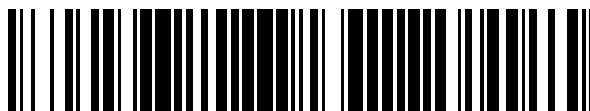


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 717**

51 Int. Cl.:
A61K 31/496 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07846860 .0**
96 Fecha de presentación: **27.11.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2139482**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.01.2010**

54 Título: **Tratamiento del mieloma múltiple**

30 Prioridad:
27.11.2006 US 861120 P
28.02.2007 US 904138 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.03.2012

73 Titular/es:
ARES TRADING S.A.
ZONE INDUSTRIELLE DE L'OURIETTAZ
1170 AUBONNE, CH

72 Inventor/es:
JOURDAN, Michel;
DREANO, Michel y
KLEIN, Bernard

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

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).

ES 2 377 717 T3

DESCRIPCIÓN

Tratamiento del mieloma múltiple

Solicitudes relacionadas

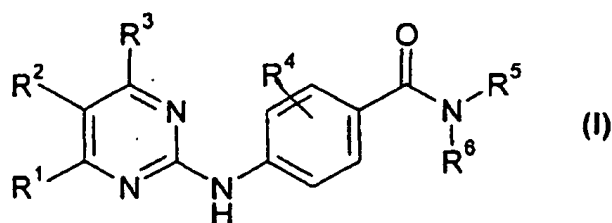
- 5 Esta solicitud reclama el beneficio de la solicitud provisional de E.U.A. No. 60/861.120, presentada el 27 de noviembre de 2006, y la solicitud provisional de E.U.A. No. 60/904.138, presentada el 28 de febrero de 2007.

Antecedentes de la invención

- 10 El mieloma múltiple es un cáncer de las células plasmáticas. Las células plasmáticas son células del sistema inmune en la médula ósea que producen anticuerpos para combatir enfermedades e infecciones. Durante el desarrollo, pueden aparecer anomalías genéticas que producen células plasmáticas malignas o células de mieloma múltiple. Estas células viajan a través del torrente sanguíneo y se reúnen en la médula ósea, donde causan daño permanente al tejido sano. Debido a que muchos órganos pueden ser afectados por el mieloma múltiple, los síntomas y signos son variables. Los síntomas comunes incluyen lesiones óseas, niveles elevados de calcio, insuficiencia renal, anemia y deterioro de las capacidades inmunitarias. El daño óseo es causado por la rápida proliferación de células de mieloma y liberación de IL-6, conocida como factor activador de los osteoclastos, que estimula a que los osteoclastos degraden el hueso. La degradación del hueso puede hacer también que el nivel de calcio en el torrente sanguíneo aumente, una condición denominada hipercalcemia. Puesto que las células de mieloma desplazan a las células normales en la médula ósea, la producción de células sanguíneas normales se deteriora también. Una reducción en el número de glóbulos blancos puede aumentar el riesgo de infección, mientras que la disminución de la producción de glóbulos rojos puede producir anemia. Una reducción de las plaquetas puede impedir la coagulación sanguínea normal. Además, el exceso de proteína M y de proteína de cadena ligera producida por las células de mieloma puede espesar la sangre. Estas proteínas pueden dañar también a los riñones y deteriorar su función. Pueden aparecer problemas circulatorios en los riñones cuando las células de mieloma espesan la sangre. Además, la hipercalcemia hace trabajar en exceso a los riñones, dando como resultado una reducción de la excreción de calcio, un aumento de la producción de orina y del potencial de deshidratación.
- 25 El mieloma múltiple es el segundo cáncer de la sangre más frecuente después del linfoma no Hodgkin. Representa aproximadamente el 1 % de todos los cánceres y el 2 % de todas las muertes por cáncer. Hasta la fecha, no existe ningún tratamiento que produzca la recuperación completa y duradera de la enfermedad. Por lo tanto, existe la necesidad de nuevos métodos de tratamiento para el mieloma múltiple.

Sumario de la invención

- 30 La presente invención se refiere a un método para tratar el mieloma múltiple en un sujeto que necesita del mismo. El método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto según la fórmula I, o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El mieloma múltiple a tratar puede estar en cualquiera de las etapas, categorías y estado de enfermedad descritos más adelante.

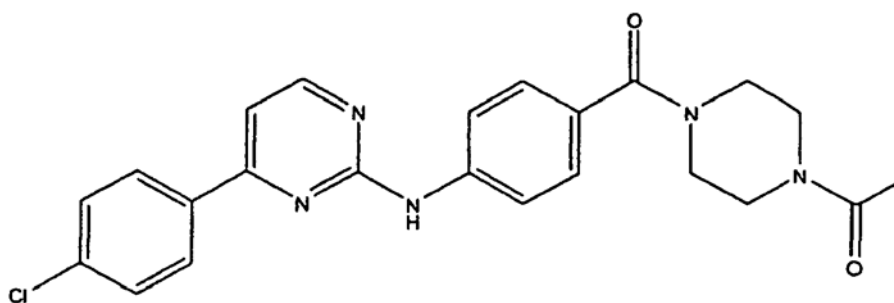


Fórmula I

- 35 La presente invención se basa al menos en parte sobre el descubrimiento de que los compuestos según la fórmula I, pueden inhibir la proliferación de muchas líneas celulares de mieloma (Ejemplo 1). Estos compuestos pueden presentar también un efecto inhibitor sobre la supervivencia de células de mieloma primarias sin que afecten a la supervivencia de otras células de la médula ósea, cuando las células de la médula ósea de pacientes con mieloma fueron tratadas con dichos compuestos (Ejemplo 4). Cuando se usan en combinación con Velcade o melfalán, estos compuestos muestran un efecto aditivo sobre la inhibición de la proliferación de las células de mieloma (Ejemplo 3).

Breve descripción de los dibujos

El compuesto A, como se usa en los ejemplos y figuras, es 1-(4-{4-[4-(4-cloro-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-benzoil}-piperazin-1-il)-etanona.



Compuesto A

La FIG. 1 es un gráfico de barras que muestra los efectos inhibidores del compuesto A (IC_{50} en μM para la figura 1A, e IC_{90} en μM para la figura 1B) sobre la proliferación de 14 líneas celulares de mieloma.

- 5 La FIG. 2 es una representación gráfica que muestra la inducción dependiente del tiempo de la apoptosis de las células XG-12 tratadas con el compuesto A.

La FIG. 3 es una representación gráfica que muestra los efectos inhibidores de concentraciones crecientes de compuesto A sobre la proliferación de las células XG-3 con o sin Velcade a una concentración que induce el 10 % (IC_{10}) o el 50 % (IC_{50}) de inhibición de la proliferación de las células XG-3.

- 10 La FIG. 4 es una representación gráfica que muestra los efectos inhibidores de concentraciones crecientes de compuesto A sobre la proliferación de las células XG-12 con o sin melfalán a una concentración que induce el 10 % (IC_{10}) o el 50 % (IC_{50}) de inhibición de la proliferación de las células XG-12.

La FIG. 5 es un gráfico de barras que muestra el efecto del compuesto A sobre la supervivencia *ex vivo* de células de mieloma primarias $CD138^+$ de 5 pacientes con mieloma múltiple recién diagnosticado.

- 15 La FIG. 6 es un gráfico de barras que muestra el efecto del compuesto A sobre la supervivencia *ex vivo* de células de médula ósea no de mieloma de 5 pacientes con mieloma múltiple recién diagnosticado.

La FIG. 7 es un gráfico de barras que muestra el efecto del compuesto A sobre la supervivencia *ex vivo* de células precursoras hematopoyéticas $CD34^+$ de 5 pacientes con mieloma múltiple recién diagnosticado.

- 20 La FIG. 8 es un gráfico de barras que muestra el efecto del compuesto A sobre la supervivencia *ex vivo* de células de mieloma primarias $CD138^+$ de 5 pacientes con mieloma múltiple recurrente.

La FIG. 9 es un gráfico de barras que muestra el efecto del compuesto A sobre la supervivencia *ex vivo* de células de médula ósea no de mieloma de 5 pacientes con mieloma múltiple recurrente.

La FIG. 10 es un gráfico de barras que muestra el efecto del compuesto A sobre la supervivencia *ex vivo* de células precursoras hematopoyéticas $CD34^+$ de 5 pacientes con mieloma múltiple recurrente.

25 Descripción detallada de la invención

"Ariilo" se refiere a un grupo carbocíclico aromático insaturado de 6 a 14 átomos de carbono que tiene un único anillo (por ejemplo, fenilo) o múltiples anillos condensados (por ejemplo, naftilo). Los ariilos preferidos incluyen fenilo, naftilo, fenantrenilo, y similares.

- 30 "Alquilarilo" se refiere a un alquilo que tiene al menos un átomo de hidrógeno del alquilo reemplazado con un resto ariilo, tal como bencilo, $-(CH_2)_2$ fenilo, $-(CH_2)_3$ fenilo, $-CH$ (fenilo) $_2$, y similares.

- 35 "Alquilo" se refiere a un alquilo saturado o insaturado de cadena lineal o ramificada, o a un hidrocarburo cíclico o no cíclico, que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, mientras que "alquilo inferior" o "alquilo C_1 - C_6 " tiene el mismo significado, pero solamente tiene 1 a 6 átomos de carbono. Los alquilos de cadena lineal saturados representativos incluyen metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo, y similares; mientras que los alquilos ramificados saturados incluyen isopropilo, sec-butilo, isobutilo, terc-butilo, isopentilo, y similares. Los alquilos insaturados contienen al menos un doble o triple enlace entre átomos de carbono adyacentes (denominados también un "alqueno" o "alquino", respectivamente). Los alquenos de cadena lineal y ramificada representativos incluyen etilenilo, propilenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-metil-1-butenilo, 2-metil-2-butenilo, 2,3-dimetilo, 2-butenilo, y similares; mientras que los alquinos de cadena lineal y ramificada representativos incluyen acetilenilo, propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo, 3-metil-1-butinilo, y similares. Los "alquilos cíclicos" saturados representativos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, y similares; mientras que los alquilos cíclicos insaturados incluyen ciclopentenilo y ciclohexenilo, y similares. Los cicloalquilos se mencionan también en esta memoria como sistemas de anillos "carbocíclicos", e incluyen sistemas

de anillos bicíclicos y tricíclicos que tienen de 8 a 14 átomos de carbono, tales como un cicloalquilo (tal como ciclopentano o ciclohexano) fusionado con uno o más anillos carbocíclicos aromáticos (tal como fenilo) o no aromáticos (tal como ciclohexano).

5 "Alcoxi" se refiere a -O-(alquilo) o -O-(arilo), tal como metoxi, etoxi, n-propiloxi, isopropiloxi, n-butiloxi, iso-butiloxi, fenoxi, y similares.

"Alquenilo C₂-C₆" se refiere a grupos alquenilo que tienen con preferencia de 2 a 6 átomos de carbono, y que tienen al menos 1 o 2 sitios de insaturación alquénica. Los grupos alquenilo preferidos incluyen etenilo (-CH=CH₂), n-2-propenilo (-CH₂CH=CH₂), y similares.

10 "Alquinilo C₂-C₆" se refiere a grupos alquinilo que tienen con preferencia de 2 a 6 átomos de carbono, y que tienen al menos 1 o 2 sitios de insaturación alquínica; los grupos alquinilo preferidos incluyen etinilo (-C≡CH), propargilo (-CH₂C≡CH), y similares.

"Halógeno" se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo.

"Ceto" se refiere a un grupo carbonilo (es decir, C=O).

15 "Heteroarilo" se refiere a un anillo heterocíclico aromático de 5 a 10 miembros y que tiene al menos un heteroátomo seleccionado de nitrógeno, oxígeno y azufre, y que contiene al menos un átomo de carbono, incluyendo tanto los sistemas de anillos monocíclicos como los bicíclicos. Son heteroarilos representativos piridilo, furilo, benzofuranilo, tiofenilo, benzotiofenilo, quinolinilo, pirrolilo, indolilo, oxazolilo, benzoxazolilo, imidazolilo, bencimidazolilo, tiazolilo, benzotiazolilo, isoxazolilo, pirazolilo, isotiazolilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo, cinolinilo, ftalazinilo y quinazolinilo.

20 "Heteroalquilarilo" se refiere a un alquilo que tiene al menos un átomo de hidrógeno del alquilo reemplazado con un resto heteroarilo, tal como -CH₂-piridinilo, -CH₂-pirimidinilo, y similares.

25 "Heterocicloalquilo" o "heterociclo" se refiere a un anillo heterocíclico que contiene de 5 a 10 átomos en el anillo. Específicamente, un anillo heterocíclico monocíclico de 5 a 7 miembros o bicíclico de 7 a 10 miembros, que es saturado, insaturado o aromático, y que contiene de 1 a 4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre, y en el que los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados, y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado, incluyendo los anillos bicíclicos en los que alguno de los heterociclos anteriores está fusionado con un anillo de benceno. El heterociclo puede estar unido por medio de cualquier heteroátomo o átomo de carbono. Los heterociclos incluyen los heteroarilos como se han definido anteriormente. Por lo tanto, en adición a los heteroarilos listados anteriormente, los heterociclos incluyen también morfolinilo, pirrolidinonilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, hidantoinilo, valerolactamilo, oxiranilo, oxetanilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, tetrahidropiridinilo, tetrahidropirimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo, tetrahidropirimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo, y similares.

30 "Alquilheterocicloalquilo" se refiere a un alquilo que tiene al menos un átomo de hidrógeno del alquilo reemplazado con un heterociclo, tal como 2-(1-pirrolidinil)etilo, 4-morfolinilmetilo, (1-metil-4-piperidinil)metilo, y similares.

35 El término "sustituido", como se usa en esta memoria, se refiere a cualquiera de los grupos anteriores (es decir, alquilo, arilo, alquilarilo, heterocicloalquilo y heterocicloalquilo) en el que al menos un átomo de hidrógeno está reemplazado con un sustituyente. En el caso de un sustituyente ceto ("C(=O)"), están reemplazados dos átomos de hidrógeno. Los sustituyentes incluyen halógeno, hidroxilo, alquilo, alquilo sustituido (tal como haloalquilo, aminoalquilo monosustituido o completamente sustituido, alquiloxialquilo, y similares), arilo, arilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heterocicloalquilo, heterocicloalquilo sustituido, alquilheterocicloalquilo, alquilheterocicloalquilo sustituido, -NR_aR_b, -NR_aC(=O)R_b, -NR_aC(=O)NR_aR_b, -NR_aC(=O)OR_b, -NR_aSO₂R_b, -OR_a, -C(=O)R_a, -C(=O)OR_a, -C(=O)NR_aR_b, -OC(=O)R_a, -OC(=O)OR_a, -OC(=O)NR_aR_b, -NR_aSO₂R_b, o un radical de la fórmula Y-Z-R_a, en la que Y es alcanodiilo, alcanodiilo sustituido, o un enlace directo, Z es -O-, -S-, S(=O)-, -S(=O)₂-, -N(R_b)-, -C(=O)-, -C(=O)O-, -OC(=O)-, -N(R_b)C(=O)-, -C(=O)N(R_b)-, o un enlace directo, donde R_a y R_b son iguales o diferentes, y son independientemente hidrógeno, amino, alquilo, alquilo sustituido (incluyendo alquilo halogenado), arilo, arilo sustituido, alquilarilo, alquilarilo sustituido, heterocicloalquilo, heterocicloalquilo sustituido, alquilheterocicloalquilo o alquilheterocicloalquilo sustituido, o donde R_a y R_b considerados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un heterociclo o heterociclo sustituido.

50 "Haloalquilo" se refiere a un alquilo que tiene uno o más átomos de hidrógeno reemplazados con halógeno, tal como -CF₃.

"Hidroxialquilo" significa alquilo que tiene uno o más átomos de hidrógeno reemplazados con hidroxilo, tal como -CH₂OH.

55 "Sulfonilo" se refiere a un grupo "-SO₂-R", en el que R se selecciona de H, arilo, heteroarilo, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido con halógeno (por ejemplo, un grupo -SO₂-CF₃), alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₈, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, arilalquilo C₁-C₆, heteroarilalquilo C₁-C₆, arilalquenilo C₂-C₆, heteroarilalquenilo

C₂-C₆, arilalquinilo C₂-C₆, heteroarilalquinilo C₂-C₆, cicloalquilalquilo C₁-C₆ o heterocicloalquilalquilo C₁-C₆.

"Sulfinilo" se refiere a un grupo "-S(O)-R", en el que R se selecciona de H, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido con halógeno (por ejemplo, un grupo -SO₂-CF₃), alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₈, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, arilalquilo C₁-C₆, heteroarilalquilo C₁-C₆, arilalquenilo C₂-C₆, heteroarilalquenilo C₂-C₆, arilalquinilo C₂-C₆, heteroarilalquinilo C₂-C₆, cicloalquilalquilo C₁-C₆ o heterocicloalquilalquilo C₁-C₆.

"Sulfanilo" se refiere a un grupo "-S-R", en el que R se selecciona de H, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido con halógeno (por ejemplo, un grupo -SO₂-CF₃), alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₈, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, arilalquilo C₁-C₆, heteroarilalquilo C₁-C₆, arilalquenilo C₂-C₆, heteroarilalquenilo C₂-C₆, arilalquinilo C₂-C₆, heteroarilalquinilo C₂-C₆, cicloalquilalquilo C₁-C₆ o heterocicloalquilalquilo C₁-C₆. Los grupos sulfanilo preferidos incluyen metilsulfanilo, etilsulfanilo, y similares.

"Carboxilo" se refiere a -COOH.

"Amino" se refiere al grupo -NRR', en el que cada R, R' es independientemente hidrógeno o alquilo C₁-C₆, arilo, heteroarilo, arilalquilo C₁-C₆, heteroarilalquilo C₁-C₆, cicloalquilo o heterocicloalquilo, y en el que R y R', junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, pueden formar opcionalmente un anillo de heterocicloalquilo de 3 a 8 miembros.

"Amonio" se refiere a un grupo -N⁺RR'R" cargado positivamente, en el que cada R, R', R" es independientemente alquilo C₁-C₆, arilalquilo C₁-C₆, heteroarilalquilo C₁-C₆, cicloalquilo o heterocicloalquilo, y en el que R y R', junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, pueden formar opcionalmente un anillo de heterocicloalquilo de 3 a 8 miembros.

"HCl" significa la sal hidrocioruro, de los compuestos representados por su estructura química.

"Heterociclo no aromático que contiene nitrógeno" significa morfolinilo, tiomorfolinilo, pirrolidinonilo, pirrolidinilo, piperidinilo, homopiperidinilo, piperazinilo, homopiperazinilo, hidantoinilo, tetrahidropiridinilo, tetrahidropirimidinilo, oxazolidinilo, tiazolidinilo, indolinilo, isoindolinilo, tetrahidroquinolinilo, tetrahidroisoquinolinilo, y similares.

"Sales o complejos farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales o complejos de los compuestos descritos en esta memoria. Ejemplos de dichas sales incluyen, pero sin limitarse a ellas, las sales que se forman con ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico, y similares), así como las sales formadas con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido málico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido pamoico, ácido algínico, ácido poliglútamico, ácido naftalensulfónico, ácido metanosulfónico, ácido naftalendisulfónico y ácido poligalacturónico, así como las sales formadas con aminoácidos básicos tales como lisina o arginina.

Además, se pueden preparar sales de los compuestos que contienen un ácido carboxílico u otro u otros grupos funcionales ácidos, por reacción con una base adecuada. Dicha sal farmacéuticamente aceptable se puede preparar con una base que disponga de un catión farmacéuticamente aceptable, lo que incluye las sales de metal alcalino (especialmente sodio y potasio), sales de metal alcalinotérreo (especialmente calcio y magnesio), sales de aluminio y sales de amonio, así como las sales preparadas a partir de bases orgánicas fisiológicamente aceptables tales como trimetilamina, trietilamina, morfolina, piridina, piperidina, picolina, dicitlohexilamina, N,N'-dibenciletilendiamina, 2-hidroxiethylamina, bis-(2-hidroxiethyl)amina, tri-(2-hidroxiethyl)amina, procaína, dibencilpiperidina, N-bencil-β-fenetilamina, deshidroabietilamina, N,N'-bisdeshidroabietilamina, glucamina, N-metilglucamina, colidina, quinina, quinolina, y aminoácidos básicos tales como lisina y arginina.

La presente invención está dirigida a un método para tratar a un sujeto con mieloma múltiple, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto según la fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

El mieloma múltiple es un cáncer de las células plasmáticas. La etapa del mieloma múltiple se puede determinar usando el International Staging System (ISS). El ISS se basa en la evaluación de dos resultados del análisis de sangre, la β₂-microglobulina (β₂-M) y la albúmina, que en conjunto demostraron ser el factor más potente de pronóstico para el mieloma múltiple entre muchos factores analizados. Los criterios para determinar diferentes etapas según el International Staging System para el mieloma, se listan a continuación:

- Etapa I: β₂-M <3,5 mg/dL y albúmina ≥3,5 g/dL
- Etapa II: β₂-M <3,5 mg/dL o β₂-M 3,5 - 5,5 mg/dL, y albúmina <3,5 g/dL (ni etapa I ni etapa III)
- Etapa III: β₂-M >5,5 mg/dL

Los pacientes con mieloma múltiple se clasifican típicamente en una de varias categorías de mieloma. El mieloma múltiple puede ser asintomático o sintomático. Los pacientes con mieloma asintomático no muestran deterioro de

órganos o tejidos ni síntomas relacionados. El deterioro de órganos o tejidos relacionado con el mieloma incluye hipercalcemia, deterioro de la función renal, anemia y lesiones óseas. El mieloma asintomático incluye el mieloma múltiple latente (SMM), el mieloma múltiple indoloro (IMM) y la etapa I del mieloma múltiple. El mieloma múltiple latente se caracteriza por la proteína monoclonal y un ligero aumento del número de células plasmáticas en la médula ósea. El mieloma múltiple indoloro se caracteriza por pequeñas cantidades de proteína monoclonal o un aumento del número de células plasmáticas en la médula ósea.

Los pacientes con mieloma múltiple se caracterizan también por el estado de su enfermedad. El estado de la enfermedad se determina basándose en si el paciente ha recibido ya tratamiento, y si es así, en el resultado. Los pacientes con la enfermedad recientemente diagnosticada son individuos que tienen mieloma que todavía no ha sido tratado. Los pacientes que han recibido tratamiento, pertenecen a varias categorías:

- *Enfermedad sensible:* se refiere a mieloma que está respondiendo a la terapia. Ha habido una disminución de la proteína M de al menos un 50 %.
- *Enfermedad estable:* se refiere a mieloma que no ha respondido al tratamiento (es decir, la disminución de la proteína M no ha alcanzado el 50 %), pero que no ha progresado (ha empeorado).
- *Enfermedad progresiva:* se refiere a mieloma activo que está empeorando (es decir, con aumento de la proteína M y empeoramiento del deterioro de órganos o tejidos). En la mayoría de los casos, la enfermedad recurrente y/o refractaria puede ser considerada como enfermedad progresiva.
- *Enfermedad recurrente:* se refiere a la enfermedad de mieloma que respondió inicialmente a la terapia, pero que después ha comenzado a progresar de nuevo. Los pacientes se pueden clasificar además como habiendo recaído después de la terapia inicial o después de la terapia subsiguiente.
- *Enfermedad refractaria:* se refiere a mieloma que no ha respondido a la terapia inicial, así como a mieloma recurrente que no responde al tratamiento subsiguiente. En este último caso, el mieloma se puede denominar también enfermedad recurrente y refractaria.

La presente invención proporciona métodos para tratar a un sujeto con mieloma múltiple, que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto según la fórmula I, o su sal farmacéuticamente aceptable. El mieloma múltiple a tratar puede estar en cualquiera de las etapas, categorías y estado de la enfermedad descritos anteriormente.

De acuerdo con los métodos de la presente invención, un compuesto según la fórmula I, o su sal farmacéuticamente aceptable, se puede usar solo o en combinación con al menos otro agente terapéutico usado para reducir uno o más síntomas de mieloma múltiple. El compuesto según la fórmula I, o su sal farmacéuticamente aceptable, se puede administrar concurrentemente con el otro agente terapéutico, que puede ser parte de la misma composición, o puede estar en una composición diferente de la que comprende el compuesto según la fórmula I, o su sal farmacéuticamente aceptable. Alternativamente, el compuesto según la fórmula I, o su sal farmacéuticamente aceptable, se puede administrar antes o después de la administración del otro agente terapéutico. Un compuesto según la fórmula I, o su sal farmacéuticamente aceptable, se puede administrar por la misma o diferente vía de administración que el otro agente terapéutico. Dicho agente terapéutico puede consistir en agentes quimioterapéuticos, agentes terapéuticos de soporte, o una combinación de los mismos.

Como se usa en esta memoria, un "agente quimioterapéutico" es un agente que es tóxico para las células cancerosas. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos que se pueden usar en la presente invención incluyen bortezomib (Velcade®, Millennium), melfalán, prednisona, vincristina, carmustina, ciclofosfamida, dexametasona, talidomida, doxorubicina, cisplatino, etopósido y citarabina. En una realización específica, un compuesto según la fórmula I, o su sal farmacéuticamente aceptable, se usa en combinación con bortezomib (Velcade®). En otra realización específica, un compuesto según la fórmula I, o su sal farmacéuticamente aceptable, se usa en combinación con melfalán.

Un "agente terapéutico de soporte", es un agente usado principalmente para reducir los síntomas y complicaciones del mieloma múltiple. Los ejemplos del agente terapéutico de soporte incluyen, pero sin limitarse a ellos, bisfosfonatos, factores de crecimiento, antibióticos, diuréticos y analgésicos.

Los ejemplos de antibióticos incluyen sulfamidas, penicilinas (por ejemplo, bencil penicilina, *P*-hidroxibencil penicilina, 2-pentenil penicilina, *N*-heptil penicilina, fenoximetil penicilina, feneticilina, metecilina, oxacilina, clocxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, nafcilina, ampicilina, amoxicilina, ciclacilina, carbenicilina, ticarcilina, piperacilina, azlocilina, mezlocilina, mecilinam, amdinocilina), cefalosporina y derivados de la misma (por ejemplo, cefalotina, cefapirina, cefacetilo, cefazolina, cefalexina, cefandina, cefadroxilo, cefamandol, cefuroxima, ceforanida, cefoxitina, cefotetán, cefaclor, cefotaxima, ceftizoxima, ceftriaxona, ceftazidima, moxalactam, cefoperazona, cefixima, ceftibuten y cefprozil), ácido oxolínico, amifloxacina, temafloxacina, ácido nalidíxico, ácido piromídico, ciprofloxacino, cinoxacino, norfloxacino, perfloxacino, rosaxacino, ofloxacino, enoxacino, ácido pipemídico, sulbactam, ácido clavulánico, ácido β-bromopenicilánico, ácido β-cloropenicilánico, ácido 6-acetilmetilen-penicilánico, cefoxazol, sultampicilina, éster de dihidrato de formaldehído de adinocilina y sulbactam, tazobactam, aztreonam, sulfazetina,

isosulfazetina, norcardicina, fenilacetamidometilfosfonato de *m*-carboxifenilo, clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, demeclociclina, doxiciclina, metaciclina y minociclina.

Ejemplos de bisfosfonatos incluyen etidronato (Didronel), pamidronato (Aredia), alendronato (Fosamax), risedronato (Actonel), zoledronato (Zometa) e ibandronato (Boniva).

- 5 Ejemplos de diuréticos incluyen derivados de tiazida, tales como amilorida, clorotiazida, hidroclorotiazida, metilclorotiazida y clortalidona.

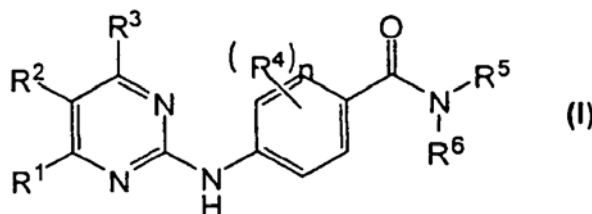
Ejemplos de factores de crecimiento incluyen el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias de macrófagos-granulocitos (GM-CSF), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulador de colonias múltiples, eritropoyetina, trombopoyetina, oncostatina M e interleucinas.

- 10 Ejemplos de analgésicos incluyen un opioide (por ejemplo, morfina), un inhibidor de la COX-2 (por ejemplo, rofecoxib, valdecoxib y celecoxib), salicilatos (por ejemplo, aspirina, trisalicilato de magnesio de colina, salsalato, diflunisal y salicilato sódico), derivados de ácido propiónico (por ejemplo, fenoprofeno calcico, ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno y naproxeno sódico), derivados de ácido indolacético (por ejemplo, indometacina, sulindac, etodolac y tolmetina), fenamatos (por ejemplo, ácido mefenámico y meclofenamato), derivados de benzotiazina u oxamicams (por ejemplo, mobic o piroxicam) o ácido pirrolacético (por ejemplo, ketorolaco).

Como se usa en esta memoria, "tratar" incluye alcanzar, parcialmente o sustancialmente, uno o más de los siguientes resultados: reducir parcial o totalmente el grado de la enfermedad; aliviar o mejorar un síntoma o indicador clínico asociado con la enfermedad; retardar, inhibir o prevenir la evolución de la enfermedad; o retardar, inhibir o prevenir parcial o totalmente el inicio o desarrollo de la enfermedad.

- 20 Un "sujeto" es un mamífero, preferiblemente un ser humano, pero puede ser también un animal que necesite tratamiento veterinario, por ejemplo, animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos, y similares), animales de granja (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos, y similares) y animales de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, cobayas, y similares).

- 25 El método de tratamiento de un sujeto que sufre de mieloma múltiple comprende la administración al sujeto, de una cantidad eficaz de un compuesto que es un derivado de anilino pirimidina de la fórmula (I):



Dichos compuestos se describen en el documento WO 02/46171 (Signal Pharmaceuticals Inc.), los cuales se describen en particular para el tratamiento de trastornos autoinmunes, enfermedades inflamatorias, enfermedades cardiovasculares, enfermedades infecciosas, ictus o cáncer.

- 30 En dichos compuestos según la fórmula (I), que incluyen las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, los sustituyentes se definen como sigue:

R^1 es un arilo o un heteroarilo opcionalmente sustituido con uno a cuatro sustituyentes seleccionados independientemente de R^7 ;

R^2 es hidrógeno;

- 35 R^3 es hidrógeno o alquilo inferior;

R^4 se selecciona, en cada caso, independientemente, del grupo que consiste en halógeno, hidroxilo, alquilo inferior y alcoxi inferior; y donde n es un entero de 0 a 4;

- 40 R^5 y R^6 son iguales o diferentes, y se seleccionan independientemente del grupo que consiste en $-R^8$, $-(CH_2)_aC(=O)R^9$, $-(CH_2)_aC(=O)OR^9$, $-(CH_2)_aC(=O)NR^9R^{10}$, $-(CH_2)_aC(=O)NR^9(CH_2)_bC(=O)R^{10}$, $-(CH_2)_aNR^9C(=O)R^{10}$, $-(CH_2)_aNR^{11}C(=O)NR^9R^{10}$, $-(CH_2)_aNR^9R^{10}$, $-(CH_2)_aOR^9$, $-(CH_2)_aSO_2R^9$ o $-(CH_2)_aSO_2NR^9R^{10}$; y R^5 y R^6 considerados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un heterociclo o heterociclo sustituido;

- 45 R^7 , en cada aparición, se selecciona independientemente del grupo que consiste en halógeno, hidroxilo, ciano, nitro, carboxi, alquilo, alcoxi, haloalquilo, aciloxi, sulfanilalquilo, sulfinalalquilo, sulfonilalquilo, hidroxialquilo, arilo, arilo sustituido, alquilarilo, alquilarilo sustituido, heterocicloalquilo, heterocicloalquilo sustituido, alquilheterocicloalquilo, alquilheterocicloalquilo sustituido, $-C(=O)OR^8$, $-OC(=O)R^8$, $-C(=O)NR^8R^9$, $-C(=O)NR^8OR^9$, $-SO_2R^8$, $-SO_2NR^8R^9$, -

$\text{NR}^8\text{SO}_2\text{R}^9$, $-\text{NR}^8\text{R}^9$, $-\text{NR}^8\text{C}(=\text{O})\text{R}^9$, $-\text{NR}^8\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_b\text{OR}^9$, $-\text{NR}^8\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_b\text{R}^9$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_b\text{NR}^8\text{R}^9$ y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido fusionado con fenilo sustituido o no sustituido;

R^8 , R^9 , R^{10} y R^{11} son iguales o diferentes, y en cada aparición se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, alquilarilo, alquilarilo sustituido, heterocicloalquilo, heterocicloalquilo sustituido, alquilheterocicloalquilo y alquilheterocicloalquilo sustituido;

o R^8 y R^9 considerados junto con el átomo o los átomos a los que están unidos, forman un heterociclo o heterociclo sustituido;

a y b son iguales o diferentes, y en cada aparición se seleccionan independientemente del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3 o 4; y

c en cada aparición es 0, 1 o 2.

En una realización de la invención, R^1 es un arilo o un heteroarilo sustituido o no sustituido. Cuando R^1 es sustituido, está sustituido con uno o más sustituyentes que se definen más adelante. Con preferencia, cuando es sustituido, R^1 está sustituido con un halógeno, sulfonilo o sulfonamida.

En otra realización de la invención, R^1 se selecciona del grupo que consiste en un arilo, furilo, benzofuranilo, tiofenilo, benzotiofenilo, quinolinilo, pirrolilo, indolilo, oxazolilo, benzoxazolilo, imidazolilo, bencimidazolilo, tiazolilo, benzotiazolilo, isoxazolilo, pirazolilo, isotiazolilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo, cinolinilo, ftalazinilo y quinazolinilo, sustituidos o no sustituidos.

En otra realización de la invención, R^1 es un arilo sustituido o no sustituido, preferiblemente un fenilo sustituido o no sustituido. Cuando R^1 es un arilo sustituido, el arilo está sustituido con uno o más sustituyentes definidos más adelante.

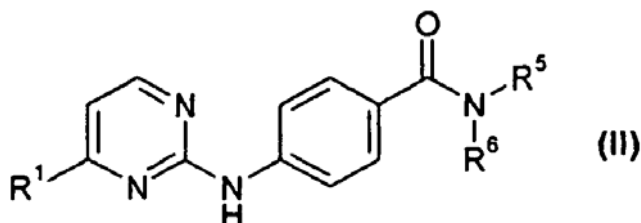
Preferiblemente, cuando R^1 es un arilo sustituido, está sustituido con un halógeno, sulfonilo o sulfonamida.

En otra realización de la invención, R^5 y R^6 , considerados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un heterociclo no aromático que contiene nitrógeno sustituido o no sustituido, preferiblemente morfolinilo sustituido o no sustituido, tiomorfolinilo sustituido o no sustituido, pirrolidinonilo sustituido o no sustituido, pirrolidinilo sustituido o no sustituido, piperidinilo sustituido o no sustituido, homopiperidinilo sustituido o no sustituido, piperazinilo sustituido o no sustituido, homopiperazinilo sustituido o no sustituido, hidantoinilo sustituido o no sustituido, tetrahidropiridinilo sustituido o no sustituido, tetrahidropirimidinilo sustituido o no sustituido, oxazolidinilo sustituido o no sustituido, tiazolidinilo sustituido o no sustituido, indolinilo sustituido o no sustituido, isoindofinilo sustituido o no sustituido, tetrahydroquinolinilo sustituido o no sustituido o tetrahydroisoquinolinilo sustituido o no sustituido.

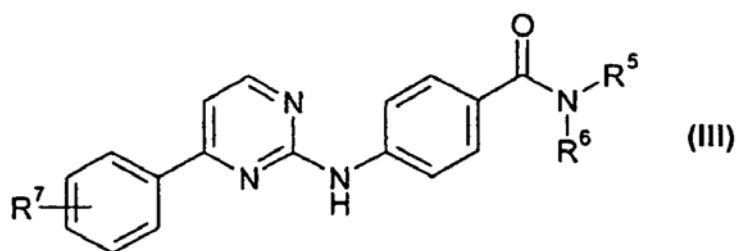
Cuando R^5 y R^6 , considerados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un piperazinilo sustituido o no sustituido, un piperidinilo sustituido o no sustituido o un morfolinilo sustituido o no sustituido, el piperazinilo sustituido, el piperidinilo sustituido o el morfolinilo sustituido, están sustituidos con uno o más sustituyentes definidos a continuación.

Preferiblemente, cuando están sustituidos, el sustituyente es alquilo, amino, alquilamino, alquiléter, acilo, pirrolidinilo o piperidinilo.

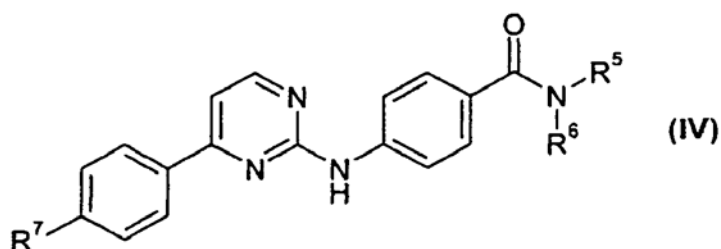
En una realización de la invención, R^2 , R^3 y R^4 son hidrógeno, y los compuestos de esta invención tienen la siguiente fórmula (II):



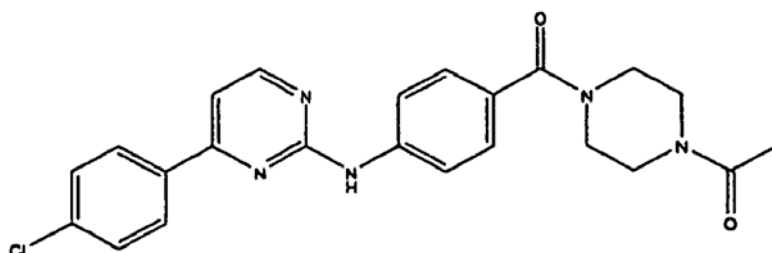
En una realización más específica de la invención, R^1 es un fenilo opcionalmente sustituido con R^7 , y tiene la siguiente fórmula (III):



En otra realización más de la invención, R^7 está en la posición *para* del anillo de fenilo, como se representa por la siguiente fórmula (IV):



- 5 En otra realización más de la invención, el derivado de anilino pirimidina es el compuesto A: 1-(4-{4-[4-(4-cloro-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-benzoyl}-piperazin-1-il)-etanona.



Compuesto A

- 10 En otra realización, la invención es un compuesto representado por la fórmula estructural (I), (II), (III) o (IV), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con la condición de que el compuesto A o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, están excluidos.

Los compuestos según las fórmulas I a IV y el compuesto A se pueden preparar por los métodos descritos en el documento WO 02/46171 A2 (Signal Pharmaceuticals Inc.), cuyo contenido completo se incorpora a esta memoria como referencia.

- 15 En una realización, el sujeto que está siendo tratado con un compuesto según la fórmula I, o su sal farmacéuticamente aceptable, solo o en combinación con otros agentes terapéuticos, está siendo sometido a radioterapia. En otra realización, el sujeto que está siendo tratado con un compuesto según la fórmula I, o su sal farmacéuticamente aceptable, solo o en combinación con otros agentes terapéuticos, está en preparación para un trasplante de células madre. Un compuesto según la fórmula I, o su sal farmacéuticamente aceptable, solo o en combinación con otros agentes terapéuticos, se puede usar como una terapia de inducción para reducir la carga tumoral antes de un trasplante de células madre. En otra realización, el sujeto que está siendo tratado con un compuesto según la fórmula I, o su sal farmacéuticamente aceptable, solo o en combinación con otros agentes terapéuticos, está sufriendo un trasplante de células madre.

- 25 Cuando un compuesto según la fórmula I, o su sal farmacéuticamente aceptable, es denominado o descrito por su estructura, se debe entender que se incluyen también los solvatos o hidratos del compuesto. El término "solvatos" se refiere a formas cristalinas en las que se incorporan moléculas de disolvente en la red cristalina durante la cristalización. El solvato puede incluir agua o disolventes no acuosos tales como etanol, isopropanol, DMSO, ácido acético, etanolamina y EtOAc. Los solvatos, en los que el agua es la molécula de disolvente incorporada en la red cristalina, se denominan típicamente "hidratos". Los hidratos incluyen hidratos estequiométricos, así como composiciones que contienen cantidades variables de agua.

Además, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto según la fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como ingrediente activo junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 El término "composición farmacéutica" significa uno o más ingredientes activos, y uno o más ingredientes inertes que constituyen el vehículo, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de la combinación, formación de complejos o agregación de cualquiera de dos o más de los ingredientes, o de la disociación de uno o más de los ingredientes, o de otros tipos de reacciones o interacciones de uno o más de los ingredientes. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención abarcan cualquier composición preparada mezclando un compuesto de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 Las composiciones incluyen composiciones adecuadas para administración oral, rectal, tópica, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular e intravenosa), ocular (oftálmica), pulmonar (inhalación nasal o bucal) o nasal, aunque la vía más adecuada en cualquier caso dado dependerá de la naturaleza y severidad de las condiciones que están siendo tratadas, y de la naturaleza del ingrediente activo. Se pueden presentar convenientemente en formas farmacéuticas unitarias, y se pueden preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia.

15 En la práctica, un compuesto según la fórmula I se puede combinar como el ingrediente activo en mezcla con un vehículo farmacéutico de acuerdo con técnicas de elaboración farmacéutica convencionales. El vehículo puede tomar una amplia variedad de formas, dependiendo de la forma de preparación deseada para administración, por ejemplo, oral o parenteral (incluyendo intravenosa). En la preparación de las composiciones para formas farmacéuticas orales, se pueden usar cualquiera de los medios farmacéuticos usuales tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes, y similares, en el caso de preparaciones líquidas orales tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones; o vehículos tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes de desintegración, y similares en el caso de preparaciones sólidas orales tales como, por ejemplo, polvos, 20 cápsulas duras y blandas y comprimidos, siendo preferidas las preparaciones orales sólidas sobre las preparaciones líquidas.

Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan la forma unitaria de dosificación oral más ventajosa, en cuyo caso se usan obviamente vehículos farmacéuticos sólidos. Si se desea, los comprimidos pueden ser recubiertos usando técnicas estándar acuosas o no acuosas. Dichas composiciones y preparaciones deben contener al menos 0,1 por ciento de compuesto activo. El porcentaje de compuesto activo en estas composiciones, naturalmente puede variar, y puede estar convenientemente entre aproximadamente 2 por ciento a aproximadamente 60 por ciento del peso de la unidad. La cantidad de compuesto activo en dichas composiciones terapéuticamente útiles es tal, que se obtenga una dosificación eficaz. Un compuesto activo según la fórmula I se puede administrar también intranasalmente como, por ejemplo, en gotas líquidas o pulverización.

30 Los comprimidos, píldoras, cápsulas, y similares, pueden contener también un aglutinante tal como goma de tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente de desintegración tal como almidón de maíz, almidón de patata o ácido algínico; un lubricante tal como estearato de magnesio; y un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina. Cuando la forma farmacéutica unitaria es una cápsula, puede contener, en adición a los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido tal como un aceite 40 graso.

Otros materiales distintos pueden estar presentes como recubrimientos, o para modificar la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos pueden ser recubiertos con shellac, azúcar, o ambos. Un jarabe o elixir puede contener, además del ingrediente activo, sacarosa como un agente edulcorante, metilparabenos y propilparabenos como conservantes, un colorante y un aromatizante tal como sabor de cereza o naranja.

45 Un compuesto según la fórmula I se puede administrar también parenteralmente. Se pueden preparar soluciones o suspensiones del compuesto activo en agua mezclados adecuadamente con un agente tensioactivo tal como hidroxipropilcelulosa. Se pueden preparar también dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos en aceites. Bajo condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante que evita el crecimiento de microorganismos.

50 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable, incluyen dispersiones o soluciones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o soluciones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que sea fácil de aplicar por jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y se debe preservar contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), mezclas 55 adecuadas de los mismos, y aceites vegetales.

Se puede usar cualquier vía de administración adecuada para proporcionar a un mamífero, especialmente un ser humano, una dosis eficaz de un compuesto de la presente invención. Por ejemplo, se puede usar la vía oral, rectal,

tópica, parenteral, ocular, pulmonar, nasal, y similares. Las formas farmacéuticas incluyen comprimidos, trociscos, dispersiones, suspensiones, soluciones, cápsulas, cremas, pomadas, aerosoles, y similares. Preferiblemente, un compuesto según la fórmula I se administra oralmente.

El término "cantidad eficaz", es la cantidad de compuesto con la que se logra un resultado clínico beneficioso cuando el compuesto se administra a un sujeto. Un "resultado clínico beneficioso" incluye el alivio o mejora de los síntomas clínicos de la enfermedad; la prevención, inhibición o retraso en la recurrencia de los síntomas de la enfermedad o de la enfermedad misma y/o un incremento en la longevidad del sujeto, en comparación con la ausencia del tratamiento, o de la prevención, inhibición o retraso en la evolución de los síntomas de la enfermedad o de la enfermedad misma. La cantidad precisa de compuesto (u otro agente terapéutico) administrada a un sujeto, dependerá del tipo y de la gravedad de la enfermedad o condición y de las características del sujeto, tales como salud general, edad, sexo, peso corporal y tolerancia a los fármacos. Dependerá también del grado, severidad y tipo de enfermedad. El experto en la técnica será capaz de determinar las dosificaciones adecuadas, dependiendo de éstos y otros factores. Cuando se co-administra con otro agente terapéutico, una "cantidad eficaz" del segundo agente dependerá del tipo de fármaco usado. La dosificación eficaz puede variar, dependiendo del modo de administración.

Un compuesto según la fórmula I se puede administrar a una dosificación diaria de aproximadamente 0,1 miligramos a aproximadamente 100 miligramos por kilogramo de peso corporal del animal, preferiblemente dada como una dosis diaria individual o en dosis divididas dos a seis veces al día, o en forma de liberación sostenida. Para la mayoría de los grandes mamíferos, la dosificación diaria total es de aproximadamente 1,0 miligramos a aproximadamente 1000 miligramos, preferiblemente de aproximadamente 1 miligramo a aproximadamente 50 miligramos. En el caso de un ser humano adulto de 70 kg, la dosis diaria total será generalmente de aproximadamente 7 miligramos a aproximadamente 350 miligramos. Este régimen de dosificación se puede ajustar para obtener la respuesta terapéutica óptima.

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, que de ninguna manera se pretende que sean limitativos.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

1. Líneas celulares y ensayo de proliferación celular

Caracterización y mantenimiento

Se realizaron pases de líneas celulares de mieloma cada 3-4 días en medio RPMI1640 y suero de ternera fetal (FCS) al 10 %. Para las líneas celulares dependientes de IL-6, se añadieron 2 ng/ml de IL-6 recién descongelada (Abcys, Francia) al inicio del cultivo. Cada línea de células tiene características fenotípicas y de HLA únicas, que hacen posible verificar periódicamente su identidad.

Las siguientes líneas celulares se obtuvieron en el laboratorio de B. Klein: XG-1, XG-2, XG-3, XG-4, XG-6, XG-7, XG-11, XG-12, XG-13, XG-14, XG-19 y XG-20 (Zhang, *et al.*, 1994; Rebouissou, *et al.*, 1998).

Las líneas de células RPMI8226 y L363 se adquirieron de la ATCC.

Ensayo de proliferación celular

Se recogieron células de mieloma en la fase de crecimiento exponencial (el día 3 después del pase de cultivo, cuando la concentración de células era de alrededor de 5×10^5 células/ml). Se lavaron las células dos veces, se cultivaron durante 3 horas en RPMI1640 y FCS al 10 %, y se lavaron dos veces. Esto hace posible separar los factores de crecimiento unidos a las células (en particular, IL-6 recombinante). Después, las células se siembran en microplacas de fondo plano de 96 pocillos a diferentes concentraciones, dependiendo de su tiempo de duplicación:

- 5×10^3 células/pocillo en 100 μ l para las líneas de células: XG-1 y XG-7
- 10^4 células/pocillo en 1000 μ l para las líneas de células: XG-2, XG-4, XG-6, XG-11, RPMI8226 y L363
- 2×10^4 células/pocillo en 100 μ l para las líneas de células: XG-3, XG-12, XG-13, XG-14, XG-19 y XG-20

Los medios de cultivo usados fueron:

- RPMI1640, FCS al 10 % y 0,5 ng/ml de IL-6 para las células XG-1, XG-2, XG-3, XG-4, XG-6, XG-7, XG-11, XG-12, XG-13, XG-19 y XG-20
- X-VIVO20 y 0,5 ng/ml de IL-6 para células XG-14
- RPMI1640 y FCS al 10 % para las células RPMI8226 y L363

Los compuestos diluidos, DMSO o medio de cultivo control, se añadieron en 100 μ l al inicio del cultivo. Se usaron tres pocillos de cultivo para una dilución del compuesto, y los experimentos se realizaron dos veces (finalmente, seis

pocillos de cultivo para una dilución del compuesto).

Se cultivaron las células durante 4 días. Ocho horas antes del final del cultivo, se añadieron 0,5 µCi de timidina tritiada en 50 µl de RPMI1640 y FCS al 10 %. Después se extrajeron las células con un colector de células, y se determinó la incorporación de timidina usando un contador de células beta.

- 5 Se evaluó una toxicidad putativa del DMSO añadiendo un grupo DMSO que contenía la concentración más alta de DMSO (1:333 de DMSO que corresponde al compuesto).

Se prepararon soluciones de reserva de Velcade (3 mM) y dexametasona (10 mM) en DMSO. Estos compuestos se diluyeron en RPMI1640 y FCS al 10 % - Velcade (concentración final 1 µM) y DEX (dexametasona) (concentración final 10^{-6} M) -, y se usaron como control positivo para la inhibición de la proliferación de células de mieloma.

10 2. Detección de la apoptosis de las líneas de células de mieloma

Se detectaron células apoptóticas usando anexina V marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC-anexina-V, Boehringer Mannheim). La anexina V tiene una alta afinidad por la fosfatidilserina presente sobre la membrana citoplásmica exterior de las células apoptóticas. Se lavaron las células, se marcaron con FITC-anexina-V de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, y se analizaron con un citómetro de flujo FACScan usando el software Cell Quest (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA).

- 15

3. Medidas del ciclo celular de las líneas de células de mieloma

La distribución del ciclo celular de las líneas de células se evaluó mediante análisis de citometría de flujo por tinción doble con yoduro de propidio (PI) y bromodesoxiuridina (BrdU). Treinta minutos antes de interrumpir el cultivo, se añadieron BrdU (10 µM) a los cultivos, y después se recogieron las células por centrifugación, se lavaron dos veces con solución tampón salina de fosfato (PBS) y se fijaron en etanol al 70 % durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de dos lavados con PBS, se resuspendieron las células en 50 µL de HCl 3 N, Tween 20 al 0,5 % y se incubaron durante 20 minutos a 20 °C para desnaturalizar el ADN. Se recuperaron entonces las células por centrifugación, se resuspendieron en 250 µL de tetraborato de sodio 10 mM para neutralizar la reacción, se lavaron dos veces con PBS, Tween 20 al 0,05 %, y se incubaron con 20 µL de anti-BrdU-FITC (BD Biosciences). Después de dos lavados adicionales, se resuspendieron las células en 500 µL de PBS y Tween 20 al 0,05 % que contenía 10 µg/ml de PI. Se analizó la fluorescencia de FL1-H (BrdU) y FL2-A (PI) en un citómetro de flujo FACScan usando el software Cell Quest (Becton Dickinson).

- 20
- 25

4. Análisis estadístico

Para cada experimento, las medias de las incorporaciones de timidina tritiada (valores medios determinados en tres pocillos de cultivo) se representaron gráficamente frente a las concentraciones logarítmicas del compuesto. Se ajustaron las curvas con regresión exponencial, que se determinó usando las concentraciones que definen la respuesta de inhibición (usualmente 3-4 concentraciones).

Las concentraciones que dan 50 % y 90 % de inhibición de la proliferación de las células de mieloma, se determinaron con estas curvas de regresión.

35 5. Células de médula ósea

Se recogieron células de médula ósea de 10 pacientes con mieloma múltiple (5 pacientes al diagnóstico y 5 pacientes recurrentes), y se aislaron las células mononucleares por centrifugación con ficoll hypaque.

Se cultivaron las células mononucleares de médula ósea a 5×10^5 células/ml en RPMI1640 y suero de ternera fetal al 5 % con medio de cultivo como control, con la concentración más alta de DMSO y tres concentraciones del compuesto A. Las tres concentraciones (1 µM, 3,3 µM y 10 µM) usadas para el compuesto A fueron la concentración media determinada en 10 líneas celulares de mieloma que dan 10 %, 50 % o 90 % de inhibición.

- 40

El día 5 se hizo el conteo del número de células, y se determinaron el porcentaje y el recuento de células de mieloma por tinción con FACS usando un anticuerpo monoclonal anti-CD138. Esto hizo posible valorar las células viables de mieloma, ya que el CD138 se pierde en las células de mieloma pre-apoptóticas (Jourdan, M. *et al.* (1998), *Br. J. Haematol.*, 100, 637-648). Se determinó también el porcentaje y el recuento de los progenitores hematopoyéticos CD34 con un anticuerpo monoclonal anti-CD34 y marcaje con FACS.

- 45

Ejemplo 1: Inhibición de la proliferación de células de mieloma por el compuesto A

Un compuesto según la fórmula I, 1-(4-{4-[4-(4-clorofenil)-pirimidin-2-ilamino]-benzoil}-piperazin-1-il)-etanona (compuesto A), se diluyó en DMSO (Sigma Chemicals) para obtener una solución de reserva 3 mM. La solución de reserva se distribuyó en alícuotas y se almacenó a -80 °C hasta su uso. El compuesto se descongeló, se calentó brevemente a 37 °C en un baño de agua y se diluyó en RPMI160 y FCS al 10 %, hasta obtener una concentración 10 µM. Se añadió una cantidad adecuada de la solución 10 µM a los pocillos de cultivo que contenían células de mieloma para obtener las siguientes concentraciones de compuesto A: 10 µM, 3,33 µM, 1,11 µM, 0,37 µM, 0,12 µM y

- 50

0,04 μM . Como se muestra en la figura 1, el compuesto A presentó una inhibición completa de la proliferación de 13 de 14 células de mieloma humano.

Ejemplo 2: Inducción de la apoptosis de células de mieloma e inhibición de los ciclos de células de mieloma por el compuesto A

Se seleccionaron para el estudio, dos líneas de células de mieloma (XG-3 y XG-12) que son sensibles al compuesto A (1-(4-{4-[4-(4-clorofenil)-pirimidin-2-ilamino]-benzoil}-piperazin-1-il)-etanona). Para evaluar el efecto del compuesto A sobre la supervivencia de las células de mieloma, se determinó el porcentaje de células apoptóticas usando la unión de anexina V a las células apoptóticas. Se evaluó el efecto del compuesto A sobre el ciclo celular evaluando el porcentaje de células en la fase S del ciclo celular por incorporación de BrdU-FITC. La apoptosis, el ciclo celular y el recuento de células se evaluaron diariamente durante un período de cultivo de cuatro días en las líneas de células, usando las dosis respectivas IC_{10} , IC_{50} e IC_{90} de compuesto A.

Como se muestra en la Tabla 1 y en la FIG. 2, el compuesto A indujo la apoptosis de las líneas de células de mieloma. La apoptosis fue dependiente de la dosis y del tiempo. El compuesto A indujo también una disminución en el número de células en la fase S del ciclo celular de las líneas de células de mieloma, según se muestra en la Tabla 1.

		Co	IC_{10}	IC_{50}	IC_{90}
XG-12	Anexina V (%)	24,9	ND	39,5	79,8
	Fase S (%)	40,8	ND	37,3	6,8
	Células ($\times 10^6/\text{ml}$)	0,41	ND	0,35	0,11
XG-3	Anexina V (%)	25,5	29,2	30,7	48,2
	Fase S (%)	35,3	32,1	29,2	15,3
	Células ($\times 10^6/\text{ml}$)	0,83	0,68	0,47	0,29

Tabla 1. Porcentaje de células apoptóticas, porcentaje de células en la fase S y recuento de células, para las líneas de células de mieloma XG-12 o XG-3 tratadas con el compuesto A a concentraciones IC_{10} , IC_{50} o IC_{90} el día 3 del cultivo celular.

Ejemplo 3: Inhibición de la proliferación de células de mieloma por el compuesto A y Velcade o melfalán

Se usaron para el estudio las líneas de células que han demostrado ser las más sensibles (XG-12 y XG-3) o las menos sensibles (XG7 y L363) al compuesto A (1-(4-{4-[4-(4-clorofenil)-pirimidin-2-ilamino]-benzoil}-piperazin-1-il)-etanona). Se determinó la concentración que da 10 % (IC_{10}) o 50 % (IC_{50}) de inhibición de las líneas de células de mieloma, y los datos se dan en la Tabla 2.

		XG12	XG3	XG7	L363
Melfalán	IC_{10} (μM)	0,318	0,490	0,409	0,110
	IC_{50} (μM)	1,234	1,680	1,181	0,457
Velcade	IC_{10} (μM)	0,0016	0,0016	0,0014	0,0049
	IC_{50} (μM)	0,0039	0,0022	0,0035	0,0084

Tabla 2. Efectos inhibidores de melfalán y Velcade en líneas de células de mieloma

Se analizó el compuesto A en combinación con melfalán o con Velcade. Se aplicaron concentraciones crecientes del compuesto A (0, 0,01, 0,03, 0,12, 0,37, 1,1, 3,1, 10, 30 μM) a 4 líneas celulares de mieloma solo o en combinación con Velcade o melfalán, a una concentración que da alrededor de 10 % o 50 % de inhibición.

Se determinó la concentración de compuesto A que da 50 % o 90 % de inhibición de la proliferación de las líneas de células de mieloma en ausencia o en presencia de Velcade, según se muestra en la Tabla 3 y en la FIG. 3. Se observó un efecto aditivo cuando el compuesto A se usó en combinación con Velcade, ya que las concentraciones de compuesto A que inducen 50 % o 90 % de inhibición de la proliferación de células de mieloma fueron similares con o sin Velcade.

		Compuesto A	Compuesto A + Velcade (IC ₁₀)	Compuesto A + Velcade (IC ₅₀)
XG3	IC ₅₀	1,485	1,313	1,368
	IC ₉₀	6,353	5,944	5,869
XG12	IC ₅₀	0,974	1,256	0,611
	IC ₉₀	3,918	4,278	2,915
XG7	IC ₅₀	6,363	5,921	5,611
	IC ₉₀	9,330	9,842	9,016
L363	IC ₅₀	2,329	2,744	3,910
	IC ₉₀	10,102	9,133	10,474

Tabla 3. Efectos inhibidores del compuesto A con o sin Velcade

- 5 Se realizó un estudio de combinación similar, en presencia de una concentración creciente de compuesto A y concentración fija de melfalán (IC₁₀ o IC₅₀). Los datos se muestran en la Tabla 4 y en la FIG. 4. Se observó un efecto aditivo cuando el compuesto A se usó en combinación con melfalán, ya que las concentraciones del compuesto A que inducen 50 % o 90 % de inhibición de la proliferación de células de mieloma, fueron similares con o sin melfalán.

		Compuesto A	Compuesto A + Melfalán (IC ₁₀)	Compuesto A + Melfalán (IC ₅₀)
XG3	IC ₅₀	1,485	1,492	1,690
	IC ₉₀	6,353	6,243	6,098
XG12	IC ₅₀	0,974	0,932	1,072
	IC ₉₀	3,918	3,539	3,795
XG7	IC ₅₀	6,363	6,037	7,561
	IC ₉₀	9,330	9,202	9,630
L363	IC ₅₀	1,791	1,962	1,488
	IC ₉₀	9,412	9,430	8,547

Tabla 4. Efectos inhibidores del compuesto A con o sin melfalán

10 **Ejemplo 4: Efecto del compuesto A sobre la supervivencia de células primarias de mieloma, células no de mieloma y células madre hematopoyéticas CD34⁺**

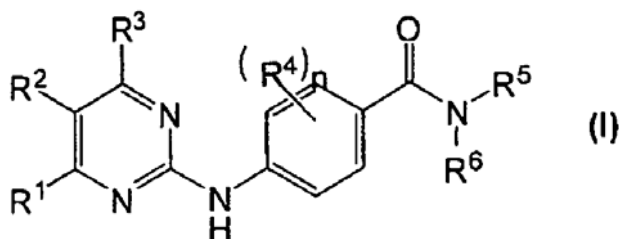
- 15 Se cultivaron durante 5 días con medio de cultivo y suero de ternera fetal al 10 %, células mononucleares de médula ósea de 5 pacientes con mieloma múltiple recién diagnosticado, o de 5 pacientes con mieloma múltiple recurrente. Se trataron las células con dexametasona 10⁻⁶ M, Velcade 1 µM o compuesto A (1-(4-{4-[4-(4-clorofenil)-pirimidin-2-ilamino]-benzoil}-piperazin-1-il)-etanona), a concentraciones medias de IC₁₀, IC₅₀ o IC₉₀. Al final del cultivo, se contaron las células. Se determinaron las células viables de mieloma usando un marcado con FACS con anticuerpo monoclonal anti-CD138, así como las células madre hematopoyéticas viables usando un anticuerpo monoclonal anti-CD34. Los resultados se expresan como el porcentaje de células de mieloma viables, células no de mieloma o células CD34, en comparación con el grupo de cultivo control sin inhibidor.

- 20 Como se muestra en las figuras 5 a 10, el compuesto A inhibe la supervivencia de las células de mieloma primarias sin afectar a la supervivencia de las otras células de la médula ósea, salvo la de los precursores hematopoyéticos para algunos pacientes.

- 25 Mientras que esta invención se ha mostrado y descrito particularmente con relación a ejemplos de realizaciones de la misma, los expertos en la técnica entenderán que se pueden hacer varios cambios en la forma y detalles sin separarse del alcance de la invención englobado por las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto según la fórmula I:



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que

5 R^1 es arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con uno a cuatro sustituyentes seleccionados independientemente de R^7 ;

R^2 es hidrógeno;

R^3 es hidrógeno o alquilo inferior;

10 R^4 se selecciona, en cada caso, independientemente del grupo que consiste en halógeno, hidroxilo, alquilo inferior y alcoxi inferior; donde n es un entero de 0 a 4;

R^5 y R^6 son iguales o diferentes, y se seleccionan independientemente del grupo que consiste en $-R^8$, $-(CH_2)_aC(=O)R^9$, $-(CH_2)_aC(=O)OR^9$, $-(CH_2)_aC(=O)NR^9R^{10}$, $-(CH_2)_aC(=O)NR^9(CH_2)_bC(=O)R^{10}$, $-(CH_2)_aNR^{11}C(=O)NR^9R^{10}$, $-(CH_2)_aNR^9R^{10}$, $-(CH_2)_aOR^9$, $-(CH_2)_aNR^9C(=O)R^{10}$, $-(CH_2)_aSO_2R^9$ y $-(CH_2)_aSO_2NR^9R^{10}$;

15 o R^5 y R^6 considerados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un heterociclo opcionalmente sustituido;

20 R^7 , en cada aparición, se selecciona independientemente del grupo que consiste en halógeno, hidroxilo, ciano, nitro, carboxi, alquilo, alcoxi, haloalquilo, aciloxi, sulfonilalquilo, sulfinilalquilo, sulfonilalquilo, hidroxialquilo, arilo, arilo sustituido, alquilarilo, alquilarilo sustituido, heterocicloalquilo, heterocicloalquilo sustituido, alquilheterocicloalquilo, alquilheterocicloalquilo sustituido, $-C(=O)OR^8$, $-OC(=O)R^8$, $-C(=O)NR^8R^9$, $-C(=O)NR^8OR^9$, $-SO_2R^8$, $-SO_2NR^8R^9$, $-NR^8SO_2R^9$, $-NR^8R^9$, $-NR^8C(=O)R^9$, $-NR^8C(=O)(CH_2)_bOR^9$, $-NR^8C(=O)(CH_2)_bR^9$, $-O(CH_2)_bNR^8R^9$ y heterocicloalquilo fusionado con fenilo;

R^8 , R^9 , R^{10} y R^{11} son iguales o diferentes, y en cada aparición se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, alquilarilo, alquilarilo sustituido, heterocicloalquilo, heterocicloalquilo sustituido, alquilheterocicloalquilo y alquilheterocicloalquilo sustituido;

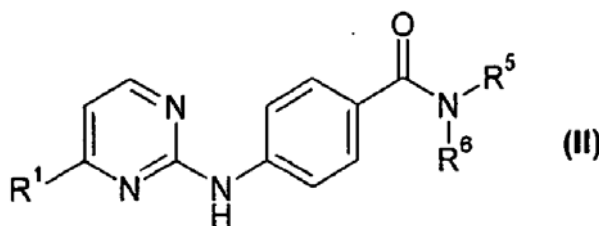
25 o R^8 y R^9 considerados junto con el átomo o los átomos a los que están unidos, forman un heterociclo opcionalmente sustituido;

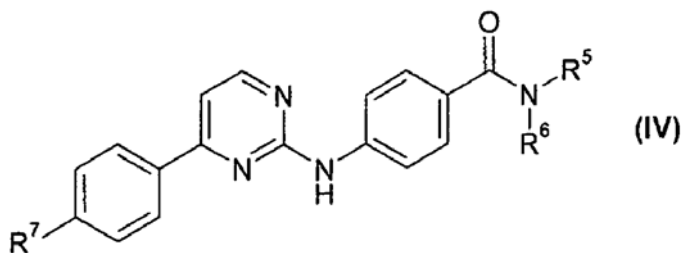
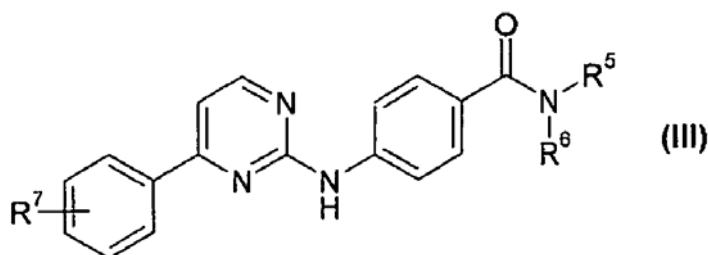
a y b son iguales o diferentes, y en cada aparición se seleccionan independientemente del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3 y 4; y

c es en cada aparición 0, 1 o 2,

30 para uso en el tratamiento del mieloma múltiple.

2. Un compuesto para uso según la reivindicación 1, seleccionado de las fórmulas (II), (III) y (IV):





o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que

5 R^1 , R^5 , R^6 y R^7 , son como se definen en la reivindicación 1.

3. Un compuesto para uso según las reivindicaciones 1 o 2, el que R^5 y R^6 , considerados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un heterociclo no aromático que contiene nitrógeno opcionalmente sustituido.

10 4. Un compuesto para uso según la reivindicación 3, en el que el heterociclo no aromático que contiene nitrógeno se selecciona del grupo que consiste en morfolinilo, tiomorfolinilo, pirrolidinonilo, pirrolidinilo, piperidinilo, homopiperidinilo, piperazinilo, homopiperazinilo, hidantoinilo, tetrahidropiridinilo, tetrahidropirimidinilo, oxazolidinilo, tiazolidinilo, indolinilo, isoindolinilo, tetrahydroquinolinilo y tetrahydroisoquinolinilo.

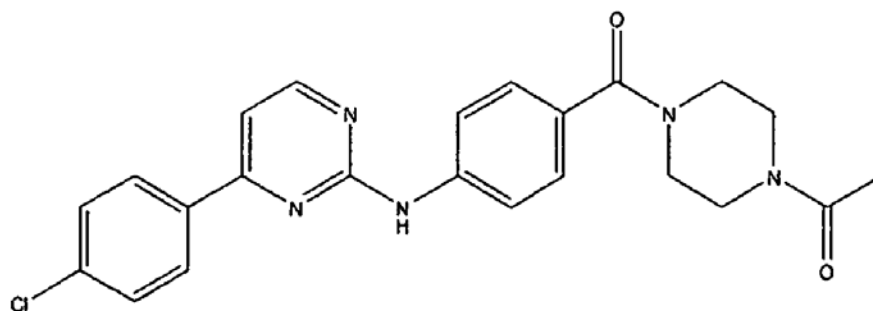
5. Un compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, el que R^1 es arilo o heteroarilo.

15 6. Un compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, el que R^1 se selecciona del grupo que consiste en arilo, furilo, benzofuranilo, tiofenilo, benzotiofenilo, quinolinilo, pirrolilo, indolilo, oxazolilo, benzoxazolilo, imidazolilo, bencimidazolilo, tiazolilo, benzotiazolilo, isoxazolilo, pirazolilo, isotiazolilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo, cinolinilo, ftalazinilo y quinazolinilo.

7. Un compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el que R^1 es fenilo.

8. Un compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, el que el heterociclo que contiene nitrógeno es piperazinilo, piperidinilo, o morfolinilo.

20 9. El compuesto A para uso según la reivindicación 1, denominado 1-(4-{4-[4-(4-cloro-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-benzoyl}-piperazin-1-il)-etanona, y representado por la fórmula estructural:



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

25 10. Un compuesto para uso según las reivindicaciones 1 a 9, el que el mieloma múltiple es mieloma múltiple en la etapa I, mieloma múltiple en la etapa II, mieloma múltiple en la etapa III, mieloma múltiple asintomático, mieloma sintomático, mieloma múltiple recién diagnosticado, mieloma múltiple sensible, mieloma múltiple estable, mieloma

múltiple progresivo, mieloma múltiple recurrente, o mieloma múltiple refractario.

11. Un compuesto para uso según reivindicación 10, en el que el mieloma múltiple asintomático es mieloma múltiple latente o mieloma múltiple indoloro.

5 12. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la fórmula (I), (II) (III) o A según las reivindicaciones 1 a 9, o una de sus sales fisiológicamente aceptables, y que comprende además una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en bortezomib (velcade), melfalán, prednisona, vincristina, carmustina, ciclofosfamida, dexametasona, talidomida, doxorubicina, cisplatino, etopósido y citarabina.

10 13. Una composición farmacéutica según la reivindicación 12, en la que el agente terapéutico se selecciona de velcade o melfalán.

14. Un compuesto para uso según las reivindicaciones 1 a 9, para tratar el mieloma múltiple en un sujeto que está sometido a radioterapia, que está en preparación para un trasplante de células madre, o que está sometido a un trasplante de células madre.

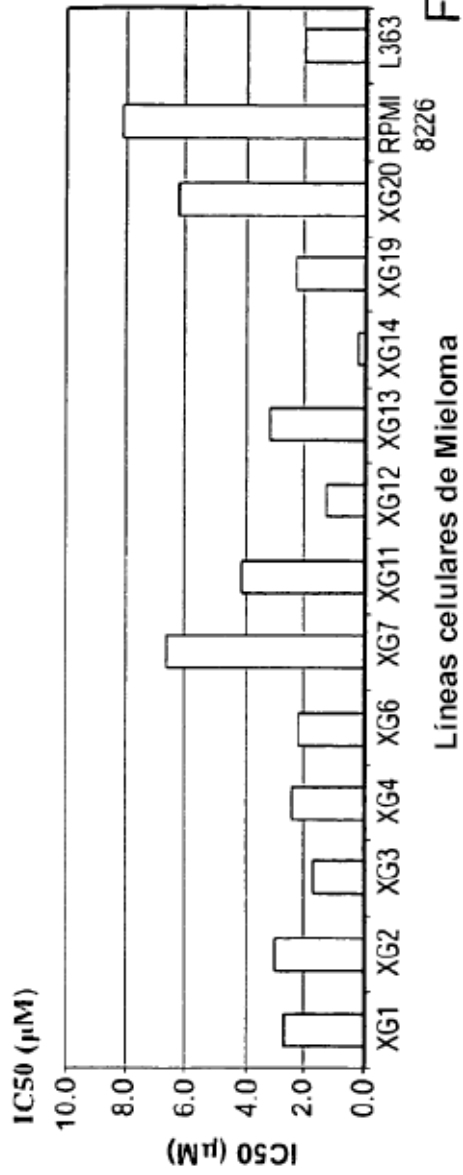


FIG. 1A

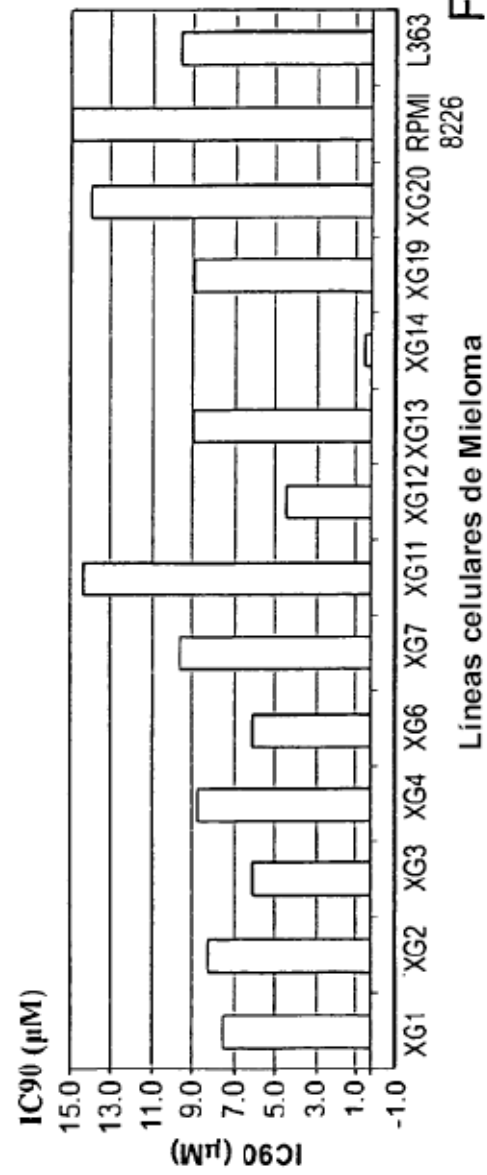


FIG. 1B

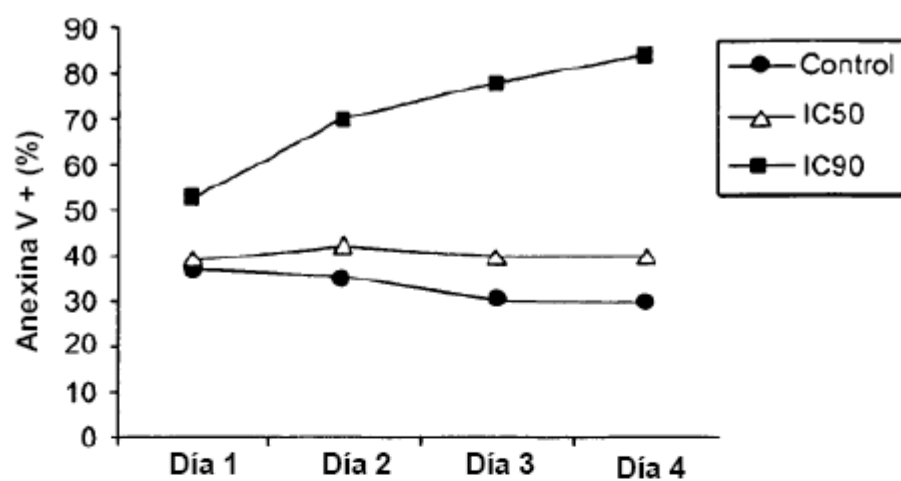


FIG. 2

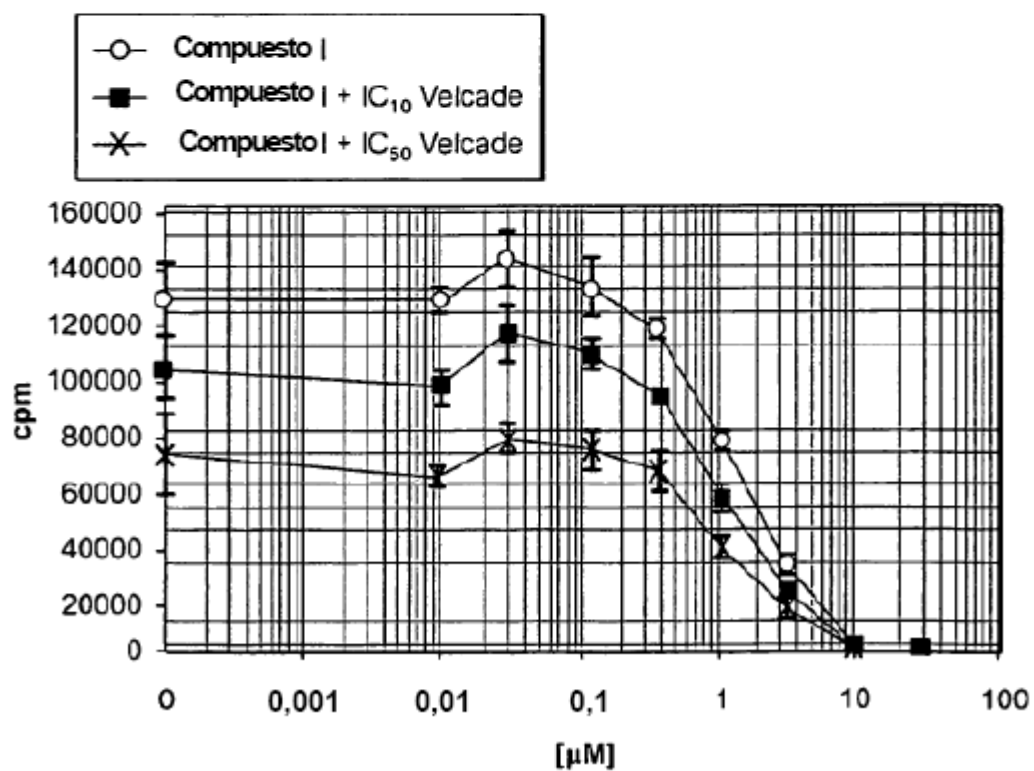


FIG. 3

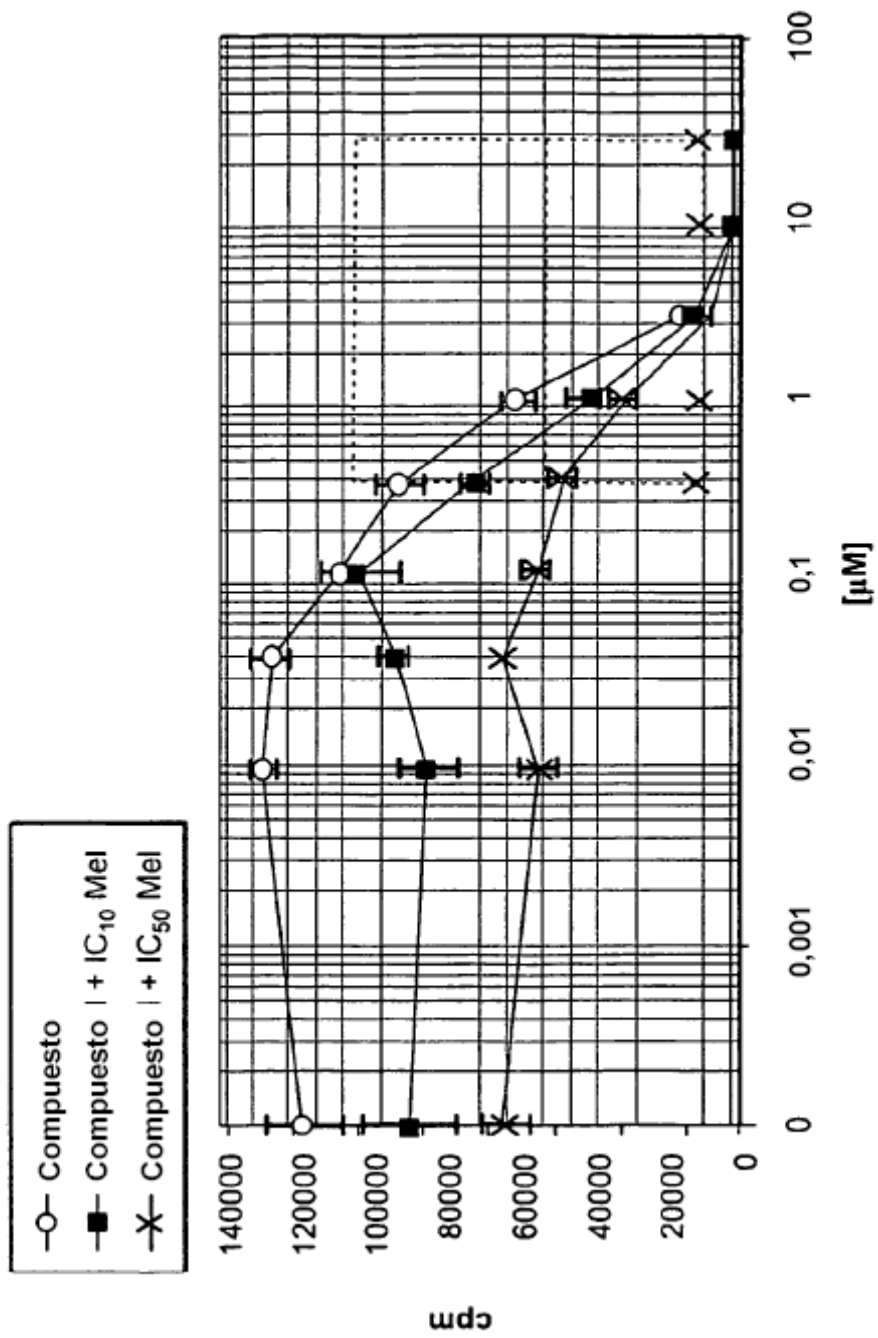
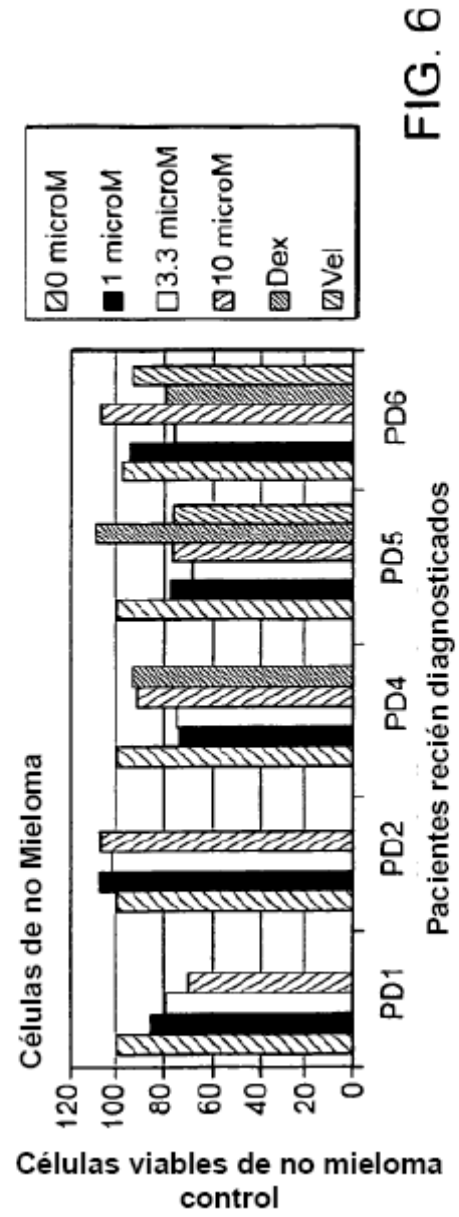
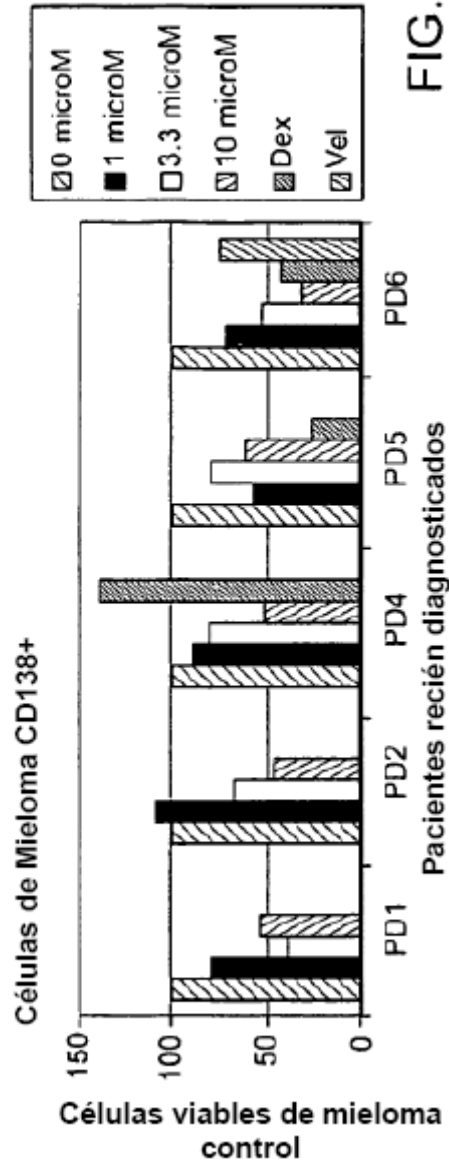
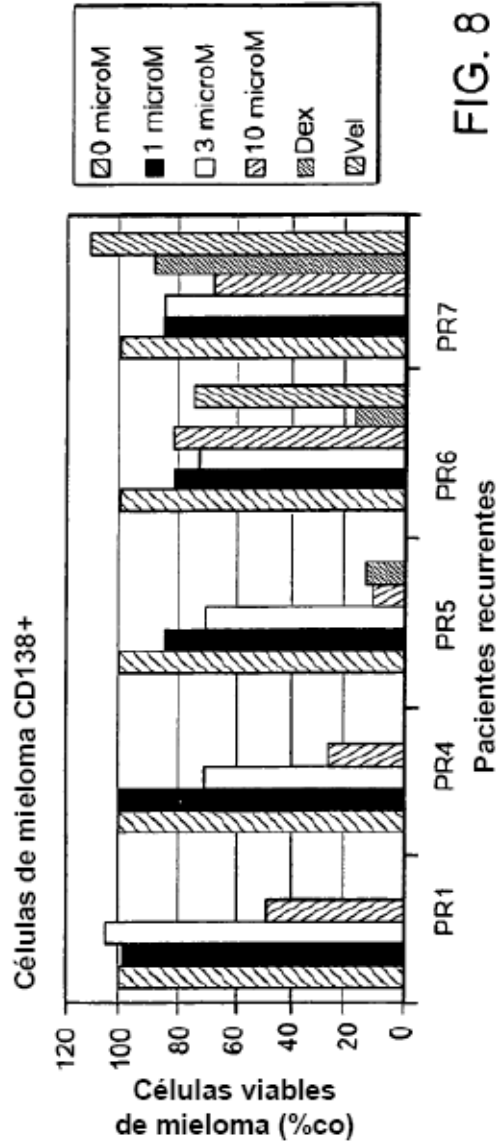
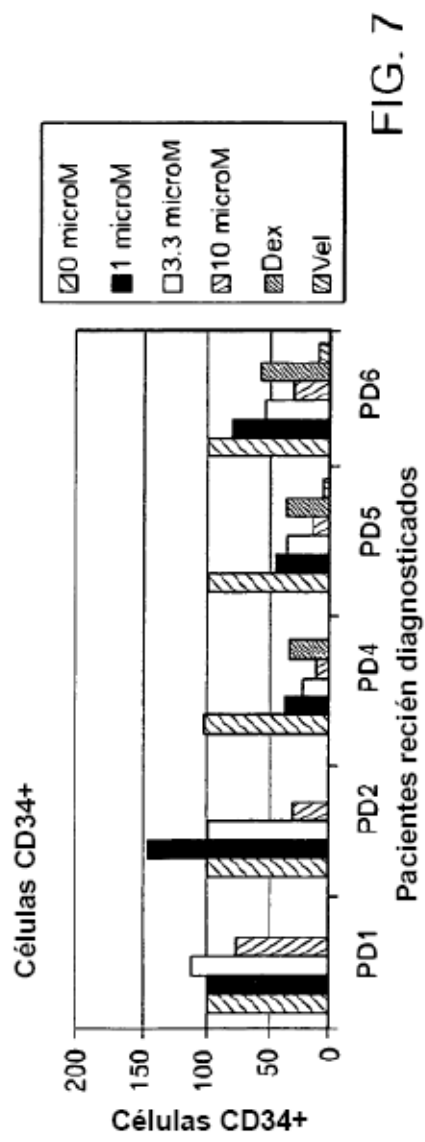


FIG. 4





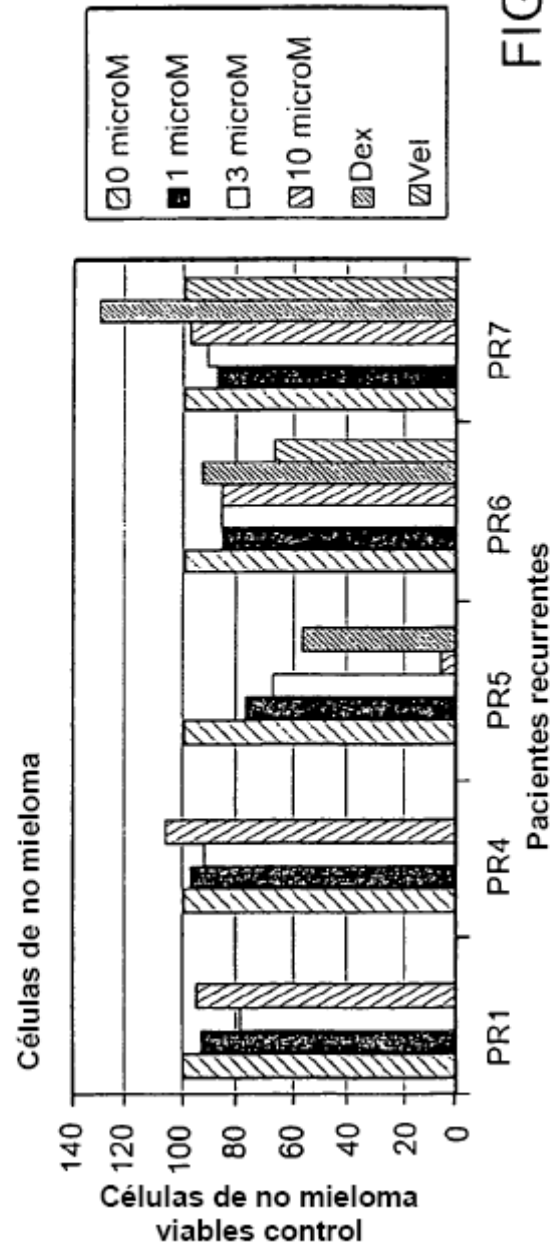


FIG. 9

