

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 509 875**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/44** (2006.01)

**A61K 31/47** (2006.01)

**A61K 31/4709** (2006.01)

**A61K 31/496** (2006.01)

**A61P 35/04** (2006.01)

**A61P 19/08** (2006.01)

**A61P 19/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2006 E 06773373 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 1896020**

54 Título: **SKI606 como inhibidor de la cinasa Src para el tratamiento de lesiones osteolíticas**

30 Prioridad:

**17.06.2005 US 691933 P**

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

**20.10.2014**

73 Titular/es:

**THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY  
OF TEXAS SYSTEM (100.0%)  
201 WEST 7TH STREET  
AUSTIN, TX 78701, US**

72 Inventor/es:

**DARNAY, BRYANT G.;  
PRICE, JANET E.;  
POBLENZ, ANN y  
TALPAZ, MOSHE**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 509 875 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

SKI606 como inhibidor de la cinasa Src para el tratamiento de lesiones osteolíticas

- 5 **[0001]** Esta solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud de patente provisional de los EE. UU. con el número de serie 60/691.933, presentada el 17 de junio de 2005.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION****10 I. CAMPO DE LA INVENCION**

- [0002]** La presente invención se refiere generalmente a los campos de la biología celular, la fisiología celular, la medicina y la oncología. Más en particular, se refiere a procedimientos para la regulación de la osteoclastogénesis en un sujeto que lo necesita y especialmente la osteoclastogénesis relacionada con la destrucción ósea inducida por el cáncer.

**II. DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA RELACIONADA**

- [0003]** El cáncer de mama es el cáncer femenino más común en los EE. UU. y la segunda causa principal de muerte por cáncer en las mujeres. Las mujeres con cáncer de mama tiene riesgo de sufrir metástasis óseas. Del 5 al 10 % de las pacientes con cáncer de mama presentarán inicialmente metástasis en los huesos. Las pacientes con osteopatías osteolíticas procedentes de un cáncer de mama metastásico tienen mayor riesgo de fracturas patológicas, dolores de huesos, compresión medular e hipercalcemia. El estándar actual de cuidados para el tratamiento de las metástasis óseas es un tratamiento con bisfosfonatos, que retrasa los problemas óseos pero no los evita por completo. Además, no todas las pacientes responden a este tratamiento. A la vez que se desea un tratamiento más eficaz, es necesaria una mayor disección biológica y molecular de esta enfermedad. El receptor activador de NF-κB (RANK) y su ligando (RANKL, también denominado TRANCE/ODF/OPGL) son mediadores esenciales de la osteoclastogénesis y se les ha supuesto implicados en diversas enfermedades, que incluyen la artritis reumatoide, la osteoporosis, el tumor óseo de células gigantes, la enfermedad de Paget, el cáncer metastásico de mama y próstata, el mieloma múltiple y la osteolisis expansiva familiar. La osteoprotegerina (OPG, también denominada OCIF/TR1) es un receptor señuelo soluble que inhibe la unión de RANKL a su receptor superficial RANK.

- [0004]** Algunos modelos de ratones con RANKL, RANK y OPG inactivados han demostrado un papel esencial de estas moléculas en la osteoclastogénesis (es decir, la remodelación ósea). La importancia biológica de estas moléculas queda subrayada por la inducción de una grave osteoporosis por la disrupción específica de OPG y por la inducción de osteopetrosis por la disrupción específica de RANKL o por la expresión en exceso de OPG. Por lo tanto, la formación de osteoclastos puede atribuirse a la proporción relativa entre RANKL y OPG en el microentorno de la médula ósea y las alteraciones de este equilibrio pueden ser una causa principal de la pérdida ósea en muchos trastornos óseos metabólicos. Al igual que en los ratones RANKL -/-, la disrupción específica de RANK también conduce a un fenotipo osteopetrósico. Tanto los ratones RANK -/- como RANKL -/- mostraron ausencia de osteoclastos, lo que indica la necesidad esencial de estas moléculas para la osteoclastogénesis. Además, RANK y RANKL se requieren para la organogénesis de los ganglios linfáticos y el desarrollo temprano de los linfocitos B y T. Adicionalmente, los ratones que carecen de TRAF6, c-Src, c-Fos o las subunidades p50/p52 de NF-κB muestran también un fenotipo osteopetrósico; aunque estos ratones mutantes tienen osteoclastos, aparentemente estas células tienen deficiencias en la reabsorción ósea. Por lo tanto, RANKL y RANK, así como sus moléculas de señalización citoplásmica son los factores condicionantes que regulan la homeostasis ósea normal.

- [0005]** La relación entre la importancia de RANK/RANKL/OPG en la remodelación ósea y que la mayor parte de la destrucción ósea inducida por el cáncer se deba al aumento de la actividad osteoclástica sugieren un papel esencial de RANK/RANKL/OPG en las osteopatías y el cáncer. Además de la importancia de RANK/RANKL/OPG en la osteoporosis, informes recientes sugieren un papel potencial de estas moléculas en otras enfermedades, incluida la artritis reumatoide, el tumor óseo de células gigantes, la enfermedad de Paget y la osteolisis expansiva familiar (debida a una mutación en el exón 1 de RANK). Los cánceres metastásicos de mama y próstata tiene la capacidad de invadir y crecer como metástasis en el hueso y causar lesiones osteolíticas. En modelos de ratones con tumores metastásicos, en los que el tumor provoca un aumento de la osteoclastogénesis y la destrucción ósea, la administración sistémica de OPG reduce la destrucción ósea mediada por el tumor y el dolor asociado con el cáncer óseo. Por lo tanto, la selección como diana de la maquinaria de transducción de señales de RANK podría usarse potencialmente como estrategia terapéutica para inhibir la destrucción ósea no deseada asociada con el cáncer y

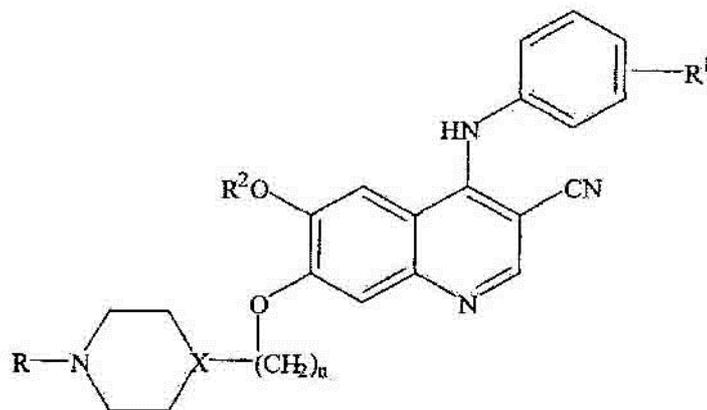
trastornos óseos metabólicos. Se necesitan estrategias adicionales para evitar la destrucción ósea no deseada asociada con cánceres metastásicos o afecciones asociadas o relacionadas con la pérdida ósea.

- [0006]** Shakespeare W. C. y col: "Novel bone-targeted SRC tyrosine kinase inhibitor drug discovery" Current Opin in Drug Discovery and Development, Current Drugs, Londres, Gran Bretaña, vol. 6, n°. 5, 1 de enero de 2003, páginas 729-741, describen el uso de inhibidores de la tirosina-cinasa Src en el tratamiento de la osteoporosis y osteopatías relacionadas con el cáncer. Los quinolinacarbonitrilos se desvelan entre los inhibidores comunes de Src, según se listan en esta publicación.
- 10 **[0007]** En el documento US 2003/045480 se desvela la preparación de inhibidores de la proteína-cinasa Src para el tratamiento de trastornos de hiperreabsorción ósea.
- [0008]** Susva M. y col: "Src inhibitors: drugs for the treatment of osteoporosis, cancer or both?" Trends in Pharmacological Sciences, Elsevier, Haywarth, Gran Bretaña, vol. 21, n° 12, 1 de diciembre de 2000, páginas 489-495, desvelan inhibidores de Src en el tratamiento de la osteoporosis, la reabsorción ósea y en el tratamiento de la metástasis ósea de ciertos cánceres.
- 15 **[0009]** Boschelli y col: "4-Anilino-3-Quinolinecarbonitriles: An Emerging Class of Kinase Inhibitors - An Update" Medicinal Chemistry Review - Online, Bentham Science Publishers, EE. UU., vol. 1, n° 4, 1 de octubre de 2004, páginas 457-463, desvelan la preparación de 4-anilino-3-quinolinacarbonitrilos como inhibidores de cinasa.
- 20 **[0010]** Boschelli D. H. y col: "Optimization of 4-phenylamino-3-quinolinecarbonitriles as potent inhibitors of Src kinase activity" Journal of Medicinal Chemistry, vol. 44, n°. 23, 8 de noviembre de 2001, páginas 3965-3977, desvelan la optimización del patrón de 4-fenilamino-3-quinolinacarbonitrilos para obtener potentes inhibidores de la actividad cinasa de Src.
- 25 **[0011]** Boschelli, Diane H. y col: "7-Alkoxy-4-phenylamino-3-quinolinecarbonitriles as Dual Inhibitors of Src and Abl Kinases" Journal of Medicinal Chemistry (2004), 47 (7), 1599-1601, desvelan la optimización del patrón de 7-alcoxi-4-fenilamino-3-quinolinacarbonitrilos para obtener dobles inhibidores de las cinasas Src y Abl para obtener compuestos de bajo peso molecular para el tratamiento de osteopatías metastásicas, cáncer y osteoporosis.
- 30 **[0012]** En el documento US 6002008 se desvela la preparación de derivados de 3-cianoquinolina y su uso como inhibidores de proteína-tirosina-cinasas para el tratamiento de neoplasias y la nefropatía poliquística. En el documento US 2003/212276 se desvela la preparación de 3-quinolinacarbonitrilos 7-sustituidos útiles para el tratamiento del cáncer.
- 35

### **RESUMEN DE LA INVENCION**

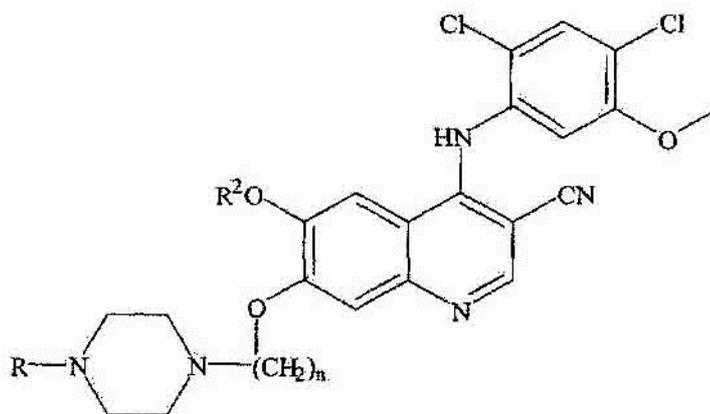
- [0013]** La presente invención se refiere al uso de un compuesto o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según se define en las reivindicaciones en la preparación de un producto farmacéutico para el tratamiento o la prevención de lesiones osteolíticas, enfermedades con reabsorción ósea o reabsorción ósea relacionada con una afección patológica. Además, la invención se refiere a un compuesto o a una fórmula según se definen en las reivindicaciones para uso en el tratamiento o prevención de lesiones osteolíticas, enfermedades con reabsorción ósea o reabsorción ósea relacionada con una afección patológica. La presente invención describe también compuestos de la fórmula estructural I, II, III o IV:
- 40
- 45

Fórmula I



en la que n es un número entero de 1 a 3; X es N, CH, siempre que cuando X es N, n es 2 o 3; R es un alquilo de 1 a 3 átomos de carbono; R(1) es 2,4-diCl, 5-OMe; 2,4-diCl; 3,4,5-tri-OMe; 2-Cl, 5-OMe; 2-Me, 5-OMe; 2,4-diMe; 2,4-diMe-5-OMe, 2,4-diCl, 5-OEt; R(2) es un alquilo de 1 o 2 átomos de carbono y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

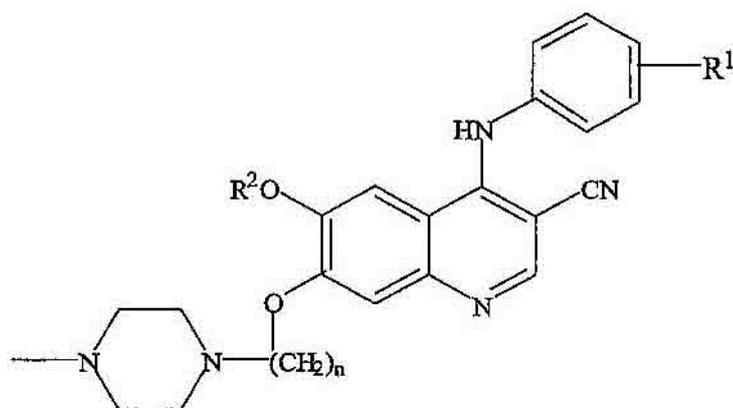
Fórmula II



10

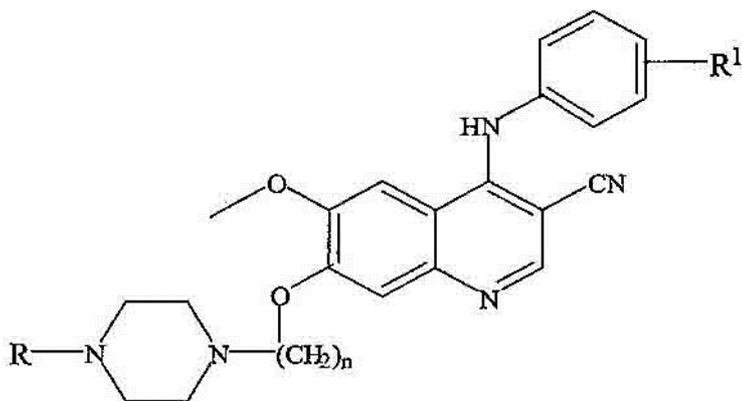
en la que n es 2 o 3; R es un alquilo de 1 a 3 átomos de carbono; R(2) es un alquilo de 1 o 2 átomos de carbono y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

15 Fórmula III



en la que n es 2 o 3; R(1) es 2,4-diCl, 5-OMe; 2,4-diCl; 3,4,5-tri-OMe; 2-Cl, 5-OMe; 2-Me, 5-OMe; 2,4-diMe; 2,4-diMe-5-OMe, 2,4-diCl, 5-OEt; R(2) es un alquilo de 1 o 2 átomos de carbono y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Fórmula IV



10

en la que n es 2 o 3; R es un alquilo de 1 a 3 átomos de carbono, R(1) es 2,4-diCl, 5-OMe; 2,4-diCl; 3,4,5-tri-OMe; 2-Cl, 5-OMe; 2-Me, 5-OMe; 2,4-diMe; 2,4-diMe-5-OMe, 2,4-diCl, 5-OEt.

**[0014]** El compuesto de esta invención puede usarse para el tratamiento, prevención o inhibición de la reabsorción ósea, la reabsorción ósea patológica, la actividad de los osteoclastos, la osteoclastogénesis, lesiones osteolíticas u otras afecciones patológicas asociadas con pérdida o destrucción óseas. En ciertas realizaciones, el compuesto se usa como parte de una composición farmacéutica.

**[0015]** Los compuestos específicos desvelados en este documento incluyen: compuesto **1** - 4-((2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino)-6-metoxi-7-(3-(4-metil-1-piperazinil)propoxi)-3-quinolinacarbonitrilo; compuesto **2** - 4-((2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino)-7-(3-(4-etil-1-piperazinil)propoxi)-6-metoxi-3-quinolinacarbonitrilo; compuesto **3** - 4-[(2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino]-6-metoxi-7-[2-(4-metil-1-piperazinil)etoxi]-3-quinolinacarbonitrilo; compuesto **4** - 4-[(2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino]-7-[2-(4-etil-1-piperazinil)etoxi]-6-metoxi-3-quinolinacarbonitrilo; compuesto **5** - 4-[(2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino]-6-metoxi-7-[(1-metilpiperidin-4-il)metoxi]-3-quinolinacarbonitrilo; compuesto **6** - 4-[(2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino]-6-metoxi-7-[2-(1-metilpiperidin-4-il)etoxi]-3-quinolinacarbonitrilo; compuesto **7** - 4-[(2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino]-6-metoxi-7-[3-(1-metilpiperidin-4-il)propoxi]quinolina-3-carbonitrilo; compuesto **8** - 4-[(2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino]-7-[(1-etilpiperidin-4-il)metoxi]-6-metoxiquinolona-3-carbonitrilo; compuesto **9** - 4-[(2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino]-6-etoxi-7-[3-(4-metilpiperazin-1-il)propoxi]quinolina-3-carbonitrilo; compuesto **10** - 4-[(2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino]-6-etoxi-7-[(1-metilpiperidin-4-il)metoxi]quinolina-3-carbonitrilo; compuesto **11** - 4-[(2,4-dicloro-5-

metoxifenil)amino]-6-etoxi-7-[3-(4-etilpiperazin-1-il)propoxi]quinolina-3-carbonitrilo; compuesto **12** - 4-[(2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino]-6-etoxi-7-[3-(1-metilpiperidin-4-il)propoxi]quinolina-3-carbonitrilo; compuesto **13** - 4-[(2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino]-6-etoxi-7-[2-(4-metil-1-piperazinil)etoxi]quinolina-3-carbonitrilo; compuesto **14** - 4-[(2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino]-6-etoxi-7-[2-(1-metilpiperidin-4-il)etoxi]quinolina-3-carbonitrilo; compuesto **15** - 4-[(2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino]-6-metoxi-7-[3-(4-propil-1-piperazinil)propoxi]-3-quinolinacarbonitrilo; compuesto **16** - 4-[(2,4-diclorofenil)amino]-6-metoxi-7-[(1-metilpiperidin-4-il)metoxi]-3-quinolinacarbonitrilo; compuesto **17** - 6-metoxi-7-[(1-metilpiperidin-4-il)metoxi]-4-[(3,4,5-trimetoxifenil)amino]quinolina-3-carbonitrilo; compuesto **18** - 4-[(2-cloro-5-metoxifenil)amino]-6-metoxi-7-[(1-metilpiperidin-4-il)metoxi]quinolina-3-carbonitrilo; compuesto **19** - 6-metoxi-4-[(5-metoxi-2-metilfenil)amino]-7-[(1-metilpiperidin-4-il)metoxi]quinolina-3-carbonitrilo; compuesto **20** - 4-[(2,4-dimetilfenil)amino]-6-metoxi-7-[(1-metilpiperidin-4-il)metoxi]quinolina-3-carbonitrilo; compuesto **21** - 6-metoxi-4-[(5-metoxi-2,4-dimetilfenil)amino]-7-[(1-metilpiperidin-4-il)metoxi]quinolina-3-carbonitrilo; compuesto **22** - 4-[(2,4-dicloro-5-etoxifenil)amino]-6-metoxi-7-[(1-metilpiperidin-4-il)metoxi]quinolina-3-carbonitrilo; y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. En ciertas realizaciones, un compuesto preferido es el compuesto **1** - 4-[(2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino]-6-metoxi-7-(3-(4-metil-1-piperazinil)propoxi)-3-quinolinacarbonitrilo.

15

**[0016]** Se contempla que cualquier procedimiento o composición descritos en este documento pueden implementarse con respecto a cualquier otro procedimiento o composición descritos en este documento.

**[0017]** El uso de las palabras “un” o “uno/una” cuando se usan junto con el término “comprende” en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva pueden significar “uno/una”, pero también corresponde al significado de “uno/una o más”, “al menos uno/una” y “uno/una o más de uno/una”.

**[0018]** El término “o” en las reivindicaciones se usa para indicar “y/o”, a menos que se indique explícitamente que se refiere a alternativas únicas o las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la descripción apoye una definición que se refiera a alternativas únicas e “y/o”.

**[0019]** Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción detallada siguiente. Sin embargo, deberá entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones específicas de la invención, se proporcionan solo a modo de ilustración, ya que diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y el alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

**[0020]** Los dibujos siguientes forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar con más detalle ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor con referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en este documento.

**Figuras 1A-1C.** SKI606 es un potente inhibidor de la osteoclastogénesis. (Figura 1A) La estructura del 4-fenilamino-3-quinolinacarbonitrilo SKI606. (Figura 1B) Se sembraron células BMM en placas de 48 pocillos ( $2 \times 10^4$  células/pocillo) y se estimularon con M-CSF (10 ng/ml) o M-CSF y RANKL (100 ng/ml) en grupos de cuatro con las concentraciones indicadas de SKI606. M-CSF se repuso el día tres. Las células se fijaron y se tiñeron para la detección de TRAP en el día cinco, mediante un kit de tinción de TRAP de Sigma-Aldrich (San Luis, MO, EE. UU.). (Figura 1C) Los datos mostrados son representativos de tres experimentos. Se muestran fotografías de campos representativos de los distintos tratamientos con un objetivo de 10x.

**Figuras 2A-2B.** Las células BMM responden a SKI606 en función del tiempo. (Figura 2A) Las células BMM se sembraron en placas de 48 pocillos ( $2 \times 10^4$  células/pocillo) y se pretrataron con M-CSF (10 ng/ml) o M-CSF y RANKL (300 ng/ml) en grupos de cuatro durante los tiempos indicados y después se trataron con SKI606 300 nM. M-CSF se repuso el día tres. Las células se fijaron y se tiñeron para la detección de TRAP en el día cinco, mediante un kit de tinción de TRAP de Sigma-Aldrich (San Luis, MO, EE. UU.). (Figura 2B) Los datos mostrados son representativos de tres experimentos. Las fotografías corresponden a campos representativos de los distintos tratamientos con un objetivo de 10x.

55

**Figuras 3A-3B.** Las células MDA-MB-435 estimulan la osteoclastogénesis en células RAW264.7. (Figura 3A) Las células RAW264.7 se sembraron (500 células/pocillo; 8 pocillos por tratamiento) en placas de 96 pocillos con células MDA-MB-435 a las densidades indicadas y se incubaron durante cinco días. (Figura 3B) El medio acondicionado se preparó según se describe anteriormente. Las células RAW264.7 se incubaron (750 células/pocillo; 8 pocillos por

tratamiento) con medio acondicionado por MDA-MB-435 a las concentraciones indicadas durante cinco días. Los cultivos se fijaron y se tiñeron para la detección de TRAP en el día cinco, mediante un kit de tinción de TRAP de Sigma-Aldrich (San Luis, MO, EE. UU.). Los datos mostrados son representativos de cinco experimentos. Las fotografías corresponden a campos representativos de los distintos tratamientos con un objetivo de 10x.

5

**Figuras 4A-4B.** SKI606 inhibe la osteoclastogénesis estimulada por MDA-MB-435 en las células RAW264.7. (Figura 4A) Las células RAW264.7 se sembraron (500 células/pocillo; 8 pocillos por tratamiento) en placas de 96 pocillos con células MDA-MB-435 (800 células/pocillo) a las densidades indicadas y se incubaron durante cinco días en presencia de dosis crecientes de SKI606. (Figura 4B) Las células RAW264.7 (750 células/pocillo; 8 pocillos por

10

tratamiento) se incubaron en placas de 96 pocillos en medio acondicionado por MDA-MB-435 al 10 % durante cinco días. Los cultivos se fijaron y se tiñeron para la detección de TRAP en el día cinco, mediante un kit de tinción de TRAP de Sigma-Aldrich (San Luis, MO, EE. UU.). (Figura 2B) Los datos mostrados son representativos de cinco experimentos.

15

**Figuras 5A-5C.** SKI606 disminuye significativamente el crecimiento tumoral y las lesiones osteolíticas. Se dividieron ratones en tres grupos de tratamiento. El tratamiento se inició tres días después de una inyección intratibial de  $5 \times 10^5$  células MDA-MB-435 con administración por sonda oral del vehículo (Methocel al 0,5 %, Tween al 0,4 % en PBS) o de 150 mg/kg de SKI606 en el vehículo o inyecciones subcutáneas de 10 mg/kg de Zomeda (ácido zolendrónico) en 0,1 ml de PBS, cinco días por semana durante nueve semanas. (Figura 5A) El peso del tumor se determinó de la manera siguiente: peso de la pata inyectada - peso de la pata trasera no inyectada del mismo animal. (Figura 5B) Las áreas de lisis se estimaron a partir de imágenes de rayos X digitales; se usó el programa NIH Scion para medir el área de las tibias y de las áreas líticas y calcular la relación entre los píxeles en las zonas líticas y los píxeles en el área de las tibias. (Figura 5C) La tibia con el tumor inyectado se fijó y descalcificó en EDTA y se tiñeron algunas secciones para detectar la presencia de osteoclastos multinucleados (más de tres núcleos)

20

25

mediante el kit de tinción de TRAP de Sigma-Aldrich (San Luis, MO, EE. UU.).

**Figuras 6A-6C.** SKI606 disminuye significativamente el crecimiento tumoral y las lesiones osteolíticas. Se tomaron imágenes de rayos X a los 35 días después de la inyección y también a intervalos de 14 días. Después de nueve semanas se tomaron imágenes finales de rayos X del grupo de control tratado por administración por sonda oral del vehículo (Methocel al 0,5 % / Tween al 0,4 % en PBS) (figura 6A), los ratones tratados con 150 mg/kg (figura 6B) o con Zomeda (figura 6C).

30

### **DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES ILUSTRATIVAS**

35

**[0021]** El tejido óseo vivo se repone continuamente por el proceso de reabsorción y deposición de minerales de calcio. Dos tipos de células, los osteoblastos y los osteoclastos, facilitan este proceso, descrito como el ciclo de absorción y reabsorción. El osteoclasto es una célula multinucleada y es la única célula en el cuerpo con capacidad conocida para degradar (o reabsorber) el hueso. En ciertas afecciones patológicas, el ciclo de absorción y reabsorción es defectivo, lo que resulta en la degradación ósea. Típicamente, la degradación ósea resulta típicamente en un aumento del riesgo de fracturas óseas patológicas, dolores de huesos, compresión medular e hipercalcemia.

40

45

**[0022]** Las realizaciones de la presente invención incluyen el uso de un compuesto o una fórmula según se definen en las reivindicaciones en la preparación de un producto farmacéutico para el tratamiento de lesiones osteolíticas, enfermedades con reabsorción ósea o reabsorción ósea relacionada con una afección patológica, que incluyen generalmente, pero no se limitan a osteoporosis, artritis, artritis reumatoide, metástasis cancerosas en el hueso, cáncer óseo, hipercalcemia, lesiones osteolíticas con implantes ortopédicos, enfermedad de Paget y la pérdida ósea asociada con hiperparatiroidismo. Algunos cánceres representativos incluyen, pero no se limitan a cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de endometrio, mieloma múltiple, carcinoma de células renales, cánceres de cabeza y cuello y carcinoma cervical. Las afecciones artríticas incluyen, pero no se limitan a artritis inducida por adyuvantes, colágeno, bacterias y antígenos, en particular la artritis reumatoide. Las lesiones osteolíticas incluyen, pero no se limitan a adamantinoma, quiste (lesión) óseo aneurismático, angiosarcoma de gran malignidad, angiosarcoma de escasa malignidad, lesiones óseas de la enfermedad de Gaucher, tumor pardo del hiperparatiroidismo, condroblastoma, fibroma condromixioide, condrosarcoma, cordoma, condrosarcoma de células claras, osteosarcoma intramedular convencional, enfermedad articular degenerativa, fibroma desmoplástico, estenosis medular diafisaria con histiocitoma fibroso maligno, encondroma, granuloma eosinófilo, hemangioendotelio epitelioide, sarcoma de Ewing en el hueso, osteosarcoma extraóseo, fibrosarcoma, displasia fibrosa, periostitis reactiva florida, tumor de células gigantes, tumor glómico, sarcoma granulocítico en el hueso, síndrome de Hardcastle, hemangioma, hemangiopericitoma, osteosarcoma superficial de gran malignidad, linfoma

50

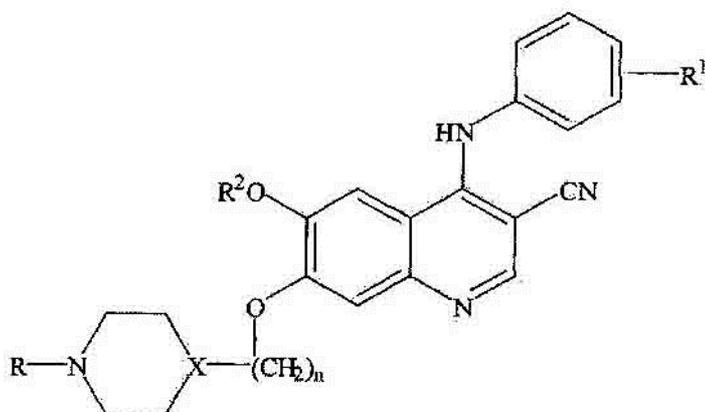
55

de Hodgkin en el hueso, osteosarcoma intracortical, osteosarcoma intraóseo bien diferenciado, condroma yuxtacortical, leucemia, histiocitoma fibroso maligno, melorreostosis, cáncer de mama metastásico, cáncer de riñón metastásico, cáncer de pulmón metastásico, cáncer de próstata metastásico, osteosarcoma multifocal, mieloma múltiple, miositis osificante, neurofibroma óseo, linfoma no de Hodgkin, fibroma no osificante (defecto cortical fibroso), lesión de Nora, osteoblastoma, osteocondroma, osteocondromatosis (hmoce), displasia osteofibrosa, osteoma osteoide, osteoma, osteomielitis, osteopatía estriada, osteopoiquiosis, osteosarcoma, enfermedad de Paget, osteosarcoma parostal, condroma periostal, osteosarcoma periostal, sinovitis vellonodular pigmentada, sarcoma post-Paget, schwannoma óseo, osteosarcoma de células pequeñas, quiste óseo solitario, tumor fibroso solitario, mieloma solitario (plasmacitoma), quiste subcondral, condromatosis sinovial, osteosarcoma telangiectásico, lesiones de "tirón" - defecto fibroso metafisiario o quiste óseo unicameral.

### I. INHIBIDORES DE CINASAS RELACIONADAS CON SRC

**[0023]** En la presente invención se describen compuestos de la fórmula estructural I:

15



en la que n es un número entero de 1 a 3; X es N, CH, siempre que cuando X es N, n es 2 o 3; R es un alquilo de 1 a 3 átomos de carbono; R(1) es 2,4-diCl, 5-OMe; 2,4-diCl; 3,4,5-tri-OMe; 2-Cl, 5-OMe; 2-Me, 5-OMe; 2,4-diMe; 2,4-diMe-5-OMe, 2,4-diCl, 5-OEt; R(2) es un alquilo de 1 o 2 átomos de carbono y/o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

20

**[0024]** Los compuestos específicos descritos en este documento incluyen: compuesto **1** - 4-((2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino)-6-metoxi-7-(3-(4-metil-1-piperazinil)propoxi)-3-quinolinacarbonitrilo; compuesto **2** - 4-((2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino)-7-(3-(4-etil-1-piperazinil)propoxi)-6-metoxi-3-quinolinacarbonitrilo; compuesto **3** - 4-((2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino)-6-metoxi-7-[2-(4-metil-1-piperazinil)etoxi]-3-quinolinacarbonitrilo; compuesto **4** - 4-((2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino)-7-[2-(4-etil-1-piperazinil)etoxi]-6-metoxi-3-quinolinacarbonitrilo; compuesto **5** - 4-((2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino)-6-metoxi-7-[(1-metilpiperidin-4-il)metoxi]-3-quinolinacarbonitrilo; compuesto **6** - 4-((2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino)-6-metoxi-7-[2-(1-metilpiperidin-4-il)etoxi]-3-quinolinacarbonitrilo; compuesto **7** - 4-((2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino)-6-metoxi-7-[3-(1-metilpiperidin-4-il)propoxi]quinolina-3-carbonitrilo; compuesto **8** - 4-((2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino)-7-[(1-etilpiperidin-4-il)metoxi]-6-metoxiquinolona-3-carbonitrilo; compuesto **9** - 4-((2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino)-6-etoxi-7-[3-(4-metilpiperazin-1-il)propoxi]quinolina-3-carbonitrilo; compuesto **10** - 4-((2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino)-6-etoxi-7-[(1-metilpiperidin-4-il)metoxi]quinolina-3-carbonitrilo; compuesto **11** - 4-((2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino)-6-etoxi-7-[3-(4-etilpiperazin-1-il)propoxi]quinolina-3-carbonitrilo; compuesto **12** - 4-((2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino)-6-etoxi-7-[3-(1-metilpiperidin-4-il)propoxi]quinolina-3-carbonitrilo; compuesto **13** - 4-((2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino)-6-etoxi-7-[2-(4-metil-1-piperazinil)etoxi]quinolina-3-carbonitrilo; compuesto **14** - 4-((2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino)-6-etoxi-7-[2-(1-metilpiperidin-4-il)etoxi]quinolina-3-carbonitrilo; compuesto **15** - 4-((2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino)-6-metoxi-7-[3-(4-propil-1-piperazinil)propoxi]-3-quinolinacarbonitrilo; compuesto **16** - 4-((2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino)-6-metoxi-7-[(1-metilpiperidin-4-il)metoxi]-3-quinolinacarbonitrilo; compuesto **17** - 6-metoxi-7-[(1-metilpiperidin-4-il)metoxi]-4-[(3,4,5-trimetoxifenil)amino]quinolina-3-carbonitrilo; compuesto **18** - 4-[(2-cloro-5-metoxifenil)amino]-6-metoxi-7-[(1-metilpiperidin-4-il)metoxi]quinolina-3-carbonitrilo; compuesto **19** - 6-metoxi-4-[(5-metoxi-2-metilfenil)amino]-7-[(1-metilpiperidin-4-il)metoxi]quinolina-3-carbonitrilo; compuesto **20** - 4-[(2,4-dimetilfenil)amino]-6-metoxi-7-[(1-metilpiperidin-4-il)metoxi]quinolina-3-carbonitrilo; compuesto **21** - 6-metoxi-4-[(5-metoxi-2,4-dimetilfenil)amino]-7-[(1-metilpiperidin-4-il)metoxi]quinolina-3-carbonitrilo; compuesto **22** - 4-[(2,4-dicloro-

35

40

5-etoxifenil)amino]-6-metoxi-7-[(1-metilpiperidin-4-il)metoxi]quinolina-3-carbonitrilo; y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

**[0025]** Los compuestos descritos en este documento pueden usarse para el tratamiento, mejora, prevención o inhibición de la osteoclastogénesis o la pérdida ósea. Los compuestos se usan como parte de una composición farmacéutica. En una realización preferida se usa el compuesto **1** - 4-((2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino)-6-metoxi-7-(3-(4-metil-1-piperazinil)propoxi)-3-quinolinacarbonitrilo en la inhibición de la osteoclastogénesis o la pérdida ósea.

**[0026]** Las sales farmacéuticamente aceptables son aquellas derivadas de ácidos orgánicos e inorgánicos como, por ejemplo: acético, láctico, carboxílico, cítrico, cinámico, tartárico, succínico, fumárico, maleico, malónico, mandélico, málico, oxálico, propiónico, clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, nítrico, sulfúrico, glicólico, pirúvico, metanosulfónico, etanosulfónico, toluenosulfónico, salicílico, benzoico y ácidos aceptables similarmente conocidos.

**[0027]** El término "alquilo" se refiere al radical de grupos alifáticos saturados, incluidos grupos alquilo de cadena lineal, grupos alquilo de cadena ramificada, grupos cicloalquilo (alíciclicos), grupos cicloalquilo sustituidos con alquilo y grupos alquilo sustituidos con cicloalquilo. En una realización preferida, un alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada tiene tres o menos átomos de carbono en su esqueleto.

**[0028]** El compuesto puede proporcionarse por vía oral, intralesional, intraperitoneal, inyección intramuscular o intravenosa, infusión, administración mediada por liposomas, por vía tópica, nasal, anal, vaginal, sublingual, uretral, transdérmica, intratecal, ocular u ótica. Con el fin de obtener consistencia al proporcionar el compuesto de esta invención, se prefiere que el compuesto de la invención esté en forma de una dosis unitaria. Las formas de dosis unitarias adecuadas incluyen comprimidos, cápsulas y polvos en sobres o viales. Tales formas de dosis unitarias pueden contener de 0,1, 0,5, 1, 10, 100, 200 a 300 ng o mg de un compuesto de la invención, incluidos todos los valores e intervalos intermedios y en ciertos aspectos de 2 a 100 ng o mg. En otra realización, las formas de dosificación unitaria contienen de 50 a 150 mg de un compuesto de la presente invención. El compuesto de la presente invención puede administrarse por vía oral o por otras vías de administración bien conocidas. Un compuesto tal puede administrarse de una, dos, tres, cuatro, cinco a seis veces al día, más normalmente de una, dos, tres a cuatro veces al día, semana o mes, durante semanas, meses o años. La cantidad eficaz podrá ser determinada por un experto en la técnica; también dependerá de la forma del compuesto. Un experto en la técnica podría realizar rutinariamente pruebas empíricas de actividad para determinar la bioactividad del compuesto en bioensayos y determinar de este modo la dosis que ha de administrarse, así como extrapolar y analizar datos de ensayos clínicos.

**[0029]** El compuesto de la invención puede formularse con excipientes convencionales tales como una carga, un desintegrante, un aglutinante, un lubricante, un aroma, un aditivo colorante o un vehículo. El vehículo puede ser, por ejemplo, un diluyente, un aerosol, un vehículo tópico, una disolución acuosa, una disolución no acuosa o un vehículo sólido. El vehículo puede ser un polímero. Un vehículo en esta invención comprende cualquiera de los vehículos estándar farmacéuticamente aceptados, tales como una disolución salina tamponada con fosfato, una disolución salina tamponada con acetato, agua, emulsiones tales como una emulsión de aceite/agua o una emulsión de triglicéridos, diversos tipos de humectantes, comprimidos, comprimidos recubiertos y/o cápsulas.

**[0030]** Cuando se proporciona por vía oral o tópica, tal compuesto será proporcionado a un sujeto por administración en vehículos diferentes. Típicamente, tales vehículos contienen excipientes tales como almidón, leche azúcar, ciertos tipos de arcilla, gelatina, ácido esteárico, talco, grasas o aceites vegetales, gomas o glicoles. El vehículo específico deberá seleccionarse sobre la base del procedimiento de administración deseado, por ejemplo, disolución salina tamponada con fosfato (PBS) podría usarse para la administración por vía intravenosa o sistémica y grasas vegetales, cremas, pomadas, ungüentos o geles pueden usarse para la administración por vía tópica.

**[0031]** El compuesto de la presente invención puede administrarse junto con los adecuados diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes y/o vehículos útiles en el tratamiento o prevención de una lesión osteolítica y/o pérdida ósea. Tales composiciones son líquidas o formulaciones liofilizadas o secas de otro modo e incluyen diluyentes con diverso contenido de tampones (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y fuerza iónica, aditivos tales como albúminas o gelatina para evitar la absorción a superficies, detergentes (por ejemplo, TWEEN 20, TWEEN 80, PLURONIC F68, sales de ácidos biliares), solubilizantes (por ejemplo, glicerol, polietilenglicerol), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfato de sodio), conservantes (por ejemplo, timerosal, alcohol bencílico, parabenos), sustancias espesantes o modificadores de la tonicidad (por ejemplo lactosa, manitol), unión covalente de polímeros tales como polietilenglicol, complejación con iones metálicos o incorporación del compuesto en o sobre preparaciones particuladas de hidrogeles o liposomas, microemulsiones, micelas,

vesículas unilamelares o multilamelares, fantasmas de eritrocitos o esferoblastos. Tales composiciones influirán en el estado físico, solubilidad, estabilidad, tasa de liberación *in vivo* y tasa de aclaramiento *in vivo* del compuesto o composición. La elección de las composiciones dependerá de las propiedades físicas y químicas del compuesto capaz de tratar, mejorar o prevenir una afección o estado de enfermedad concretos.

5

**[0032]** El compuesto de la presente invención puede administrarse localmente por medio de una cápsula que permite una liberación prolongada del compuesto durante un periodo de tiempo. Las composiciones de liberación controlada o prolongada incluyen la formulación en depósitos lipófilos (por ejemplo, ácidos grasos, ceras, aceites).

10 **[0033]** La presente invención proporciona además un compuesto de la invención para uso como sustancia terapéutica activa para el tratamiento, regulación, mejora, prevención o inhibición de la osteoclastogénesis o la pérdida ósea.

**[0034]** La presente invención proporciona además un procedimiento para el tratamiento de la pérdida ósea en humanos, que comprende la administración de una cantidad eficaz de un compuesto o de una composición farmacéutica de la invención al individuo al que se le ha diagnosticado una lesión osteolítica o presenta riesgo de padecerla. La dosis proporcionada al paciente variará en función de lo que se administre, el propósito de la administración, la manera de administración y similares. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad suficiente para curar, reducir o mejorar los síntomas de la pérdida ósea.

20

**[0035]** El compuesto de la invención puede administrarse solo o en combinación con otros compuestos usados para tratar cualquier estado de enfermedad o dolencia relacionadas.

**[0036]** El compuesto de esta invención se preparó a partir de: (a) materiales de partida comercialmente disponibles, (b) materiales de partida conocidos que pueden prepararse según se describe en la bibliografía o (c) nuevos compuestos intermedios descritos en los esquemas y en los procedimientos experimentales citados en este documento. Los compuestos incluidos en esta invención pueden prepararse de acuerdo con las rutas de síntesis desveladas en las patentes de los EE. UU. 6.002.008 y 6.780.996 y en la solicitud de patente de los EE. UU. 20050101780A1, cada una de las cuales se incorpora en este documento en su totalidad por referencia.

30

**[0037]** Las reacciones se llevan a cabo en un disolvente apropiado para los reactivos y materiales empleados y adecuado para las reacciones que se efectúan. Los expertos en la técnica de la síntesis orgánica entienden que las diversas funcionalidades presentes en la molécula deben ser consistentes con las transformaciones químicas propuestas. Cuando no se especifica, el orden de las etapas de síntesis, la elección de los grupos de protección y las condiciones de desprotección serán evidentes para los expertos en la técnica. Además, en algunos casos, los sustituyentes en los materiales de partida pueden ser incompatibles con ciertas condiciones de reacción. Las restricciones correspondientes a determinados sustituyentes será evidentes para los expertos en la técnica. Las reacciones se llevan a cabo en atmósferas inertes en los casos apropiados.

40 **[0038]** La preparación de los compuestos de la fórmula I ha sido descrita en la bibliografía (Boschelli y col., 2001a; Boschelli y col., 2001b; Boschelli y col., 2003; Boschelli y col., 2004 y Ye y col., 2001).

## II. CICLO DE ABSORCIÓN Y REABSORCIÓN ÓSEA

45 **[0039]** El tejido óseo vivo se repone continuamente por el proceso de reabsorción y deposición de minerales de calcio. Dos tipos de células, los osteoblastos y los osteoclastos, facilitan este proceso, descrito como el ciclo de absorción y reabsorción. El osteoclasto es una célula multinucleada y es la única célula en el cuerpo con capacidad conocida para degradar (o reabsorber) el hueso. Esta actividad de reabsorción la lleva a cabo el osteoclasto formando hoyos (reabsorción lagunar) en el tejido óseo. De hecho, la actividad de los osteoclastos en cultivo celular se mide por su capacidad de formar esos hoyos en cortes de tejido mineralizado tales como hueso o dentina de cachalote. El osteoclasto deriva de un precursor hematopoyético que tiene en común con los elementos formados de la sangre (Takahashi y col., 1987). El precursor del osteoclasto es una célula monoclear (célula con un único núcleo) que se encuentra en la médula ósea y que forma el osteoclasto multinucleado maduro y único tras experimentar replicación y diferenciación por medio de fusión celular. El osteoclasto maduro se distingue de otras células multinucleadas por la presencia de la enzima fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), que se usa a menudo como marcador celular para osteoclastos.

**[0040]** Entre las afecciones patológicas asociadas con un desarrollo o funcionamiento anormal de los osteoclastos se encuentran afecciones en las que el aumento de la reabsorción ósea resulta en el desarrollo de una

estructura ósea frágil y/o quebradiza tal como la osteoporosis, o el aumento de la absorción ósea resulta en el desarrollo de un exceso de masa ósea tal como la osteopetrosis. Se cree que el desarrollo de poblaciones excesivas o deficientes de osteoclastos u osteoblastos resulta en una correspondiente falta o exceso de citocinas específicas.

5 **[0041]** Muchas de las citocinas conocidas estimulan o inhiben a las células sanguíneas. Se ha demostrado que varias citocinas reguladoras del crecimiento, tales como M-CSF, el factor de crecimiento transformante  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), la interleucina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF), estimulan la proliferación de células mononucleares de la médula. Aunque citocinas tales como la interleucina 1, el factor de necrosis tumoral y la interleucina 6 (IL-6) pueden influir en la formación y diferenciación de los osteoclastos (Mundy, 1990), estos factores no son factores de  
10 regulación específicos del crecimiento de los osteoclastos.

**[0042]** Algunos modelos de ratones con RANKL, RANK y el receptor señuelo osteoprotegerina (OPG) inactivados han demostrado un papel esencial de estas moléculas en la osteoclastogénesis (es decir, la remodelación ósea). La importancia biológica de estas moléculas queda subrayada por la inducción de una grave  
15 osteoporosis por la disrupción específica de OPG y por la inducción de osteopetrosis por la disrupción específica de RANKL o por la expresión en exceso de OPG (Bucay y col., 1998; Kong y col., 1999; Mizuno y col., 1998). Por lo tanto, la formación de osteoclastos puede atribuirse a la proporción relativa entre RANKL y OPG en el microentorno de la médula ósea y las alteraciones de este equilibrio pueden una causa principal de la pérdida ósea en muchos trastornos óseos metabólicos. Al igual que en los ratones RANKL  $-/-$ , la disrupción específica de RANK también  
20 conduce a un fenotipo osteopetrótico (Dougall y col., 1999; Li y col., 2000). Tanto los ratones RANK  $-/-$  como RANKL  $-/-$  mostraron ausencia de osteoclastos, lo que indica la necesidad esencial de estas moléculas para la osteoclastogénesis. Además, RANK y RANKL se requieren para la organogénesis de los ganglios linfáticos y el desarrollo temprano de los linfocitos B y T (Dougall y col., 1999; Kong y col., 1999). Adicionalmente, los ratones que carecen de TRAF6 (Lomaga y col., 1997), c-Src (Soriano y col., 1991), c-Fos (Johnson y col., 1992) o las  
25 subunidades p50/p52 de NF- $\kappa$ B (Franzoso y col., 1997; Iotsova y col., 1997) muestran también un fenotipo osteopetrótico; aunque estos ratones mutantes tienen osteoclastos, aparentemente estas células parecen tener deficiencias en la reabsorción ósea.

**[0043]** El mantenimiento de la integridad ósea requiere un equilibrio dinámico entre la formación ósea y la  
30 reabsorción ósea. El tamaño neto de la reserva de osteoclastos activos queda determinado por los efectos netos de la diferenciación y fusión de los precursores de los osteoclastos y por la actividad y tasa de apoptosis de los osteoclastos activos. Aunque se ha demostrado que diversas citocinas (TNF, IL-1, IL-6, IL-11, TGF- $\alpha$ ) y moléculas (11 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D3 y glucocorticoides) expresadas por las células del linaje de los osteoblastos desempeñan un papel en la diferenciación de los osteoclastos, parece que los factores esenciales son RANKL  
35 (producido por osteoblastos) y RANK (expresado en osteoclastos y progenitores de osteoclastos), así como los mecanismos y rutas de señalización intracelular resultantes. Por lo tanto, se necesita M-CSF, pero su función sigue siendo elusiva, aunque probablemente solo se requiere para la iniciación de la diferenciación de los progenitores tempranos de los osteoclastos y su supervivencia.

40 **[0044]** El esqueleto humano está en continua remodelación, renovándose normalmente en aproximadamente dos años, lo que permite el uso del mineral esquelético en la homeostasis del calcio. La fuerza y la forma del esqueleto se conservan por sustitución segmentaria: una sección del hueso es degradada por osteoclastos, formados a partir de precursores de monocitos y macrófagos (Scheven y col., 1986; Fujikawa y col., 1996), mientras que los osteoblastos, derivados de células del estroma, sintetizan nuevo hueso (Rickard y col., 1996). Estas células,  
45 que no están relacionadas entre sí, se diferencian de manera acoplada y producen una nueva sección ósea en pocas semanas.

**[0045]** Los osteoclastos, que son células gigantes multinucleadas, se producen a partir de células madre hematopoyéticas y son las principales células responsables de la reabsorción ósea fisiológica y patológica. Los  
50 osteoclastos están especializados en la eliminación de las fases inorgánica y orgánica del hueso (Blair y col., 1986). Los cambios en los niveles de citocinas y factores de crecimiento en el microentorno del hueso provocan una reabsorción ósea anormal por parte de los osteoclastos (véase Mundy y col., 1997, como revisión). Por consiguiente, la expresión forzada de IL-4 (Lewis y col., 1993) y G-CSF (Takahashi y col., 1996) en ratones induce osteopenia, mientras que los ratones que expresan en exceso el receptor soluble de TNF- $\alpha$  (Ammann y col., 1997) o sin el gen  
55 de IL-6 (Poli y col., 1994) están protegidos contra la pérdida ósea causada por la deficiencia de estrógenos.

**[0046]** La disolución de la fase mineral de hidroxiapatito depende de la acidificación de la laguna de reabsorción subosteoclástica por la acción de la anhidrasa carbónica II y una bomba de protones (Vaes, 1968; Baron y col., 1985; Blair y col., 1992).

**[0047]** Una excesiva reabsorción ósea por los osteoclastos contribuye a la patología de muchas enfermedades humanas, incluida la artritis, la osteoporosis, la periodontitis y la hipercalcemia del cáncer. Durante la reabsorción, los osteoclastos eliminan los componentes tanto minerales como orgánicos del hueso (Blair y col., 5 1986). Las principales enfermedades óseas actuales de interés público son la osteoporosis, la hipercalcemia del cáncer, la osteopenia debida a metástasis óseas, la periodontitis, el hiperparatiroidismo, erosiones periarticulares en la artritis reumatoide, la enfermedad de Paget, la osteopenia inducida por inmovilización y el tratamiento con glucocorticoides. Todas estas afecciones se caracterizan por la pérdida ósea que resulta de un desequilibrio entre la reabsorción ósea (degradación) y la formación ósea, que continúa durante toda la vida a una tasa de 10 aproximadamente el 14 % anual, en promedio. Sin embargo, la tasa de renovación ósea difiere entre los distintos sitios, por ejemplo, es mayor en el hueso trabecular de las vértebras y el hueso alveolar de las mandíbulas que en la corteza de los huesos largos. El potencial de pérdida ósea está directamente relacionado con la renovación y puede representar más del 5 % anual en las vértebras inmediatamente después de la menopausia, una afección que conduce a un aumento del riesgo de fracturas. La renovación puede efectuarse por un aumento o una disminución 15 de la actividad de los osteoblastos o un aumento o disminución de la actividad de los osteoclastos. Las composiciones y procedimientos para la modulación de la actividad de los osteoblastos y/o los osteoclastos en un sujeto será útil en el tratamiento de diversas enfermedades o afecciones asociadas con la pérdida ósea.

**[0048]** Todas las afecciones mencionadas anteriormente se beneficiarían del tratamiento con agentes que 20 inhiban o regulen la osteoclastogénesis o la reabsorción ósea. Un mecanismo para la inhibición de la reabsorción ósea es la inhibición de la fusión de las células precursoras de osteoclastos.

### III. PROCEDIMIENTOS PARA EL TRATAMIENTO DE AFECCIONES OSTEOLÍTICAS

**[0049]** La presente invención también es adecuada para el tratamiento de sujetos con una enfermedad o 25 afección de reabsorción ósea patológica. El término "beneficio terapéutico" se refiere a todo lo que estimule o potencie el bienestar del sujeto con respecto al tratamiento médico de su afección, lo que incluye el tratamiento de afecciones osteolíticas y/o la regulación de la reabsorción ósea, la actividad de los osteoclastos y/ la osteoclastogénesis.

30

#### A. Formulaciones farmacéuticas y administración

**[0050]** Se contemplan los procedimientos que implican la administración del compuesto de la invención. Algunos ejemplos de enfermedades y afecciones que pueden prevenirse, mejorarse, o tratarse con uno o más 35 compuestos de la invención incluyen la pérdida ósea asociada con la metástasis cancerosa en el hueso, que incluye, pero no se limita a metástasis de cáncer de pulmón, cabeza y cuello, mama, pancreático, de próstata, renal, óseo, testicular, cervical, gastrointestinal, de colon, vejiga u otras metástasis cancerosas, así como otras enfermedades o afecciones relacionadas o asociadas con lesiones osteolíticas.

**[0051]** Una "cantidad eficaz" de la composición farmacéutica, en general, se define como la cantidad suficiente 40 para conseguir de manera detectable y repetida el resultado deseado establecido, por ejemplo, mejorar, reducir, minimizar o limitar el alcance de la afección o enfermedad osteolítica o sus síntomas. En ciertos aspectos pueden aplicarse definiciones más rigurosas, incluida la prevención, eliminación, erradicación o cura de la enfermedad.

**[0052]** En ciertas realizaciones específicas, se desea inhibir la osteoclastogénesis o de otra manera revertir, 45 impedir o reducir la reabsorción ósea mediante los procedimientos y composiciones de la presente invención. Por supuesto, las vías de administración variarán con la localización y naturaleza de la lesión y pueden incluir, por ejemplo, la administración y formulación para la vía intradérmica, subcutánea, regional, parenteral, intravenosa, intramuscular, intranasal, sistémica y oral.

50

**[0053]** También puede aplicarse una administración continua en caso apropiado. Se contempla la 55 administración por medio de una jeringa o cateterización. Tal perfusión continua puede tener lugar durante un periodo de aproximadamente 1-2 horas a aproximadamente 2-6 horas, a aproximadamente 6-12 horas, a aproximadamente 12-24 horas, a aproximadamente 1-2 días, a aproximadamente 1-2 semanas o un periodo más largo después de la iniciación del tratamiento. En general, la dosis de la composición terapéutica por medio de perfusión continua será equivalente a la administrada por medio de inyecciones únicas o múltiples, ajustada durante el periodo de tiempo durante el cual tiene lugar la perfusión.

**[0054]** Los tratamientos pueden incluir diversas "dosis unitarias". Una dosis unitaria se define como la que

contiene una cantidad predeterminada de la composición terapéutica. La cantidad que ha de administrarse y la vía de administración y formulación concretas se encuentran dentro de los conocimientos del experto en la técnica clínica. Una dosis unitaria no tiene necesariamente que administrarse como una única inyección, sino que puede comprender una infusión continua durante un periodo de tiempo establecido. Una dosis unitaria de la presente invención puede describirse convenientemente en términos de mg por volumen de formulación o peso (por ejemplo, miligramos o mg) de la composición terapéutica.

**[0055]** En algunas realizaciones, el procedimiento para la administración de una composición que comprende una o más composiciones de la invención es la administración por vía sistémica. Sin embargo, las composiciones farmacéuticas desveladas en este documento pueden administrarse alternativamente por vía parenteral, subcutánea, intratraqueal, intravenosa, intradérmica, intramuscular o incluso intraperitoneal. La inyección puede ser mediante jeringa o por cualquier otro procedimiento usado para la inyección de una disolución.

**[0056]** Las disoluciones de los compuestos activos pueden prepararse como bases libres o sales farmacológicamente aceptables en agua mezcladas adecuadamente con un tensioactivo tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En las condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos. Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación magistral de disoluciones o dispersiones inyectables estériles (patente de los EE. UU. 5.466.468). En todos los casos, la forma debe ser estéril y tener un grado de fluidez tal que sea fácilmente inyectable. Debe ser estable en las condiciones de preparación y almacenamiento y debe estar protegida contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.

**[0057]** El vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y/o aceites vegetales. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede conseguirse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanbol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse mediante el uso en las composiciones de agentes retardantes de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

**[0058]** Para la administración por vía parenteral en una disolución acuosa, por ejemplo, la disolución debe tamponarse adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido ha de hacerse primeramente isotónico con la suficiente disolución salina o glucosa. Estas disoluciones acuosas concretas son especialmente adecuadas para la administración por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, intratumoral e intraperitoneal. En este contexto, los expertos en la técnica sabrán qué medios acuosos estériles pueden usarse a la vista de la presente descripción. Por ejemplo, una dosificación puede disolverse en 1 ml de una disolución isotónica de NaCl y añadirse a 1.000 ml de líquido de hipodermoclasia o inyectarse en el punto de inyección propuesto, (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 15.<sup>a</sup> edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Alguna variación en la dosificación tendrá lugar necesariamente en función de la afección del sujeto que se trate. En cualquier caso, la persona responsable de la administración determinará la dosis adecuada para el sujeto individual. Además, para la administración a pacientes humanos, las preparaciones deberán satisfacer los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza requeridos por la Oficina de Productos Biológicos de la FDA.

**[0059]** Las disoluciones inyectables estériles se preparan por incorporación de los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se necesite y, a continuación, esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan por incorporación de diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación son técnicas de secado al vacío y de liofilización que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una disolución de los mismos previamente esterilizada por filtración.

**[0060]** Las composiciones desveladas en este documento pueden formularse en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y las que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, los ácidos clorhídrico o fosfórico, o

ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. También pueden derivarse sales formadas con los grupos carboxilo libres de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxido de sodio, potasio, amonio, calcio o hierro y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares. Tras la formulación, las disoluciones se administrarán de manera compatible con la forma farmacéutica y en la cantidad necesaria para que sean terapéuticamente eficaces. Las formulaciones se administran fácilmente en diversas formas farmacéuticas, tales como disoluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármacos y similares.

**[0061]** Según se usa en este documento, "vehículo" incluye todos y cualquiera de los disolventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, tampones, disoluciones vehículo, suspensiones, coloides y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias con actividad farmacéutica es bien conocido en la técnica. Se contempla el uso en las composiciones terapéuticas de cualquier medio o agente convencional excepto en el caso de que sean incompatibles con el principio activo. También pueden incorporarse en las composiciones principios activos adicionales.

**[0062]** La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica o una reacción adversa similar cuando se administran a un paciente humano. La preparación de una composición acuosa que contiene una proteína como ingrediente activo es bien conocida en la técnica. Típicamente, estas composiciones se preparan como inyectables, bien como disoluciones o como suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para disolución o suspensión en un líquido antes de su inyección.

#### B. Tratamientos de combinación

**[0063]** En ciertas realizaciones, las composiciones y procedimientos de la presente invención implican un compuesto que inhibe o regula la reabsorción ósea, la actividad de los osteoclastos y/o la osteoclastogénesis y que, a su vez, puede usarse en combinación con otros agentes o composiciones para potenciar el efecto de otros tratamientos tales como tratamientos antineoplásicos, para mejorar la calidad de vida del sujeto tratado. Estas composiciones se suministrarán en una cantidad combinada eficaz para conseguir el efecto deseado, por ejemplo, la destrucción o la inhibición del crecimiento de una célula cancerosa y la inhibición de la osteoclastogénesis, la actividad de los osteoclastos o la reabsorción ósea. Este proceso puede implicar la puesta en contacto de las células con una composición de la invención y un segundo agente terapéutico o agentes terapéuticos o múltiples factores al mismo tiempo. Esto puede conseguirse mediante la puesta en contacto de la célula con una única composición o formulación farmacológica que incluye dos o más agentes o mediante la puesta en contacto de la célula con dos o más composiciones o formulaciones distintas, en que al menos una composición incluye una composición de la invención y una o más de las otras composiciones incluye al menos un segundo agente terapéutico.

**[0064]** En una realización de la presente invención, se contempla el uso de un tratamiento antiosteoclástico junto con un tratamiento de inmunoterapia, además de agentes proapoptóticos, antiangiogénicos, antineoplásicos o reguladores del ciclo celular. Alternativamente, el tratamiento puede preceder o seguir al otro agente de tratamiento en intervalos que oscilan de minutos a semanas. En realizaciones en las que se administran uno o más segundos agentes terapéuticos y un tratamiento antiosteoclástico por separado a una célula, tejido, órgano o sujeto, se asegurará en general que no transcurra un periodo de tiempo significativo entre los momentos de cada administración, de modo que el segundo agente y la composición de la invención todavía sean capaces de ejercer un efecto combinado ventajoso en el sujeto. En tales casos, se contempla que pueda ponerse en contacto la célula con las dos modalidades con un intervalo de separación de aproximadamente 12-24 h entre sí y, con mayor preferencia, de aproximadamente 6-12 h entre sí. Sin embargo, en otras situaciones, puede ser deseable extender significativamente el periodo de tiempo del tratamiento, con un lapso de tiempo de varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) entre las respectivas administraciones.

**[0065]** Pueden emplearse diversas combinaciones, por ejemplo, una combinación de la presente invención es "A" y un segundo tratamiento, tal como quimioterapia, es "B":

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

B/B/B/A B/B/A/B A/ABB A/B/A/B A/B/B/A BB/A/A

B/AB/A B/A/AB A/A/A/B B/A/A/A AB/A/A A/AB/A

**[0066]** La administración de las composiciones antiosteoclásticas de la presente invención a un paciente seguirá los protocolos generales para la administración de tales composiciones, teniendo en cuenta la toxicidad, en su caso. Se espera una repetición de los ciclos de tratamiento según sea necesario. También se contempla la posible administración de diversos tratamientos estándar, así como intervenciones quirúrgicas, en combinación con el tratamiento descrito.

**[0067]** En realizaciones específicas, se contempla el empleo de un tratamiento contra el cáncer tal como quimioterapia, radioterapia o inmunoterapia, en combinación con los tratamientos antiosteoclásticos descritos en este documento.

10

### 1. Quimioterapia

**[0068]** Los tratamientos contra el cáncer incluyen además diversos tratamientos de combinación con tratamientos a base de sustancias químicas y de radiación. Las quimioterapias de combinación incluyen, por ejemplo, cisplatino (CDDP), carboplatino, procarbazona, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, busulfano, nitrosourea, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, bleomicina, plicomicina, mitomicina, etopósido (VP16), tamoxifeno, raloxifeno, agentes de unión al receptor de estrógeno, taxol, gemcitabina, navelbina, inhibidores de la farnesiltransferasa, transplatino, 5-fluorouracilo, vincristina, vimblastina y metotrexato o cualquier análogo o variante derivada de los anteriores.

20

### 2. Radioterapia

**[0069]** Otros factores que dañan al ADN y se han usado extensivamente incluyen lo que se conoce normalmente por rayos  $\gamma$ , rayos X y/o la administración directa de radioisótopos a las células cancerosas. Se contemplan también otras formas de factores dañinos para el ADN tales como las microondas, la irradiación con haces de protones (patente de los EE. UU. 5.760.395 y patente de los EE. UU. 4.870.287) y la radiación UV. Lo más probable es que todos estos factores produzcan una amplia diversidad de daños en el ADN, en los precursores del ADN, en la replicación y reparación del ADN y en el ensamblaje y mantenimiento de los cromosomas. Los intervalos de dosificación de los rayos X oscilan desde dosis diarias de 50 a 200 roentgen durante periodos de tiempo prolongados (tres a cuatro semanas) hasta dosis únicas de 2.000 a 6.000 roentgen. Los intervalos de dosificación para los radioisótopos varían ampliamente y dependen del periodo de semidesintegración del isótopo, la energía y el tipo de radiación emitida y la absorción por las células neoplásicas.

**[0070]** Los términos “puesta en contacto” y “expuesta”, aplicados a una célula, se usan en este documento para describir el proceso por el que una composición terapéutica y un agente quimioterapéutico o radioterapéutico se administran a una célula, tejido o sujeto diana o se ponen en yuxtaposición directa.

### 3. Inmunoterapia

**[0071]** En el contexto del tratamiento del cáncer, la inmunoterapéutica se basa, generalmente, en el uso de células y moléculas efectoras inmunitarias (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) para reconocer específicamente y destruir células cancerosas. Un ejemplo de estas es trastuzumab (Herceptin<sup>TM</sup>). El efector inmunitario puede ser, por ejemplo, un anticuerpo específico para algún marcador de la superficie de una célula tumoral. El anticuerpo por sí solo puede servir como efector del tratamiento o puede atraer otras células para llevar a cabo efectivamente la destrucción celular. El anticuerpo puede estar conjugado también con un fármaco o toxina (una sustancia quimioterapéutica, un radionúclido, la cadena A de la ricina, la toxina del cólera, la toxina pertúsica, etc.) y servir solamente como agente de reconocimiento específico. Alternativamente, el efector puede ser un linfocito con una molécula superficial que interacciona, directa o indirectamente, con una célula diana tumoral. Las diversas células efectoras incluyen linfocitos T citotóxicos y linfocitos citolíticos naturales (NK). La combinación de modalidades terapéuticas, es decir, la actividad citotóxica directa y la inhibición o reducción de ErbB2 proporcionarán un beneficio terapéutico en el tratamiento de cánceres que expresan en exceso ErbB2.

**[0072]** Existe una serie de estrategias diferentes para la inmunoterapia pasiva del cáncer. Pueden clasificarse ampliamente en las siguientes: inyección de anticuerpos solamente; inyección de anticuerpos acoplados a toxinas o agentes quimioterapéuticos; inyección de anticuerpos acoplados a isótopos radiactivos.; inyección de anticuerpos antiidiotipos; y finalmente, purga de células tumorales en la médula ósea.

**[0073]** En la inmunoterapia activa se administra un péptido, polipéptido o proteína antigénicos o una composición o “vacuna” de células tumorales autólogas o alogénicas, generalmente con un adyuvante bacteriano

distinto (Ravindranath y Morton, 1991; Morton y col., 1992; Mitchell y col., 1990; Mitchell y col., 1993). En la inmunoterapia en melanoma, aquellos pacientes que producen una elevada respuesta de IgM, con frecuencia muestran mayor supervivencia que aquellos que no producen anticuerpos IgM o una baja cantidad de los mismos (Morton y col., 1992). Los anticuerpos IgM son a menudo anticuerpos transitorios y la excepción a la regla parecen ser los anticuerpos contra gangliósidos o carbohidratos.

**[0074]** En la inmunoterapia adoptiva, los linfocitos que circulan en el paciente o los linfocitos infiltrados en el tumor se aíslan *in vitro*, se activan por linfocinas tales como IL-2 o se transducen con genes de necrosis tumoral y se readministran (Rosenberg y col., 1988; 1989). Para conseguir esto, se administraría a un animal o a un paciente humano una cantidad inmunológicamente eficaz de los linfocitos activados en combinación con una composición de un péptido antigénico con adyuvantes incorporados, según se describe en este documento. Los linfocitos activados serán preferentemente células propias del paciente aisladas anteriormente de una muestra de sangre o de un tumor y activadas (o "expandidas") *in vitro*. Esta forma de inmunoterapia ha producido varios casos de remisión de melanoma y carcinoma renal, pero el porcentaje de pacientes con respuesta fue pequeño en comparación con aquellos sin respuesta.

#### 4. Cirugía

**[0075]** Aproximadamente el 60 % de las personas con cáncer se someterán a algún tipo de cirugía, incluida la cirugía preventiva, de diagnóstico o estadificación, curativa y paliativa. La cirugía curativa incluye la resección, en la que la totalidad o parte del tejido canceroso se elimina físicamente, se extirpa y/o destruye. La resección tumoral se refiere a la eliminación física de al menos parte de un tumor. Además de la resección tumoral, el tratamiento quirúrgico incluye cirugía con láser, criocirugía, electrocirugía y cirugía controlada al microscopio (cirugía de Moh). Además, se contempla que la presente invención puede usarse junto con la eliminación de cánceres superficiales, precánceres o pequeñas cantidades de tejido normal.

#### EJEMPLOS

**[0076]** Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la técnica deberán apreciar que las técnicas desveladas en los ejemplos que siguen representan técnicas que los inventores han descubierto que funcionan bien en la práctica de la invención y que, por lo tanto, puede considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica.

#### EJEMPLO 1

#### PROCEDIMIENTOS

**[0077]** **Animales y líneas celulares.** Las hembras de ratones atímicos sin pelo NCr se obtuvieron del Área de Producción Animal del Instituto Nacional del Cáncer, Frederick Cancer Research Facility (Frederick, MD, EE. UU.). Los ratones Black 6 (C57BL/6J) se obtuvieron de Charles Rivers (Wilmington, MA, EE. UU.). Los ratones se mantuvieron en una cámara de flujo laminar en condiciones específicas sin patógenos y se usaron a las ocho semanas de edad. Todas las instalaciones fueron aprobadas por la Asociación Americana de Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio (AAALAC), el Departamento de Salud y Servicios Humanos y los NIH. Los ratones se alimentaron con pienso para roedores Purina y agua del grifo a voluntad. La línea celular de cáncer de mama, MDA-MB-435 se mantuvo en medio D-MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) enriquecido con FBS al 10 % y piruvato de sodio 1 mM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). La línea celular de macrófagos de ratón RAW264.7 se mantuvo en medio DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) enriquecido con FBS al 10 % (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). Todos los medios contenían Fungizone en una dilución de 1:100 (concentración final: penicilina G, estreptomycin, 100 unidades/ml y anfotericina B, 250 ng/ml).

**[0078]** **Cultivo de células primarias de médula ósea.** Se diseccionaron asépticamente células primarias de médula ósea (BMM) de las tibias y los fémures de ratones Black 6 (C57BU6J) de 8-12 semanas de edad. La médula ósea se lavó con medio D-MEM incompleto, se centrifugó a 1.200 rpm durante 3 min y se resuspendió en 5 ml de medio D-MEM incompleto. Las células BMM se incubaron en 20 ml de tampón de lisis Red Blood Cell (8,3 g/l de NH<sub>4</sub>Cl, 1 g/l de bicarbonato de sodio, 0,4 g/l de EDTA) a temperatura ambiente durante 1-2 min. Se añadieron 25 ml de D-MEM enriquecido con FBS al 10 % y 100 unidades/ml de penicilina (D-MEM completo) y las células BMM se centrifugaron durante 3 min a 1.200 rpm. A continuación, las células BMM se sembraron en placas a una densidad de 1,5-2 x 10<sup>7</sup> células/placa de 10 cm con 10 ml de D-MEM completo y se cultivaron durante 24 h. Se recogieron las células no adheridas que se centrifugaron durante 5 min a 1.200 rpm y se sembraron a una concentración de 2,5 x

10<sup>4</sup> células/pocillo en una placa de 96 pocillos para el ensayo de citotoxicidad, de 2 x 10<sup>4</sup> células/pocillo en placas de 48 pocillos o 5 x 10<sup>3</sup> células/pocillo en placas de 96 pocillos para los ensayos de diferenciación de osteoclastos. Las células se cultivaron durante tres días en presencia de 10 ng/ml de M-CSF antes de lavarlas y usarlas para otros estudios. Para la diferenciación en osteoclastos se añadieron 30-100 ng/ml de RANKL. A los dos días se añadieron 5 de nuevo M-CSF y RANKL al medio.

**[0079] Ensayo de citotoxicidad.** La citotoxicidad de SKI606 para células BMM se analizó en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos de fondo plano. Las células BMM (2,5 x 10<sup>4</sup>) se sembraron en las placas y se trataron según se describe anteriormente. El compuesto SKI606 se diluyó en medio de cultivo y se añadió a los pocillos en 10 diluciones seriadas dobles. Las células se incubaron durante 72 h y aquellas que quedaron adheridas se tiñeron con violeta cristal (al 0,5 % en metanol al 20 %) y se solubilizaron con tampón de Sorenson (citrato de sodio 0,1 M, pH 4,2, en etanol al 50 %). La absorbancia se midió a 630 nm mediante un lector de microplacas universal EL800 de Bio-Tek Instruments Inc (Winooski, VT, EE. UU.).

15 **[0080] Diferenciación de osteoclastos *in vitro*.** Se cultivaron células BMM (2 x 10<sup>4</sup>) en placas de 48 pocillos según se describe anteriormente y después se trataron con 100 ng/ml de RANKL y 10 ng/ml de M-CSF. Los cultivos celulares se sometieron a un cambio de medio en el día tres. En el día cinco, las células se fijaron y se evaluó la diferenciación de osteoclastos mediante recuento del número total de células multinucleadas (más de tres núcleos) 20 positivas para TRAP por pocillo mediante un kit para detección de la actividad fosfatasa ácida en leucocitos de Sigma-Aldrich (San Luis, MO, EE. UU.).

**[0081] Ensayo de reabsorción ósea.** Se cultivaron células BMM (5 x 10<sup>3</sup>) en placas de 96 pocillos según se describe anteriormente. Brevemente, las células se sembraron en placas OsteoAssay<sup>TM</sup> de Cambrex (Rockland, ME, EE. UU.) y se trataron inicialmente con 100 ng/ml de RANKL y 10 ng/ml de M-CSF, con o sin SKI606 300 nM. En el 25 día tres, se añadieron de nuevo 10 ng/ml de M-CSF. En el día cinco, se usó una alícuota de 20 µl del sobrenadante para evaluar la reabsorción ósea a partir de la placa OsteoAssay<sup>TM</sup>. La reabsorción ósea se evaluó por medición de la liberación de colágeno I de la placa OsteoAssay<sup>TM</sup> con el kit CrossLaps for Culture ELISA de Nordic Bioscience Diagnostics (Porstmouth, VA, EE. UU.). La absorbancia se midió a 450 nm, usando como referencia la lectura a 650 nm, mediante un lector de microplacas universal EL800 de Bio-Tek Instruments Inc (Winooski, VT, EE. UU.).

30 **[0082] Dependencia del tiempo.** Se cultivaron células BMM (2 x 10<sup>4</sup>) en placas de 48 pocillos según se describe anteriormente y se trataron con RANKL (100 ng/ml) en ausencia o presencia de SKI606 300 nM, añadido con la estimulación por RANKL y con tinción de TRAP a las 96 h después del tratamiento o añadido a las 12, 24 o 48 h después de la estimulación por RANKL y con tinción de TRAP a las 96 h. A continuación, las células se fijaron, se 35 tiñeron para detectar TRAP y se contó el número de osteoclastos en cada condición según se describe anteriormente.

**[0083] Cocultivo de células RAW 264.7 con células MDA-MB-435 y medio acondicionado.** Para los ensayos de cocultivo, se sembraron las células RAW264.7 (500 células/pocillo) en placas de 96 pocillos y se les dejó 40 adherirse durante 12 h. A continuación, se introdujeron las células MDA-MB-435 en el cultivo de RAW264.7 a densidades crecientes y se incubó durante 12 h. Los cocultivos se incubaron después con o sin SKI606 a las concentraciones indicadas durante cinco días. A continuación, las células se fijaron, se tiñeron para detectar TRAP y se contó el número de osteoclastos en cada condición según se describe anteriormente.

45 **[0084]** Para el medio acondicionado, las células MDA-MB-435 se sembraron en placas de 10 cm (1 x 10<sup>6</sup> células/placa) y se incubaron durante 36 h. El medio se extrajo, se centrifugó durante 5 min a 2.500 rpm y los sobrenadantes se aislaron y guardaron a 4 °C hasta su uso. Las células RAW264.7 (750 células/pocillo) se sembraron en placas de 96 pocillos y se les dejó adherirse durante 12 h. Se les añadió el medio acondicionado por las células MDA-MB-435 y se incubaron con o sin SKI606 a las concentraciones indicadas durante cinco días. A 50 continuación, las células se fijaron, se tiñeron para detectar TRAP y se contó el número de osteoclastos en cada condición según se describe anteriormente.

**[0085] Infecciones intraóseas y procesamiento de muestras de tejido óseo.** Se recogieron células MDA-MB-435 con una disolución de tripsina al 0,025 %, EDTA al 0,01 %, se lavaron con PBS y se resuspendieron en PBS 55 en preparación para su implantación en ratones. Los animales se anestesiaron con inyecciones intramusculares de ketamina (100 mg/kg) más acepromacina (2,5 mg/kg). Se inyectaron 5 x 10<sup>5</sup> células de cáncer de mama MDA-MB-435 en 0,01 ml de PBS en la tibia proximal de hembras de ratones atímicos sin pelo NCr mediante una aguja Hamilton de calibre 28. Tres días después de la inyección, los ratones se dividieron en tres grupos y se inició el tratamiento de administración diaria por sonda oral del vehículo (Methocel al 0,5 %, Tween al 0,4 % en PBS), 150

mg/kg de SKI606 en el vehículo o inyecciones subcutáneas de 10 µg/kg de Zomeda (ácido zolendróico) en 0,1 ml de PBS. El tratamiento se administró diariamente, cinco días por semana, durante nueve semanas. Se tomaron imágenes de rayos X a los 35 días después de la inyección y también a intervalos de 14 días. Después de nueve semanas se tomaron las imágenes de rayos X finales y se calculó el peso de los tumores a partir de la diferencia en peso de la pata con el tumor y la pata sin tumor del mismo animal. La tibia con el tumor inyectado se fijó y descalcificó en EDTA y se tiñeron algunas secciones para detectar la presencia de osteoclastos multinucleados (más de tres núcleos) mediante el kit de detección de la actividad fosfatasa ácida en leucocitos de Sigma-Aldrich (San Luis, MO, EE. UU.). La incidencia del tumor en la tibia se determinó mediante el examen de secciones histológicas. El peso del tumor se determinó de la manera siguiente: peso de la pata inyectada - peso de la pata trasera no inyectada del mismo animal. Las áreas de lisis se estimaron a partir de imágenes de rayos X digitales; se usó el programa NIH Scion para medir el área de las tibias y de las áreas líticas y calcular la relación entre los píxeles en las zonas líticas y los píxeles en el área de las tibias.

## **RESULTADOS**

15

**[0086]** Para identificar potenciales inhibidores de cinasa, se probaron los compuestos 1, 2, 3, 4 y 5 en cuanto a su capacidad para inhibir la diferenciación de osteoclastos inducida por RANKL de células RAW264.7. Se eligió SKI606 porque se había observado que un compuesto relacionado era un inhibidor doble de las cinasas Src y Abl (Boschelli y col., 2001b). SKI606 se identificó y caracterizó y se encontró que este compuesto inhibe Src en un ensayo enzimático con una  $CI_{50}$  de 1,2 nM e inhibe la fosforilación de la tirosina de proteínas dependiente de Src a concentraciones comparables.

**[0087]** El compuesto no es citotóxico para las células BMM y menos del 10 % de las células murieron a una concentración de SKS606 de 600 nM, lo que indica que el efecto inhibidor sobre la osteoclastogénesis no es debido a una actividad citotóxica de SKI606 sobre las células precursoras. Este 4-fenilamino-3-quinolinacarbonitrilo, de estructura conocida (figura 1A), tiene un efecto inhibidor sobre la diferenciación de osteoclastos mediada por RANKL en células BMM en función de la dosis (figura 1B). Las células BMM parecen ser menos sensibles a SKI606 si este se añade después de la iniciación de la osteoclastogénesis (figuras 2A y 2B). Además, se estudió la capacidad de SKI606 para inhibir la reabsorción ósea mediante la estimulación de las células BMM con RANKL en placas OsteoAssay™ de Cambrex (Rockland, ME, EE. UU.) con o sin SKI606. Los cultivos de BMM tratados con M-CSF y RANKL en presencia de SKI606 300 nM mostraron una disminución de la liberación de colágeno I, un indicador de la reabsorción ósea, de 3,7 veces en comparación con el tratamiento con M-CSF y RANKL.

**[0088]** Se examinó la capacidad de la línea celular de cáncer de mama MD-MB-435 para inducir osteoclastogénesis en células RAW264.7. Se encontró que esta dependía de la densidad con un número óptimo de células MDA-MB-435 por pocillo de 800 (figura 3A). El número óptimo de células RAW264.7 se estableció para este estudio en 500 células/pocillo para el cocultivo con células MDA-MB-435 (datos no mostrados). El medio acondicionado por las células MDA-MB-435 fue también capaz de inducir osteoclastogénesis en cultivos de células RAW264.7 con una mezcla óptima del 10 % de medio acondicionado por las células MDA-MB-435 en DMEM/F12 (figura 3B). Esto indica que la capacidad de las células MDA-MB-435 para inducir osteoclastogénesis en las células RAW264.7 es debida a un factor liberado, más que a un contacto entre las células. Las células MDA-MB-435 pueden liberar también un factor inhibidor tal como OPG ya que el número de osteoclastos formados disminuye con mayores concentraciones del medio acondicionado.

**[0089]** Otros estudios adicionales incluyeron la investigación de la capacidad de SKI606 para inhibir la formación de osteoclastos inducidos por el cáncer de mama. SKI606 inhibió significativamente la osteoclastogénesis inducida por MDA-MB-435 en las células RAW264.7 a una concentración de SKI606 de 400 nM (figura 4A). SKI606 también fue capaz de inhibir la osteoclastogénesis inducida por medio acondicionado por células MDA-MB-435 en función de la dosis (figura 4B).

50

**[0090]** SKI606 se evaluó en un modelo *in vivo*, con hembras de ratones atímicos sin pelo NCr (de ocho semanas de edad) a las que se inyectaron  $5 \times 10^5$  células MDA-MB-435 en 0,01 ml de PBS en la tibia proximal de cada ratón mediante una aguja Hamilton del calibre 28. Los ratones se dividieron en tres grupos de tratamiento y la incidencia del tumor en la tibia se determinó mediante examen de secciones histológicas y del peso del tumor. El peso de los tumores en la tibia de ratones tratados con SKI606 o Zomeda fue significativamente inferior al de los tumores de los grupos de control (figura 5A y tabla 1). Se observaron significativamente menos áreas de lisis en los ratones tratados con SKI606 o Zomeda (Figura 5B y tabla 1). Además se contaron significativamente menos células positivas para TRAP en las secciones de los tumores de los ratones tratados con SKI606 (figura 5C). En las figuras 6A-6C se muestran composiciones de las imágenes digitales.

55

Tabla 1. Evaluación de SKI606 en un modelo de tumor óseo de MDA-MB-435 en ratones

Grupo experimental	Incidencia del tumor en la tibia	Peso del tumor	Estimación de las zonas líticas
Control (vehículo)	12/12 (100 %)	0,242 ± 0,07	0,294 ± 0,06
SKI606	9/12 (75 %)	0,088 ± 0,02	0,164 ± 0,09
Zomeda	11/12 (92 %)	0,073 ± 0,02	0,099 ± 0,05

## 5 REFERENCIAS

### [0091]

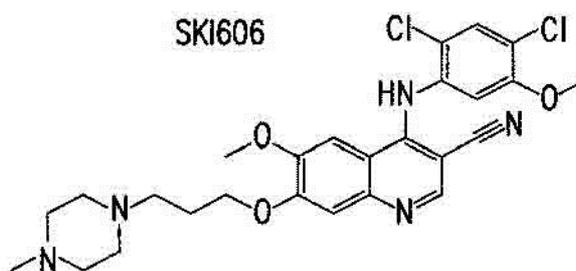
- Patente de los EE. UU. 4.870.287
- 10 Patente de los EE. UU. 5.466.468  
Patente de los EE. UU. 5.760.395  
Patente de los EE. UU. 6.780.996  
Patente de los EE. UU. 6.002.008  
Solicitud de patente de los EE. UU. 20050101780A1
- 15 Ammann y col., J. Clin. Invest., 99(7): 1699-1703, 1997.  
Baron y col., J. Cell Biol., 101(6): 2210-2222, 1985.  
Blair y col., J Cell Biol., 102(4): 1164-1172, 1986.  
Blair y col., J. Cell Biochem., 48(4): 401-410, 1992.
- 20 Blair y col., J. Cell Biol., 102(4): 1164-1172, 1986.  
Boschelli y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., 13: 3797, 2003.  
Boschelli y col., J. Med. Chem., 44: 822,2001b.  
Boschelli y col., J. Med. Chem., 47: 1599, 2004.  
Bucay y col., Genes Dev., 12(9): 1260-1268, 1998.
- 25 Dougall y col., Genes Dev., 13(18): 2412-2424, 1999.  
Franzoso y col., Genes Dev., 11(24): 3482-3496, 1997.  
Fujikawa y col., Ann. Rheum. Dis., 55(11): 816-822, 1996.  
Iatsova y col., Nat. Med., 3(11):1285-1289, 1997.  
Johnson y col., Cell, 71(4): 577-86,1992.
- 30 Kong y col., Nature, 397(6717): 315-323, 1999.  
Lewis y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90(24): 11618-11622,1993.  
Li y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97(4): 1566-1571, 2000.  
Lomaga y col., Genes Dev., 13(8): 1015-1024, 1999.  
Mitchell y col., Ann. NY Acad. Sci., 690: 153-166, 1993.
- 35 Mitchell y col., J. Clin. Oncol., 8(5): 856-869, 1990.  
Mizuno y col., Gene, 215(2): 339-343, 1998.  
Morton y col., Arch. Surg., 127: 392-399, 1992.  
Mundy y col., Cancer, 80(suplemento 8): 1546-1556, 1997.  
Mundy, Ann. NY Acad. Sci., 593: 91-97, 1990.
- 40 Poli y col., EMBO J., 13(5): 1189-1196, 1994.  
Ravindranath y Morton, Intern. Rev. Immunol., 7: 303-329, 1991.  
Remington's Pharmaceutical Sciences, 15<sup>a</sup> ed., páginas 1035-1038 y 1570-1580, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1980.  
Rickard y col., J. Bone Miner. Res., 11(3): 312-324, 1996.
- 45 Rosenberg y col., Ann. Surg. 210(4): 474-548, 1989.  
Boschelli y col., J. Med. Chem., 44: 3965, 2001a.  
Rosenberg y col., N. Engl. J. Med., 319: 1676,1988.  
Scheven y col., Nature, 321(6065): 79-78, 1986.  
Soriano y col., Cell, 64(4): 693-702, 1991.
- 50 Takahashi y col., Lab. Invest. 74(4): 827-34, 1996  
Takahashi y col., J. Bone Miner. Res., 2(4): 311-317, 1987.  
Vaes, J. Cell Biol., 39(3): 676-697, 1968.  
Ye y col., 221<sup>a</sup> Reunión Nacional de la American Chemical Society, San Diego, California, abril de 2001.

## REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto, en que el compuesto es 4-[(2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino]-6-metoxi-7-[3-(4-metil-1-piperazinil)propoxil]-3-quinolinacarbonitrilo o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la

5 preparación de un producto farmacéutico para el tratamiento o prevención de lesiones osteolíticas, enfermedades con reabsorción ósea o reabsorción ósea relacionada con una afección patológica.

2. Uso de la reivindicación 1, en que el compuesto es de la fórmula siguiente:



10

3. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en que el compuesto es un inhibidor de la cinasa Src.

4. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en que la reabsorción ósea está asociada a

15 osteoporosis, tumor óseo de células gigantes, mieloma múltiple, osteolisis expansiva familiar, osteopenia, periodontitis, hiperparatiroidismo, erosiones periarticulares en la artritis reumatoide, enfermedad de Paget, osteopenia inducida por inmovilización, hipercalcemia del cáncer, metástasis ósea, adamantinoma, quiste (lesión) óseo aneurismático, angiosarcoma de gran malignidad, angiosarcoma de escasa malignidad, lesiones óseas de la enfermedad de Gaucher, tumor pardo del hiperparatiroidismo, condroblastoma, fibroma condromixioide,

20 condrosarcoma, cordoma, condrosarcoma de células claras, osteosarcoma intramedular convencional, enfermedad articular degenerativa, fibroma desmoplástico, estenosis medular diafisaria con histiocitoma fibroso maligno, encondroma, granuloma eosinófilo, hemangioendotelio epitelioide, sarcoma de Ewing en el hueso, osteosarcoma extraóseo, fibrosarcoma, displasia fibrosa, periostitis reactiva florida, tumor glómico, sarcoma granulocítico en el hueso, síndrome de Hardcastle, hemangioma, hemangiopericitoma, osteosarcoma superficial de gran malignidad,

25 linfoma de Hodgkin en el hueso, osteosarcoma intracortical, osteosarcoma intraóseo bien diferenciado, condroma yuxtacortical, leucemia, histiocitoma fibroso maligno, melorreostosis, cáncer de mama metastásico, cáncer de riñón metastásico, cáncer de pulmón metastásico, cáncer de próstata metastásico, osteosarcoma multifocal, miositis osificante, neurofibroma óseo, linfoma no de Hodgkin, fibroma no osificante (defecto cortical fibroso), lesión de Nora, osteoblastoma, osteocondroma, osteocondromatosis, displasia osteofibrosa, osteoma osteoide, osteoma,

30 osteomielitis, osteopatía estriada, osteopoiquiosis, osteosarcoma parostal, condroma periostal, osteosarcoma periostal, sinovitis vellonodular pigmentada, sarcoma post-Paget, schwannoma óseo, osteosarcoma de células pequeñas, quiste óseo solitario, tumor fibroso solitario, mieloma solitario (plasmacitoma), quiste subcondral, condromatosis sinovial, osteosarcoma telangiectásico, lesiones de "tirón" - defecto fibroso metafisiario o quiste óseo unicameral.

35

5. Uso de acuerdo con la reivindicación 4, en que la metástasis ósea es una metástasis de cáncer de pulmón, cabeza y cuello, mama, pancreático, de próstata, renal, óseo, testicular, cervical, gastrointestinal, de colon, o vejiga.

40 6. Uso de acuerdo con la reivindicación 5, en que el producto farmacéutico se formula para administración en combinación con un tratamiento antineoplásico tal como quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia o cirugía.

7. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en que el producto farmacéutico se formula para

45 administración por vía oral.

8. Un compuesto de la reivindicación 1 o de la fórmula según se define en la reivindicación 2 para uso en el tratamiento o prevención de lesiones osteolíticas, enfermedades con reabsorción ósea o reabsorción ósea relacionada con una afección patológica.

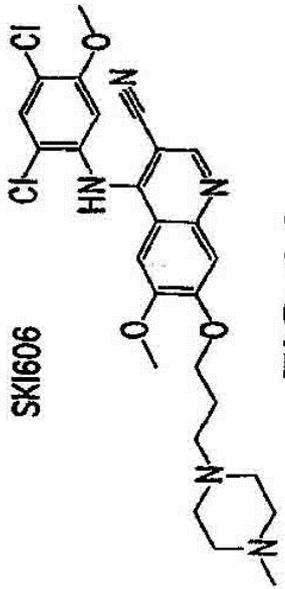


FIG.1A

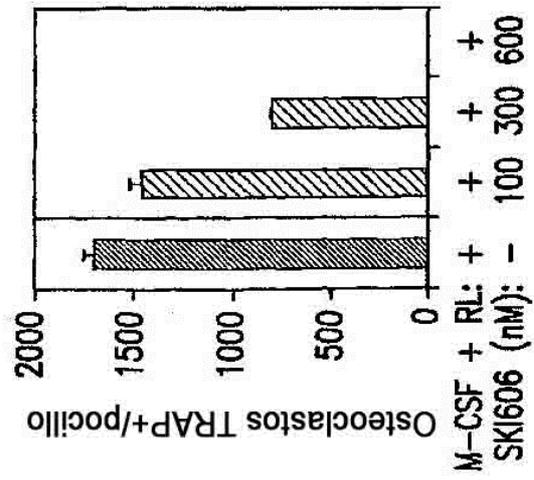


FIG.1B

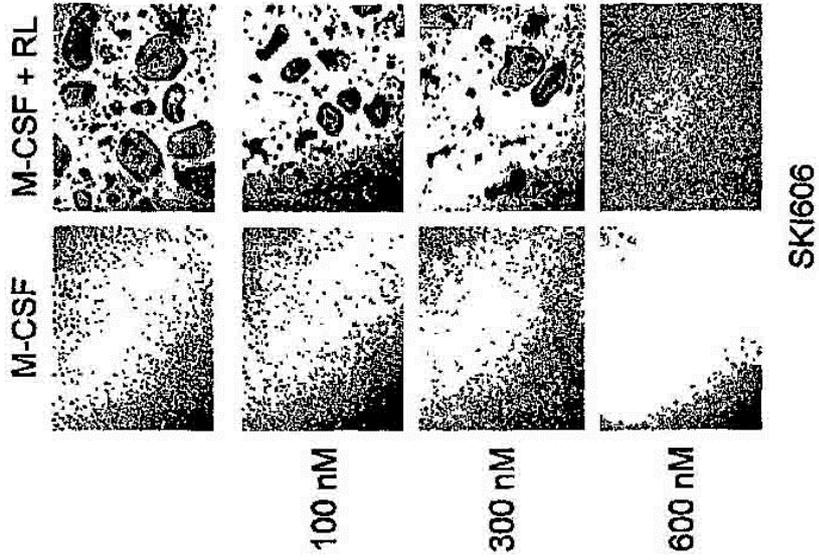


FIG.1C

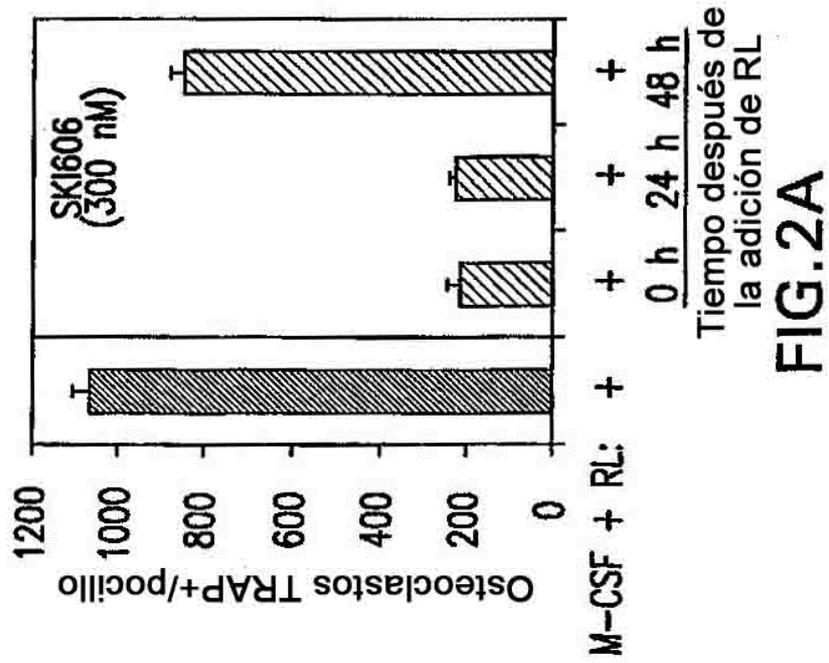


FIG. 2A

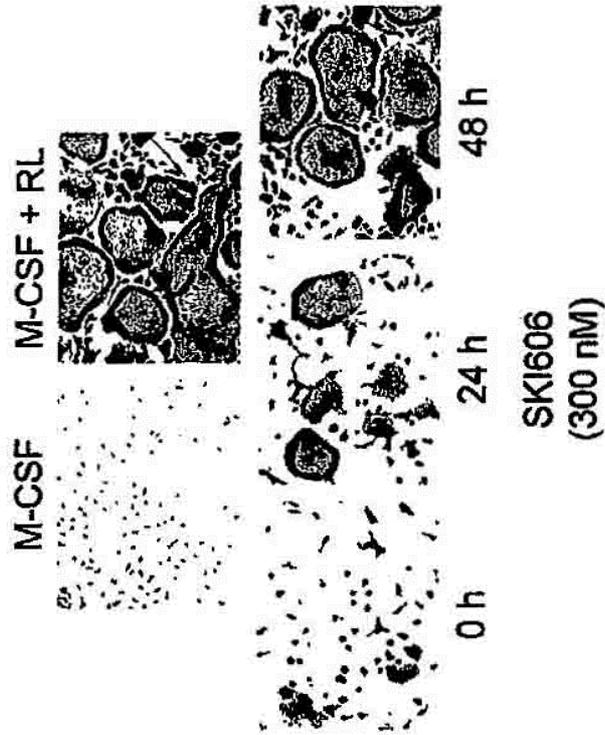
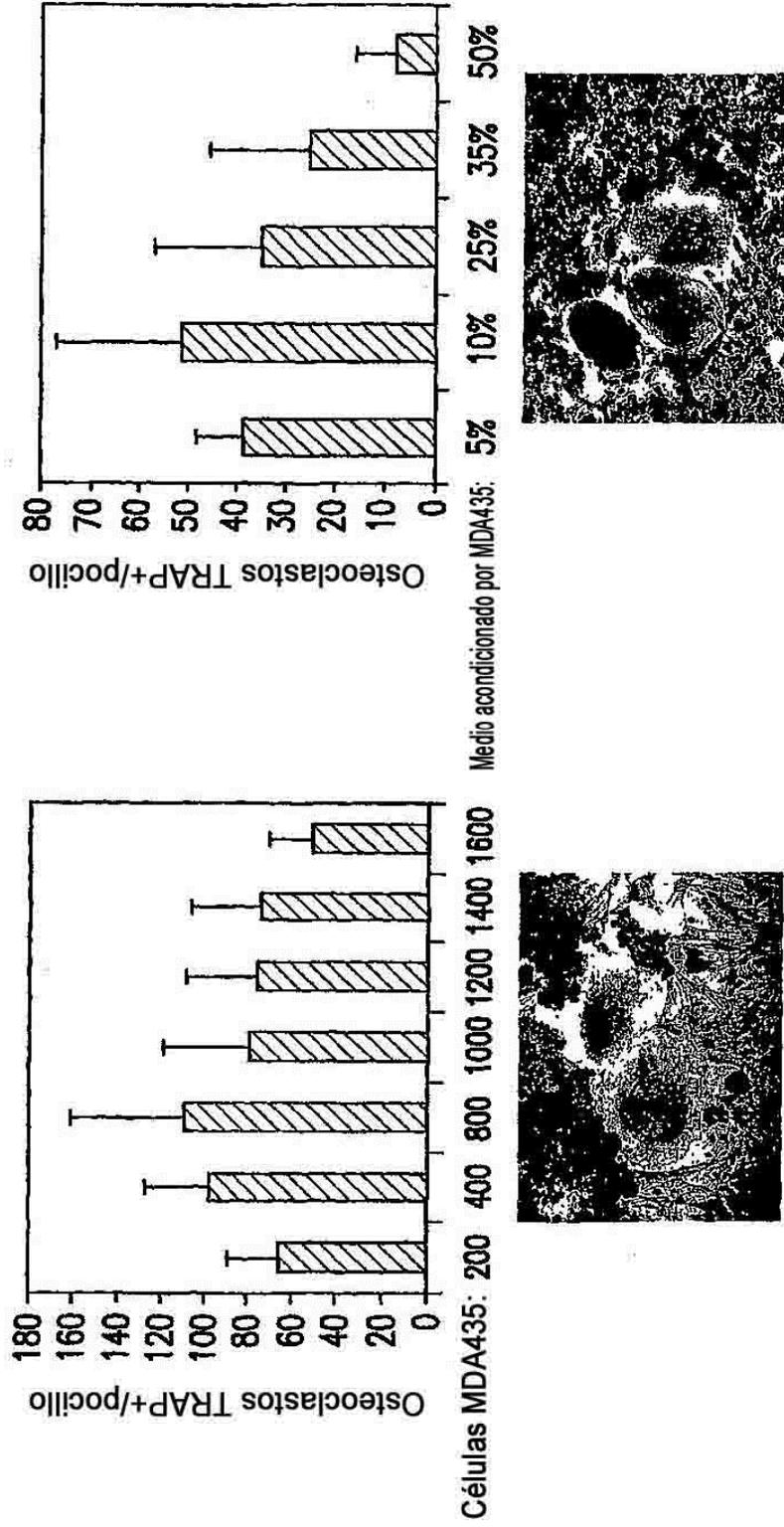
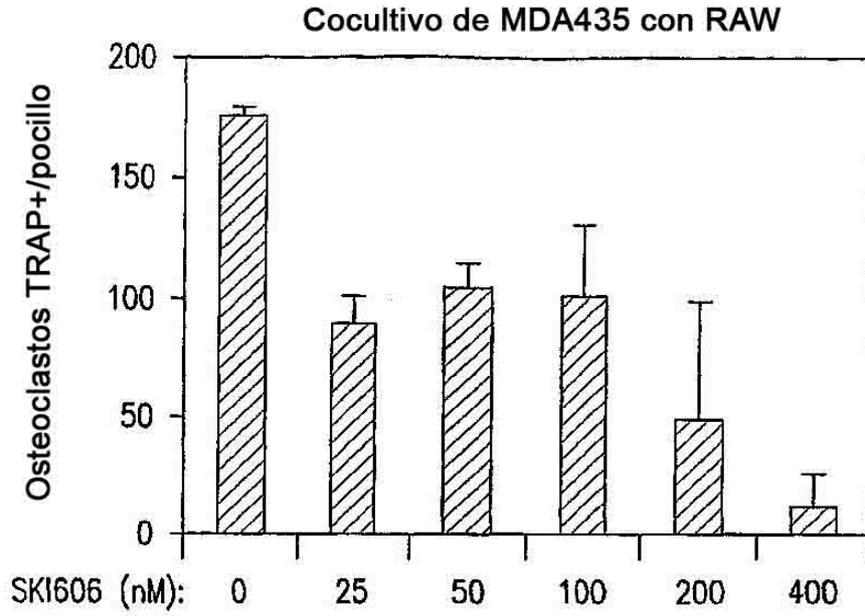
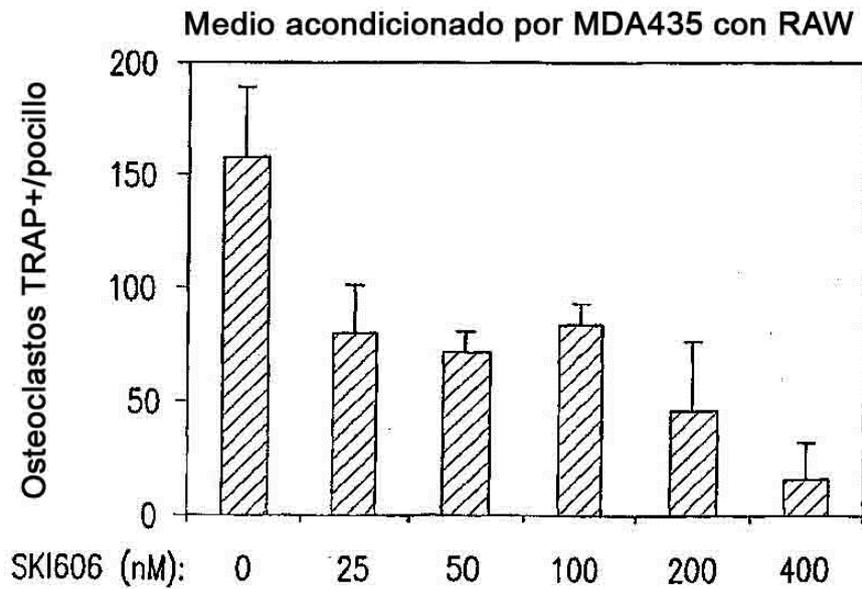


FIG. 2B

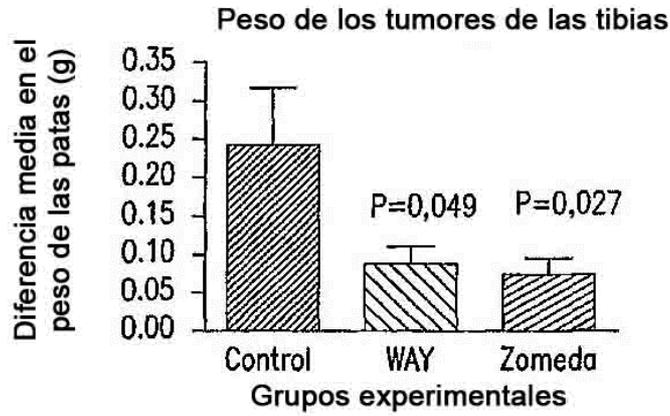




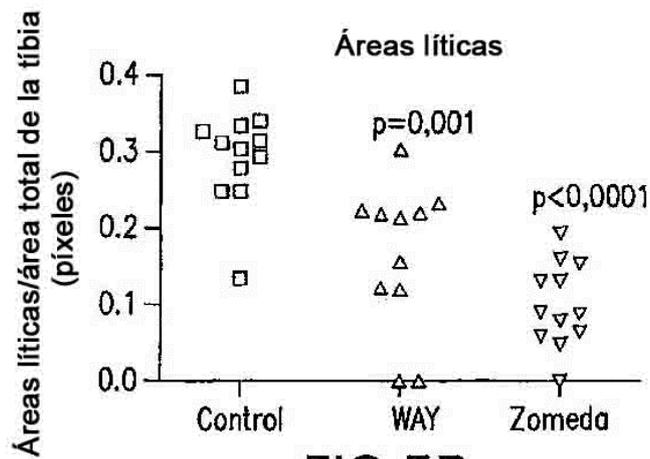
**FIG.4A**



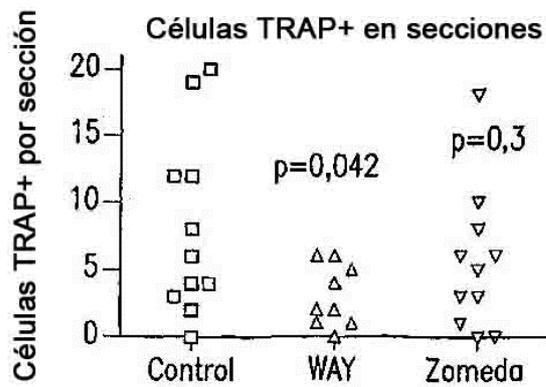
**FIG.4B**



**FIG.5A**



**FIG.5B**



**FIG.5C**

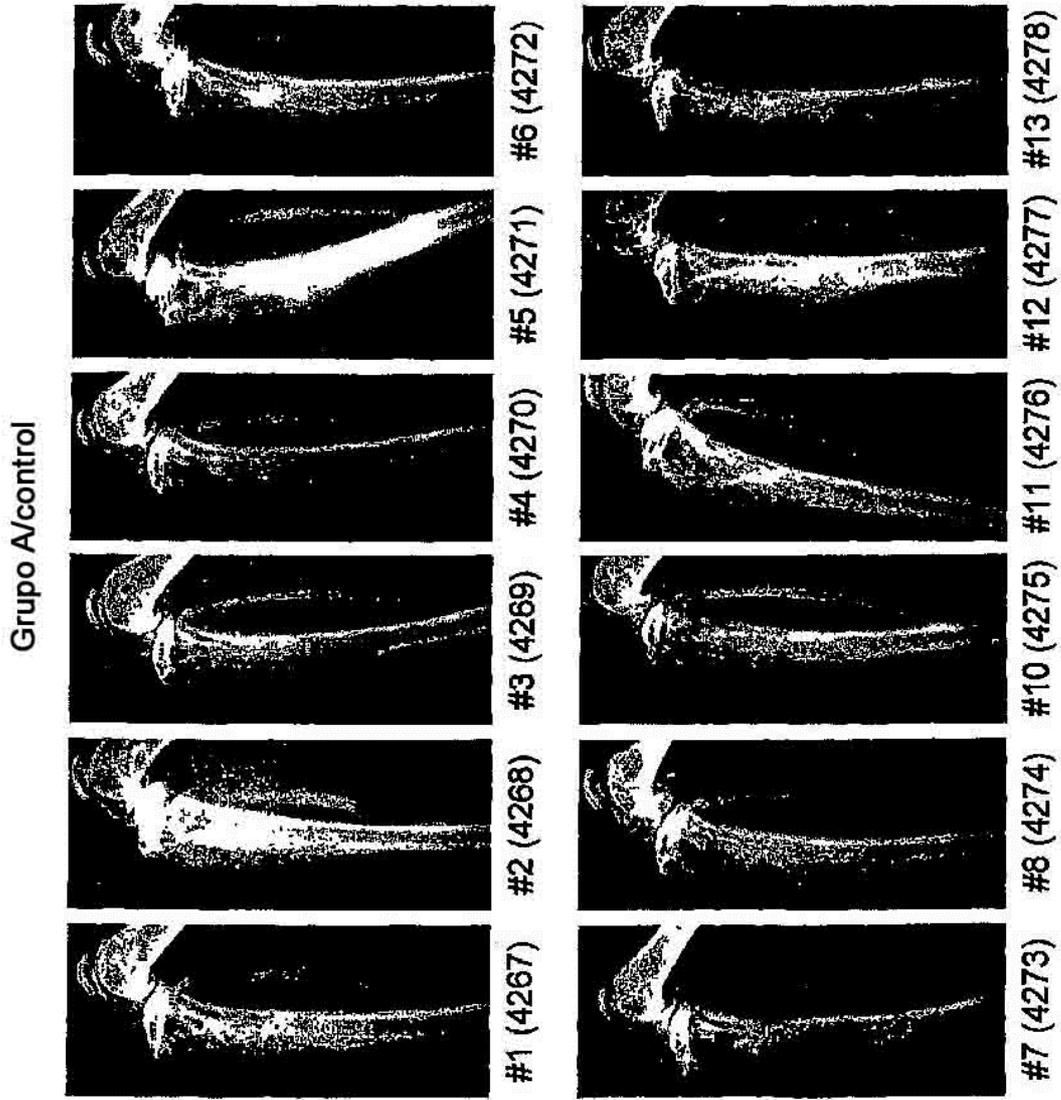


FIG.6A

Grupo B, experimento 2 (WAY 150 mg/kg)

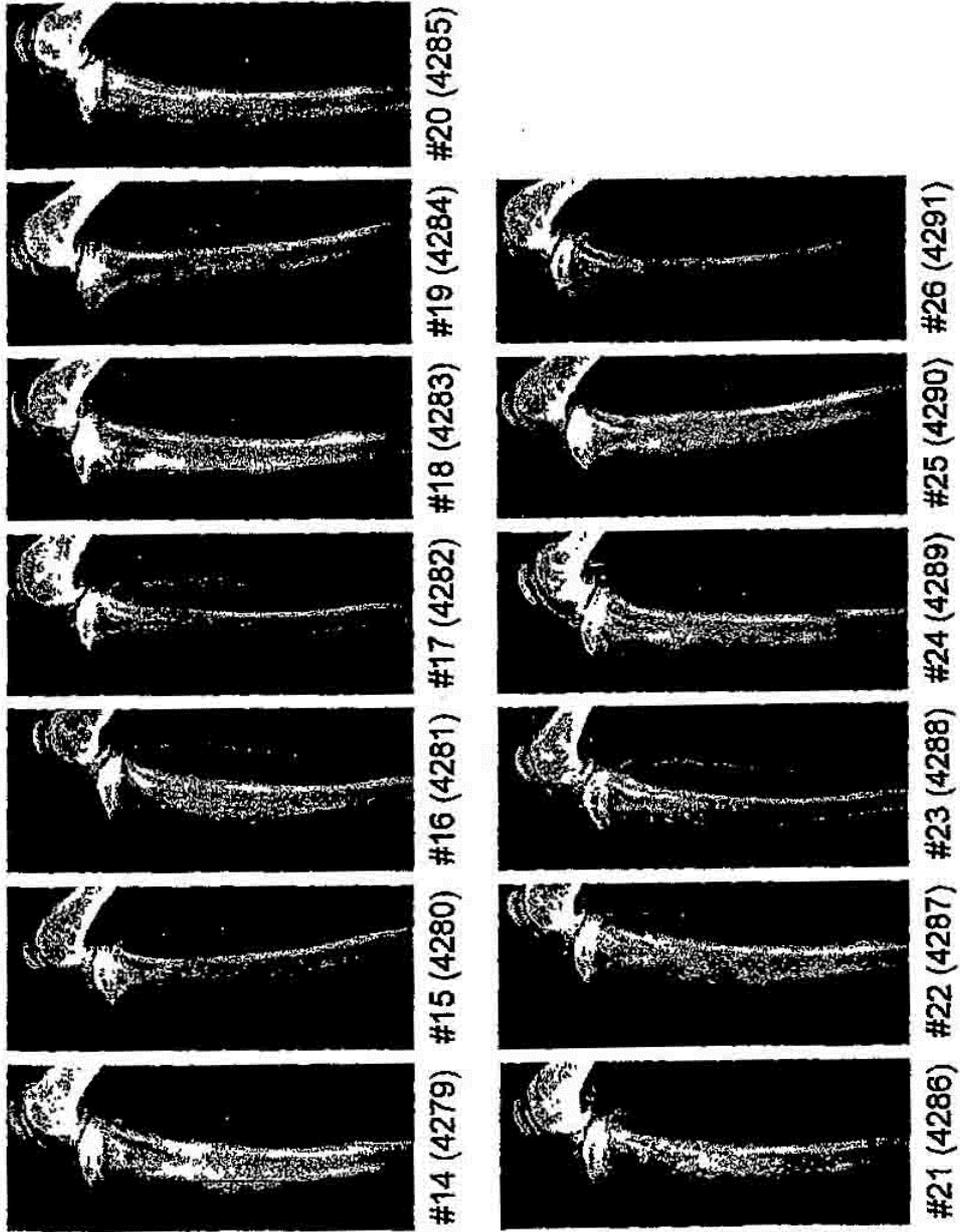


FIG. 6B

Grupo C, experimento 2 (Zomeda)

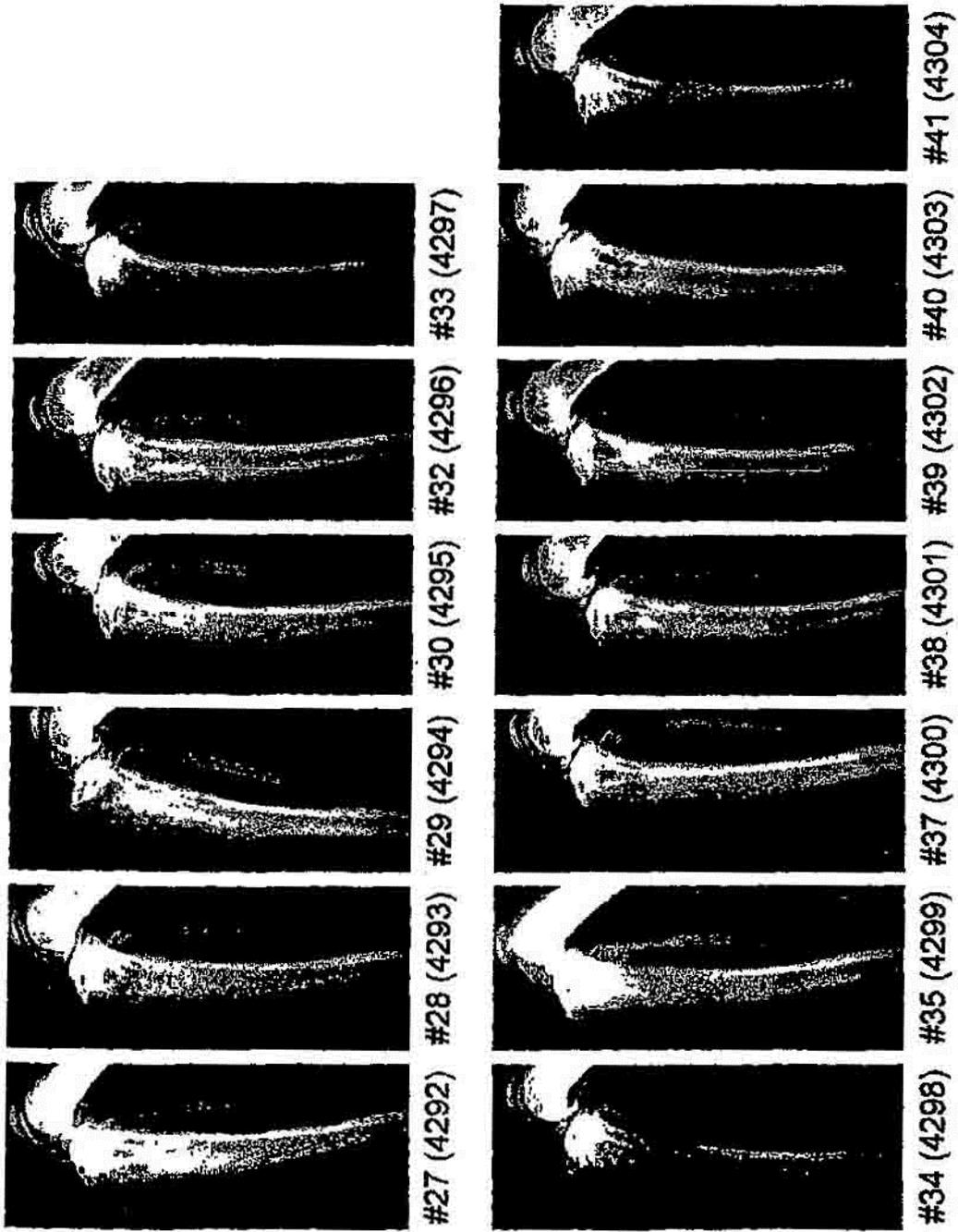


FIG.6C