

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 697**

51 Int. Cl.:

A61K 31/135 (2006.01)

A61K 31/381 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2003 E 08152489 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2013 EP 1944026**

54 Título: **Uso de agentes de enlace del receptor EDG en el cáncer**

30 Prioridad:

16.05.2002 GB 0211261
20.06.2002 US 390411 P
24.07.2002 GB 0217150
24.02.2003 US 449739 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.11.2013

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)
LICHTSTRASSE 35
4056 BASEL, CH

72 Inventor/es:

BAUMRUKER, THOMAS;
BRINKMANN, VOLKER;
LA MONTAGNE, KENNETH RICHARD;
LASSOTA, PETER T;
MECHTCHERIAKOVA, DIANA y
WOOD, JEANETTE MARJORIE

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 428 697 T3

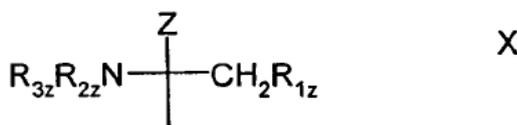
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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

Uso de agentes de enlace del receptor EDG en el cáncer.

La presente invención se refiere al uso de un agonista del receptor esfingosina-1-fosfato (S1P), particularmente en el tratamiento del cáncer.

- 5 Los agonistas del receptor S1P son agentes acelerantes de recirculación de linfocitos (LH) que provocan una linfopenia que resultan de una redistribución, preferiblemente reversible, de linfocitos de la circulación al tejido linfático secundario, sin provocar una inmunosupresión generalizada. Las células naïve son secuestradas; las células T CD8 y CD4 y las células B de la sangre se estimulan para migrar a los nódulos linfáticos (NL) y parches de Peyer (PP), y de este modo por ejemplo, se inhibe la infiltración de células en órganos trasplantados.
- 10 Los agonistas del receptor S1P, por lo general son análogos de la esfingosina, tales como los derivados 2-aminopropano-1,3-diol 2-sustituido o 2-aminopropanol, por ejemplo un compuesto que comprende un grupo de fórmula X



en donde

- 15 Z es H; alquilo C₁₋₆; alqueno C₂₋₆; alquino C₂₋₆; fenilo; fenilo sustituido por un OH; alquilo C₁₋₆ sustituido por 1 a 3 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste de halógeno, cicloalquilo C₃₋₈, fenilo y fenilo sustituido por OH; o CH₂-R_{4z} en donde R_{4z} es OH, aciloxi o un residuo de fórmula (a)



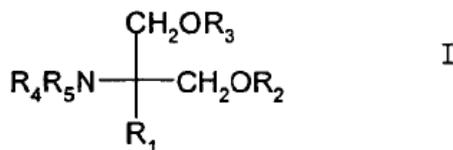
- 20 en donde Z₁ es un enlace directo u O, preferiblemente O; cada uno de R_{5z} y R_{6z}, independientemente, es H, o alquilo C₁₋₄ opcionalmente sustituido por 1, 2 o 3 átomos de halógeno;

- 25 R_{1z} es OH, aciloxi o un residuo de fórmula (a); y cada uno de R_{2z} y R_{3z}, independientemente, es H, alquilo C₁₋₄ o acilo. El grupo de fórmula X es un grupo funcional unido como un grupo terminal a una fracción que puede ser hidrofílica o lipofílica y comprende uno o más residuos alifáticos, alicíclicos, aromáticos y/o heterocíclicos, en la medida que la molécula resultante en donde al menos uno de Z y R_{1z} es o comprende un residuo de fórmula (a), las señales como un agonista en una más del receptor esfingosina-1-fosfato.

- 30 Los agonistas del receptor S1P son compuestos cuya señal como agonistas en uno o más receptores de la esfingosina-1 fosfato, por ejemplo S1P1 a S1P8. El agonista que se une a un receptor S1P por ejemplo, puede resultar en la disociación de las proteínas G heterotriméricas intracelulares en G α -GTP y G $\beta\gamma$ -GTP, y/o aumentar la fosforilación del receptor ocupado por el agonista y la activación de quinasas/rutas de señalización en dirección 3'. La afinidad de enlace de los agonistas del receptor S1P se puede medir como se describe en el párrafo I, a continuación.

Ejemplos de agonistas del receptor S1P apropiados son, por ejemplo los siguientes (siendo solo los compuestos de fórmula IX parte de la invención):

- Los compuestos como se revelan en EP627406A1, por ejemplo un compuesto de fórmula I



en donde R₁ es una cadena de carbono (C₁₂₋₂₂) lineal o ramificado

- que puede tener en la cadena un enlace o un heteroátomo seleccionado de un enlace doble, un enlace triple, O, S, NR₆, en donde R₆ es H, alquilo, aralquilo, acilo o alcocarbonilo, y carbonilo, y/o

- 5 - que puede tener como un sustituyente alcoxi, alqueniloxi, alquiniloxi, aralquiloxi, acilo, alquilamino, alquiltio, acilamino, alcocarbonilo, alcocarbonilamino, aciloxi, alquilcarbamoilo, nitro, halógeno, amino, hidroxiiimino, hidroxilo o carboxi; o

R₁ es

- un fenilalquilo en donde el alquilo es una cadena de carbono (C₆₋₂₀) lineal o ramificada; o

- 10 - un fenilalquilo en donde el alquilo es una cadena de carbono (C₁₋₃₀) lineal o ramificada, en donde dicho fenilalquilo es sustituido por

- una cadena de carbono (C₆₋₂₀) lineal o ramificada opcionalmente sustituida por un halógeno,

- una cadena alcoxi (C₆₋₂₀) lineal o ramificada opcionalmente sustituida por un halógeno,

- un alqueniloxi (C₆₋₂₀) lineal o ramificado,

- 15 - fenilalcoxi, halofenilalcoxi, fenilalcoxialquilo, fenoxialcoxi o fenoxialquilo,

- cicloalquilalquilo sustituido por un alquilo C₆₋₂₀,

- heteroarilalquilo sustituido por un alquilo C₆₋₂₀,

- alquilo C₆₋₂₀ heterocíclico o

- alquilo heterocíclico sustituido por un alquilo C₂₋₂₀,

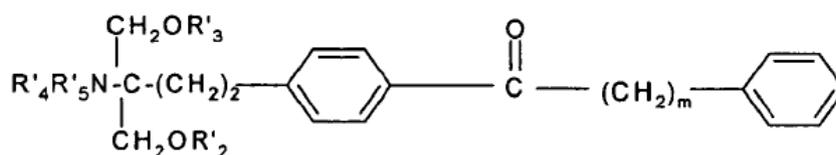
- 20 y en donde

la fracción alquilo puede tener

- en la cadena carbono, un enlace o un heteroátomo seleccionado de un enlace doble, un enlace triple, O, S, sulfinilo, sulfonilo, o NR₆, en donde R₆ es como se define anteriormente, y

- 25 - como un sustituyente alcoxi, alqueniloxi, alquiniloxi, aralquiloxi, acilo, alquilamino, alquiltio, acilamino, alcocarbonilo, alcocarbonilamino, aciloxi, alquilcarbamoilo, nitro, halógeno, amino, hidroxilo o carboxi, y cada uno de R₂, R₃, R₄ y R₅, independientemente, es H, alquilo C₁₋₄ o acilo o una sal de este farmacéuticamente aceptable;

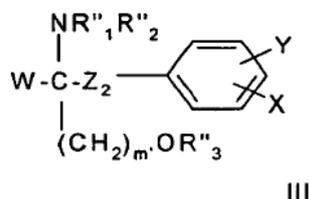
- Los compuestos como se revelan en EP 1002792A1, por ejemplo un compuesto de fórmula II



II

en donde m es 1 a 9 y cada uno de R², R³, R⁴ y R⁵, independientemente, es H, alquilo o acilo, o una sal de este farmacéuticamente aceptable;

- Los compuestos como se revelan en EP0778263 A1, por ejemplo un compuesto de fórmula III

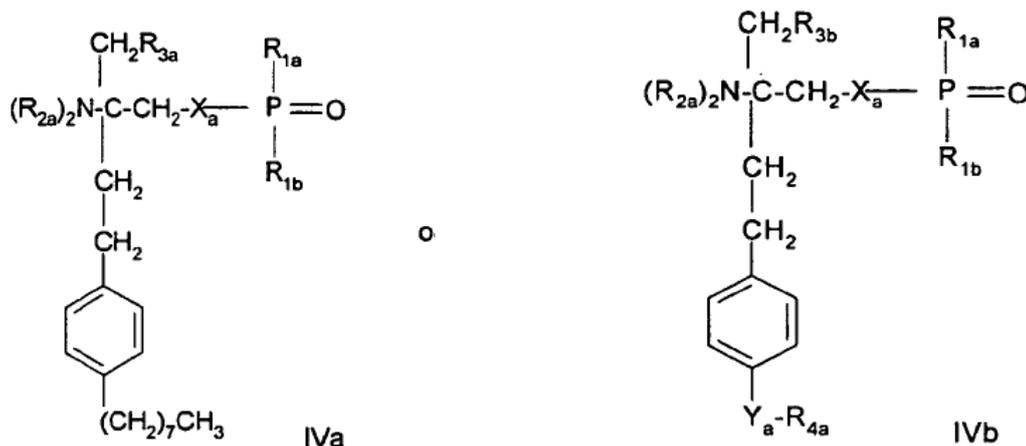


5 en donde W es H; alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆ o alquinilo C₂₋₆; fenilo no sustituido o sustituido por un OH; R⁴O(CH₂)_n; o alquilo C₁₋₆ sustituido por 1 a 3 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste de halógeno, cicloalquilo C₃₋₈, fenilo y fenilo sustituido por un OH;

10 X es H o alquilo de cadena lineal sustituido o no sustituido que tiene un número p de átomos de carbono o alcoxi de cadena lineal no sustituido o sustituido que tiene un número (p-1) de átomos de carbono, por ejemplo sustituido por 1 a 3 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste de alquilo C₁₋₆, OH, alcoxi C₁₋₆, aciloxi, amino, alquilamino C₁₋₆, acilamino, oxo, haloalquilo C₁₋₆, halógeno, fenilo no sustituido y fenilo sustituido por 1 a 3 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste de alquilo C₁₋₆, OH, alcoxi C₁₋₆, acilo, aciloxi, amino, alquilamino C₁₋₆, acilamino, haloalquilo C₁₋₆ y halógeno; Y es H, alquilo C₁₋₆, OH, alcoxi C₁₋₆, acilo, aciloxi, amino, alquilamino C₁₋₆, acilamino, haloalquilo C₁₋₆ o halógeno, Z₂ es un enlace sencillo o un alquileo de cadena lineal que tiene un número o átomos de carbono de q,

15 cada uno de p y q, independientemente, es un número entero de 1 a 20, con la condición de 6 ≤ p + q ≤ 23, m' es 1, 2 o 3, n es 2 o 3, cada uno de R¹, R², R³ y R⁴, independientemente, es H, alquilo C₁₋₄ o acilo, o una sal de este farmacéuticamente aceptable,

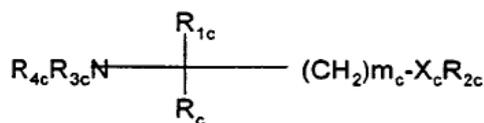
- Los compuestos como se revela en WO02/18395, por ejemplo un compuesto de fórmula IVa o IVb



20 en donde X_a es O, S, NR_{1s} o un grupo -(CH₂)_{na}-, grupo que es no sustituido o sustituido por 1 a 4 halógenos; n_a es 1 o 2, R_{1s} es H o alquilo (C₁₋₄), alquilo que es no sustituido o sustituido por un halógeno; R_{1a} es H, OH, alquilo (C₁₋₄) u O-alquilo (C₁₋₄) en donde el alquilo es no sustituido o sustituido por 1 a 3 halógenos; R_{1b} es H, OH o alquilo (C₁₋₄), en donde el alquilo es no sustituido o sustituido por un halógeno; cada R_{2a} independientemente se selecciona de H o alquilo (C₁₋₄), alquilo que es no sustituido o sustituido por un halógeno; R_{3a} es H, OH, halógeno u Oalquilo (C₁₋₄) en donde alquilo es no sustituido o sustituido por un halógeno; y R_{3b} es H, OH, halógeno, alquilo (C₁₋₄) en donde alquilo es no sustituido o sustituido por un hidroxilo, u Oalquilo (C₁₋₄) en donde alquilo es no sustituido o sustituido por un halógeno; Y_a es -CH₂-, -C(O)-, -CH(OH)-, -C(=NOH)-, O o S, y R_{4a} es alquilo (C₄₋₁₄) o alquenilo (C₄₋₁₄);

o una sal o hidrato de este farmacéuticamente aceptable;

- Los compuestos como se revela en WO 02/076995, por ejemplo un compuesto de fórmula V



V

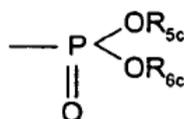
en donde

m_c es 1, 2 o 3;

5 X_c es O o un enlace directo;

R_{1c} es H; alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido por un OH, acilo, halógeno, cicloalquilo C_{3-10} , fenilo o hidroxi-fenileno; alquenilo C_{2-6} ; alquinilo C_{2-6} ; o fenilo opcionalmente sustituido por un OH;

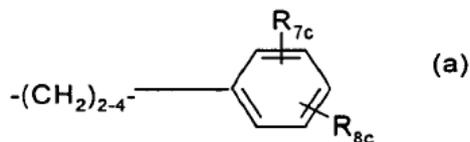
R_{2c} es



10 en donde R_{5c} es H o alquilo C_{1-4} opcionalmente sustituido por 1, 2 o 3 átomos de halógeno, y R_{6c} es H o alquilo C_{1-4} opcionalmente sustituido por un halógeno;

cada uno de R_{3c} y R_{4c} , independientemente, es H, alquilo C_{1-4} opcionalmente sustituido por un halógeno, o acilo, y

R_c es alquilo C_{13-20} que opcionalmente puede tener en la cadena un átomo de oxígeno y que opcionalmente puede ser sustituido por un nitro, halógeno, amino, hidroxi o carboxi; o un residuo de fórmula (a)

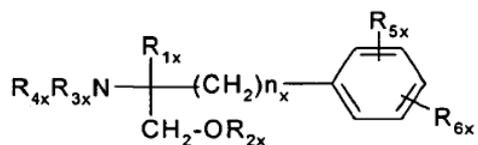


15

en donde R_{7c} es H, alquilo C_{1-4} o alcoxi C_{1-4} , y R_{8c} es alcanoil C_{1-20} sustituido, fenilalquilo C_{1-14} en donde el alquilo C_{1-14} es opcionalmente sustituido por un halógeno u OH, cicloalquilalcoxi C_{1-14} o fenilalcoxi C_{1-14} en donde el anillo cicloalquilo o fenilo es opcionalmente sustituido por un halógeno, alquilo C_{1-4} y/o alcoxi C_{1-4} , fenilalcoxi C_{1-14} -alquilo C_{1-14} , fenoxialcoxi C_{1-14} o fenoxialquilo C_{1-14} ,

20 Siendo también R_c un residuo de fórmula (a) en donde R_{8c} es alcoxi C_{1-14} cuando R_{1c} es alquilo C_{1-4} , alquenilo C_{2-6} o alquinilo C_{2-6} ,

o un compuesto de fórmula VI



VI

en donde

n_x es 2, 3 o 4

R_{1x} es H; alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido por un OH, acilo, halógeno, cicloalquilo, fenilo o hidroxi-fenileno; alqueno C_{2-6} ; alquinilo C_{2-6} ; o fenilo opcionalmente sustituido por un OH;

5 R_{2x} es H, alquilo C_{1-4} o acilo

cada uno de R_{3x} y R_{4x} , independientemente es H, alquilo C_{1-4} opcionalmente sustituido por un halógeno o acilo,

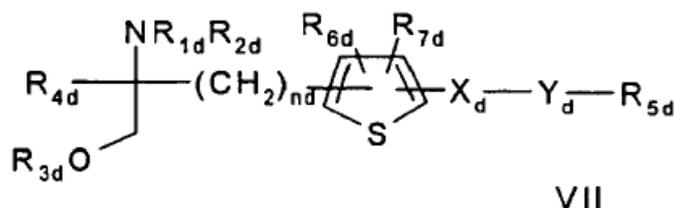
R_{5x} es H, alquilo C_{1-4} o alcoxi C_{1-4} , y

10 R_{6x} es alcanoil C_{1-20} sustituido por un cicloalquilo; cicloalquilalcoxi C_{1-14} en donde el anillo cicloalquilo es opcionalmente sustituido por un halógeno, alquilo C_{1-4} y/o alcoxi C_{1-4} ; fenilalcoxi C_{1-14} en donde el anillo fenilo es opcionalmente sustituido por un halógeno, alquilo C_{1-4} y/o alcoxi C_{1-4} ,

Siendo también R_{6x} alcoxi C_{4-14} cuando R_{1x} es alquilo C_{2-4} sustituido por un OH, o pentiloxi o hexiloxi cuando R_{1x} es alquilo C_{1-4} , a condición de que R_{6x} sea diferente de fenilo-butilenoxi cuando cualquiera R_{5x} sea H o R_{1x} sea metilo,

o una sal de este farmacéuticamente aceptable;

- Los compuestos como se revela en WO02/06268A1, por ejemplo un compuesto de fórmula VII



15

en donde cada uno de R_{1d} y R_{2d} , independientemente, es H o un grupo protector amino;

R_{3d} es hidrógeno o un grupo protector hidroxilo;

R_{4d} es alquilo inferior;

n_d es un número entero de 1 a 6;

20 X_d es etileno, vinileno, etinileno, un grupo que tiene una fórmula - D-CH₂- (en donde D es carbonilo, - CH(OH)-, O, S o N), arilo o arilo sustituido por hasta tres sustituyentes seleccionados del grupo a, como se define de ahora en adelante;

25 Y_d es un enlace sencillo, alquileno C_{1-10} , alquileno C_{1-10} que es sustituido por hasta tres sustituyentes seleccionados de los grupos a y b, alquileno C_{1-10} que tiene O o S en el medio o al final de la cadena carbono, o alquileno C_{1-10} que tiene O o S en el medio o en el final de la cadena carbono, que es sustituido por hasta tres sustituyentes seleccionados de los grupos a y b;

R_{5d} es hidrógeno, cicloalquilo, arilo, heterociclo, cicloalquilo sustituido por hasta tres sustituyentes seleccionados de los grupos a y b, arilo sustituido por hasta tres sustituyentes seleccionados de los grupos a y b, o heterociclo sustituido por hasta tres sustituyentes seleccionados de los grupos a y b; y

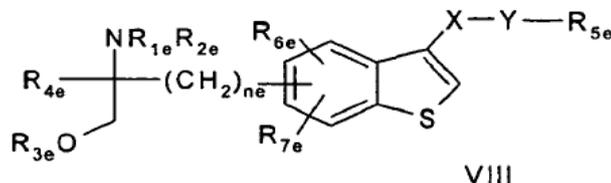
30 cada uno de R_{6d} y R_{7d} , independientemente, es H o un sustituyente seleccionado del grupo a;

<grupo a > es halógeno, alquilo inferior, halógeno alquilo inferior, alcoxi inferior, alquiltio inferior, carboxilo, alcoxycarbonilo inferior, hidroxilo, acilo alifático inferior, amino, alquilamino mono-inferior, alquilamino di-inferior, acilamino alifático inferior, ciano o nitro;

35 <grupo b > es cicloalquilo, arilo, heterociclo, siendo cada uno opcionalmente sustituido por hasta tres sustituyentes seleccionados del grupo a;

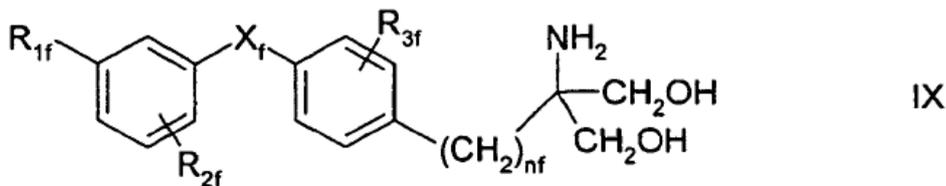
con la condición de que cuando R_{5d} sea hidrógeno, Y_d es un alquileo C1-10 ya sea de enlace sencillo o lineal, o una sal o éster de este farmacéuticamente aceptable.

- Los compuestos como se revela en JP-14316985 (JP2002316985), por ejemplo un compuesto de fórmula VIII:



5 en donde R_{1e} , R_{2e} , R_{3e} , R_{4e} , R_{5e} , R_{6e} , R_{7e} , n_e , X_e e Y_e son como se revela en JP-14316985; o una sal o éster de este farmacéuticamente aceptable.

- Los compuestos como se revela en WO 03/29184 y WO 03/29205, por ejemplo los compuestos de fórmula IX, que son parte de la presente invención:



10 en donde X_f es O o S, y R_{1f} , R_{2f} , R_{3f} y n_f son como se revela en WO 03/29184 y O3/29205, por ejemplo 2-amino-2-[4-(3-benziloxifenoxi)-2-clorofenil]propil-1,3-propano-diol o 2-amino-2-[4-(benziloxifeniltio)-2-clorofenil]propil-1,3-propano-diol.

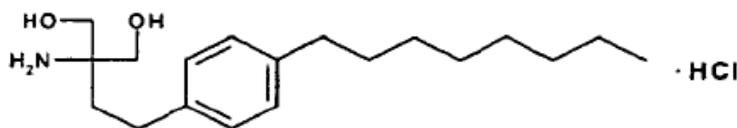
El acilo puede ser un residuo $R_y\text{-CO-}$, en donde R_y es alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-6} , fenilo o fenil-alquilo C_{1-4} . A menos que se indique de otra manera, el alquilo, alcoxi, alqueno o alquino puede ser lineal o ramificado.

15 Cuando en los compuestos de fórmula I, la cadena carbono como R_1 es sustituida, puede ser sustituida por un halógeno, nitro, amino, hidroxilo o carboxi. Cuando la cadena carbono se interrumpe por un fenileno opcionalmente sustituido, la cadena carbono puede ser no sustituida. Cuando la fracción fenileno es sustituida, puede ser sustituida por un halógeno, nitro, amino, metoxi, hidroxilo o carboxi.

20 Los compuestos de fórmula I, son aquellos en donde R_1 es un alquilo C_{13-20} , opcionalmente sustituido por un nitro, halógeno, amino, hidroxilo o carboxi, y, más preferiblemente aquellos en donde R_1 es fenilalquilo sustituido por una cadena alquilo C_{6-14} opcionalmente sustituida por un halógeno y la fracción alquilo es un alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido por un hidroxilo. R_1 puede ser fenil-alquilo C_{1-6} sustituido en el fenilo por una cadena alquilo C_{6-14} lineal o ramificada, preferiblemente lineal. La cadena alquilo C_{6-14} puede estar en orto, meta o para, preferiblemente en para.

Cada uno de R_2 a R_5 puede ser H.

25 Un compuesto de fórmula I es el 2-amino-2-tetradecil-1,3-propanodiol. Un agonista del receptor S1P de fórmula I particularmente preferido es FTY720, i.e. 2-amino-2-[2-(4-octilfenil)etil]propano-1,3-diol en forma libre o en una forma de sal farmacéuticamente aceptable (denominado en lo sucesivo como Compuesto A), por ejemplo el clorhidrato, como se muestra:



Un compuesto de fórmula II, es uno en donde cada uno de R'₂ a R'₅ es H y m es 4, i.e. 2-amino-2-[2-[4-(1-oxo-5-fenilpentil)fenil]etil]propano-1,3-diol, en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable (denominado en lo sucesivo como Compuesto B), por ejemplo el clorhidrato.

5 Un compuesto de fórmula III, es uno en donde W es CH₃, cada uno de R"₁ a R"₃ es H, Z₂ es etileno, X es heptiloxi y Y es H, i.e. 2-amino-4-(4-heptiloxifenil)-2-metil-butanol, en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable (denominado en lo sucesivo como Compuesto C), por ejemplo el clorhidrato. Se prefiere particularmente el enantiómero R.

10 Un compuesto de fórmula IVa, es el FTY720-fosfato (R_{2a} es H, R_{3a} es OH, X_a es O, R_{1a} y R_{1b} son OH). Un compuesto de fórmula IVb es el Compuesto C-fosfato (R_{2a} es H, R_{3b} es OH, X_a es O, R_{1a} y R_{1b} son OH, Y_a es O y R_{4a} es heptilo). Un compuesto de fórmula V es el Compuesto B-fosfato.

Un compuesto de fórmula V, es el ácido fosfórico mono-[(R)-2-amino-2-metil-4-(4-pentiloxi-fenil)-butil]éster.

Un compuesto de fórmula VIII es el (2R)-2-amino-4-[3-(4-ciclohexilxibutil)benzo[b]tien-6-il]-2-metilbutan-1-ol.

15 Cuando los compuestos de fórmula IX tienen uno o más centros asimétricos en la molécula, se debe entender que la presente invención abarca los diferentes isómeros ópticos, así como se abarcan los racematos, los diastereoisómeros y las mezclas de estos. Los compuestos revelados de fórmula III o IVb, cuando el átomo de carbono que lleva el grupo amino es asimétrico, pueden tener la configuración R en este átomo de carbono.

20 Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de las fórmulas I a IX incluyen las sales con ácidos inorgánicos, tales como clorhidrato, bromhidrato y sulfato, las sales con ácidos orgánicos, tales como sales acetato, fumarato, maleato, benzoato, citrato, malato, metanosulfonato y bencenosulfonato, o, cuando sea apropiado, sales con metales tales como sodio, potasio, calcio y aluminio, sales con aminas, tales como trietilamina y sales con aminoácidos dibásicos, tales como lisina. Los compuestos y las sales de los métodos de la presente invención abarcan las formas hidrato y solvato.

25 Se ha encontrado que los agonistas del receptor S1P, basándose en la actividad observada, por ejemplo recirculación de linfocitos, por ejemplo como se describe en EP627406A1 o USP 6,004,565 son útiles por ejemplo como inmunosupresores, por ejemplo en el tratamiento de rechazo agudo de aloinjertos. Se ha encontrado que, los agonistas del receptor S1P tienen propiedades interesantes que los hacen útiles para la quimioterapia del cáncer, particularmente de tumores sólidos, especialmente de tumores sólidos avanzados. Todavía existe la necesidad de ampliar las tecnologías sanitarias de tratamiento del cáncer de tumores sólidos, especialmente en los casos donde el tratamiento con compuestos anticáncer no se asocia con regresión o estabilización de la enfermedad.

30 En la presente invención, se provee:

35 Un uso para inhibir o controlar la angiogénesis desregulada, por ejemplo la angiogénesis mediada por la esfingosina-1-fosfato (S1P), en un sujeto con necesidad de este, que comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista del receptor S1P que comprende un grupo de fórmula IX, o una sal de este farmacéuticamente aceptable. Y un uso para prevenir o tratar enfermedades mediadas mediante un proceso de neo-angiogénesis o asociado con angiogénesis desregulada en un sujeto con necesidad de este, de acuerdo con las reivindicaciones que comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista del receptor S1P que comprende un grupo de fórmula IX, o una sal de este farmacéuticamente aceptable.

40 Por "tumores sólidos" se entiende tumores y/o metástasis (donde se encuentre) diferentes de cáncer linfático, por ejemplo cerebro y otros tumores del sistema nervioso central (por ejemplo tumores de las meninges, cerebro, médula espinal, nervios craneales y otras partes de sistema nervioso central, por ejemplo glioblastomas o blastomas de médula); cáncer de cabeza y/o cuello; tumores de mama; tumores del sistema circulatorio (por ejemplo corazón, mediastino y pleura, y otros órganos intratorácicos, tumores vasculares y tejido vascular asociado con el tumor); tumores del sistema excretor (por ejemplo riñón, pelvis renal, uréter, vejiga, otros y órganos urinarios no especificados); tumores del tracto gastrointestinal (por ejemplo esófago, estómago, intestino delgado, colon, colorectal, unión rectosigmoidea, recto, ano y canal anal), tumores que afectan el hígado y los conductos biliares intrahepáticos, vesícula biliar, otros y partes sin especificar del tracto biliar, páncreas, otros y órganos digestivos); cavidad oral (labios, lengua, encías, piso de la boca, paladar, y otras partes de la boca, glándula parótida, y otras partes de las glándulas salivales, amígdalas, bucofaringe, nasofaringe, senos piriformes, hipofaringe, y otros sitios en los labios, cavidad oral y faringe); tumores del sistema reproductor (por ejemplo vulva, vagina, cuello uterino, Cuerpo del útero, útero, ovario, y otros sitios asociados con órganos genitales femeninos, placenta, pene, próstata, testículos, y otros sitios asociados con órganos genitales masculinos); tumores del tracto respiratorio (por ejemplo cavidad nasal y oído medio, senos accesorios, laringe, tráquea, bronquios y pulmón, por ejemplo cáncer de pulmón de célula pequeña o cáncer de pulmón de célula no-pequeña); tumores del sistema esquelético (por ejemplo hueso y

5 cartílago articular de extremidades, cartílago articular óseo y otros sitios); tumores de la piel (por ejemplo melanoma maligno de la piel, cáncer de piel no-melanoma, carcinoma de célula basal en la piel, carcinoma de células escamosas de piel, mesotelioma, sarcoma de Kaposi); y tumores que involucran otros tejidos incluyendo nervios periféricos y sistema nervioso autónomo, tejido blando y conjuntivo, retroperitoneo y peritoneo, ojos y sus anexos, tiroides, glándulas adrenales y otras glándulas endocrinas y estructuras relacionadas, neoplasma maligno secundario y no específico de ganglios linfáticos, neoplasma maligno secundario de sistemas digestivo y respiratorio y neoplasma maligno secundario de otros sitios.

10 Cuando se menciona antes y posteriormente un tumor, una enfermedad tumoral, un carcinoma o un cáncer, también la metástasis en el tejido u órgano original y/o en cualquier otro lugar se implican alternativamente o además, cualquiera que sea la localización del tumor y/o la metástasis.

En una serie de otras modalidades alternativas o específicas, la presente invención también provee

15 Un uso para potenciar la actividad de un agente quimioterapéutico o para superar la resistencia a un agente quimioterapéutico en un sujeto con necesidad de este, que comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista del receptor S1P, por ejemplo un agonista del receptor S1P que comprende un grupo de fórmula IX, o una sal de este farmacéuticamente aceptable, ya sea de forma concomitante o secuencial con dicho agente quimioterapéutico.

20 Un uso de acuerdo con el punto anterior, en donde el agente quimioterapéutico es un inhibidor de las rutas de transducción de señales dirigido ya sea contra las células huésped o los procesos involucrados en la formación del tumor y/o la formación de metástasis o utilizado por las células tumorales para la proliferación, supervivencia, diferenciación o desarrollo de resistencia al fármaco.

1.10 Un uso como se indica anteriormente, en donde el agonista del receptor S1P se administra de manera intermitente.

25 Por "cáncer linfático" se entiende por ejemplo, tumores de sistema linfático y sanguíneo (por ejemplo enfermedad de Hodgkin, linfoma no-Hodgkin, linfoma de Burkitt, linfomas relacionados con el SIDA, enfermedades inmunoproliferativas malignas, mieloma múltiple y neoplasias malignas de células plasmáticas, leucemia linfocítica, leucemia mieloide aguda o crónica, leucemia linfocítica aguda o crónica, leucemia monocítica, otras leucemias de células de tipo especificado, leucemia de células de tipo noespecificado, otras y neoplasias malignas noespecificadas de tejidos linfoides, hematopoyéticos y relacionados, por ejemplo linfoma difuso de células grandes, linfoma de célula T o linfoma de célula T cutáneo). El cáncer mieloide incluye por ejemplo leucemia mieloide aguda o crónica.

30 Por el término "agente quimioterapéutico" se entiende cualquier agente quimioterapéutico diferente del agonista del receptor S1P de acuerdo con esta lista:

- i. un inhibidor de aromatasas,
- 35 ii. un antiestrógeno, un anti-andrógeno (especialmente en el caso de cáncer de próstata) o un agonista de la gonadorelina,
- iii. un inhibidor de la topoisomerasa I o un inhibidor de la topoisomerasa II,
- iv. un agente activo del microtúbulo, un agente alquilante, un antimetabolito antineoplásico o un compuesto de platino,
- 40 v. un compuesto de direccionamiento/disminución de la actividad de la proteína o lípido quinasa o la actividad de la proteína o lípido fosfatasa, otro compuesto anti-angiogénico o un compuesto que induce los procesos de diferenciación celular,
- vi. un receptor de la bradiquinina 1 o un antagonista de la angiotensina II,
- 45 vii. un inhibidor de la ciclooxigenasa, un bisfosfonato, un inhibidor de la histona desacetilasa, un inhibidor de la heparanasa (evita la degradación de heparan sulfato), por ejemplo PI-88, un modificador de la respuesta biológica, preferiblemente una linfoquina o interferones, por ejemplo interferón γ , un inhibidor de la ubiquitinación, o un inhibidor que bloquea las rutas anti-apoptóticas,
- viii. un inhibidor de las isoformas oncogénicas Ras, por ejemplo H-Ras, K-Ras o N-Ras, o un inhibidor de la farnesil transferasa, por ejemplo L-744,832 o DK8G557,

ix. un inhibidor de la telomerasa, por ejemplo telomestatin,

x. un inhibidor de la proteasa, un inhibidor de la metaloproteínasa de la matriz, un inhibidor de la metionina aminopeptidasa, por ejemplo bengamida o un derivado de este, o un inhibidor del proteosoma, por ejemplo PS-341, y/o

5 xi) un inhibidor de mTOR.

El término "inhibidor de aromatasa" como se utiliza en este documento se refiere a un compuesto que inhibe la producción del estrógeno, i.e. la conversión de los sustratos androstenediona y testosterona a estrona y estradiol, respectivamente. El término incluye, pero no se limita a esteroides, especialmente atamestano, exemestano y formestano y, en particular, no-esteroides, especialmente aminoglutetimida, rogletimida, piridoglutetimida, trilostano, testolactona, ketokonazol, vorozol, fadrozol, anastrozol y letrozol. El exemestano se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial AROMASIN™. El formestano se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial LENTARON™. El fadrozol se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial AFEMA™. El anastrozol se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial ARIMIDEX™. El letrozol se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial FEMARA™ o FEMAR™. La aminoglutetimida se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial ORIMETEN™. Una combinación de la invención que comprende un agente quimioterapéutico que es un inhibidor de aromatasa es particularmente útil para el tratamiento de tumores receptores positivos de hormonas, por ejemplo tumores de mama.

El término "antiestrógeno" como se utiliza en este documento se refiere a un compuesto que antagoniza el efecto de estrógenos en el nivel receptor del estrógeno. El término incluye tamoxifeno, fulvestrant, raloxifeno y raloxifeno clorhidrato. El tamoxifeno se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial NOLVADEX™. El raloxifeno clorhidrato se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial EVISTA™. El fulvestrant se puede formular como se revela en US 4,659,516 o se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial FASLODEX™. Una combinación de la invención que comprende un agente quimioterapéutico que es un antiestrógeno es particularmente útil para el tratamiento de tumores positivos al receptor de estrógeno, por ejemplo tumores de mama.

El término "anti-andrógeno" como se utiliza en este documento se refiere a cualquier sustancia que es capaz de inhibir los efectos biológicos de hormonas androgénicas e incluye bicalutamida (CASODEX™), la cual se puede formular, por ejemplo como se revela en US 4,636,505.

El término "agonista de la gonadotropina" como se utiliza en este documento incluye abarelix, goserelina y goserelina acetato. La goserelina se revela en US 4,100,274 y se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial ZOLADEX™. El abarelix se puede formular, por ejemplo como se revela en US 5,843,901.

El término "inhibidor de la topoisomerasa I" como se utiliza en este documento incluye, topotecan, irinotecan, 9-nitrocampotecina y el conjugado de la camptotecina macromolecular PNU-166148 (compuesto A1 en WO99/17804). El irinotecan se puede administrar, por ejemplo en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial CAMPTOSAR™. El topotecan se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial HYCAMTIN™.

El término "inhibidor de la topoisomerasa II" como se utiliza en este documento incluye, las antraciclinas tales como doxorubicina (incluyendo formulación liposomal, por ejemplo CAELYX™), daunorubicina, epirubicina, idarubicina y nemorubicina, las antraquinonas mitoxantrona y losoxantrona, y las podofilotoxinas etopósido y tenipósido. El etopósido se puede administrar, por ejemplo en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial ETOPOPHOS™. El tenipósido se puede administrar, por ejemplo en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial VM 26-BRISTOL™. La doxorubicina se puede administrar, por ejemplo en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial ADRIBLASTIN™. La epirubicina se puede administrar, por ejemplo en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial FARMORUBICIN™. La idarubicina se puede administrar, por ejemplo en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial ZAVEDOS™. La mitoxantrona se puede administrar, por ejemplo en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial NOVANTRON™.

El término "agente activo del microtúbulo" se refiere a agentes estabilizantes del microtúbulo y desestabilizantes microtúbulo incluyendo, taxanos, por ejemplo paclitaxel y docetaxel, alcaloides de la vinca, por ejemplo, vinblastina, especialmente sulfato de vinblastina, vincristina especialmente sulfato de vincristina, y vinorelbina, discodermolides y epotilonas y derivados de esta, por ejemplo epotilona B o un derivado de esta. El paclitaxel se puede administrar por

ejemplo en la forma como se comercializa, por ejemplo TAXOL™. El docetaxel se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial TAXOTERE™. El sulfato de vinblastina se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial VINBLASTIN R.P.™. El sulfato de vincristina se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial FARMISTIN™. La discodermolida se puede obtener, por ejemplo, como se revela en US 5,010,099.

El término "agente alquilante" como se utiliza en este documento incluye, pero no se limita a busulfan, clorambucil, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán o nitrosourea (BCNU o Gliadel™). La ciclofosfamida se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial CYCLOSTIN™. La ifosfamida se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial HOLOXAN™.

El término "antimetabolito antineoplásico" incluye, pero no se limita a 5-fluorouracil, capecitabina, gemcitabina, citarabina, fludarabina, tioguanina, metotrexato e idatrexato. La capecitabina se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial XELODA™. La gemcitabina se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial GEMZAR™.

El término "compuesto de platino" como se utiliza en este documento incluye, pero no se limita a carboplatino, cisplatino y oxaliplatino. El carboplatino se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial CARBOPLAT™. El oxaliplatino se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial ELOXATIN™.

El término "compuestos que dirigen/disminuyen la actividad de la proteína o lípido quinasa o otros compuestos anti-angiogénicos" como se utiliza en este documento incluye, pero no se limita a los inhibidores de la proteína tirosina quinasa y/o serina y/o los inhibidores de la treonina quinasa o lípido quinasa, por ejemplo compuestos que dirigen, disminuyen o inhiben la actividad de la familia del factor de crecimiento epidérmico de los receptores de la tirosina quinasa (EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4 como homo- o heterodímeros), la familia del factor de crecimiento endotelial vascular de receptor tirosina quinasas (VEGFR), los receptores del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR), los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1R), la familia del receptor de la tirosina quinasa Trk, la familia del receptor tirosina quinasa Axl, el receptor tirosina quinasa Ret, el receptor tirosina quinasa Kit/SCFR, miembros de la familia c-Abl y sus productos de fusión génica (por ejemplo BCR-Abl), miembros de la familia de proteína quinasa C (PKC) y de serina/treonina quinasas Raf, miembros de la familia quinasa MEK, SRC, JAK, FAK, PDK o PI(3), o de la familia quinasa relacionada con la quinasa PI(3), y/o miembros de la familia quinasa dependiente de la ciclina (CDK) y los compuestos anti-angiogénicos que tienen otro mecanismo para su actividad, por ejemplo no relacionado con la inhibición de la proteína o lípido quinasa.

Los compuestos que dirigen, disminuyen o inhiben la actividad de VEGFR son especialmente los compuestos, proteínas o anticuerpos que inhiben el receptor tirosina quinasa VEGF, que inhiben un receptor de VEGF o se unen a VEGF, y son en particular aquellos compuestos, proteínas o anticuerpos monoclonales genéricos y específicamente revelados en WO 98/35958, por ejemplo 1-(4-cloroanilino)-4-(4-piridilmetil)ftalazina o una sal de este farmacéuticamente aceptable, por ejemplo el succinato, en WO 00/27820, por ejemplo un derivado de la amida del ácido N-arilo(tio) antranílico por ejemplo 2-[(4-piridil)metil]amino-N-[3-metoxi-5-(trifluorometil) fenil]benzamida o 2-[(1-oxido-4-piridil)metil]amino-N-[3-trifluorometilfenil]benzamida, o en WO 00/09495, WO 00/59509, WO 98/11223, WO 00/27819 y EP 0 769 947; aquellos como se describen en M. Prewett et al en Cancer Research 59 (1999) 5209-5218, por F. Yuan et al en Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 93, pp. 14765-14770, Dec. 1996, by Z. Zhu et al en Cancer Res. 58, 1998, 3209-3214, y por J. Mordenti et al en Toxicologic Pathology, Vol. 27, no. 1, pp 14-21, 1999; en WO 00/37502 y WO 94/10202; Angiostatin™, descrita por M. S. O'Reilly et al, Cell 79, 1994, 315-328; Endostatin™, descrita por M. S. O'Reilly et al, Cell 88, 1997, 277-285; amidas del ácido antranílico; ZD4190; ZD6474; SU5416; SU6668; o anticuerpos anti-VEGF o anticuerpos anti-receptor de VEGF, por ejemplo RhuMab.

Por anticuerpo se entiende anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos formados de al menos 2 anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada.

Los compuestos que dirigen, disminuyen o inhiben la actividad de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico son especialmente los compuestos, proteínas o anticuerpos que inhiben los miembros de la familia del receptor tirosina quinasa EGF, por ejemplo receptor EGF, ErbB2, ErbB3 y ErbB4 o se unen a EGF o ligandos relacionados con EGF, o que tienen un efecto inhibitorio doble sobre el receptor de ErbB y VEGF quinasa y son en particular aquellos compuestos, proteínas o anticuerpos monoclonales genéricos y específicamente revelados en WO 97/02266, por ejemplo el compuesto del ej. 39, o en EP 0 564 409, WO 99/03854, EP 0520722, EP 0 566 226, EP 0 787 722, EP 0 837 063, US 5,747,498, WO 98/10767, WO 97/30034, WO 97/49688, WO 97/38983 y, especialmente, WO 96/30347 (por ejemplo, el compuesto conocido como CP 358774), WO 96/33980 (por ejemplo, el compuesto ZD 1839) y WO 95/03283 (por ejemplo, el compuesto ZM105180) o PCT/EP02/08780; por ejemplo

trastuzumab (HerpetinR), cetuximab, Iressa, OSI-774, CI-1033, EKB-569, GW-2016, E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6.3 o E7.6.3.

Los compuestos que dirigen, disminuyen o inhiben la actividad de PDGFR son especialmente los compuestos que inhiben el receptor de PDGF, por ejemplo un derivado N-fenil-2-pirimidina-amina, por ejemplo imatinib.

- 5 Los compuestos que dirigen, disminuyen o inhiben la actividad de miembros de la familia c-Abl y sus productos de fusión génica, por ejemplo un derivado N-fenil-2-pirimidina-amina, por ejemplo imatinib; PD180970; AG957; o NSC 680410.

- 10 Los compuestos que dirigen, disminuyen o inhiben la actividad de los miembros de la familia de proteína quinasa C, Raf, MEK, SRC, JAK, FAK y PDK, o PI(3) quinasa o miembros de la familia relacionados con PI(3) quinasa, y/o miembros de la familia quinasa dependiente de la ciclina (CDK) son especialmente los derivados de la estaurosporina revelados en EP 0 296 110, por ejemplo midostaurina; ejemplos de otros compuestos incluyen por ejemplo UCN-01, safinol, BAY 43-9006, Bryostatin 1, Perifosine; UO126; Ilmofosine; RO 318220 y RO 320432; GO 6976; Isis 3521; o LY333531/LY379196.

Otros compuestos anti-angiogénicos son por ejemplo la talidomida (THALOMID) y TNP-470.

- 15 Los compuestos que dirigen, disminuyen o inhiben la actividad de una proteína o lípido fosfatasa son por ejemplo los inhibidores de fosfatasa 1, fosfatasa 2A, PTEN o CDC25, por ejemplo ácido okadaico o un derivado de este.

Los compuestos que inducen los procesos de diferenciación celular son por ejemplo el ácido retinoico, α -, γ - o δ -tocoferol o α -, γ - o δ -tocotrienol.

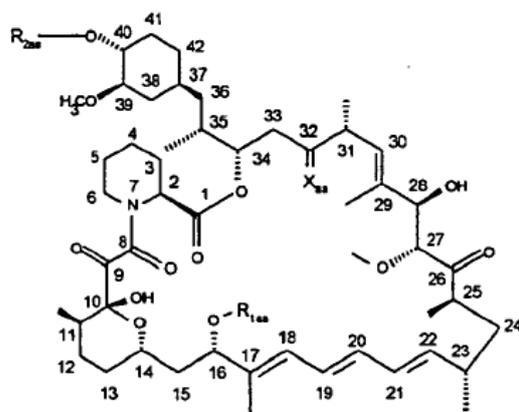
- 20 El término inhibidor de la ciclooxigenasa como se utiliza en este documento incluye, pero no se limita a, por ejemplo celecoxib (CelebrexR), rofecoxib (VioxxR), etoricoxib, valdecoxib o un ácido 5-alquil-2-arilaminofenilacético, por ejemplo ácido 5-metil-2-(2'-cloro-6'-fluoroanilino) fenil acético.

El término "inhibidor de la histona desacetilasa" como se utiliza en este documento incluye, MS-27-275, SAHA, piroxamida, FR-901228 o ácido valproico.

- 25 El término "bisfosfonatos" como se utiliza en este documento incluye, pero no se limita a, ácido etridrónico, clodrónico, tiludrónico, pamidrónico, alendrónico, ibandrónico, risedrónico y zoledrónico. El "ácido etridrónico" se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial DIDRONEL™. El "ácido clodrónico" se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial BONEFOS™. El "ácido tiludrónico" se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial SKELID™. El "ácido pamidrónico" se puede administrar, por ejemplo en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial AREDIA™. El "ácido alendrónico" se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial FOSAMAX™. El "ácido ibandrónico" se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial BONDRANAT™. El "ácido risedrónico" se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial ACTONEL™. El "ácido zoledrónico" se puede administrar, por ejemplo en la forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial ZOMETA™
- 30
- 35

El término "inhibidor de la metaloproteinasa de la matriz" como se utiliza en este documento incluye, pero no se limita a inhibidores peptidomiméticos y no peptidomiméticos del colágeno, derivados de la tetraciclina, por ejemplo inhibidor peptidomimético hidroxamato batimastat y su análogo biodisponible por vía oral marimastat, prinomastat, BMS-279251, BAY 12-9566, TAA211 o AAJ996.

- 40 El término "inhibidor de mTOR" como se utiliza en este documento incluye, pero no se limita a rapamicina (sirolimus) o un derivado de esta. La rapamicina es un conocido antibiótico macrólido producido por *Streptomyces hygroscopicus*. Los derivados de la rapamicina apropiados incluyen por ejemplo, los compuestos de fórmula A



A

en donde

R_{1aa} es CH₃ o alquilino C₃₋₆,

R_{2aa} es H o -CH₂-CH₂-OH, 3-hidroxi-2-(hidroximetil)-2-metil-propanoil o tetrazolil, y

5 X_{aa} es =O, (H,H) o (H,OH)

a condición de que R_{2aa} sea diferente de H, cuando X_{aa} es =O y R_{1aa} es CH₃.

o un profármaco de este cuando R_{2aa} es -CH₂-CH₂-OH, por ejemplo un éter de este fisiológicamente hidrolizable.

Los compuestos de fórmula A, se revelan por ejemplo en WO 94/09010, WO 95/16691, WO 96/41807, USP 5,362,718 o WO 99/15530. Se pueden preparar como se revela o por analogía a los procedimientos descritos en estas referencias.

Los derivados de la rapamicina preferidos son 32-deoxorapamicina, 16-pent-2-iniloxi-32-deoxorapamicina, 16-pent-2-iniloxi-32(S)-dihidro-rapamicina, 16-pent-2-iniloxi-32(S)-dihidro-40-O-(2-hidroxietil)-rapamicina y, más preferiblemente, 40-O-(2-hidroxietil)-rapamicina. Otros ejemplos de derivados de la rapamicina incluyen por ejemplo CC1779 o 40- [3-hidroxi-2-(hidroximetil)-2-metilpropanoato]-rapamicina o una sal de este farmacéuticamente aceptable, como se revela en USP 5,362,718, ABT578 o 40-(tetrazolil)-rapamicina, particularmente 40-epi-(tetrazolil)-rapamicina, por ejemplo como se revela en WO 99/15530, o los análogos no inmunosupresores como se revela por ejemplo en WO 98/02441 y WO01/14387, por ejemplo AP23573.

En cada caso, dónde se proveen las citaciones de solicitudes de patente o publicaciones científicas, el asunto en relación con los compuestos se incorpora aquí en la presente aplicación por referencia. Del mismo modo, se comprenden las sales farmacéuticamente aceptables de este, los correspondientes racematos, diastereoisómeros, enantiómeros, tautómeros así como las correspondientes modificaciones de cristal de los compuestos revelados anteriormente cuando están presentes, por ejemplo solvatos, hidratos y polimorfos, que se revelan en este documento. Los compuestos utilizados como ingredientes activos en las combinaciones de la invención se pueden preparar y administrar como se describe en los documentos citados, respectivamente. También dentro del alcance de esta invención está la combinación de más de dos ingredientes activos separados como se ha expuesto anteriormente, i.e. una combinación farmacéutica dentro del alcance de esta invención podría incluir tres ingredientes activos o más. Además tanto el primer agente como el co-agente no son el ingrediente idéntico.

La utilidad de los agonistas de S1P, por ejemplo los agonistas de S1P que comprenden un grupo de fórmula X de acuerdo con las reivindicaciones, en el tratamiento de tumores sólidos como se especifica anteriormente, se puede demostrar en métodos de ensayo de animales así como en clínicos, por ejemplo de acuerdo con los métodos descritos a continuación.

Todos los ejemplos son ejemplos referencia.

A. In Vitro

A.1 Actividad Antitumoral

Se utiliza una línea celular de cáncer de mama de ratón aislado originalmente de carcinomas mamarios, por ejemplo JygMC(A). El número de células se ajusta a 5×10^5 para la siembra en placas en medio fresco antes del procedimiento. Las células se incuban con medio fresco que contiene 2.5mM de timidina sin FCS, durante 12 h y luego se lava dos veces con PBS, seguido por la adición de medio fresco con 10% de FCS y adicionalmente se incuban durante otras 12h. Posteriormente las células se incuban con medio fresco que contiene 2.5mM de timidina sin FCS, durante 12h. Para liberar las células del bloque, las células se lavan dos veces con PBS y se vuelven a sembrar en placas en medio fresco con 10% de FCS. Después de la sincronización, las células se incuban con o sin diferentes concentraciones de un compuesto de fórmula I, durante 3, 6, 9, 12, 18 o 24 h. Las células se recogen después del tratamiento con 0.2% de EDTA, se fijan con solución congelada de etanol al 70%, se hidrolizan con 250 $\mu\text{g/ml}$ de RNasaA (tipo 1-A: Sigma Chem. Co.) a 37°C , durante 30 min y se tiñen con yoduro de propidio a 10 mg/ml durante 20 min. Después del periodo de incubación, el número de células se determina tanto por el recuento de células en un contador Coulter como por el ensayo colorimétrico SRB. Bajo estas condiciones un agonista de S1P, por ejemplo el Compuesto B en la forma de sal clorhidrato, inhibe la proliferación de las células tumorales a concentraciones que oscilan de 10^{-12} a 10^{-6} M.

15 A.2 Ensayo de Formación de Tubo HUVEC S1 P-Mediado

Para el ensayo de formación de tubos, se utilizan HUVEC del pasaje 2-8 y nunca son mayores del 70% de confluencia antes de la recogida. Las células se preparan para el ensayo mediante el lavado con Solución Salina Balanceada con Herpes (HBSS de Clonetics) y luego la tripsinización con Tripsina/EDTA (0.25 mg/ml, de Clonetics). Después de que aproximadamente el 90 % de las células se han levantado de la placa, se adiciona un volumen igual de Solución Neutralizante de Tripsina (TNS de Clonetics) y las células se recolectan en un tubo cónico que contiene al menos 10 ml de EBM-2 (Clonetics) + 0.1 % de medio BSA (Sigma). Las células se centrifugan a 1000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se retira y reemplaza con 5 ml de EBM-2 fresco + 0.1 % de BSA. Las células se cuentan utilizando un hemacitómetro y el volumen de la suspensión celular se ajusta para lograr una concentración de 500,000 células/ml. Los tubos cónicos se preparan con los compuestos de prueba a 100 nM, y la toxina pertussis (PTx) a 10 ng/ml en cada uno, luego 1 ml de la suspensión celular se adiciona a cada tubo. Los tubos luego se incuban, durante $\frac{1}{2}$ hora a 37°C , 5% de CO_2 . El ensayo de migración se realiza utilizando Placas Inserto Fluoro-Blok 24-Multiwell cubiertas con fibronectina (tamaño de poro 8 μm , Falcon #351147) en lugar de los insertos individuales en una placa de 24 pozos. Las células y los compuestos de prueba se preparan y pre-incuban como se describe anteriormente, luego se adicionan 100 μl a cada pozo apropiado en la Placa Inserto. Se adicionan 300 μl del medio EBM-2 + 2 % de carbón vegetal - tratado sin S1P en el fondo de los pozos marcados para no estimulación (-), y se adicionan 300 μl del medio que contiene S1P (500 nM) en el fondo de los pozos marcados para estimulación (+). La placa luego se incuba, durante 4 horas a 37°C , 5 % de CO_2 .

Calceína AM, 50 $\mu\text{g/vial}$, (Molecular Probes #C3100) se prepara mediante la adición de 20 μl de DMSO al vial. Luego 12.5 ml de HBSS (por placa) se calientan a 37°C y 150 μl se adicionan al vial. Los contenidos del vial luego se transfieren de nuevo al HBSS remanente para hacer la concentración final 4 $\mu\text{g/ml}$ de Calceína AM.

La placa Fluoro-Blok se retira del incubador y la placa inserto superior se separa y se aplica un "golpecito" para retirar el exceso de medio aferrado a los insertos. A continuación, la placa inserto se transfiere a una placa de 24 pozos fresca que contiene 500 $\mu\text{l/pozo}$ de la Calceína AM a 4 $\mu\text{g/ml}$. La placa luego se incuba, durante $1\frac{1}{2}$ horas a 37°C , 5 % de CO_2 .

Después de la incubación, la placa se lee en un Cytofluor II, con una excitación de 485 nm y una emisión de 530 nm. El recubrimiento del Fluoro-Blok en los insertos permite que solo sean contadas las células que han migrado al fondo. Los datos se transfieren a Excel para los cálculos, las gráficas se crean utilizando SigmaPlot, y para las pruebas de significancia (t-test) se utiliza el SigmaStat. (Figura 7).

La formación de tubos se cuantifica mediante el recuento del número de puntos de ramificación (dos cables de conexión independientes) en 3 campos independientes a una ampliación 4x. Los resultados se reportan de la siguiente manera:

Tratamiento	Puntos de Ramificación
PBS	8 ± 5
S1P	42 ± 13
FTY720-Fosfato	48 ± 15
FTY720-Fosfato + S1P	14 ± 7
Compuesto C-Fosfato	44 ± 16
Compuesto C-Fosfato + S1P	18 ± 6

Estos resultados demuestran la capacidad única del FTY720-Fosfato o Compuesto C-Fosfato para actuar como un agonista de la angiogénesis por sí solo, pero luego sorprendentemente, como un antagonista de la angiogénesis mediada por S1P. El Compuesto C-Fosfato preferiblemente es el racemato o el enantiómero R. PTx se utiliza como un control para inhibir la actividad mediada por $G_{i\alpha}$ (EDG-1).

B. In Vivo

B.1 Actividad Antitumoral

La actividad antitumoral se expresa como % T/C (aumento promedio en los volúmenes del tumor de animales tratados dividido por el aumento promedio de volúmenes del tumor de animales control multiplicado por 100).

Alícuotas de células cancerosas (1×10^7), por ejemplo células humanas de melanoma A375, se trasplantan a ratones BALB/c-*nu/nu*. Cuando los tumores han alcanzado un tamaño de aprox. 10x10 mm, los animales se asignan aleatoriamente a cuatro subgrupos y se inicia el tratamiento con un compuesto de fórmula I. Los animales se sacrifican después de 2 semanas de tratamiento, tiempo en el cual los tumores y tejidos se recogieron y prepararon para el análisis morfológico y molecular. El tamaño de los tumores se determina con un calibrador. En este ensayo, un agonista de S1 P, por ejemplo el Compuesto B o C (en la forma de sal clorhidrato), ralentiza el crecimiento del tumor cuando se administra a una dosis de 0.5 a 5 mg/kg vs control de solución salina: por ejemplo, el Compuesto C-HCl cuando se administra a una dosis de 2.5mg/kg 5x/semanas da lugar a un valor final de T/C del 30%.

B.2 Combinación con un inhibidor de la proteína tirosina quinasa VEGF-R

Ratones inmunológicamente deficientes trasplantados con tumores de mama MDA-MB-435 humanos se tratan durante 2 semanas con un inhibidor de la proteína tirosina quinasa VEGF-R, por ejemplo 1-(4-cloroanilino)-4-(4-piridilmetil)ftalazina succinato, a una dosis de 100 mg/kg p.o. 5x/semana, un agonista del receptor S1P, por ejemplo el Compuesto C (sal clorhidrato), a una dosis de 2.5 mg/kg i.v. 5x/semana, o una combinación de ambos. Como se indica anteriormente la actividad antitumoral se expresa como % T/C. Una combinación del Compuesto C-HCl con 1-(4-cloroanilino)-4-(4-piridilmetil)ftalazina succinato produce un efecto antitumoral mayor (% T/C 27) en comparación con ya sea el agente solo (Compuesto C-HCl, T/C 66%; 1-(4-cloroanilino)-4-(4-piridilmetil)ftalazina succinato, % T/C 91). También se obtienen buenas respuestas antitumorales cuando los ratones inmunológicamente deficientes se trasplantan con células humanas de melanoma A375 y se tratan de manera similar con la misma combinación: el tratamiento combinado resulta en un % T/C 15 mientras que el tratamiento con cada agente solo resulta en un % T/C 35 y 44, respectivamente.

B.3 Actividad Antiangiogénica

Cámaras porosas que contienen (i) esfingosina-1-fosfato (5 μ M/cámara) o (ii) VEGF humano (1 μ g/cámara) en 0.5 ml de 0.8% peso/v de agar (que contiene heparina, 20 U/ml) se implantan por vía subcutánea en el flanco de los ratones. S1 P o VEGF induce el crecimiento de tejido vascularizado alrededor de la cámara. Esta respuesta es dependiente de la dosis y se puede cuantificar midiendo el peso y el contenido sanguíneo del tejido. Los ratones se tratan una vez al día (i) por vía oral con el Compuesto A (0.3, 3, 30 o 50 mg/kg) o (ii) por vía intravenosa con el enantiómero R del Compuesto C (2.5 mg/kg) o (iii) por vía intravenosa con el enantiómero S del Compuesto C (2.5 mg/kg) o (iv) por vía oral o por vía intravenosa con vehículo (5% de glucosa, 10 ml/kg), iniciando 4-6 horas antes de la implantación de las cámaras y continuando durante 4 días. Los animales se sacrifican para la medición de los tejidos vascularizados 24 h después de la última dosis. Se determinan el peso y el contenido sanguíneo de los tejidos vascularizados alrededor de la cámara.

Los animales tratados con el Compuesto A o con el enantiómero S o R del Compuesto C muestran un reducido contenido sanguíneo y/o peso de los tejidos vascularizados en comparación con los animales tratados con el vehículo solo.

C. Ensayo Clínico

C.1 Investigación del beneficio clínico de un agonista del receptor S1 P, por ejemplo un compuesto de fórmula I, II o III, por ejemplo el Compuesto A, B o C

20 pacientes con tumores sólidos en progresión, en estado avanzado, resistentes o reacios a terapias estándar, para recibir dicho compuesto a una dosificación como se determina por un estudio de incremento de dosis. El estado clínico general del paciente se investiga semanalmente mediante el examen físico y de laboratorio. Los cambios en peso del tumor y la metástasis se evalúan cada 2 meses mediante examen radiológico. Inicialmente los pacientes recibieron el tratamiento durante 2 meses. Posteriormente, permanecen en tratamiento durante el tiempo que su

enfermedad no progrese y el fármaco se tolere satisfactoriamente. Las variables principales para la evaluación: Seguridad (eventos adversos), bioquímica sérica estándar y hematología, dimensiones del tumor mediante tomografía computarizada (TC) o Imágenes por Resonancia Magnética (IRM).

C.2 Tratamiento Combinado

5 Los estudios clínicos apropiados son, por ejemplo, estudios no aleatorizados abiertos, de incremento de dosis en
 10 pacientes con tumores sólidos avanzados. Tales estudios prueban en particular el sinergismo de los ingredientes
 activos de la combinación de la invención. Los efectos beneficiosos de las enfermedades proliferativas se pueden
 determinar directamente a través de los resultados de estos estudios o por cambios en el diseño del estudio que son
 conocidos como tales por un experto en la técnica. Tales estudios, en particular, son apropiados para comparar los
 15 efectos de una monoterapia utilizando los ingredientes activos y una combinación de la invención. Preferiblemente,
 la dosis de agente (a) se escala hasta que la se alcance la Máxima Dosificación Tolerada, y el co-agente (b) se
 administra con dosis fijas. Alternativamente, el agente (a) se administra con una dosis fija y la dosis de co-agente (b)
 se escala. Cada paciente recibe una dosis del agente (a) ya sea diariamente o intermitente. La eficacia del
 tratamiento se puede determinar en dichos estudios, por ejemplo, después de 12, 18 o 24 semanas mediante la
 evaluación radiológica de los tumores cada 6 semanas.

Alternativamente, se puede utilizar un estudio doble ciego, controlado con placebo con el fin de probar los beneficios
 de la combinación de la invención mencionados en este documento.

Las dosificaciones diarias requeridas en la práctica del método de la presente invención, cuando se utiliza un
 20 agonista del receptor S1P solo variarán dependiendo de, por ejemplo, el compuesto utilizado, el huésped, el modo
 de administración y la severidad de la condición que se trata. Un rango de dosificación diaria preferido es
 aproximadamente de 0.1 a 100 mg como una dosis única o en dosis divididas. Las dosificaciones diarias apropiadas
 para pacientes están en el orden de por ejemplo 0.1 a 50 mg p.o. El agonista del receptor S1P se puede administrar
 por cualquier ruta convencional, en particular por vía enteral, por ejemplo por vía oral, por ejemplo en la forma de
 25 comprimidos, cápsulas, soluciones de bebida, por vía nasal, pulmonar (por inhalación) o por vía parenteral, por
 ejemplo en la forma de suspensiones o soluciones inyectables. Las formas de dosificación unitarias apropiadas para
 una administración oral comprenden de aprox. 0.1 a 30 mg, por lo general 0.25 a 30 mg de agonista del receptor S1
 P, junto con uno o más diluentes o portadores farmacéuticamente aceptables para estos. Con el fin de inhibir la
 angiogénesis es importante seleccionar una dosis suficientemente alta del agonista del receptor S1 P, como bajas
 30 concentraciones de los agonistas del receptor de S1 P promueven la angiogénesis. Una dosis apropiada para
 proveer un efecto anti-angiogénico cuando un agonista de S1 P se administra a un paciente se puede seleccionar
 mediante estudios de incrementos de dosis y de concentración como se describe anteriormente en A, B, y C.

La combinación de la invención también se puede aplicar en combinación con una intervención quirúrgica,
 hipertemia de todo el cuerpo prolongada suave y/o terapia de irradiación.

La administración de una combinación farmacéutica de la invención resulta en un efecto beneficioso, por ejemplo un
 35 efecto terapéutico sinergista, por ejemplo con respecto a ralentizar, detener o revertir la formación de neoplasia,
 crecimiento o propagación de la metástasis o una mayor duración de la respuesta del tumor o inhibición de la
 angiogénesis; también puede resultar en otros efectos beneficiosos, por ejemplo menos efectos secundarios, una
 calidad mejorada de vida o una disminución de la mortalidad y la morbilidad, en comparación con una monoterapia
 40 que aplica solo uno de los ingredientes activos farmacéuticamente utilizado en la combinación de la invención, en
 particular en el tratamiento de un tumor que es reactivo a otros quimioterapéuticos conocidos como agentes anti-
 cáncer.

Un beneficio adicional es que se pueden utilizar dosis inferiores de los ingredientes activos de la combinación de la
 invención, por ejemplo, que las dosificaciones necesitan no solo por lo general ser más pequeñas sino también ser
 45 aplicadas menos frecuentemente, o se puede utilizar con el fin de disminuir la incidencia de los efectos secundarios,
 mientras que controla el crecimiento de formación de neoplasia. Esto está de acuerdo con los deseos y
 requerimientos de los pacientes a ser tratados.

De acuerdo con una modalidad de la invención, una combinación farmacéutica preferida comprende

a) un compuesto de fórmula I, II, III, IVa, IVb, V o VI, por ejemplo el Compuesto A, B o C, y

50 b) como un co-agente, uno o más compuestos como se indica en los párrafos (ii), (iii), (iv), (v), (vii) o (xi)
 anteriormente, por ejemplo carboplatino, cisplatino, paclitaxel, docetaxel, gemcitabina, doxorubicina, un compuesto
 que dirige, disminuye o inhibe la actividad de la familia del factor de crecimiento endotelial vascular del receptor
 tirosina quinasas (VEGFR) o los receptores del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR), un
 bisfosfonato o un inhibidor de mTOR.

Otra modalidad de la invención se refiere al uso de un agonista del receptor S1 P (a) en combinación con un agente quimioterapéutico (b) en el tratamiento de un cáncer linfático o mielóide, por ejemplo como se revela anteriormente. La combinación puede comprender como otro co-agente b) por ejemplo busulfan, citarabina, 6-tioguanina, fludarabina, hidroxurea, procarbazona, bleomicina o metotrexato. Los inhibidores de la topoisomerasa II, por ejemplo daunorubicina o, particularmente, los compuestos que dirigen, disminuyen o inhiben la actividad de PDGFR o de miembros de la familia c-Abl y sus productos de fusión génica, por ejemplo imatinib, se prefieren como co-agente (b), por ejemplo para su uso en el tratamiento de un cáncer linfático.

Los términos "co-administración" o "administración combinada" o similares como se utiliza en este documento se entiende que abarcan la administración de los agentes terapéuticos seleccionados a un paciente individual, y tienen la intención de incluir regímenes de tratamiento en los cuales los agentes no se administran necesariamente por la misma ruta de administración o al mismo tiempo.

Es un objetivo de esta invención proveer una composición farmacéutica que comprende una cantidad, que es en conjunto efectiva terapéuticamente contra una enfermedad maligna proliferativa que comprende una combinación de la invención. En esta composición, el primer agente a) y el co-agente (b) se pueden administrar juntos, uno después del otro o por separado en una forma de dosificación unitaria combinada o en dos formas de dosificación unitarias separadas. La forma de dosificación unitaria también puede ser una combinación fija.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se pueden preparar de una manera conocida per se y son aquellas apropiadas para la administración por vía enteral, tal como por vía oral o rectal, y parenteral a mamíferos (animales de sangre caliente), incluyendo humanos, que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un socio de la combinación activa farmacológicamente solo, por ejemplo como se indica anteriormente, o en combinación con uno o más portadores o diluentes farmacéuticamente aceptables, especialmente apropiados para la aplicación enteral o parenteral.

Las composiciones farmacéuticas apropiadas contienen, por ejemplo, de aproximadamente 0.1 % a cerca de 99.9%, preferiblemente de aproximadamente 1 % a cerca de 60 %, de el o los ingredientes activos. Las preparaciones farmacéuticas para la terapia de combinación para administración enteral o parenteral son, por ejemplo, aquellas en formas de dosificación unitarias, tales como comprimidos recubiertos de azúcar, comprimidos, cápsulas o supositorios, o ampollas. Si no se indica de otra manera, estas se preparan de una manera conocida per se, por ejemplo por medio de procesos convencionales de mezcla, granulación, recubrimiento con azúcar, disolución o liofilización. Será apreciado que el contenido de la unidad de un socio de combinación contenido en una dosis individual de cada forma de dosificación no necesita por si mismo constituir una cantidad efectiva dado que la cantidad efectiva necesaria se puede alcanzar mediante la administración de una pluralidad de unidades de dosificación.

En particular, una cantidad terapéuticamente efectiva de cada uno de los socios de combinación de la combinación de la invención se puede administrar de forma simultánea o secuencialmente y en cualquier orden, y los componentes se pueden administrar por separado o como una combinación fija. Por ejemplo, el método de retraso de la progresión o tratamiento de una enfermedad maligna proliferativa de acuerdo con la invención puede comprender (i) administración del primer agente a) en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable y (ii) administración de un co-agente b) en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable, de forma simultánea o secuencialmente en cualquier orden, en conjunto cantidades terapéuticamente efectivas, preferiblemente en cantidades sinérgicamente efectivas, por ejemplo en dosificaciones diarias o intermitentes correspondientes a las cantidades descritas en este documento. Los socios de combinación individuales de la combinación de la invención se pueden administrar por separado en diferentes momentos durante el curso de la terapia o concurrentemente en formas de combinación únicas o divididas. Adicionalmente, el término administración también abarca el uso de un pro-fármaco de un socio de combinación que convierte *in vivo* al socio de combinación como tal. Por lo tanto, se debe entender que la presente invención abarca todos estos regímenes de tratamiento simultáneo o alternante y el término "administración" se debe interpretar en consecuencia.

La dosificación efectiva de cada uno de los socios de combinación empleados en la combinación de la invención puede variar dependiendo del compuesto particular o la composición farmacéutica empleada, el modo de administración, la condición que se trata, la severidad de la condición que se trata. De esta manera, el régimen de dosificación de la combinación de la invención se selecciona de acuerdo con una variedad de factores incluyendo la ruta de administración y la función hepática y renal del paciente. Un médico, clínico o veterinario de experiencia normal puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad efectiva de los ingredientes activos únicos necesarios para prevenir, contrarrestar o detener el progreso de la condición. La precisión óptima en el logro de la concentración de los ingredientes activos dentro del rango que produce eficacia sin toxicidad requiere un régimen basado en las cinéticas de la disponibilidad de los ingredientes activos en los sitios diana.

Las dosificaciones diarias para el primer agente o componente (a) por supuesto, variarán dependiendo de una variedad de factores, por ejemplo el compuesto elegido, la condición particular que se trata y el efecto deseado. En general, sin embargo, se logran resultados satisfactorios en la administración de un agonista del receptor S1 P, por

- ejemplo el Compuesto A, B o C, a tasas de dosificación diaria del orden de aprox. 0.1 a 100 mg como una dosis única o en dosis divididas. El agonista del receptor S1 P se puede administrar por cualquier ruta convencional, en particular por vía enteral, por ejemplo por vía oral, por ejemplo en la forma de comprimidos, cápsulas, soluciones de bebida o por vía parenteral, por ejemplo en la forma de suspensiones o soluciones inyectables. Las formas de dosificación unitarias apropiadas para una administración oral comprenden de aprox. 0.1 a 30 mg del componente (a), por ejemplo 0.1 a 25 mg, junto con uno o más diluentes o portadores farmacéuticamente aceptable para este.
- El fadrozol se puede administrar por vía oral a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 0.5 a cerca de 10 mg/día, preferiblemente de aproximadamente 1 a cerca de 2.5 mg/día. El exemestano se puede administrar por vía oral a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 5 a cerca de 200 mg/día, preferiblemente de aproximadamente 10 a cerca de 25 mg/día, o por vía parenteral de aproximadamente 50 a 500 mg/día, preferiblemente de aproximadamente 100 a cerca de 250 mg/día. Si el fármaco se administra en una composición farmacéutica separada, se puede administrar en la forma revelada en GB 2,177,700. El formestano se puede administrar por vía parenteral a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 100 a 500 mg/día, preferiblemente de aproximadamente 250 a cerca de 300 mg/día. El anastrozol se puede administrar por vía oral a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 0.25 a 20 mg/día, preferiblemente de aproximadamente 0.5 a cerca de 2.5 mg/día. La aminoglutemida se puede administrar a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 200 a 500 mg/día.
- El tamoxifeno citrato se puede administrar a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 10 a 40 mg/día.
- La vinblastina se puede administrar a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 1.5 a 10 mg/m²día. El sulfato de vincristina se puede administrar por vía parenteral a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 0.025 a 0.05 mg/kg de peso corporal * semanas. La vinorelbina se puede administrar a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 10 a 50 mg/m²día. El fosfato de etopósido se puede administrar a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 25 a 115 mg/m²día, por ejemplo 56.8 o 113.6 mg/m²día.
- El tenipósido se puede administrar a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 75 a 150 mg aproximadamente cada dos semanas. La doxorubicina se puede administrar a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 10 a 100 mg/m²día, por ejemplo 25 o 50 mg/m²día. La epirubicina se puede administrar a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 10 a 200 mg/m²día. La idarubicina se puede administrar a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 0.5 a 50 mg/m²día. La mitoxantrona se puede administrar a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 2.5 a 25 mg/m²día.
- El paclitaxel se puede administrar a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 50 a 300 mg/m²día. El docetaxel se puede administrar a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 25 a 100 mg/m²día.
- La ciclofosfamida se puede administrar a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 50 a 1500 mg/m²día. El Melphalan se puede administrar a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 0.5 a 10 mg/m²día.
- El 5-fluorouracilo se puede administrar a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 50 a 1000 mg/m²día, por ejemplo 500 mg/m²día. La capecitabina se puede administrar a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 10 a 1000 mg/m²día. La gemcitabina clorhidrato se puede administrar a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 1000 mg/m²/semanas. El metotrexato se puede administrar a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 5 a 500 mg/m²día.
- El topotecan se puede administrar a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 1 a 5 mg/m²día. El irinotecan se puede administrar a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 50 a 350 mg/m²día.
- El carboplatino se puede administrar a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 200 a 400 mg/m² aproximadamente cada cuatro semanas. El cisplatino se puede administrar a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 25 a 75 mg/m² aproximadamente cada tres semanas. El oxaliplatino se puede administrar a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 50 a 85 mg/m² cada dos semanas.
- El imatinib se puede administrar a un humano en una dosificación en el rango de aproximadamente 2.5 a 850 mg/día, más preferiblemente 5 a 600 mg/día y más preferiblemente 20 a 300 mg/día.

5 El ácido alendrónico se puede administrar a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 5 a 10 mg/día. El ácido clodrónico se puede administrar a un humano por ejemplo en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 750 a 1500 mg/día. El ácido etidrónico se puede administrar a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 200 a 400 mg/día. El ácido ibandrónico se puede administrar a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 1 a 4 mg cada tres a cuatro semanas. El ácido risedrónico se puede administrar a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 20 a 30 mg/día. El ácido pamidrónico se puede administrar a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 15 a 90 mg cada tres a cuatro semanas. El ácido tiludrónico se puede administrar a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 200 a 400 mg/día.

10 El trastuzumab se puede administrar a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 1 a 4 mg/m²/semanas.

La bicalutamida se puede administrar a un humano en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 25 a 50 mg/m²día.

15 1-(4-cloroanilino)-4-(4-piridilmetil)ftalazina o la sal de esta, por ejemplo succinato, se puede administrar a un humano en un rango de dosificación de aproximadamente 50 a 1500, más preferiblemente aproximadamente 100 a 750, y más preferiblemente 250 a 500, mg/día.

La rapamicina o un derivado de esta, por ejemplo 40-O-(2-hidroxi-etilo)-rapamicina, se puede administrar en un rango de dosificación que varía de aproximadamente 0.1 a 25 mg.

Ejemplo de Formulación: cápsulas blandas

Compuesto de fórmula I,	
por ejemplo Compuesto A, HCl	30 mg
Polietilenglicol 300	300 mg
Polisorbato 80	20 mg
<hr style="width: 100%; border: 0.5px solid black;"/> Total	<hr style="width: 100%; border: 0.5px solid black;"/> 350 mg

20 Los agonistas del receptor S1 P, por ejemplo un agonista del receptor S1 P que comprende un grupo de fórmula X, son bien tolerados a las dosificaciones requeridas para su uso de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, la LD₅₀ aguda para el Compuesto A es > 10 mg/kg p.o. en ratas y monos.

25 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de agonistas de S1 P como fármacos pro-angiogénicos. La inducción de neo-angiogénesis últimamente ha sido reconocida como un excelente objetivo en un número de condiciones (por ejemplo, angiogénesis miocárdica, cicatrización de heridas o disfunción vascular en la diabetes/vasculopatía).

30 Como se describe anteriormente, concentraciones altas de agonistas del receptor S1 P (2 μM o más, por ejemplo 2-5 μM o cerca de 5 μM) muestran efectos anti-angiogénicos, y los agonistas del receptor S1 P pueden inhibir la angiogénesis inducida por VEGF. Por el contrario, concentraciones bajas (0.1 -1 μM, por ejemplo 0.1 - 0.5 μM o 0.5 - 1 μM) de agonistas de S1 P tienen un efecto potenciador de la angiogénesis y son capaces de potenciar la angiogénesis mediada por VEGF. De esta manera, los agonistas de S1P pueden tener efectos bifásicos en la angiogénesis.

En consecuencia, la presente invención además provee:

35 8. Uso de un agonista de S1 P, por ejemplo un agonista de S1 P que comprende un grupo de fórmula X, por ejemplo el Compuesto A o el Compuesto A-fosfato, en la inducción del proceso de neo-angiogénesis, por ejemplo como un agente pro-angiogénico, por ejemplo en indicaciones dónde se indica una promoción de la angiogénesis;

40 9. Un proceso para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades mediadas por la inhibición del proceso de neo-angiogénesis, por ejemplo mediadas por factores anti-angiogénicos, por ejemplo en indicaciones dónde se indica una promoción de la angiogénesis, por ejemplo en cicatrización de heridas o en el tratamiento de infarto del miocardio o disfunción vascular en la diabetes/vasculopatía, que comprende el uso de un

agonista del receptor S1 P, por ejemplo un agonista de S1 P que comprende un grupo de fórmula X, por ejemplo el Compuesto A o el Compuesto A-fosfato, como un ingrediente activo;

5 10. Un método para tratar o prevenir enfermedades mediadas por la inhibición del proceso de neo-angiogénesis, por ejemplo mediadas por factores anti-angiogénicos, por ejemplo en indicaciones dónde se indica una promoción de la angiogénesis, tales como por ejemplo en la cicatrización de heridas o en el tratamiento de infarto del miocardio o disfunción vascular en la diabetes/vasculopatía, que comprende la administración de una cantidad efectiva de un agonista del receptor S1 P, por ejemplo un agonista de S1 P que comprende un grupo de fórmula X, por ejemplo el Compuesto A o el Compuesto A-fosfato, a un sujeto con necesidad de dicho tratamiento.

10 Los agonistas de S1P apropiados para promover la angiogénesis incluyen aquellos definidos anteriormente en relación con el tratamiento del cáncer, por ejemplo agonistas de S1 P que comprenden un grupo de fórmula X o los compuestos de acuerdo con las fórmulas I a IX, o las sales o ésteres de estos farmacéuticamente aceptables. Preferiblemente el agonista de S1 P es el Compuesto A-fosfato. El agonista de S1 P puede ser utilizado solo, o en combinación con uno o más agentes que promueven la angiogénesis, por ejemplo VEGF.

15 Con el fin de promover la angiogénesis es importante seleccionar una dosis suficientemente baja del agonista del receptor S1 P, como concentraciones altas de agonistas del receptor S1 P inhiben la angiogénesis. Una dosis apropiada para proveer un efecto pro-angiogénico cuando un agonista de S1 P se administra a un paciente se puede seleccionar por estudios de incrementos de dosis y de concentración como se describe anteriormente en A, B, y C.

Descripción de las Figuras

20 Figura 1

Muestra que el Compuesto A-fosfato promueve fuertemente la formación de una red similar a capilar de una manera dependiente de la dosis forma de campana, que muestra una actividad máxima alrededor de 0.5 μ M.

Figura 2

25 Muestra que tanto el Compuesto A-fosfato como el Compuesto A a 0.5 - 1 μ M no atenúan la remodelación mediada por VEGF, sino más bien cooperan con el polipéptido factor de crecimiento.

Figura 3

30 Muestra que el Compuesto A-fosfato así como la formación de tubos estimulada por S1P, prácticamente se inhibe completamente por la toxina pertussis (PTX, 50 ng/ml), un inhibidor de proteínas heterotrimericas G de tipo $\alpha_{i/o}$. Esto puede ser interpretado como una posible intervención de eventos de señalización mediada por el receptor EDG-1 (S1P1) en biorespuestas estimuladas con el Compuesto A-fosfato.

Figura 4

35 Muestra, que la esfingosina a 1 mM, que a su vez parece ser menos potente que S1 P, atenúa la capacidad de ambos S1 P y el Compuesto A-fosfato para inducir estructuras similares a capilares, sin que tenga un efecto inhibitor en la formación de tubos inducidos por VEGF. A este respecto, la esfingosina se comporta diferente del Compuesto A. Los datos indican que el balance entre esfingosina y S1 P parece ser críticamente importante para angiogénesis/activación de célula endotelial más probablemente a través de la familia del receptor de EDG. Es importante destacar, que las concentraciones altas de esfingosina y Compuesto A (2 - 5 μ M) inhiben la formación de tubos provocada por VEGF.

Figura 5

40 Muestra que el tratamiento de HUVEC con el Compuesto A-fosfato a 0.5 mM puede resultar en la activación transitoria de ERK1/2 con un pico de fosforilación/activación a 10 minutos y regreso a la línea base en 20 minutos

Figura 6

45 Se probó si el Compuesto A, el Compuesto A-fosfato, la esfingosina o S1P también no inducir el factor de tejido en HUVEC. Los datos encontrados demuestran que ninguno de estos compuestos solo o en combinaciones puede elevar la actividad del factor de tejido como se muestra en la Figura 6. El Compuesto A y el Compuesto A-fosfato pueden potenciar ligeramente el VEGF pero no el factor de tejido inducido por TNF- α .

Figura 7

Muestra el efecto del Compuesto C en un ensayo de formación de tubos HUVEC mediado por S1 P.

Se utilizan las siguientes abreviaturas:

BSA: albúmina de suero de bovino

ECGS: grupo de factor de crecimiento de célula endotelial

ECL: quimioluminiscencia aumentada

S: esfingosina

PBS: solución salina regulada con fosfato

JNK1/2: c-jun-N-terminal quinasa 1/2

RT: temperatura ambiente

equivalentes TF: equivalentes factor de tejido

EGR-1/NFAT: proteína de respuesta de crecimiento temprano 1/factor nuclear de células T activadas F1 P:
Compuesto A-fosfato (FTY720-fosfato)

- 5 La utilidad de los agonistas del receptor S1P, por ejemplo los agonistas de S1P que comprenden un grupo de fórmula X, en la promoción de angiogénesis se puede demostrar por ejemplo de acuerdo con los métodos descritos de ahora en adelante.

D. Cultivo celular y Materiales

- 10 Las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) se cultivan a 37°C y 5% de CO₂ en medio M199 suplementado con 20% de SCS (HyClone, Logan, UT), 1U/ml de heparina, 50 µg/ml de ECGS, glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina y 0.1 mg/ml de estreptomycin. Las células se utilizan para los experimentos hasta el pasaje número 5. HUVEC de escasa alimentación se obtienen mediante la privación con M199 que contiene 1% de SCS, durante 5 h. VEGF₁₆₅ recombinante humana se obtiene de PromoCell (Heidelberg, Germany). Los anticuerpos policlonales ERK1/2 fosfo-específicos, quinasa p38, los anticuerpos ERK1/2 no-fosfo y el reactivo quimioluminiscente LumiGLO son de New England BioLabs (Beverly, MA), los anticuerpos policlonales IκB de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Calif.). La inmunoglobulina G (IgG) de anti-conejo de burro conjugado con peroxidasa y la IgG anti-ratón de oveja se adquirieron de Amersham LIFE SCIENCE (Amersham Place, England). Las membranas de transferencia Immobilon-P son productos de Millipore (Bedford, MA). S se obtiene de Sigma Chemical Co.; S1 P es de Biomol. La solución stock del Compuesto A-fosfato se prepara mediante el siguiente protocolo. El Compuesto A-fosfato se disuelve en metanol trazado con HCl concentrado (0.5 mg del Compuesto A-fosfato en 500 ml de metanol más 2 ml de HCl). El solvente de la solución resultante se evapora con vacío y el residuo obtenido se vuelve a disolver (variante 1) en 0.1 % de solución de BSA desgrasada en agua desionizada estéril (500 µl) o (variante 2) en 0.5 % de Triton X-1 00 en agua desionizada. Las soluciones stock resultantes (2.5 mM) se sometieron a sonicación y almacenaron a 4°C.

Ensayo de Coagulación

- 25 Las células se siembran en placas de 6 pozos a una confluencia del 80-90% y se cultivan durante la noche. Las células se raspan de las placas y se analizan para actividad del factor de tejido de acuerdo con el método como se describe en Clauss, M., J. Biol. Chem. 271,17629-17634 (1996), Mechtcheriakova, D., Blood 93,3811-3823 (1999). En resumen, después de la inducción durante 4 horas con VEGF (1.5 nM), TNF- α (100 U/ml), S (0.5-2 µM), S1P (0.5-2 µM), el Compuesto A (0.5-2 µM), y el Compuesto A-fosfato (0.5-2 µM), las células se lavan dos veces y luego se raspan en 1ml de solución reguladora de coagulación (acetato de sodio 12 mM, dietilbarbitato 7 mM y cloruro de sodio 130 mM; pH 7.4). 50 µl de las células resuspendidas se mezclan con 50 µl de plasma tratado con citrato, y los tiempos de coagulación se determinan después de la recalcificación con 50 µl de solución de CaCl₂ 20 mM a 37°C. Los equivalentes-TF se determinan utilizando una curva estándar obtenida de tromboplastina de cerebro de conejo.

E. Análisis de Western Blot

- 35 Después de varios tratamientos, las células se lavan dos veces con PBS frío, se lisan en 100 µl de solución reguladora Laemmli, se raspan y calientan durante 5 min a 95°C. Los lisados celulares totales se separan mediante SDS-PAGE y se transfieren a membrana Immobilon-P. La membrana se bloquea, durante 30 minutos con PBS que contiene 0.1% de Tween-20 y 3% de leche desnatada y se incuba durante 1 hora a RT con un anticuerpo primario diluido en solución reguladora de bloqueo. La membrana obtenida se lava tres veces, durante 5 minutos con PBS que contiene 0.1% de Tween-20 y se incuba con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa durante 1 hora a RT. Después de una etapa de lavado, la membrana se incuba durante 1 minuto con reactivo ECL y se expone a una

película, según sea necesario. Para volver a analizar con otro anticuerpo, la membrana se lava dos veces en PBS, se trata durante 30 min a 55°C con solución reguladora de tratamiento (Tris-HCL 62.5 mM, pH 6.8, 2% de SDS, 2-mercaptoetanol 100 mM) y se lava tres veces durante 5 minutos con PBS a RT. La membrana se almacena húmeda envuelta en SaranWrap a 4°C después de cada inmunodetección.

5 Ensayo de angiogénesis in vitro en Matrigel

La morfogénesis de células endoteliales en estructuras similares a capilares en Matriz Matrigel Reducida del Factor de Crecimiento (BD Bioscience) se realiza de acuerdo con el procedimiento de fabricación. En resumen, las HUVEC se tripsinizan, se vuelven a suspender en medio M199 libre de suero que contiene inhibidor de la tripsina de soja (1mg/ml, Sigma). Después de la centrifugación, las células se vuelven a suspender en medio libre de suero a una densidad de 0.5×10^5 células/ml, y la suspensión celular se siembra en placas de cultivo celular de 96 pozos (Costar, Corning Incorporated) precubiertas con 50 μ l de Matrigel en la ausencia o presencia de varios estímulos: VEGF a 1.5 nM, S1P a 0.1-2 μ M, S a 0.5-2 μ M, Compuesto A a 0.5-2 μ M, y Compuesto A-fosfato a 0.1-2 μ M. Ocho horas después, las células en Matrigel se fijan con 3 % de formaldehído en PBS y se conservan a 4°C. Los resultados se cuantifican de las imágenes hechas con un microscopio Nikon Diaphot equipado con una cámara CCD enfriada (Kappa GmbH, Gleichen, Germany) mediante el recuento directo de puntos de ramificación en dos campos microscópicos de cada pozo hechos por duplicados.

F. El Compuesto A-fosfato-induce la morfogénesis de células endoteliales en el ensayo de formación de tubos in vitro en Matrigel y una posible implicación de ruta(s) de señalización mediada por G_i

El efecto del Compuesto A y el Compuesto A-fosfato en diferenciación morfogénica de células endoteliales se determina utilizando un ensayo de angiogénesis in vitro en Matrigel. La morfogénesis de célula endotelial es un proceso complejo que necesita interacciones de matriz extracelular-célula, seguido por remodelación de la matriz, migración estimulada, interacciones célula-célula, y proteólisis perivascular. Como se muestra en la Figura 1, el Compuesto A-fosfato puede promover fuertemente la formación de la red similar a capilar de una manera de forma de campana dependiente de la dosis que muestra actividad máxima alrededor de 0.5 μ M. El número de puntos de ramificación por campo microscópico, que refleja la potencia de inducción del estímulo, es comparable para el Compuesto A-fosfato y S1P, y puede exceder significativamente los efectos provocados por VEGF. El Compuesto A por sí mismo a 0.5 - 1 μ M tiene un efecto potenciador débil, pero consistente, en comparación con el Compuesto A-fosfato. Ambos el Compuesto A-fosfato y el Compuesto A a 0.5 - 1 μ M no atenúan la remodelación mediada por VEGF sino más bien cooperan con el factor de crecimiento de polipéptido (ver por ejemplo, la Figura 2). Adicionalmente, el Compuesto A-fosfato- así como la formación de tubos estimulada por S1P se inhibe completamente por la toxina pertussis (PTX, 50 ng/ml), un inhibidor de proteínas G heterotrimericas de tipo $\alpha_{i/o}$. Esto se puede interpretar como una posible intervención de los eventos de señalización mediados por el receptor EDG-1 (S1P₁) en biorespuestas estimuladas con el Compuesto A-fosfato (ver por ejemplo, la Figura 3). S a 1 μ M, que a su vez parece ser menos potente que S1 P, atenúa la capacidad de ambos S1P y el Compuesto A-fosfato para inducir estructuras similares a capilares, sin que tenga un efecto inhibitor en la formación de tubos inducidos por VEGF (ver por ejemplo, la Figura 4). A este respecto, S se comporta de manera diferente al Compuesto A. Los datos indican que el balance entre S y S1 P parece ser críticamente importante para la angiogénesis/activación de célula endotelial más probablemente vía la familia del receptor de EDG. Es importante destacar que, las concentraciones altas de S y el Compuesto A (2 - 5 μ M) inhibieron la formación de tubos provocada por VEGF. Esos datos sugieren efectos bifásicos dependientes de la dosis del Compuesto A y el Compuesto A-fosfato en la angiogénesis in vitro.

G. Activación de ERK1/2 MAP quinasas mediante el Compuesto A-fosfato

La transducción de la señal vía MAP quinasas juega un papel clave en una variedad de funciones de célula endotelial. El tratamiento de HUVEC con el Compuesto A-fosfato a 0.5 μ M puede resultar en activación transitoria de ERK1/2 con un pico de fosforilación/activación a 10 minutos y regreso a la línea base en 20 minutos (ver por ejemplo, la Figura 5). No es detectable ninguna activación de p38 quinasa y JNK1/2 por el Compuesto A-fosfato en HUVEC. Adicionalmente, el Compuesto A-fosfato puede provocar la activación de ERK1/2 de una manera dependiente de la dosis, que muestra actividad más fuerte a 2 μ M. Esto está en contraste con los resultados del ensayo de formación de tubos, cuando el Compuesto A-fosfato a 2 μ M puede ser menos potente que a 0.5 μ M. Ni el Compuesto A ni S son capaces de inducir la activación de MAP quinasa en células endoteliales en una cinética que oscila de 5 minutos a 60 minutos de tratamiento. Para estimar el posible papel del programa inflamatorio/ dependiente de NF κ B en biorespuestas estimuladas con el Compuesto A-fosfato de células endoteliales, las membranas se vuelven a analizar con anticuerpos anti-I κ B. Los niveles I κ B no se afectan por el tratamiento del Compuesto A-fosfato. Además el tratamiento de células endoteliales con el Compuesto A-fosfato puede fallar para inducir la expresión de E-Selectina como un gen de respuesta secundaria dependiente de NF κ B. De esta manera, los datos indican firmemente que la señalización del Compuesto A-fosfato no involucra la activación de NF κ B, la principal cascada en la respuesta inflamatoria aguda en células endoteliales.

H. El Compuesto A y Compuesto A-fosfato no inducen la expresión del factor de tejido en células endoteliales

Un rasgo característico importante de tanto el estímulo inflamatorio clásico TNF- α como el principal factor de crecimiento angiogénico VEGF en células endoteliales es su potencia para favorecer la expresión del factor de tejido. Se probó también si el Compuesto A, el Compuesto A-fosfato, S o S1P no inducen el factor de tejido en HUVEC. Los datos encontrados demuestran que ninguno de estos compuestos solos o en combinaciones pueden elevar la actividad del factor de tejido (ver por ejemplo, la Figura 6). El Compuesto A y el Compuesto A-fosfato pueden potenciar ligeramente el VEGF- pero no el factor de tejido inducido por TNF- α . Los datos obtenidos en conjunto indican que el Compuesto A, el Compuesto A-fosfato, S y S1P trabajan de forma mecánica claramente para VEGF angiogénico y TNF- α inflamatorio.

I. La afinidad de enlace de los agonistas del receptor S1P con los receptores S1P humanos individuales se puede determinar en los siguientes ensayos:

La transfección transitoria de receptores S1 P humanos en células HEK293

Los receptores EDG y las proteínas G_i se clonan, y cantidades iguales de 4 cADNs para el receptor EDG, Gi- α , Gi- β y Gi- γ se mezclan y utilizan para transfectar monocapas de células HEK293 utilizando el método de precipitación de fosfato de calcio (M. Wigler et al., Cell. 1977;11;223 y DS. Im et al., Mol. Pharmacol. 2000;57;753). En resumen, se adiciona una mezcla de ADN que contiene 25 μ g de ADN y CaCl 0.25 M al HEPES-estandarizado Na₂HPO₄ 2 mM. Las monocapas subconfluentes de células HEK293 se envenenan con cloroquina 25 mM, y el precipitado de ADN luego se aplica a las células. Después de 4 h, las monocapas se lavan con solución salina regulada con fosfato y medio realimentado (90% 1:1 medio esencial modificado de Dulbecco (DMEM):F-12 + 10% de suero fetal bovino). Las células se recogen 48-72 h después de la adición del ADN mediante el raspado en solución reguladora HME (en mM: 20 HEPES, 5 MgCl₂, 1 EDTA, pH 7.4) que contiene 10% de sacarosa en hielo, y se rompen utilizando un homogeneizador Dounce. Después de la centrifugación a 8003 g, el sobrenadante se diluye con HME sin sacarosa y se centrifuga a 100,000 g, durante 1h. El pellet resultante se vuelve homogeneizar y centrifugar una segunda hora a 100,000 g. Este pellet de membrana cruda se vuelve a suspender en HME con sacarosa, se divide en alícuotas, y se congela por inmersión en nitrógeno líquido. Las membranas se almacenan a 70°C. La concentración de proteína se determina espectroscópicamente mediante el ensayo de proteína Bradford.

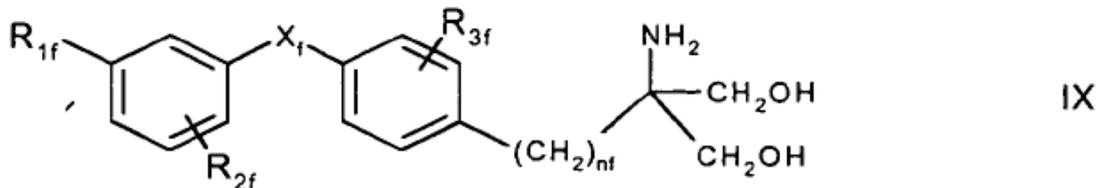
Ensayo de enlace GTP γ S utilizando las preparaciones de membrana S1P/HEK293 del receptor

Los experimentos de enlace GTP γ S se llevan a cabo como se describe por DS. Im et al., Mol. Pharmacol. 2000; 57:753. El enlace GTP γ S mediado del ligando con proteínas G se mide en solución reguladora de enlace GTP (en mM: 50 HEPES, 100 NaCl, 10 MgCl₂, pH 7.5) utilizando 25 μ g de una preparación de la membrana de células HEK293 transfectadas transitoriamente. El ligando se adiciona a las membranas en la presencia de GDP 10 μ M y 0.1 nM [³⁵S]GTP γ S (1200 Ci/mmol) y se incuba a 30°C, durante 30 min. GTP γ S unido se separa del no unido utilizando el cosechador Brandel (Gaithersburg, MD) y se hace el recuento con un contador de centelleo líquido.

35

REIVINDICACIONES

1. Un agonista del receptor S1 P, que es un compuesto de fórmula IX



en donde

5 R_{1f} es un halógeno, trihalometilo, hidroxilo, alquilo inferior que tiene de 1 a 7 átomos de carbono, fenilo, aralquilo, alcoxi inferior que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, trifluorometiloxi, fenoxi, ciclohexilmetiloxi, aralquilo sustituido o no sustituido, piridilmetiloxi, cinnamiloxi, naftilmetiloxi, fenoximetil, hidroximetilo, hidroxietilo, alquiltio inferior que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, alquilsulfinilo inferior que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, alquilsulfonilo inferior que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, benziltio, acetilo, nitro o ciano;

10 R_{2f} es un hidrógeno, halógeno, trihalometilo, alcoxi inferior que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, alquilo inferior que tiene de 1 a 7 átomos de carbono, fenetilo, o benziloxi;

R_{3f} es un hidrógeno, halógeno, trifluorometilo, alcoxi inferior que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, hidroxilo, benziloxi, alquilo inferior que tiene de 1 a 7 átomos de carbono, fenilo o alcoximetilo inferior que tiene de 1 a 4 átomos de carbono;

15 X_f es O o S; y

n_f es un número entero de 1 a 4,

o una sal de este farmacéuticamente aceptable,

20 para utilizar en un método para prevenir o tratar enfermedades mediadas por un proceso de neo-angiogénesis o asociado con la angiogénesis desregulada, donde dichas enfermedades se seleccionan del grupo que consiste de cáncer, angiogénesis miocárdica, cicatrización de heridas y disfunción vascular en la diabetes o vasculopatía.

2. Un agonista del receptor S1P para utilizar de acuerdo con la reivindicación 1, para prevenir o tratar tumores sólidos.

3. Un agonista del receptor S1P para utilizar de acuerdo con la reivindicación 1, para inhibir el crecimiento de tumores sólidos o tratar la invasividad de los tumores sólidos o síntomas asociados con dicho crecimiento del tumor.

25 4. Un agonista del receptor S1P de la fórmula IX, como se define en la reivindicación 1, o una sal de este farmacéuticamente aceptable, para utilizar en un método para prevenir o tratar enfermedades mediadas mediante un proceso de neo-angiogénesis o asociado con la angiogénesis desregulada, donde dichas enfermedades se seleccionan del grupo que consiste de cáncer, angiogénesis miocárdica, cicatrización de heridas, disfunción vascular en la diabetes o vasculopatía, trastornos linfoproliferativo y mieloproliferativo, en donde el agonista del receptor S1 P se administra concomitantemente o en secuencia con un agente quimioterapéutico.

30 5. Un agonista del receptor S1P para utilizar de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el agente quimioterapéutico se selecciona de

i. un inhibidor de aromatasa,

ii. un antiestrógeno, un anti-andrógeno o un agonista de la gonadorelina,

35 iii. un inhibidor de la topoisomerasa I o un inhibidor de la topoisomerasa II,

iv. un agente activo del microtúbulo, un agente alquilante, un antimetabolito antineoplásico o un compuesto de platino,

- v. un compuesto de direccionamiento/disminución de la actividad de la proteína o lípido quinasa o una actividad de proteína o lípido fosfatasa, otro compuesto anti-angiogénico o un compuesto que induce los procesos de diferenciación celular,
- vi. un receptor de la bradiquinina 1 o un antagonista de la angiotensina II,
- 5 vii. un inhibidor de la ciclooxigenasa, un bisfosfonato, un inhibidor de la histona desacetilasa, un inhibidor de la heparanasa, un modificador de la respuesta biológica, un inhibidor de la ubiquitinación, o un inhibidor que bloquea las rutas anti-apoptóticas,
- viii. un inhibidor de isoformas oncogénicas de Ras,
- ix. un inhibidor de la telomerasa,
- 10 x. un inhibidor de la proteasa, un inhibidor de la metaloproteínasa de la matriz, un inhibidor de la metionina aminopeptidasa, o un inhibidor del proteosoma, y/o
- xi) un inhibidor de mTOR.
- 6.** Un agonista del receptor S1P para utilizar de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, para prevenir o tratar tumores de sistema linfático o sanguíneo o cáncer mielóide.
- 15 **7.** Un agonista del receptor S1P para utilizar de acuerdo con la reivindicación 4, en combinación con un agente quimioterapéutico para tratar un cáncer linfático o mielóide, en donde el agente quimioterapéutico se selecciona de busulfán, citarabina, 6-tioguanina, fludarabina, hidroxiaurea, procarbazona, bleomicina y metotrexato.
- 8.** Un agonista del receptor S1P para utilizar de acuerdo con la reivindicación 4, en combinación con un agente quimioterapéutico para tratar un cáncer linfático, en donde el agente quimioterapéutico se selecciona de daunorubicina e imatinib.
- 20 **9.** Un agonista del receptor S1P para utilizar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el agonista del receptor S1P se administra de manera intermitente.
- 10.** Un agonista del receptor S1P como se define en la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades mediadas por la inhibición del proceso de neo-angiogénesis, donde dichas enfermedades se seleccionan del grupo que consiste de cáncer, angiogénesis miocárdica, cicatrización de heridas y disfunción vascular en la diabetes o vasculopatía.
- 25 **11.** Un agonista del receptor S1P para utilizar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el agonista del receptor S1P es el 2-amino-2-[4-(benziloxifeniltio)-2-clorofenil]propil-1,3-propano-diol o el 2-amino-2-[4-(3-benziloxifenoxi)-2-clorofenil]propil-1,3-propano-diol, en forma libre o en una forma de sal farmacéuticamente aceptable.
- 30

Figura 1

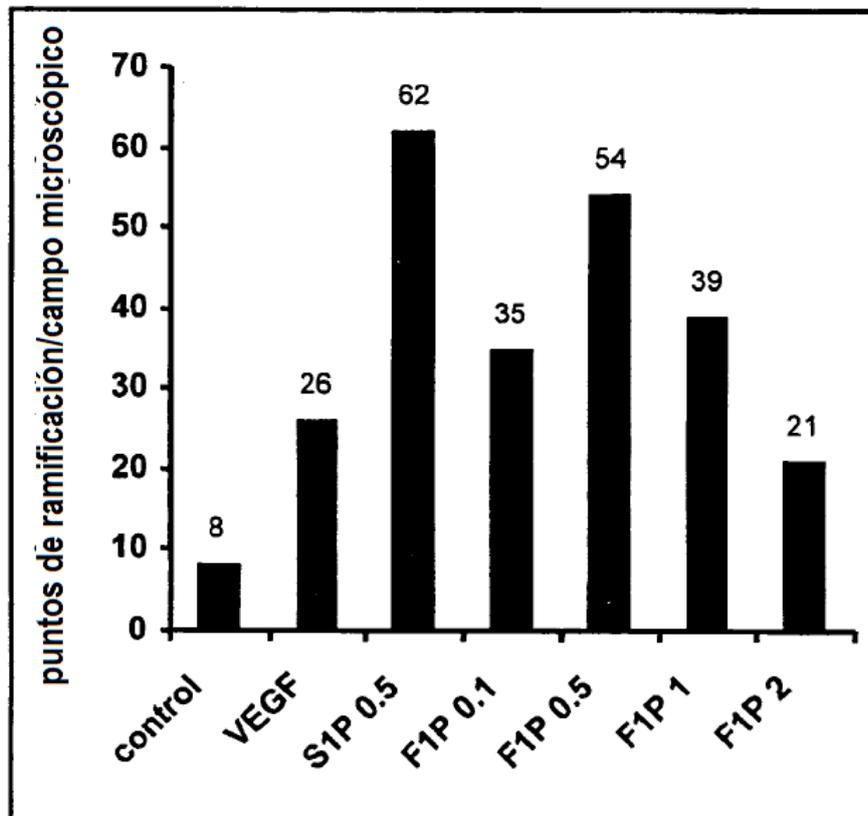
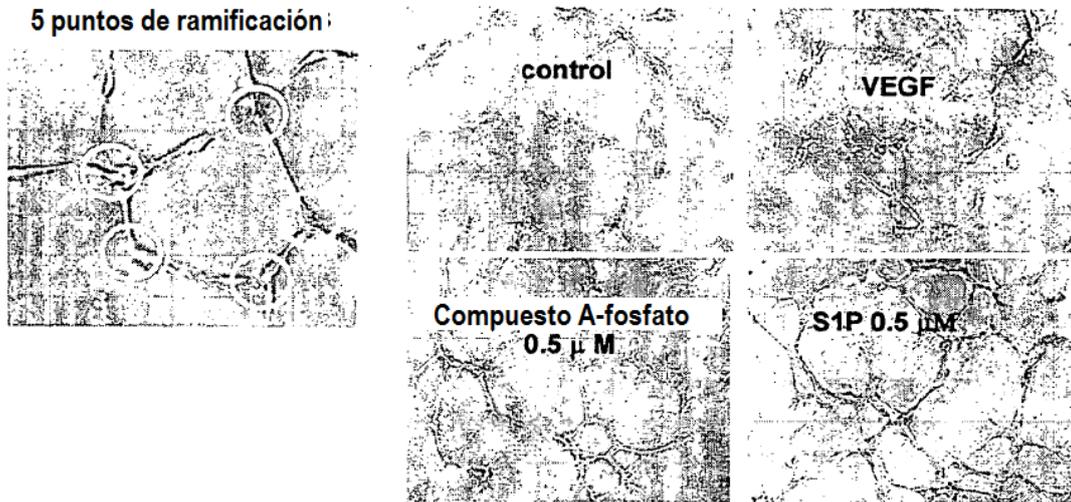


Figura 2

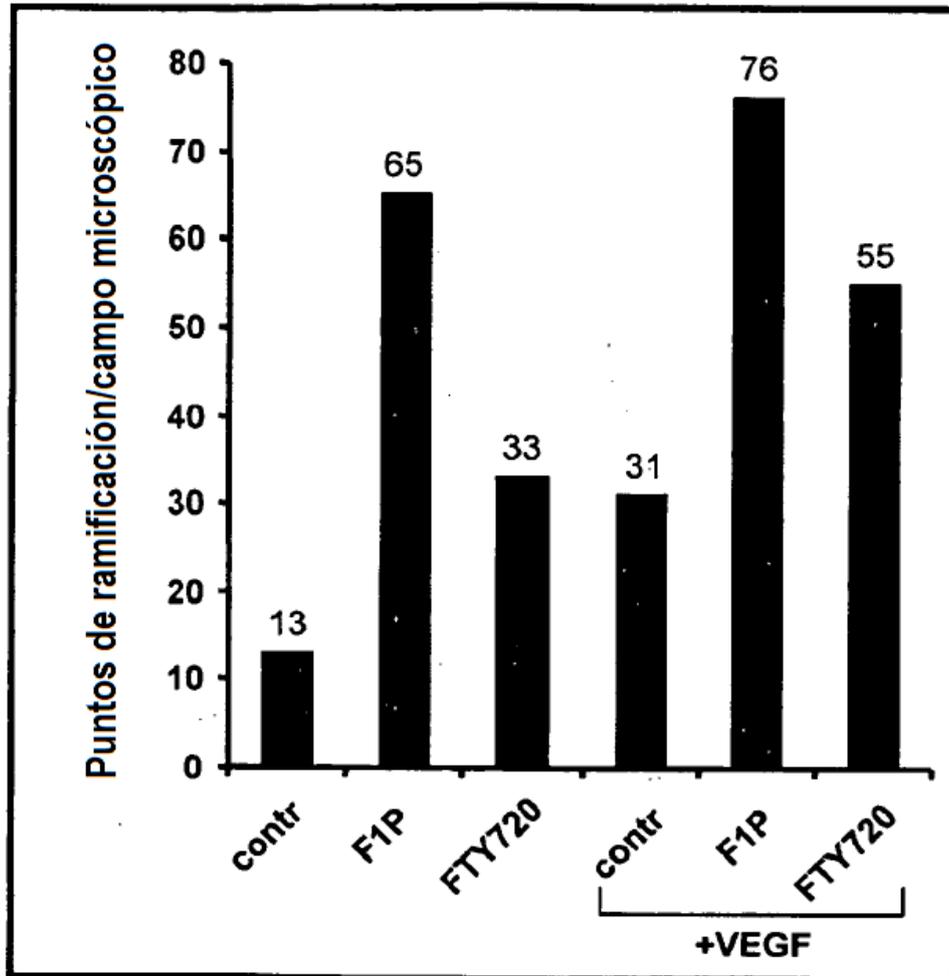


Figura 3

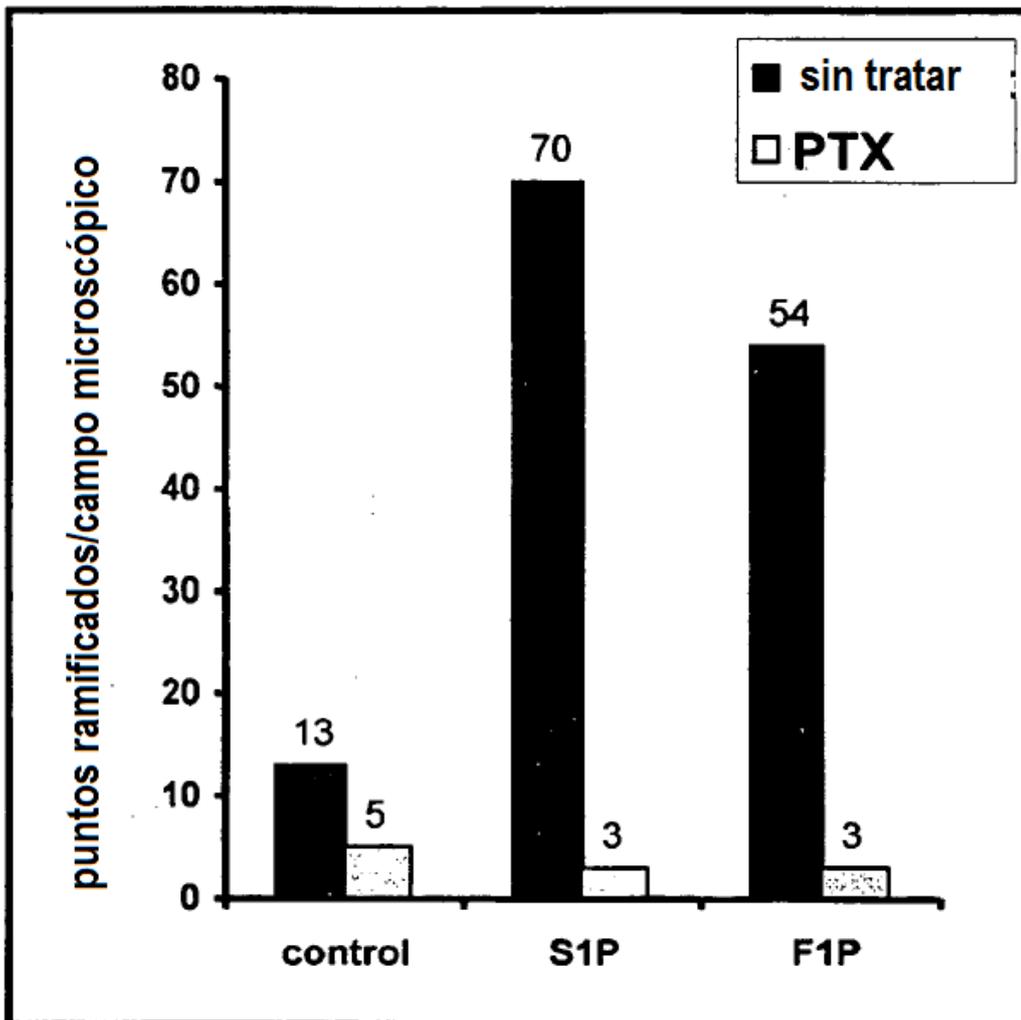


Figura 4

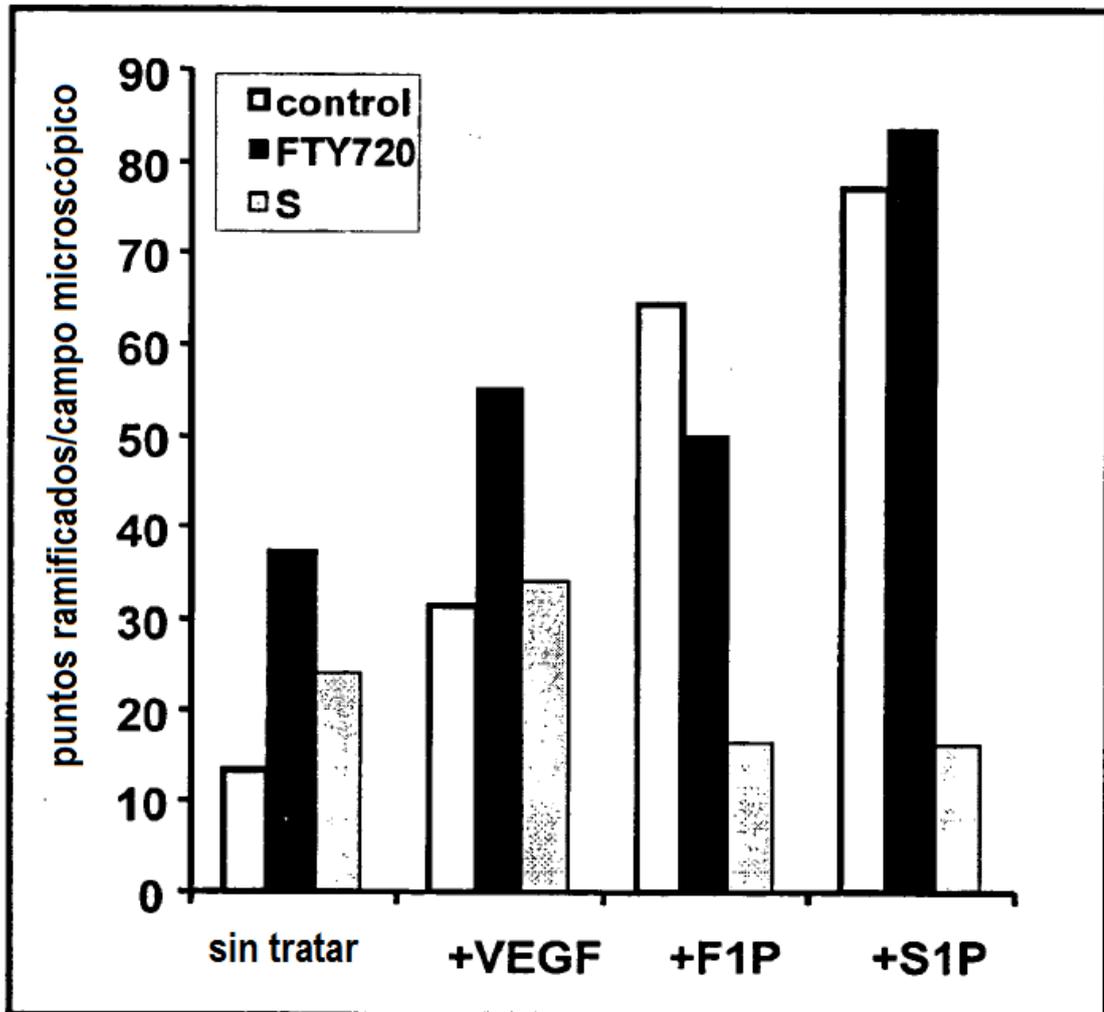


Figura 5

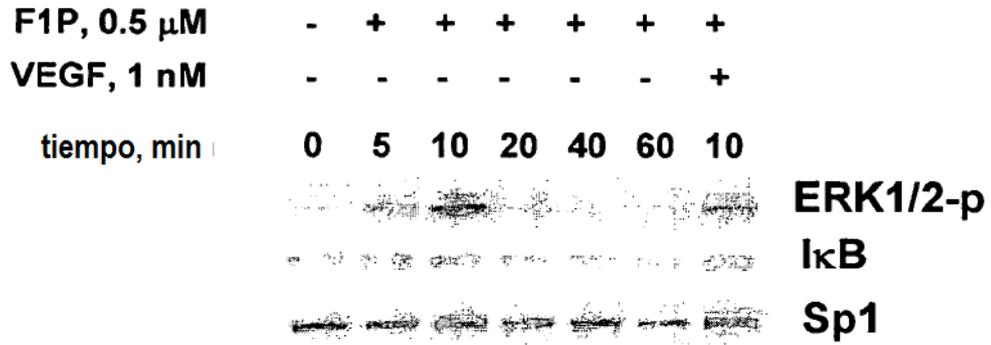


Figura 6

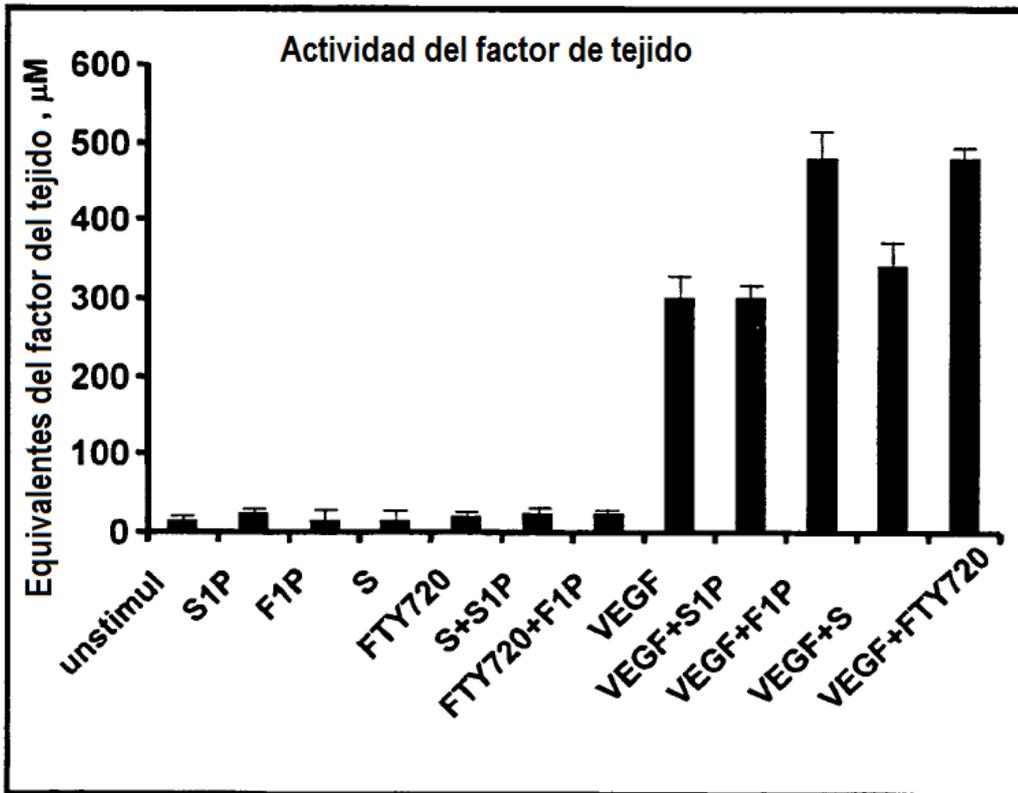


Figura 7

