

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 459 442**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/4164** (2006.01)

**C07D 233/00** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2008** **E 08863009 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2014** **EP 2229170**

54 Título: **Inhibidores de quinesina como compuestos terapéuticos contra el cáncer**

30 Prioridad:

**14.12.2007 US 13966 P**

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

**09.05.2014**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)  
Lichtstrasse 35  
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**ABRAMS, TINYA;  
BARSANTI, PAUL;  
DUHL, DAVID;  
FAURE, MICHEL;  
RENHOWE, PAUL A. y  
WALTER, ANNETTE OLGA**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 459 442 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 quinesina como compuestos terapéuticos contra el cáncer

Campo técnico

5 Esta invención se refiere a inhibidores de KSP para uso en el tratamiento de trastornos proliferativos, tales como cánceres, mediante la administración de inhibidores de KSP.

Antecedentes

10 Las quinesinas son proteínas motoras que hidrolizan el trifosfato de adenosina a medida que viajan a lo largo de los microtúbulos y generan fuerza mecánica. Estas proteínas se caracterizan porque contienen un dominio motor que tiene aproximadamente 350 residuos de aminoácidos. Se han resuelto las estructuras cristalinas de varios dominios motores de quinesina.

15 En la actualidad, se han identificado aproximadamente cien proteínas relacionadas con quinesina (KRP). Las quinesinas están involucradas en una variedad de procesos biológicos celulares, incluyendo el transporte de organelos y vesículas, y el mantenimiento del retículo endoplasmático. Varias KRP interactúan con los microtúbulos del huso mitótico o con los cromosomas directamente, y parecen jugar un papel esencial durante las etapas mitóticas del ciclo celular. Estas KRP mitóticas son de un interés particular para el desarrollo de compuestos terapéuticos contra el cáncer.

La proteína del huso de quinesina (KSP) (también conocida como Eg5, HsEg5, KNSL1, o KIF11) es una entre varias proteínas motoras de tipo quinesina que se localizan en el huso mitótico, y se sabe que son requeridas para la formación y/o función del huso mitótico bipolar.

20 En 1995, se demostró que el consumo de KSP utilizando un anticuerpo dirigido contra el terminal C de KSP detiene las células HeLa en la mitosis con los arreglos de microtúbulos monoastrales (Blangy y colaboradores, Cell 83: 1159 - 1169, 1995). Las mutaciones en los genes *bimC* y *cut7*, que se considera que son homólogos de la KSP, provocan una falla en la separación del centrosoma en *Aspergillus nidulans* (Enos, A. P., y N. R. Morris, Cell 60: 1019 - 1027, 1990) y en *Schizosaccharomyces pombe* (Hagan, I., y M. Yanagida, Nature 347: 563 - 566, 1990). El tratamiento de  
25 células con cualquier ATRA (ácido retinoico todo trans), el cual reduce la expresión de KSP al nivel de la proteína, o el consumo de KSP, utilizando oligonucleótidos antisentido, reveló una inhibición significativa del crecimiento en las células de carcinoma pancreático DAN-G, indicando que la KSP puede estar involucrada en la acción anti-proliferativa del ácido retinoico todo trans (Kaiser, A., y colaboradores, J. Biol. Chem. 274, 18925 - 189131, 1999). En forma muy interesante, se demostró que la proteína quinasa relacionada con *Xenopus laevis Aurora* pEg2 se asocia y fosforila X1Eg5 (Giet, R., y colaboradores, J. Biol. Chem. 274: 15005 - 15013, 1999). Los sustratos  
30 potenciales de las quinasas relacionadas con *Aurora* son de interés particular para el desarrollo de fármacos contra el cáncer. Por ejemplo, las quinasas *Aurora* 1 y 2 son sobreexpresadas al nivel de la proteína y del ARN, y los genes se amplifican en los pacientes con cáncer de colon.

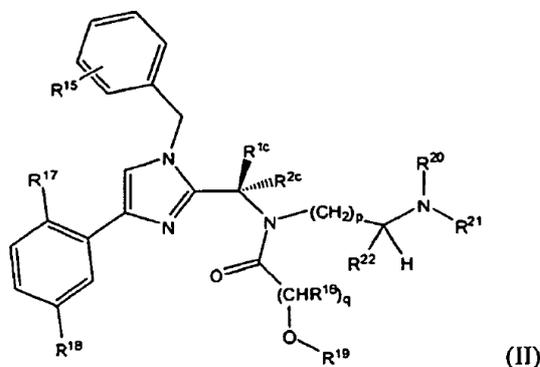
35 Se demostró que el primer inhibidor de molécula pequeña permeable de la célula para KSP, "monoastral", detiene las células con husos monopolares sin afectar la polimerización de los microtúbulos, como lo hacen los compuestos quimioterapéuticos convencionales, tales como los taxanos y los alcaloides vinca (Mayer, T. U., y colaboradores, Science 286: 971 - 974, 1999). Se identificó al monastrol como un inhibidor en las cribas basadas en el fenotipo, y se sugirió que este compuesto puede servir como guía para el desarrollo de los fármacos contra el cáncer. Se determinó que la inhibición no es competitiva con respecto a la interacción del trifosfato de adenosina con la KSP, y se encontró que es rápidamente reversible (DeBonis, S., y colaboradores, Biochemistry 42: 338 - 349, 2003; Kapoor, T. M., y colaboradores, J. Cell Biol. 150: 975 - 988, 2000).

40 A la luz de la importancia de contar productos quimioterapéuticos mejorados, existe la necesidad de inhibidores de KSP que sean inhibidores efectivos *in vivo* de KSP y de las proteínas relacionadas con KSP. Anteriormente se han reportado algunos inhibidores de KSP. Por ejemplo, la publicación internacional WO 06/002236 y la  
45 PCT/US2006/031129 dan a conocer ciertas clases de compuestos indicados como inhibidores de KSP. Ispinesib (SB-715992) es un candidato clínico de Cytokinetics, que es indicada para actuar como un inhibidor de KSP. La presente invención proporciona nuevos inhibidores de KSP con actividades mejoradas, y se relaciona con el uso de estos inhibidores de KSP. Además, proporciona novedosos inhibidores de KSP que son efectivos contra las células cancerosas que son resistentes a otros agentes terapéuticos, tales como paclitaxel, debido a su expresión de la glicoproteína P que actúa como una bomba de flujo de salida.  
50

## Resumen de la invención

La invención se relaciona con inhibidores de KSP para uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa seleccionada a partir de un tumor sólido o un cáncer hematológico en un mamífero, que comprende la administración a dicho mamífero de una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de la Fórmula II, un tautómero del compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero, o una mezcla de los mismos, en donde el compuesto de la Fórmula II es:

5



en donde:

$R^{1c}$  se selecciona entre el grupo que consiste en etilo, isopropilo, t-butilo, fenilo,  $-\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{O}$ (oxetan-3-ilo) y  $-\text{CCH}_3(\text{CH}_2)_2\text{O}$ (3-metiloxetan-3-ilo);

10  $R^{2c}$  es hidrógeno o metilo;

$R^{15}$ ,  $R^{16}$ ,  $R^{17}$  y  $R^{18}$  se seleccionan cada uno independientemente entre H, halo, alquilo C1 - 4, haloalquilo C1 - 4, y CN;

$R^{19}$ ,  $R^{20}$  y  $R^{21}$  son cada uno independientemente H o acilo C1 - C10 opcionalmente sustituido;

$R^{22}$  es haloalquilo C1 - C4;

15  $p$  es un número entero de 1 a 3; y

$q$  es un número entero de 1 - 3;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas realizaciones de los compuestos de Fórmula II,

$R^{1c}$  se selecciona entre el grupo que consiste de etilo, isopropilo y t-butilo;

20  $R^{2c}$  es H;

$R^{15}$ ,  $R^{17}$  y  $R^{18}$  se seleccionan cada uno independientemente entre H, halo, alquilo C1 - 4, haloalquilo C1 - 4, y CN;

$R^{16}$  es H o alquilo C1 - C4;

$R^{19}$ ,  $R^{20}$  y  $R^{21}$  son cada uno independientemente H o acilo C1 - C10 opcionalmente sustituido;

$R^{22}$  es haloalquilo C1 - C4;

25  $p$  es 2; y

$q$  es 1.

Estos compuestos también incluyen las sales farmacéuticamente aceptables correspondientes.

Los compuestos de Fórmula II y Fórmula IIa - IIc (más abajo) son un subconjunto de los compuestos de Fórmula I, y se caracterizan por la presencia de un grupo hidroxilo libre o una versión de un profármaco de un grupo hidroxilo libre en la fracción acilo, es decir, en estos compuestos, R<sup>19</sup> es H, o R<sup>19</sup> es un grupo acilo que puede hidrolizarse *in vivo* para proporcionar un compuesto en el que R<sup>19</sup> es H. Los compuestos en los que R<sup>19</sup> es un grupo acilo adecuados son profármacos que se hidrolizan fácilmente en el cuerpo para producir un compuesto en el que R<sup>19</sup> es H. Los compuestos en los que R<sup>19</sup> es H se ha encontrado que tienen sorprendentemente buena actividad para el tratamiento de ciertas condiciones tales como el cáncer de próstata, y son particularmente efectivos contra tumores en los que P-gp se expresa y en ciertos cánceres hematológicos. En particular, estos compuestos son efectivos contra los tumores resistentes a fármacos que expresan P-gp, un mecanismo de resistencia común, mientras que incluso compuestos muy similares sin el hidroxilo son mucho menos efectivos contra tales tumores resistentes a fármacos. Si bien es común que un hidroxilo libre sea una característica indeseable en un candidato a fármaco debido a problemas metabólicos tales como oxidación y glicosilación, se encontró sorprendentemente que los compuestos de Fórmula II o IIa, IIb o IIc, son más efectivos *in vivo* contra ciertos tumores que compuestos similares que no contienen un hidroxilo libre y que no se puede hidrolizar fácilmente para proporcionar un hidroxilo libre (R<sup>19</sup> = H). Su efectividad contra tumores resistentes a los fármacos hace que estos compuestos de Fórmula II sean particularmente útiles para el tratamiento del cáncer.

En una realización adicional, la invención se refiere a inhibidores de KSP para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa seleccionada de entre un tumor sólido o un cáncer hematológico en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de fórmula II, un tautómero del compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero, o una mezcla de los mismos, en donde el tumor sólido se selecciona de entre el grupo que consiste de carcinoma de pulmón, carcinoma de mama, carcinoma de ovario, carcinoma de piel, carcinoma de colon, carcinoma de vejiga urinaria, carcinoma de hígado, carcinoma gástrico, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma de células escamosas, carcinoma papilar de tiroides, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC), carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer de páncreas, cáncer de cerebro, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello y sarcomas. En ciertas realizaciones, el tumor es uno resistente a múltiples fármacos, o uno que expresa un nivel elevado de glicoproteína P (P-gp).

En una realización adicional, el tumor sólido es un carcinoma de mama. En una realización adicional, el carcinoma de mama es carcinoma de mama metastásico.

En una realización alternativa, el tumor sólido es un carcinoma gástrico. En una realización adicional, el tumor sólido es cáncer de próstata. En una forma de realización, la invención proporciona inhibidores de KSP para uso en un método de tratamiento para una enfermedad proliferativa seleccionada de un cáncer sólido o hematológico que comprende la administración de la Fórmula II en donde el tumor es un cáncer resistente a múltiples fármacos. En algunas realizaciones, la malignidad hematológica se selecciona entre leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia linfoblástica aguda (LLA), mieloma múltiple (MM), linfoma no Hodgkin (LNH) y linfoma de Hodgkin (LH). En ciertas realizaciones, la malignidad es una resistente a múltiples fármacos, o una que expresa un nivel elevado de glicoproteína P (P-gp).

En una realización adicional, la invención se refiere a inhibidores de KSP para su uso en un método para tratar una enfermedad proliferativa escogida entre un tumor sólido o un cáncer hematológico en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de Fórmula II, un tautómero del compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero, o una mezcla de los mismos, en donde el cáncer hematológico se selecciona entre el grupo que consiste de linfoma de Hodgkin (LH), linfoma no Hodgkin (LNH), leucemia, leucemia mielógena, leucemia linfocítica, leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), síndrome mielodisplásico (SMD), leucemia de células peludas y mieloma múltiple.

En una realización adicional, dicho cáncer hematológico es leucemia mielógena aguda. En una realización alternativa, el cáncer hematológico es mieloma múltiple.

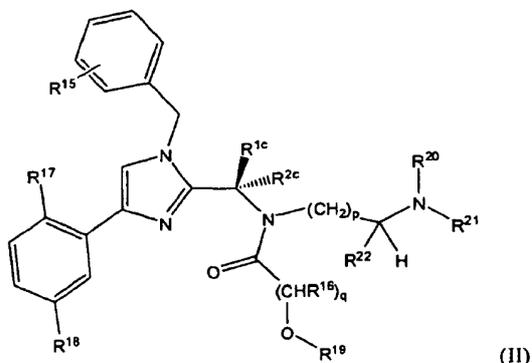
En otra realización, la invención se refiere a inhibidores de KSP para uso en un método para tratar una enfermedad proliferativa seleccionada a partir de un tumor sólido o un cáncer hematológico en un mamífero, en donde el método comprende administrar a dicho mamífero una cantidad de un inhibidor de KSP de Fórmula (II) y comprende además administrar un segundo compuesto terapéutico contra el cáncer. En una forma de realización, el segundo compuesto terapéutico contra el cáncer se administra antes de, junto con, o después del tratamiento con el inhibidor de KSP de Fórmula (II).

El segundo compuesto terapéutico contra el cáncer se puede seleccionar a partir de irinotecano, topotecano, gemcitabina, imatinib, trastuzumab, 5 - fluorouracilo, leucovorina, carboplatino, cisplatino, docetaxel, paclitaxel, tezacitabina, ciclofosfamida, alcaloides vinca, antraciclinas, rituximab, y nilotinib.

En algunas realizaciones, el segundo compuesto es un inhibidor de Bcr-Abl.

En realizaciones particulares, el inhibidor de Bcr-Abl se selecciona de entre el grupo de imatinib y nilotinib.

La invención proporciona un compuesto de fórmula (II) :



5 en donde:

$R^{1c}$  se selecciona entre el grupo que consiste en etilo, isopropilo, t-butilo, fenilo,  $-\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{O}$ (oxetan-3-ilo) y  $-\text{CCH}_3(\text{CH}_2)_2\text{O}$ (3-metiloxetan-3-ilo);

$R^{2c}$  es hidrógeno o metilo;

10  $R^{15}$ ,  $R^{16}$ ,  $R^{17}$  y  $R^{18}$  se seleccionan cada uno independientemente entre H, halo, alquilo C1 - 4, haloalquilo C1 - 4, y CN;

$R^{19}$ ,  $R^{20}$  y  $R^{21}$  son cada uno independientemente H o acilo C1 - C10 opcionalmente sustituido;

$R^{22}$  es haloalquilo C1 - C4;

p es un número entero de 1 a 3; y

q es un número entero de 1 - 3;

15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una forma de realización,  $R^{22}$  es fluorometilo.

En otra forma de realización, p es 2.

En una forma de realización adicional, q es 1.

En otra forma de realización,  $R^{2c}$  y  $R^{15}$  son cada uno H.

20 En una forma de realización adicional,  $R^{17}$  y  $R^{18}$  son cada uno halógeno.

En aun otra forma de realización,  $R^{19}$ ,  $R^{20}$  y  $R^{21}$  son cada uno H.

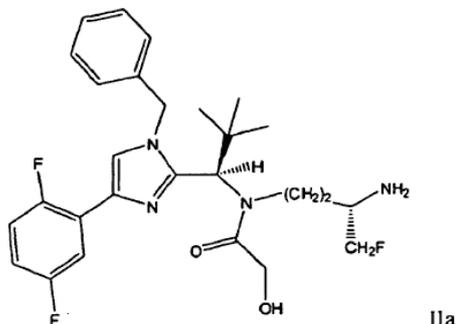
En una forma de realización adicional,  $R^{19}$  es H.

En otra forma de realización,  $R^{19}$  es acilo C1 - C10 opcionalmente sustituido.

25 En algunas forma de realización, el compuesto comprende dos o más de las características estructurales descritas anteriormente para  $R^{22}$ , p, q,  $R^{2c}$  y  $R^{17}$  -  $R^{21}$ . En algunas forma de realización, el compuesto comprende cuando menos tres de estas características estructurales. En algunas forma de realización preferidas de estos compuestos,  $R^{22}$  es fluorometilo, y p es 2, y q es 1, y  $R^{2c}$  y  $R^{15}$  son cada uno H. En algunas de estas forma de realización,  $R^{17}$  y

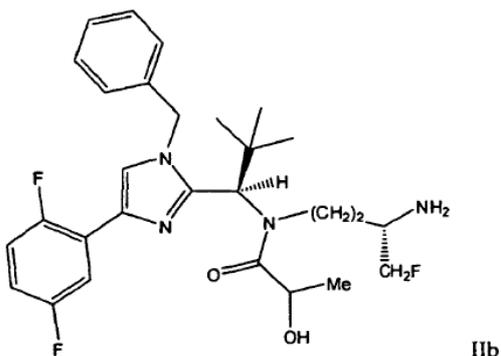
R<sup>18</sup> representan cada uno F. Y en algunas de estas forma de realización preferidas, R<sup>18</sup>, R<sup>28</sup> y R<sup>21</sup> son cada uno H. De preferencia en estas forma de realización, R<sup>1c</sup> se selecciona a partir de etilo, isopropilo y ter-butilo.

La invención también proporciona un compuesto de la fórmula IIa:



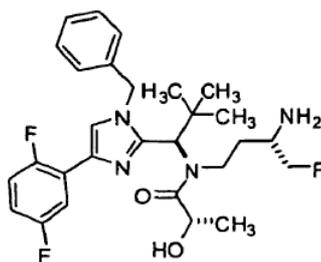
5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La invención también proporciona un compuesto de la fórmula IIb:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La invención también proporciona un compuesto de la fórmula IIc:



10

(S)-N-((S)-3-amino-4-fluorobutil)-N-((R)-1-(1-bencil-4-(2,5-difluorofenil)-1H-imidazol-2-il)-2,2-dimetilpropil)-2-hidroxiopropanamida

IIc

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 En una forma de realización, la invención proporciona inhibidores de KSP para el uso en un método para el tratamiento de una enfermedad proliferativa seleccionada a partir de un tumor sólido o un cáncer hematológico en un mamífero, en donde el método comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de cualquiera de las fórmulas II, IIa, IIb o IIc, un tautómero de cualquiera de estos compuestos, una sal

farmacéuticamente aceptable de cualquiera de estos compuestos, una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero, o una mezcla de los mismos.

5 En una forma de realización adicional, el tumor sólido se selecciona a partir del grupo que consiste en carcinoma de pulmón, carcinoma de mama, carcinoma de ovario, carcinoma de piel, carcinoma de colon, carcinoma de vejiga  
 10 urinaria, carcinoma de hígado, carcinoma gástrico, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma de células escamosas, carcinoma papilar de tiroides, carcinoma cervical, carcinoma pulmonar de células pequeñas (SCLC), carcinoma pulmonar de células no pequeñas, cáncer pancreático, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de cerebro, y sarcomas. En ciertas forma de realización, el tumor sólido es un tumor que es resistente a otros fármacos para el cáncer. Puede ser un cáncer que exprese una bomba  
 15 de flujo de salida, tal como P-gp que promueve la resistencia a fármacos, o un cáncer que ha demostrado que es resistente al tratamiento con fármacos como paclitaxel o SB-715992. Los cánceres que son resistentes a fármacos, tales como paclitaxel, debido a sobreexpresión por parte de las células cancerosas de una bomba de flujo de salida, en particular glicoproteína P (P-gp), son sensibles a los compuestos de la fórmula II, como se demuestra en la presente invención, mientras que compuestos similares que carecen del hidroxilo de los compuestos de la Fórmula II pueden no ser efectivos en estos tumores resistentes a fármacos. Los compuestos de las fórmulas IIa, IIb, y IIc son especialmente útiles para el tratamiento de tumores que expresan P-gp y exhiben resistencia a otros agentes terapéuticos. Estos compuestos son convenientes por su capacidad inesperada para tratar los tumores resistentes a fármacos. Se cree que su actividad sobre los tumores resistentes a fármacos está asociada con el hidroxilo libre sobre la fracción de amida de la Fórmula II.

20 En otra forma de realización, el tumor sólido es carcinoma de mama. En una forma de realización adicional, el carcinoma de mama es carcinoma de mama metastásico.

En una forma de realización alternativa, el tumor sólido es carcinoma gástrico.

En otra forma de realización, el tumor sólido es cáncer de próstata.

25 En cada una de estas forma de realización, el tumor algunas veces es uno que es resistente a otros fármacos. En algunas forma de realización, el tumor se selecciona a partir de cáncer de riñón, hígado, colon, cerebro o de mama. En ciertas forma de realización, es un tumor que expresa niveles elevados de P-gp. Tal expresión elevada de P-gp puede surgir naturalmente, o como resultado del tratamiento con otros fármacos.

30 En otra forma de realización, la invención proporciona inhibidores de KSP para uso en un método para el tratamiento de una enfermedad proliferativa seleccionada a partir de un tumor sólido o un cáncer hematológico en un mamífero, el cual comprende administrar a este mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de cualquiera de las fórmulas IIa, IIb o IIc, un tautómero de cualquiera de estos compuestos, una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de estos compuestos, una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero, o una mezcla de los mismos, en donde el cáncer hematológico se selecciona a partir del grupo que consiste de linfoma de Hodgkin (LH), linfoma no Hodgkin (LNH), leucemia, leucemia mielógena, leucemia linfocítica, leucemia mielógena aguda (LMA),  
 35 leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), síndrome mielodisplásico (SMD), leucemia de células pilosas, y mieloma múltiple.

En otra forma de realización, el cáncer hematológico es leucemia mielógena aguda.

En otra forma de realización, el cáncer hematológico es mieloma múltiple.

Breve descripción de los dibujos

40 Figura 1. Sensibilidad relativa al compuesto IIa para las líneas celulares derivadas a partir de malignidades hematológicas. Las sensibilidades relativas basadas en el ensayo CellTiter Glo® de las líneas celulares en un panel de malignidad hematológica se muestran graficando la diferencia entre el promedio de los valores Log(GI50) (GI50 es la concentración con una inhibición del 50%) para el panel completo, y el valor Log(GI50) para cada línea celular; los valores positivos (barras a la derecha) indican las líneas celulares que son más sensibles que el promedio, y los  
 45 valores negativos (barras a la izquierda) indican las líneas celulares que son menos sensibles que el promedio.

Figura 2. Evaluación de la etapa celular mediante FACS para las líneas celulares SUDHL-4 y RL tratadas con el Compuesto IIa: la primera columna muestra las células no tratadas, la segunda columna muestra las células después de 24 horas con el Compuesto IIa, y la tercera columna muestra las células 48 horas después del tratamiento con el Compuesto IIa.

50 Figura 3. Datos que muestran que el compuesto IIa es citotóxico para las células blásticas de LMA de pacientes con LMA. El Panel A muestra el porcentaje de supervivencia en función de la dosificación. El Panel B muestra cultivos

celulares después de 2 semanas de tiempo de crecimiento. El Panel C muestra el porcentaje de células en la etapa <2N, 2N o 4N, comparando el efecto del compuesto Ila con aquél del paclitaxel.

5 Figura 4. Eficacia del compuesto Ila administrado en un programa de dosificación cada 4 días, 3 veces (q4d x 3) en el modelo de xenoinjerto de tumor subcutáneo MV4;11. Se establecieron tumores MV4;11 en ratones nu/nu atímicos hembra, mediante inyección subcutánea de  $10^7$  células en 0,2 mL de una relación 1:1 de HBSS y Matrigel<sup>MR</sup> en el costado derecho de cada ratón. Cuando los tumores alcanzaron 250 mm<sup>3</sup>, aproximadamente 24 días después del implante de las células, se dividieron aleatoriamente los ratones de acuerdo con el volumen del tumor, en grupos de tratamiento (n = 9). Se les administró a los animales en forma intravenosa el vehículo (Captisol®), el compuesto Ila, o SB-715992 (Ispinesib, un inhibidor de KSP de Cytokinetics que está en estudios clínicos). Todos fueron dosificados en un programa q4d x 3. (A) Eficacia / volúmenes tumorales de los grupos de tratamiento vs los días después de la selección aleatoria; (B) Porcentaje de cambio del peso corporal en relación con los pesos iniciales en el día de la selección aleatoria.

15 Figura 5. Eficacia del compuesto Ila administrado en un programa de dosificación cada 4 días, 3 veces (q4d x 3) en el modelo de xenoinjerto de tumor KB8.5. Se establecieron tumores KB8.5 en ratones nu/nu atímicos hembra (Charles River Laboratories) mediante inyección subcutánea de  $5 \times 10^6$  células en 0,2 mL de una relación 1:1 de HBSS y Matrigel<sup>MR</sup> en el costado derecho de cada ratón. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 300 mm<sup>3</sup>, aproximadamente 10 días después del implante de las células, se seleccionaron los ratones en forma aleatoria de acuerdo con el volumen del tumor en los grupos de tratamiento (n = 9 / grupo). A los animales se les administró en forma intravenosa el compuesto Ila o SB-715992. El paclitaxel se administró a razón de 30 mg/kg en forma intraperitoneal. Todos se dosificaron en un programa q4d x 3. (Izquierda) Eficacia / volúmenes tumorales de los grupos de tratamiento vs días después del inicio de la dosificación; (Derecha) Porcentaje de cambio del peso corporal en relación con los pesos iniciales el día de la selección aleatoria / inicio de la dosificación. \*p < 0,05 comparado con el vehículo y SB-715992 (ANOVA / Método de Dunn).

25 Figura 6. Eficacia del compuesto IIc administrado en un programa de dosificación cada 4 días, 3 veces (q4d x 3) en el modelo de xenoinjerto de tumor KB8.5. Se establecieron tumores KB8.5 en ratones nu/nu atímicos hembra (Charles River Laboratories) mediante inyección subcutánea de  $5 \times 10^6$  células en 0,2 mL de una relación 1:1 de HBSS y Matrigel<sup>MR</sup> en el costado derecho de cada ratón. Cuando los tumores alcanzaron un promedio de 339 mm<sup>3</sup>, se seleccionaron los ratones en forma aleatoria con base en los volúmenes de los tumores, en los grupos de tratamiento (n = 9). A los animales se les administró en forma intravenosa el compuesto IIc o SB-715992. El paclitaxel se administró a razón de 30 mg/kg en forma intraperitoneal. Todos se dosificaron en un programa q4d x 3. (Izquierda) Eficacia / volúmenes tumorales de los grupos de tratamiento vs días después del inicio de la dosificación; (Derecha) Porcentaje de cambio del peso corporal en relación con los pesos iniciales el día de la selección aleatoria / inicio de la dosificación. El compuesto IIc a razón de 1,25 mg/kg fue estadísticamente diferente del grupo con vehículo el día 11 (\*p < 0,05, ANOVA / Prueba de Tukey).

35 Figura 7. Eficacia del compuesto Ila administrado en un programa de dosificación cada 4 días, 3 veces (q4d x 3) en el modelo de xenoinjerto de tumor KB8.5. Se establecieron tumores KB8.5 en ratones nu/nu atímicos hembra (Charles River Laboratories) mediante inyección subcutánea de  $5 \times 10^6$  células en 0,2 mL de una relación 1:1 de HBSS y Matrigel<sup>MR</sup> en el costado derecho de cada ratón. Cuando los tumores alcanzaron un promedio de 285 mm<sup>3</sup>, se seleccionaron los ratones en forma aleatoria con base en los volúmenes de los tumores, en los grupos de tratamiento (n = 10). A los animales se les administró en forma intravenosa el compuesto Ila o SB-715992. El paclitaxel se administró a razón de 30 mg/kg en forma intraperitoneal. Todos se dosificaron en un programa q4d x 3. (Izquierda) Eficacia / volúmenes tumorales de los grupos de tratamiento vs días después del inicio de la dosificación; (Derecha) Porcentaje de cambio del peso corporal en relación con los pesos iniciales el día de la selección aleatoria / inicio de la dosificación. Ninguno de los grupos fue estadísticamente diferente del grupo con vehículo (ANOVA en Rangos).

Modalidades de la invención

A. Definiciones y visión de conjunto

50 Se debe entender que la terminología empleada en la presente invención tiene el propósito de describir las formas de realización particulares solamente, y no pretende limitar el alcance de la presente invención. Se debe observar que, como se utilizan en la presente y en las reivindicaciones, las formas en singular "un, una", "y" y "el, la" incluyen los referentes en plural, a menos que el contexto claramente dictamine otra cosa. En esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones que se presentan más adelante, se hará referencia a una cantidad de términos que serán definidos por tener los siguientes significados:

55 Como se utiliza en la presente invención, "alquilo" se refiere a los grupos hidrocarbilo alifáticos saturados monovalentes de cadena recta, ramificada, o cíclica, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, y más

preferiblemente de 1 a 4 átomos de carbono. Este término es ejemplificado por grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, isobutilo, n-butilo, ter-butilo, n-pentilo, y similares.

El término "alquilo lineal" se refiere a un grupo alquilo que no está ramificado.

5 "Alquilo sustituido" se refiere a un grupo alquilo que tiene uno o más sustituyentes, con frecuencia de 1 a 4, y de preferencia de 1 a 2 sustituyentes. Los sustituyentes adecuados para los grupos alquilo se seleccionan a partir del grupo que consiste de alcoxi sustituido o no sustituido, acilo sustituido o no sustituido, acilamino sustituido o no sustituido, aciloxi sustituido o no sustituido, amino sustituido o no sustituido, amino acilo sustituido o no sustituido, arilo, arilo sustituido, ariloxi, ariloxi sustituido, ciano, halógeno, hidroxilo, nitro, carboxilo, oxo, hidroximi-  
10 C1 - C4 alcoxi-imino-carboxilo sustituidos o no sustituidos, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, espiro-cicloalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, -SO<sub>2</sub>-alquilo, -SO<sub>2</sub>-alquilo sustituido, en donde dichos sustituyentes se definen en la presente invención. Los sustituyentes preferidos para los grupos alquilo incluyen alcoxi, hidroxilo, halógeno que es de preferencia F o Cl, ciano, oxo, amino sustituido o no sustituido, aciloxi sustituido o no sustituido, y acilamino sustituido o no sustituido.

15 El término "haloalquilo" se refiere a un grupo alquilo en donde cuando menos un átomo de hidrógeno es reemplazado con un átomo de halógeno. En una forma de realización, el término se refiere a fluorometilo, difluorometilo o trifluorometilo, y similares.

El término "hidroxialquilo" se refiere a un grupo alquilo en donde cuando menos un átomo de hidrógeno es reemplazado con un grupo hidroxilo. En una forma de realización, el término se refiere a hidroximetilo, 1 o 2- hidroxietilo, 1, 2, o 3-hidroxipropilo, y similares.

20 "Alquilenos" se refiere a grupos hidrocarbilo alifáticos saturados divalentes que tienen de preferencia de 1 a 5, y de una manera mas preferible de 1 a 3 átomos de carbono, los cuales son de cadena recta o ramificada. Este término es ejemplificado por grupos tales como metileno (-CH<sub>2</sub>-), etileno (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), n-propileno (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), isopropileno (-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)-) y similares. "Alquilenos sustituidos" se refiere a un grupo alquilenos que tiene uno o más  
25 sustituyentes, de preferencia de 1 a 4, y de una manera muy preferible de 1 a 2 sustituyentes seleccionados a partir de los sustituyentes adecuados para los grupos alquilo.

"Alcoxi" se refiere al grupo "alquil-O-" el cual incluye, a manera de ejemplo, metoxi, etoxi, n-propoxi, iso-propoxi, n-butoxi, ter-butoxi, sec-butoxi, n-pentoxi y similares.

"Alcoxi sustituido" se refiere al grupo "alquil-O- sustituido".

30 "Acilo" se refiere a los grupos H-C(O)-, alquil-C(O)-, alquil-C(O)- sustituido, alquenil-C(O)-, alquenil-C(O)- sustituido, alquiniil-C(O)-, alquiniil-C(O)- sustituido, cicloalquil-C(O)-, cicloalquil-C(O)- sustituido, aril-C(O)-, aril-C(O)- sustituido, heteroaril-C(O)-, heteroaril-C(O)- sustituido, heterocíclico-C(O)-, y heterocíclico-C(O)- sustituido, en donde alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido son como se definen en la presente invención.

35 "Aminoacilo" se refiere al grupo -C(O)NRR en donde cada R se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, y heterocíclico sustituido, y en donde dos grupos R se pueden unir para formar, junto con el átomo de nitrógeno con el que están unidos, un anillo heterocíclico o heterocíclico sustituido; en donde alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido son como se definen en la presente invención. En donde dos grupos R se unen para formar un anillo, con frecuencia es un anillo de 5 a 6 miembros que está  
40 opcionalmente sustituido como se permite de acuerdo con los sustituyentes que pueden estar sobre los grupos R; con frecuencia se seleccionan a partir de pirrolidina, piperidina, morfolina, tiomorfolina, y piperazina.

45 "Aciloxi" se refiere a los grupos alquil-C(O)O-, alquil-C(O)O- sustituido, alquenil-C(O)O-, alquenil-C(O)O- sustituido, alquiniil-C(O)O-, alquiniil-C(O)O- sustituido, aril-C(O)O-, aril-C(O)O- sustituido, cicloalquil-C(O)O-, cicloalquil-C(O)O- sustituido, heteroaril-C(O)O-, heteroaril-C(O)O- sustituido, heterocíclico-C(O)O-, y heterocíclico-C(O)O- sustituido, en donde alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido son como  
50 se definen en la presente invención.

"Oxiacilo" o "carboxil éster" se refieren a los grupos -C(O)O-alquilo, -C(O)O-alquilo sustituido, -C(O)O-alquenilo, -C(O)O-alquenilo sustituido, -C(O)O-alquinilo, -C(O)O-alquinilo sustituido, -C(O)O-arilo, -C(O)O-arilo sustituido, -

C(O)O-cicloalquilo, -C(O)O-cicloalquilo sustituido, -C(O)O-heteroarilo, -C(O)O-heteroarilo sustituido, -C(O)O-heterocíclico, y -C(O)O-heterocíclico sustituido, en donde alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido son como se definen en la presente invención.

5 "Alquenilo" se refiere a los grupos alquenilo que tienen de 2 a 6 átomos de carbono, y de preferencia de 2 a 4 átomos de carbono, y que tienen cuando menos 1, y de preferencia de 1 a 2 sitios de insaturación de alquenilo. Estos grupos son ejemplificados por vinilo, alilo, but-3-en-1-ilo, y similares.

10 "Alquenilo sustituido" se refiere a los grupos alquenilo que tienen uno o más, de preferencia de 1 a 4 sustituyentes, y de una manera muy preferible 1 a 2 sustituyentes. Los sustituyentes adecuados incluyen aquéllos descritos para los grupos alquilo en la presente invención.

"Alquinilo" se refiere a los grupos alquinilo que tienen de 2 a 6 átomos de carbono, y de preferencia de 2 a 3 átomos de carbono, y que tienen cuando menos 1, y de preferencia de 1 a 2 sitios de insaturación de alquinilo.

15 "Alquinilo sustituido" se refiere a los grupos alquinilo que tienen uno o más, de preferencia de 1 a 4 sustituyentes, y de una manera muy preferible de 1 a 2 sustituyentes. Los sustituyentes adecuados incluyen aquéllos descritos como sustituyentes para los grupos alquilo en la presente invención. "Ciano" se refiere al grupo -CN.

"Amino" se refiere al grupo -NH<sub>2</sub>.

20 "Amino sustituido" se refiere al grupo -NR'R", en donde R' y R" se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, -SO<sub>2</sub>-alquilo, -SO<sub>2</sub>-alquilo sustituido, y en donde R' y R" se unen opcionalmente, junto con el átomo de nitrógeno enlazado a los mismos, para formar un grupo heterocíclico o heterocíclico sustituido; en el entendido de que R' y R" no son ambos hidrógeno. Cuando R' es hidrógeno y R" es alquilo, el grupo amino sustituido algunas veces es denominado en la presente invención como alquilamino. Cuando R' y R" son alquilo, el grupo amino sustituido algunas veces es denominado en la presente invención como dialquilamino. Cuando se hace referencia a un amino monosustituido, esto significa que ya sea R' o R" es hidrógeno pero no ambos. Cuando se hace referencia a un amino disustituido, esto significa que ni R' ni R" es hidrógeno.

30 "Acilamino" se refiere a los grupos -NRC(O)alquilo, -NRC(O)-alquilo sustituido, NRC(O)cicloalquilo, NRC(O)cicloalquilo sustituido, -NRC(O)alquenilo, -NRC(O)alquenilo sustituido, -NRC(O)alquinilo, NRC(O)alquinilo sustituido, -NRC(O)arilo, -NRC(O)arilo sustituido, -NRC(O)heteroarilo, -NRC(O)heteroarilo sustituido, -NRC(O)-heterocíclico, y -NRC(O)-heterocíclico sustituido, en donde R es hidrógeno o alquilo, y en donde alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido son como se definen en la presente invención.

"Nitro" se refiere al grupo -NO<sub>2</sub>.

35 "Ciano" se refiere al grupo -CN.

40 "Arilo" o "Ar" se refiere a un grupo carbocíclico aromático monovalente de 6 a 14 átomos de carbono, que tiene un solo anillo (por ejemplo, fenilo) o múltiples anillos condensados (por ejemplo, naftilo o antrilo), en donde los anillos condensados pueden o no ser aromáticos (por ejemplo, 2-benzoxazolinona, 2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-on-7-ilo, y similares), en el entendido de que el punto de unión está en un átomo de carbono aromático. Los arilos preferidos incluyen fenilo y naftilo.

45 "Arilo sustituido" se refiere a los grupos arilo que están sustituidos con uno o más, de preferencia de 1 a 3 sustituyentes, y de una manera muy preferible de 1 a 2 sustituyentes. Los sustituyentes adecuados incluyen hidroxilo, acilo, acilamino, aciloxi, alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, amino, amino sustituido, aminoacilo, arilo, arilo sustituido, ariloxi, ariloxi sustituido, carboxilo, carboxil ésteres, ciano, tiol, tioalquilo, tioalquilo sustituido, tioarilo, tioarilo sustituido, heterotioarilo, heterotioarilo sustituido, tiocicloalquilo, tiocicloalquilo sustituido, tiorheterocíclico, tiorheterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, halógeno, nitro, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, heteroariloxi, heteroariloxi sustituido, heterociclioxi, heterociclioxi sustituido, amino sulfonilo (NH<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>-), y amino sulfonilo sustituido.

50 "Arioxi" se refiere al grupo aril-O- que incluye, a manera de ejemplo, fenoxi, naftoxi, y similares.

"Arioxi sustituido" se refiere a los grupos aril-O- sustituidos.

"Bencilo" se refiere al grupo -CH<sub>2</sub>-fenilo.

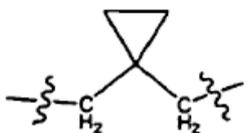
"Arimetilo" se refiere al grupo -CH<sub>2</sub>-arilo.

"Carboxilo" se refiere a -COOH o sales del mismo.

- 5 "Carboxil éster" se refiere a un grupo que tiene la fórmula -COOR, en donde R es alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, arilalquilo, o heteroarilalquilo. Con frecuencia, R es un grupo alquilo C1 - C4 opcionalmente sustituido, tal como metilo, etilo, isopropilo, o metoxietilo.

"Cicloalquilo" se refiere a grupos alquilo cíclicos de 3 a 10 átomos de carbono que tienen anillos cíclicos individuales o múltiples, incluyendo, a manera de ejemplo, adamantilo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclooctilo y similares.

- 10 "Espirocicloalquilo" se refiere a grupos cíclicos de 3 a 10 átomos de carbono, que tienen un anillo de cicloalquilo con una unión espiro (la unión formada por un solo átomo, que es el único miembro común de los anillos) como se ejemplifica mediante la siguiente estructura, en donde las dos valencias abiertas se conectan entre sí para formar un anillo:



- 15 "Cicloalquilo sustituido" se refiere a un grupo cicloalquilo, que tiene de 1 a 5 sustituyentes seleccionados a partir del grupo que consiste de alquilo, alquilo sustituido, oxo (=O), tioxo (=S), alcoxi, alcoxi sustituido, acilo, acilamino, aciloxi, amino, amino sustituido, aminoacilo, arilo, arilo sustituido, arioxi, arioxi sustituido, ciano, halógeno, hidroxilo, nitro, carboxilo, carboxil ésteres, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, y heterocíclico sustituido.

- 20 "Halo" o "halógeno" se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo, y de preferencia es flúor o cloro.

"Hidroxi" se refiere al grupo -OH.

"Oxo" se refiere al grupo =O.

- 25 "Heteroarilo" se refiere a un grupo aromático que tiene de 5 a 10 átomos en el anillo, incluyendo de 1 a 4 heteroátomos seleccionados a partir del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre como miembros del anillo. Estos grupos heteroarilo pueden tener un solo anillo (por ejemplo, piridinilo o furilo) o múltiples anillos condensados (por ejemplo, indolizínilo o benzotienilo), en donde los anillos condensados pueden o no ser aromáticos y/o contener un heteroátomo, en el entendido de que el punto de unión es a través de un átomo del grupo heteroarilo aromático. En una forma de realización, el(los) átomo(s) de nitrógeno y/o de azufre del anillo del grupo heteroarilo están opcionalmente oxidados, para proporcionar las fracciones N-óxido (N → O) sulfinilo o sulfonilo. Los heteroarilos preferidos incluyen piridinilo, pirrolilo, indolilo, tiofenilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, imidazolilo, triazolilo, y furanilo.

- 30 "Heteroarilo sustituido" se refiere a los grupos heteroarilo que están sustituidos con de 1 a 3 sustituyentes, de preferencia 1 o 2 sustituyentes, seleccionados a partir del mismo grupo de sustituyentes definidos para arilo sustituido.

- 35 "Heteroarilo que contiene nitrógeno" y "heteroarilo sustituido que contiene nitrógeno" se refieren a los grupos heteroarilo y a los grupos heteroarilo sustituido que comprenden cuando menos un átomo de nitrógeno del anillo, y que comprenden opcionalmente otros heteroátomos tales como azufre, nitrógeno, u oxígeno, y similares como miembros del anillo.

- 40 "Heteroariloxi" se refiere al grupo -O-heteroarilo, y "heteroariloxi sustituido" se refiere al grupo -O-heteroarilo sustituido, en donde heteroarilo y heteroarilo sustituido son como se definen en la presente invención.

"Heterociclo" o "heterocíclico" o "heterocicloalquilo" o "heterociclilo" se refieren a un grupo saturado o insaturado que tiene un solo anillo o múltiples anillos condensados, incluyendo sistemas anulares espiro, fusionados, unidos a

- través de un puente o espiro, de 3 a 10 átomos por anillo, incluyendo de 1 a 4 heteroátomos seleccionados a partir del grupo que consiste en nitrógeno, azufre y oxígeno como miembros del anillo; en los sistemas de anillos fusionados, uno o más de los anillos pueden ser cicloalquilo, arilo o heteroarilo, en el entendido de que el punto de unión es a través del anillo heterocíclico. En una forma de realización, los átomos de nitrógeno y/o de azufre del grupo heterocíclico están opcionalmente oxidados para proporcionar las fracciones de N-óxido, sulfínico, sulfónico.
- 5 "Heterocíclico sustituido" o "heterocicloalquilo sustituido" o "heterociclilo sustituido" se refiere a los grupos heterocíclicos que están sustituidos con uno o más, y de preferencia de 1 a 3 sustituyentes, seleccionados a partir de los sustituyentes descritos en la presente invención. Los sustituyentes adecuados incluyen aquéllos descritos en la presente invención para los grupos alquilo y cicloalquilo.
- 10 Los ejemplos de heterociclilos y heteroarilos incluyen, pero no se limitan a, azetidina, pirrol, imidazol, pirazol, piridina, pirazina, pirimidina, piridazina, indolizina, isoindol, indol, dihidroindol, indazol, purina, quinolizina, isoquinolina, quinolina, ftalazina, naftilpiridina, quinoxalina, quinazolina, quinolina, pteridina, carbazol, carbolina, fenantridina, acridina, fenantrolina, isotiazol, fenazina, isoxazol, fenoxazina, fenotiazina, imidazolidina, imidazolina, piperidina, piperazina, indolina, ftalimida, 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina, 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]-tiofeno, tiazol, tiazolidina, tiofeno, benzo[b]tiofeno, morfolinilo, tiomorfolinilo (también denominado como tiomorfolinilo), 1,1-dioxo-  
15 tiomorfolinilo, piperidinilo, pirrolidina, tetrahidrofuranilo, y similares.
- "Heterocíclico que contiene nitrógeno" y "heterocíclico sustituido que contiene nitrógeno" se refieren a los grupos heterocíclicos y a los grupos heterocíclicos sustituidos que comprenden cuando menos un átomo de nitrógeno del anillo, y que comprenden opcionalmente otros heteroátomos como átomos del anillo seleccionados a partir de azufre, oxígeno y similares.
- 20 "Tiol" se refiere al grupo -SH.
- "Alquiltio" o "tioalcoxi" se refieren al grupo -S-alquilo.
- "Alquiltio sustituido" o "tioalcoxi sustituido" se refieren al grupo -S-alquilo sustituido.
- "Arlitio" se refiere al grupo -S-arilo, en donde arilo se definió anteriormente.
- 25 "Arlitio sustituido" se refiere al grupo -S-arilo sustituido, en donde arilo sustituido se definió anteriormente.
- "Heteroarilitio" se refiere al grupo -S-heteroarilo, en donde heteroarilo es como se definió anteriormente.
- "Heteroarilitio sustituido" se refiere al grupo -S-heteroarilo sustituido, en donde heteroarilo sustituido se definió anteriormente.
- 30 "Heterocíclicotio" se refiere al grupo -S-heterocíclico, y "heterocíclicotio sustituido" se refiere al grupo -S-heterocíclico sustituido, en donde heterocíclico y heterocíclico sustituido son como se definió anteriormente.
- "Heterocícliciloxi" se refiere al grupo heterocíclicil-O-, y "heterocícliciloxi sustituido" se refiere al grupo heterocíclicil-O-sustituido en donde heterocíclicil y heterocíclicil sustituido son como se definió anteriormente.
- "Cicloalquiltio" se refiere al grupo -S-cicloalquilo, y "cicloalquiltio sustituido" se refiere al grupo -S-cicloalquilo sustituido, en donde cicloalquilo y cicloalquilo sustituido son como se definió anteriormente.
- 35 "Actividad biológica", como se utiliza en la presente invención, se refiere a una concentración inhibidora cuando se prueba en cuando menos uno de los ensayos expuestos en los Ejemplos 1 a 13.
- Como se utiliza en la presente invención, el término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere al ácido o a las sales de metales alcalinotérreos no tóxicos de los compuestos de la fórmulas (II). Estas sales se pueden preparar *in situ* durante el aislamiento y purificación finales de los compuestos de la fórmulas (II), o por haciendo reaccionar por separado las funciones básica o ácida con un ácido o base orgánicos o inorgánicos adecuados, respectivamente. Las sales farmacéuticamente aceptables representativas incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, camforato, camforsulfonato, digluconato, ciclopentanopropionato, dodecil sulfonato, etano sulfonato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, fumarato, hipurato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, nicotinato, 2-naftalenosulfonato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivaloato, propionato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, p-toluenosulfonato, y undecanoato. También, los grupos que contienen nitrógeno básico se pueden cuaternizar con agentes tales como haluros de alquilo, tales como cloruros, bromuros, y yoduros de metilo, etilo, propilo, y butilo; sulfatos de dialquilo tales como
- 40  
45

sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo, y diamilo, haluros de cadena larga, tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo; haluros de arilalquilo como bromuros de bencilo y fenetilo, y otros. De esta forma se obtienen productos solubles o dispersables en agua o en aceite.

5 Ejemplos de los ácidos que se pueden emplear para formar las sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico, y ácidos orgánicos tales como ácido acético, hipúrico, láctico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido metanosulfónico, ácido succínico y ácido cítrico. Las sales de adición básica se pueden preparar *in situ* durante el aislamiento y la purificación finales de los compuestos de fórmula (II), o por separado mediante la reacción de fracciones de ácido carboxílico con una base adecuada, tal como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable, o con amoníaco, o con una amina orgánica primaria, secundaria o terciaria. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, cationes basados en los metales alcalinos y alcalinotérreos, tales como las sales de sodio, litio, potasio, calcio, magnesio, aluminio y similares, así como los cationes de amonio, de amonio cuaternario, y de amina, incluyendo, pero sin limitarse a, amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina, y similares. Otras aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición básica incluyen dietilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina y similares.

20 Como se utiliza en la presente invención, el término "éster farmacéuticamente aceptable" se refiere a ésteres que se hidrolizan *in vivo* e incluyen aquéllos que se descomponen en el cuerpo humano para liberar el compuesto progenitor o una sal del mismo. Los grupos éster adecuados incluyen, por ejemplo, aquéllos derivados a partir de los ácidos carboxílicos alifáticos farmacéuticamente aceptables, en particular los ácidos alcanóico, alquenoico, cicloalcanóico, y alcanodioico, en donde cada fracción alquilo o alquenilo convenientemente no tiene más de 6 átomos de carbono. Los ejemplos representativos de los ésteres particulares incluyen, pero no se limitan a, formatos, acetatos, propionatos, butiratos, acrilatos y etilsuccinatos.

25 El término "profármaco farmacéuticamente aceptable", como se utiliza en la presente invención, se refiere a aquellos profármacos de los compuestos de la presente invención que, dentro del alcance de un buen juicio médico, son adecuados para utilizarse en contacto con los tejidos de los seres humanos y de los animales inferiores sin una indebida toxicidad, irritación, respuesta alérgica, y similares, de una forma adecuada con una relación razonable de beneficio/riesgo, y que son efectivos para el pretendido, así como las formas zwitteriónicas, donde sea posible, de los compuestos de la invención. El término "profármaco" se refiere a los compuestos que se transforman rápidamente *in vivo* para proporcionar el compuesto progenitor de la fórmula anterior, por ejemplo mediante hidrólisis en la sangre. Se proporciona una discusión en T. Higuchi y V. Stella, PRO-DRUGS AS NOVEL DELIVERY SYSTEMS, Volumen 14 de la A.C.S. Symposium Series, y en Edward B. Roche, ed., BIOREVERSIBLE VEHICLES IN DRUG DESIGN, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987.

35 Como se utilizan en la presente invención "agentes contra el cáncer" o "agente para el tratamiento de cáncer" o "compuestos terapéuticos contra el cáncer" se refieren a agentes que incluyen, a manera de ejemplo solamente, los agentes que inducen apoptosis; polinucleótidos (por ejemplo, ribozimas); polipéptidos (por ejemplo, enzimas); fármacos; miméticos biológicos; alcaloides; agentes alquilantes; antibióticos antitumorales; antimetabolitos; hormonas; compuestos de platino; anticuerpos monoclonales; anticuerpos monoclonales conjugados con fármacos contra el cáncer, toxinas, y/o radionúclidos; modificadores de la respuesta biológica (por ejemplo, interferones e interleucinas, etc.); agentes de inmunoterapia adoptiva; factores de crecimiento hematopoyéticos; agentes que inducen la diferenciación de las células tumorales (por ejemplo, ácido retinoico todo trans, etc.); reactivos de terapia genética; reactivos para terapia antisentido y nucleótidos; vacunas tumorales; inhibidores de angiogénesis, y similares. Otros numerosos agentes están también dentro de la esfera de una persona capacitada en el arte.

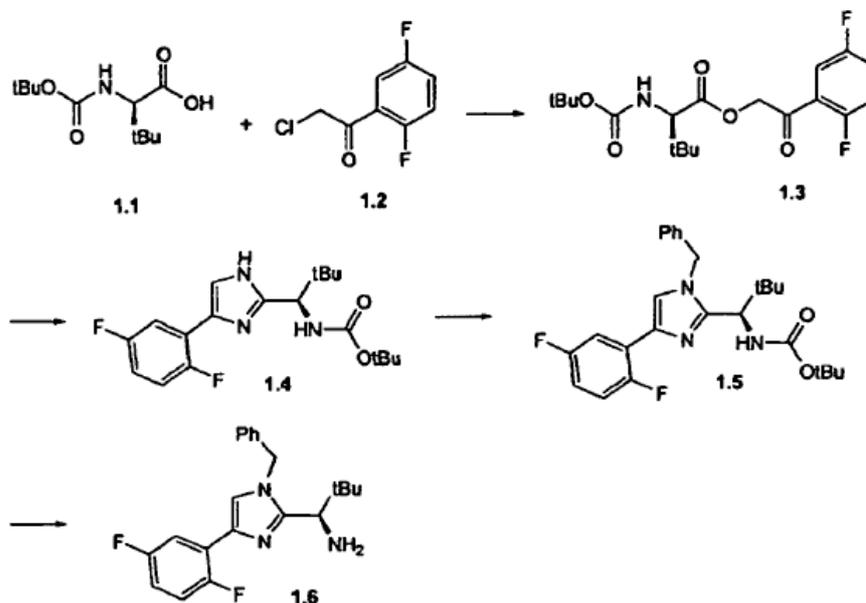
45 Se entiende que en todos los grupos sustituidos definidos anteriormente, no se pretende que los polímeros a los que se llega mediante la definición de los sustituyentes con sustituyentes adicionales para ellos mismos (por ejemplo, arilo sustituido que tiene un grupo arilo sustituido como sustituyente, el cual por sí mismo está sustituido con un grupo arilo sustituido, etc.) se incluyan en la presente invención. En tales casos, el número máximo de estos sustituyentes es de tres. Es decir, que cada una de las definiciones anteriores está restringida por una limitación de las mismas, por ejemplo, los grupos "arilo sustituido" están limitados a arilo sustituido-(arilo sustituido)-arilo sustituido.

De una manera similar, se entiende que las definiciones anteriores no pretenden incluir patrones de sustitución no permisibles (por ejemplo, metilo sustituido con 5 grupos flúor, o un grupo hidroxilo sobre una insaturación etilénica o acetilénica, o un grupo divalente, tal como oxo, sobre un anillo de fenilo). Estos patrones de sustitución no permisibles son bien conocidos por la persona capacitada en el arte.

55 Los compuestos de esta invención pueden exhibir estereoisomerismo en virtud de la presencia de uno o más centros asimétricos o quirales en los compuestos. La presente invención contempla cada uno de los diferentes estereoisómeros y mezclas de los mismos. Algunos de los compuestos de la invención comprenden átomos de

- carbono asimétricamente sustituidos. Estos átomos de carbono asimétricamente sustituidos pueden dar como resultado los compuestos de la invención que comprenden las mezclas de estereoisómeros en un átomo de carbono asimétricamente sustituido particular, o estereoisómeros individuales. Como resultado, se incluyen en la presente invención mezclas racémicas, mezclas de diastereómeros, enantiómeros individuales, así como los diastereómeros individuales de los compuestos de la invención. Los términos configuración "S" y "R", como se utilizan en la presente invención, son como se definen por parte de la IUPAC 1974 "RECOMMENDATIONS FOR SECTION E, FUNDAMENTAL STEREOCHEMISTRY", Pure Appl. Chem. 45: 13 - 30, 1976. Se pueden obtener los enantiómeros deseados mediante síntesis quiral a partir de los materiales de partida quirales comercialmente disponibles, mediante métodos bien conocidos en el arte, o se pueden obtener a partir de las mezclas de enantiómeros, mediante la separación del enantiómero deseado, empleando las técnicas conocidas. Para algunas forma de realización de los compuestos de la fórmula (II), se ilustra un solo isómero para al menos un estereocentro en los compuestos; en donde se ilustra un solo isómero de un estereocentro particular, la estereoquímica relativa absoluta ilustrada es una forma de realización preferida. Donde no se indica una estereoquímica específica, un estereocentro puede estar en la configuración R o S, o puede ser cualquier mezcla de los dos, incluyendo una mezcla racémica.
- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- Los compuestos de esta invención también pueden exhibir isomerismo geométrico. Los isómeros geométricos incluyen las formas cis y trans de los compuestos de la invención que tienen dobles enlaces, tales como las fracciones de alqueno, oxima, imina, o alquilenilo. La presente invención comprende los isómeros geométricos y estereoisómeros individuales, y mezclas de los mismos.
- Los compuestos de la invención se pueden preparar mediante los métodos conocidos en el arte, y además como se describe en la presente invención. Por ejemplo, los métodos para la elaboración de los compuestos de la fórmula (II) se describen en la solicitud publicada PCT/US2005/022062 (publicación internacional número WO O6/002236) y en las solicitudes de patentes de los Estados Unidos correspondientes. En la presente invención se proporcionan ejemplos de métodos adicionales de síntesis aplicables a la preparación de los compuestos de la fórmula (II).
- Un ejemplo de la preparación de ciertos inhibidores de KSP de la Fórmula II, se muestra a continuación, en el Esquema 1.

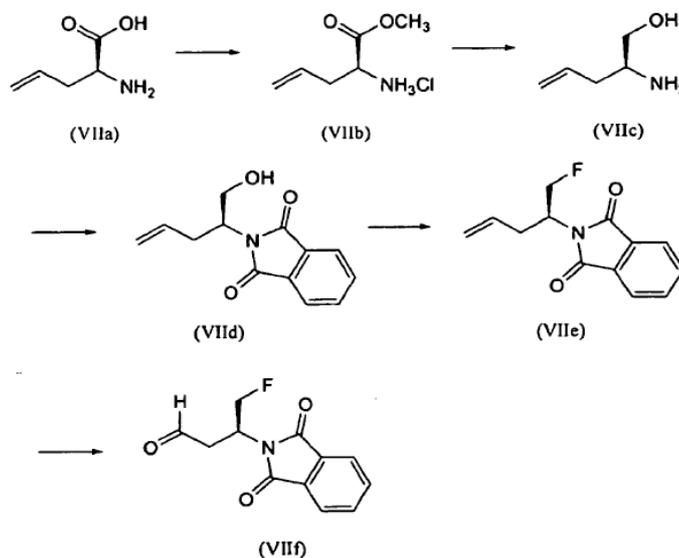
## ESQUEMA 1



- 5 Los compuestos 1.1 y 1.2 se hicieron reaccionar con  $K_2CO_3$  en acetona que contenía KI. Se encontró que el uso de  $K_2CO_3$  / acetona es superior a  $Cs_2CO_3$  / etanol, debido al menor costo del  $K_2CO_3$  y debido a que el compuesto 1.3 se precipitó a partir de la solución de acetona después de la adición de agua, eliminando la necesidad de un procesamiento de la fracción acuosa para la extracción del 1.3. Se sometió luego a reflujo el ceto éster 1.3 con acetato de amonio ( $NH_4OAc$ ) en tolueno, para producir el imidazol 1.4. Se encontró que el uso de tolueno produce mayores rendimientos del imidazol en comparación con el reflujo en xilenos con una trampa Dean Stark, debido a que el último método condujo a la remoción del acetato de amonio de la mezcla de reacción en la trampa. La reacción de 1.4 con bromuro de bencilo y  $K_2CO_3$  en dimetil formamida produjo 1.5, el cual se puede precipitar de la solución de la reacción después de la adición de agua. El tratamiento de 1.5 con metanol y cloruro de acetilo produjo la sal de HCl de 1.6, que fue luego convertida en su base libre cuando se tituló con una solución de NaOH / metanol. Se encontró que la formación del 1.6 a partir de 1.1 y 1.2 procedió con un rendimiento del 81% con una alta pureza (> 97%, como se determinó mediante HPLC) y una alta pureza óptica (>99% de exceso enantiomérico).

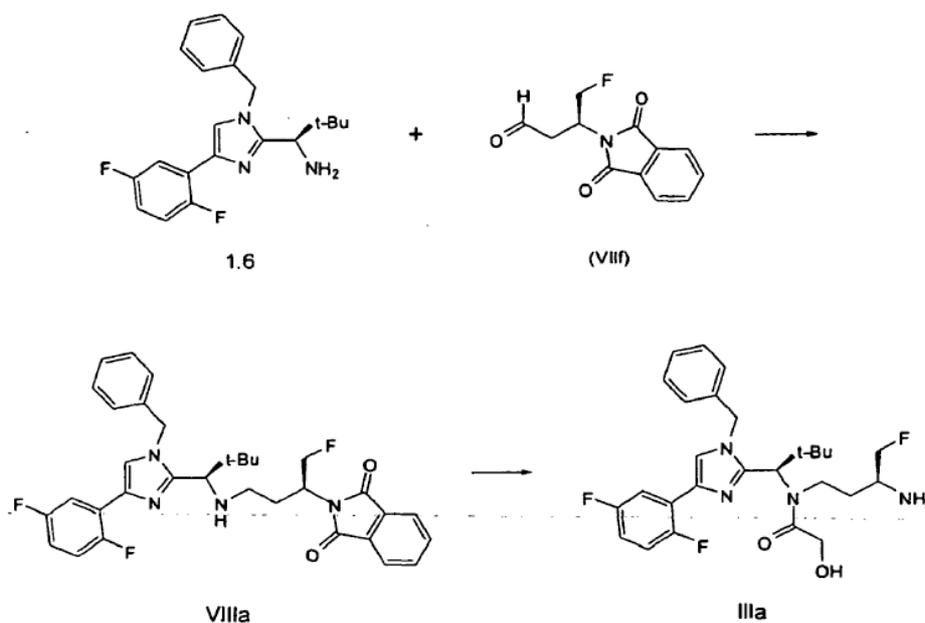
20 Se puede hacer reaccionar el compuesto 1.6 con un aldehído  $HC(O)R^b$  bajo condiciones de aminación reductiva, o con  $Y-R^b$ , en donde Y es un grupo saliente, para introducir un grupo alquilo sobre el nitrógeno de la amina, que luego se puede acilar para proporcionar los compuestos de fórmula (II). El Esquema 2 ilustra la preparación de un aldehído que se puede utilizar en la etapa de aminación reductiva para preparar los compuestos de la fórmula (II), y en particular los compuestos de fórmula IIa o IIb o IIc.

## ESQUEMA 2



- 5 Después de la aminación reductiva, se utilizan agentes y condiciones de acilación conocidos para acilar la amina secundaria, con el objeto de proporcionar los compuestos de la fórmula (II). El Esquema 3 ilustra la aminación reductiva para proporcionar VIIIa. La acilación de la amina, seguida por la desprotección de la ftalimida y la remoción de un grupo protector sobre el hidroxilo libre, proporcionan el compuesto IIa. Los grupos protectores adecuados para el hidroxilo incluyen, por ejemplo, bencil éteres, que se pueden remover mediante hidrogenólisis, y los carbonatos de alquilo, que se pueden remover selectivamente con reactivos tales como yoduro de trimetilsililo. La masa medida del compuesto IIa, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución, fue de 503,2609 para el ion  $[M+H]^+$ , que es consistente con la fórmula molecular  $C_{27}H_{33}N_4O_2F_3$ .
- 10

## ESQUEMA 3



Este compuesto se caracteriza además por su espectro IR, que tiene bandas de absorción a 3500-2700 (br), 1641, 1591, 1508, 1491, 1162, y 1088  $cm^{-1}$ . Se caracteriza además mediante los siguientes datos de RMN:

20

#	$\delta^1\text{H}$ [ppm]	$n^1\text{H}$	Mult*	#	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm]
1	7,84	1	d	1	172,9
2	7,74	1	m	2**	158,4
3	7,38	2	t	3**	154,8
4	7,34 - 7,27	4	m	4	144,4
5	7,09	1	m	5	136,7
6	5,71	1	s	6	131,6
7	5,16	2	AB	7	128,5
8	4,65	1	s, ancha	8	127,8
9	4,21	2	AB	9	127,4
10	3,72	2	d, t	10**	123,5
11	3,55	1	t	11**	121,0
12	2,41	1	m	12**	117,2
13	1,43	2	s, ancha	13**	113,6
14	0,96	1	m	14**	112,4
15	0,91	3	s	15**	87,2
16	-0,77	1	m	16	59,9
				17	53,1
				18**	49,1
				19	48,5
				20	41,7
				21	37,1
				22	32,2
				23	27,3

\*Multiplicidad AB (AB cuarteto), b (ancha), d (doblete), dd (doblete de dobletes), m (multiplete), s (singulete), t (triplete),  
\*\*Cambio de punto medio del multiplete acoplado con  $^{19}\text{F}$ ,

5 Observe que la estereoquímica absoluta de los centros quirales en esta molécula se identifica con base en la quiralidad de los materiales de partida o intermedios conocidos. Los datos de HPLC y RMN apoyan la conclusión de que el proceso anterior proporciona el compuesto como un solo isómero.

10 Empleando los mismos métodos, se preparó el compuesto IIc mediante el uso de un agente de acilación alfa-hidroxi quiral conocido. Éste exhibió el espectro de masas esperado para la estructura asignada, incluyendo un ion molecular M+H con  $m/z = 517,3$ , y una HPLC analítica  $R_t = 3,70$  minutos (fase inversa). Los datos de LC/ESI-MS se registraron utilizando un espectrómetro de masas Waters LCT Premier con una fuente de ionización por electroaspersión doble, y un cromatógrafo líquido Agilent 1100. La resolución del sistema de MS fue de aproximadamente 12000 (definición de FWHM). La separación mediante HPLC se llevó a cabo con una velocidad de flujo de 1,0 mL / minuto con un gradiente desde 10% hasta 95% en 2,5 minutos. Se utilizó formato de amonio 10 mM como aditivo modificador en la fase acuosa. Se utilizó la Sulfadimetoxina (Sigma; molécula protonada  $m/z 311,0814$ ) como referencia, y se adquirió a través del canal LockSpray<sup>MR</sup> cada tercer barrido. Se encontró que la precisión de masas del sistema es de < 5 ppm.

20 Los agentes de acilación y ácidos adecuados para la etapa de acilación incluyen haluros de acilo, anhídridos, y ácidos. Las condiciones adecuadas de acoplamiento de amida incluyen el uso de una variedad de reactivos de acoplamiento de amida para formar el enlace amida, tales como las carbodiimidas N,N'-diciclohexil-carbodiimida (DCC), N,N'-diisopropil-carbodiimida (DIPCDI), y 1-etil-3-(3'-dimetilamino)propil-carbodiimida (EDCI). Las carbodiimidas se pueden utilizar junto con aditivos tales como dimetilaminopiridina (DMAP) o benzotriazoles tales como 7-aza-1-hidroxibenzotriazol (HOAt), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), y 6-cloro-1-hidroxibenzotriazol (Cl-HOBt); las condiciones para tales formaciones enlazadas a amida son bien conocidas en el arte.

25 Reactivos de acoplamiento de amida adicionales también incluyen los reactivos basados en uronio y fosfonio. Las sales de uronio incluyen N-óxido de hexafluorofosfato de N-[(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazolo-[4,5-b]-piridin-1-il-metilen]-N-metil-uronio (HATU), N-óxido de hexafluorofosfato de N-[(1H-benzotriazol-1-il)-(dimetilamino)-metilen]-N-metil-uronio (HBTU), N-óxido de hexafluorofosfato de N-[(1H-6-cloro-benzotriazol-1-il)-(dimetilamino)-metilen]-N-metil-uronio (HCTU), N-óxido de tetrafluoroborato de N-[(1H-benzotriazol-1-il)-(dimetilamino)-metilen]-N-metil-uronio (TBTU), y N-óxido de tetrafluoroborato de N-[(1H-6-cloro-benzotriazol-1-il)-(dimetilamino)-metilen]-N-metil-uronio (TCTU). Las sales de fosfonio incluyen hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino)-fosfonio (BOP), hexafluorofosfato de 7-azabenzotriazol-1-il-N-oxi-tris-(pirrolidino)-fosfonio (PyAOP), y hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-N-oxi-tris-(pirrolidino)-fosfonio (PyBOP).

La etapa de formación de amida se puede llevar a cabo en un solvente polar, tal como dimetilformamida (DMF), y también puede incluir una base orgánica, tal como diisopropilietilamina (DIEA) o dimetilaminopiridina (DMAP).

5 Los métodos para la selección, incorporación, y remoción de los grupos protectores adecuados para el hidroxilo durante la preparación de un compuesto de fórmula II son bien conocidos en el arte. Con base en el esquema de reacción anterior, los compuestos de la fórmula II son fácilmente preparados por una persona que tenga una experiencia ordinaria en la materia, que sepa cómo seleccionar materiales de partida adecuados para proporcionar los productos deseados.

10 Un "inhibidor de KSP" es un compuesto que es capaz de inhibir cualquier actividad medible de una proteína de huso de quinesina (KSP). De preferencia, un inhibidor de KSP tiene una IC50 de menos de 100 micromolar, más preferiblemente menos de 10 micromolar, y con frecuencia menos de 1 micromolar.

15 Una "enfermedad proliferativa" incluye cualquier enfermedad o condición que afecte a un vertebrado, que se caracteriza por células que proliferan en forma excesiva o indeseable. "Un método para el tratamiento de una enfermedad proliferativa", de acuerdo con esta invención, incluye un método para el tratamiento (la inhibición) del crecimiento anormal de células, incluyendo las células transformadas, en un paciente que requiera de dicho tratamiento (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano), mediante la administración, de una manera concurrente o secuencial, de una cantidad efectiva de un inhibidor de KSP solo o en combinación con una cantidad efectiva de un agente quimioterapéutico y/o de radiación. El crecimiento anormal de células significa un crecimiento de células independiente de los mecanismos reguladores normales (por ejemplo, pérdida de inhibición por contacto), incluyendo el crecimiento anormal de células tumorales o de células benignas o malignas de otras enfermedades proliferativas.

20 Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren, o describen, la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado.

25 "Tumor", como se utiliza en la presente invención, se refiere a todo el crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sea malignas o benignas, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. El término "tumor sólido" se refiere a un cáncer o carcinoma de los tejidos corporales diferentes de la sangre, médula ósea, y sistema linfático. Los ejemplos de tumores sólidos pueden ser, pero no se limitan a, carcinoma de pulmón, carcinoma de mama, carcinoma de ovario, carcinoma de piel, carcinoma de colon, carcinoma de vejiga urinaria, carcinoma de hígado, carcinoma gástrico, cáncer de próstata, cáncer pancreático, carcinoma de células renales, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma de células escamosas, carcinoma papilar de tiroides, carcinoma cervical, carcinoma pulmonar de células pequeñas, carcinoma pulmonar de células no pequeñas, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, y sarcomas.

35 Como se utiliza en la presente invención, el término "cáncer hematológico" se refiere a un cáncer de la sangre, e incluye leucemia y trastornos linfoproliferativos malignos, entre otros. "Leucemia" se refiere a un cáncer de la sangre, en donde se elaboran demasiados glóbulos blancos o glóbulos rojos sanguíneos, y, por consiguiente, inundan las otras partes que conforman la sangre, tales como las plaquetas y los glóbulos rojos sanguíneos normales. Se entiende que los casos de leucemia se clasifican como agudos o crónicos. Las células cancerosas en las leucemias agudas se bloquean en una etapa inmadura, y no obstante, continúan multiplicándose. En consecuencia, hay una gran acumulación de células inmaduras no funcionales, y la pérdida concomitante de células funcionales. Las leucemias crónicas progresan más lentamente, desarrollándose las células cancerosas hasta la madurez total. Adicionalmente, los glóbulos blancos pueden ser mielógenos o linfocitos. Por consiguiente, ciertas formas de leucemia pueden ser, a manera de ejemplo, leucemia linfocítica (o linfoblástica) aguda (LLA); leucemia mielógena aguda (LMA); leucemia linfocítica crónica (LLC); o leucemia mielógena crónica (LMC); y síndrome mielodisplásico. "Trastornos linfoproliferativos malignos" pueden referirse a un linfoma, tal como linfoma de Hodgkin, y linfoma no Hodgkin, o mieloma múltiple, entre otros.

45 Algunos tumores descritos en la presente invención pueden ser resistentes a diversos agentes terapéuticos. 'Resistente' significa que el cáncer no es sustancialmente afectado por un agente terapéutico en sus tasas de administración normales, o en tasas que son toleradas por el paciente. Una forma mayor de resistencia contra una variedad de agentes antineoplásicos involucra la función de un grupo de bombas de proteína de membrana que extruden estas moléculas citotóxicas. Las "bombas resistentes a múltiples fármacos" pueden referirse a la superfamilia de las proteínas de Casete de Enlazamiento de ATP (ABC), presentes en los organismos desde las bacterias hasta los seres humanos. Las bombas transportadoras de ABC se localizan en la membrana plasmática de las células, o en la membrana de diferentes organelos celulares, y median la translocalización de diferentes moléculas a través de estas barreras. La mayoría de las bombas de ABC utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para esta actividad de transporte (transportadores activos), pero algunas bombas forman canales de membrana específicos.

55 Numerosos estudios clínicos han revelado que el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos en los tumores está asociado con la sobreexpresión de ciertas bombas de ABC, denominadas como proteínas resistentes a múltiples

- fármacos (MDR). La resistencia a múltiples fármacos mediada por la glicoproteína P (denominada como P-gp, MDR1 o ABCB1), fue la primera que se descubrió (Juliano, R. L. y Ung, V., *Biochim. Biophys. Acta*, 455, 152 - 162 (1976); Chen, D. y colaboradores, *Cell*, 47, 381 - 389 (1986); Ueda, K. y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84, 3004 - 3008 (1987)), y probablemente todavía es el mecanismo más ampliamente observado en la resistencia clínica a múltiples fármacos (Endicott, J. A. y Ling, V., *Annu. Rev. Biochem.*, 58, 137 - 171 (1989); Higgins, C. E, *Ann. Rev. Cell Biol.*, 8, 67 - 113 (1992); Gottesman, M. M. y Pastan, I., *Annu. Rev. Biochem.*, 62, 385 - 427 (1993); Gottesman, M. M. y colaboradores, *Nat. Rev. Cancer*, 2, 48 - 58 (2002)). Existen otras dos bombas de ABC, que han demostrado participar en la resistencia a múltiples fármacos de los tumores: la proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 (MRP1, ABCC1), y la proteína de resistencia a la mitoxantrona (MXR/BCRP, ABC G2) ((Gottesman, M. M. *ibid*, Cole, S.P.c. y colaboradores, *Science*, 258, 1650 - 1654 (1992); Borst, P. y colaboradores, *J. Natl. Cancer. Inst.*, 92, 1295 - 1302 (2000); Deeley, R. G. y Cole, S.P.c., *Sem. Cancer Bio I.*, 8, 193 - 204 (1997); Litman, I y colaboradores, *Cell. Mol. Life Sci.*, 58, 931 - 959 (2001)). Adicionalmente, otras bombas de ABC humanas capaces de transportar activamente diferentes compuestos hacia fuera de las células, también pueden hacer parte en casos seleccionados de resistencia a múltiples fármacos. Éstas incluyen ABCB4 (MDR3) y ABCB11 (P-gp hermana o BSEP), dos bombas que residen predominantemente en el hígado, con una función involucrada en la secreción de fosfatidil colina y ácidos biliares, respectivamente (Lecureur, V. y colaboradores, *Toxicol.*, 152, 203 - 219 (2000); Paulusma, c.c. y colaboradores, *Science*, 271, 1126 - 1128 (1996); Paulusma, c. c. y colaboradores, *Hepatology*, 25, 1539 - 1542 (1997)). Se ha demostrado que la MDR3 transporta ciertos fármacos también (Smith, A. J. y colaboradores, *J. Bio. Chem.*, 275, 23530 - 23539 (2000)). Además de MRP1, se han clonado cinco homólogos (MRP2 - MRP6). Definitivamente se demostró que la sobreexpresión de MRP2 (un transportador orgánico de aniones que también puede extrudir los compuestos hidrófobos) confiere el cáncer MDR9 (Kool, M y colaboradores, *Cancer Res*, 57, 3537 - 3547 (1997)). MRP3, una bomba transportadora del conjugado orgánico, y MRP5, una bomba transportadora de nucleósidos, también son proteínas candidatas para causar ciertas formas de resistencia a fármacos (Borst, P. y colaboradores, *ibid.*).
- 25 "Anticuerpos" e "inmunoglobulinas" (Ig) son glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Aunque los anticuerpos exhiben especificidad de enlace con un antígeno, las inmunoglobulinas incluyen tanto los anticuerpos como otras moléculas de tipo anticuerpo que carecen de especificidad de antígeno. Por ejemplo, los polipéptidos de la última clase son producidos en bajos niveles por el sistema linfático, y en mayores niveles por los mielomas.
- 30 La palabra "marcador" cuando se utiliza en la presente invención, se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directamente o indirectamente con el anticuerpo para generar un anticuerpo "marcado". El marcador puede ser detectable por si mismo (por ejemplo, marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que sea detectable. Los radionúclidos que pueden servir como marcadores detectables incluyen, por ejemplo, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212, y Pd-109. El marcador también puede ser una entidad no radioactiva, tal como una toxina que sea detectable por sus actividades biológica o bioquímica.
- 40 El término "antagonista" se utiliza en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que bloquea, inhibe, o neutraliza parcial o completamente una actividad biológica de un objetivo nativo dado a conocer en la presente invención o la transcripción o traducción del mismo.
- 45 "Portadores", como se utilizan en la presente invención, incluyen portadores, excipientes, o estabilizantes farmacéuticamente aceptables, que no son tóxicos para la célula o mamífero que están siendo expuestos a los mismos en las dosificaciones y concentraciones empleadas. Con frecuencia, el portador fisiológicamente aceptable es una solución acuosa con el pH regulado. Los ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables comprenden reguladores tales como fosfato, citrato, succinato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol; contra iones formadores de sales, tales como sodio; y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEEN, polietilén glicol (PEG), y Pluronic. La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden. De preferencia, los agentes terapéuticos que se van a combinar en tales métodos están ambos presentes en niveles terapéuticamente relevantes de una manera simultánea en el cuerpo del sujeto tratado.
- 55 Una "célula huésped", como se utiliza en la presente invención, se refiere a un microorganismo o a una célula eucariota o a una línea celular cultivada como una entidad unicelular que se puede utilizar, o que se ha utilizado, como un receptor para un vector recombinante o para otros polinucleótidos de transferencia, e incluye la progenie de la célula original que se ha transfectado. Se entiende que la progenie de una sola célula no necesariamente puede

ser completamente idéntica en la morfología o en el complemento genómico o de ADN total a la progenitora original, debido a mutaciones naturales, accidentales, o deliberadas.

5 “Tratamiento” se define en la presente invención como la aplicación o administración de un inhibidor de KSP a un sujeto, o la aplicación o administración de un inhibidor de KSP a un tejido aislado o a una línea celular de un sujeto, en donde el sujeto tiene un tumor sólido o cáncer hematológico, un síntoma asociado con un tumor sólido o cáncer hematológico, o una predisposición hacia el desarrollo de un tumor sólido o cáncer hematológico, en donde el propósito es sanar, curar, aliviar, liberar, alterar, remediar, aminorar, mejorar, o afectar el tumor sólido o el cáncer hematológico, cualquier de los síntomas asociados al tumor sólido o al cáncer hematológico, o la predisposición hacia el desarrollo del tumor sólido o cáncer hematológico. El sujeto puede ser un mamífero, y en algunas formas de  
10 realización, el sujeto es un ser humano. Con frecuencia, el sujeto es un ser humano que ha sido diagnosticado con cuando menos una de las condiciones descritas en la presente invención como adecuadas para el tratamiento con los compuestos y métodos de la invención. En las forma de realización específicas, el sujeto puede ser uno que tenga un cáncer que exprese una bomba de flujo de salida que promueva la resistencia a fármacos, tal como P-gp, o el sujeto puede ser uno que tenga un tumor que haya demostrado resistencia a fármacos como paclitaxel o SB-  
15 715992.

Por “tratamiento” también se entiende la aplicación o administración de una composición farmacéutica que comprende al inhibidor de KSP a un sujeto, o la aplicación o administración de una composición farmacéutica que comprende al inhibidor de KSP a un tejido aislado o a una línea celular de un sujeto, que tenga un tumor sólido o  
20 cáncer hematológico, un síntoma asociado con un tumor sólido o cáncer hematológico, o una predisposición hacia el desarrollo de un tumor sólido o cáncer hematológico, en donde el propósito es sanar, curar, aliviar, liberar, alterar, remediar, aminorar, mejorar, o afectar el tumor sólido o el cáncer hematológico, cualquiera de los síntomas asociados del tumor sólido o del cáncer hematológico, o la predisposición hacia el desarrollo del tumor sólido o cáncer hematológico.

Por “actividad antitumoral” se entiende una reducción en el índice de proliferación o acumulación de células malignas, y por consiguiente, una declinación en el índice de crecimiento de un tumor existente o en un tumor que se presente durante la terapia, y/o la destrucción de células neoplásicas (tumoraes) existentes o de células neoplásicas recién formadas, y por consiguiente, una disminución en el tamaño global de un tumor durante la terapia. La terapia con al menos un inhibidor de KSP provoca una respuesta fisiológica que es benéfica con respecto al tratamiento de tumores sólidos en un ser humano. La terapia con al menos un inhibidor de KSP provoca una  
25 respuesta fisiológica que es benéfica con respecto al tratamiento de tumores hematológicos en un ser humano. Se reconoce que los métodos de la invención pueden ser útiles en la prevención de crecimientos tumorales adicionales que se presenten durante la terapia.

De acuerdo con los métodos de la presente invención, se utiliza al menos un inhibidor de KSP, como se define en cualquier otra parte de la presente invención, para promover una respuesta terapéutica positiva con respecto a un tumor sólido o cáncer hematológico. Por “respuesta terapéutica positiva” con respecto al tratamiento de cáncer, se entiende una mejora en la enfermedad en asociación con la actividad contra el cáncer de estos anticuerpos o fragmentos de los mismos, y/o una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad. Es decir, se puede observar un efecto antiproliferativo, la prevención de otros crecimientos tumorales, una reducción en el tamaño del tumor, una reducción en el número de células cancerosas, y/o una disminución en uno o más síntomas mediados por el estímulo de las células cancerosas. Por consiguiente, por ejemplo, una mejora en la enfermedad se puede caracterizar como una respuesta completa. Por “respuesta completa” se entiende una ausencia de enfermedad clínicamente detectable, con normalización de cualesquiera de los estudios radiográficos previamente anormales, de médula ósea, y de fluido cerebroespinal (FCE). Esta respuesta debe persistir durante al menos un mes después del tratamiento, de acuerdo con los métodos de la invención. Alternativamente, una mejora en la enfermedad se puede categorizar como una respuesta parcial. Por “respuesta parcial” se entiende al menos una disminución de aproximadamente el 50% en toda la carga tumoral medible (es decir, el número de células tumorales presentes en el sujeto), en ausencia de nuevas lesiones, y que persiste durante cuando menos un mes. Esta respuesta es aplicable a los tumores medibles solamente.  
35  
40  
45

Se puede evaluar la respuesta del tumor por los cambios en la morfología del tumor (es decir, carga tumoral global, tamaño del tumor, y similares), empleando técnicas de cribado, tales como exploración con formación de imágenes de resonancia magnética (MRI), toma de imágenes radiográficas X, exploración tomográfica computarizada (CT), toma de imágenes bioluminiscentes, por ejemplo, toma de imágenes con luciferasa, toma de imágenes de exploración ósea, y muestreo de biopsia de tumor, incluyendo aspiración de médula ósea (AMO). Además de estas respuestas terapéuticas positivas, el sujeto que se está sometiendo a terapia con el inhibidor de KSP, puede experimentar el efecto benéfico de una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad.  
50  
55

Por “dosis o cantidad terapéuticamente efectiva” o “cantidad efectiva” se entiende una cantidad de inhibidor de KSP que, cuando se administra, provoca una respuesta terapéutica positiva con respecto al tratamiento de un paciente con un tumor sólido o cáncer hematológico. Se reconoce que el método de tratamiento puede comprender una sola

administración de una dosis terapéuticamente efectiva, o múltiples administraciones de una dosis terapéuticamente efectiva del inhibidor.

El gen de la tirosina quinasa Bcr-Abl codifica una proteína de fusión, y es creado por la unión anormal de los genes BCR y ABL. Esta fusión se encuentra sobre el denominado cromosoma Filadelfia, causada por la translocalización recíproca t(9:22) que da como resultado la formación del gen de fusión Bcr-Abl, que provoca una expresión no regulada de la tirosina quinasa ABL. Se considera que la presencia del cromosoma Filadelfia es uno de los factores causantes tanto en LMC como en LLA (Abraham (2007) Community Oncology 4 (1) páginas 11 - 14). En la actualidad, la tirosina quinasa Bcr-Abl es el objetivo para una nueva clase de compuestos terapéuticos inhibidores de Bcr-Abl, tales como imatinib (Gleevec®, Novartis), dasatinib (Sprycel®, Bristol-Myers-Squibb), y nilotinib (AML107, Novartis). La tirosina quinasa Bcr-Abl actúa corriente arriba de la proteína KSP.

En algunas forma de realización preferidas, el inhibidor de KSP se administra en combinación con al menos otro "compuesto activo", el cual puede ser una terapia contra el cáncer, incluyendo, pero sin limitarse a, cirugía, terapia de radiación, quimioterapia, terapia de citoquinas, u otro anticuerpo monoclonal pretendido para uso en el tratamiento del tumor sólido de interés, en donde la terapia adicional contra el cáncer se administra antes, durante, o posteriormente a la terapia inhibidora de KSP, y ambos agentes terapéuticos están presentes en niveles terapéuticos concurrentemente en el sujeto. Por consiguiente, cuando las terapias combinadas comprenden la administración del inhibidor de KSP en combinación con la administración de otro agente terapéutico, como con quimioterapia, terapia de citoquinas, u otro anticuerpo monoclonal, los métodos de la invención abarcan la administración conjunta, la utilización de formulaciones separadas o una sola formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, en donde, de preferencia, hay un período de tiempo en el que ambos (o todos) los agentes activos ejercen de una manera simultánea sus actividades terapéuticas. Cuando los métodos de la presente invención comprenden regímenes terapéuticos combinados, estas terapias se pueden suministrar de una manera simultánea, es decir, el inhibidor de KSP se administra de una manera concurrente, o dentro del mismo marco de tiempo, que la otra terapia contra el cáncer (es decir, las terapias están sucediendo de una manera concurrente, pero el inhibidor de KSP no se administra precisamente al mismo momento que la otra terapia contra el cáncer). Alternativamente, el inhibidor de KSP de la presente invención también se puede administrar antes, o posteriormente a la otra terapia contra el cáncer. La administración en secuencia de las diferentes terapias contra el cáncer se puede llevar a cabo independientemente de si el sujeto tratado responde al primer curso de la terapia para disminuir la posibilidad de remisión o recurrencia.

En algunas forma de realización de la invención, los inhibidores de KSP descritos en la presente invención se administran en combinación con quimioterapia o terapia de citoquinas, en donde el inhibidor de KSP y los agentes quimioterapéuticos o las citoquinas se pueden administrar en secuencia, en cualquier orden, o de una manera simultánea (es decir, concurrentemente o dentro del mismo marco de tiempo). Los ejemplos de los agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, CPT-11 (irinotecano), que se puede utilizar, por ejemplo, en el tratamiento de cáncer colorrectal y de cáncer pulmonar de células no pequeñas; gemcitabina, que se puede utilizar, por ejemplo, en el tratamiento de cáncer de pulmón, cáncer de mama, y cáncer de ovario epitelial; y otros agentes quimioterapéuticos adecuados para el tratamiento de tumores sólidos. Las citoquinas de interés incluyen, pero no se limitan a, interferón alfa, interferón gamma, interleuquina 2 (IL-2), IL-12, IL-15, e IL-21, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), o las variantes biológicamente activas de estas citoquinas.

En otras forma de realización de la invención, los inhibidores de KSP descritos en la presente invención se administran en combinación con anticuerpos monoclonales pretendidos para el tratamiento del tumor sólido. Por consiguiente, por ejemplo, cuando el sujeto se está sometiendo a tratamiento para un cáncer gástrico o de colon, la terapia podría incluir la administración de cantidades efectivas de un inhibidor de KSP descrito en la presente invención, en combinación con la administración de cantidades efectivas de un anticuerpo monoclonal, tal como Erbitux® (también conocido como Cetuximab; ImClone Systems Incorporated, Nueva York, Nueva York, y Bristol Meyers Squibb, Princeton, Nueva Jersey). De una manera similar, cuando el sujeto se está sometiendo a tratamiento para cáncer colorrectal, la terapia podría incluir la administración de cantidades efectivas de un inhibidor de KSP, descrito en la presente invención, en combinación con la administración de cantidades efectivas del anticuerpo monoclonal humanizado Avastina<sup>MR</sup> (también conocido como bevacizumab; Genentech, Inc., San Francisco, California), que se enlaza con, e inhibe, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), una proteína que tiene un papel crítico en la angiogénesis tumoral. De una manera alternativa, en un sujeto que se esté sometiendo al tratamiento para cáncer de mama, la terapia podría incluir la administración de cantidades efectivas de un inhibidor de KSP descrito en la presente invención, en combinación con una cantidad efectiva del anticuerpo monoclonal humanizado Herceptina® (también conocido como trastuzumab; Genentech, Inc., San Francisco, California). Otros ejemplos de anticuerpos monoclonales pretendidos para el tratamiento de tumores sólidos, que se pueden utilizar en combinación con los inhibidores de KSP de la presente invención, incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo anti-EGFR que dirige al receptor del factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo, IMC-C225 (ImClone Systems, Nueva York, Nueva York) (véase, por ejemplo, Mendelsohn y Baselga (2000) Oncogene 19: 6550 - 6565 y Solbach y colaboradores (2002) Int. J. Cancer 101: 390 - 394); un anticuerpo receptor de anti-IGF-1,

que dirige a la proteína receptora de IGF-1 (véase, por ejemplo, Maloney y colaboradores (2003) *Cancer Res.* 63: 5073 - 5083, y Hailey y colaboradores (2002) *Mol. Cancer. Ther.* 1: 1349 - 1353; un anticuerpo anti-MUC I, que se dirige al antígeno asociado con el tumor MUC1; anti- $\alpha 5\beta 1$ , anti- $\alpha v\beta 5$ , y anti- $\alpha v\beta 3$ , que dirigen estas integrinas respectivas, que regulan los procesos de adhesión y señalización celular involucrados en la proliferación y supervivencia celular (véase, por ejemplo, Laidler y colaboradores (2000) *Acta Biochimica Polonica* 47(4): 1159 - 1170, y Cruet-Hennequart y colaboradores (2003) *Oncogene* 22(11): 1688 - 1702), un anticuerpo anti-P-cadherina, que dirige este miembro de la familia de la cadherina (véase, por ejemplo, la solicitud de patente en trámite de los Estados Unidos Número 20030194406); y un anticuerpo anti-VE-cadherina, que dirige la función relacionada angiogénica de esta molécula de adhesión específica de las células endoteliales (véase, por ejemplo, Liao y colaboradores (2002) *Cancer Res.* 62: 2567 - 2557. En las forma de realización preferidas de estas combinaciones, el inhibidor de KSP es un compuesto de Fórmula (II), y puede ser un compuesto de Fórmula IIa, IIb, o IIc.

Los inhibidores de KSP de la invención, y el anticuerpo monoclonal, se pueden administrar en secuencia, en cualquier orden, o de una manera simultánea (es decir, de una manera concurrente o dentro del mismo marco de tiempo). Cuando se administra más de un tipo de anticuerpo monoclonal, los métodos de la presente invención pueden comprender además la exposición a radiación y/o quimioterapia, como sea garantizado para el cáncer que se esté sometiendo a tratamiento, y como sea recomendado por el médico supervisor.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1: Ensayo para determinar la actividad de KSP

Los microtúbulos purificados obtenidos de cerebro bovino se adquirieron a través de Cytoskeleton Inc. (Denver, Colorado, EUA). El dominio motor de la KSP humana (Eg 5, KNSL1) se clonó, se expresó, y se purificó hasta una homogeneidad mayor al 95%. Biomol Green<sup>MR</sup> se adquirió a través de Affinity Research Products Ltd. (Matford Court, Exeter, Devon, Reino Unido). Los microtúbulos y la proteína motora KSP (es decir, el dominio motor de KSP) se diluyeron en regulador de ensayo (Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), MgCl<sub>2</sub> 1 mM, DTT 10 mM, y 0,25 mg / mL de albúmina de suero bovino), hasta una concentración final de 35  $\mu$ g / mL de microtúbulos, y KSP 45 nM. La mezcla de microtúbulos / KSP se incubó previamente luego a 37 °C durante 10 minutos, para promover el enlace de KSP con los microtúbulos.

A cada pozo de la placa de prueba (placa de 384 pozos) que contenía 1,25  $\mu$ L de inhibidor o de compuesto de prueba en sulfóxido de dimetilo (o sulfóxido de dimetilo solamente, en el caso de los controles), se le agregaron 25  $\mu$ L de solución de ATP (ATP diluido hasta una concentración de 300  $\mu$ M en regulador de ensayo), y 25  $\mu$ L de la solución de microtúbulos / KSP anteriormente descrita. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. En seguida de la incubación, se agregaron a cada pozo 65  $\mu$ L de Biomol Green<sup>MR</sup> (un colorante con base en verde de malaquita que detecta la liberación del fosfato inorgánico). Las placas se incubaron durante 5 a 10 minutos adicionales, y luego se determinó la absorbancia a 630 nm, utilizando un lector de placas Victor II. La cantidad de absorbancia a 630 nm correspondió a la cantidad de actividad de KSP en las muestras. La IC<sub>50</sub> de cada inhibidor o compuesto de prueba se determinó luego con base en la disminución en la absorbancia a 630 nm en cada concentración, por medio de regresión no lineal, utilizando ya sea un software de análisis de datos XLFit para Excel, o Prism de GraphPad Software Inc.

Los compuestos preferidos de la invención tienen una actividad biológica, medida por una IC<sub>50</sub> de menos de aproximadamente 1 mM, teniendo las forma de realización preferidas una actividad biológica de menos de aproximadamente 25  $\mu$ M, teniendo las forma de realización particularmente preferidas una actividad biológica de menos de aproximadamente 1.000 nM, y teniendo las forma de realización muy preferidas una actividad biológica de menos de aproximadamente 100 nM. Los compuestos de la Fórmula II se probaron en este ensayo, y se encontró que tienen valores IC<sub>50</sub> por debajo de los límites de cuantificación para este ensayo (el estimado es de 2 - 4 nM).

#### Ejemplo 2: Inhibición de la proliferación celular en líneas celulares tumorales tratadas con el Compuesto IIa

Las líneas celulares utilizadas fueron las siguientes: HCT-116 (National Cancer Institute's DCTF Tumor Repository, catálogo # NCI 502568, Rockville, MD), HCT-15 (National Cancer Institutes DCTF Tumor Repository, catálogo # NCI 502711, Rockville, MD, disponible a través de la American Type Culture Collection, catálogo # CLL-225), KB-3-1 (disponible a través de DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares - Número de Catálogo ACC 158), KB-V1 (disponible a través de DSMZ - Número de Catálogo ACC 149), AGS (disponible a través de la American Type Culture Collection, Manassas VA, Número de Catálogo CRL-1739MR), N87 (disponible a través de la American Type Culture Collection, Manassas VA, Número de Catálogo CRL-5822), HeI92.1.7 (disponible a través de la American Type Culture Collection, Manassas VA, Número de Catálogo TIB 180), K562 (disponible a través de la American Type Culture Collection, Manassas VA, Número de Catálogo CRL-243MR), MV4;11 (American Tissue Culture Collection, Manassas VA, Número de Catálogo CRL-9591), y U937 (disponible a través de la American Type Culture Collection, Manassas VA, Número de Catálogo CRL-1593.2).

Las líneas de células se aplicaron a placas de 96 pozos, con densidades de aproximadamente 500 células por pozo, de una placa de 96 pozos y se dejaron crecer durante 24 horas. Entonces se trataron las células con diferentes concentraciones de los compuestos durante 72 horas. Luego se agregaron 100  $\mu$ L del reactivo CellTiter-Glo® (Promega Corporation). CellTiter-Glo® se utiliza en un método homogéneo de determinación del número de células viables, utilizando el reactivo individual CellTiter-Glo® para detectar ATP (patentes de los Estados Unidos Nos. 6.602.677 y 7.241.584) (véase Promega, Catálogo de producto #G7570). En seguida de la adición del reactivo CellTiter-Glo®, se incubaron las células en la oscuridad durante 30 minutos. Se determinó la cantidad de luminiscencia para cada pozo, utilizando un lector de placas Wallac Trilux, que se correlaciona con el número de células por pozo. El número de células viables en los pozos que reciben solamente DMSO (0,5%) sirvió como una indicación del % de inhibición, mientras que los pozos sin células sirvieron como inhibición del 100% del crecimiento celular. Se determinó gráficamente la concentración del compuesto que dio como resultado una inhibición del crecimiento del 50% (GI50) a partir de las curvas sigmoideas de dosis-respuesta de los valores de las dosis transformados por el log vs los recuentos celulares (porcentaje del control) a las 72 horas de la exposición continua al compuesto. Los datos se presentan más adelante en la Tabla 1. Se observaron amplios efectos anti-proliferativos (valores de GI50 de 0,1 a 6,5 nM) en todas las líneas celulares probadas. Esta amplia actividad es consistente con un compuesto que es un inhibidor mitótico.

Tabla 1 - Actividad antiproliferativa *in vitro* (valores de GI50 en nM) del Compuesto IIa.

Tipo de tumor	Línea celular	GI50 (nM)	# de las pruebas	Tiempo de duplicación (h)
Colon	HCT-116	0,1	4	22
Colon	HCT-15	0,3	9	34
Epidermoide	KB3.1	0,6	15	24
Epidermoide	KB8.5	0,5	16	24
Epidermoide	KBV1	6,5	11	29
Gástrico	AGS	0,2	4	20
Gástrico	N87	1,0	2	47
Leucemia	Hel92.1.7	0,5	4	18
Leucemia	K562	0,1	4	30
Leucemia	MV4-11	0,2	2	36,5
Leucemia	U937	0,1	4	24

La glicoproteína P (P-gp, también conocida como MDR1) es una bomba de flujo de salida que es un transportador de ABC, que media la resistencia a múltiples fármacos contra diferentes fármacos citotóxicos en las células que la expresan. Algunas líneas celulares utilizadas en este estudio (HCT-15, KBV1, y KBV8.5) expresan P-gp, y, como se puede observar en la Tabla 1, estas líneas celulares son sensibles a los inhibidores de KSP de la Fórmula II. El Ejemplo 12 que se encuentra más adelante, demuestra que los compuestos similares de la Fórmula I que carecen de un hidroxilo sobre la fracción de acilo, no son activos *in vivo* contra estos tumores.

### 25 **Ejemplo 3:** Efecto *in vitro* de los inhibidores de KSP sobre el perfil del ciclo celular en líneas celulares cancerosas

Las células de líneas celulares de linfoma se trataron con los inhibidores de KSP de la invención, y se analizaron mediante análisis FACS. Se recolectaron aproximadamente  $2 \times 10^5$  células, se lavaron los precipitados celulares con PBS frío dos veces, y se resuspendieron en 500  $\mu$ L de PBS frío. Se fijaron las células mediante la adición de 8 mL de etanol frío al 80%, mientras que se realizaba una agitación tipo vórtice lenta. Después de 15 minutos de incubación, se lavaron las células fijadas dos veces con PBS, y se resuspendieron las células precipitadas en 1 mL de regulador de coloración PI/ARNasa (BD Pharmingen<sup>MR</sup>, catálogo # 550825), y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C protegidas de la luz. El yoduro de propidio (PI) es un colorante vital fluorescente que colorea tanto el ADN como el ARN. Por consiguiente, el ARN se debe removido mediante digestión con ribonucleasa (ARNasa). Las células teñidas se pasaron a través de un filtro de células hasta un tubo FACS, para reducir el número de agregados celulares (BD Falcon # 352235) antes del análisis FACS. El contenido de ADN de las células fijadas y coloreadas se analizó mediante el citómetro de flujo BD FACSCalibur utilizando el software CellQuest.

El tratamiento de las células cancerosas con los inhibidores de KSP dio como resultado la detención mitótica, pero el grado de detención, su duración, y las consecuencias después de la detención, pueden variar entre las líneas celulares. En seguida de la detención mitótica, las células tienen varias opciones, incluyendo salir de la detención y dividirse normalmente, sufrir apoptosis directamente, o salir de la mitosis sin citoquinesis (un fenómeno denominado como deslizamiento mitótico). Si las células sufren el deslizamiento mitótico, pueden entrar a una pseudo-G1, y luego continuar el ciclo, envejecer, o sufrir apoptosis. Algunas de estas diferencias se destacan en el tratamiento de las líneas celulares de linfoma SUDHL-4 (una línea celular de linfoma de células B obtenida a través de DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares, número de catálogo ACC 495), y RL (una línea celular de linfoma no Hodgkin humano, American Type Culture Collection, Manassas VA, número de catálogo CRL-2261<sup>MR</sup>), con los inhibidores de KSP.

Ambas líneas celulares se detuvieron en la mitosis en respuesta al compuesto Ila, pero las células SUDHL-4 sufrieron apoptosis después de 48 horas de tratamiento, como se indica mediante un incremento de las células con un contenido de ADN  $< 2N$ , mientras que las células de linfoma de RL permanecieron detenidas en la mitosis, y no se presenta inducción de apoptosis ni deslizamiento mitótico. Véase la Figura 2.

#### 5 **Ejemplo 4:** Ensayos de cribado del inhibidor de KSP

La identificación de los tipos de tumores que son los más sensibles a los inhibidores de KSP de la presente invención, se puede llevar a cabo utilizando un planteamiento no forzado, que utiliza varios ensayos basados en células. Los ensayos seleccionados fueron los siguientes:

10 • CellTiter-Glo®. Éste es un ensayo diseñado para medir la concentración de ATP en un cultivo celular, y se puede correlacionar con el número de células. Brevemente, el CellTiter-Glo® (Promega Corporation) es un método homogéneo que utiliza el único reactivo CellTiter-Glo® para detectar el ATP, en donde el ATP en el ensayo dirige la actividad de una luciferasa termoestable, para crear una señal luminiscente, la cual se puede medir luego y correlacionar con el número de células viables. En resumen, para las células adherentes, se sembraron en placa de 1.000 a 5.000 células/pozo en placas de 96 pozos (100  $\mu\text{L}$ /pozo), y se dejó que se adhirieran durante 24 horas, antes de ser tratadas con el fármaco. Para las células no adherentes, se sembraron en placa de 1.000 a 10.000 células/pozo en placas de 96 pozos (100  $\mu\text{L}$ /pozo), e inmediatamente se trataron con el fármaco. Las diluciones del fármaco se prepararon en DMSO a razón de 1.000 veces la concentración final. Estas diluciones se diluyeron luego hasta 1/6 en un medio de crecimiento, antes de ser añadidas a las células (11  $\mu\text{L}$ /pozo), para alcanzar la concentración final deseada. Después de 48 horas en una incubadora de cultivo de tejidos a 37 °C, se procesaron las placas para el ensayo CellTiter-Glo®, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Protocolo para un ensayo de proliferación celular de 72 horas: el ensayo de 72 horas se llevó a cabo de la misma forma que el ensayo de 48 horas, excepto por las siguientes modificaciones: para las células adherentes, se sembraron en placa de 500 a 5.000 células/pozo en placas de 96 pozos (90  $\mu\text{L}$ /pozo de medio de crecimiento celular), y se dejó que se adhirieran durante 24 horas antes de ser tratadas con el fármaco. Para las células no adherentes, se sembraron en placa de 1.000 a 10.000 células/pozo en placas de 96 pozos (90  $\mu\text{L}$ /pozo de medio de crecimiento celular), y se trataron inmediatamente con el fármaco. Los valores de los datos presentados, representan la concentración del compuesto de prueba requerida para una reducción en el crecimiento del 50%.

30 • Liberación de LDH. El ensayo de detección de citotoxicidad KitPLUS (LDH) (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) mide la cantidad de LDH liberada en el medio mediante el teñido de las células; la LDH cataliza la conversión del lactato hasta piruvato. La reacción enzimática se acopla con una reacción química que utiliza una sal de tetrazolio para formar un formazano que es rojo y se puede detectar por su absorbancia a 490 nm. Este ensayo mide la cantidad de células muertas después del tratamiento con el fármaco. Las células se sembraron en placa a razón de 10.000 células/pozo en placas de 96 pozos (100  $\mu\text{L}$ /pozo). Se dejó que las células adherentes se adhirieran durante 24 horas antes de ser tratadas con el fármaco, mientras que las células no adherentes se trataron inmediatamente con el fármaco. Las diluciones de fármacos se prepararon en DMSO a razón de 1.000 veces la concentración final. Estas diluciones se diluyeron luego en proporción 1/100 en el medio de crecimiento, antes de agregarse a las células (11  $\mu\text{L}$ /pozo), para alcanzar la concentración final deseada. Después de 48 horas en una incubadora de cultivo de tejidos a 37 °C, las placas se procesaron para el ensayo de detección de citotoxicidad KitPLUS (LDH), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Únicamente los valores promedio se sustrajeron de todos los puntos de datos antes del análisis. Los valores de los datos presentados corresponden a la concentración del compuesto, en donde el resultado de LDH está en el nivel medio máximo.

45 • Caspasa-Glo® 3/7. El Ensayo de Caspasa-Glo® 3/7 (Promega Corporation) es un ensayo luminiscente homogéneo que mide las actividades de la caspasa-3/7. El ensayo proporciona un sustrato pro-luminiscente de caspasa-3/7 DEDV-aminoluciferina, y una luciferasa termoestable en un reactivo optimizado para la actividad de la caspasa-3/7, la actividad de la luciferasa, y la lisis celular. La adición del único reactivo de Caspasa-Glo® 3/7 trae como resultado la lisis celular, seguida por la disociación de la caspasa del sustrato. Ésta libera la aminoluciferina libre, la cual es consumida por la luciferasa, generando una señal luminiscente. La señal es proporcional a la actividad de la caspasa-3/7. Los valores de los datos presentados corresponden a la concentración del compuesto, en donde la actividad de la caspasa 3/7 está en el nivel medio máximo.

Se seleccionaron cinco líneas celulares con sensibilidades diferentes conocidas a los inhibidores de KSP de la invención, en un esfuerzo por demostrar la naturaleza predictiva de los ensayos de cribado. Las líneas son como sigue:

55 HCT-116 y HT29. HCT-116 es una línea celular derivada a partir de un carcinoma epitelial colónico humano, y se ha demostrado que es sensible a los inhibidores de KSP de la invención *in vivo*. HT29 (disponible a través de la

American Type Culture Collection, Manassas VA, Número de Catálogo HTB-38) también se deriva a partir de carcinoma epitelial colónico humano, pero es menos sensible a los inhibidores de KSP.

MV4;11 (American Tissue Culture Collection (catálogo # CRL-9591, Rockville, MD)) es una línea celular de leucemia mielógena aguda (LMA).

5 Colo205 (American Tissue Culture Collection (catálogo # HB-8307, Rockville, MD)) es una línea celular de cáncer colorrectal humano.

T47D (disponible a través de la American Tissue Culture Collection (catálogo # HTB-133, Rockville, MD)) es una línea celular derivada a partir de un carcinoma ductal de mama humano que parece tener un defecto en el punto de verificación del huso).

10 Los datos para el Compuesto Ila se presentan a continuación en la Tabla 2. Los resultados demuestran que, en general, los ensayos están de acuerdo entre sí, y se pueden utilizar en amplios cribados de diferentes tipos de células para cribar inhibidores de KSP, y para cribar tipos de células sensibles.

Tabla 2 - Ensayos de cribado de proliferación / supervivencia.

Línea celular	Ensayo de CTG (nM)			Ensayo de LDH (nM)			Ensayo de Caspasa 3/7 (nM)		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
MV4;11	0,05	0,04	0,04	NS	0,03	NS	0,02	0,03	NS
HCT- 116	>5	0,11	0,13	0,06	0,10	0,10	0,12	0,09	NS
Colo- 205	>5	0,18	0,19	NS	0,11	0,16	0,13	0,21	0,19
HT29	>5	>5	0,21	NS	0,35	0,27	NS	NS	NS
T47-D	>5	>5	0,45	NS	0,32	0,33	NS	0,39	0,40

Ensayo de CTG - Los resultados son los valores GI<sub>50</sub>, en donde el valor GI<sub>50</sub> se calcula como la concentración del compuesto que da como resultado una tasa de supervivencia del 50%. Ensayo de LDH - Los resultados son los valores EC<sub>50</sub>, en donde los valores EC<sub>50</sub> se calculan como la concentración del compuesto que da como resultado la mitad del efecto máximo. Ensayo de Caspasa 3/7 - Los resultados son los valores EC<sub>50</sub>, en donde los valores de EC<sub>50</sub> se calculan como la concentración del compuesto que da como resultado la mitad del efecto máximo.

15 **Ejemplo 5:** Actividad de los inhibidores de KSP contra el panel de líneas celulares NCI60

El panel NCI-60 es un panel estandarizado de líneas celulares tumorales que se utiliza con frecuencia para investigar la sensibilidad de los tumores de diferentes orígenes a un agente dado (Shoemaker 2000 Nat. Rev. Cancer, 6: 813 - 23). El ensayo de CellTiter-Glo® descrito anteriormente se utilizó para medir la sensibilidad de una cantidad de líneas celulares derivadas de tumor, a los compuestos inhibidores de KSP. Los datos para el

20 Compuesto Ila se presentan a continuación en la Tabla 3, y demuestran que muchas líneas celulares derivadas de tumor son sensibles a los inhibidores de KSP de la invención.

Tabla 3 - Resumen de los datos de CellTiter-Glo para el Compuesto Ila.

Panel celular	Línea celular	GI <sub>50</sub>	Log(GI <sub>50</sub> )	Diferencial
Leucemia	CCRF-CEM	0,215	-0,6676	0,999
Leucemia	HL-60	0,165	-0,7825	1,114
Leucemia	K-562	0,218	-0,6615	0,993
Leucemia	MOLT-4	0,331	-0,4802	0,811
Leucemia	RPMI-8226	0,351	-0,4547	0,786
Leucemia	SR	0,095	-1,0223	1,353
NSCL	A549	10	1,0000	-0,669
NSCL	EKVX	10	1,0000	-0,669
NSCL	HOP-62	10	1,0000	-0,669
NSCL	HOP-92	10	1,0000	-0,669
NSCL	NCI-H226	10	1,0000	-0,669
NSCL	NCI-H23	0,223	-0,6517	0,983
NSCL	NCI-H322M	10	1,0000	-0,669
NSCL	NCI-H460	0,378	-0,4225	0,754
NSCL	NCI-H522	0,166	-0,7799	1,111
Colon	COLO 205	10	1,0000	-0,669

(continuación)

Panel celular	Línea celular	GI <sub>50</sub>	Log(GI <sub>50</sub> )	Diferencial
Colon	HCC-2998	0,608	-0,2161	0,547
Colon	HCT-116	0,138	-0,8601	1,191
Colon	HCT-15	0,378	-0,4225	0,754
Colon	HT29	10	1,0000	-0,669
Colon	KM12	0,423	-0,3737	0,705
Colon	SW-620	0,236	-0,6271	0,958
CNS	SF-268	10	1,0000	-0,669
CNS	SF-295	0,162	-0,7905	1,122
CNS	SF-539	0,387	-0,4123	0,743
CNS	SNB-19	10	1,0000	-0,669
CNS	SNB-75	10	1,0000	-0,669
CNS	U251	0,239	-0,6216	0,953
Melanoma	LOX IMVI	10	1,0000	-0,669
Melanoma	MALME-3M	10	1,0000	-0,669
Melanoma	M14	0,209	-0,6799	1,011
Melanoma	SK-MEL-2	2,773	0,4429	-0,112
Melanoma	SK-MEL-28	10	1,0000	-0,669
Melanoma	SK-MEL-5	10	1,0000	-0,669
Melanoma	UACC-257	10	1,0000	-0,669
Melanoma	UACC-62	10	1,0000	-0,669
Melanoma	MDA-MB-435	0,152	-0,8182	1,149
Ovária	IGROV1	10	1,0000	-0,669
Ovária	OVCAR-3	10	1,0000	-0,669
Ovária	OVCAR-4	10	1,0000	-0,669
Ovária	OVCAR-5	10	1,0000	-0,669
Ovária	OVCAR-8	0,324	-0,4895	0,821
Ovária	SK-OV-3	0,421	-0,3757	0,707
Ovária	NCI/ADR-RES	4,18	0,6212	-0,290
Renal	786-0	10	1,0000	-0,669
Renal	A498	10	1,0000	-0,669
Renal	ACHN	10	1,0000	-0,669
Renal	CAKI-1	10	1,0000	-0,669
Renal	RXF 393	10	1,0000	-0,669
Renal	SN12C	10	1,0000	-0,669
Renal	TK-10	10	1,0000	-0,669
Renal	UO-31	10	1,0000	-0,669
Próstata	PC-3	10	1,0000	-0,669
Próstata	DU-145	0,435	-0,3615	0,693
Mama	MCF7	10	1,0000	-0,669
Mama	MDA-MB-231	0,333	-0,4776	0,809
Mama	HS 578T	0,22	-0,6576	0,989
Mama	BT-474	10	1,0000	-0,669
Mama	BT-549	0,809	-0,0921	0,423
Mama	T-47D	10	1,0000	-0,669
	Media	2,143	0,331	

El valor GI<sub>50</sub> es la concentración del compuesto (expresada en nM) que da como resultado un índice de supervivencia del 50%.

Diferencial: La diferencia entre el log (GI<sub>50</sub>) promedio (0.331) y el Log(GI<sub>50</sub>) de cada línea celular.

Promedio: La media geométrica para los valores GI<sub>50</sub>, y la media aritmética para los valores Log(GI<sub>50</sub>).

**Ejemplo 6:** Actividad de los inhibidores de KSP contra las líneas celulares derivadas a partir de malignidades hematológicas

- 5 Los datos presentados en la Tabla 3 demostraron que las líneas celulares leucémicas eran las más sensibles a los inhibidores de KSP de la invención. Por consiguiente, se probó un panel de varias líneas celulares derivadas a partir de malignidades hematológicas en el ensayo de CellTiter-Glo® descrito anteriormente, y se presentan en la Tabla 4 a continuación y en la Figura 1.

Tabla 4 - Valores de GI<sub>50</sub> para el Compuesto Ila contra las líneas celulares derivadas a partir de malignidades hematológicas.

Enfermedad	Línea celular	Número de catálogo	GI <sub>50</sub> (nM)	Log(GI <sub>50</sub> )	Diferencial
LMA	MV4;11	ATCC CRL-9591	0,08	-1,114	0,644
LMA	MV4;11Luc	Derivada de MV4;11	0,11	-0,979	0,509
LMA	AML-193	ATCC CRL-9589	0,11	-0,959	0,489
LMA	Kasumi-1	ATCC CRL-2724	0,44	-0,357	-0,113
LMA	SET-2	Disponible a través de DSMZ ACC608	0,34	-0,469	-0,001
LMA	MOLM13-Luc	Disponible a través de ATCC 30-2001	0,23	-0,645	0,175
LMA	HL60	Disponible a través de ATCC CCL-240	0,17	-0,783	0,313
LMA	HL60-Luc	Disponible a través de ATCC 30-2001	0,51	-0,297	-0,173
LMA	HEL92	ATCC TIB-180	0,49	-0,310	-0,160
LMC	K562	Disponible a través de ATCC CCL-243	0,21	-0,680	0,210
LLA	CCRF-CEM	ATCC CCL-119	0,16	-0,785	0,315
LLA	RS4;11	ATCC CRL-1873	0,10	-1,000	0,530
LLA	MOLT-4	Disponible a través de ATCC CRL- 1582	0,33	-0,480	0,010
LLA	SEM-Luc	Disponible a través de ATCC 30-2001	0,15	-0,824	0,354
MM	KMS11	Véase Namba y colaboradores más abajo	0,48	-0,316	-0,154
MM	KMS11-Luc	Derivada de KSM-11	0,29	-0,538	0,068
MM	KMS18-Luc	Disponible a través de ATCC 30-2001	0,52	-0,286	-0,184
MM	OPM2	DSMZ Acc50	0,14	-0,870	0,400
MM	KMS26	Disponible a través de JCRB JCRB1187	0,24	-0,620	0,150
MM	L363	Disponible a través de DSMZ ACC49	0,13	-0,886	0,416
MM	LP1	Disponible a través de DSMZ ACC41	0,21	-0,688	0,218
MM	RPMI-8226	Disponible a través de ATCC CRL- 8658TM	0,26	-0,582	0,112
MM	H929	Disponible a través de ATCC CRL- 9068	0,34	-0,475	0,005
MM	H929-Luc	Disponible a través de ATCC 30-2001	1,69	0,227	-0,697
NHL	RL	ATCC CRL-226TM	20,00	1,301	-1,771
NHL	SuDHL-4	DSMZ ACC495	0,45	-0,350	-0,120
NHL	U937	Disponible a través de ATCC CRL- 1593.2	0,20	-0,699	0,229
NHL	SR	Disponible a través de ATCC SLR- 2262	0,11	-0,957	0,487
NHL	Karpas-299-Luc	Disponible a través de ATCC 30-2001	20,18	1,305	-1,775
HL	L428	DSMZ ACC197	20,00	1,301	-1,771
HL	KM-H2	DSMZ ACC 8	0,23	-0,632	0,162
	Media		0,34	-0,470	

El valor GI<sub>50</sub> es la concentración del compuesto que da como resultado un índice de supervivencia del 50%. Diferencial: La diferencia entre el Log(GI<sub>50</sub>) promedio (0,470) y el Log(GI<sub>50</sub>) de cada línea celular. Promedio: La media geométrica para los valores de GI<sub>50</sub>, y la media aritmética para los valores Log(GI<sub>50</sub>). (KMS-11, véase Namba y colaboradores (1989) In Vitro Cell Dev. Biol. 25(8) páginas 723 - 729).

### 5 Ejemplo 7: Sensibilidad de los blastos celulares primarios a los inhibidores de KSP

Los datos de la Tabla 4 demuestran que varios tipos de líneas celulares de cáncer hematológico son sensibles a los inhibidores de KSP de la invención. Las células de blastos primarios de los pacientes con LMA se probaron para determinar su sensibilidad al Compuesto Ila, como se muestra más adelante. Los blastos de LMA congelados de sangre periférica se obtuvieron a través de AllCell LLC (Emeryville, CA). Se adquirieron tres viales congelados que contenían aproximadamente  $1 \times 10^7$  PBMC. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de tres pacientes con LMA recién diagnosticados, con un alto porcentaje de blastos (# 06 - 188, 80%; # 06 - 366, 88%; 06 - 503, 73%) se cultivaron durante varias semanas, y se trataron con los inhibidores de KSP. Los viales se descongelaron rápidamente, y se cultivaron las células en DMEM de Iscove complementado con suero bovino fetal al 10%, y las siguientes citoquinas, todas a razón de 10 ng / mL: GM-CSF, G-CSF, SCF, IL-3, e IL-6 (todas de R&D Systems). Estos ensayos se llevaron a cabo sobre las células de la siguiente manera:

- Ensayo de CellTiter-Glo® sobre blastos de LMA. Las PBMC que contenían blastos de LMA se sembraron en placas de 96 pozos (5.000/pozo), y se trataron con diferentes concentraciones del compuesto Ila (10 pM a 10 nM) durante 48 horas, antes de medir la supervivencia de las células como se describió anteriormente. Los valores de GI<sub>50</sub> (nM) se calcularon como para las líneas celulares.
- Análisis del ciclo celular utilizando coloración con yoduro de propidio. Las PBMC que contenían los blastos de LMA se sembraron en placas de 6 pozos (0,6 a  $1 \times 10^6$  células/pozo), y se trataron con uno de los siguientes: DMSO (vehículo), Compuesto Ila a 0,2 ó 2 nM, o Paclitaxel a 100 nM. Se cosecharon aproximadamente  $2 \times 10^5$  células, los precipitados celulares se lavaron con PBS frío dos veces, y se volvieron a suspender en 500 µL de PBS frío. Las

células se fijaron mediante la adición de 8 mL de etanol frío al 80%, mientras que se hacía una agitación tipo vórtice lenta. Después de 15 minutos de incubación, se lavaron las células fijadas dos veces con PBS, y se volvieron a suspender los precipitados celulares en 1 mL de regulador de coloración PI / ARNasa (BD Biosciences # 550825) y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C, protegidas de la luz. El yoduro de propidio (PI) es un colorante vital fluorescente que tiñe tanto el ADN como el ARN. Por consiguiente, se debe remover el ARN mediante digestión con ribonucleasa (ARNasa). Las células teñidas se pasaron a través de un tamiz de células hacia un tubo FACS, para reducir el número de agregados celulares (BD Falcon # 352235), antes del análisis FACS. El contenido de ADN de las células fijadas y teñidas se analizó mediante el citómetro de flujo BD FACSCalibur, utilizando el software CellQuest.

- 5
- 10
- 15
- Ensayo de formación de colonias en el medio que contiene metilcelulosa. El medio semisólido que contenía metilcelulosa se adquirió a través de StemCell Technologies Inc. (Methocult<sup>MR</sup> GF+ H4435, Catálogo # 04435). Los blastos se sembraron con densidades en el intervalo de  $1 \times 10^3$  a  $1 \times 10^5$  células/pozo, en placas de seis pozos tratadas con cultivo sin tejido. Se agregó DMSO (vehículo) o el compuesto Ila (0.1, 0.2, 0.5, 1 y 2 nM) al medio al mismo tiempo que las células. Se hizo recuento de las colonias bajo un microscopio después de dos semanas. Se tiñeron las células vivas con P-yodo-nitro-tetrazolio a razón de 750  $\mu$ L / pozo, en una concentración de 1 mg / mL (Sigma Catálogo #18377); se tomaron fotografías después de una incubación durante la noche a 37 °C.

20

25

30

Resultados: Aunque el tiempo de duplicación aparente de estos blastos fue más lento que aquél de la mayoría de las líneas celulares de LMA, 50 a 70 horas vs 30 a 50 horas, se obtuvieron valores de  $GI_{50}$  para el compuesto Ila (0.12, 0.28, y 0.34 nM), que estaban en línea con lo que se mostró anteriormente para las líneas celulares de LMA. Se obtuvieron resultados similares utilizando el ensayo de formación de colonias, en donde el número de colonias se redujo notablemente a 0,2 nM, y las colonias estaban ausentes a 0,5 nM y por encima para la muestra # 06866. Se obtuvieron resultados similares para las muestras # 06-188 y # 06-503, y en todos los casos las colonias estuvieron ausentes a 0,5 nM y por encima. El perfil del ciclo celular mostró que, para la muestra # 06-366 a las 24 horas, hubo un incremento en el número de células detenidas en la mitosis (población 4N), seguido a las 48 horas por un incremento en el número de células que estaban muriendo (población <2N). Estos cambios fueron más notorios en la concentración más alta (2 nM) que en la concentración más baja (0,2 nM), que es cercano al  $GI_{50}$ . Se utilizó una alta dosis de paclitaxel (100 nM) como control positivo, para una detención mitótica fuerte. Se obtuvieron resultados similares para las muestras # 06-188 y # 06-503. Para la muestra # 06-503, se recolectaron los datos en los instantes de tiempo a las 48 y 72 horas. El patrón a las 48 horas es similar al observado para la muestra # 06-366, y a las 72 horas el incremento en el número de células que están muriendo (población <2N) es más notorio, en especial a 2 nM. Véase la Figura 2. El hecho de que los valores  $GI_{50}$  son aún muy bajos, indica que las células que entran al ciclo celular son aniquiladas muy efectivamente por el compuesto Ila.

#### Ejemplo 8: Determinación de la eficacia *in vivo* de los inhibidores de KSP

35

40

45

La línea celular HCT-116 ha sido utilizada ampliamente en la evaluación de los inhibidores mitóticos, tales como los interruptores de microtúbulos, los inhibidores de quinasa mitótica, y los inhibidores de KSP. Se llevó a cabo un estudio de efectividad de múltiples dosis en un programa de dosificación de cuatro veces al día durante 3 días (q4d x 3). Los experimentos se llevaron a cabo utilizando ratones nu/nu atímicos producidos por mezcla de razas de aproximadamente 6 a 8 semanas de edad (Charles River Laboratories, Hollister, CA). Después de arribar, los animales recibieron un implante de un microchip subcutáneo (AVID, Folsom, LA) en la región subescapular, para la identificación de los individuos. Se permitió que los animales se aclimataran durante una semana antes de iniciar cualquiera de los procedimientos experimentales. Los animales se alojaron a razón de 4 a 5 animales por jaula, en jaulas microaislantes de policarbonato transparente, con un ciclo de luz de 12 horas y 12 horas de oscuridad, a temperaturas de entre 70 y 80 grados Fahrenheit y una humedad relativa del 30 al 70%. Se proporcionó alimento (croquetas para roedores de Purina) y agua al gusto. Los ratones se manejaron de acuerdo con los reglamentos y lineamientos de la ACUC de Novartis, y con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de ILAR. Los experimentos se llevaron a cabo en una instalación acreditada por AAALAC de acuerdo con un protocolo aprobado por ACUC.

50

El compuesto Ila (base libre) y el SB-715992 (Ispinesib, un inhibidor de KSP de Cytokinetics que está en los ensayos clínicos; como su base libre), se formularon en Captisol® al 20% para todas las dosis anteriores, para un volumen de dosis de 8 mL / kg. Las dosis se ajustaron al peso corporal de cada animal. Las formulaciones se hicieron una vez al principio del estudio, y se guardaron a temperatura ambiente. El paclitaxel de grado clínico se adquirió premezclado en un vehículo basado en cremóforo (Mayne Pharma, ahora Hospira, Lake Forest, IL, catálogo # NDC-6170334209), y se diluyó en solución salina estéril para proporcionar un volumen de dosis de 16 mL / kg, para una dosis de 30 mg / kg administrada en forma intraperitoneal.

55

Las células de carcinoma de colon humano HCT116 se obtuvieron a través del National Cancer Institute's DCTD Tumor Repository (catálogo # NCI 502568, Rockville, MD), y se analizaron para estar seguros de que estaban libres de Mycoplasma sp. y de virus de murino en el panel de ensayo de PCR IMPACT1 (RADIL, Universidad de Missouri, Columbia, MO). Las células HCT116 se cultivaron en RPMI1640 con L-glutamina 2 mM (Mediatech Inc., catálogo #

15-040-CV), complementado con suero bovino fetal al 10% (JRH Biosciences, catálogo # 12003-1000M). Estas células se cultivaron como cultivos adherentes, se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía dióxido de carbono al 5%. Las células se cultivaron por lo menos durante 10 pasadas antes de usarse. Las células se cosecharon con una confluencia del 95%, y se centrifugaron aproximadamente a 800 x g durante 5 minutos a 4 °C, y luego se volvieron a suspender en un HBSS frío (Mediatech Inc., catálogo # 21-021-CV), en una concentración de 50 millones de células / mL para el implante subcutáneo (volumen de inyección de 0,1 mL).

Los ratones nu/nu hembras (Charles River, Hollister, CA) se inyectaron en forma subcutánea en el costado derecho con 5 millones de células tumorales HCT-116 suspendidas en solución salina balanceada de Hank (HBSS) en un volumen total de 0,1 mL / ratón. Para los estudios de eficacia, se seleccionaron los ratones en forma aleatoria 10 días después del implante. Se inscribieron 72 ratones en el Estudio 1, y 81 ratones en el Estudio 2, con un volumen tumoral promedio de aproximadamente 300 mm<sup>3</sup>. Los xenoinjertos de tumores se midieron en dos dimensiones (L x A) con calibradores digitales dos veces por semana desde el inicio de la dosificación en el Día 0. El volumen del tumor se calculó como (L x A<sup>2</sup>)/2. Los pesos corporales se midieron dos veces por semana, y las observaciones clínicas se registraron diariamente. El volumen del tumor y los pesos corporales se capturaron y se almacenaron mediante el software StudyDirector (StudyLog, South San Francisco, CA). Los valores de porcentaje de tratamiento/control (T/C) se calcularon utilizando la siguiente fórmula:

$$\%T/C = 100 \times \Delta T/\Delta C$$

en donde:

T = volumen promedio del tumor del grupo tratado con fármaco el día final del estudio;

ΔT = volumen promedio del tumor del grupo tratado con fármaco el día final del estudio - volumen medio del tumor del grupo tratado con fármaco el día inicial de la dosificación;

C = volumen promedio del tumor medio del grupo de control en el día final del estudio; y

ΔC = volumen promedio del tumor del grupo de control el día final del estudio - volumen promedio del tumor del grupo de control el día inicial de la dosificación.

25 Todos los datos se expresaron como la media y SEM (error estándar de la media). Se llevaron a cabo comparaciones entre grupos para las mediciones finales de los tumores, utilizando un análisis por pares de ANOVA de una vía. La significancia se determinó utilizando el ANOVA de una vía de Kruskal-Wallis en un método de Ranks y Dunn para múltiples comparaciones por pares. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando SigmaStat (Systat Software Inc., San José, CA).

30 Se llevó a cabo un estudio de eficacia de múltiples dosis en un programa q4d x 3 para comparar la actividad antitumoral del compuesto Ila con el SB-715992 y el paclitaxel. Los resultados se muestran en la Tabla 5. En este estudio, los animales tratados con las dosis más altas de 5 mg / kg del compuesto Ila y de 15 mg / kg de SB-715992 solamente recibieron las primeras dos dosis del programa q4d x 3 planeado, debido a una pérdida de peso significativa, de la cual se recuperaron los ratones. Inclusive con solamente dos dosis, hubo una regresión significativa del tumor de una manera similar (regresión del 73%, p < 0,005 para cada uno). Las dos dosis más bajas de 2,5 y 1,25 mg / kg del compuesto Ila y de 7.5 mg / kg de SB-715992 dadas en el programa q4d x 3, también provocaron en forma similar una regresión de los xenoinjertos del tumor HCT116 (regresión del 82%, del 66%, del 65%, p < 0,05, respectivamente). Sobre todo, el paclitaxel fue más efectivo que el compuesto Ila; aunque los tumores tuvieron regresión inicialmente, el crecimiento se reasumió pronto después de cesar la dosificación.

40 Tabla 5 - Eficacia del Compuesto Ila administrado en un programa de dosificación q4d x 3 en el modelo de xenoinjerto de tumor HCT116.

Compuesto	Programa de dosis, ruta	Respuesta del tumor			Respuesta del huésped		
		T/C, Día 17 (%)	Δ de volumen tumoral, Día 17 (mm <sup>3</sup> )	% máximo de regresión (Día)	Δ máximo de peso corporal (Día) (g)	Δ máximo de peso corporal (Día) (%)	Supervivencia (vivos / total)
Vehículo (20% de Captisol®)	q4d x 3, i.v.	100	756 ± 95	-	0.9 ± 0.5 (D11)	3.4 ± 0.02 (D11)	9/9
Compuesto Ila	1.25 mg/kg, i.v., q4d x 3	~*	-173 ± 12	66 (D20)	-0.7 ± 0.3 (D4)	-2.9 ± 0.01 (D4)	9/9

(continuación)

Compuesto	Programa de dosis, ruta	Respuesta del tumor			Respuesta del huésped		
		T/C, Día 17 (%)	$\Delta$ de volumen tumoral, Día 17 ( $\text{mm}^3$ )	% máximo de regresión (Día)	$\Delta$ máximo de peso corporal (Día) (g)	$\Delta$ máximo de peso corporal (Día) (%)	Supervivencia (vivos / total)
Compuesto Ila	2.5 mg/kg, i.v., q4d x 3	-*	-208 $\pm$ 17	82 (D20)	-1.8 $\pm$ 0.2 (D11)	-7.0 $\pm$ 0.03 (D11)	9/9
Compuesto Ila	5 mg/kg, i.v., q4d x 3	-*	-196 $\pm$ 11	73 (D20)	-3.0 $\pm$ 0.2 (D7)	-11.7 $\pm$ 0.02 (D7)	8/9 (pérdida de peso corporal)
SB-715992	3.5 mg/kg, i.v., q4d x 3	5	39 $\pm$ 4	10 (D11)	-0.7 $\pm$ 0.05 (D4)	-2.7 $\pm$ 0.17 (D4)	9/9
SB-715992	7.5 mg/kg i.v., q4d x 3	-*	-177 $\pm$ 55	65 (D17)	-0.3 $\pm$ 0.05 (D4)	-1.3 $\pm$ 0.25 (D4)	9/9
SB-715992	15 mg/kg, i.v., q4d x 3	-*	-205 $\pm$ 24	73 (D20)	-2.5 $\pm$ 0.2 (D7)	-10.6 $\pm$ 0.75 (D7)	9/9
Paclitaxel	30 mg/kg, i.p., q4d x 3	-*	-80 $\pm$ 3	31 (D17)	-1.3 $\pm$ 0.1 (D7)	-5.0 $\pm$ 0.46 (07)	9/9

5 Debido a que una dosis tan baja como de 1,25 mg / kg en un programa q4d x 3 indujo la regresión de los xenoinjertos HCT116, se repitió el estudio de efectividad con un intervalo de dosis de 2 a 0,125 mg / kg, para observar una respuesta a la dosis, y determinar qué tan baja se puede suministrar una dosis para inducir la regresión del tumor. Los resultados de la Tabla 6 indican que se observó la regresión de los tumores con dosis tan bajas como 1 mg / kg (regresión del 46%,  $p < 0,05$ , día 17), y se observó estasis del tumor con dosis tan bajas como 0,25 mg / kg del compuesto Ila durante el intervalo de dosificación, pero no alcanzó un significado estadístico, comparado con el grupo de control con vehículo. El efecto antitumoral del compuesto Ila con 0,125 mg / kg no fue significativamente diferente del control con vehículo. Solamente la dosis de 7,5 mg / kg de SB-715992 indujo la regresión de los tumores. Adicionalmente, 72 horas después de la última dosis, se recolectó sangre para comparar los niveles de neutrófilos circulantes entre los grupos. Los neutrófilos se redujeron de una forma dependiente de la dosis, de una forma similar al efecto de la efectividad tumoral.

10  
15 Tabla 6 - Eficacia de dosis bajas del Compuesto Ila administrado en un programa de dosificación q4d x 3 en el modelo de xenoinjerto de tumor HCT116.

Compuesto	Programa de dosis, ruta	Respuesta del tumor			Respuesta del huésped			
		T/C, Día 24 (%)	$\Delta$ de volumen tumoral, Día 24 ( $\text{mm}^3$ )	% máximo de regresión (Día)	Neutrófilos/ $\mu\text{l}$ 72 h después de la dosis +/- D. E.	$\Delta$ máximo de peso corporal (Día) (g)	$\Delta$ máximo de peso corporal (Día) (%)	Superviv. (vivos / total)
Vehículo (20% de Captisol®)	q4d x 3, i.v.	100	1104 $\pm$ 262	-	1227 +/- 257	-0,1 $\pm$ 0,2 (D3)	-0,4 $\pm$ 0,86 (D3)	9/9
Compuesto Ila	0,125 mg/kg, i.v., q4d x 3	81	809 $\pm$ 193	-	1346 +/- 427	-0,4 $\pm$ 0,16 (D3)	-1,4 $\pm$ 0,59 (D3)	9/9
Compuesto Ila	0.25 mg/kg, i.v., q4d x 3	35	382 $\pm$ 120	-	785 +/- 374	-0,6 $\pm$ 0,15 (D3)	-2,3 $\pm$ 0,58 (D3)	9/9
Compuesto Ila	0.5 mg/kg, i.v., q4d x 3	14	155 $\pm$ 145	8 (D14)	293 +/- 29	-0,7 $\pm$ 0,18 (D3)	-2,7 $\pm$ 0,75 (D3)	9/9
Compuesto Ila	1 mg/kg, i.v., q4d x 3	-*	-34 $\pm$ 36	46 (D17)	343 +/- 255	-0,7 $\pm$ 0,23 (D3)	-2,8 $\pm$ 0,83 (D3)	9/9

(continuación)

Compuesto	Programa de dosis, ruta	Respuesta del tumor			Respuesta del huésped			
		T/C, Día 24 (%)	$\Delta$ de volumen tumoral, Día 24 (mm <sup>3</sup> )	% máximo de regresión (Día)	Neutrófilos/ $\mu$ l 72 h después de la dosis +/- D. E.	$\Delta$ máximo de peso corporal (Día) (g)	$\Delta$ máximo de peso corporal (Día) (%)	Superviv. (vivos / total)
Compuesto Ila	2 mg/kg, i.v., q4d x 3	-*	-141 $\pm$ 48	73 (D21)	193 +/- 125	-1.35 $\pm$ 0.87 (D10)	4.7 $\pm$ 1.17 (D3)	8/9 (perdida de peso corporal)
SB-715992	1.75 mg/kg, i.v., q4d x 3	36	395 $\pm$ 84	-	1026 +/- 229	-0.6 $\pm$ 0.58 (D3)	-2.3 $\pm$ 0.51 (D3)	9/9
SB-715992	3.5 i.v., q4d x 3	15	165 $\pm$ 60	13 (D7)	731 +/- 391	-0.5 $\pm$ 0.37 (D3)	-2.0 $\pm$ 0.44 (D3)	9/9
SB-715992	7.5 mg/kg, i.v., q4d x 3	-	-145 $\pm$ 25	65 (D21)	476 +/- 112	-0.7 $\pm$ 1.1 (D10)	-3.0 $\pm$ 2.49 (D10)	9/9

**Ejemplo 9:** Eficacia de los inhibidores de KSP en el modelo de xenoinjerto de tumor HCT15

- 5 HCT15 es una línea celular de adenocarcinoma humano que también se sabe que expresa la bomba P-gp. Por consiguiente, se llevó a cabo un modelo de tumor de xenoinjerto utilizando esta línea celular, para verificar los resultados del Ejemplo 10.

10 Los experimentos se llevaron a cabo utilizando ratones nu/nu atímicos producidos por mezcla de razas (Charles River, Laboratories) de aproximadamente 6 a 8 semanas de edad. Cuando llegaron, los animales recibieron un implante de microchip subcutáneo (AVID, Folsom, LA) en la región subescapular, para la identificación de los individuos. Se dejaron aclimatar los animales durante 1 semana antes de iniciar cualquiera de los procedimientos experimentales. El cuidado animal de rutina y la garantía de bienestar fueron como se describió anteriormente.

15 Las células de carcinoma de colon humano HCT15 se obtuvieron a través del National Cancer Institute's DCTD Tumor Repository (catálogo # NCI 502711, Flockville, MD). Las células HCT15 se cultivaron en RPMI1640 con L-glutamina 2 mM (Mediatech Inc., catálogo # 15-040-CV) complementado con suero bovino fetal al 10% (JRH Biosciences, catálogo # 12003-1000M). Las células se probaron para determinar si estaban libres de Mycoplasma sp. y de virus de murino en el panel de ensayo de reacción en cadena de la polimerasa IMPACT1 (RADIL, Universidad de Missouri, Columbia, MO).

20 Estas células se cultivaron como cultivos adherentes, se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía dióxido de carbono al 5%. Las células se cultivaron por lo menos durante 10 pasadas antes de usarse. Las células se cosecharon con una confluencia del 95%, y se centrifugaron aproximadamente a 800 x g durante 5 minutos a 4 °C, y luego se volvieron a suspender en un HBSS frío (Mediatech Inc., catálogo # 21-021-CV) más Matrigel<sup>MR</sup> en una concentración de 50 millones de células / mL para el implante subcutáneo (volumen de inyección de 0,2 mL).

25 Los tratamientos para los estudios de eficacia se iniciaron 10 días después del implante de las células tumorales, cuando los tumores eran de aproximadamente 300 mm<sup>3</sup>. El compuesto Ila y SB-715992 se administraron en forma intravenosa (i.v.) a través de la vena de la cola, en un volumen de 8 mL / kg, en las dosis indicadas. El paclitaxel se administró en forma intraperitoneal (i.p.) en un volumen de 16 mL / kg, a razón de 30 mg / kg.

30 Para los estudios de eficacia, se seleccionaron los ratones en forma aleatoria 10 días después del implante, con un volumen tumoral promedio de aproximadamente 300 mm<sup>3</sup>. Los xenoinjertos de tumores se midieron en dos dimensiones (L x A) con calibradores digitales dos veces por semana desde el inicio de la dosificación en el Día 0. El volumen del tumor se calculó como (L x A<sup>2</sup>)/2. Los pesos corporales se midieron dos veces por semana, y las observaciones clínicas se registraron diariamente. El volumen del tumor y los pesos corporales se capturaron y se almacenaron mediante el software StudyDirector (StudyLog, South San Francisco, CA). Los datos se analizaron como se describió anteriormente.

35 Los resultados mostrados en la Tabla 7 indicaron que el compuesto Ila demostró una mayor eficacia antitumoral de HCT15 que el paclitaxel; con la dosis de 4 mg / kg, el porcentaje T/C fue del 26% (p < 0,05 vs el vehículo, y similar vs paclitaxel). Aunque los datos muestran una separación entre los grupos dosificados con 4 mg / kg de inhibidor de KSP, y 7,5 y 15 mg / kg de SB-715992, no se logró el significado estadístico debido a la variabilidad de los

5 volúmenes de los tumores en este modelo. En el día 10, se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre 4 mg / kg del compuesto Ila, y la dosis de 7,5 mg / kg de SB-715992. El paclitaxel, un sustrato conocido para P-gp, tiene una actividad antitumoral muy baja en este modelo. No se observó una pérdida de peso corporal significativa ni signos de toxicidad externos en cualquiera de los ratones tratados. La mayor actividad antitumoral en el modelo de HCT15 demuestra la efectividad del compuesto Ila en los modelos de xenoinjerto de tumor que expresan altos niveles de P-gp.

Tabla 7 - Eficacia del Compuesto Ila administrado en un programa de dosificación q4d x 3 en el modelo de xenoinjerto de tumor HCT15.

Compuesto	Programa de dosis, ruta	Respuesta del tumor			Respuesta del huésped		
		$\Delta T / \Delta C$ , Día 15 (%)	Regresión (%)	$\Delta$ del volumen del tumor, Día 15 ( $\text{mm}^3$ )	$\Delta$ máximo de peso corporal (Día) (g)	$\Delta$ máximo de peso corporal (Día) (%)	Superviv. (vivos / total)
Vehículo (20% de Captisol)	8 mL/kg, q4dx3, i.v.	100	-	1123 $\pm$ 84	0.3 $\pm$ 0.2 (D10)	1.4 $\pm$ 0.8 (D10)	9/9
COMPUESTO Ila	1.25 mg/kg, q4d x 3, i.v	60	-	671 $\pm$ 172	-0.5 $\pm$ 0.4 (D3)	-2.1 $\pm$ 0.6 (D3)	9/9
COMPUESTO Ila	2.5 mg/kg, q4dx3, i.v	65	-	735 $\pm$ 159	0.6 $\pm$ 0.2 (D3)	2.3 $\pm$ 0.8 (D10)	9/9
COMPUESTO Ila	4.0 mg/kg, q4dx3, i.v	26*	-	99 $\pm$ 78	-0.8 $\pm$ 0.3 (D10)	-3.2 $\pm$ 1.4 (D10)	9/9
SB-715992	7.5 mg/kg, q4d x 3, i.v	87	-	647 $\pm$ 164	0.6 $\pm$ 0.2 (D8)	2.6 $\pm$ 1.0 (D8)	9/9
SB-715992	15 mg/kg, q4d x 3, i.v	67	-	491 $\pm$ 109	-1.2 $\pm$ 0.4 (D10)	-4.9 $\pm$ 1.4 (D10)	9/9
Paclitaxel	30 mg/kg, q4d x 3, i.p	104	-	703 $\pm$ 198	0.8 $\pm$ 0.6 (D8)	3.3 $\pm$ 1.0 (D8)	9/9

#### 10 Ejemplo 10: Eficacia de los inhibidores de KSP en el modelo de xenoinjerto de leucemia mielógena aguda (LMA)

Se evaluó la eficacia del compuesto Ila contra el modelo de xenoinjerto de tumor MV4;11 (O'Farrell y colaboradores, 2003) en ratones atímicos. Primero se probó la eficacia en un modelo de xenoinjerto de tumor MV4;11 subcutáneo en ratones, y también, debido a que el microambiente de la médula ósea juega un papel importante en el crecimiento y supervivencia de las células de LMA, se evaluó adicionalmente la efectividad en un modelo de la enfermedad diseminada MV4;11-luc en ratones, en donde las células se hospedan y crecen en la médula ósea y en algunos órganos blandos. Debido a la expresión de luciferasa por parte de las células tumorales, se determinó un monitoreo comprensivo en serie del crecimiento de las lesiones de leucemia utilizando toma de imágenes de bioluminiscencia.

15 Los estudios de eficacia tumoral subcutánea se llevaron a cabo utilizando ratones nu/nu atímicos producidos por mezclas de razas de aproximadamente 6 - 8 semanas de edad (Charles River Laboratories, Hollister, CA). El estudio de eficacia en el modelo de la enfermedad diseminada se llevó a cabo utilizando ratones hembras NOD-SCID inmunodeficientes de aproximadamente 7 a 8 semanas de edad (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME). A la llegada, los animales recibieron un implante de microchip subcutáneo (AVID, Folsom, LA) en la región subescapular, para la identificación de los individuos. Se dejó aclimatar a los animales durante una semana antes de iniciar cualquiera de los procedimientos experimentales. El cuidado animal de rutina y la garantía del bienestar fueron como se describió anteriormente.

20 Las células de leucemia mielógena aguda MV4;11 humana se obtuvieron a través de la American Tissue Culture Collection (catálogo # CRL-9591, Rockville, MD), y se analizaron para garantizar que están libres de Mycoplasma sp. y de virus de murino en el panel de ensayo de reacción en cadena de la polimerasa IMPACT1 (RADIL, Universidad de Missouri, Columbia, MO). Para el modelo de la enfermedad diseminada, se recibieron un grupo estable de células MV4;11 que expresaban el gen de luciferasa del Fangxian Sun at the Genomics Institute de la Fundación de Investigación de Novartis en San Diego, California (MV4;11-luc). Las células MV4;11 se cultivaron en un medio de Dulbecco modificado de Iscove (Mediatech Inc., catálogo # 15-016-CV) complementado con suero bovino fetal al 10% (JRH Biosciences, catálogo # 12003-1000M), L-glutamina 4 mM, y 5 ng / mL de M-CSF de granulocitos humanos recombinantes (GM-CSF) (R&D Systems, catálogo # 215-GM). Las MV4;11-luc se cultivaron en el mismo medio, pero con la adición de 2  $\mu\text{g}$  / mL de puromicina para la selección de la expresión de luciferasa. Estas células se cultivaron como cultivos en suspensión, se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía dióxido de carbono al 5%. Las células se cultivaron por lo menos durante 10 pasadas antes de usarse. Las células se cosecharon aproximadamente a razón de 2 millones de células/mL, y se centrifugaron a

aproximadamente 800 x g durante 5 minutos a 4 °C, y luego se volvieron a suspender en un HBSS frío (Mediatech Inc., catálogo # 21-021-CV) en una concentración de 25 millones de células / mL (conteniendo Matrigel<sup>MR</sup> al 50%, BD Biosciences, catálogo # 354234), para implantación subcutánea (volumen de inyección de 0,2 mL), o a una concentración de 100 millones de células / mL para implantación intravenosa (i.v.) a través de la vena de la cola (volumen de inyección de 0,1 mL). Los ratones se irradiaron con 3 Gray durante 3 minutos 1 día antes del implante intravenoso de las células.

El compuesto Ila (base libre) y el SB-715992 (base libre) se formularon en Captisol al 20% para un volumen de dosis de 8 mg / kg. Las dosis se ajustaron al peso corporal de cada animal. Las formulaciones se hicieron una vez al principio del estudio, y se guardaron a temperatura ambiente. El paclitaxel de grado clínico se adquirió previamente mezclado en vehículo con base en cremóforo (Mayne Pharma, ahora Hospira, LakeForest, IL, catálogo # NDC-6170334209), y se diluyó en solución salina estéril, para proporcionar un volumen de dosis de 16 mL / kg, para una dosis de 30 mg / kg administrada en forma intraperitoneal.

Para las dos evaluaciones de eficacia en el modelo de tumor subcutáneo, se inyectaron 10 millones de células combinadas en una mezcla de 1:1 de HBSS y Matrigel<sup>MR</sup> en forma subcutánea en el costado derecho, en un volumen total de 0,2 mL / ratón. Los ratones se seleccionaron aleatoriamente 17 días después del implante, y los ratones se inscribieron con un volumen tumoral promedio de aproximadamente 250 mm<sup>3</sup>. Los xenoinjertos de tumores se midieron en dos dimensiones (L x A) con calibradores digitales dos veces por semana desde el inicio de la dosificación en el Día 0. El volumen del tumor se calculó como (L x A<sup>2</sup>)/2. Los pesos corporales se midieron dos veces por semana, y las observaciones clínicas se registraron diariamente. El volumen del tumor y los pesos corporales se capturaron y se almacenaron mediante el software StudyDirector (StudyLog, South San Francisco, CA).

Para la evaluación de la eficacia en el modelo de la enfermedad diseminada, los ratones NOD-SCID hembras recibieron irradiación en todo el cuerpo a 3 Gray, el día antes de la inyección en la vena de la cola de 10 millones de células en 0,1 mL de HBSS. Cuarenta ratones se seleccionaron aleatoriamente, y se inscribieron en el estudio 28 días después del implante, con un conteo de fotones promedio (vista dorsal + vista ventral) de aproximadamente 5x10<sup>7</sup> fotones/segundo, como se determinó mediante las imágenes de bioluminiscencia. Aproximadamente 10 minutos antes de tomar las imágenes, los ratones se inyectaron en forma intraperitoneal con 150 mg / kg de luciferina (Xenogen Corporation, Alameda, CA), seguidos por anestesia con isoflurano. La emisión de fotones se midió utilizando una cámara de un dispositivo acoplado de carga en el sistema de toma de imágenes IVIS (Xenogen Corporation). En resumen, se capturó una imagen en escala de grises de los ratones, seguida por una superposición de un mapa de bioluminiscencia que representaba la distribución espacial de los fotones detectados a partir de la luciferina dissociada en las células cancerosas que expresaban la luciferasa. La intensidad de la señal se cuantificó utilizando una versión personalizada del software IGOR Pro versión 4.09A (WaveMetrics, Inc., Lake Oswego, OR), denominada Living Image versión 2.50.2 (Xenogen). Se determinó la suma de todos los recuentos de fotones detectados a partir de las vistas dorsal + ventral. La bioluminiscencia de las células cancerosas en los animales se midió tomando imágenes en los días designados, hasta que el primer ratón desarrolló parálisis del miembro trasero debido a la carga de la enfermedad, el punto final principal para cuando se sacrifican humanitariamente los ratones. Se registró el día de la eutanasia para cada ratón, y se graficó el porcentaje restante de ratones sobrevivientes con el tiempo (análisis de supervivencia de Kaplan-Meier). Los valores P se calcularon utilizando la prueba log-rank (Software Graph Pad Prism 4.0), para evaluar las diferencias entre los grupos tratados y de control (p < 0,05 se consideró significativo). Los pesos corporales se midieron dos veces por semana, y las observaciones clínicas se registraron diariamente. Los pesos corporales se capturaron y se almacenaron mediante el software StudyDirector (StudyLog, South San Francisco, CA). El análisis de datos se llevó a cabo como se describió anteriormente.

Resultados, modelo de tumor subcutáneo: Los estudios de eficacia en el modelo de tumor subcutáneo se realizaron para comparar la actividad de un intervalo de dosis del compuesto Ila administrado q4d x 3. En el primer estudio, se evaluaron las dosis más altas toleradas en los ratones nu/nu; 4 mg / kg del compuesto Ila, 15 mg / kg de SB-715992, y 30 mg / kg de paclitaxel. A los 4 ratones restantes con tumores se les administraron 0.625 mg / kg de inhibidor de KSP en el mismo programa. Los resultados se muestran en la Tabla 8. Se observaron regresiones de los tumores en todos los grupos de tratamiento durante el intervalo de dosificación, con 9/9, 6/9, y 7/9 ratones con regresiones tumorales completas sostenidas (CR) durante más de 100 días en los grupos tratados con las dosis altas del compuesto Ila, SB-715992, y paclitaxel, respectivamente. Aunque los tumores tuvieron regresión en el grupo tratado con 0,625 mg / kg del compuesto Ila, crecieron nuevamente aproximadamente 10 días después de la última dosis. Las dosis de los agentes de prueba fueron en general bien toleradas con una pérdida de peso media máxima <10%, aunque 2 ratones perdieron >20% del peso corporal en el grupo tratado con SB715992.

Tabla 8 - Eficacia del Compuesto Ila administrado en un programa de dosificación q4d x 3 en el modelo de xenoinjerto de tumor MV4;11 subcutáneo

Compuesto	Programa de dosis, ruta	Respuesta del tumor				Respuesta del huésped			
		$\Delta T/\Delta C$ , Día 24 (%)	Regresión máxima en % (Día)	$\Delta$ del volumen del tumor, Día 24 (mm <sup>3</sup> )	CR	$\Delta$ máximo de peso corporal (Día) (g)	$\Delta$ máximo de peso corporal (Día) (%)	Superviv (vivos / total)	
Vehículo (20% de Captisol)	q4d x 3, i.v.	100	-	911 ± 101	0	0,23 ± 0,3 (D10)	1 ± 1,4 (D10)	9/9	
COMPUESTO Ila	0.625 mg/kg, q4d x 3, i.v.	-	69 (D10)	-32 ± 172	0	-0,5 ± 1,3 (D7)	-1,7 ± 5,0 (D7)	4/4	
COMPUESTO Ila	4 mg/kg, q4d x 3, i.v.	-	100, (D60)	-176 ± 31	9	-1,5 ± 0,4 (D10)	-5,9 ± 1,6 (D10)	9/9	
SB-715992	15 mg/kg, q4d x 3, i.v.	-	98 (D60)	-211±28	6	-1,4 ± 0,3 (D3)	-5,6± 1,1 (D3)	7/9 (pérdida de peso corporal)	
Paclitaxel	1 mg/kg, q4d x 3, i.p.	-	75 (D46)	-151 ± 63	7	0,4 ± 0,3 (D10)	0,4 ± 1,1 (D10)	9/9	

- 5 El segundo estudio de eficacia en el modelo de tumor subcutáneo se realizó comparando la actividad de un intervalo de dosis bajas del compuesto Ila administrado q4d x 3. La dosis más alta utilizada fue de 2 mg / mg, que es la mitad de la dosis más alta tolerada en los ratones sin pelo. La actividad del compuesto Ila se comparó con SB715992 a razón de 7,5 mg / kg, que es la mitad de su dosis más alta tolerada. Los resultados se muestran en la Tabla 9 y en la Figura 2. Se observó la regresión del tumor para diferentes grados en las dosis de 0,5, 1 y 2 mg / kg del compuesto Ila, y de 1,75, 3,5, y 7,5 mg / kg de SB-715992. A los 5 días después de la última dosis, los tumores empezaron a crecer en los grupos tratados con 0,5 mg / kg del compuesto Ila y con 1,75 mg / kg de SB-715992. Luego, a los 30 días después de la dosificación, los tumores empezaron a crecer en el grupo tratados con 7,5 mg / kg de SB-715992. Las dosis de 1 y 2 mg / kg del compuesto Ila provocaron regresiones de largo plazo, con 6 y 5 regresiones tumorales completas durante más de 100 días, respectivamente. Las dosis de los agentes de prueba fueron en general bien toleradas, con una pérdida de peso media máxima <10%.

Tabla 9 - Estudio 2: Resumen de la eficacia antitumoral y tolerabilidad del Compuesto Ila contra tumores de xenoinjerto subcutáneo de LMA humana MV4;11

Compuesto	Programa de dosis, ruta	Respuesta del tumor				Respuesta del huésped			
		$\Delta T/\Delta C$ , Día 21 (%)	Regresión máxima en % (Día)	$\Delta$ del volumen del tumor, Día 21 (mm <sup>3</sup> )	CR	$\Delta$ máximo de peso corporal (Día) (g)	$\Delta$ máximo de peso corporal (Día) (%)	Superviv (vivos / total)	
Vehículo (20% de Captisol)	q4d x 3, i.v.	100	-	574 ± 84	0	0,3 ± 0,24 (D10)	1,1 ± 0,9 (D10)	9/9	
COMPUESTO Ila	0.13 mg/kg, q4d x 3, i.v.	161	-	921 ± 341	0	-0,6 ± 1,0 (D10)	2,3 ± 1,7 (D10)	9/9	
COMPUESTO Ila	0.25 mg/kg, q4d x 3, i.v.	133	-	765 ± 196	0	0,2 ± 0,14, (D10)	0,64 ± 0,5 (D10)	9/9	
COMPUESTO Ila	0.5 mg/kg, q4d x 3, i.v.	20	55 (D10)	114 ± 1 10	0	-0,6 ± 0,24 (D7)	-2,5 ± 0,8 (D7)	9/9	
COMPUESTO Ila	1 mg/kg, q4d x 3, i.v.	-	89 (D63)	-194 ± 27	6	-0,3 ± 0,2 (D7)	-1,1 ± 0,7 (D7)	9/9	

(continuación)

Compuesto	Programa de dosis, ruta	Respuesta del tumor				Respuesta del huésped		
		$\Delta T / \Delta C$ , Día 21 (%)	Regresión máxima en % (Día)	$\Delta$ del volumen del tumor, Día 21 (mm <sup>3</sup> )	CR	$\Delta$ máximo de peso corporal (Día) (g)	$\Delta$ máximo de peso corporal (Día) (%)	Superviv (vivos / total)
COMPUESTO Ila	2 mg/kg, q4d x 3, i.v	-	87 (D63)	-201 ± 23	5	-0,1 ± 0,14 (D3)	-0,4 ± 0,6 (D3)	9/9
SB-715992	1.8 mg/kg, Q4dx3, i.v	59	-	339 ± 218	0	0,5 ± 0,4 (D10)	2,0 ± 1,0 (D10)	9/9
SB-715992	3.5 mg/kg, Q4dx3, i.v	44	41 (D10)	251 ± 132	0	0,2 ± 0,3 (D3)	0,7 ± 0,3 (D3)	9/9
SB-715992	7.5 mg/kg, Q4dx3, i.v	-*	75 (D31)	-204 ± 20	3	-0,4 ± 0,8 (D10)	-1,4 ± 1,3 (D10)	9/9

5 Resultados, modelo de enfermedad de LMA diseminada: Se evaluó la actividad del compuesto Ila en un modelo de enfermedad de AML diseminada de V4;11-luc, en donde se implantaron células tumorales en forma intravenosa. La administración del tratamiento se inició 28 días después del implante celular, momento en el cual los animales están en una etapa avanzada de la enfermedad, como se indica por la extensa señal de bioluminiscencia. Los resultados se muestran en la Tabla 10. En la toma inicial de imágenes, se observó la señal de bioluminiscencia en el hueso (mandíbula, cráneo, columna vertebral, y huesos largos), pero también se diseminó a través de todo el cuerpo, incluyendo el pulmón y el hígado. Por consiguiente, posteriormente se registró la emisión de fotones a partir de todo el cuerpo (vistas dorsal + ventral). Estas lesiones condujeron finalmente a parálisis de las extremidades posteriores, con una pérdida de peso corporal significativa ocasional debido a la carga tumoral, momento en el cual los ratones se sacrificaron. Esto se denominó como "supervivencia condicional".

10 El monitoreo serial del cuerpo entero de la emisión de fotones de MV4;11-luc en los ratones se realizó hasta que el primer ratón sucumbió a la enfermedad, lo cual sucedió después del día 12 del estudio. Las dosis de 0,5 y 1 mg / kg del compuesto Ila administradas q4d x 3, redujeron de una manera significativa la señal de bioluminiscencia, comparable con el grupo tratado con vehículo (p < 0,05), una medida de la carga de la enfermedad, mientras que el efecto del tratamiento con 0,25 mg / kg no fue significativamente diferente de aquél del vehículo. El compuesto Ila fue bien tolerado en estas dosis. El compuesto Ila retardó de una manera significativa la inducción de parálisis de las extremidades posteriores, y mejoró la supervivencia de los ratones con las tres dosis, comparable con la cohorte tratada con vehículo (p < 0,05). La supervivencia media en el grupo tratado con vehículo fue de 15 días, mientras que aquélla de los grupos tratados con 0,25, 0,5, y 1 mg / kg del compuesto Ila fue de 27, 31, y 30 días, respectivamente. La reducción dependiente de la dosis temprana en la carga tumoral (bioluminiscencia) que ocurrió durante el tiempo de la dosificación, no se tradujo en un incremento dependiente de la dosis en la supervivencia. Parece que una vez que empeoró el efecto del compuesto, la enfermedad progresó rápidamente en todos los grupos.

Tabla 10 - Eficacia del Compuesto Ila administrado en un programa de dosificación q4d x 3 en el modelo de enfermedad diseminada MV4;11.

Compuesto	Programa de dosis, ruta	Respuesta del tumor				Respuesta del huésped	
		$\Delta T / \Delta C$ , Día 12 (%)	Regresión, Día 12 (%)	$\Delta$ de bioluminiscencia del tumor, Día 12 (fotones / s)	Mediana de los días de supervivencia	$\Delta$ máxima de peso corporal (Día) (g)	$\Delta$ máxima de peso corporal (Día) (%)
Vehículo (20% de Captisol)	q4d x 3, i.v.	100	-	$9,2 \times 10^8 \pm 2,6 \times 10^6$	15	-0,64 ± 0,16 (D6)	-3,6 ± 0,92 (D6)
COMPUESTO Ila	0.25 mg/kg, q4d x 3, i.v	46	-	$4,3 \times 10^8 \pm 2,0 \times 10^8$	27**	1,1 ± 0,44 (D5)	5,6 ± 1,3 (D5)
COMPUESTO Ila	0.5 mg/kg, q4d x 3, i.v	-	9*	$-4,0 \times 10^6 \pm 1,3 \times 10^7$	31**	-0,57 ± 0,45 (D10)	-2,6 ± 2,3 (D10)

(continuación)

Compuesto	Programa de dosis, ruta	Respuesta del tumor				Respuesta del huésped	
		$\Delta T / \Delta C$ , Día 12 (%)	Regresión, Día 12 (%)	$\Delta$ de bioluminiscencia del tumor, Día 12 (fotones / s)	Mediana de los días de supervivencia	$\Delta$ máxima de peso corporal (Día) (g)	$\Delta$ máxima de peso corporal (Día) (%)
COMPUESTO Ila	1 mg/kg, q4d x 3, i.v	-	80*	$-3,9 \times 10^7 \pm 1,4 \times 10^7$	30**	$-0,77 \pm 0,32$ (D10)	$-4,2 \pm 1,7$ (D10)

**Ejemplo 11:** Evaluación de la eficacia de los inhibidores de KSP en xenoinjertos de tumor KMS-11-luc de mieloma múltiple humano

Se evaluó la eficacia del compuesto Ila contra xenoinjertos de tumor KMS-11-luc de mieloma múltiple humano. Primero se probó la eficacia en un modelo de xenoinjerto de tumor subcutáneo en ratones con esta línea, en donde el compuesto Ila indujo un efecto antitumoral notorio. Debido a que el microambiente de la médula ósea juega un papel importante en el crecimiento y la supervivencia de las células de mieloma, se evaluó adicionalmente la efectividad en un modelo de la enfermedad diseminada KMS-11-luc en ratones, en donde las células preferencialmente se establecen y crecen en el sitio ortotópico de la médula ósea. La expresión del gen reportero de luciferasa en las células permitió monitorear de una manera comprensiva en serie el crecimiento de las lesiones de mieloma en el hueso, mediante la toma de imágenes de bioluminiscencia.

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando ratones hembras SCID-Beige inmunodeficientes de aproximadamente 7 a 8 semanas de edad (Charles River Laboratories, Wilmington, MA). A su llegada, los animales recibieron un implante de microchip subcutáneo (AVID, Folsom, LA) en la región subescapular, para la identificación de los individuos. Se dejó que los animales se aclimataran durante una semana antes de iniciar cualquiera de los procedimientos experimentales. El cuidado animal de rutina y la garantía de bienestar fueron como se describió anteriormente.

Las células de mieloma múltiple KMS-11-luc humano se obtuvieron a través del laboratorio de Suzanne Trudel en la Universidad de Toronto (Ontario, Canadá), y se comprobó que estaban libres de Mycoplasma sp. y de virus de murino, en el panel de ensayo de PCR IMPACT1 (RADIL, Universidad de Missouri, Columbia, MO). Antes de que se recibiera esta línea celular, se había modificado por ingeniería genética en forma estable para expresar la luciferasa, mediante transfección retroviral del vector pGC-gfp/luc. Las células KMS-11-luc se cultivaron en un medio de Iscove complementado con 2 mmoles / L de L-glutamina (Mediatech, Inc., Hemdon, VA), y suero bovino fetal al 10% (JRH Biosciences, catálogo # 12003-1000M). Estas células se cultivaron como cultivos en suspensión, mantenidos a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía dióxido de carbono al 5%. Las células se cultivaron por lo menos durante 10 pasadas antes de usarse. Las células se cosecharon aproximadamente a razón de 2 millones de células/mL, y se centrifugaron a aproximadamente 800 x g durante 5 minutos a 4 °C, y luego se volvieron a suspender en una mezcla en proporción 1:1 de solución salina balanceada de Hank fría (HBSS) y Matrigel<sup>MR</sup> (Mediatech, Inc., catálogo # 2-O21-CV; BD Biosciences, catálogo # 354234, respectivamente), en una concentración de 50 millones de células / mL para el implante subcutáneo (volumen de inyección de 0,2 mL). Alternativamente, para el modelo de la enfermedad diseminada, las células se prepararon solamente en HBSS frío, en una concentración de 100 millones de células / mL para el implante intravenoso (i.v.) por medio de la vena de la cola (volumen de inyección de 0,1 mL).

El compuesto Ila y el SB-715992 (base libre) se formularon en Captisol al 20 %, para un volumen de dosis de 8 mL / kg. Las dosis se ajustaron al peso corporal de cada animal. Las formulaciones se hicieron una vez al principio del estudio, y se guardaron a temperatura ambiente. El paclitaxel de grado clínico se adquirió previamente mezclado en un vehículo basado en cremóforo (Mayne Pharma, ahora Hospira, Lake Forest, IL, catálogo # NDC-6170334209), y se diluyó en suero estéril para proporcionar un volumen de dosis de 16 mL / kg, para una dosis de 30 mg / kg administrada en forma intraperitoneal.

Para la evaluación de eficacia en el modelo de tumor subcutáneo, se inyectaron en forma subcutánea 10 millones de células combinadas en una mezcla en proporción 1:1 de HBSS y Matrigel<sup>MR</sup> en el costado derecho, en un volumen total de 200 mL / ratón. Los ratones se seleccionaron en forma aleatoria 11 días después del implante, y se inscribieron 54 ratones con un volumen tumoral promedio de aproximadamente 140 mm<sup>3</sup>. Los xenoinjertos de tumores se midieron en dos dimensiones (L x A) con calibradores digitales dos veces por semana desde el inicio de la dosificación en el Día 0. El volumen del tumor se calculó como (L x A<sup>2</sup>)/2. Los pesos corporales se midieron dos veces por semana, y las observaciones clínicas se registraron diariamente. El volumen del tumor y los pesos corporales se capturaron y se almacenaron mediante el software StudyDirector (StudyLog, South San Francisco, CA). El análisis de datos fue como se describió anteriormente.

Para la evaluación de eficacia en el modelo de la enfermedad diseminada, se inyectaron en forma intravenosa 10 millones de células en HBSS por medio de la vena de la cola, en un volumen total de 100 mL / ratón. Cuarenta ratones se seleccionaron en forma aleatoria, y se inscribieron en el estudio 10 días después del implante, con un conteo de fotones medio en los huesos de la pata (derecha + izquierda) de aproximadamente  $9 \times 10^5$  fotones/segundo, como se determinó mediante la toma de imágenes de bioluminiscencia. Aproximadamente 10 minutos antes de tomar las imágenes, se inyectaron los ratones en forma intraperitoneal con 150 mg / kg de luciferina (Xenogen Corporation, Alameda, CA), seguido por anestesia con isoflurano. La emisión de fotones se midió utilizando una cámara de un dispositivo acoplado de carga en el sistema de toma de imágenes IVIS (Xenogen Corporation). En resumen, se capturó una imagen en escala de grises de los ratones, seguida por una superposición de un mapa de bioluminiscencia que representaba la distribución espacial de los fotones detectados a partir de la luciferina disociada en las células cancerosas que expresaban la luciferasa. La intensidad de la señal se cuantificó utilizando una versión personalizada del software IGOR Pro versión 4.09A (WaveMetrics, Inc., Lake Oswego, OR), denominada Living Image versión 2.50.2 (Xenogen). Se determinó la suma de todos los recuentos de fotones detectados a partir de las vistas dorsal + ventral. La bioluminiscencia de las células cancerosas en los animales se midió tomando imágenes en los días designados, hasta que el primer ratón desarrolló parálisis del miembro trasero debido a la carga de la enfermedad, el punto final principal para cuando se sacrifican humanitariamente los ratones. Se registró el día de la eutanasia para cada ratón, y se graficó el porcentaje restante de ratones sobrevivientes con el tiempo (análisis de supervivencia de Kaplan-Meier). Los valores P se calcularon utilizando la prueba log-rank (Software Graph Pad Prism 4.0), para evaluar las diferencias entre los grupos tratados y de control ( $p < 0,05$  se consideró significativo). Los pesos corporales se midieron dos veces por semana, y las observaciones clínicas se registraron diariamente. Los pesos corporales se capturaron y se almacenaron mediante el software StudyDirector (StudyLog, South San Francisco, CA). El análisis de datos se llevó a cabo como se describió anteriormente.

Resultados, modelo de xenoinjerto de tumor KMS-11-luc subcutáneo: El estudio de eficacia en el modelo de tumor subcutáneo evaluó la actividad de un intervalo de dosis del compuesto Ila administradas en el programa q4d x 3, con una dosis alta de 1 mg / mg, que es aproximadamente la mitad de su más alta dosis tolerada en los ratones SCID-Bg. La actividad del compuesto Ila se comparó con la del SB-715992 (Ispinesib, un inhibidor de KSP de Cytokinetics que está en estudios clínicos) a la mitad de su más alta dosis tolerada de 7,5 mg / kg, y el paclitaxel en su más alta dosis tolerada de 30 mg / kg 24d x 3. Los resultados se muestran en la Tabla 11. Se observó regresión del tumor hasta diferentes grados en todos los grupos de tratamiento durante el intervalo de dosificación; sin embargo, el crecimiento tumoral se reasumió después de terminar la dosificación. El nuevo crecimiento tumoral empezó más pronto, y procedió más rápidamente, en los ratones tratados con las dosis más bajas del compuesto Ila. A los 8 días después del final del tratamiento, se observó el nuevo crecimiento tumoral en los grupos tratados con paclitaxel y con 0,5 mg / kg del compuesto Ila. A los 13 días después del tratamiento, se observó el nuevo crecimiento tumoral en el grupo tratado con 0,5 mg / kg del compuesto Ila. Las dosis de 1 mg / kg de compuesto Ila y de 7,5 mg / kg de SB-715992 dieron como resultado la máxima regresión de los tumores KMS-11-luc en un 56% y en un 49% ( $p < 0,05$ ), respectivamente, y no se presentó un nuevo crecimiento tumoral hasta aproximadamente 4 semanas después del final del tratamiento. Las dosis de los agentes de prueba fueron en general bien toleradas, con una pérdida de peso promedio máxima de  $<10\%$ , con la excepción de la dosis de 1 mg / kg del compuesto Ila, que dio como resultado una pérdida de peso corporal promedio del 12% a los 10 días después del inicio de la dosificación. Un ratón de este grupo perdió el 20% del peso corporal, y se removió del estudio. Todos los demás ratones de ese grupo se recuperaron de cualquier pérdida de peso corporal después de la última dosis.

Tabla 11 - Eficacia del Compuesto Ila administrado en un programa de dosificación q4d x 3 en el modelo de xenoinjerto de tumor KMS-11-luc subcutáneo.

Compuesto	Programa de dosis, ruta	Respuesta del tumor			Respuesta del huésped		
		T/C, Día 31 (%)	Regresión máxima en % (Día)	$\Delta$ del volumen del tumor, Día 31 (mm <sup>3</sup> )	$\Delta$ máximo de peso corporal (Día) (g)	$\Delta$ máximo de peso corporal (Día) (%)	Superviv. (vivos / total)
Vehículo (20% de Captisol)	Q4d x 3, i.v.	100	-	2150 $\pm$ 191	0,31 $\pm$ 0,33 (D10)	1,74 $\pm$ 1,37 (D10)	9/9
COMPUESTO Ila	0. 25 mg/kg, Q4d x 3, i.v	25	24 (D7)	527 $\pm$ 152	-1,4 $\pm$ 1,2, (D10)	-6,68 $\pm$ 1,67 (D10)	9/9
COMPUESTO Ila	0.5 mg/kg, Q4d x 3, i.v	10	42 (D10)	221 $\pm$ 71	-0,94 $\pm$ 0,3 (D10)	4,58 $\pm$ 1,67 (D10)	9/9

(continuación)

Compuesto	Programa de dosis, ruta	Respuesta del tumor			Respuesta del huésped		
		T/C, Día 31 (%)	Regresión máxima en % (Día)	Δ del volumen del tumor, Día 31 (mm <sup>3</sup> )	Δ máximo de peso corporal (Día) (g)	Δ máximo de peso corporal (Día) (%)	Superviv. (vivos / total)
COMPUESTO Ila	1 mg/kg, Q4d x 3, i.v	0,1*	56 (D17)	1,5 ± 26	-2,76 ± 0,65 (D10)	-12,69 ± 5,0 (D10)	8/9
SB-715992	7.5 mg/kg, Q4dx3, i.v.	-* (D14)	49, (D14)	-46 ± 19	-0,96 ± 0,31 (D10)	-4,8 ± 1,93 (D10)	9/9
Paclitaxel	30 mg/kg, Q4dx3, i.p.	30	5 (D3)	640 ± 190	-0,63 ± 0,22 (D3)	-2,95 ± 1,0 (D10)	9/9

5 Resultados del modelo de tumor KMS-11-luc diseminado: El tratamiento con el fármaco se inició 10 días después del implante celular. Las imágenes de bioluminiscencia mostraron una señal incrementada a través del tiempo en el grupo tratado con vehículo, sugiriendo la localización en las regiones fuera de la región esquelética, incluyendo pulmón, hígado, y bazo. Sin embargo, la señal de bioluminiscencia predominante pareció ser esquelética, con múltiples fuentes de señal, incluyendo los huesos largos, el cráneo, las raíces de los dientes/mandíbula, pelvis, y columna vertebral, en la mayoría de los ratones. Los análisis histológicos de los fémures recolectados de los estudios anteriores con este modelo, han confirmado la infiltración de las células de mieloma hacia la médula ósea (Xin y colaboradores, 2006 Clin. Cancer Res. Aug. 15; 12(16): 4908 - 15). El progreso de la enfermedad condujo a parálisis de las extremidades posteriores, con una pérdida de peso corporal significativa ocasional debida a la carga tumoral, en cuyo momento, los ratones se sacrificaron humanitariamente. Esto se denominó como "supervivencia condicional".

10 Los resultados se muestran en la Tabla 12. Las dosis de 0,5 y 1 mg / kg del compuesto Ila administradas q4d x 3, redujeron de una manera significativa la señal de bioluminiscencia, una medida de la carga global de la enfermedad; sin embargo, el grupo tratado con 0,25 mg / kg no fue estadísticamente diferente del grupo tratado con vehículo. El porcentaje de regresión de la señal del 47% el día 13 de los ratones tratados con la dosis de 1 mg / kg, fue acompañado por una pérdida de peso corporal de >20% el día 13 en un ratón de este grupo. Todos los demás animales de ese grupo toleraron esta dosis. En las dosis más bajas, el compuesto Ila fue bien tolerado.

15 Esta inhibición dependiente de la dosis de la carga de la enfermedad, medida mediante bioluminiscencia, dio como resultado una demora similar en la parálisis de las extremidades posteriores, y por lo tanto, una mejor supervivencia condicional de los ratones, comparable con la cohorte tratada con vehículo en todos los grupos. La supervivencia media en el grupo tratado con vehículo fue de 19 días, mientras que aquella del grupo tratado con 0,25, 0,5, y 1 mg / kg del compuesto Ila fue de 29, 35, y 52 días, respectivamente.

Tabla 12 - Eficacia del Compuesto Ila administrado en un programa de dosificación q4d x 3 en el modelo de enfermedad diseminada KMS-11-luc.

Compuesto	Programa de dosis, ruta	Respuesta del tumor				Respuesta del huésped	
		T/C, Día 13 (%)	Regresión, Día 13 (%)	Δ de bioluminiscencia del tumor, Día 13 (fotones / s)	Mediana de los días de supervivencia	Δ máxima de peso corporal (Día) (g)	Δ máxima de peso corporal (Día) (%)
Vehículo (20% de Captisol)	q4d x 3, i.v.	100	-	$1,5 \times 10^8 \pm 1,8 \times 10^7$	19**	1,3 ± 0,19 (D14)	5,9 ± 1,04 (D14)
COMPUESTO Ila	0,25 mg/kg, q4d x 3, i.v.	15	-	$2,2 \times 10^7 \pm 1,1 \times 10^6$	29**	2,1 ± 1,23 (D14)	5,0 ± 2,0 (D14)
COMPUESTO Ila	0,5 mg/kg, q4d x 3, i.v.	0,7*	-	$1,1 \times 10^6 \pm 5,8 \times 10^5$	35**	2,5 ± 0,23 (D14)	6,7 ± 1,1 (D14)

(continuación)

Compuesto	Programa de dosis, ruta	Respuesta del tumor				Respuesta del huésped	
		T/C, Día 13 (%)	Regresión, Día 13 (%)	$\Delta$ de bioluminiscencia del tumor, Día 13 (fotones / s)	Mediana de los días de supervivencia	$\Delta$ máxima de peso corporal (Día) (g)	$\Delta$ máxima de peso corporal (Día) (%)
COMPUESTO Ila	1 mg/kg, q4d x 3, i.v.	-*	47	$-4,3 \times 10^5 \pm 1,7 \times 10^5$	52**	-0,74 $\pm$ 0,75 (D13)	-3,3 $\pm$ 4,0 (D13)

**Ejemplo 12:** Los compuestos de la Fórmula II son efectivos contra los tumores resistentes a fármacos

- 5 Los experimentos pre-clínicos *in vivo* han demostrado que los compuestos de la Fórmula II son inesperadamente superiores a los compuestos estructuralmente similares que no tengan un grupo hidroxilo o un grupo hidroxilo de profármaco en la fracción de acilo. Los modelos de tumor que expresan una bomba de flujo de salida, la glicoproteína P de membrana de plasma (P-gp), se analizaron para determinar su sensibilidad a los compuestos de la Fórmula II y a otros fármacos, incluyendo los compuestos estructuralmente similares que carecen del grupo hidroxilo (o del grupo aciloxi) que está presente en los compuestos de la Fórmula II. P-gp es un mecanismo de resistencia del tumor, y tal vez el ejemplo mejor entendido y más clásico de un mecanismo de resistencia al flujo de salida. Se seleccionó el modelo de xenoinjerto subcutáneo de carcinoma cervical humano KB8.5 para el cribado farmacológico y la posterior selección y evaluación de estos compuestos; corresponde a la línea celular KB3.1, y difiere solamente por tener la bomba de flujo de salida. Los compuestos de la Fórmula II se compararon con otros inhibidores de KSP, así como con el paclitaxel, que se sabe que es afectado por la P-gp. El estudio descrito en la presente invención demuestra que los compuestos de la Fórmula II (por ejemplo, los compuestos Ila y IIc) son eficaces *in vivo* contra un tumor que expresa P-gp, y que es resistente a otros fármacos, mientras que un compuesto similar de Fórmula II que carecía del grupo hidroxilo, no fue activo contra este tumor.

#### Materiales

20 Tabla - 1 Características del Animal

Especie	Cepa	Vendedor	Genero	Peso	Edad
Ratón ( <i>Mus musculus</i> )	nu/nu	Charles River, Hollister, CA	hembra	25 g	6 - 8 semanas

- 25 Los experimentos se llevaron a cabo utilizando ratones nu/nu atómicos producidos por mezcla de razas (Charles River Laboratories) de aproximadamente 6 a 8 semanas de edad. Cuando arribaron, los ratones recibieron un implante de microchip subcutáneo (AVID, Folsom, LA) en la región subescapular, para la identificación de los individuos. Se dejó aclimatarse a los ratones durante una semana antes de que se iniciara cualquier de los procedimientos experimentales.

#### Condiciones de Mantenimiento

- 30 Los ratones se alojaron a razón de 4 a 5 animales por jaula, en jaulas microaislantes de policarbonato transparente, con un ciclo de 12 horas de luz, 12 horas de oscuridad, a temperaturas de entre 70 y 80 grados Fahrenheit y con una humedad relativa del 30 - 70%. Se proporcionó alimento (croquetas para roedores de Purina) y agua al gusto.

#### Condiciones Experimentales

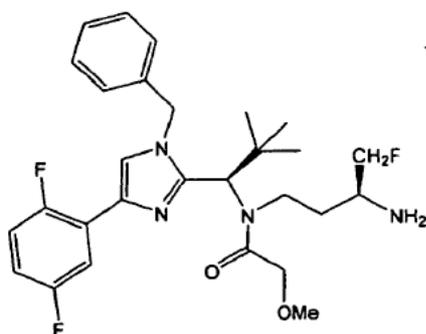
- 35 Las células KB8.5 se cultivaron en DMEM con L-glutamina 2 mM (Mediatech, catálogo # 10-013-CV) complementado con suero bovino fetal al 10% (JRH Biosciences, catálogo # 12003-1000M). Una vez que las células KB8.5 demostraron un buen índice de crecimiento, se agregaron 10 ng / mL de colchicina para mantener los niveles de expresión de P-gp.

Estas células se cultivaron como cultivos adherentes, se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía dióxido de carbono al 5%. Las células se cultivaron por lo menos durante 10 pasadas antes de usarse. Las células se cosecharon con una confluencia del 95%, y se centrifugaron aproximadamente a 800 x g durante 5 minutos a 4 °C, y luego se volvieron a suspender en una relación 1:1 de HBSS (Mediatech Inc., catálogo # 21-021-

CV) más Matrigel<sup>MR</sup> en una concentración de 25 millones de células / mL para el implante subcutáneo de la línea KB8.5 (volumen de inyección de 0,2 mL).

#### Compuestos y Formulaciones

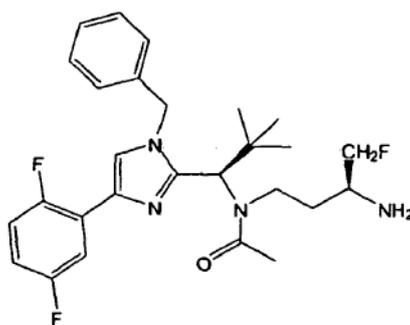
5 El compuesto Ila, el compuesto Iic, el compuesto Ia (mostrados más adelante), y el SB-715992, se formularon en una formulación basada en Captisol®. Las dosis se administraron en forma intravenosa (i. v.), y se ajustaron al peso corporal de cada animal. Las formulaciones se hicieron una vez al principio del estudio, y se guardaron a temperatura ambiente. El paclitaxel de grado clínico se adquirió previamente mezclado en un vehículo basado en cremóforo (Mayne Pharma, ahora Hospira, Lake Forest, IL, catálogo # NDC-6170334209), y se diluyó en suero estéril, para proporcionar un volumen de dosis de 16 mL / kg, para una dosis de 30 mg / kg administrada en forma intraperitoneal (i. p.):



Ia

15 El compuesto Ia es estructuralmente similar a los compuestos de Fórmula II, pero tiene un grupo metoxi en lugar de un grupo hidroxilo o de un grupo aciloxi, y su actividad *in vitro* contra la KSP es muy similar a las actividades de los compuestos Ila y Iic. Por ejemplo, en el ensayo de CellTiter-Glo®, el valor GI50 medido para el compuesto Ia sobre la célula HCT-15 fue de 0,3 nM, que es equivalente al del compuesto Ila (véase el Ejemplo 2). De una manera similar, se midió un valor de 0,4 nM para las líneas celulares KB3.1 y KB8.5 para el compuesto Ia, mientras que se midieron valores de 0,6 nM y de 0,5 nM para el compuesto Ila sobre estas mismas líneas (véase el Ejemplo 2). Sin embargo, los compuestos de la Fórmula II tienen un hidroxilo libre sobre el grupo acilo (o un grupo aciloxi que es un profármaco para un hidroxilo libre), mientras que el Ia tiene un metil éter en su lugar. El metil éter es bien tolerado por el sitio activo, como se demuestra por su actividad *in vitro*, y en particular también es muy efectivo sobre las líneas celulares resistentes a P-gp *in vitro*. Además, se podría esperar que sea menos susceptible a la activación metabólica que los compuestos de Fórmula II *in vivo*. En realidad, como lo ilustran los datos de la siguiente Tabla, la comparación de los parámetros farmacocinéticos muestra que el compuesto Ia exhibe una más alta exposición y una mayor estabilidad metabólica *in vivo*, que los compuestos de las Fórmulas Ila y Iic. De una manera sorprendente, aunque los compuestos de Fórmula II son convenientes *in vivo* en relación con los compuestos conocidos en la técnica anterior contra los cánceres que expresan P-gp, debido a que el cáncer de xenoinjerto resistente a P-gp fue sensible a los compuestos de la Fórmula II, pero no al Compuesto Ia.

30 En forma interesante, también se encontró que los compuestos de la Fórmula II son significativamente más eficaces que los compuestos que carecen completamente del hidroxilo, por ejemplo, un compuesto de la Fórmula Ib:



Ib

35 El compuesto Ib es mucho menos activo *in vitro* que los compuestos de la Fórmula II, que tienen una IC50 de 22 nM, comparado con los compuestos Ila y Iic, que cada uno tiene una IC50 menor a 1 nM. El compuesto Ib no se probó en

5 el modelo de xenoinjerto, debido a que su farmacocinética y su actividad *in vitro* eran demasiado desfavorables para esperar eficacia *in vivo*. Se había demostrado que tiene una disponibilidad *in vivo* mucho más baja, con base en los datos que muestran que exhibió una velocidad de eliminación más alta y una AUC más baja ("área debajo de la curva", una forma estándar de medir la exposición *in vivo* de un sujeto de prueba a un compuesto), y también fue mucho menos activo en el sitio objetivo, como se muestra por su IC50 más alta. En comparación, los compuestos la, lla, y llc, exhibieron cada uno mejores efectos farmacocinéticos *in vivo*, así como una actividad *in vitro* superior, y se probaron en el cáncer de xenoinjerto.

Compuesto	Actividad in vitro (IC50 - nm)	Tasa de eliminación <i>in vivo</i> (mL/min/kg)	Vida media <i>in vivo</i> (min)	AUC (ng-min/mL)
la	0,6	29	117	160.000
lb	22	94	90	52.000
lla	0,8	41	110	116.000
llc	0,9	47	110	102.000

10 Por lo tanto, los compuestos de la Fórmula II son más efectivos *in vitro* y son más persistentes *in vitro* que el Compuesto lb, e inesperadamente se demostró que son efectivos sobre los cánceres resistentes a fármacos que expresan una bomba de flujo de salida de resistencia a múltiples fármacos (RMF), mientras que el compuesto la fue inefectivo contra el mismo cáncer RMF, a pesar de su igual potencia sobre las líneas celulares de P-gp *in vitro*, y su más alta disponibilidad en el animal de prueba (velocidad de eliminación más baja y AUC más alta).

Métodos del estudio

20 Para los estudios de eficacia, se inscribieron los ratones con un volumen tumoral medio de aproximadamente 300 mm<sup>3</sup>. Los xenoinjertos de tumores se midieron en dos dimensiones (L x A) con calibradores digitales dos veces por semana desde el inicio de la dosificación en el Día 0. El volumen del tumor se calculó como (L x A<sup>2</sup>)/2. Los pesos corporales se midieron dos veces por semana, y las observaciones clínicas se registraron diariamente. El volumen del tumor y los pesos corporales se capturaron y se almacenaron mediante el software StudyDirector (StudyLog, South San Francisco, CA).

Análisis de Datos

25 Se calcularon los valores de porcentaje de tratamiento/control ( $\Delta T/\Delta C$ ) para los volúmenes tumorales, utilizando la siguiente Fórmula:

$$\% \Delta T/\Delta C = 100 \times \Delta T/\Delta C$$

en donde:

T = volumen promedio del tumor del grupo tratado con fármaco el día final del estudio;

30  $\Delta T$  = volumen promedio del tumor del grupo tratado con fármaco el día final del estudio - volumen medio del tumor del grupo tratado con fármaco el día inicial de la dosificación;

C = volumen promedio del tumor medio del grupo de control en el día final del estudio; y

$\Delta C$  = volumen promedio del tumor del grupo de control el día final del estudio - volumen promedio del tumor del grupo de control el día inicial de la dosificación.

35 Todos los datos se expresaron como la media y SEM. Se llevaron a cabo comparaciones entre grupos para las mediciones finales de los tumores, utilizando un análisis por pares de ANOVA de una vía. La significancia se determinó utilizando el ANOVA de una vía de Kruskal-Wallis en Ranks, seguido por una prueba post-hoc (método de Dunn para la prueba de Tukey) para múltiples comparaciones por pares. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando SigmaStat (Systat Software Inc., San José, CA).

Evaluaciones de eficacia en los modelos de xenoinjerto que expresan P-gp.

40 Se condujeron estudios de eficacia de múltiples dosis, con la misma dosis de 5 mg / kg, en un programa q4d x 3 en estos modelos, comparando la actividad del compuesto lla y el compuesto la. Para el compuesto llc, no se toleró bien la dosis de 2,5 mg / kg, y de esta manera, la comparación de efectividad fue con el nivel de dosis de 1,25 mg / kg. Los resultados en la Figura 3 y de la Tabla 13 indican que el Compuesto lla demuestra una eficacia antitumoral

significativa en el modelo, con un porcentaje  $\Delta T/\Delta C$  del 19 % ( $p < 0,05$ ) en el modelo de xenoinjerto KB8.5 en el día 11.

Tabla 13. Eficacia del Compuesto Ila administrado en un programa de dosificación q4d x 3 en un modelo de xenoinjerto de tumor KB8.5.

Compuesto	Programa de dosis, ruta	Respuesta del tumor	Respuesta del huésped	
		$\Delta T/\Delta C$ , Día 11 (%)	$\Delta$ máxima de peso corporal en %, (Día)	Supervivencia (vivos / total)
Vehículo	i.v., q4dx3	100	6 (D7)	9/9
Compuesto Ila	5 mg/kg, i.v., q4dx3	19*	-2 (D11)	9/9
SB-715992	15 mg/kg, i.v., q4dx3	56	4 (D7)	9/9
Paclitaxel	30 mg/kg, i.v., q4dx3	78	5 (D11)	9/9

Se establecieron las células KB8.5 en ratones nu/nu hembra (Charles River) mediante la inyección subcutánea de  $5 \times 10^6$  células en 0,2 mL de una relación 1:1 de HBSS más Matrigel<sup>MIR</sup> en el costado derecho de los ratones. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 300 mm<sup>3</sup>, se seleccionaron en forma aleatoria los ratones con base en los volúmenes tumorales, en los grupos de tratamiento ( $n = 9$ ). Los compuestos se administraron en los niveles de dosis y en los programas indicados. El efecto del tratamiento sobre los volúmenes tumorales y los pesos corporales se presenta como la media  $\pm$  SEM. El experimento se evaluó en el día 11 del tratamiento. \* $p < 0,05$  vs el vehículo y SB-715992 (ANOVA de una vía de Kruskal-Wallis sobre Ranks / Método de Dunn).

5 De la misma manera, los resultados de la Figura 4 y de la Tabla 14 indican que el compuesto Iic demuestra una eficacia antitumoral significativa en este modelo, con un porcentaje de  $\Delta T/\Delta C$  del 39% ( $p < 0,05$ ) en el día 11.

Tabla 14 - Eficacia del Compuesto Iic administrado en un programa de dosificación q4d x 3 en el modelo de xenoinjerto de tumor KB8.5.

Compuesto	Programa de dosis, ruta	Respuesta del tumor	Respuesta del huésped	
		$\Delta T/\Delta C$ , Día 11 (%)	$\Delta$ máxima de peso corporal en %, (Día)	Supervivencia (vivos / total)
Vehículo	i.v., q4dx3	100	+8 (D11)	9/9
Compuesto Iic	1,25 mg/kg, i.v., q4dx3	39*	-5 (D11)	9/9
Compuesto Iic	2,5 mg/kg, i.v., q4dx3	No aplicable	-10 (D8)	Todos muertos el Día 8 debido a que 4/9 ratones tenían 15% de pérdida de peso o más
SB-715992	15 mg/kg, i.v., q4dx3	77	-1 (D7)	9/9
Paclitaxel	30 mg/kg, i.v., q4dx3	87	+3 (D11)	9/9

Se establecieron las células KB8.5 en ratones nu/nu hembra (Charles River) mediante la inyección subcutánea de  $5 \times 10^6$  células en 0,2 mL de una relación 1:1 de HBSS más Matrigel<sup>MIR</sup> en el costado derecho de los ratones. Cuando los tumores alcanzaron un promedio de 339 mm<sup>3</sup>, se seleccionaron en forma aleatoria los ratones con base en los volúmenes tumorales, en los grupos de tratamiento ( $n = 9$ ). Los compuestos se administraron en los niveles de dosis y en los programas indicados. El efecto del tratamiento sobre los volúmenes tumorales y los pesos corporales se presenta como la media  $\pm$  SEM. El experimento se evaluó en el día 11 del tratamiento. \* $p < 0,05$  vs el vehículo (ANOVA de una vía de Kruskal-Wallis sobre Ranks / Prueba de Tukey).

10 En contraste, un compuesto similar que carecía de un hidroxilo sobre la fracción de acilo, y que tenía en su lugar un metoxi, el compuesto Ia, no fue eficaz en el modelo de xenoinjerto de tumor KB8.5, como se muestra en la Figura 5 Tabla 15.

15 Tabla 15 - Eficacia del Compuesto Ia administrado en un programa de dosificación q4d x 3 en modelos de xenoinjerto de tumor KB8.5.

Compuesto	Programa de dosis, ruta	Respuesta del tumor	Respuesta del huésped	
		$\Delta T/\Delta C$ , Día 11 (%)	$\Delta$ máxima de peso corporal en %, (Día)	Supervivencia (vivos / total)
Vehículo	i.v., q4dx3	100	4 (D11)	10/10
Compuesto Ia	1,25 mg/kg, i.v., q4dx3	84	1 (D11)	10/10
Compuesto Ia	2,5 mg/kg, i.v., q4dx3	61	-0,4 (D4)	10/10

(continuación)

Compuesto	Programa de dosis, ruta	Respuesta del tumor	Respuesta del huésped	
		$\Delta T/\Delta C$ , Día 11 (%)	$\Delta$ máxima de peso corporal en %, (Día)	Supervivencia (vivos / total)
Compuesto Ia	5 mg/kg, i.v., q4dx3	66	-2 (D4)	10/10
SB-715992	15 mg/kg, i.v., q4dx3	60	-3 (D11)	10/10
Paclitaxel	30 mg/kg, i.v., q4dx3	60	-2 (D4)	10/10

Se establecieron las células KB8.5 en ratones nu/nu hembra (Charles River) mediante la inyección subcutánea de  $5 \times 10^6$  células en 0,2 mL de una relación 1:1 de HBSS más Matrigel<sup>MR</sup> en el costado derecho de los ratones. Cuando los tumores alcanzaron un promedio de 285 mm<sup>3</sup>, se seleccionaron en forma aleatoria los ratones con base en los volúmenes tumorales, en los grupos de tratamiento (n = 10). Los compuestos se administraron en los niveles de dosis y en los programas indicados. El efecto del tratamiento sobre los volúmenes tumorales y los pesos corporales se presenta como la media  $\pm$  SEM. El experimento se evaluó en el día 11 del tratamiento. Ninguno de los grupos fueron estadísticamente diferentes del grupo del vehículo (ANOVA de una vía de Kruskal-Wallis sobre Ranks).

- 5 No se observó una pérdida de peso corporal significativa ni signos externos de toxicidad en ninguno de los ratones tratados, excepto por una pérdida de peso significativa en el grupo tratado con 2,5 mg / kg del compuesto IIc. La mayor actividad antitumoral que se observa en el modelo de KB8.5 positivo para P-gp demuestra una ventaja inesperada de los compuestos de la Fórmula II sobre un compuesto similar de la Fórmula I que carece de la función hidroxilo que caracteriza a los compuestos de la Fórmula II.

**Ejemplo 13:** Los compuestos de la Fórmula II son efectivos contra muchos explantes de tumor

- 10 Se probó el compuesto IIa contra un panel de líneas celulares y explantes de tumor en un ensayo de agar blando, como se describe en Fiebig, H. H., Maier, A., y Burger, A. M. (Clonogenic assay with established human tumour xenografts: correlation of in vitro to in vivo activity as a basis for anticancer drug discovery, Eur. J. Cancer 40, 802 - 820 (2004). La Tabla 16 enlista el tipo de cáncer, el número de la muestra, su valor GI<sub>50</sub> (la concentración necesaria para alcanzar una inhibición del 50 por ciento) en el ensayo, el logaritmo de la GI<sub>50</sub> (log(GI<sub>50</sub>)), y la sensibilidad relativa de cada muestra (Diferencial). El diferencial se calcula sustrayendo el log(GI<sub>50</sub>) para cada línea celular del log(GI<sub>50</sub>) promedio a través de todo el panel (0,236 en este caso); un valor positivo indica una muestra que es más sensible que el promedio, mientras que un valor negativo muestra que es menos sensible que el promedio.

- 20 La mayoría de las indicaciones tienen muestras que son sensibles. La mayoría de los cánceres sensibles basados en este ensayo son: cánceres hematológicos (leucemia y linfoma, 5/5), cáncer pulmonar de células pequeñas (SCLC; 5/5), de mama (7/10), de vejiga (4/6), y sarcomas (4/7).

Tabla 16 - Actividad del Compuesto IIa en diferentes líneas celulares de cáncer.

Tipo de cáncer	Muestra de tumor	GI <sub>50</sub> (nM)	log(GI <sub>50</sub> )	Diferencial
Leucemia (LLA)	CCRFCEM	0,287	-0,542	0,779
Leucemia (LLA)	JURKAT	0,106	-0,975	1,211
Leucemia (LMC)	K562	0,27	-0,569	0,805
Leucemia (LLA)	MOLT4	0,877	-0,057	0,293
Linfoma (LNH)	U937	0,086	-1,066	1,302
NSCLC	1012	0,926	-0,033	0,270
NSCLC	289	4,899	0,690	-0,454
NSCLC	526	1,265	0,102	0,134
NSCLC	629	10	1,000	-0,764
NSCLC	677	1,162	0,065	0,171
NSCLC	737	3,068	0,487	-0,250
NSCLC	1422	0,728	-0,138	0,374
NSCLC	211	0,216	-0,666	0,902
NSCLC	1176	3	0,477	-0,241
NSCLC	1647	16,752	1,224	-0,988
SCLC	538	0,339	-0,470	0,706
SCLC	573	0,587	-0,231	0,468
SCLC	615	0,082	-1,086	1,323
SCLC	650	0,376	-0,425	0,661
SCLC	H69	0,269	-0,570	0,807
Colorrectal	1034	0,214	-0,670	0,906

ES 2 459 442 T3

(continuación)

Tipo de cáncer	Muestra de tumor	GI <sub>50</sub> (nM)	log(GI <sub>50</sub> )	Diferencial
Colorrectal	1044	0,612	-0,213	0,450
Colorrectal	1103	1	0,000	0,236
Colorrectal	1299	10	1,000	-0,764
Colorrectal	1297	10	1,000	-0,764
Colorrectal	158	10	1,000	-0,764
Colorrectal	1729	10	1,000	-0,764
Colorrectal	1753	11,279	1,052	-0,816
Colorrectal	1788	2,246	0,351	-0,115
Colorrectal	1783	0,721	-0,142	0,378
Colorrectal	1784	5,969	0,776	-0,539
Colorrectal	233	0,238	-0,623	0,860
Colorrectal	243	10	1,000	-0,764
Colorrectal	260	10	1,000	-0,764
Colorrectal	268	6,24	0,795	-0,559
Colorrectal	280	10	1,000	-0,764
Colorrectal	504	0,273	-0,564	0,800
Colorrectal	533	1,753	0,244	-0,007
Colorrectal	609	10	1,000	-0,764
Colorrectal	647	10	1,000	-0,764
Colorrectal	676	10	1,000	-0,764
Colorrectal	742	1,873	0,273	-0,036
Colorrectal	94LX	19,52	1,290	-1,054
Colorrectal	975	10	1,000	-0,764
Melanoma	1341	10	1,000	-0,764
Melanoma	462	10	1,000	-0,764
Melanoma	989	12,722	1,105	-0,868
Ovario	1353	10	1,000	-0,764
Ovario	899	10,000	1,000	-0,764
Próstata	22RV1	0,537	-0,270	0,506
Próstata	DU145	1	0,000	0,236
Próstata	MRIH1579	10	1,000	-0,764
Próstata	PC3M	0,424	-0,373	0,609
Mama	1162	0,286	-0,544	0,780
Mama	1322	1,402	0,147	0,090
Mama	1384	2,666	0,426	-0,189
Mama	1398	0,239	-0,622	0,858
Mama	401	0,563	-0,249	0,486
Mama	449	0,534	-0,272	0,509
Mama	574	10	1,000	-0,764
Mama	583	0,239	-0,622	0,858
Mama	713	0,244	-0,613	0,849
Mama	857	2,456	0,390	-0,154
Vejiga	1036	0,115	-0,939	1,176
Vejiga	1218	0,509	-0,293	0,530
Vejiga	1228	0,315	-0,502	0,738
Vejiga	1258	17,076	1,232	-0,996
Vejiga	1352	0,972	-0,012	0,249
Vejiga	439	10	1,000	-0,764
Gástrico	1172	10	1,000	-0,764
Gástrico	209	10	1,000	-0,764
Gástrico	214	9	0,954	-0,718
Sarcoma	117	0,249	-0,604	0,840
Sarcoma	1186	0,327	-0,485	0,722
Sarcoma	1301	0,235	-0,629	0,865
Sarcoma	1410	2,246	0,351	-0,115
Sarcoma	417	0,16	-0,796	1,032
Sarcoma	463	19,122	1,282	-1,045
Sarcoma	627	10	1,000	-0,764

(continuación)

Tipo de cáncer	Muestra de tumor	GI <sub>50</sub> (nM)	log(GI <sub>50</sub> )	Diferencial
Páncreas	1657	26,952	1,431	-1,194
Páncreas	1861	0,623	-0,206	0,442
Páncreas	1869	10,865	1,036	-0,800
Páncreas	1876	0,337	-0,472	0,709
Páncreas	1872	0,282	-0,550	0,786
Páncreas	1881	2,316	0,365	-0,128
Páncreas	1887	10	1,000	-0,764
Páncreas	1900	16,933	1,229	-0,992
Páncreas	1912	0,112	-0,951	1,187
Páncreas	1937	0,185	-0,733	0,969
Páncreas	546	2,591	0,413	-0,177
Páncreas	736	1,265	0,102	0,134
	Media	1,724	0,236	

**Ejemplo 14:** Los compuestos de la Fórmula II son efectivos contra muchas líneas celulares de tumor sólido

5 Se probó el compuesto Ila contra un panel de líneas celulares derivadas a partir de tumores sólidos, como se describe en véase también McDermott, U., Sharma, S. V., Dowell, L., Greninger, P., Montagut, C., Lamb, J., Archibald, H., Raudales, FL, Tam, A., Lee, D., Rothenberg, S. M., Supko, J. G., Sordella, H., Ulkus, L.E., lafrate, A. J., Maheswaran, 8., Njauw, C. N., Tsao, H., Drew, L., Hanke, J. H., Ma, X. J., Erlander, M. G., Gray, N. S., Haber, D. A., y Settleman, J. (2007), Identification of genotype-correlated sensitivity to select/ve kinase inhibitors by using high-throughput tumor cell line profiling. Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 104, 19936 - 19941 (2007)). Las células se trataron con el compuesto durante 72 horas, y se reportó la fracción de células sobrevivientes, en comparación con un control no tratado. La Tabla 17 enlista el nombre de la línea celular, el órgano de origen, la fracción de células sobrevivientes en las tres concentraciones probadas (0,2 nM, 2,0 nM y 20 nM), y un puntaje de sensibilidad. El puntaje de sensibilidad era de 5 (las más sensibles) hasta 1 (las menos sensibles), y el puntaje fue como sigue: 5 = fracción sobreviviente  $\leq 0,2$  a 0,2 nM; 4 =  $0,2 < \text{fracción sobreviviente} \leq 0,5$  a 0,2 nM; 3 = fracción sobreviviente  $> 0,5$  a 0,2 nM, y  $\leq 0,5$  a 2,0 nM; 2 fracción sobreviviente  $> 0,5$  a 2,0 nM y  $\leq 0,5$  a 20 nM; 1 = fracción sobreviviente  $> 0,5$  a 20 nM.

20 Todas las indicaciones tienen muestras que son sensibles. Una de las muchas maneras posibles de clasificar estos cánceres por la sensibilidad, es calcular el puntaje de sensibilidad promedio para cada indicación (suma de puntajes de sensibilidad / número de muestras). Si se toman criterios muy estrictos utilizando un puntaje promedio de 3 o más, la mayoría de los cánceres sensibles basados en este ensayo son: ovario (3,38), estómago (3,32), cerebro (3,21), piel (3,02), cuello uterino (3,00), y tiroides (3,00).

Tabla 17 - Actividad del Compuesto Ila en diferentes líneas celulares de tumor sólido.

Línea celular	Órgano	0,2 nM	2,0 nM	20 nM	Sensibilidad
SCaBER	Vejiga	0,6666	0,0383	0,0238	3
1A6	Vejiga	0,9359	0,0473	0,0309	3
RT112/84	Vejiga	1,0884	0,0457	0,0312	3
5637	Vejiga	1,1044	0,0595	0,0423	3
EJ138	Vejiga	1,1072	0,0888	0,0712	3
RT-112	Vejiga	0,925	0,099	0,0915	3
SW 780	Vejiga	0,7289	0,091	0,0981	3
RT4	Vejiga	0,5091	0,1175	0,1008	3
T24	Vejiga	0,723	0,131	0,102	3
647-V	Vejiga	0,721	0,185	0,141	3
VM-CUB1	Vejiga	0,8161	0,1594	0,1497	3
SW-1710	Vejiga	0,7185	0,1353	0,1546	3
KU-19-19	Vejiga	0,9247	0,1929	0,1985	3
UM-UC-3	Vejiga	0,9804	0,2219	0,2074	3
BFTC-905	Vejiga	1,089	0,264	0,223	3
HT 1376	Vejiga	1,1586	0,2837	0,233	3
CAL-29	Vejiga	0,967	0,282	0,256	3
J82	Vejiga	0,7211	0,3475	0,2914	3
639-V	Vejiga	0,961	0,37	0,31	3
TCCSUP	Vejiga	1,0148	0,5876	0,4752	2
HT-1197	Vejiga	1,0133	0,9855	0,8308	1

ES 2 459 442 T3

(continuación)

Línea celular	Órgano	0,2 nM	2,0 nM	20 nM	Sensibilidad
CSR1	Hueso	0,2156	0,0818	0,0769	4
CS1	Hueso	0,4253	0,1844	0,1903	4
Hs 888.T	Hueso	0,4945	0,4138	0,3803	4
MHH-ES-1	Hueso	0,687	0,032	0,017	3
SK-ES-1	Hueso	0,9862	0,0606	0,0516	3
KHOS-240S	Hueso	0,925	0,071	0,065	3
Saos-2	Hueso	0,6146	0,118	0,1008	3
HOS	Hueso	1,033	0,078	0,118	3
RD-ES	Hueso	0,6036	0,2671	0,1397	3
KHOS-312H	Hueso	1,103	0,284	0,231	3
U-2 OS	Hueso	1,0283	0,241	0,2322	3
NY	Hueso	1,293	0,341	0,3	3
CAL-72	Hueso	0,9276	0,3256	0,3065	3
HuO-3N1	Hueso	0,9177	0,3533	0,3165	3
MG-63	Hueso	0,815	0,57	0,502	1
H-EMC-SS	Hueso	0,8996	0,604	0,5042	1
MC-IXC	Cerebro	0,079	0,047	0,033	5
SK-N-SH	Cerebro	0,1798	0,0495	0,0574	5
NB69	Cerebro	0,0922	0,0639	0,0662	5
Hs 683	Cerebro	0,4152	0,0858	0,0278	4
SK-N-AS	Cerebro	0,357	0,0895	0,0819	4
M059J	Cerebro	0,4307	0,1343	0,0874	4
SH-SY5Y	Cerebro	0,4428	0,1183	0,0946	4
Daoy	Cerebro	0,4727	0,0556	0,1088	4
MOG-G-CCM	Cerebro	0,2092	0,1363	0,1564	4
YKG-1	Cerebro	0,3102	0,1764	0,1624	4
CCF-STTG1	Cerebro	0,3804	0,3579	0,2861	4
GOS-3	Cerebro	0,4488	0,3264	0,2977	4
SK-N-MC	Cerebro	0,5584	-0,0017	-0,0048	3
U-251 MG	Cerebro	0,8575	0,0313	0,0321	3
BE(2)-C	Cerebro	0,757	0,0224	0,033	3
LNZTA3WT4	Cerebro	0,5274	0,0814	0,052	3
LNZTA3WT11	Cerebro	0,6268	0,0841	0,0567	3
T98G	Cerebro	0,6311	0,0972	0,0718	3
LN-229	Cerebro	0,7177	0,1241	0,0965	3
MOG-G-UVW	Cerebro	0,7682	0,1238	0,1114	3
H4	Cerebro	0,5851	0,1689	0,12	3
PFSK-1	Cerebro	0,5585	0,1428	0,1766	3
SW 1783	Cerebro	0,7547	0,2518	0,1872	3
SF-295	Cerebro	0,5622	0,2393	0,191	3
DK-MG	Cerebro	0,5941	0,228	0,1916	3
A172	Cerebro	0,6374	0,22	0,1923	3
GAMG	Cerebro	1,2891	0,2385	0,1923	3
1321N1	Cerebro	0,7485	0,2015	0,1977	3
CHP-212	Cerebro	0,946	0,267	0,216	3
LN-18	Cerebro	0,9918	0,238	0,2181	3
U-118 MG	Cerebro	0,9433	0,2612	0,2391	3
U373 MG	Cerebro	0,5474	0,307	0,2442	3
SW 1088	Cerebro	0,7941	0,242	0,2644	3
DBTRG-05MG	Cerebro	0,8442	0,387	0,2789	3
KG-1-C	Cerebro	0,9548	0,3391	0,3367	3
SCCH-26	Cerebro	0,8806	0,351	0,3398	3
42-MG-BA	Cerebro	0,9486	0,4389	0,3783	3
SNB-19	Cerebro	1,0241	0,4679	0,4543	3
IPTP/98	Cerebro	0,8158	0,3799	0,4603	3
GMS-10	Cerebro	0,9262	0,6735	0,5424	1
U-138 MG	Cerebro	0,8028	0,4448	0,5689	1
LN-405	Cerebro	1,046	0,6715	0,7525	1

ES 2 459 442 T3

(continuación)

Línea celular	Órgano	0,2 nM	2,0 nM	20 nM	Sensibilidad
AU565	Mama	0,1024	0,0539	0,0297	5
HCC1954	Mama	0,2453	0,0742	0,0831	4
Hs 578T	Mama	0,287	0,075	0,085	4
CAL-85-1	Mama	0,2062	0,1707	0,1396	4
EFM-192B	Mama	0,3565	0,2746	0,1884	4
EFM-19	Mama	0,4888	0,2428	0,2227	4
HCC1143	Mama	0,3856	0,2969	0,2799	4
MDA-MB-415	Mama	0,4378	0,2779	0,2826	4
MB 157	Mama	0,919	0,03	0,013	3
MDA-MB-468	Mama	0,826	0,131	0,104	3
MCF7	Mama	0,7312	0,1175	0,106	3
MDA-MB-453	Mama	0,9677	0,1497	0,128	3
HCC1806	Mama	0,63	0,157	0,135	3
HCC38	Mama	0,799	0,198	0,135	3
CAL-148	Mama	0,8879	0,1778	0,1446	3
MDA-MB-436	Mama	0,9257	0,235	0,1588	3
EVSA-T	Mama	0,8101	0,1921	0,1617	3
JIMT-1	Mama	1,0342	0,2107	0,2045	3
CAL-120	Mama	0,7606	0,3094	0,2346	3
CAL-51	Mama	1,0399	0,252	0,2391	3
HCC1569	Mama	0,8118	0,3757	0,2706	3
MDA-MB-435S	Mama	0,736	0,4	0,369	3
KPL-1	Mama	0,8294	0,4721	0,3691	3
HCC70	Mama	1,029	0,4525	0,3868	3
MDA-MB-361	Mama	0,51	0,4185	0,4945	3
EFM-192C	Mama	1,1771	0,5303	0,2644	2
MDA-MB-175-VII	Mama	0,9252	0,6705	0,4413	2
UACC-893	Mama	0,578	0,635	0,474	2
BT-474	Mama	1,7649	0,4043	0,4842	2
BT-549	Mama	0,7005	0,6093	0,5628	1
T47D	Mama	1,1392	0,657	0,6325	1
ZR-75-30	Mama	0,979	0,7094	0,6879	1
MT-3	Mama	0,8962	0,6827	0,704	1
BT-483	Mama	0,8449	1,114	0,8657	1
C-4I	Cuello uterino	0,3791	0,0476	0,0328	4
CAL-39	Cuello uterino	0,3382	0,1481	0,1479	4
C-33 A	Cuello uterino	0,916	0,0127	-0,006	3
SISO	Cuello uterino	0,7157	0,0163	-0,002	3
HeLa	Cuello uterino	0,7398	0,048	0,0072	3
MS751	Cuello uterino	0,6941	0,0256	0,0552	3
BT-B	Cuello uterino	0,788	0,0821	0,0657	3
ME-180	Cuello uterino	0,9997	0,1521	0,1564	3
Ca Ski	Cuello uterino	0,7077	0,2047	0,1791	3
SKG-IIIb	Cuello uterino	0,718	0,2701	0,2185	3
DoTc2 4510	Cuello uterino	0,9503	0,2981	0,2597	3
SW756	Cuello uterino	0,9509	0,371	0,3384	3
SiHa	Cuello uterino	0,5524	0,3919	0,3415	3
C-4 II	Cuello uterino	0,8416	0,4293	0,4254	3
HT-3	Cuello uterino	0,8834	0,6888	0,6523	1
KYSE-50	Esófago	0,183	0,055	0,063	5
KYSE-410	Esófago	0,244	0,211	0,214	4
T.Tn	Esófago	0,4246	0,3322	0,2448	4
T.T	Esófago	0,8253	0,0649	0,0197	3
KYSE-180	Esófago	0,617	0,085	0,079	3
TE7	Esófago	0,718	0,113	0,113	3
KYSE-510	Esófago	0,671	0,223	0,129	3
KYSE-70	Esófago	0,824	0,201	0,158	3
KYSE-150	Esófago	1,166	0,213	0,163	3

ES 2 459 442 T3

(continuación)

Línea celular	Órgano	0,2 nM	2,0 nM	20 nM	Sensibilidad
OE21	Esófago	0,7539	0,2571	0,2117	3
KYSE-520	Esófago	1,111	0,386	0,356	3
KYSE-30	Esófago	0,7729	0,5353	0,4066	2
KYSE-270	Esófago	1,057	0,582	0,453	2
KYSE-140	Esófago	1,114	0,512	0,461	2
HCE7	Esófago	0,865	0,488	0,512	1
COLO-680N	Esófago	0,882	0,535	0,515	1
OE33	Esófago	1,006	0,5977	0,5259	1
KYSE-220	Esófago	0,833	0,626	0,661	1
OE19	Esófago	0,9684	0,8451	0,6916	1
JR 029	Cabeza y cuello	0,0671	0,0015	0,0021	5
PCI-38	Cabeza y cuello	0,2035	0,0781	0,0682	4
CAL 27	Cabeza y cuello	0,449	0,1068	0,069	4
CAL-33	Cabeza y cuello	0,5807	0,0516	0,0204	3
HSC-2	Cabeza y cuello	0,7659	0,0902	0,0707	3
PCI-15B	Cabeza y cuello	0,8113	0,0605	0,0753	3
HO-1-N-1	Cabeza y cuello	0,9323	0,095	0,096	3
PCI-6A	Cabeza y cuello	1,1429	0,1568	0,1195	3
H3118	Cabeza y cuello	0,8217	0,108	0,131	3
ACC2	Cabeza y cuello	1,1233	0,1636	0,1357	3
ACCS	Cabeza y cuello	0,7258	0,2017	0,1658	3
ACC3	Cabeza y cuello	0,887	0,186	0,168	3
BICR 78	Cabeza y cuello	1,0035	0,1602	0,1694	3
JR 028	Cabeza y cuello	1,0931	0,2299	0,2027	3
PCI-15	Cabeza y cuello	1,0668	0,1987	0,2061	3
SCC-9	Cabeza y cuello	0,5841	0,2727	0,272	3
SAT	Cabeza y cuello	0,854	0,302	0,307	3
SCC90	Cabeza y cuello	0,5915	0,3331	0,3358	3
HN	Cabeza y cuello	0,9124	0,3981	0,3481	3
PCI-15A	Cabeza y cuello	0,8516	0,3844	0,3675	3
JR 013	Cabeza y cuello	1,0158	0,3829	0,3766	3
PCI-4B	Cabeza y cuello	1,2078	0,4475	0,3808	3
PCI-30	Cabeza y cuello	0,8216	0,362	0,4064	3
UDSCC2	Cabeza y cuello	0,5716	0,4203	0,4394	3
JR 019	Cabeza y cuello	1,0805	0,4801	0,484	3
RPMI 2650	Cabeza y cuello	1,1239	0,5619	0,4435	2
JR 028EP	Cabeza y cuello	0,995	0,5386	0,4657	2
BHY	Cabeza y cuello	1,0468	0,5311	0,4897	2
PCI-4A	Cabeza y cuello	1,0214	0,6602	0,4984	2
HSC-3	Cabeza y cuello	1,069	0,3074	0,5475	1
ACC 8-2	Cabeza y cuello	1,1417	0,7519	0,5967	1
JR 022	Cabeza y cuello	1,0441	0,7332	0,6409	1
PCI-6B	Cabeza y cuello	1,1076	0,7016	0,6703	1
ACC112	Cabeza y cuello	0,9498	0,7645	0,916	1
GP5d	Intestino	0,185	0,116	0,0711	5
SW48	Intestino	0,471	0,028	0,053	4
T84	Intestino	0,462	0,068	0,058	4
LoVo	Intestino	0,2792	0,0659	0,0611	4
COLO 205	Intestino	0,8137	0,0578	0,0376	3
Hs 257.T	Intestino	0,8128	0,0699	0,0465	3
MDSTB	Intestino	0,7601	0,094	0,0774	3
CL-11	Intestino	0,9903	0,1858	0,1559	3
SW-948	Intestino	1,0249	0,2096	0,1757	3
CoCM-1	Intestino	1,062	0,227	0,191	3
LS174T	Intestino	0,8916	0,2634	0,2176	3
COLO 201	Intestino	1,029	0,204	0,24	3
SW620	Intestino	0,7593	0,2603	0,288	3
WiDr	Intestino	0,8917	0,3977	0,3243	3

ES 2 459 442 T3

(continuación)

Línea celular	Órgano	0,2 nM	2,0 nM	20 nM	Sensibilidad
LS180	Intestino	0,9989	0,4556	0,3266	3
SW837	Intestino	1,0342	0,4365	0,3773	3
SK-CO-1	Intestino	0,93	0,464	0,405	3
CL-14	Intestino	0,8508	0,6531	0,4248	2
HRT-18	Intestino	0,744	0,523	0,425	2
Caco-2	Intestino	0,769	0,538	0,496	2
COLO-206F	Intestino	1,075	0,651	0,543	1
SW 1417	Intestino	1,016	0,769	0,607	1
CL-34	Intestino	1,1299	0,4878	0,6107	1
RCM-1	Intestino	1,0188	0,8159	0,6594	1
COLO-678	Intestino	1,06	0,802	0,661	1
OUMS-23	Intestino	0,7971	0,9316	0,7076	1
SW 1116	Intestino	1,0852	1,0031	0,7353	1
SW 1463	Intestino	1,164	0,925	0,862	1
G-402	Riñón	0,4146	0,1885	0,1583	4
SW 156	Riñón	0,4381	0,3386	0,2802	4
CAL-54	Riñón	0,4808	0,3592	0,326	4
SW 13	Riñón	0,697	0,014	0,023	3
G-401	Riñón	0,857	0,081	0,073	3
NH-6	Riñón	0,9578	0,1525	0,1175	3
KMRM-M1	Riñón	1,072	0,139	0,126	3
SN-12C	Riñón	0,9117	0,1661	0,1382	3
Caki-1	Riñón	0,6522	0,1373	0,1431	3
786-O	Riñón	1,066	0,205	0,17	3
VMRC-RCW	Riñón	1,081	0,156	0,171	3
UO-31	Riñón	0,8695	0,3772	0,3758	3
769-P	Riñón	0,977	0,478	0,431	3
KMRC-20	Riñón	0,84	0,466	0,459	3
BFTC-909	Riñón	1,076	0,4325	0,4869	3
KMRC-1	Riñón	0,8824	0,6127	0,5558	1
VMRC-RCZ	Riñón	0,9492	0,6125	0,5913	1
ACHN	Riñón	1,005	0,623	0,6277	1
JHH-4	Hígado	0,4019	0,0719	0,0775	4
OCUG-1	Hígado	0,4247	0,115	0,0881	4
SNU-182	Hígado	0,3211	0,3009	0,2618	4
SNU-398	Hígado	0,7925	0,0572	0,048	3
JHH-7	Hígado	0,526	0,0621	0,049	3
SNU-475	Hígado	0,9855	0,1516	0,1274	3
JHH-6	Hígado	0,6033	0,1987	0,1906	3
HuCCT1	Hígado	0,731	0,2303	0,1941	3
EGI-1	Hígado	0,8992	0,2121	0,2415	3
huH-1	Hígado	0,637	0,3355	0,2569	3
SK-HEP-1	Hígado	0,7567	0,2521	0,2684	3
PLC/PRF/5	Hígado	0,7758	0,2551	0,3086	3
Hep G2	Hígado	0,8333	0,2949	0,311	3
SNU-423	Hígado	0,9714	0,304	0,3364	3
SNU-387	Hígado	0,6457	0,4265	0,3953	3
JHH-1	Hígado	0,6947	0,4443	0,4458	3
SNU-449	Hígado	1,0774	0,486	0,4864	3
C3A	Hígado	0,9439	0,4686	0,5087	1
JHH-2	Hígado	1,0593	0,7702	0,7744	1
A549	Pulmón	0,4707	0,0974	0,129	4
H290	Pulmón	0,4248	0,4081	0,3961	4
H2691	Pulmón	0,468	0,4411	0,4795	4
RERF-LC-MA	Pulmón	0,639	0,0854	0,0623	3
NCI-H841	Pulmón	0,8459	0,1149	0,1057	3
SBC-3	Pulmón	0,9716	0,2057	0,155	3
H2369	Pulmón	1,0518	0,172	0,1562	3

ES 2 459 442 T3

(continuación)

Línea celular	Órgano	0,2 nM	2,0 nM	20 nM	Sensibilidad
ChaGo-K-1	Pulmón	1,0137	0,1936	0,1726	3
H2804	Pulmón	0,8272	0,2981	0,195	3
NCI-H2286	Pulmón	0,8997	0,2979	0,2466	3
UMC-11	Pulmón	0,6174	0,2438	0,276	3
H2373	Pulmón	0,8795	0,3019	0,2853	3
H2461	Pulmón	0,8732	0,3484	0,2912	3
H2795	Pulmón	1,0282	0,3473	0,3436	3
NCI-H196	Pulmón	0,8976	0,3922	0,389	3
H2722	Pulmón	0,8473	0,4877	0,4089	3
H28	Pulmón	0,9309	0,4937	0,4124	3
H2803	Pulmón	0,6578	0,4814	0,4939	3
H2731	Pulmón	0,9841	0,5147	0,4912	2
H2591	Pulmón	1,0024	0,5897	0,5288	1
SW 1271	Pulmón	1,054	0,681	0,585	1
H2052	Pulmón	0,9018	0,7748	0,6495	1
H513	Pulmón	0,8696	0,747	0,7763	1
NCI-H2195	Pulmón	1,0695	0,7473	0,7937	1
VMRC-LCD	Pulmón: NSCLC	0,1083	0,0165	0,0206	5
NCI-H1703	Pulmón: NSCLC	0,0217	0,0234	0,0387	5
DV-90	Pulmón: NSCLC	0,1662	0,0939	0,0801	5
NCI-H520	Pulmón: NSCLC	0,1553	0,0853	0,0943	5
HCC-44	Pulmón: NSCLC	0,4828	0,0622	0,0573	4
LOU-NH91	Pulmón: NSCLC	0,2854	0,0649	0,0667	4
NCI-H1792	Pulmón: NSCLC	0,4287	0,1012	0,085	4
LU99A	Pulmón: NSCLC	0,3858	0,1388	0,1203	4
LU99B	Pulmón: NSCLC	0,3259	0,1927	0,1616	4
LCLC-103H	Pulmón: NSCLC	0,4592	0,1711	0,163	4
NCI-H2009	Pulmón: NSCLC	0,2163	0,1481	0,1764	4
NCI-H2170	Pulmón: NSCLC	0,477	0,2033	0,1894	4
CAL-12T	Pulmón: NSCLC	0,4345	0,2399	0,2003	4
SK-MES-1	Pulmón: NSCLC	0,2868	0,2316	0,2173	4
NCI-H2122	Pulmón: NSCLC	0,8339	0,0731	0,0601	3
NCI-H460	Pulmón: NSCLC	0,9368	0,0626	0,0624	3
NCI-H1437	Pulmón: NSCLC	1,0697	0,11	0,0878	3
ABC-1	Pulmón: NSCLC	0,7461	0,1129	0,0899	3
NCI-H1299	Pulmón: NSCLC	0,902	0,105	0,094	3
HCC-366	Pulmón: NSCLC	1,1043	0,0917	0,1002	3
LU65B	Pulmón: NSCLC	0,9138	0,1102	0,1013	3
VMRC-LCP	Pulmón: NSCLC	0,6195	0,1294	0,1061	3
NCI-H3122	Pulmón: NSCLC	0,664	0,1227	0,113	3
LU65A	Pulmón: NSCLC	0,5925	0,1313	0,1233	3
201T	Pulmón: NSCLC	1,1069	0,1758	0,1239	3
EBC-1	Pulmón: NSCLC	0,806	0,155	0,128	3
NCI-H1666	Pulmón: NSCLC	1	0,112	0,135	3
RERF-LC-MS	Pulmón: NSCLC	0,6674	0,141	0,1425	3
273T	Pulmón: NSCLC	0,8467	0,1865	0,159	3
NCI-H2110	Pulmón: NSCLC	0,929	0,244	0,194	3
NCI-H2085	Pulmón: NSCLC	1,0485	0,2496	0,2008	3
NCI-H358	Pulmón: NSCLC	1,1308	0,2687	0,2249	3
LU99C	Pulmón: NSCLC	0,5091	0,1845	0,2281	3
EPLC-272H	Pulmón: NSCLC	0,7924	0,2789	0,24	3
NCI-H2087	Pulmón: NSCLC	0,7317	0,2612	0,2452	3
NCI-H1915	Pulmón: NSCLC	1,1651	0,2784	0,25	3
COR-L23	Pulmón: NSCLC	1,0115	0,2364	0,2645	3
NCI-H1944	Pulmón: NSCLC	0,7625	0,2508	0,2692	3
LU65	Pulmón: NSCLC	1,0552	0,3022	0,2768	3
SW 1573	Pulmón: NSCLC	0,6665	0,3095	0,2782	3
SK-MES	Pulmón: NSCLC	0,7978	0,3101	0,3203	3

ES 2 459 442 T3

(continuación)

Línea celular	Órgano	0,2 nM	2,0 nM	20 nM	Sensibilidad
NCI-H2172	Pulmón: NSCLC	0,9469	0,4313	0,3324	3
NCI-H322	Pulmón: NSCLC	0,5775	0,4467	0,3978	3
NCI-H1623	Pulmón: NSCLC	0,8983	0,436	0,4131	3
NCI-H2030	Pulmón: NSCLC	0,9091	0,4382	0,4146	3
NCI-H1869	Pulmón: NSCLC	0,53	0,4401	0,4219	3
NCI-H1793	Pulmón: NSCLC	0,8914	0,4837	0,426	3
NCI-H2228	Pulmón: NSCLC	1,111	0,419	0,431	3
NCI-H1573	Pulmón: NSCLC	0,5795	0,4795	0,4416	3
HCC-15	Pulmón: NSCLC	1,081	0,4963	0,4502	3
RERF-LC-Ad2	Pulmón: NSCLC	0,5334	0,4658	0,4902	3
NCI-H838	Pulmón: NSCLC	1,043	0,5099	0,3182	2
NCI-H650	Pulmón: NSCLC	1,0045	0,5034	0,502	1
NCI-H2405	Pulmón: NSCLC	0,8472	0,497	0,5105	1
NCI-H2444	Pulmón: NSCLC	0,9104	0,601	0,5357	1
PC-3 [JPC-3]	Pulmón: NSCLC	0,7824	0,5818	0,5439	1
NCI-H1693	Pulmón: NSCLC	0,6644	0,6313	0,5467	1
COR-L 105	Pulmón: NSCLC	0,7921	0,5136	0,5478	1
SK-LU-1	Pulmón: NSCLC	0,8993	0,5272	0,582	1
HCC-78	Pulmón: NSCLC	0,865	0,666	0,595	1
H3255	Pulmón: NSCLC	0,894	0,686	0,598	1
NCI-H1781	Pulmón: NSCLC	0,8353	0,6108	0,6045	1
HCC-827	Pulmón: NSCLC	0,8265	0,6909	0,6187	1
HOP92	Pulmón: NSCLC	0,9934	0,695	0,6344	1
Calu-1	Pulmón: NSCLC	0,8105	0,6374	0,6643	1
NCI-H2342	Pulmón: NSCLC	0,8589	0,778	0,7798	1
NCI-H2347	Pulmón: NSCLC	0,9848	0,8783	0,845	1
LC-1 sq	Pulmón: NSCLC	1,9116	0,996	1,2191	1
JAR	Varios	0,0398	0,0104	0,0015	5
HT 1080	Varios	0,0583	0,0135	0,0141	5
TASK1	Varios	0,8609	0,0456	0,0344	3
GCT	Varios	0,6099	0,097	0,0732	3
STS 0421	Músculo	0,3838	0,1484	0,11	4
A673	Músculo	0,5523	0,0896	0,0731	3
OV-1063	Ovario	0,1051	-0,0465	-0,0045	5
TOV-112D	Ovario	0,059	0,0111	0,0122	5
A2780	Ovario	0,1745	0,0693	0,0442	5
OVMIU	Ovario	0,1776	0,138	0,1443	5
MDA-H2774	Ovario	0,2085	0,0117	0,0207	4
IGROV-1	Ovario	0,4271	0,1121	0,1124	4
RMG-I	Ovario	0,2666	0,2123	0,1716	4
SK-OV-3	Ovario	0,2853	0,2647	0,291	4
OAW42	Ovario	0,4569	0,3872	0,3435	4
OVTOKO	Ovario	0,4835	0,42	0,412	4
Caov-3	Ovario	0,5251	-0,0004	-0,0224	3
MCAS	Ovario	1,2885	-0,0085	-0,0142	3
PA-1	Ovario	0,636	0,005	0,005	3
ES-2	Ovario	0,9311	0,0747	0,0623	3
RKN	Ovario	1,0045	0,1482	0,1049	3
OVCAR-8	Ovario	0,7166	0,1442	0,1224	3
A2780ADR	Ovario	0,5276	0,1526	0,1356	3
TYK-nu	Ovario	0,7871	0,245	0,2265	3
NIH:OVCAR-3	Ovario	1,0723	0,2539	0,2416	3
OAW28	Ovario	0,8974	0,2001	0,2458	3
OVCAR-5	Ovario	0,7739	0,2162	0,2648	3
EFO-27	Ovario	0,8772	0,2627	0,3237	3
SW 626	Ovario	1,0372	0,3903	0,4064	3
OVISE	Ovario	0,6107	0,4587	0,4191	3
OVSAYO	Ovario	0,9829	0,4188	0,4195	3

ES 2 459 442 T3

(continuación)

Línea celular	Órgano	0,2 nM	2,0 nM	20 nM	Sensibilidad
EFO-21	Ovario	0,8922	0,4971	0,4502	3
OV-90	Ovario	1,175	0,4593	0,4735	3
FU-OV-1	Ovario	0,9593	0,5098	0,495	2
OVKATE	Ovario	1,0241	0,9374	0,8461	1
KP-4	Páncreas	0,1844	0,0203	0,0222	5
PANC-1	Páncreas	0,3146	0,1726	0,1474	4
KP-3	Páncreas	0,378	0,222	0,175	4
KP-1N	Páncreas	0,3155	0,1894	0,1894	4
Panc 03.27	Páncreas	0,702	0,111	0,117	3
HUP-T4	Páncreas	0,952	0,144	0,154	3
A2.1	Páncreas	1,339	0,186	0,208	3
HPAC	Páncreas	0,939	0,251	0,213	3
KP-1NL	Páncreas	0,702	0,287	0,219	3
BxPC-3	Páncreas	1,233	0,321	0,236	3
A13A	Páncreas	1,115	0,28	0,239	3
KP-3L	Páncreas	0,875	0,287	0,258	3
Panc 10.05	Páncreas	1,204	0,2845	0,267	3
HUP-T3	Páncreas	0,7682	0,2841	0,2686	3
HPAF-II	Páncreas	1,042	0,423	0,372	3
DAN-G	Páncreas	0,6668	0,3759	0,3811	3
KP-2	Páncreas	0,8359	0,4032	0,4095	3
YAPC	Páncreas	0,76	0,507	0,289	2
Capan-1	Páncreas	0,857	0,51	0,368	2
Panc 02.03	Páncreas	1,0158	0,5008	0,4159	2
AsPC-1	Páncreas	1,292	0,721	0,535	1
SU.86.86	Páncreas	1,1289	0,645	0,5435	1
PL4	Páncreas	0,929	0,651	0,544	1
SUIT-2	Páncreas	1,123	0,844	0,57	1
Panc 08.13	Páncreas	0,91	0,761	0,703	1
Capan-2	Páncreas	1,0128	0,7716	0,7456	1
Panc 04.03	Páncreas	0,994	0,798	0,77	1
DU 145	Próstata	0,931	0,049	0,044	3
MGH-BA-1	Piel	0,15	0,044	-0,013	5
WM1158	Piel	0,0594	0,0252	0,0321	5
IGR-1	Piel	0,1978	0,0714	0,0587	5
COLO-849	Piel	0,4553	-0,0091	0,0093	4
A2058	Piel	0,2671	0,0255	0,02	4
M-14	Piel	0,3071	0,0703	0,0561	4
MGH-ST-1	Piel	0,4152	0,074	0,0578	4
COLO 792	Piel	0,3273	0,1011	0,0917	4
VMRC-MELG	Piel	0,4605	0,1462	0,1194	4
MGH-BO-1	Piel	0,353	0,186	0,151	4
A375.S2	Piel	0,452	0,1896	0,1536	4
SK-MEL-39	Piel	0,4542	0,2968	0,2391	4
K19	Piel	0,323	0,3	0,247	4
IPC-298	Piel	0,4501	0,3059	0,2539	4
MGH-SW-1	Piel	0,2458	0,2558	0,271	4
A431	Piel	1,0122	0,022	0,0192	3
BU-ML	Piel	0,7451	0,0443	0,0244	3
CHL-1	Piel	0,8801	0,0514	0,0326	3
COLO 857	Piel	0,7565	0,0666	0,0529	3
SK-MEL-131	Piel	0,7317	0,0848	0,0599	3
UACC-62	Piel	0,5483	0,1094	0,124	3
Hs 944.T	Piel	0,7522	0,1316	0,1388	3
MGH-PO-1	Piel	0,7752	0,1548	0,1397	3
IGR-37	Piel	0,5675	0,1714	0,1429	3
UACC903	Piel	0,555	0,181	0,175	3
SK-MEL-37	Piel	0,536	0,2181	0,1784	3

ES 2 459 442 T3

(continuación)

Línea celular	Órgano	0,2 nM	2,0 nM	20 nM	Sensibilidad
MGH-MC-1	Piel	0,7186	0,1934	0,1994	3
C32	Piel	0,9511	0,2482	0,2055	3
G-MEL	Piel	0,6624	0,2227	0,2122	3
MEWO	Piel	0,991	0,255	0,214	3
IGR-39	Piel	0,834	0,2702	0,2141	3
MEL-JUSO	Piel	0,7127	0,1949	0,2211	3
451Lu	Piel	0,7217	0,2594	0,2265	3
WM35	Piel	0,8726	0,2125	0,2318	3
COLO 858	Piel	0,806	0,306	0,234	3
1205Lu	Piel	0,5617	0,2665	0,2484	3
K4	Piel	0,919	0,257	0,254	3
K1	Piel	0,6275	0,2832	0,2662	3
WM793B	Piel	0,6332	0,3606	0,3015	3
WM 266-4	Piel	0,7552	0,3436	0,3252	3
MM608	Piel	0,7646	0,3161	0,3265	3
MGH-TH-1	Piel	1,114	0,4408	0,3347	3
K2	Piel	0,97	0,33	0,36	3
Hs 939.T	Piel	0,7495	0,4148	0,3821	3
WM164	Piel	0,805	0,414	0,399	3
MGH-QU-1	Piel	0,97	0,46	0,433	3
SK-MEL-28	Piel	0,841	0,476	0,459	3
Hs 940.T	Piel	0,899	0,552	0,492	2
MEL-HO	Piel	0,8835	0,6098	0,5037	1
SK-MEL-119	Piel	0,8436	0,4805	0,5052	1
HMVII	Piel	0,7604	0,6097	0,5073	1
K8	Piel	0,762	0,468	0,509	1
MGH-MCC-1	Piel	1,03	0,73	0,573	1
WM239A	Piel	1,447	0,732	0,64	1
MM455	Piel	1,257	0,718	0,672	1
WM902B	Piel	1,401	0,99	0,805	1
AGS	Estómago	0,1829	0,0811	0,067	5
Takigawa	Estómago	0,1891	0,1612	0,1255	5
TMK-1	Estómago	0,334	0,0293	0,0321	4
AZ-521	Estómago	0,3819	0,0702	0,0601	4
MKN28	Estómago	0,3799	0,1106	0,0748	4
IM-95m	Estómago	0,4254	0,1195	0,0834	4
KATO II	Estómago	0,3873	0,2237	0,2532	4
HGC-27	Estómago	0,536	0,044	0,057	3
NUGC-3	Estómago	1,1004	0,09	0,0967	3
23132/87	Estómago	1,0523	0,1618	0,1552	3
MKN74	Estómago	1,0538	0,1651	0,1667	3
KATO II	Estómago	0,6955	0,1991	0,196	3
RERF-GC-1B	Estómago	0,8254	0,3142	0,2073	3
MKN7	Estómago	1,1909	0,2781	0,2612	3
NCI-N87	Estómago	0,8742	0,3371	0,29	3
IM-95	Estómago	0,902	0,311	0,292	3
OCUM-1	Estómago	0,8101	0,2168	0,3176	3
NUGC-4	Estómago	0,5093	0,3328	0,335	3
GTL-16	Estómago	0,7105	0,4124	0,3635	3
MKN45	Estómago	0,851	0,326	0,429	3
FU97	Estómago	0,7699	0,5171	0,404	2
MKN1	Estómago	1,024	0,5318	0,4098	2
KMH-2	Tiroides	0,343	0,017	0,0093	4
IHH-4	Tiroides	0,3912	0,0328	0,0391	4
FTC-133	Tiroides	0,3884	0,1596	0,1535	4
8505C	Tiroides	0,7694	0,1011	0,0742	3
FTC-238	Tiroides	0,5915	0,0995	0,0877	3
CAL-62	Tiroides	0,9829	0,1362	0,1365	3

(continuación)

Línea celular	Órgano	0,2 nM	2,0 nM	20 nM	Sensibilidad
ONCO-DG-1	Tiroides	1,0952	0,3063	0,1977	3
TCO-1	Tiroides	0,7356	0,2228	0,1992	3
HTC-C3	Tiroides	0,7903	0,2916	0,2857	3
TT2609-C02	Tiroides	0,9862	0,3171	0,3136	3
8305C	Tiroides	0,7851	0,435	0,3771	3
ML-1	Tiroides	0,7562	0,4193	0,4005	3
BHT-101	Tiroides	1,0259	0,4909	0,4394	3
S-117	Tiroides	0,8908	0,4405	0,4683	3
RO82-W-1	Tiroides	0,7894	0,4013	0,4831	3
B-CPAP	Tiroides	1,378	0,763	0,49	2
ASH-3	Tiroides	0,7518	0,6432	0,5762	1
MFE-319	Útero	0,2338	0,0988	0,0843	4
HEC-1	Útero	0,2361	0,0976	0,1034	4
SNG-M	Útero	0,6532	0,0129	0,0117	3
Ishikawa	Útero	0,9421	0,0306	0,0209	3
MFE-296	Útero	0,6434	0,0852	0,0762	3
ESS-1	Útero	0,881	0,1059	0,0827	3
MES-SA	Útero	0,808	0,1341	0,1377	3
SKN	Útero	0,864	0,2716	0,1851	3
AN3CA	Útero	0,9261	0,2145	0,2207	3
Ishikawa (Heraklio) 02 ER-	Útero	0,88	0,242	0,225	3
MFE-280	Útero	0,9711	0,4052	0,3979	3
EFE-184	Útero	0,986	0,5066	0,426	2
EN	Útero	1,0579	0,6322	0,5471	1

**Ejemplo 14:** Los compuestos de la Fórmula II son efectivos contra muchas líneas celulares de tumor sólido

Se probó el compuesto Ila contra un panel de líneas celulares derivadas a partir de malignidades hematológicas en un ensayo de supervivencia celular, utilizando el CellTiter-Glo® como lectura después de 48 horas en presencia del compuesto. La Tabla 18 enlista el tipo de malignidad hematológica, el nombre de la muestra, su valor  $GI_{50}$  (la concentración necesaria para alcanzar una inhibición del crecimiento del 50%) en el ensayo, el logaritmo de la  $GI_{50}$ , ( $\log(GI_{50})$ ), y la sensibilidad relativa de cada muestra (Diferencial). El diferencial se calcula sustrayendo el  $\log(GI_{50})$  para cada línea celular del  $\log(GI_{50})$  promedio a través de todo el panel (0,236 en este caso); un valor positivo indica una muestra que es más sensible que el promedio, mientras que un valor negativo indica una muestra que es menos sensible que el promedio.

Las malignidades hematológicas sensibles son: leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia linfoblástica aguda (LLA), mieloma múltiple (MM), linfoma no Hodgkin (LNH), y linfoma de Hodgkin (LH).

Tabla 18 - Actividad del Compuesto Ila en líneas celulares de cáncer hematológico.

Enfermedad	Línea celular	$GI_{50}$ (nM)	$\log(GI_{50})$	Diferencial
LMA	MV4;11	0,08	-1,114	0,747
LMA	MV4;11Luc	0,11	-0,979	0,613
LMA	LMA-193	0,11	-0,959	0,593
LMA	Kasumi-1	0,44	-0,357	-0,010
LMA	UKE-1	0,18	-0,757	0,391
LMA	SET-2	0,34	-0,469	0,102
LMA	MOLM13-Luc	0,23	-0,645	0,279
LMA	LH60	0,17	-0,783	0,416
LMA	LH60-Luc	0,51	-0,294	-0,072
LMA	HEL92	0,49	-0,310	-0,056
LMC	K562	0,21	-0,680	0,314
LLA	CCRF-CEM	0,16	-0,785	0,419
LLA	RS4;11	0,10	-1,000	0,634
LLA	MOLT-4	0,33	-0,480	0,114
LLA	SEM-Luc	0,15	-0,824	0,458

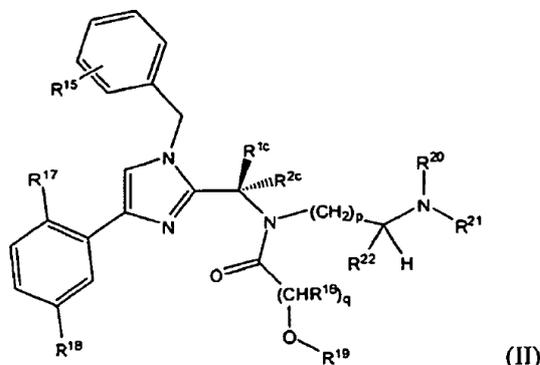
ES 2 459 442 T3

(continuación)

Enfermedad	Línea celular	GI50 (nM)	Log(GI50)	Diferencial
LLA	MOLT-3	0,34	-0,475	0,109
LLA	REH	0,18	-0,745	0,379
LLA	SUP-B15	0,19	-0,721	0,355
LLA	CCRF-HSB-2	0,19	-0,733	0,367
LLA	697	0,11	-0,979	0,613
LLA	NALM-6	0,14	-0,870	0,504
LLA	NALM-19	0,19	-0,721	0,355
LLA	TANOUE	10,00	1,000	-1,366
LLA	MHH-CLLA-2	0,32	-0,502	0,136
LLA	MHH-CLLA-3	0,20	-0,699	0,333
LLA	MHH-CLLA-4	10,00	1,000	-1,366
LLA	MUTZ-5	10,00	1,000	-1,366
LLA	YT	10,00	1,000	-1,366
MM	KMS11	0,48	-0,316	-0,050
MM	KMS11-Luc	0,29	-0,538	0,172
MM	KMS18-Luc	0,52	-0,286	-0,080
MM	OPM2	0,14	-0,870	0,504
MM	MM1-S	0,24	-0,620	0,254
MM	MM1-S-Luc	0,23	-0,638	0,272
MM	KMS26	0,24	-0,620	0,254
MM	KMS12	0,29	-0,538	0,172
MM	L363	0,13	-0,886	0,520
MM	LP1	0,21	-0,688	0,322
MM	INA-6	0,12	-0,921	0,555
MM	RPMI8226	0,26	-0,582	0,216
MM	H929	0,34	-0,475	0,109
MM	H929-Luc	1,69	0,227	-0,593
LNH	RL	20,00	1,301	-1,667
LNH	SuDLH-1	10,00	1,000	-1,366
LNH	SuDLH-4	0,45	-0,350	-0,016
LNH	SuDLH-6	0,16	-0,796	0,430
LNH	U937	0,20	-0,699	0,333
LNH	SR	0,11	-0,957	0,591
LNH	Karpas-299-Luc	20,18	1,305	-1,671
LNH	Karpas-299	0,20	-0,699	0,333
LNH	Karpas-422	5,14	0,711	-1,077
LNH	Ramos	0,16	-0,796	0,430
LNH	HuT78	0,28	-0,561	0,195
LNH	HH	0,22	-0,668	0,301
LNH	DEL	0,28	-0,548	0,182
LNH	SUP-M2	0,18	-0,745	0,379
LNH	DOHH2	0,24	-0,629	0,263
LNH	SUP-T1	5,57	0,746	-1,112
LH	HDLM-2	0,12	-0,921	0,555
LH	L-1236	3,67	0,564	-0,930
LH	L428	20,00	1,301	-1,667
LH	KM-H2	0,23	-0,632	0,266
	Mean	0,430	-0,366	

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (II):



5

en donde:

$R^{1c}$  se selecciona entre el grupo que consiste en etilo, isopropilo, t-butilo, fenilo,  $-\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{O}$ (oxetan-3-ilo) y  $-\text{CCH}_3(\text{CH}_2)_2\text{O}$ (3-metiloxetan-3-ilo);

$R^{2c}$  es hidrógeno o metilo;

10  $R^{15}$ ,  $R^{16}$ ,  $R^{17}$  y  $R^{18}$  se seleccionan cada uno independientemente entre H, halo, alquilo C1 - 4, haloalquilo C1 - 4, y CN;

$R^{19}$ ,  $R^{20}$  y  $R^{21}$  son cada uno independientemente H o acilo C1 - C10 opcionalmente sustituido;

$R^{22}$  es haloalquilo C1 - C4;

p es un número entero de 1 a 3; y

15 q es un número entero de 1 - 3;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde  $R^{22}$  es fluorometilo.

3. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde p es 2.

4. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en donde q es 1.

20 5. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en donde  $R^{2c}$  y  $R^{15}$  son cada uno H.

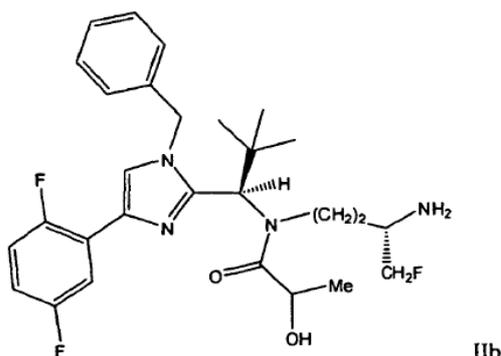
6. El compuesto de la reivindicación 5, en donde  $R^{17}$  y  $R^{18}$  son cada uno halógeno.

7. El compuesto de la reivindicación 5, en donde  $R^{19}$ ,  $R^{20}$  y  $R^{21}$  son cada uno H.

8. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 7, en donde  $R^{19}$  es H.

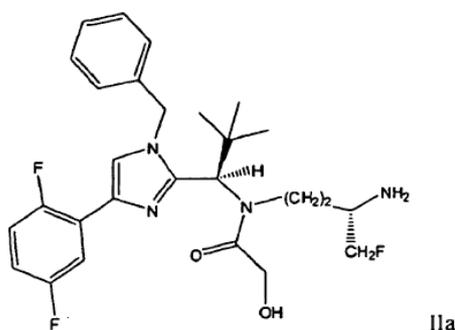
25 9. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 7, en donde  $R^{19}$  es acilo C1 - C10 opcionalmente sustituido.

10. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 de Fórmula IIb:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

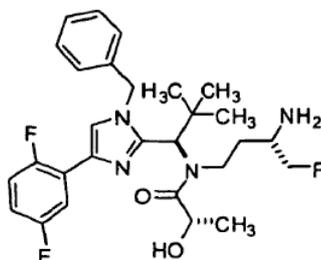
11. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 de Fórmula IIa:



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

12. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 de Fórmula IIc:



10

(S)-N-((S)-3-amino-4-fluorobutil)-N-((R)-1-(1-bencil-4-(2,5-difluorofenil)-1H-imidazol-2-il)-2,2-dimetilpropil)-2-hidroxiopropanamida IIc

15

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

13. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 12, un tautómero de cualquiera de estos compuestos, una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de estos compuestos, una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero, o una mezcla de los mismos, para uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa seleccionada de un tumor sólido y un cáncer hematológico en un mamífero.

20

14. Un compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicha enfermedad proliferativa es un tumor sólido seleccionado del grupo que consiste de carcinoma de pulmón, carcinoma de mama, carcinoma de ovario, carcinoma de piel, carcinoma de colon, carcinoma de vejiga urinaria, carcinoma de hígado, carcinoma gástrico, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma de células escamosas, carcinoma papilar de tiroides, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC), carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer de páncreas, cáncer de cerebro, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello y sarcomas.

25

15. Un compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el carcinoma de mama es carcinoma de mama metastático.
16. Un compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 14 o la reivindicación 15, en donde el tumor es un tumor resistente a múltiples fármacos.
- 5 17. Un compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el tumor expresa un nivel elevado de glicoproteína P.
- 10 18. Un compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicha enfermedad proliferativa es un cáncer hematológico seleccionado del grupo que consiste de linfoma de Hodgkin (LH), linfoma no Hodgkin (LNH), leucemia, leucemia mielógena, leucemia linfocítica, leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), síndrome mielodisplásico (SMD), leucemia de células peludas y mieloma múltiple.
- 15 19. Un compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 18, en donde dicho cáncer hematológico es leucemia mielógena aguda.
20. Un compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 18, en donde dicho cáncer hematológico es mieloma múltiple.
21. Un compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicho uso comprende la administración de un segundo compuesto terapéutico contra el cáncer.
- 20 22. Un compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 21, en donde dicho segundo compuesto terapéutico contra el cáncer se selecciona de irinotecano, topotecano, gemcitabina, imatinib, trastuzumab, 5-fluorouracilo, leucovorina, carboplatino, cisplatino, docetaxel, paclitaxel, tezacitabina, ciclofosfamida, rituximab, y nilotinib.

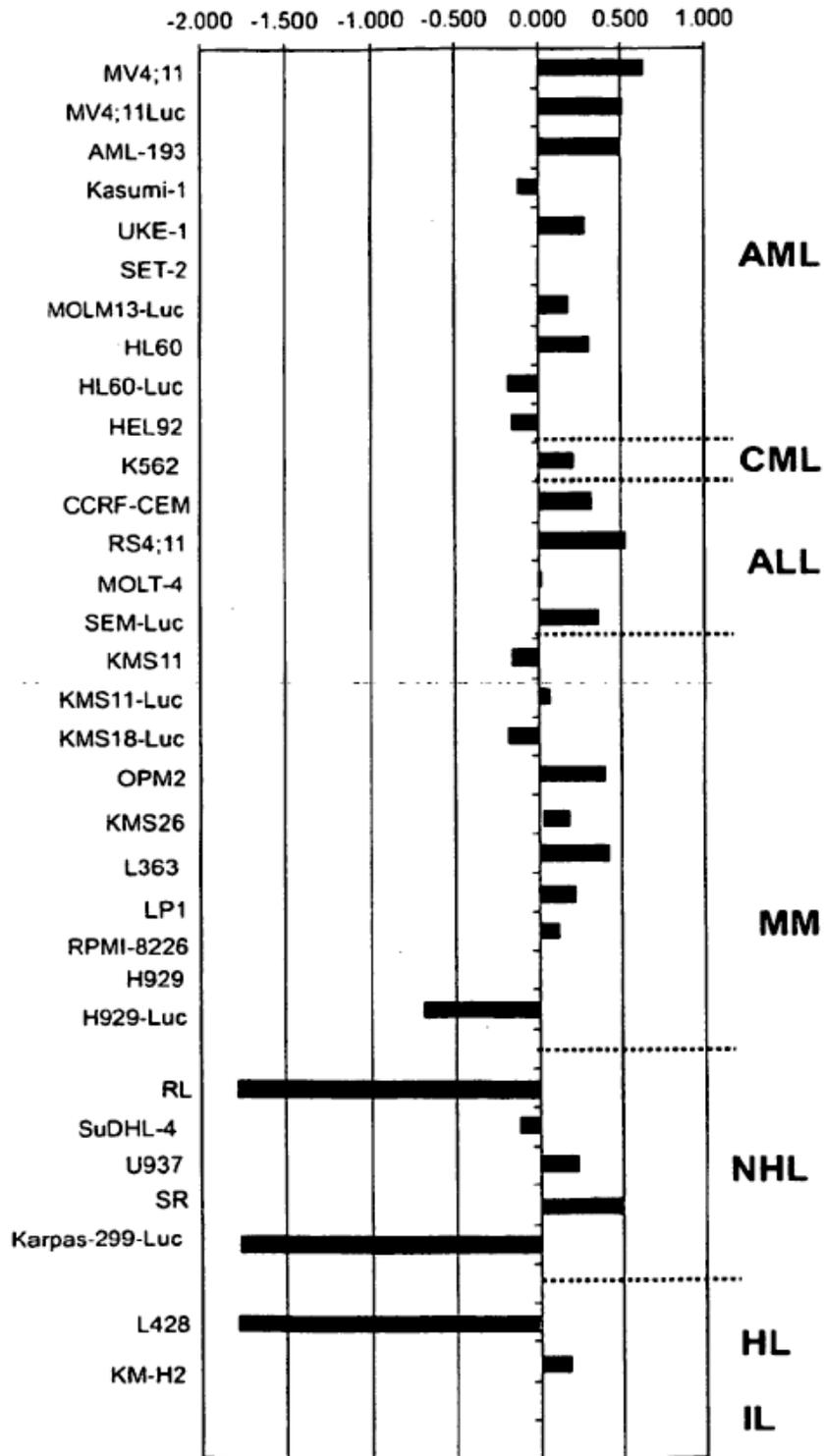
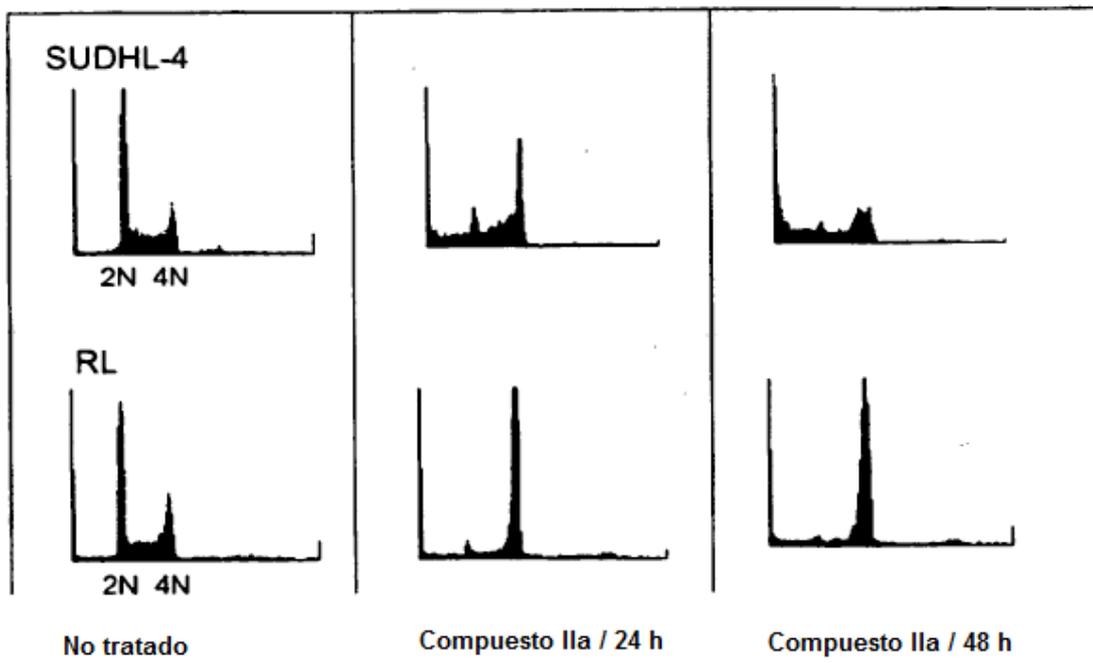


FIG. 1



**FIG. 2**

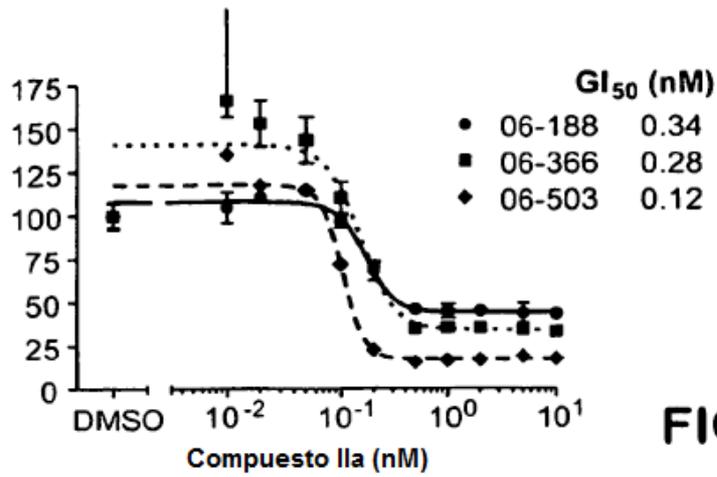


FIG. 3A

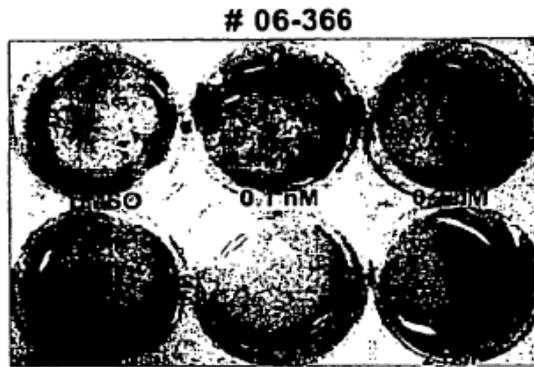


FIG. 3B

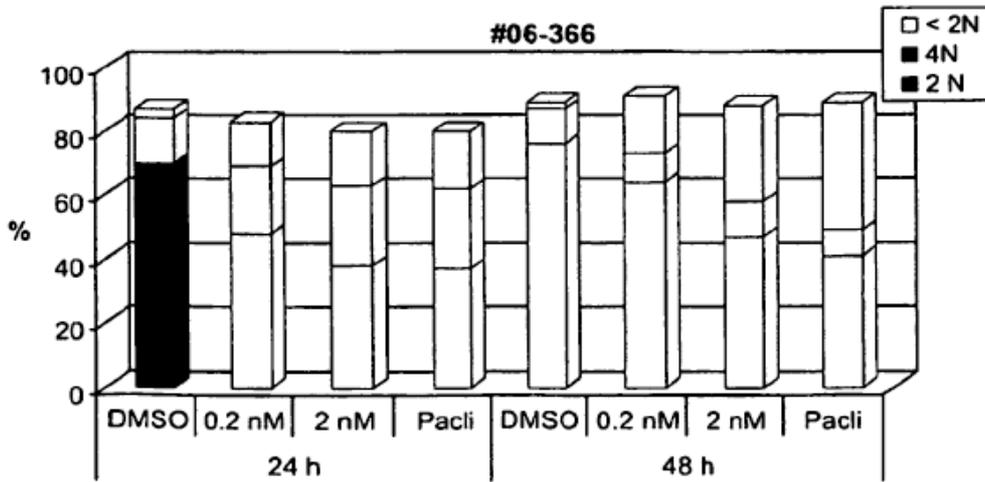


FIG. 3C

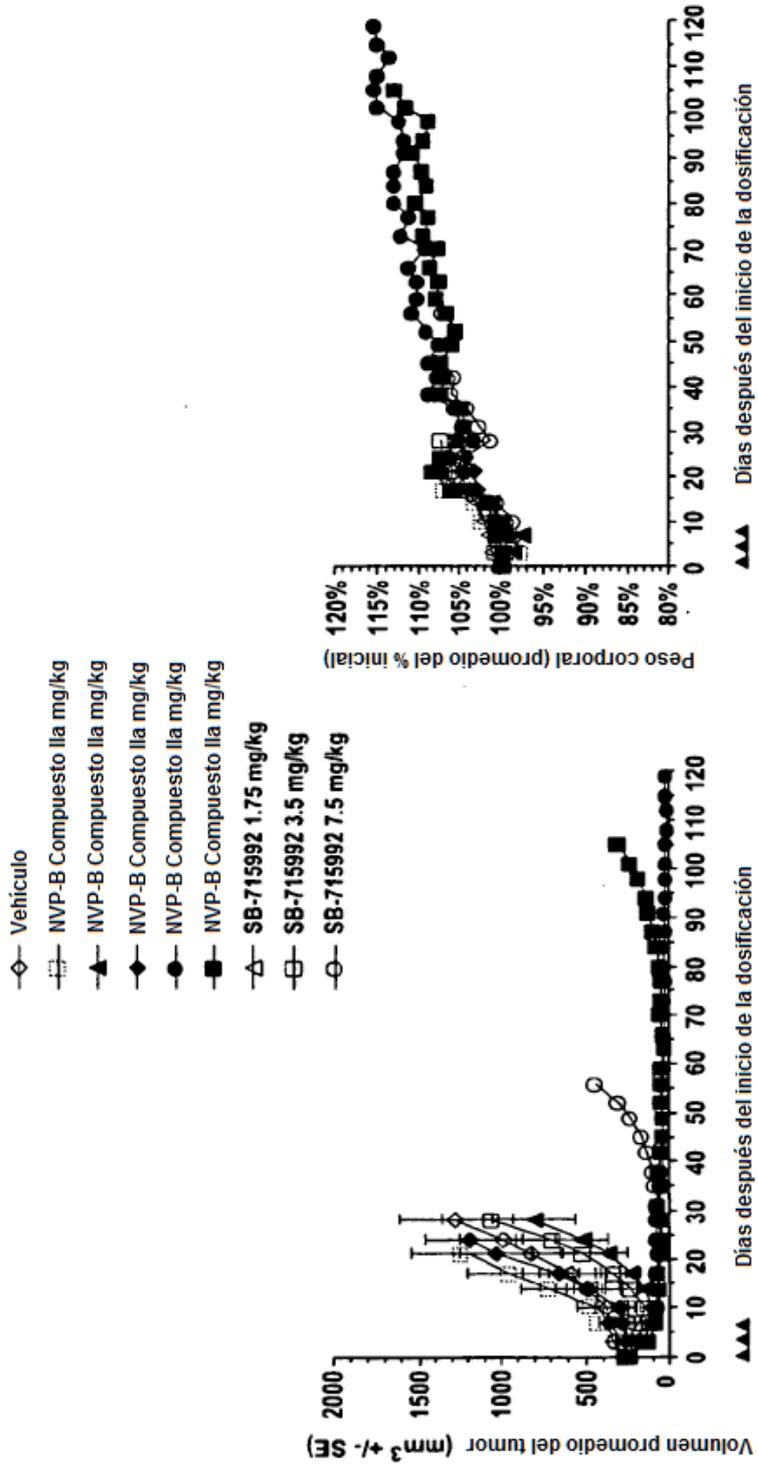


FIG. 4B

FIG. 4A

- ◆--- Vehículo
- Compuesto Ila 5 mg/kg
- SB-715992 1.75 mg/kg
- ▲— Paclitaxel 30 mg/kg IP

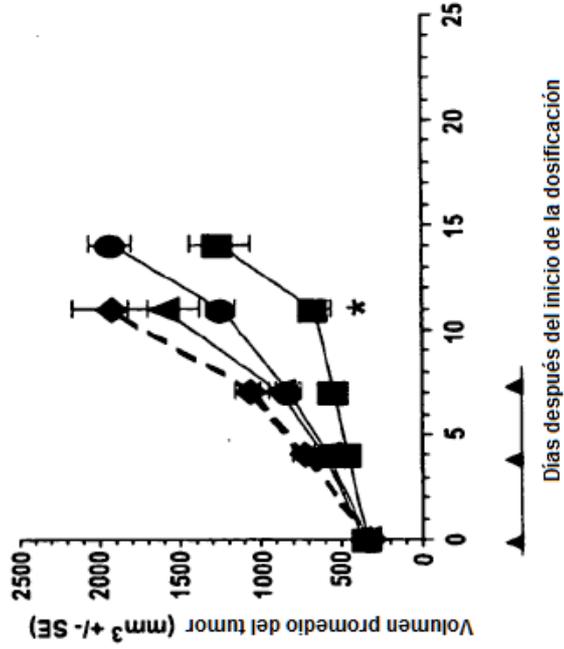


FIG. 5A

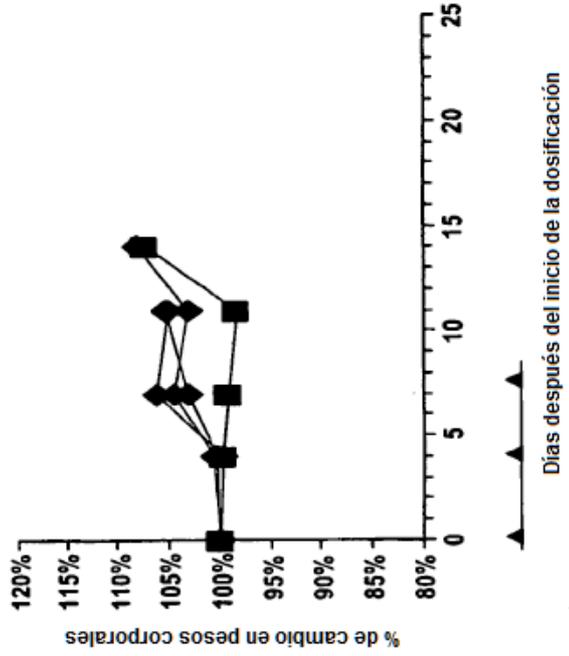


FIG. 5B

- ◆ Vehículo
- Compuesto Ilc .25 mg/kg
- \* Compuesto Ilc 2,5 mg/kg
- SB-715992 15 mg/kg
- ▲ Pacitaxel 30 mg/kg IP

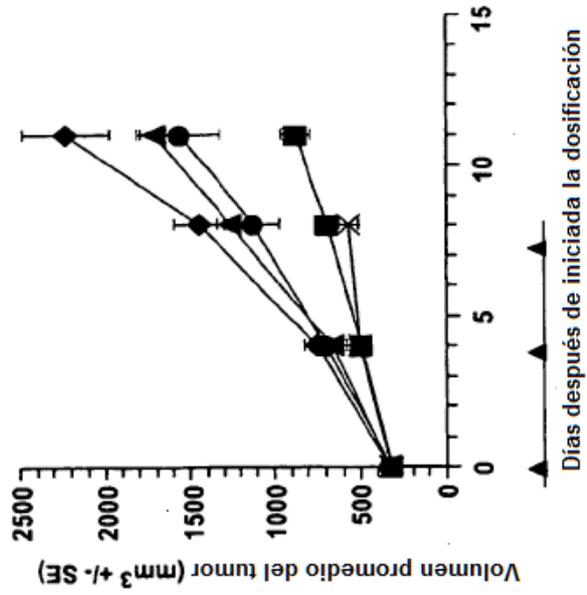


FIG. 6A

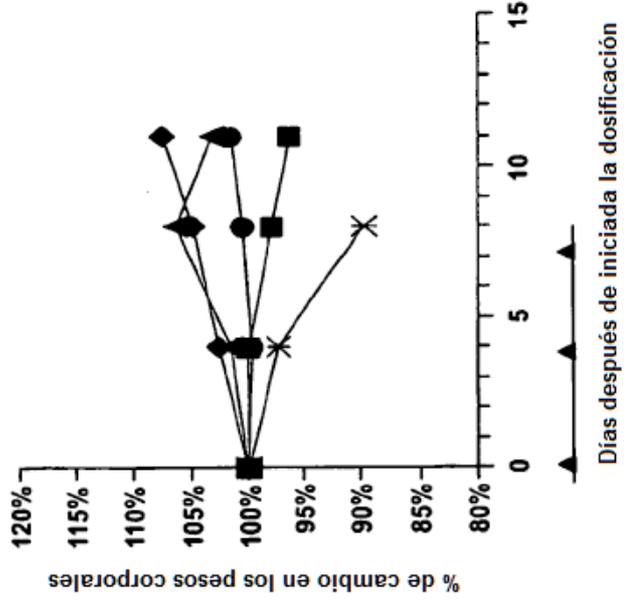


FIG. 6B

- ◆--- Vehículo
- Compuesto la 1,25 mg/kg
- △— Compuesto la 2,5 mg/kg
- Compuesto la 5 mg/kg
- ◆— SB-715992 15 mg/kg
- ▲— Paclitaxel 30 mg/kg IP

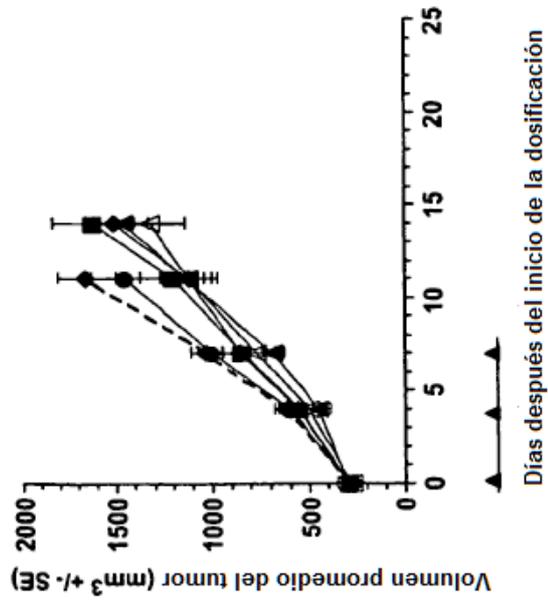


FIG. 7A

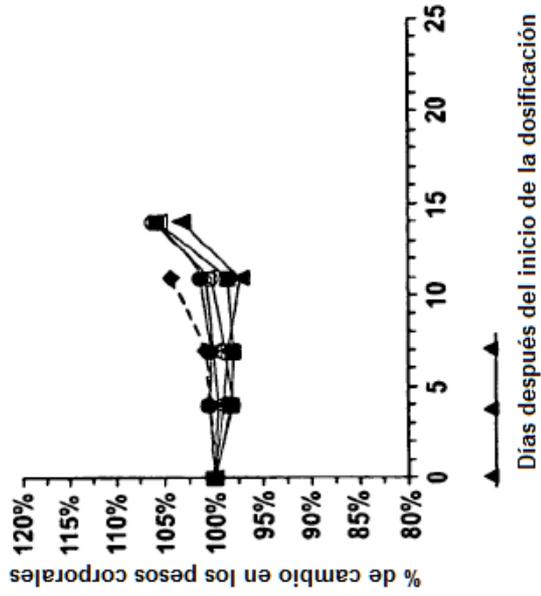


FIG. 7B