

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 317**

51 Int. Cl.:

A61K 31/553 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2007** **E 07836181 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2013** **EP 2046340**

54 Título: **Inhibidores de JAK para tratamiento de trastornos mieloproliferativos**

30 Prioridad:

21.07.2006 US 832627 P
19.07.2007 US 880063

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
10.01.2014

73 Titular/es:

CEPHALON, INC. (100.0%)
41 MOORES ROAD P.O. BOX 4011
FRAZER, PA 19355, US

72 Inventor/es:

DOBZANSKI, PAWEŁ y
RUGGERI, BRUCE A.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 437 317 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

Inhibidores de JAK para tratamiento de trastornos mieloproliferativos

5 Campo de la invención

La invención se refiere al tratamiento de trastornos mieloproliferativos (TMP) y síndromes mielodisplásicos. Específicamente, la invención se refiere a un compuesto de pirrolocarbazol fusionado para su uso en el tratamiento de TMPs y trastornos mielodisplásicos con un compuesto que es un inhibidor de JAK2.

10 Antecedentes de la invención

Los trastornos mieloproliferativos (TMPs) son malignidades clónicas caracterizadas por la superproducción de uno o más linajes hematopoyéticos con una diferenciación relativamente normal dando como resultado una médula ósea (MO) hiperclonal. Se cree que los TMPs aparecen en un único progenitor multipotente o célula madre, que domina la MO y sangre. Los progenitores hematopoyéticos cultivados de pacientes con TMPs muestran propiedades alteradas del crecimiento e independencia del factor del crecimiento. La base molecular para ciertos TMPs no ha estado clara hasta que una serie de informes recientes identificaron una única sustitución de aminoácido V617F en el dominio pseudocinasa de JAK2 como una lesión molecular prevalente en policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (TE) y mielofibrosis idiopática crónica (MFIC). Esta mutación se encontró en el 75%-97% de pacientes con PV, y aproximadamente en el 40%-50% de pacientes con TE y MFIC (James et al, Trends in Molecular Medicine 11, 546-554). De manera importante, no se han encontrado otras mutaciones en los dominios autoinhibidores o de cinasa de otras 85 cinasas (Levine et al., 2005, Cancer Cell 7, 387-397). Además, la mutación V617F también se ha identificado en pacientes con síndromes mielodisplásicos (SMD). En base a la estructura pronosticada de JAK2, la sustitución V617F interrumpe una interacción autoinhibidora entre los dominios JH3 y cinasa (JH1) de la proteína. Como consecuencia, los mutantes V617F fueron constitutivamente activos y confirieron independencia del factor de crecimiento y activación de STAT5 constitutivo cuando se expresaron en células BaF3/EPOR (Levine et al., Cancer Cell 2005, 7, 387-397; Kralovics et al., 2005, N. Engl. J. Med. 352, 1779-1790). Los progenitores eritroides que llevan la mutación V617F crecieron en ausencia de eritropoyetina exógena (EPO) y formaron colonias eritroides endógenas (CEE), un marcador de inactivación mediada por TMPs y siARN de JAK2 redujo la formación de CEE. Finalmente, los ratones trasplantados con células de médula ósea murina que expresaban el mutante V617F, pero no un JAK2 de tipo salvaje, desarrollaron características patológicas que se parecían mucho a PV en humanos incluyendo una fuerte elevación de hemoglobina/hematocrito, leucocitosis, hiperplasia de megacariocitos, hematopoyesis extracelular dando como resultado esplenomegalia y mielofibrosis de médula ósea (James et al., 2005, Nature 434, 1144-1148; Werning et al., 2006, Blood 2006 Feb 14, [Epub antes que impreso]). Clínicamente, la presencia de la mutación en pacientes con MFIC se asoció con una enfermedad más agresiva y una supervivencia significativamente más baja (Campbell et al., 2006, Blood 2098-2100).

Existe una necesidad en la técnica de contrarrestar el fenotipo asociado a JAK2 mutante o activado y de tratar enfermedades mieloproliferativas y síndromes mielodisplásicos asociados a la activación de JAK2.

Resumen de la invención

Las tirosinas cinasas (trc) unidas al receptor son proteínas de transmembrana que contienen un dominio de enlace de ligando extracelular, una secuencia de transmembrana y un dominio tirosina cinasa citoplásmico. Las tirosinas cinasas funcionan en la transducción de señal celular. La proliferación celular, diferenciación, migración, metabolismo y muerte programada son ejemplos de respuestas celulares mediadas por tirosina cinasa. JAK2 es una tirosina cinasa no receptora.

Se ha descubierto que los inhibidores de JAK2 pueden usarse para tratar trastornos mieloproliferativos y otras enfermedades en las que la expresión constitutiva de JAK2 contribuya a un estado patológico.

De este modo, la invención proporciona una composición que contiene un derivado de pirrolocarbazol fusionado para su uso en un método para tratar trastornos mieloproliferativos y trastornos relacionados con dicha composición.

Los trastornos mieloproliferativos y trastornos asociados con la activación de JAK2 que pueden tratarse con la invención incluyen, aunque no se limitan a enfermedades mieloproliferativas tales como, por ejemplo, policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (TE), mielofibrosis con metaplasia mieloide (MMM) también llamada mielofibrosis idiopática crónica (MFIC), trastornos mieloproliferativos sin clasificar (TMPsc), síndrome hipereosinofílico (SHE), y mastocitosis sistémica (MS).

En la invención, una cantidad terapéuticamente efectiva del inhibidor de JAK2 se administra al sujeto. Para un adulto medio de 70 kg, un régimen de dosis puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 20 a aproximadamente 120 mg, dos veces al día. En algunas realizaciones la dosis para el adulto medio es de aproximadamente 40 a aproximadamente 100 mg, dos veces al día. En otras realizaciones la dosis para el adulto medio es de

aproximadamente 60 a aproximadamente 80 mg, dos veces al día.

En la invención la actividad de ciertas proteínas se reduce en presencia del derivado de pirrolocarbazol fusionado en comparación con la ausencia de pirrolocarbazol fusionado. Estas proteínas incluyen, aunque no se limitan a, JAK2, STAT5, STAT3, SHP2, GAB2, AKT y ERK.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 muestra la inhibición de Actividad Cinasa JAK2 por CEP-701.

Figura 2 muestra resultados de PCR específico de alelo (panel A) y análisis de enzima de restricción (panel B) que se realizaron para confirmar la presencia de la mutación de V617F en células HEL 92. Las células K562, que no guardan esta mutación sirvieron como un control de tipo salvaje. **Panel A:** para PCR específico de alelo, cebadores específicos de mutante generaron un diagnóstico de producto (flechas) de 203 bp de la mutación; un producto de 364 bp sirvió como un control interno para PCR. M, marcadores de peso molecular; Carriles 1 y 2, células HEL92 que muestran un mutante de 364 bp y alelos de tipo salvaje y el alelo específico de mutante de 203 bp. Carril 3, células de control K562 que muestran solamente el alelo de tipo salvaje de 364 bp. **Panel B:** para análisis de restricción, un producto PCR que abarca la mutación V617 se generó a partir de ADNs de HEL92 y K562 y se digirió con enzima de restricción BsaX1. Se muestran los productos de PCR no digeridos (indicados con "-") y BsaX1 digeridos (indicado con "+"). M, marcadores de peso molecular. Se generó el patrón pronosticado de restricción para ADN de K562. Se analizaron dos preparaciones independientes de ADN para cada línea celular.

Figura 3 muestra los efectos de CEP-701 en la señalización de JAK2/STAT en células HEL 92. Las células HEL 92 se incubaron durante 24 horas con CEP-701 en 0,1 μ M, 0,3 μ M, 1,0 μ M y 3,0 μ M, como se indica. Los efectos en la señalización de JAK2/STAT se evaluaron mediante inmunoblot usando anticuerpos STAT3 y STAT5 fosfoespecíficos, como lo indica el protocolo de inmunoprecipitación/inmunoblot (IP/WB) para JAK2: el total de anticuerpo JAK2 se usó para IP y la fosforilación se evaluó con WB usando anticuerpo de fosfotirosina. La expresión de Bclxl se determinó mediante inmunoblot.

Figura 4 muestra los efectos de CEP-701 en el crecimiento de células HEL 92. Las células HEL 92 se incubaron con concentraciones crecientes de CEP-701, como se indica, durante 24 horas y 48 horas. Los efectos en el crecimiento celular se evaluaron mediante ensayo MTS. Los experimentos se realizaron en 10% FCS (Panel A y B) o sin suero (Panel C y D). El Panel A muestra resultados de una incubación de 24 horas en presencia de 10% de suero fetal bovino (SFB). El Panel B muestra los resultados de una incubación de 48 horas en presencia de 10% SFB. El Panel C muestra los resultados de una incubación de 24 horas sin SFB. El Panel D muestra los resultados de una incubación de 48 horas sin SFB. Para los paneles A-D, se añadieron cantidades crecientes de CEP-701 a cultivos separados (mostrados en barras con ventana); las células no tratadas se muestran en la primera barra.

Figura 5 muestra los efectos de CEP-701 en el crecimiento de células HEL 92 sin el compuesto repuesto cada 24 horas. Las células HEL 92 se incubaron en 2% SFB con concentraciones crecientes de CEP-701, como se indica, durante 72 horas. CEP-701 se repuso cada 24 horas. Los efectos en el crecimiento celular se evaluaron con ensayo MTS. Las células no tratadas se muestran en la primera barra.

Figura 6 muestra efectos de CEP-701 en la inducción de apoptosis en células HEL 92. Las células HEL 92 se incubaron con concentraciones crecientes de CEP-701, como se indica, durante 24 horas, 48 horas y 72 horas. La inducción de apoptosis se analizó con ensayo de liberación histona/ADN. El Panel A muestra un ensayo de 24 horas, el Panel B muestra un ensayo de 48 horas y el Panel C muestra un ensayo de 72 horas.

Figura 7 muestra la inhibición de activación de STAT5 por CEP-701 en células HEL 92. Las células HEL 92 se incubaron con concentraciones crecientes de CEP-701 durante 1 hora, 1,5 horas y 2,5 horas, como se indica. Se prepararon extractos completos de células y los efectos en la fosforilación de STAT5 se evaluaron mediante inmunoblot usando anticuerpos específicos. Las bandas se cuantificaron y la extensión de la fosforilación se normalizó a la cantidad total de STAT5 en una muestra. Los resultados se muestran como porcentaje del resto de fosforilación de STAT5 en comparación con las muestras no tratadas del vehículo.

El promedio de 5 experimentos se muestra en la parte inferior. En base a 5 experimentos independientes, el IC_{50} para inhibición de STAT5 en células HEL 92 se determinó para ser aproximadamente 10 nM.

Figura 8 muestra la inhibición de activación de STAT3 por CEP-701 en células HEL 92. Las células HEL 92 se incubaron con concentraciones crecientes de CEP-701 durante 1 hora, 1,5 horas y 2,5 horas, como se indica. Se prepararon extractos completos de células y los efectos en la fosforilación de STAT3 se evaluaron mediante inmunoblot usando anticuerpos específicos. Las bandas se cuantificaron y la extensión de la fosforilación se normalizó a la cantidad total de STAT3 en una muestra. Los resultados se muestran como porcentaje del resto de fosforilación de STAT3 en comparación con las muestras no tratadas del vehículo. El promedio de 5

experimentos se muestra en la parte inferior. En base a 5 experimentos independientes, el IC₅₀ para inhibición de STAT3 en células HEL 92 se determinó para ser aproximadamente 10 nM.

Figura 9 muestra los efectos de α 1-AGP humano en inhibición mediada por CEP-701 de actividad STAT5 en células HEL 92. Las células HEL 92 se incubaron durante 1 hora con 1,0 mg/ml de α 1-AGP y con concentraciones crecientes de CEP-701, como se indica. Se prepararon extractos completos de células y los efectos en la fosforilación de STAT5 se evaluaron mediante inmunoblot usando anticuerpos específicos. Las bandas se cuantificaron y la extensión de la fosforilación se normalizó a la cantidad total de STAT5 en una muestra. Los resultados se muestran como porcentaje del resto de fosforilación de STAT5 en comparación con las muestras no tratadas del vehículo. La co-incubación con 1,0 mg/ml AGP se cambió a IC₅₀ para inhibición de STAT5 en 3 μ M.

Figura 10 muestra los efectos de CEP-701 (30 mg/kg) administrado subcutáneamente, dos veces al día, en el crecimiento de xenoinjertos tumorales de HEL 92. **Panel A:** el crecimiento de tumores no tratados se muestra con cuadros, mientras que los tumores tratados se muestran con triángulos. **Panel B:** muestra tumores no tratados y tratados extirpados.

Figura 11 muestra los efectos de CEP-701 en la señalización de JAK2/STAT en xenoinjertos tumorales de HEL 92. Una única dosis de CEP-701 (30 mg/kg) se administró subcutáneamente a animales que tenían xenoinjertos tumorales de HEL 92 y los efectos en la activación de STAT5 y STAT3 se evaluaron en las 0, 1, 2, 4, 9 y 12 horas después de la administración de CEP-701 mediante inmunoblot. Las concentraciones intratumorales de CEP-701 también se determinaron.

Figura 12 muestra el genotipado de muestras clínicas para la presencia de la mutación de V617F por PCR específico de alelos. Los pacientes #648 y #650 diagnosticados con mielofibrosis idiopática crónica (MFIC) se evaluaron para la mutación de V617F por PCR específico de alelos. Los alelos de tipo salvaje y mutante se amplifican como un fragmento de 364 bp, mientras que el producto de PCR específico de mutante de 203 bp indica la presencia de la mutación V617F. También se muestran resultados para células HEL 92 (que contienen el alelo mutante) y K562 de tipo salvaje.

Figura 13 muestra el genotipado de muestras clínicas con enzima de restricción BsaX1. BsaX1 digirió el producto PCR que abarca la mutación V617F, como se indica. SLS es un producto PCR no relacionado con JAK2 que contiene sitios BsaX1, que sirve como un control de la integridad de la digestión.

Figura 14 muestra los efectos de CEP-701 en el crecimiento de cultivos primarios de CD34+ derivados del paciente #648 (ensayo XTT). **Panel A:** 24 horas. **Panel B:** 48 horas.

Figura 15 muestra los efectos de CEP-701 en el crecimiento de cultivos primarios de CD34+ derivados del paciente #648. Los progenitores hematopoyéticos de CD34+ se purificaron del paciente #648 y se cultivaron con concentraciones crecientes de CEP-701, como se indica. **Panel A:** células tratadas con CEP-701 durante 24 horas y el efecto en el crecimiento celular (células vivas) y apoptosis (Anexina V) se evaluaron mediante análisis FACS. **Panel B:** células tratadas durante 24 horas con CEP-701 se diluyeron en un medio fresco y se cultivaron durante 72 horas. El recuento celular se determinó usando azul tripán. T=0 representa el número de células al inicio del experimento.

Figura 16 muestra los efectos de CEP-701 en la señalización de JAK2/STAT en cultivos primarios de CD34+ derivados del Paciente #648. Los progenitores hematopoyéticos CD34++ se purificaron del paciente #648 y se cultivaron con concentraciones crecientes de CEP-701, como se indica, durante 1 hora. Se prepararon extractos completos de células y la expresión y fosforilación de STAT5, STAT3 se analizaron mediante inmunoblot usando anticuerpos específicos. Para evaluar la actividad de JAK2, se inmunoprecipitó JAK2, seguido de inmunoblot usando anticuerpo específico antifosfotirosina (4G10). La mancha se quitó y se volvió a analizar con anticuerpo JAK2. Ciclofilina y actina β sirvieron como controles internos.

Figura 17 muestra los efectos de CEP-701 en la activación de SHP2 y Gab2 y la señalización de AKT y MAPK en cultivos primarios de CD34++ derivados del Paciente #648. Los progenitores hematopoyéticos CD34++ se purificaron del paciente #648 y se cultivaron con concentraciones crecientes de CEP-701, como se indica, durante 1 hora. Se prepararon extractos completos de células y la expresión y fosforilación de varias moléculas señalizadoras se analizaron mediante inmunoblot usando anticuerpos específicos. Panel A: Efectos de CEP-701 en la activación de SHP2 y GAB2 se evaluaron mediante anticuerpos de fosforilación (pSHP2 y pGAB2). Se analizaron los niveles totales de expresión (SHP2 y GAB2). Panel B: Efectos de CEP-701 en la señalización de MAPK y AKT (SHP2 y GAB2). Panel B: Efectos de CEP-701 en la señalización de MAPK y AKT se evaluaron usando anticuerpos fosfoespecíficos contra AKT (pAKT) y ERK (pERK). Los niveles totales de expresión se analizaron usando anticuerpos específicos (AKT y ERK). La actina β sirvió como control interno.

Figura 18 muestra los efectos de incubación de 24 horas con CEP-701 en la señalización de STAT5 en cultivos primarios de CD34+ derivados del Paciente #648. Los progenitores hematopoyéticos CD34+ se

purificaron del paciente #648 y se cultivaron con concentraciones crecientes de CEP-701, como se indica, durante 24 horas. Se prepararon extractos completos de células y la expresión y fosforilación de STAT5 y la expresión de Bclxl se analizaron mediante inmunoblot usando anticuerpos específicos. La expresión de actina β y ciclofilina sirvieron como control interno.

Descripción detallada de realizaciones ilustradas

La presente invención se refiere a derivados de pirrolocarbazol fusionado biológicamente activos para su uso en métodos para el tratamiento de varios trastornos o síndromes asociados con la activación de JAK2. En ciertas realizaciones, los trastornos y/o síndromes incluyen, por ejemplo, trastornos mieloproliferativos (TMP) y síndromes mielodisplásicos. Entre los derivados de pirrolocarbazol fusionados útiles para el tratamiento de los trastornos y/o síndromes están los derivados de indolocarbazol e indenocarbazol. Más específicamente, la invención se refiere a un indolocarbazol para su uso en el tratamiento de TMPs y síndromes mielodisplásicos y otros trastornos relacionados con la activación de JAK2.

Los derivados de pirrolocarbazol fusionado útiles en tales trastornos son conocidos en la técnica y el experto en la técnica los pueden preparar de cualquier número de maneras, incluyendo, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.923.986 de Murakata, et al.; 5.705.511 de Hudkins, et al.; 5.808.060 de Hudkins, et al.; Patente de Estados Unidos N° 6.127.401 de Slingh, et al.; Patente de Estados Unidos N° 6.841.567 de Hudkins, et al.; 6.630.500 de Gingrich, et al.; 5.756.494 de Lewis, et al.; 5.468.872 de Glicksman, et al.; 5.516.771 de Dionne, et al.; 6.306.849 de Hudkins, et al.; y 6.093.713 de Hudkins, et al.; cuyas divulgaciones se incorporan como referencia en el presente documento en su totalidad. En ciertos casos, los materiales iniciales en la preparación de los indolocarbazoles, por ejemplo, K-252a y KT-5556, son ópticamente activos. El uso de K-252a y KT-5556 como material inicial en la preparación de compuestos útiles en métodos de tratamiento descritos en el presente documento, pueden llevar a la transferencia parcial o total de la actividad óptica a los derivados de pirrolocarbazol fusionado deseados.

Como se ha empleado anteriormente y a lo largo de la divulgación, los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, deberán entenderse para que tengan los siguientes significados.

Como se usa en el presente documento, "aproximadamente" se refiere a un rango de valores de $\pm 10\%$ de un valor especificado. Por ejemplo, "aproximadamente 20" incluye $\pm 10\%$ de 20, o de 18 a 22, incluidos.

Como se usa en el presente documento, "alquilo" se refiere a un hidrocarburo opcionalmente sustituido, recto o ramificado saturado de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono (y todas las combinaciones y sub-combinaciones de rangos y números específicos de átomos de carbono en el presente documento), preferentemente con desde aproximadamente 1 a aproximadamente 4 átomos de carbono (referidos en el presente documento como "alquilo de cadena corta"). Los grupos alquilo incluyen, aunque no se limitan a, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, t-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo, isohexilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo y 2,3-dimetilbutilo.

Como se usa en el presente documento, "alquenilo" se refiere a un grupo alquilo opcionalmente sustituido que tiene de desde aproximadamente 2 a aproximadamente 10 átomos de carbono, más preferentemente de desde aproximadamente 2 a aproximadamente 8 átomos de carbono o más enlaces dobles (y todas las combinaciones y sub-combinaciones de rangos y números específicos de átomos de carbono en el presente documento), donde alquilo es como se ha definido previamente.

Como se usa en el presente documento, "alquinilo" se refiere a un grupo alquilo opcionalmente sustituido que tiene de desde aproximadamente 2 a aproximadamente 10 átomos de carbono, más preferentemente de desde aproximadamente 2 a aproximadamente 8 átomos de carbono y uno o más enlaces triples (y todas las combinaciones y sub-combinaciones de rangos y números específicos de átomos de carbono en el presente documento), donde alquilo es como se ha definido previamente.

Como se usa en el presente documento "arilalquilo" se refiere a una fracción opcionalmente sustituida compuesta por un radical de alquilo que contiene un sustituyente de rilo, donde la fracción de aralquilo tiene desde aproximadamente 7 a aproximadamente 22 átomos de carbono (y todas las combinaciones y sub-combinaciones de rangos y números específicos de átomos de carbono en el presente documento), con desde aproximadamente 7 a aproximadamente 10 átomos de carbón siendo preferentes. Ejemplos no limitativos incluyen, por ejemplo, bencilo, difenilmetilo, trifenilmetilo, feniletilo y difeniletilo.

Como se usa en el presente documento, "heteroarilo" se refiere a un sistema de anillo aromático opcionalmente sustituido que tiene de 5 a 14 miembros de anillo de átomo de carbono o más heteroátomos. En ciertas realizaciones, el heteroátomo se selecciona de S, O o N. Los grupos de heteroarilo que tienen un total de desde aproximadamente 5 a aproximadamente 14, más preferentemente de desde aproximadamente 5 a aproximadamente 6 miembros de anillo de átomos de carbono y miembros de anillo de heteroátomo (y todas las combinaciones y sub-combinaciones de rangos y números específicos de carbono y miembros de anillo de

heteroátomo) son preferentes. Grupos de heteroarilo ejemplares incluye, aunque no se limitan a, pirrilo, furilo, piridilo, piridina-N-óxido, 1,2,4-tiadiazolilo, pirimidilo, tienilo, isotiazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, pirazinilo, pirimidilo, quinolilo, isoquinolilo, tiofenilo, benzotienilo, isobenzofurilo, pirazolilo, indolilo, purinilo, carbazolilo, benzimidazolilo e isoxazolilo. Los grupos heteroarilo pueden unirse por medio de un carbono o un heteroátomo al resto de la molécula.

Como se usa en el presente documento, “heteroalquilo” se refiere a un sistema de anillo opcionalmente sustituido de un radical alquilo sustituido por heteroarilo donde heteroarilo y alquilo son como se han definido previamente. Ejemplos no limitativos incluyen, por ejemplo, 2-(1H-pirrol-3-il)etil, 3-piridilmetil-5-(2H-tetrazolil)metil, y 3-(pirimidin-2-il)-2-metilciclopentanil.

Como se usa en el presente documento, los términos “Pro”, “Ser”, “Gli”, “Lis” se refieren a los aminoácidos prolina, serina, glicina y lisina, respectivamente.

Como se usa en el presente documento, el término “aminoácido” denota una molécula que contiene tanto un grupo amino como un grupo carboxilo. Las realizaciones de aminoácidos incluyen α -aminoácidos; es decir, ácidos carboxílicos de la fórmula general $\text{HOOC-CH(NH}_2\text{)-(cadena lateral)}$. Las cadenas laterales de aminoácidos incluyen fracciones que ocurren de manera natural y que no ocurren de manera natural. Las cadenas laterales de aminoácidos que ocurren de manera no natural (es decir, antinaturales) son fracciones que se usan en lugar de cadenas laterales de aminoácidos que ocurren de manera natural en, por ejemplo, análogos de aminoácido. Véase, por ejemplo, Lehninger, Biochemistry, Segunda Edición, Worth Publishers, Inc., 1975, páginas 73-75, incorporado como referencia en el presente documento. Los α -aminoácidos preferentes incluyen glicina, alanina, prolina, ácido glutámico y lisina, que tienen la configuración D, la configuración L o como un racemato.

Como se usa en el presente documento, el término “Glc” se refiere glucosa.

Como se usa en el presente documento, el término “sustancialmente enriquecido”, cuando se refiere a un estereoisómero o centro estereoisomérico, denota que al menos aproximadamente el 60%, preferentemente aproximadamente el 70%, más preferentemente aproximadamente el 80%, aún más preferentemente el 90% de un estereoisómero o centro estereoisomérico predomina en la mezcla, con al menos aproximadamente el 95% de un estereoisómero o centro estereoisomérico siendo incluso más preferente. En algunas realizaciones preferentes, el compuesto es “sustancialmente enantioméricamente puro”, esto es, al menos aproximadamente el 97,5%, más preferentemente aproximadamente el 99%, incluso más preferentemente aproximadamente el 99,5% de una forma estereoisomérica predomina.

Como se usa en el presente documento, el término “cantidad efectiva” se refiere a una cantidad de un compuesto como el descrito en el presente documento que puede ser terapéuticamente efectivo para inhibir o tratar los síntomas de una enfermedad, trastorno o condición particular. Tales enfermedades, trastornos y condiciones incluyen, aunque no se limitan a, aquellas condiciones patológicas asociadas con la actividad de JAK2, donde el tratamiento comprende, por ejemplo, inhibir la actividad del mismo poniendo en contacto células, tejidos o receptores con compuestos de la presente invención. De este modo, por ejemplo, el término “cantidad efectiva”, cuando se usa en relación con compuestos de la invención para el tratamiento de trastornos mieloproliferativos, se refiere al tratamiento de los síntomas, enfermedades, trastornos y condiciones típicamente asociadas con trastornos mieloproliferativos.

Como se usa en el presente documento, “farmacéuticamente aceptable” se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosis que son, dentro del alcance del buen juicio médico, adecuados para contactar con tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otras complicaciones problemáticas acordes a una proporción razonable beneficio/riesgo.

Como se usa en el presente documento, “sales farmacéuticamente aceptables” se refieren a derivados de los compuestos desvelados donde el compuesto original se modifica haciendo sales ácidas o bases del mismo. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, aunque no se limitan a, sales ácidas minerales u orgánicas de residuos básicos tales como amina; sales alcali u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales convencionales no tóxicas o las sales de amonio cuaternario del compuesto original formadas, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánico u orgánicos no tóxicos. Por ejemplo, tales sales no tóxicas convencionales incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos tales como hidroc্লórico, hidrobromico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etano disulfónico, oxálico, isetiónico, y similares. Estas sales fisiológicamente aceptables se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, disolviendo las bases amina libres con un exceso del ácido en alcohol acuoso, o neutralizando un ácido carboxílico libre con una base metálica alcali, o con un amina. Los compuestos descritos a lo largo del presente documento pueden usarse o prepararse de formas alternativas. Por ejemplo, muchos compuestos que contienen amino pueden usarse o prepararse como una sal ácida de adición. A menudo tales sales mejoran las propiedades de aislamiento y manipulación del compuesto. Por ejemplo, dependiendo de los reactivos, las condiciones de reacción y similares, los

compuestos como los descritos en el presente documento pueden usarse o prepararse, por ejemplo, como sus sales de hidrocioruro o tosilato. Las formas cristalinas isomórficas, todas las formas quirales y racémicas, N-óxido, hidratos, disolventes, e hidratos de sal ácida, también se contemplan dentro del alcance de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, "hidrato" se refiere a un compuesto de la presente invención que se asocia con agua en la forma molecular, es decir, en el que el enlace H-OH no se parte, y puede representarse, por ejemplo, mediante la fórmula $R \cdot H_2O$, donde R es un compuesto de la invención. Un compuesto dado puede formar más de un hidrato incluyendo, por ejemplo, monohidratos ($R \cdot H_2O$) o polihidratos ($R \cdot nH_2O$ donde n es un número entero > 1) incluyendo, por ejemplo, dihidratos ($R \cdot 2H_2O$), trihidratos ($R \cdot 3H_2O$), y similares, o hemihidratos, tales como, por ejemplo, $R \cdot n/2H_2O$, $R \cdot n/3H_2O$, $R \cdot n/4H_2O$ y similares donde n es un número entero.

Como se usa en el presente documento, "solvato" se refiere a un compuesto de la presente invención que se asocia con el disolvente en la forma molecular, es decir, en la que el disolvente está coordinativamente enlazado, y puede representarse, por ejemplo, mediante la fórmula $R \cdot (\text{disolvente})$, donde R es un compuesto de la invención. Un compuesto dado puede tener uno o más solvatos, incluyendo, por ejemplo, monosolvatos ($R \cdot (\text{disolvente})$) o polisolvatos ($R \cdot n (\text{disolvente})$) donde n es un número entero > 1) incluyendo, por ejemplo, disolvatos ($R \cdot 2 (\text{disolvente})$), trisolvatos ($R \cdot 3 (\text{disolvente})$), y similares, o hemisolvatos, tales como, por ejemplo, $R \cdot n/2 (\text{disolvente})$, $R \cdot n/3 (\text{disolvente})$, $R \cdot n/4 (\text{disolvente})$, y similares donde n es un número entero. Los disolventes en el presente documento incluyen disolventes mezclados, por ejemplo, metanol/agua, y como tales, los solvatos pueden incorporar uno o más disolventes dentro del solvato.

Como se usa en el presente documento, "hidrato de sal ácida" se refiere a un complejo que puede formarse a través de la asociación de un compuesto que tiene una o más fracciones base con al menos un compuesto que tiene una o más fracciones ácidas o a través de la asociación de un compuesto que tiene una o más fracciones ácidas con al menos un compuesto que tiene una o más fracciones base, estando dicho complejo asociado además con moléculas de agua para formar un hidrato, donde dicho hidrato es como se ha definido previamente y R representa el complejo en el presente documento descrito anteriormente.

Los compuestos descritos a lo largo del presente documento, pueden usarse o prepararse de formas alternativas. Por ejemplo, muchos compuestos que contienen amino pueden usarse o prepararse como una sal ácida de adición. A menudo tales sales mejoran las propiedades de aislamiento y manipulación del compuesto. Por ejemplo, dependiendo de los reactivos, las condiciones de reacción y similares, los compuestos como los descritos en el presente documento pueden usarse o prepararse, por ejemplo, como sus sales de hidrocioruro o tosilato. Las formas cristalinas isomórficas, todas las formas quirales y racémicas, N-óxido, hidratos, disolventes, e hidratos de sal ácida, también se contemplan dentro del alcance de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, "paciente" se refiere a animales, incluyendo mamíferos, preferentemente humanos.

Como se usa en el presente documento, "profármaco" se refiere a compuestos específicamente diseñados para maximizar la cantidad de especies activas que alcanza el sitio deseado de reacción, que por sí mismos son típicamente inactivos o mínimamente activos para la actividad deseada, pero que a través de biotransformación se convierten en metabolitos biológicamente activos.

Como se usa en el presente documento, el término "estereoisómeros" se refieren a compuestos que tienen idéntica constitución química, pero que difieren en lo que respecta a disposición de los átomos o grupos en el espacio.

Como se usa en el presente documento, "N-óxido" se refiere a compuestos donde el átomo de nitrógeno básico de un anillo heteroarilo o amina terciaria se oxida para dar un nitrógeno cuaternario que tiene una carga formal positiva y un átomo de oxígeno unido que tiene una carga formal negativa.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratamiento" y "tratar como se usan en el presente documento incluyen tratamiento preventivo (por ejemplo, profiláctico), curativo y/o paliativo.

Cuando cualquier variable ocurre más de una vez en un constituyente o en una fórmula, su definición en cada caso depende de su definición en todos los demás casos.

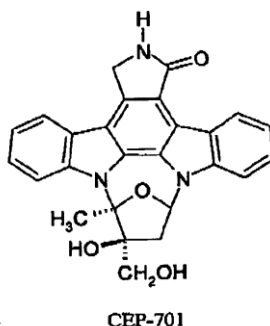
Las combinaciones de sustituyentes y/o variables son permisibles solamente si tales combinaciones dan como resultado compuestos estables.

Se cree que las fórmulas y nombres químicos usados en el presente documento de manera correcta y precisa reflejan los compuestos químicos subyacentes. Sin embargo, la naturaleza y valor de la presente invención no depende de la corrección teórica de estas fórmulas por completo o en parte. Por lo tanto, se entiende que las fórmulas usadas en el presente documento, así como los nombres químicos atribuidos a los compuestos correspondientemente indicados, no pretenden limitar la invención de ninguna manera, incluyendo la restricción a

una forma tautomérica específica o a cualquier isómero óptico o geométrico específico, excepto donde tal estereoquímica está claramente definida.

Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la presente invención está dirigida a un inhibidor de JAK2 para su uso en métodos de tratamiento de trastornos mieloproliferativos que comprenden la administración a un paciente que lo necesite, una cantidad terapéuticamente efectiva de dicho inhibidor de JAK2.

En una realización preferente, el inhibidor de JAK2 es un pirrolocarbazol fusionado que es sustancialmente enantioméricamente puro. El inhibidor de JAK2 es:



Como se usa en el presente documento, el compuesto que tiene esta estructura es referido como "CEP-701".

El pirrolocarbazol fusionado de la invención puede formularse en composiciones farmacéuticas mediante mezcla con excipientes y transportadores no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Tales composiciones pueden prepararse para su uso en administración parenteral, particularmente en forma de soluciones o suspensiones líquidas; para administración oral, particularmente en forma de líquido, pastillas o cápsulas; o intranasalmente, particularmente en forma de polvos, gotas nasales o aerosoles.

La composición puede administrarse convenientemente en forma de dosis de unidad y puede prepararse mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Tales métodos se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., Easton, Pa., 1980).

Las formas de dosis líquidas para administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del compuesto activo, las formas de dosis líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica, tales como, por ejemplo, agua y otros disolventes, agentes solubilizadores y emulsionantes tales como alcohol etilo, alcohol isopropilo, carbonato etilo, acetato etilo, alcohol bencilo, benzoato bencilo, propilenglicol, 1,3-butileno glicol, dimetilformadida, aceites, (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, castor y sésamo), glicerol, tetrahidrofurfuril alcohol, glicoles de polietileno y ésteres de ácidos grasos de sorbitán y mezclas de los mismos. Además de los diluyentes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y suspensores, agentes endulzantes, saborizantes y que dan perfume.

Las formas de dosis sólidas para administración oral incluyen cápsulas, pastillas, píldoras, polvos y gránulos. En tales formas de dosis sólidas, el compuesto activo se mezcla con al menos un excipiente o transportador inerte farmacéuticamente aceptable tal como citrato de sodio o fosfato dicalcio y/o (a) rellenos tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y ácido silícico; (b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidinona, sacarosa y acacia; (c) humectantes tales como glicerol, (d) agentes desintegrantes tales como agar agar, carbonato cálcico, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato sódico; (e) agentes retardantes de solución tales como parafina; (f) aceleradores de absorción tales como compuestos de amonio cuaternario; (g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetilo y monoestearato de glicerol; (h) absorbentes tales como caolín y bentonita; e (i) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, glicoles de polietileno sólidos, lauril sulfato de sodio, y mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, pastillas y píldoras, la forma de dosis puede también comprender agentes amortiguadores. Las composiciones sólidas de un tipo similar también pueden emplearse como rellenos en cápsulas de gelatina con relleno blando o duro usando tales excipientes como lactosa o azúcar de leche así como glicoles de polietileno de alto peso molecular y similares.

Las composiciones de un tipo similar también pueden emplearse como rellenos en cápsulas de gelatina con relleno blando o duro usando tales excipientes como lactosa o azúcar de leche así como glicoles de polietileno de alto peso molecular y similares.

Los compuestos activos también pueden estar en forma micro-encapsulada con uno o más excipientes como

se ha señalado anteriormente. En formas de dosis sólidas el compuesto activo puede mezclarse con al menos un diluyente inerte tal como sacarosa, lactosa o almidón. Tales formas de dosis pueden también comprender, como en la práctica normal, sustancias adicionales diferentes a los diluyentes inertes, por ejemplo, lubricantes para la formación de comprimidos y otras ayudas para la formación de comprimidos tales como estearato de magnesio y celulosa microcristalina. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas de dosis pueden también comprender agentes amortiguadores. Pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y pueden también ser de una composición que libera el ingrediente o ingredientes activos solamente, o preferentemente, en una cierta parte del tracto intestinal, opcionalmente, de una manera retardada. Ejemplos de composiciones de incrustación que pueden usarse incluye sustancias polimérica y ceras.

La dosis óptima de los compuestos de la presente invención puede variar, dependiendo de factores tales como tipo y extensión de progresión del trastorno mieloproliferativo, el estado general de salud del paciente, la edad y peso del paciente, la potencia del compuesto, y la ruta de administración. La optimización de la dosis del compuesto está dentro de la experiencia ordinaria en la técnica y los valores dentro de los rangos aquí provistos incluyen cualquier valor que se encuentre dentro del rango. El ingrediente activo en las formulaciones del compuesto de la invención es efectivo cuando una concentración en el plasma es desde aproximadamente 1 a aproximadamente 20 μM incluyendo cualquier valor dentro de este rango, incluyendo, aunque sin limitar a, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 19 μM . En algunas realizaciones preferente, el compuesto se administra para alcanzar una concentración en el plasma de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 μM . En otras realizaciones preferentes, el compuesto se administra para alcanzar una concentración en el plasma de desde aproximadamente 7,5 a aproximadamente 15 μM .

En ciertas realizaciones de la presente invención, la dosis del compuesto es desde aproximadamente 200 $\mu\text{g/kg}$ a aproximadamente 1 g/kg de peso corporal por día. Más preferentemente, la dosis del compuesto es de 250 $\mu\text{g/kg}$ a aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal por día. Más preferentemente, la dosis del compuesto es de 0,5 mg/kg a aproximadamente 2,3 mg/kg de peso corporal por día. Más preferentemente, la dosis del compuesto es de 0,8 mg/kg a aproximadamente 1,3 mg/kg de peso corporal por día.

En ciertas realizaciones, la dosis diaria para el adulto medio (aproximadamente 70 kg) es desde aproximadamente 20 mg a aproximadamente 300 mg, o desde aproximadamente 40 mg a aproximadamente 250 mg, o desde aproximadamente 40 a aproximadamente 100 mg. Más preferentemente, la dosis diaria es desde 80 mg a aproximadamente 160 mg. La dosis diaria puede típicamente administrarse una vez al día, dos veces al día, tres veces al día o cuatro veces al día. En algunas realizaciones el régimen de dosis es desde aproximadamente 20 a aproximadamente 120 mg, dos veces al día. En otras realizaciones, es desde aproximadamente 20 a aproximadamente 100 mg, dos veces al día. En más realizaciones, la dosis es de aproximadamente 60 a aproximadamente 80 mg, dos veces al día.

En la invención, cuando se administra una cantidad terapéutica del inhibidor de JAK2, la actividad de un número de otras proteínas en presencia del inhibidor de JAK2 es menor que la actividad de las otras proteínas en ausencia del inhibidor de JAK2. Estas otras proteínas son, por ejemplo, un número de las siguientes proteínas: JAK2, STAT5, STAT3, SPH2, GAB2, AKT y ERK.

La presente invención se ilustra más mediante los siguientes ejemplos. Los ejemplos se proporcionan únicamente para fines ilustrativos, y no deben interpretarse como limitativos del alcance o contenido de la invención de ninguna manera.

EJEMPLOS

Células y líneas celulares del paciente

HEL 92.1.7. La línea celular de eritroleucemia humana HEL 92.1.7 se compró en ATCC (TIB-180) y las células crecieron en medio RPMI 1640 con 2 mM L-glutamina ajustada para contener 1,5 g/L bicarbonato sódico, 4,5 g/L glucosa, 10 mM HEPES y 1,0 mM piruvato de sodio y suero fetal bovino, 10%, como se recomendó. CEP-701 o vehículo se añadió a un medio completo y se incubó como se indicó.

CD34+. Se recogió sangre periférica de pacientes diagnosticados con TMPs en la Universidad del Centro de Cáncer de Pensilvania después de consentimiento por escrito. Las células de sangre se separaron mediante centrifugación de gradiente Ficoll (Pharmacia). La capa celular mononuclear se retiró y lavó. Las células mononucleares se incubaron con gotas inmunomagnéticas anti-CD34 y las células CD34+ se purificaron usando el clasificador celular magnético AutoMacs (Miltenyi Biotech, todos los protocolos con gotas y dispositivos por recomendaciones del fabricante). Las células CD34+ se lavaron y contaron. Las células se usaron frescas o congeladas como células viables en 10% DMSO. Las células CD34+ se cultivaron en medio IMDM que contenía 20% suero sustituto (BIT 9500, Stem Cell Technologies, Vancouver). Las células se incubaron con factor de célula madre, interleuquina 6 e interleuquina 3 durante 3-5 días para expansión inicial. Después de la incubación inicial, se añadió eritropoyetina al medio de cultivo. Las células se expandieron más durante 2-5 días hasta que células adecuadas para los experimentos estuvieron disponibles. Todas las citoquinas se obtuvieron de sistemas R&D.

Los pacientes con Mielofibrosis Idiopática Crónica (MFIC) fueron genotipados usando los métodos PCR y Digestión Restrictiva descritos anteriormente. Se descubrió que los pacientes #648 y #650 tenían la mutación V617F como lo muestra PCR específico de alelo (**Fig. 12**) y digestión BsaXI (**Fig. 13**). En la Fig. 14, se usó el producto SCL PCR como un control. Después de la digestión con BsaXI, el producto SCL de 496 bp se cortó en fragmentos de 356 bp, 110 bp y 30 bp.

Ejemplo 1

Inhibición de Actividad Cinasa JAK2 por CEP-701

Se analizó CEP-701 para su habilidad para inhibir la actividad cinasa de JAK2 que expresaba baculovirus en un ensayo con placa de microtítulo utilizando la detección de fluorescencia resuelta en el tiempo (FRT). Las placas de alto enlace de Costar con 96 pozos (Corning Costar #3922, Corning, NY) se cubrieron primero con 100 µL/pozo de 10 µg/mL Neutravidin (Pierce #31000, Rockford, IL) en tampón tris salino (TBS) a 37° C durante 2 horas, seguido de 100 µL/pozo de 1 µg/ml sustrato de péptido 15-mer (biotinil-amino-hexanoil-EQEDEPEGDYFEWLE-amida, Infinity Biotech Research and Resource, Aston, PA) a 37 °C durante otra hora. La mezcla del ensayo JAK2 (volumen total = 100 µL/pozo) consistente en 20 mM HEPES (pH 7,2), 0,2 µM ATP, 1mM MnCl₂, 0,1% suero fetal bovino (SFB), y varias concentraciones de CEP-701 (diluido en DMSO; 2,5% DMSO final en ensayo) se añadió después a la placa del ensayo. Se añadió enzima (15 ng/ml JAK2 Lote # JAK2[318], JA2-2.1) y la reacción se dejó proceder a temperatura ambiente durante 20 minutos. La detección del producto fosforilado se realizó añadiendo 100 µL/pozo de anticuerpo PY100 etiquetado con Eu-N1 (PerkinElmer Life Sciences # AD0041, Boston, MA) diluido 1:5000 en TBS que contenía 0,05% Tween-20 y 0,25% BSA. La incubación a temperatura ambiente procedió después durante 1 hora, seguida por la adición de 100 µL de solución mejoradora (PerkinElmer Life Sciences #1244-105, Boston, MA). La placa se agitó suavemente y después de treinta minutos, la fluorescencia de la solución resultante se midió usando el lector de placas multi-etiqueta PerkinElmer EnVision 2100 (o 2102). Las curvas de inhibición se generaron en duplicados y se marcaron como inhibición porcentual contra log₁₀ de la concentración del compuesto. Los datos se analizaron mediante regresión no lineal ajustándolos a la ecuación de respuesta de dosis sigmoidal (pendiente variable) en el Prisma GraphPad de la siguiente manera:

$$y = \text{pie} + (\text{cima} - \text{pie}) / (1 + 10 (\log \text{IC}_{50-x}) * \text{Pendiente})$$

donde y es la inhibición% en una concentración dada de compuesto, x es el logaritmo de la concentración del compuesto, pie es la inhibición% en la menor concentración de compuesto analizada, y cima es la inhibición% en la mayor concentración de compuesto analizada. Los valores para el pie y la cima se fijaron en 0 y 100, respectivamente. Se promediaron y presentaron Los valores IC₅₀ de curvas individuales como el valor medio IC₅₀. Se trazó la concentración de CEP-701 contra actividad JAK2 (Fig. 1). Se mostró que CEP-701 tenía un IC₅₀ de 0,9 ± 0,2 nM.

Ejemplo 2

A. PCR específico de alelos para mutación de Val617Phe

El genotipado de líneas celulares y muestra de pacientes se realizó como se describe en Baxter, E. J. et al. (2005). "Mutación adquirida de tirosina cinasas JAK2 en trastornos mieloproliferativos humanos" Lancet 365:1054-1061.

Se usó una técnica dual, incluyendo PCR específico de alelos y análisis de enzima de restricción, para determinar el estado de la mutación de V617F. Se preparó ADN de pacientes a partir de granulocitos y células mononucleares usando el Kit de Purificación de ADN Genómico Wizard (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante a menos que se indique lo contrario. Las reacciones PCR se realizaron usando el Kit PCR Core de Promega de acuerdo con las instrucciones del fabricante a menos que se indique lo contrario.

En resumen, se amplificaron 80-200 ng de ADN en una reacción PCR (temperatura de anillamiento 58 °C, 38-44 ciclos) usando los cebadores traseros comunes (5'-ctgaatagtcctacagtggtttcagttca-3') (SEQ ID NO: 1) y dos cebadores delanteros. El primero fue un cebador mutante específico (5'-agcatttggttttaaatatggagatatt-3') (SEQ ID NO:2) que contiene una incompatibilidad en el tercer nucleótido del extremo 3' para mejorar la especificidad y que genera un producto de 203 bp indicando una presencia de la mutación V617F. El segundo cebador delantero (5'-atctatagtcagtcgtgaagtaggagaaag-3') (SEQ ID NO:3) amplifica un fragmento de 364 bp de alelos mutados y de tipo salvaje y sirve como un control interno. Los resultados se muestran en la Fig. 2 (Panel A). Ambas muestras de HEL 92 muestran amplificación del control interno así como el producto de 203 bp del alelo mutante. K562 sirvió como un control de tipo salvaje.

B. Ensayo de Restricción con Base de Enzima de Genotipo JAK2

La mutación G→T que da como resultado la sustitución V617F elimina un sitio de restricción para la enzima de

restricción BsaXI presente en JAK2 de tipo salvaje. De este modo, la resistencia a BsaXI identifica la mutación V617F.

Para evaluar la presencia de la mutación en líneas celulares y muestras del paciente, 200 ng de ADN genómico que abarcaba la posición 617 de JAK2 se amplificaron mediante PCR (57 °C, 40-44 ciclos) usando el cebador delantero (5'-gggttcctcagaacgttg-3') (SEQ ID NO. 4) y el cebador trasero (5'-tcattgcttcttttcacaa-3') (SEQ ID NO. 5). El fragmento resultante de 460 bp se digirió con BsaXI durante 3-4 horas y se analizó en un gel 2% agarosa. El alelo de tipo salvaje genera fragmentos de 241 bp, 189 bp y 31 bp, mientras que el alelo mutante permanece intacto. Los fragmentos de ADN amplificados de células HEL 92 fueron resistente a la digestión con BsaXI, mientras que los fragmentos amplificados de células K562 fueron completamente digeridos por BsaXI. Para controlar la integridad de la digestión, un fragmento de ADN de un gen SLC humano que contenía el sitio BsaXI se amplificó y digirió con BsaXI. El cebador delantero (5'-tcctggggtcttctgttg-3') (SEQ ID NO. 6) y el trasero (5'-cctgagaggcaatgggagta-3') (SEQ ID NO. 7) amplificaron un producto de 496 bp, que se digirió en fragmentos de 356 bp, 110 bp y 30 bp. Los resultados se muestran en la **Fig. 2** (Panel B).

Ejemplo 3

Efectos de CEP-701 en la proliferación celular

Las células CD34+ purificadas y expandidas se contabilizaron y colocaron en placas con 96 pozos para ensayo XTT. Las células se trataron con un inhibidor o vehículo de JAK2 durante 24-72 horas y la viabilidad celular relativa se evaluó usando el reactivo XTT (Molecular Probes) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Las células HEL 92.1.7 (2×10^4 /pozo) colocadas en placas con 96 pozos se trataron con CEP-701 o vehículo durante 24-72 horas y la viabilidad celular se evaluó mediante reactivo MTS (Promega), como se recomendó.

La viabilidad celular se evaluó para células HEL 92.1.7 con CEP-701 (**Fig. 4**, Paneles A-D). En el Panel A, las células se evaluaron a las 24 horas después de la incubación en presencia de suero fetal bovino (SFB) y después de tratamiento con CEP-701 en comparación con la viabilidad sin tratamiento con fármaco. CEP-701 redujo la viabilidad de células hasta aproximadamente el 50% (con 3,0 μ M CEP-701). En el Panel B, las células se evaluaron a las 48 horas después de la incubación en presencia de suero fetal bovino (SFB) y después de tratamiento con CEP-701 en comparación con la viabilidad sin tratamiento con fármaco. CEP-701 redujo la viabilidad de células hasta aproximadamente el 25% (con 3,0 μ M CEP-701). En el Panel C, las células se evaluaron a las 24 horas después de la incubación con CEP-701 sin SFB. CEP-701 redujo la viabilidad de células hasta aproximadamente el 50% (con 3,0 μ M CEP-701) en un patrón similar al del Panel A. En el Panel D, las células se evaluaron a las 48 horas después de la incubación con CEP-701 sin SFB. CEP-701 redujo la viabilidad de células hasta aproximadamente el 25% (con 3,0 μ M CEP-701) en un patrón similar al mostrado en el Panel B.

Fig. 5 muestra los efectos de CEP-701 en la viabilidad de célula HEL que crecieron en presencia de suero fetal bovino (SFB) con el fármaco repuesto cada 24 horas. En este experimento, las células HEL 92.1.7 se expusieron al fármaco durante 72 horas y se evaluaron para viabilidad en ensayo MTS. CEP-701 redujo la viabilidad de células hasta menos del 5% (con 1,0 μ M CEP-701).

Los ensayos MTS indican que CEP-701 inhibe el crecimiento de células HEL 92 que llevan la mutación V617F.

Fig. 6 muestra los efectos de CEP-701 en la inducción de apoptosis en células HEL92 como lo midió el ensayo de liberación histona/ADN. El ensayo muestra que CEP-701 indujo apoptosis.

Ejemplo 4

Análisis de efectos de CEP-701 en secuencias de señalización

Los efectos de CEP-701 en secuencias de señalización se evaluaron mediante inmunoprecipitación y/o inmunoblot usando anticuerpos específicos y extractos celulares completos preparados a partir de líneas celulares y muestras cultivadas de pacientes. Los extractos celulares completos se prepararon en un tampón de lisis: (20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% Tritón, 2,5 mM pirofosfato sódico, 1 mM beta-glicerofosfato, 1 mM Na₃VO₄, 1 μ g/ml leupeptina) complementado con inhibidores de proteasa (Complete Mini, Roche Diagnostic). Se determinó la concentración de proteína y se separaron cantidades iguales (10-30 μ g/vía) en un gel SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa y los niveles de expresión y/o fosforilación se evaluaron usando anticuerpos específicos, como recomendaron los fabricantes. Las manchas se desarrollaron usando el Sistema Supersignal West Pico (Pierce) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La activación de JAK2 se determinó mediante un protocolo de inmunoprecipitación/inmunoblot.

En resumen, se inmunoprecipitó JAK2 de 250 μ g de extracto con anticuerpo JAK2 usando el Pack Inicial de Inmunoprecipitación (Amersham Biosciences) como se recomendó. Después del inmunoblot, se evaluó la fosforilación de tirosina de JAK2 mediante sonda de anticuerpo específico de fosfo-tirosina 4G10 (Upstate).

Fig. 3. El Panel A muestra una inhibición dependiente de dosis de fosforilación de STAT5 al incrementar las concentraciones de CEP-701 (de 0,1 a 3,0 μ M CEP-701). El Panel B muestra una inhibición de fosforilación de JAK2 y STAT3 con concentraciones crecientes de CEP-701 (de 0,1 a 3,0 μ M CEP-701). El Panel B también muestra una inhibición dependiente de dosis de expresión de BclX_L (un efector corriente debajo de señalización JAK2/STAT5).

Figura 7 muestra inhibición de fosforilación de STAT5 después de 1,0, 15 y 2,5 horas de exposición a concentraciones crecientes de CEP-701. La inhibición media de 5 experimentos se muestra en la parte inferior. El IC₅₀ para inhibición de STAT5 en células HEL 92.1.7 es aproximadamente 10 nM, que debería trasladarse a la supresión clínicamente significativa de señalización JAK2/STAT.

Figura 8 muestra inhibición de fosforilación de STAT3 después de 1,0, 15 y 2,5 horas de exposición a concentraciones crecientes de CEP-701. La inhibición media de 5 experimentos se muestra en la parte inferior. El IC₅₀ para inhibición de STAT3 en células HEL 92.1.7 es aproximadamente 10 nM, que debería trasladarse a la supresión clínicamente significativa de señalización JAK2/STAT.

Figura 9 muestra los efectos de α 1-AGP en inhibición mediada por CEP-701 de actividad STAT5 en células HEL 92. Como se muestra en la Fig. 9, 1,0 mg/ml de α 1-AGP cambio el IC₅₀ para inhibición de STAT5 a 3 μ M. Estas concentraciones se consiguen fácilmente *in vivo* o en un régimen de dosis de 80 mg, por ejemplo.

Ejemplo 5

Efectos de CEP-701 en el crecimiento de Xenoinjertos de Tumor HEL 92

El efecto de CEP-701 en el crecimiento de tumores se evaluó (en comparación con el control vehículo) en ratones que tenían xenoinjertos de HEL92. En resumen, se administraron 30 mg/kg CEP-701 subcutáneamente dos veces al día y los volúmenes del tumor se evaluaron en días seleccionados como se muestra en la **Fig. 10**. CEP-701 inhibió el crecimiento del tumor y los volúmenes del tumor en ratones tratados con CEP-701 se redujeron de manera significativa.

Los efectos de CEP-701 en señalización JAK2/STAT en xenoinjertos de HEL 92 también se evaluaron. En este estudio animal que tenía tumores HEL 92 recibieron una única dosis de CEP-701 (30 mg/kg, subcutáneamente) y la cinética de la inhibición de STAT5 y STAT3 se evaluó en diferentes puntos en el tiempo mediante inmunoblot. Como se demuestra en la **Fig. 11**, CEP-701 suprimió fuertemente la fosforilación de STAT5 y STAT3 con una inhibición máxima observada a las 2-4 horas después de la administración del fármaco. La cinética de la inhibición se correlaciona muy bien con la concentración de CEP-701 en tumores, confirmando además la habilidad de CEP-701 para suprimir la señalización JAK2/STAT *in vivo*.

Ejemplo 6

Muestras de pacientes

CEP-701 demostró inhibir el crecimiento de células CD34+ aisladas del Paciente #648 en un ensayo XTT (Fig. 14). Las concentraciones crecientes de CEP-701 (0,03 μ M, 0,1 μ M y 0,3 μ M) redujeron el crecimiento de células a las 24 (Panel A) y 48 horas (Panel B).

Fig. 15 muestra un análisis de clasificador celular activado con fluorescencia (FACS) de cultivos primarios de CD34+ derivados de Paciente # 648 tratado con CEP-701. En el Panel A, las barras blancas indican el número de células vivas. Las barras negras en el Panel A indican la inducción de apoptosis como lo mide la Anexina V. En el Panel B de la Fig. 15, las barras blancas indican el número de células CD34+ vivas, que se trataron durante 24 horas con concentraciones crecientes de CEP-701 y que se diluyeron en un medio fresco y se cultivaron durante 72 horas adicionales. El recuento celular se determinó usando azul tripán.

Figura 16 muestra los efectos de CEP-701 en señalización JAK2/STAT en cultivos primarios de CD34+ derivados del Paciente #648. Los progenitores hematopoyéticos de CD34+ se purificaron del Paciente #648 y se cultivaron con concentraciones crecientes (30 nM, 100 nM, 300 nM y 1000 nM), como se indica, durante 1 hora. La expresión y la fosforilación de STAT5, STAT3 se analizó mediante inmunoblot usando anticuerpos específicos. Para evaluar la actividad de JAK2, JAK2 se inmunoprecipitó, seguido por un inmunoblot usando anticuerpo específico de antifosfotirosina (4G10). CEP-701 demostró inhibir señalización JAK2/STAT en células precursoras cultivadas CD34+ que tenían la mutación V617F y derivadas de un paciente con TMP.

Los efectos de CEP-701 en la activación de SHP2, GAB2, AKT y ERK se evaluaron en células CD34+ cultivadas derivadas del Paciente #648. Se usó inmunoblot para examinar fosforilación y expresión de SHP2, GAB2, (Fig. 17, Panel A) y AKT, y ERK (Fig. 17, Panel B). Las concentraciones crecientes de CEP-701 se añadieron a cultivos primarios de células CD34+ derivadas del Paciente #648. Las concentraciones usadas fueron 0, (es decir, el vehículo solo), 30, 100, 300 y 1000 nM de CEP-701. CEP-701 demostró inhibir las secuencias señalizadoras

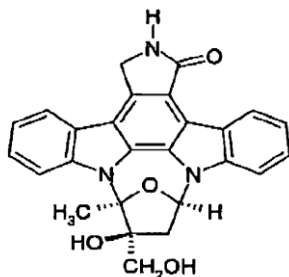
implicadas en la proliferación y supervivencia de células precursoras CD34+, sugiriendo una parada general en el nivel receptor en células que tenían la mutación V617F. En el Panel B, la expresión del gen constitutivo, β -actina, se usó como un control.

Las células del Paciente #648 también se analizaron en un experimento examinando la expresión y fosforilación STAT5 y expresión de BCL-X_L, una diana corriente debajo de señalización JAK2/STAT (**Fig. 18**). Las concentraciones crecientes de CEP-701 se añadieron a cultivos primarios de células CD34+ derivadas del paciente #648. Las concentraciones usadas fueron 0, (es decir, el vehículo solo), 30, 100, 300 y 1000 nM de CEP-701. La expresión de los genes constitutivos, β -actina y ciclofilina, se usaron como un control. CEP-701 demostró inhibir señalización JAK2/STAT y expresión Bclxl en esas células. La exposición extendida a CEP-701 (por ejemplo, múltiples dosis) puede dar como resultado un descenso de la expresión de STAT5.

Como aquellos expertos en la técnica apreciarán, son posibles numerosas modificaciones y variaciones de la presente invención en base a las instrucciones anteriores. Por lo tanto, se entiende que dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, la invención puede practicarse de otra manera a la descrita específicamente en el presente documento, y el alcance de la invención pretende abarcar tales variaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que es un inhibidor de JAK2 para su uso en el tratamiento de trastornos mieloproliferativos asociados con la activación de JAK2, donde el compuesto tiene la estructura:

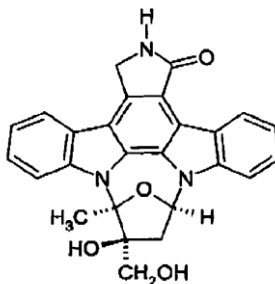


2. El compuesto como el reivindicado en la reivindicación 1, donde dicho trastorno mieloproliferativo se selecciona del grupo consistente en policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (TE), mielofibrosis con metaplasia mieloide (MMM), mielofibrosis idiopática (MFI), trastornos mieloproliferativos sin clasificar (TMPsc), síndrome hipereosinofílico (SHE), y mastocitosis sistémica (MS).

3. El compuesto como el reivindicado en la reivindicación 2, donde el compuesto se administra en una cantidad de aproximadamente 0,8 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 1,3 mg/kg de peso corporal.

4. El compuesto como el reivindicado en la reivindicación 2, donde el compuesto se administra en una cantidad de aproximadamente 60 mg a aproximadamente 80 mg dos veces al día.

5. El uso de un compuesto que es un inhibidor de JAK2 para la fabricación de un medicamento para tratar trastornos mieloproliferativos asociados con la activación de JAK2, donde el compuesto tiene la estructura:



6. El uso de la reivindicación 5, donde dicho trastorno mieloproliferativo se selecciona del grupo consistente en policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (TE), mielofibrosis con metaplasia mieloide (MMM), mielofibrosis idiopática (MFI), trastornos mieloproliferativos sin clasificar (TMPsc), síndrome hipereosinofílico (SHE), y mastocitosis sistémica (MS).

7. El uso de la reivindicación 6, donde el compuesto se adapta para su administración en una cantidad de aproximadamente 0,8 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 1,3 mg/kg de peso corporal.

8. El uso de la reivindicación 6, donde el compuesto se adapta para su administración en una cantidad de aproximadamente 60 mg a aproximadamente 80 mg dos veces al día.

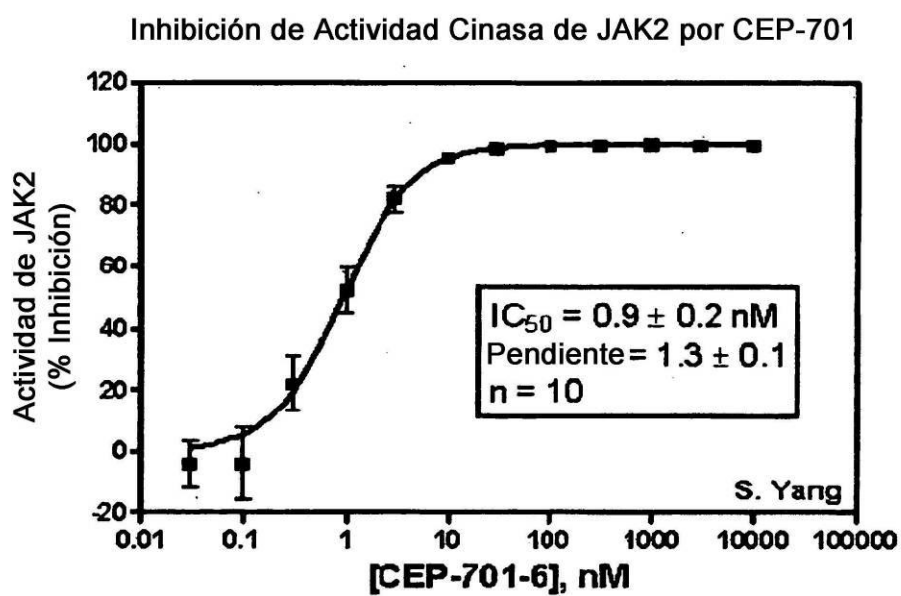
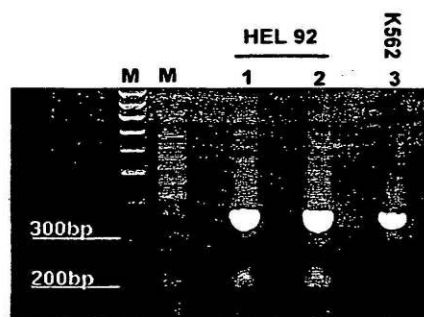


Figura 1

A

PCR específico de alelos



364bp: alelo mutante y de tipo salvaje
203bp: Alelo mutante

B

Análisis de restricción

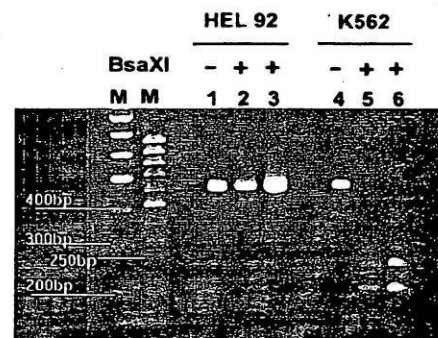
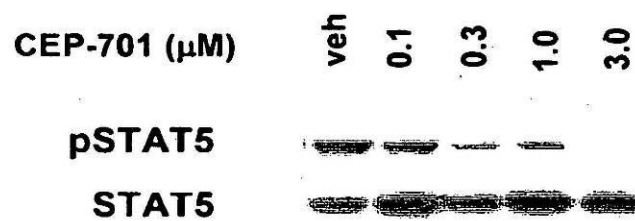


Figura 2

A



B

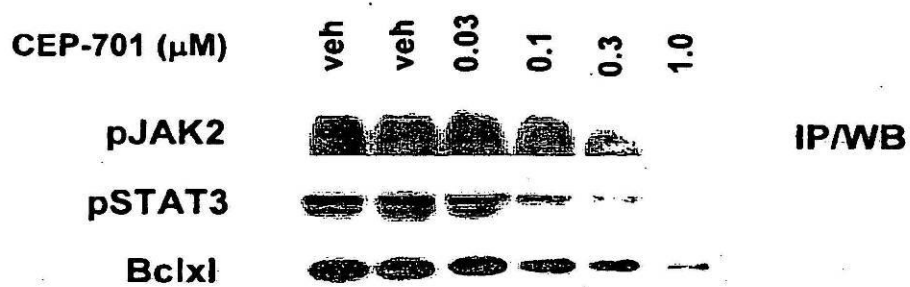


Figura 3

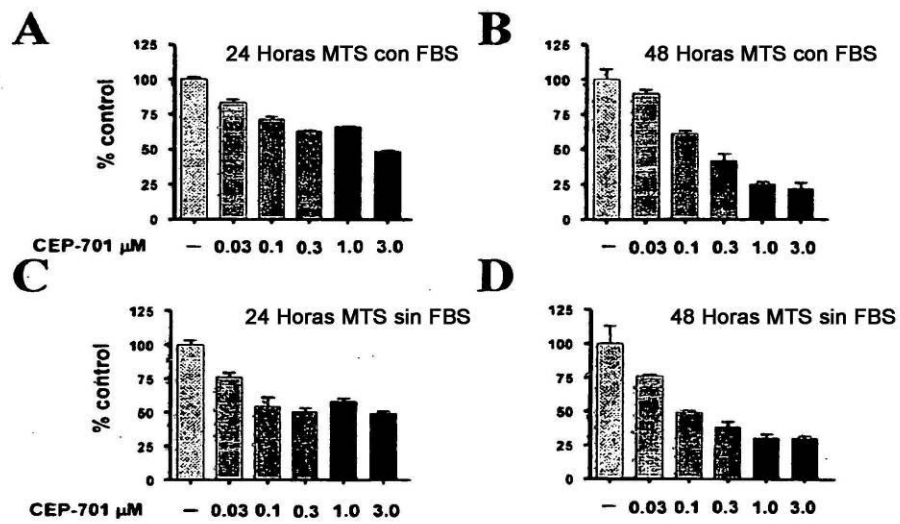


Figura 4

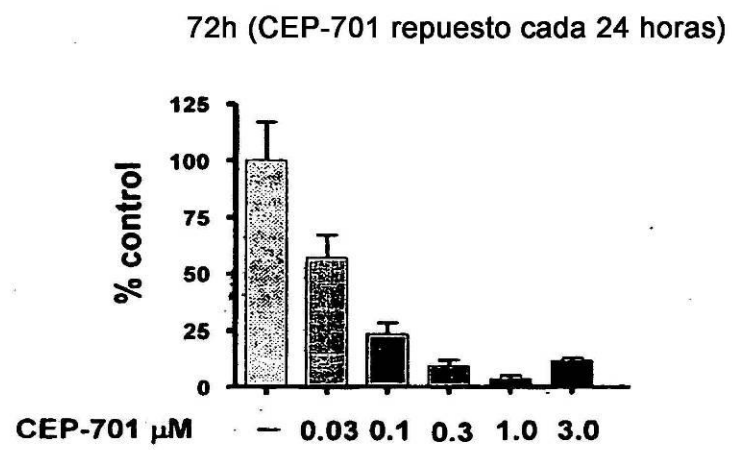


Figura 5

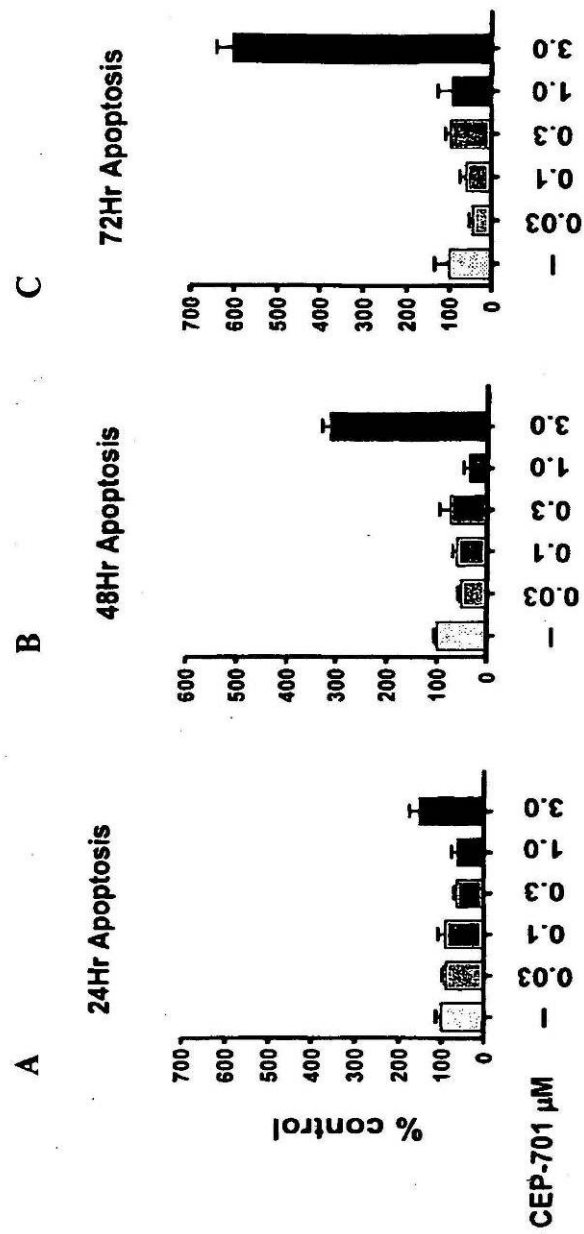


Figure 6

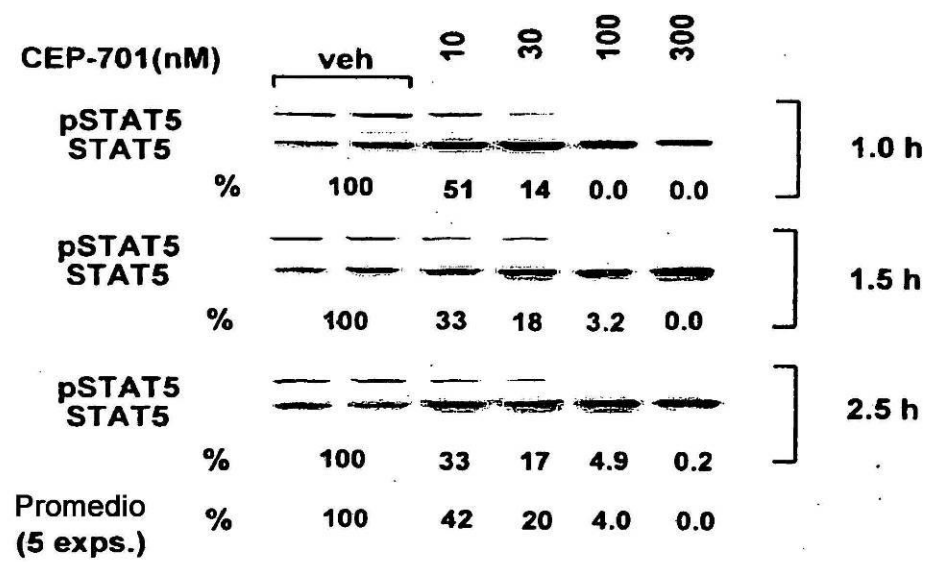


Figura 7

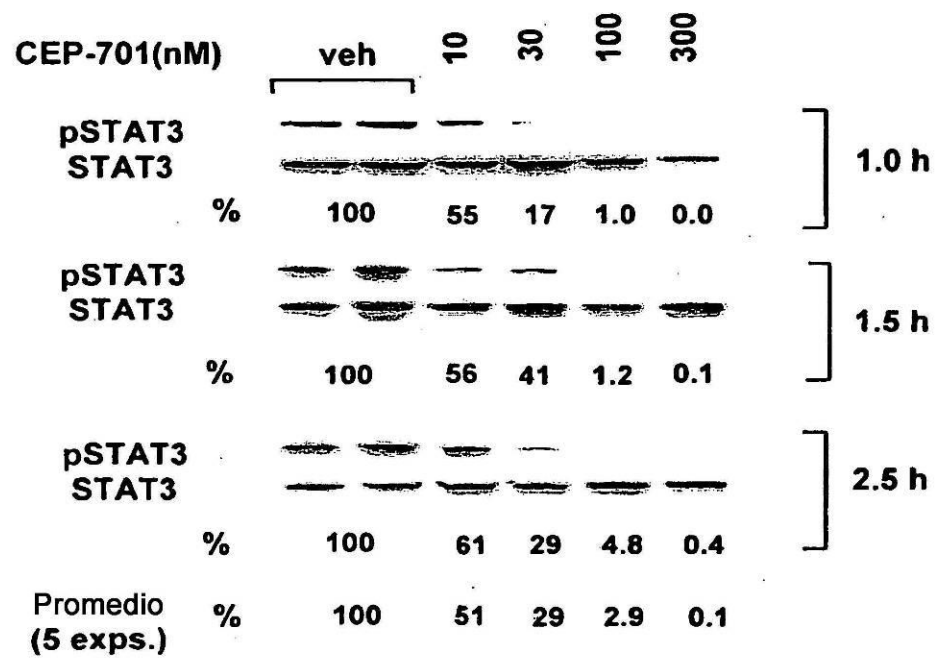


Figura 8

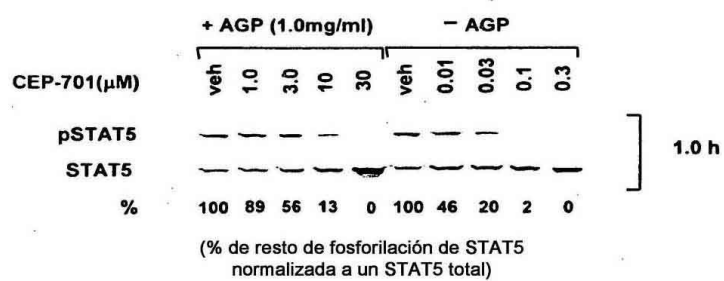
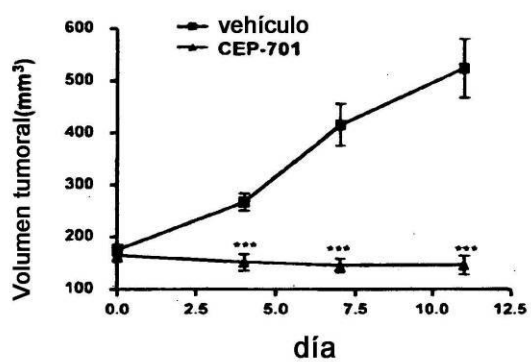


Figura 9

A



B



Figura 10

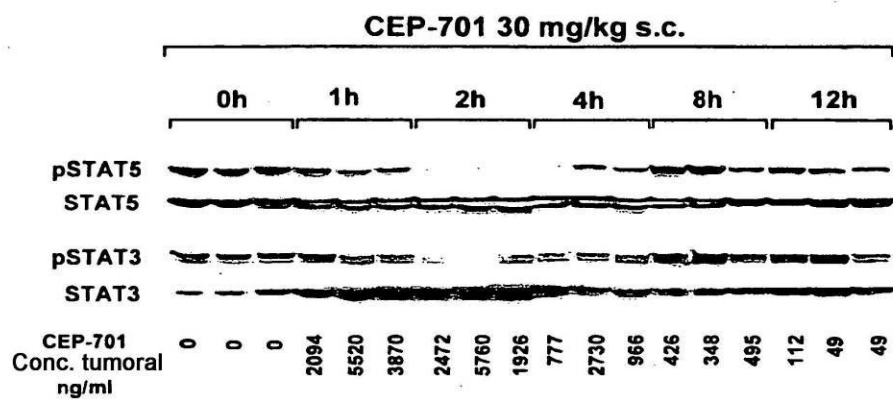


Figura 11

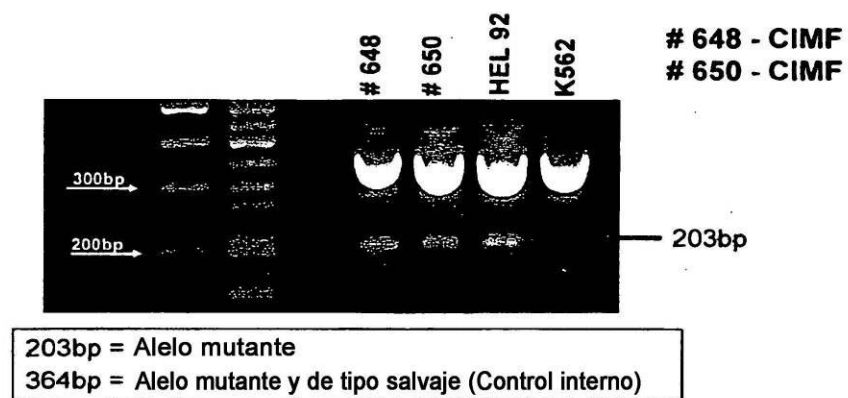


Figura 12

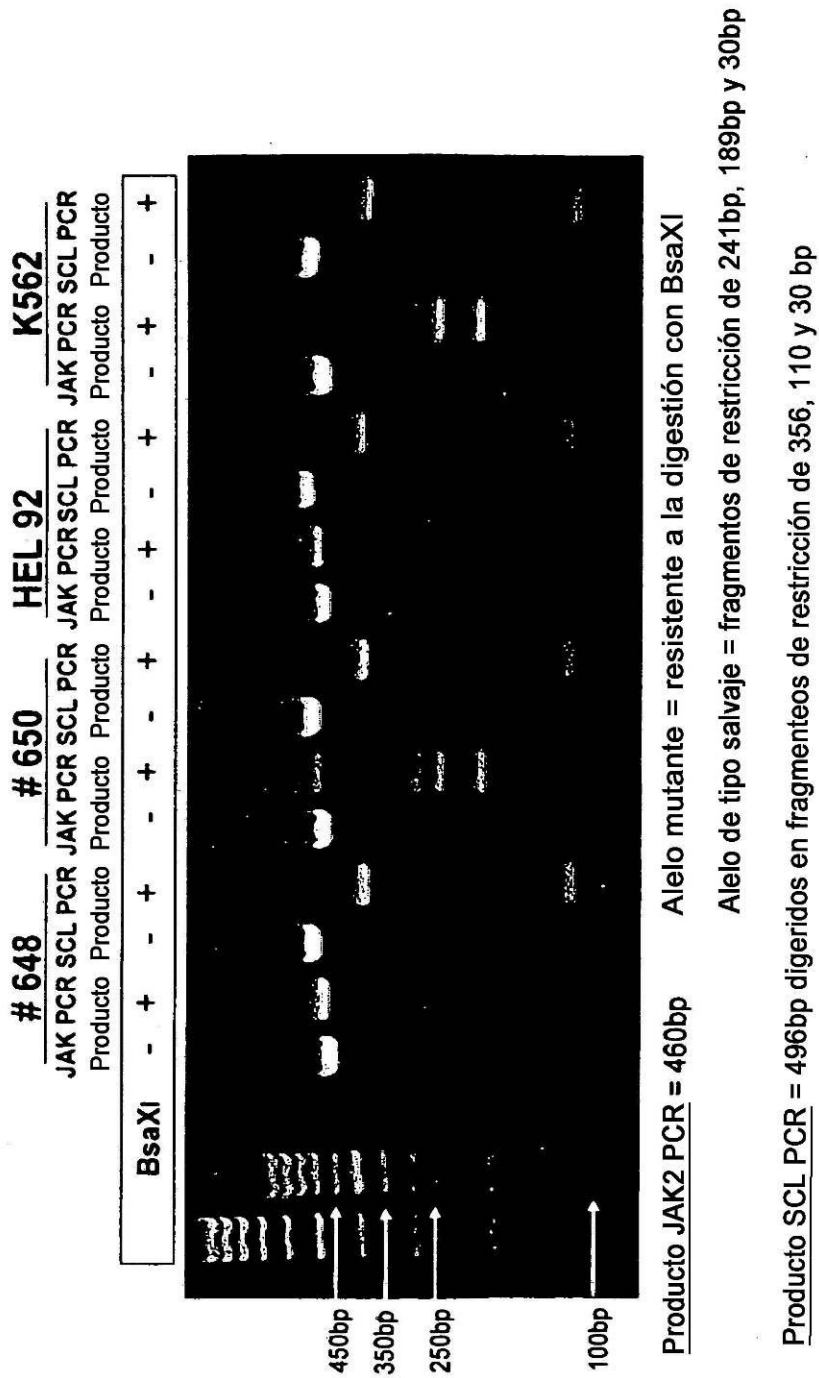


Figura 13

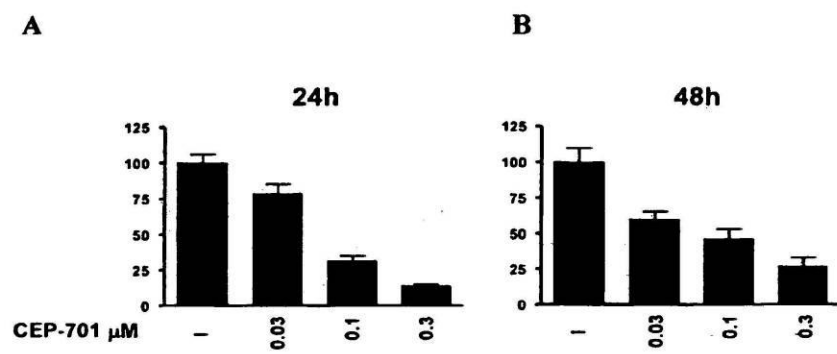


Figura 14

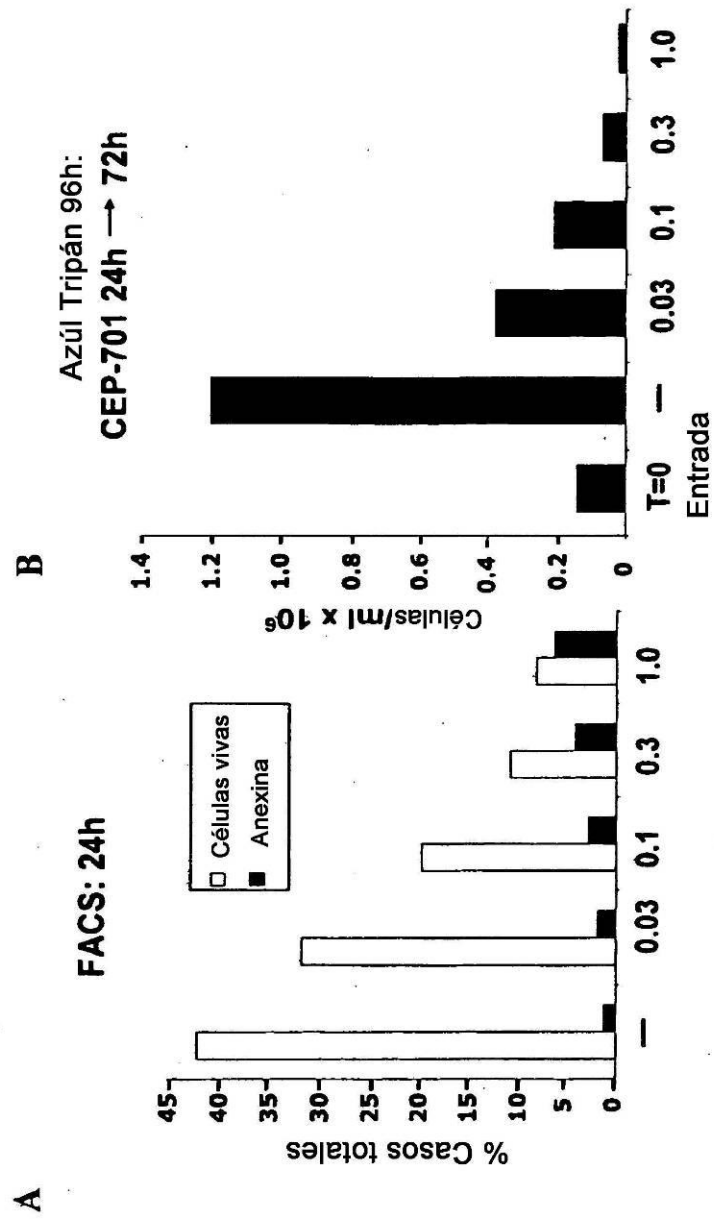


Figura 15

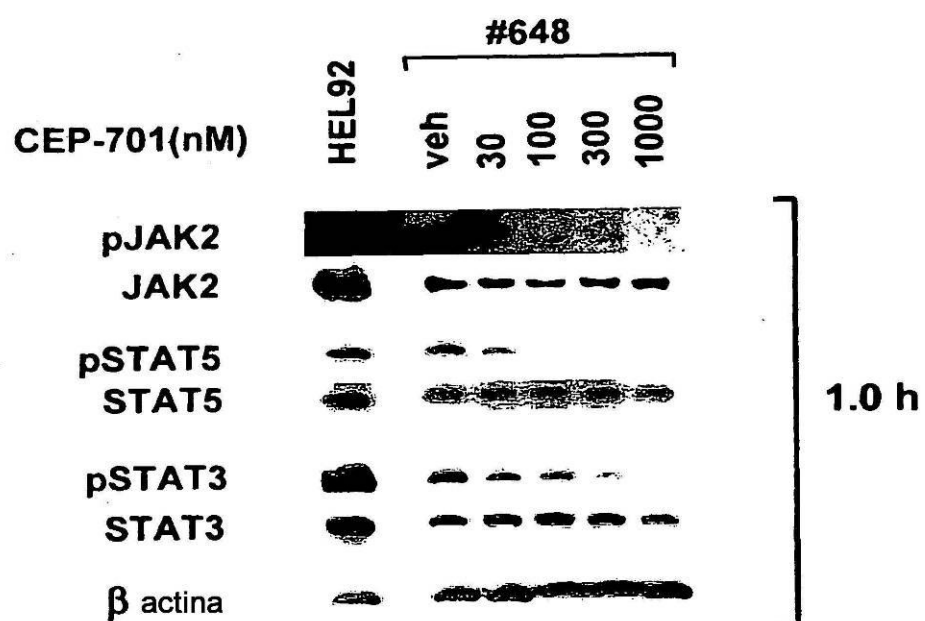


Figura 16

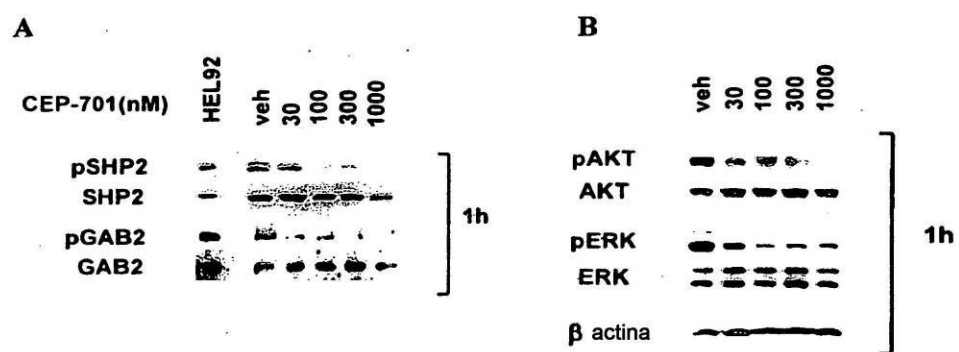


Figura 17

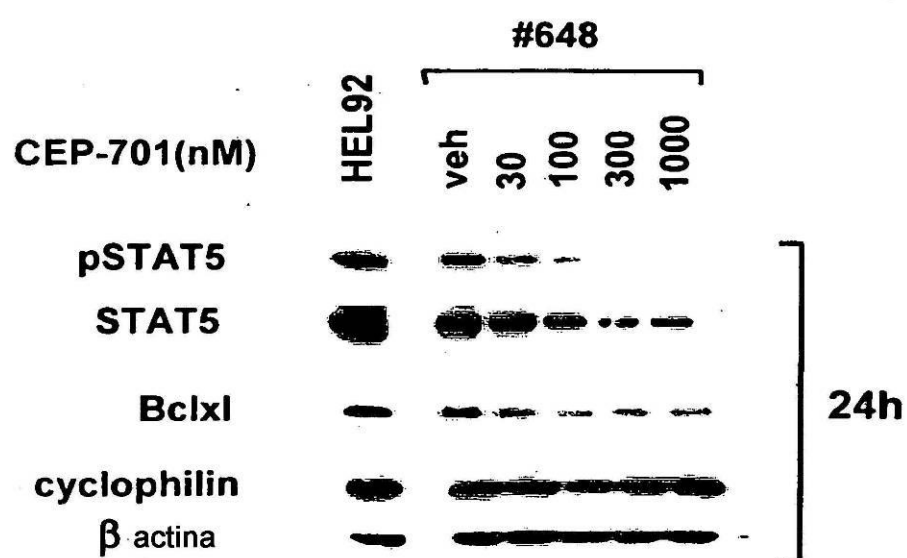


Figura 18