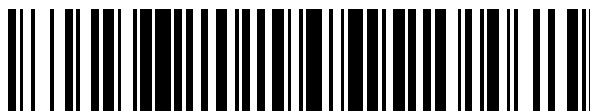


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 522 830**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 31/4709 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2005 E 11158145 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.08.2014 EP 2362218**

54 Título: **Métodos de control de la eficacia de los inhibidores de la farnesiltransferasa**

30 Prioridad:

05.11.2004 US 625204 P

12.08.2005 US 708075 P

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

18.11.2014

73 Titular/es:

JANSSEN PHARMACEUTICA N.V. (100.0%)

Turnhoutseweg 30

2340 Beerse, BE

72 Inventor/es:

FOURIE, ANNE

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 522 830 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).

Métodos de control de la eficacia de los inhibidores de la farnesiltransferasa

Descripción

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente descripción se refiere al uso de inhibidores de la farnesil transferasa para el tratamiento de sepsis o shock séptico. La invención se refiere a métodos para determinar o controlar la respuesta del paciente al tratamiento con un inhibidor de la farnesil transferasa.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Las estatinas inhiben la actividad de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, la enzima limitante de la velocidad en la biosíntesis del colesterol (Brown 1990), y son ampliamente prescritas para reducir el colesterol en pacientes hiperlipidémicos. Las observaciones recientes de los ensayos clínicos sugieren que las estatinas proporcionan un beneficio cardiovascular más allá de sus efectos hipolipemiantes. El reconocimiento de que la aterosclerosis implica un componente inflamatorio sugiere que algunos de los efectos beneficiosos de las estatinas podría estar relacionado con su modulación de la inmunidad y la inflamación (Schonbeck U 2004).

[0003] La inflamación es normalmente una respuesta aguda del sistema inmune a los patógenos microbianos, productos químicos o lesión física o, y se caracteriza por enrojecimiento, calor, hinchazón y dolor. Estos síntomas son el resultado de una cascada de eventos que incluyen la producción de citoquinas y quimioquinas, migración y acumulación celular, coagulación, fibrinólisis, dilatación de los vasos sanguíneos y aumento de la permeabilidad, así como la extravasación de plasma y proteínas. Si la respuesta inflamatoria no se regula de manera apropiada, puede progresar a un estado crónico, y ser la causa de las enfermedades inflamatorias, una causa importante de morbilidad y mortalidad. Una relación funcional entre la inflamación y el cáncer se ha reconocido durante mucho tiempo, pero las vías moleculares que subyacen a este enlace eran desconocidas. Estudios recientes han demostrado que la inflamación inducida por el crecimiento del tumor está mediada por la activación del factor de transcripción, NF-KB, y la producción del mediador inflamatorio, TNF-a (Luo, Maeda et al 2004;.. Pikarsky, Porat et al 2004).

[0004] El tratamiento de animales con lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas se utiliza para inducir experimentalmente una respuesta inflamatoria sistémica, incluyendo los síntomas clásicos inflamatorios de enrojecimiento, calor, hinchazón y dolor. La administración de LPS a animales sirve como un modelo para la sepsis inducida por LPS y el crecimiento del tumor por inflamación inducida, así como un modelo más general para las respuestas inflamatorias inducidas por otros agentes en enfermedades inflamatorias. El tratamiento con LPS de células o en animales se ha usado ampliamente como un modelo experimental para evaluar el papel de mediadores tales como las citocinas y quimiocinas en la inflamación, y para estudiar los agentes que pueden modular la producción de tales mediadores.

[0005] Los posibles efectos terapéuticos de las estatinas en enfermedades inflamatorias han sido apoyados por varios estudios con animales que utilizan el tratamiento con LPS, así como otros modelos animales de enfermedades inflamatorias. Se ha demostrado que la cerivastatina reduce los niveles séricos de TNF-a, IL-ip, óxido nítrico, y mejora la supervivencia de ratones en un modelo de sepsis inducida por LPS (Ando, Takamura et al. 2000).

[0006] Se ha demostrado que la Atorvastatina y la lovastatina previenen o reveierten la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) (Stanislaus, Pahan et al 1999;. Youssef, Stueve et al 2002.). La simvastatina ha demostrado una actividad anti-inflamatoria en la artritis inducida por colágeno (Leung, Sattar et al. 2003), y en un modelo de asma alérgica (A McKay 2004) También se descubrió que la pravastatina alivia la caquexia, hematoquecia y la permeabilidad del epitelio intestinal en colitis inducida por sulfato de dextrano (Sasaki M, et al. 2003. J Pharmacol Exp Ther 305 (1), 78-85).

[0007] MCP-1, IL-1b, IL-6, MMP-9, MyD88 y TNF-a se han implicado en la patología de la aterosclerosis (Gu, Okada et al 1998;. Aiello, Bourassa et al 1999;. Dawson, et Kuziel al 1999;. Ito, Ikeda et al 2002;. Haddy, Sass et al 2003;. Kirii, Niwa et al 2003;. Lutun, Lutgens et al 2004;. Michelsen, Wong et al 2004) y sepsis (Bossink, Paemen. et al 1995;. Weighardt, Kaiser-Moore et al 2002;. Das 2003; Lalu, Gao et al 2003;. Mancuso, Midiri et al 2004). Las estatinas se usan para el tratamiento de la aterosclerosis, donde se cree que su efecto beneficioso se debe tanto a los efectos reductores de lípidos dependientes e independientes. Rezaie-Majd et al. (2002. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 22, 1194-9) descubrió que la simvastatina reducía los niveles de proteína y ARN de las citocinas, IL-6, IL-8 y de la proteína-1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1), en pacientes hipercolesterolémicos después de 6 semanas de tratamiento. En los pacientes con enfermedad arterial coronaria (CAD), la expresión de genes de las quimiocinas, MIP-1a, MIP-1 p, IL-8, y de los receptores, CCR1 y CCR2, fueron significativamente reguladas de manera negativadespués del tratamiento con simvastatina o atorvastatina durante seis meses (Waehre T 2003). El potencial terapéutico de las estatinas para las enfermedades inflamatorias ha sido destacada por los recientes hallazgos en el ensayo de atorvastatina en la artritis reumatoide (TARA), que han demostrado que la puntuación de actividad de la enfermedad, la sedimentación globular y la proteína C-reactiva mejoraron significativamente en

comparación con la terapia existente después 6 meses de tratamiento con atorvastatina (McCarey DW 2004).

[0008] La sepsis y el shock séptico son síndromes inflamatorios complejos. Los datos recientes han demostrado que el tratamiento con estatinas está asociado con una disminución de la tasa de sepsis grave (Almog, Shefer et al. 2004) y mejora la supervivencia en un modelo murino de sepsis (Ando, Takamura et al. 2000).

[0009] Muchas observaciones de los efectos antiinflamatorios de las estatinas en modelos animales han obtenido resultados más altos que en dosis terapéuticas. Sin embargo, no hay evidencia de efectos anti-inflamatorios de las estatinas en los ensayos clínicos humanos a dosis terapéuticas (Rezaie-Majd, Maca et al 2002; Waehre T 2003; McCarey DW 2004). Mientras que los modelos animales y las observaciones clínicas en humanos demuestran que las estatinas tienen propiedades anti-inflamatorias, el mecanismo que subyace a estas propiedades actualmente es incierto. Estudios *in vitro* sobre células han demostrado que las estatinas afectan a muchos procesos diferentes y no se sabe qué procesos son necesarios para los efectos antiinflamatorios *in vivo*. Por ejemplo, se sabe que la activación de factores de transcripción tales como NF- κ B, AP 1-e y factor-1a inducible por hipoxia, que regulan la transcripción de muchos genes inflamatorios, se regula de manera negativa *in vitro* por parte de la simvastatina, atorvastatina y lovastatina (Ortego M 1999; Dichtl, Dulak et al 2003).

[0010] Las estatinas inhiben la síntesis de mevalonato, el paso limitante del índice en la producción de colesterol (Brown 1990) y también disminuyen la síntesis de los isoprenoides, pirofosfato de farnesilo (FPP) y geranilgeranil pirofosfato (GGPP) (ver Figura 1). GGPP y FPP son necesarios para la prenilación, activación y ubicación subcelular de numerosas proteínas intracelulares (Casey PJ 1995; Zhang FL 1996).

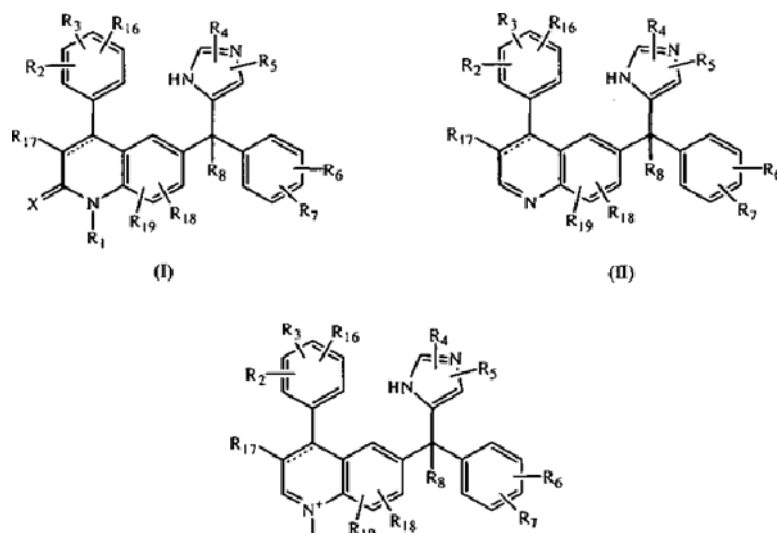
[0011] Los estudios han demostrado que los exógenos GGPP (o geraniol) y/o FPP (o farnesol) pueden revertir ciertas funciones anti-inflamatorias mediadas por estatinas incluyendo: (1) la adhesión de leucocitos (Liu L 1999), (2) la proliferación/apoptosis celular (Guijarro C 1998; Wen-Bin Zhong 2003), y (3) la actividad de NF- κ B (Ortego M 1999), así como la (4) LPS inducida por MMP-9 (Wong, Lumma et al 2001.). En contraste, la escualostatina, un inhibidor selectivo de la escualeno sintetasa y la síntesis de colesterol, no es capaz de imitar el efecto inhibitor de una estatina en la producción de quimioquinas y el reclutamiento de leucocitos inducido por LPS (Diomedea L 2001).

[0012] Se ha informado que las estatinas suprimen la secreción de MMP-9 por parte de células THP-1 inducida por LPS, pero que la inhibición de la farnesil transferasa (FTasa, también conocida como proteína farnesil transferasa o FPTasa) no tiene ningún efecto (Wong, B., et al. 2001. J Leukoc Biol 69, 959-62).

[0013] Los FTI fueron desarrollados originalmente para prevenir la farnesilación postraducciona y la activación de las oncoproteínas Ras (Prendergast y Rane 2001). Estudios recientes han demostrado la inhibición por parte de un FTI de la activación de NF- κ B (Takada, Y., et al. 2004. J Biol Chem 279, 26287-99) y la regulación a la baja de la expresión de genes inflamatorios a través de la supresión de la activación del NF- κ B dependiente de Ras (Na et al. 2004). De ese modo, los FTI comparten algunas, pero no todas, las propiedades de las estatinas.

[0014] Se conocen varios inhibidores FTasa. Por ejemplo, véase la patente de EE.UU. N ° 6.451.812, que describe ciertos FTI y su uso en el tratamiento de artropatías tales como artritis reumatoide, osteoartritis, artritis juvenil, y gota.

[0015] WO-97/21701 y la patente de EE.UU. N ° 6.037.350, describen la preparación, formulación y propiedades farmacéuticas de cierta inhibición de la farnesil-transferasa (imidazol-5-il) metil-2-quinolinona derivados de las fórmulas (I), (II) y los compuestos intermedios de fórmula (II) y (III) que son *metabolizados in vivo* a los compuestos de fórmula (I). Los compuestos de fórmulas (I), (II) y (III) están representados por



(III)

las sales de adición de base o de ácido farmacéuticamente aceptable y las formas estereoquímicamente isoméricas de las mismas, en las que la línea de puntos representa un enlace opcional;

X es oxígeno o azufre,

R¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₁₂, Ar¹, Ar² C₁₋₆alquilo, quinolinilC₁₋₆alquilo, piridilC₁₋₆ alquilo, hidroxilC₁₋₆ alquilo, C₁₋₆alquiloxilC₁₋₆, mono- o di (alquilC₁₋₆)aminoC₁₋₆alquilo, aminoC₁₋₆alquilo, o un radical de fórmula -Alk¹-C(=O)-R⁹, -Alk¹-S(O)-R⁹ or -Alk¹-S(O)₂-R⁹, donde Alk¹ es C₁₋₆alcanodiil,

R⁹ es hidroxil, alquiloxil C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, amino, alquilamino C₁₋₈ o alquilamino C₁₋₈ sustituido por alquiloxycarbonil C₁₋₆;

R², R³ y R¹⁶ cada uno independientemente son hidrogeno, hidroxil, halo, ciano, alquilo C₁₋₆, alquiloxil C₁₋₆, hidroxilC₁₋₆alquiloxil, C₁₋₆alquiloxilC₁₋₆alquiloxil, aminoC₁₋₆alquiloxil, mono- o di(alquilo C₁₋₆)aminoC₁₋₆alquiloxil, Ar¹, Ar²C₁₋₆alquilo, Ar²oxil, Ar²C₁₋₆alquiloxil, hidroxycarbonil, alquiloxycarbonil C₁₋₆, trihalometil, trihalometoxil, alquenilo C₂₋₆, 4,4-dimetiloxazolil; o cuando están en posiciones adyacentes, R² y R³ juntos pueden formar un radical bivalente de fórmula

-O-CH₂-O- (a-1),

-O-CH₂-CH₂-O- (a-2),

-O-CH=CH- (a-3),

-O-CH₂-CH₂- (a-4),

-O-CH₂-CH₂-CH₂-(a-5),

o

-CH=CH-CH=CH- (a-6);

en el que

R¹⁰ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alquilcarbonil C₁₋₆, Ar¹, Ar²C₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquiloxycarbonilC₁₋₆alquilo, o un radical de fórmula -Alk²-OR¹³ o -Alk²-NR¹⁴R¹⁵;

R¹¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₁₂, Ar¹ o Ar²C₁₋₆alquilo;

R¹² es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alquilcarbonil C₁₋₁₆, alquiloxycarbonil C₁₋₆, alquilaminocarbonil C₁₋₆, Ar¹, Ar²C₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquilcarbonilC₁₋₆alquilo, un aminoácido natural, Ar¹carbonil, Ar²C₁₋₆alquilcarbonil, aminocarbonilcarbonil, C₁₋₆alquiloxilC₁₋₆alquilcarbonil, hidroxil, alquiloxil C₁₋₆, aminocarbonil, di(C₁₋₆alquil)aminoC₁₋₆alquilcarbonil, amino, C₁₋₆alquilamino, C₁₋₆alquilcarbonilamino, o un radical de fórmula -Alk²-OR¹³ o -Alk²-NR¹⁴R¹⁵;

en el que

Alk² es alcanodiil C₁₋₆;

R¹³ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alquilcarbonil C₁₋₆, hidroxilC₁₋₆alquilo, Ar¹ o Ar²C₁₋₆alquilo;

R¹⁴ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, Ar¹ o Ar²C₁₋₆alquilo;

R¹⁵ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alquilcarbonil C₁₋₆, Ar¹ o Ar²C₁₋₆alquilo;

R¹⁷ es hidrógeno, halo, ciano, alquilo C₁₋₆, alquilcarbonil C₁₋₆, Ar¹;

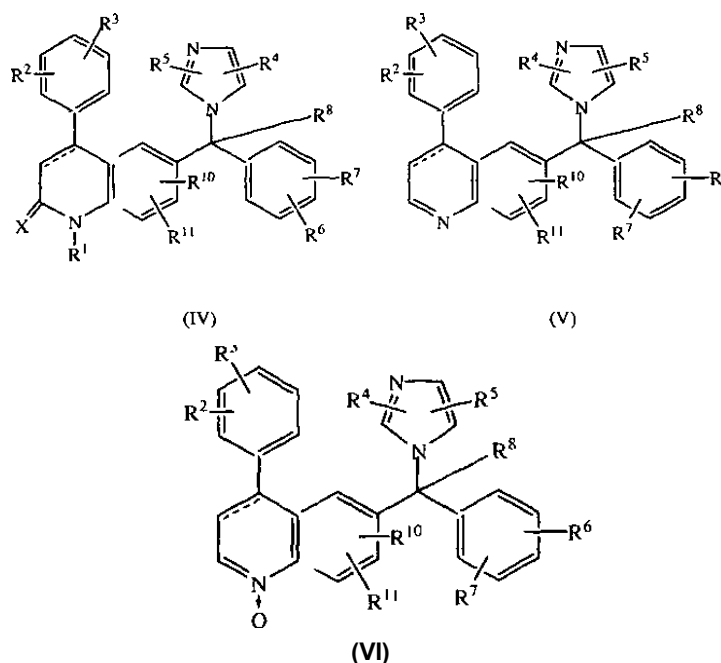
R¹⁸ es hidrógeno, C₁₋₆alquil, C₁₋₆alquiloxil or halo;

R¹⁹ es hidrógeno o alquilo C₁₋₆;

Ar¹ es fenil o fenil sustituido por alquilo C₁₋₆, hidroxil, amino, alquiloxil C₁₋₆ o halo; y

Ar² es fenil o fenil sustituido por alquilo C₁₋₆, hidroxil, amino, alquiloxil C₁₋₆ o halo.

[0016] WO-97/16443 y la patente de EE.UU. N ° 5.968.952 describen la preparación, formulación y propiedades farmacéuticas de los compuestos inhibidores de farnesiltransferasa de fórmula (IV), así como compuestos intermedios de fórmula (V) y (VI) que se metabolizan *in vivo* a los compuestos de fórmula (IV). Los compuestos de fórmulas (IV), (V) y (VI) se representan mediante



las sales de adición de base o de ácido farmacéuticamente aceptables y las formas estereoquímicamente isoméricas de los mismos, en las que la línea de puntos representa un enlace opcional;

X es oxígeno o azufre,

R¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₁₂, Ar¹, Ar² C₁₋₆alquilo, quinolinilC₁₋₆alquilo, piridilC₁₋₆alquilo, hidroxiC₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquiloxiC₁₋₆, mono- o di (alquilC₁₋₆)aminoC₁₋₆alquilo, aminoC₁₋₆alquilo, o un radical de fórmula -Alk¹-C(=O)-R⁹, -Alk¹-S(O)-R⁹ or -Alk¹-S(O)₂-R⁹, donde Alk¹ es C₁₋₆alcanodil,

R⁹ es hidroxi, alquiloC₁₋₆, alquiloxi C₁₋₆, amino, alquilamino C₁₋₈ o alquilamino C₁₋₈ sustituido por alquiloxycarbonil C₁₋₂;

R² y R³ cada uno independientemente son hidrógeno, hidroxi, halo, ciano, alquilo C₁₋₆, alquiloxi C₁₋₆, hidroxiC₁₋₆alquiloxi, C₁₋₆alquiloxiC₁₋₆alquiloxi, aminoC₁₋₆alquiloxi, mono- o di(alquilo C₁₋₆)aminoC₁₋₆alquiloxi, Ar¹, Ar²C₁₋₆alquilo, Ar²oxi, Ar²C₁₋₆alquiloxi, hidroxycarbonil, alquiloxycarbonil C₁₋₆, trihalometil, trihalometoxi, alquenilo C₂₋₆, 4,4-dimetiloxazolil; o cuando están en posiciones adyacentes, R² y R³ juntos pueden formar un radical bivalente de fórmula

-O-CH₂-O- (a-1),

-O-CH₂-CH₂-O- (a-2),

-O-CH=CH- (a-3),

-O-CH₂-CH₂- (a-4),

-O-CH₂-CH₂-CH₂- (a-5),

o

-CH=CH-CH=CH- (a-6);

R⁴ y R⁵ cada uno independientemente son hidrógeno, Ar¹, alquilo C₁₋₆, C₁₋₆alquiloxiC₁₋₆alquilo, alquiloxi C₁₋₆, alquiltio C₁₋₆, amino, hidroxycarbonil, alquiloxycarbonil C₁₋₆, C₁₋₆alquilS(O)C₁₋₆alquilo o C₁₋₆alquilS(O)₂C₁₋₆alquilo;

R⁶ y R⁷ cada uno independientemente son hidrógeno, halo, ciano, alquilo C₁₋₆, alquiloxi C₁₋₆ o Ar²oxi;

R⁸ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, ciano, hidroxycarbonil, C₁₋₆alquiloxycarbonil, C₁₋₆alquilcarbonilC₁₋₆alquilo, cianoC₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquiloxycarbonilC₁₋₆alquilo, hidroxycarbonilC₁₋₆alquilo, hidroxiC₁₋₆alquilo, aminoC₁₋₆alquilo, mono- o di(C₁₋₆alquilo) aminoC₁₋₆alquilo, haloC₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquiloxiC₁₋₆alquilo, aminocarbonilC₁₋₆alquilo, Ar¹, Ar²C₁₋₆alquiloxiC₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquiltioC₁₋₆alquilo;

R¹⁰ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alquiloxi C₁₋₆ o halo;

R¹¹ es hidrógeno o alquilo C₁₋₆;

Ar¹ es fenil o fenil sustituido por alquilo C₁₋₆, hidroxi, amino, alquiloxi C₁₋₆ o halo; y

Ar² es fenil o fenil sustituido por alquilo C₁₋₆, hidroxi, amino, alquiloxi C₁₋₆ o halo.

WO-98/40383 y la patente de EE.UU. N ° 6.187.786 describen la preparación, formulación y propiedades farmacéuticas compuestos inhibidores de farnesiltransferasa de fórmula (VII)

R¹³ es hidrógeno, halo, Ar⁴, alquilo C₁₋₆, hidroxialquilo, C₁₋₆alquiloalquilo, alquiloalquilo, alquilo C₁₋₆, C₁₋₆alquilo, amino, C₁₋₆alquiloalquilo, C₁₋₆alquiloS(O)C₁₋₆alquilo o C₁₋₆alquiloS(O)₂C₁₋₆alquilo;
R¹⁴ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆ o di(C₁₋₄alquilo)aminosulfonil;

R⁶ es hidrógeno, hidroxi, halo, alquilo C₁₋₆, ciano, haloC₁₋₆alquilo, hidroxiC₁₋₆alquilo, cianoC₁₋₆alquilo, aminoC₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquiloC₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquilthioC₁₋₆alquilo, aminocarbonilC₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquiloC₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquilcarbonilo- C₁₋₆alquil, C₁₋₆alquiloC₁₋₆alquilo, mono- o di(C₁₋₆alquil)aminoC₁₋₆alquilo, Ar⁵, Ar⁵-C₁₋₆alquiloC₁₋₆alquilo; o un radical de fórmula

$$-\text{O}-\text{R}^7 \quad (\text{e-1}),$$
$$-S-R^7 \quad (e-2),$$
$$-N-R^8R^9 \text{ (e-3),}$$

en el que

R⁷ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alquilcarbonil C₁₋₆, Ar⁶, Ar⁶-C₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquiloxicarbonilC₁₋₆alquilo, o un radical de fórmula -Alk-OR¹⁰ o -Alk-NR¹¹R¹².

R⁸ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, Ar⁷ o Ar⁷-C₁₋₆alquilo;

R⁹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alquilcarbonil C₁₋₆, alquiloxicarbonil C₁₋₆, C₁₋₆alquilaminocarbonil, Ar⁸, Ar⁸-C₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquilcarbonil-C₁₋₆alquilo, Ar⁸-carbonil, Ar⁸-C₁₋₆alquilcarbonil, aminocarbonilcarbonil, C₁₋₆alquiloxiC₁₋₆alquilcarbonilo, hidroxilo, alquiloxi C₁₋₆, aminocarbonil, di(C₁₋₆alquil)aminoC₁₋₆alquilcarbonil, amino, C₁₋₆alquilamino, C₁₋₆alquil-carbonilamino, o un radical de fórmula -Alk-OR¹⁰ o -Alk-NR¹¹R¹².

en el que

Alk es alkanediyl C_{1-6} :

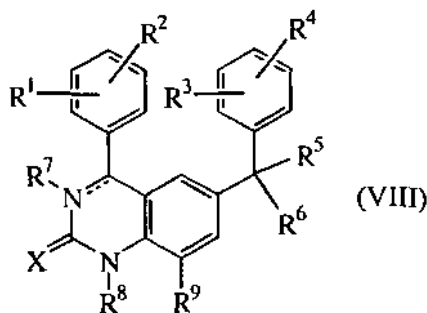
R¹⁰ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alquilcarbonil C₁₋₆, hidroxialquilo C₁₋₆, Ar⁹ o Ar⁹-C₁₋₆alquilo;

R¹¹ es hidrógeno, C₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquilcarbonil, Ar¹⁰ o Ar¹⁰-C₁₋₆alquilo;

R¹² es hidrógeno, C₁₋₆alquilo, Ar¹¹ o Ar¹¹-C₁₋₆alquilo; y

De Ar¹ a Ar¹¹ son seleccionadas independientemente entre fenil; o fenil sustituido por halo, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ trifluorometil.

[0017] WO-98/49157 y la patente de EE.UU. N° 6.117.432 abordan la preparación, formulación y propiedades farmacéuticas compuestos inhibidores de farnesiltransferasa de fórmula (VIII)



las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables y las formas estereoquímicamente isoméricas de las mismas, en las que la línea de puntos representa un enlace opcional;

X es oxígeno o azufre,

R¹ y R² cada uno independientemente son hidrógeno, hidroxi, halo, ciano, alquilo C₁₋₆, trihalometil, trihalometoxi, alquenilo C₂₋₆, alquiloxi C₁₋₆, hidroxic₁₋₆alquiloxi, C₁₋₆alquiloxiC₁₋₆alquiloxi, C₁₋₆alquiloxicarbonil, aminoC₁₋₆alquiloxi, mono- o di (C₁₋₆alquil)aminoC₁₋₆alquiloxi, Ar¹, Ar¹-C₁₋₆alquilo, Ar¹-oxi o Ar¹-C₁₋₆alquiloxi; o cuando están en posiciones adyacentes, R¹ y R² juntos pueden formar un radical bivalente de fórmula

R³ y R⁴ cada uno independientemente son hidrógeno, halo, ciano, alquilo C₁₋₆, alquiloxi C₁₋₆, Ar¹-oxi, alquiltio C₁₋₆, di(C₁₋₆alquil) amino, trihalometil y trihalometoxi.

R⁵ es hidrógeno, halo, alquilo C₁₋₆, ciano, haloC₁₋₆alquilo, hidroxilC₁₋₆alquilo, cianoC₁₋₆alquilo, aminoC₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquilo-C₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquiloxilC₁₋₆alquilo, aminocarbonilC₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquiloxycarbonilC₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquilcarbonil-C₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquiloxycarbonil, mono-ordi(C₁₋₆alquil)aminoC₁₋₆alquilo, Ar¹, Ar¹C₁₋₆alquilo-C₁₋₆alquilo; o un radical de fórmula

$$- \text{O-R}^{10} \text{ (a-1)}$$

- O-R¹⁰ (a-1),
- S-R¹⁰ (a-2).

- $N-R^{11}R^{12}$ (a-3),

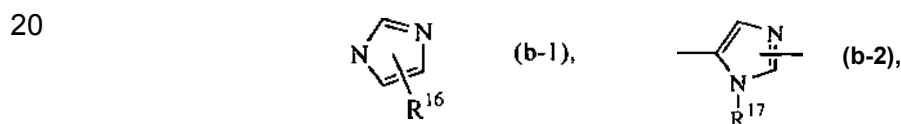
en el que

- 5 R^{10} es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquilcarbonil C_{1-6} , Ar^1 , Ar^1C_{1-6} alquilo, C_{1-6} alquiloxycarbonil C_{1-6} alquilo, o un radical de fórmula $-Alk-OR^{13}$ o $-Alk-NR^{14}R^{15}$;
 R^{11} es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , Ar^1 o Ar^1C_{1-6} alquilo;
 R^{12} es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquilcarbonil C_{1-6} , alquiloxycarbonil C_{1-6} , alquilaminocarbonil C_{1-6} , Ar^1 , Ar^1C_{1-6} alquilo, C_{1-6} alquilcarbonil C_{1-6} alquilo, Ar^1 carbonil, Ar^1C_{1-6} alquilcarbonil, aminocarbonilcarbonil, C_{1-6} alquiloxi C_{1-6} alquilcarbonil, hidroxil, alquiloxi C_{1-6} , aminocarbonil, di(C_{1-6} alquil)amino C_{1-6} alquilcarbonil, amino, C_{1-6} alquilamino, C_{1-6} alquilcarbonilamino, o un radical de fórmula $-Alk-OR^{13}$ o $-Alk-NR^{14}R^{15}$;

en el que Alk es alcanodiil C_{1-6} ;

- 15 R^{13} es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquilcarbonil C_{1-6} , hidroxil C_{1-6} alquilo, Ar^1 o Ar^1C_{1-6} alquilo;
 R^{14} es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , Ar^1 o Ar^1C_{1-6} alquilo;
 R^{15} es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquilcarbonil C_{1-6} , Ar^1 o Ar^1C_{1-6} alquilo;

R^6 es un radical de fórmula



25 Donde

- R^{16} es hidrógeno, halo, Ar^1 , alquilo C_{1-6} , hidroxil C_{1-6} alquilo, C_{1-6} alquiloxi C_{1-6} alquilo, alquiloxi C_{1-6} , alquiltio C_{1-6} , amino, C_{1-6} alquiloxycarbonil, C_{1-6} alquiltio C_{1-6} alquilo, C_{1-6} alquilS(O) C_{1-6} alquilo o C_{1-6} alquiloS(O) C_{1-6} alquilo;
 R^{17} es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , o di(C_{1-4} alquilo)aminosulfonil;
 R^7 es hidrógeno o alquilo C_{1-6} siempre que la línea de puntos no represente un enlace;
 R^8 es hidrógeno, alquilo C_{1-6} o Ar^2CH_2 o Het^1CH_2 ;
 R^9 es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquiloxi C_{1-6} o halo; o
 R^8 y R^9 juntos para formar un radical bivalente de fórmula

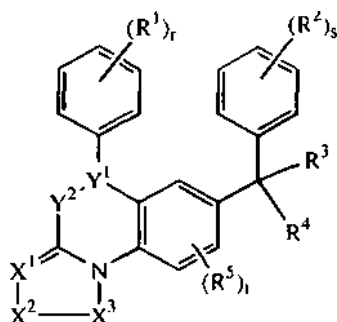
- 35 $-CH=CH-$ (c-1),
 $-CH_2-CH_2-$ (c-2),
40 $-CH_2-CH_2-CH_2-$ (c-3),
 $-CH_2-O-$ (c-4),
45 o
 $-CH_2-CH_2-O-$ (c-5);

- Ar^1 es fenil; o fenil sustituido por 1 o 2 sustituyentes seleccionados independientemente entre halo, alquilo C_{1-6} , alquiloxi C_{1-6} o trifluorometil;
50 Ar^2 es fenil; o fenil sustituido por 1 o 2 sustituyentes seleccionados independientemente entre halo, alquilo C_{1-6} , alquiloxi C_{1-6} o trifluorometil; y
 Het^1 es piridinil; o piridinil sustituido por 1 o 2 sustituyentes seleccionados independientemente entre halo, alquilo C_{1-6} , alquiloxi C_{1-6} o trifluorometil;

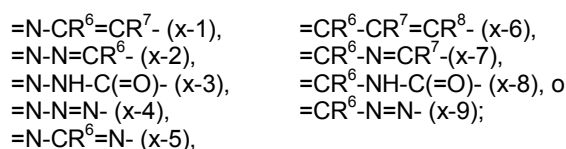
- 55 **[0018]** WO-00/39082 y la patente de EE.UU. N ° 6.458.800 describen la preparación, formulación y propiedades farmacéuticas de los compuestos inhibidores de farnesiltransferasa de fórmula (IX)

60

65

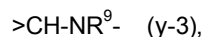


o las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables y las formas estereoquímicamente isoméricas de las mismas, en las que $=X^1-X^2-X^3-$ es un radical trivalente de fórmula

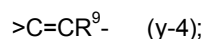


en el que cada R^6 , R^7 y R^8 son independientemente hidrógeno, alquilo C_{1-4} , hidroxilo, alquilo C_{1-4} , arilo, C_{1-4} alquilo, carbonilo, hidroxilo C_{1-4} alquilo, C_{1-4} alquilo C_{1-4} alquilo, mono- o di(C_{1-4} alquilo)amino C_{1-4} alquilo, ciano, amino, tio, alquilo C_{1-4} , arilo o arilo;

$>Y^1-Y^2-$ es un radical trivalente de fórmula



o



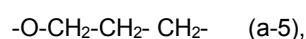
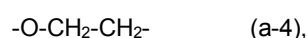
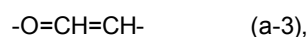
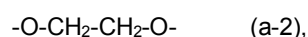
en el que R^9 es independientemente hidrógeno, halo, halocarbonilo, aminocarbonilo, ciano, carboxilo, alquilo C_{1-4} , alquilo C_{1-4} , C_{1-4} alquilo C_{1-4} alquilo, alquilo C_{1-4} , mono- o di(C_{1-4} alquilo)amino, mono- o di(C_{1-4} alquilo)amino C_{1-4} alquilo, arilo;

r y s son cada uno independientemente 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

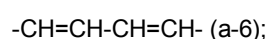
t es 0, 1, 2 o 3;

R^1 y R^2 cada uno independientemente son hidroxilo, halo, ciano, alquilo C_{1-6} , trihalometilo, trihalometoxi, alquilo C_{2-6} , alquilo C_{1-6} , hidroxilo C_{1-6} alquilo, alquilo C_{1-6} , C_{1-6} alquilo C_{1-6} alquilo, C_{1-6} alquilo C_{1-6} alquilo, amino C_{1-6} alquilo, mono- o di(C_{1-6} alquilo)amino C_{1-6} alquilo, arilo, arilo C_{1-6} alquilo, arilo o arilo C_{1-6} alquilo, hidroxilo C_{1-6} alquilo, amino C_{1-6} alquilo, aminocarbonilo, amino C_{1-6} alquilo, mono- o di(C_{1-6} alquilo)aminocarbonilo, mono- o di(C_{1-6} alquilo)amino C_{1-6} alquilo; o

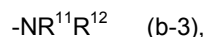
dos sustituyentes R^1 o R^2 adyacentes el uno al otro en el anillo de fenil ring pueden formar juntos independientemente un radical bivalente de fórmula



o



R^3 es hidrógeno, halo, alquilo C_{1-6} , ciano, halo C_{1-6} alquilo, hidroxialquilo, ciano C_{1-6} alquilo, amino C_{1-6} alquilo, C_{1-6} alquiloalquilo, C_{1-6} alquiloalquilo, aminocarbonil C_{1-6} alquilo, hidroxycarbonil, hidroxycarbonil C_{1-6} alquilo, C_{1-6} alquiloalquilo, C_{1-6} alquiloalquilo, alquiloalquilo C_{1-6} , arilo, aril C_{1-6} alquilo, mono- o di(C_{1-6} alquilo)amino C_{1-6} alquilo; o un radical de fórmula



en el que

R^{10} es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquiloalquilo C_{1-6} , arilo, aril C_{1-6} alquilo, C_{1-6} alquiloalquilo, o un radical de fórmula $-Alk-OR^{13}$ o $-Alk-NR^{14}R^{15}$;

R^{11} es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , arilo o aril C_{1-6} alquilo;

R^{12} es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , arilo, hidroxil, amino, alquiloalquilo, C_{1-6} alquiloalquilo, aril C_{1-6} alquilo, C_{1-6} alquiloalquilo, mono- o di(C_{1-6} alquilo)amino, C_{1-6} alquiloalquilo, aminocarbonil, arilcarbonil, halo C_{1-6} alquiloalquilo, aril C_{1-6} alquiloalquilo, alquiloalquilo C_{1-6} , C_{1-6} alquiloalquilo, mono- o di(C_{1-6} alquilo)aminocarbonil en el que el resto alquilo puede ser opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados independientemente entre arilo o C_{1-3} alquiloalquilo, aminocarbonilcarbonil, mono- o di(C_{1-6} alquilo)amino C_{1-6} alquiloalquilo, o un radical de fórmula $-Alk-OR^{13}$ o $-Alk-NR^{14}R^{15}$;

en el que

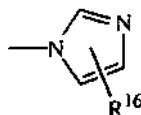
Alk es alcanodiil C_{1-6} ;

R^{13} es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquiloalquilo C_{1-6} , hidroxialquilo, arilo o aril C_{1-6} alquilo;

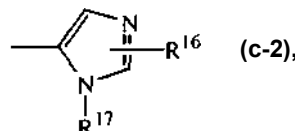
R^{14} es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , arilo o aril C_{1-6} alquilo;

R^{15} es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquiloalquilo C_{1-6} , arilo o aril C_{1-6} alquilo;

R^4 es un radical de fórmula



(c-1),



(c-2),

en el que

R^{16} es hidrógeno, halo, arilo, alquilo C_{1-6} , hidroxialquilo, C_{1-6} alquiloalquilo, alquiloalquilo C_{1-6} , alquiloalquilo C_{1-6} , amino, mono- o di(C_{1-4} alquilo)amino, hidroxycarbonil, C_{1-6} alquiloalquilo, C_{1-6} alquiloalquilo, C_{1-6} alquiloalquilo, o C_{1-6} alquiloalquilo;

R^{16} también puede estar unido a uno de los átomos de nitrógeno en el anillo de imidazol de fórmula (c-1) o (c-2), en cuyo caso el significado de R^{16} cuando se une al nitrógeno está limitado a hidrógeno, arilo, alquilo C_{1-6} , hidroxialquilo, C_{1-6} alquiloalquilo, C_{1-6} alquiloalquilo, C_{1-6} alquiloalquilo, o C_{1-6} alquiloalquilo;

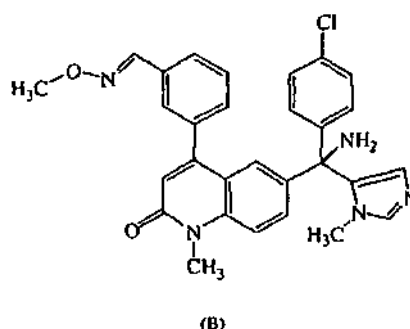
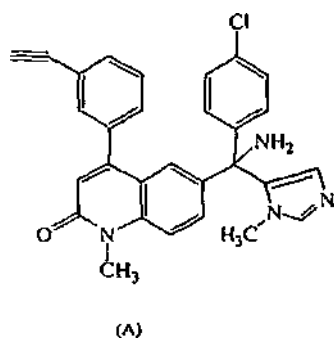
R^{17} es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , C_{1-6} alquiloalquilo, aril C_{1-6} alquilo, trifluorometil o di(C_{1-4} alquilo)aminosulfonil;

R^5 is alquilo C_{1-6} , alquilo C_{1-6} o halo;

aryl is phenyl, naftalil o fenil sustituido por 1 o más sustituyentes cada uno elgido independientemente entre halo, alquilo C_{1-6} , alquilo C_{1-6} o trifluorometil

[0019] Además, FTI potentes, incluyendo tipifarnib (también conocido como R115777 o Zarnestra®), han sido descritos en la literatura. Véase, por ejemplo, Kurzrock, R. et al. (2003), WO 98/43629, y WO 02/40015. Otros inhibidores conocidos de la farnesiltransferasa incluyen Arglabin (ie1 (R)-10-epoxi-5 (S), 7 (S)-Guaia-3 (4), 11 (13)-dien-6,12-olida que se describe en WO-98/28303 (NuOncology Labs); alcohol perrilil que se describe en WO-99/45912 (Wisconsin Genetics), SCH-66336, es decir, (+) - (R) 4-[2-[4-(3,10-dibromo-8-cloro-5,6-dihidro-11H-benzo[5,6]ciclohepta[1,2-b]piridin-11-il)piperidin-1-il]-2-oxoetil]-piperidina-1-carboxamida, que se describe en la patente de EE.UU. N° 5.874.442 (Schering); L778123, es decir, 1 (3-clorofenil)-4-[1-(4-cianobencil)-5-imidazolilmetil]-2-piperazinona, que se describe en WO-00/01691 (Merck); compuesto 2(S)-[2(S)-[2 (R)-amino-3-mercapto]propilamino-3 (S)-metil]-pentiloxi-3-fenilpropionilo-metionina sulfona que se describe en WO-94/10138 (Merck), y BMS 214662, es decir, (R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmetil)-4-(2-tienilsulfo-nil)-1H-1,4-

benzodiazepina-7-carbonitrilo, que se describe en el documento WO 97/30992 (Bristol Myers Squibb), y compuestos de Pfizer (a) y (b) descritos en el documento WO-00/ 2498 y WO-00/12499:



[0020] El uso de algunos de FTI se ha estudiado en el área de la terapia contra el cáncer. Más recientemente, el uso de ciertos FTI como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, particularmente aquellas que implican un componente inmunológico, y para el tratamiento del dolor asociado con enfermedades inflamatorias ha sido divulgada. Véase el documento WO 98/43629, que describe el uso de determinados FTI para el tratamiento de condiciones que incluyen colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, rinitis alérgica, enfermedad de injerto contra huésped, conjuntivitis, asma, artritis reumatoide, osteoartritis, ARDS, enfermedad de Behcet, rechazo de trasplantes, urticaria, dermatitis alérgica, alopecia areata, escleroderma, exantema, eccema, dermatomiositis, acné, diabetes, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Kawasaki, esclerosis múltiple, enfisema, fibrosis quística, bronquitis crónica, y psoriasis.

[0021] W09721701 describe inhibidores de la farnesil transferasa para el tratamiento de choque endotóxico que son las benzodiazepinas.

[0022] Aunque se conocen diversos FTI, sus efectos biológicos en las células y animales, y por lo tanto sus aplicaciones terapéuticas, no se han aclarado totalmente

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0023] En un aspecto general, la descripción se refiere a un método de tratamiento de un sujeto para la sepsis o shock séptico, que comprende administrar a un sujeto en necesidad de dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la farnesil transferasa. Preferentemente, el inhibidor de la farnesil transferasa se selecciona entre los compuestos inhibidores de la farnesil transferasa descritos en este documento. Más preferentemente, el inhibidor de la farnesil transferasa es tipifarnib.

[0024] En un aspecto general, la invención se refiere a métodos para determinar la respuesta de un sujeto al tratamiento con un inhibidor de la farnesil transferasa según se define en las reivindicaciones. Una realización general de tal método comprende: (a) medir un nivel de al menos uno de los IL - 6, MCP - 1, IL - 1 β , MMP - 9 y TNF - α en una muestra de sangre sin tratar, que es una muestra de sangre tomada del sujeto antes del tratamiento con el inhibidor de la farnesil transferasa, o extracto del mismo, midiendo un nivel de esta en al menos un IL - 6, MCP - 1, IL - 1 β , MMP - 9, y TNF - α en cada muestra de sangre tratada que es una muestra de sangre tomada de un sujeto al menos una vez después del comienzo del tratamiento con el inhibidor de la farnesil transferasa, o extracto del mismo, y comparando los niveles medidos, en los que una disminución indica una respuesta al tratamiento; donde el método comprende opcionalmente (b) aislar las células, plasma o suero de la muestra de sangre sin tratar para obtener un extracto de la muestra sin tratar, y aislar las células, plasma o suero de cada muestra de sangre tratada para obtener un extracto de la muestra tratada y / o opcionalmente, medir un nivel de IL - 8 en la muestra de sangre sin tratar o extracto, midiendo un nivel de IL - 8 en cada muestra de sangre tratada o extracto, y comparando los niveles de IL - 8 para obtener una medida de control.

[0025] En una realización preferente, los extractos son muestras de plasma (aisladas mediante, por ejemplo, centrifugación de la sangre). En otra realización preferente, los extractos son células mononucleares de sangre periférica aisladas por, por ejemplo, gradiente de Ficoll - Paque. Antes de la medición, la sangre o las células pueden ser estimuladas con LPS.

[0026] Otra realización general se refiere a un método para controlar la respuesta de un sujeto al tratamiento con un inhibidor de la farnesil transferasa, que comprende: (a) opcionalmente, aislar las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de la muestra de sangre sin tratar que es una muestra de sangre tomada del sujeto antes del tratamiento con el inhibidor de la farnesil transferasa para obtener una muestra de CMSP sin tratar, y aislar las células mononucleares de sangre periférica a partir de cada muestra de sangre tratada que es una muestra de sangre tomada del sujeto al menos una vez después del comienzo del tratamiento con el inhibidor de la farnesil transferasa para obtener una muestra de CMSP tratada; (c) estimular la muestra de sangre no tratada o PBMC con

lipopolisacárido para obtener una muestra no tratada de sangre estimulada por LPS o PBMC, y estimular cada muestra sangre tratada o PBMC con lipopolisacárido para obtener una muestra de sangre estimulada por LPS o PBMC; (d) aislar el ARN de la muestra de sangre no tratada estimulada por LPS o PBMC, y el aislar el ARN de cada muestra tratada de sangre estimulada por LPS o PBMC; (e) opcionalmente, medir la expresión de IL-8 en el ARN de las muestra de sangre no tratada estimulada por LPS o PBMC, medir la expresión de IL-8 en los ARN de cada muestra de sangre tratada estimulada por LPS o PBMC, y comparar dichas mediciones de la expresión del ARN de IL-8 como control; (f) medir la expresión de al menos uno de IL-1 β , MCP-1, MMP-9, MyD88, STAT1, y IL 6-en el ARN de la muestra de sangre no tratada estimulada por LPS o PBMC, medir la expresión de al menos uno de IL-1 β , MCP-1, MMP-9, MyD88, STAT1, y IL-6 en el ARN de cada muestra de sangre tratada estimulada por LPS o PBMC, y comparar las mediciones de expresión, en las que una disminución indica una respuesta al tratamiento.

[0027] En una descripción adicional, varias muestras de sangre tratada del sujeto (por ejemplo, un paciente en un ensayo clínico) se toman a intervalos periódicos de tiempo después del comienzo del tratamiento con el inhibidor de farnesiltransferasa.

[0028] Otras realizaciones, características, ventajas, y aspectos de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada a continuación en referencia a las figuras dibujadas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0029]

La **Figura 1** muestra la vía del mevalonato para la síntesis de isoprenoides y colesterol, indicando los sitios para la inhibición de la HMG CoA reductasa por parte de la simvastatina, y de la actividad de farnesiltransferasa por parte del tipifarnib. La inhibición de la HMG CoA reductasa por parte de las estatinas conduce a la inhibición de la síntesis del colesterol, y a la producción de isoprenoides, requerida para la farnesilación y geranilgeranilación de las proteínas. La inhibición de la farnesiltransferasa por parte de los FTI inhibe selectivamente la farnesilación de proteínas como Ras.

Las **figuras 2a-2g** muestran el efecto de la simvastatina y tipifarnib en la transcripción inducida por LPS de IL-1 β (**Figura 2.a**), MCP-1(**Figura 2.b**), MMP-9 (**figura 2.c**), IL-8 (**figura 2.d**), STAT1 (**figura 2.e**), MyD88 (**Figura 2.f**) e IL-6 (**Figura 2. g**). Las células THP-1 fueron cultivadas en ausencia (sin tratamiento) o presencia de LPS (100 ng / ml), más o menos simvastatina (10 μ M), o tipifarnib (5 μ M). Se aisló el ARN a los tiempos indicados para la preparación de ADNc como se describe en "Materiales y Métodos". Los niveles relativos de ARNm en comparación con GAPDH se determinaron mediante PCR en tiempo real.

Las **figuras 3a-3f** muestran el efecto de la simvastatina y tipifarnib en LPS inducida por la secreción de MCP-1 (**figura 3.a**), IL-6 (**Figura 3.b**), IL-1 β (**Figura 3c**), IL- 8 (**Figura 3.d**), MMP-9 (**Figura 3e**) y TNF- α (**Figura 3f**). Las células THP-1 cultivadas en ausencia (sin tratamiento) o presencia de LPS 100ng/ml, más o menos simvastatina (5 y 10 μ M) o tipifarnib (2 μ M y 5), respectivamente. En los puntos de tiempo indicados, se analizaron sobrenadantes para citocinas, quimiocinas o MMP-9 por ELISA. Los puntos de datos son medios de incubaciones por triplicado, para los que las desviaciones estándar eran habitualmente de 2 a 13% del valor medio.

La **Figura 4** muestra la inhibición de liberación de IL-6 inducida por LPS por parte del tipifarnib. Células THP-1 a 3,4 x 10⁵/ml se cultivaron en placas de 96 pocillos en 0,5% de FBS / RPMI 1640, en ausencia o presencia de LPS 100ng/ml, más o menos tipifarnib (a partir de 5 μ M, seguido por 3 series de dilución). Las concentraciones de tipifarnib fueron: 5 μ M, 1,67 μ M, 0,56 μ M, 0,19 μ M y 0,06 μ M. Se recogieron los sobrenadantes a las 48 h. IL6 se cuantificó mediante kit ELISA de R & D Systems.

Las **figuras 5a-5e** muestran el efecto de la simvastatina y tipifarnib en la producción de citoquinas inducidas por LPS in vivo. Los ratones BALB / c (n = 4 o 5 por grupo) se trataron por vía oral con simvastatina o tipifarnib en 20% de ciclodextrano, a una dosis de 50mg/kg, 24 horas, 17 horas y 1 hora antes de la inyección de LPS. LPS (20 mg) se administró por vía intraperitoneal. Las muestras de plasma se recogieron en 1 hora y 2 horas en el primer experimento, y 2 horas y 3 horas después de la inyección de LPS en el segundo experimento, y se ensayaron para TNF- (**Figura 5.a**), IL-6 (**Figura 5.b**), IL-1 β (**Figura 5.c**), MIP-1 α (**Figura 5.d**) y MCP-1 (**Figura 5.e**), usando ELISA o Luminex como se describe en "Materiales y Métodos" en la presente memoria. Los datos se presentan como los valores medios de 4 o 5 ratones en cada grupo, y las desviaciones estándar de los medios se indican mediante barras de error. Las estadísticas significativas para las diferencias en la producción de mediadores de la inflamación en simvastatina o tipifarnib versus animales tratados con vehículo se evaluaron mediante la prueba t de Student. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con asteriscos en las figuras 5a a través de 5e de la siguiente manera: * significa que el valor de P inferior a 0,05; ** significa el valor de P es inferior a 0,01. Cuanto menor sea el valor de P, más significativa es la diferencia.

La **Figura 6** muestra la inhibición de LPS inducido por IL-6 en los PBMC humanos por parte de tipifarnib, pero no por el enantiómero menos activo de tipifarnib. Las PBMC humanas se incubaron a 37 °C durante 1 hora en ausencia o en presencia de 5 mM y mM de tipifarnib (R115777) o su enantiómero menos activo (100 veces menos activo para la

inhibición de farnesil) después del que LPS (o el vehículo sólo sin tratamiento) se añadió a una concentración final de 10 ng/ml. Se recogieron los sobrenadantes a las 16 horas, 24 horas y 40 horas de tratamiento con LPS, y la secreción de IL-6 se cuantificó por ELISA. La importancia estadística para las diferencias en la producción de IL-6 en tipifarnib-versus PBMC tratado con vehículo se evaluó mediante la prueba t de Student. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con asteriscos ** significa valor medio de P inferior a 0,01. Cuanto menor sea el valor de P, más significativa es la diferencia.

La Figura 7a – 7b muestra el efecto de tipifarnib en LPS, TNF – α , y la señalización inducida por IL – 1. Las células THP – 1 se cultivaron en ausencia o presencia de 2 μ M de tipifarnib durante 18 horas, a continuación se incubaron con LPS y TNF – α (**Figura 7.a**), o LPS, TNF – α e IL – 1 α (**Figura 7.b**) durante 30 minutos. Los lisados celulares se analizaron por inmunoelectrotransferencia, utilizando anticuerpos contra p38, p38 fosforilado, fosfo – ERK 1 / 2, I κ B, y H – Ras.

La Figura 8 muestra que tipifarnib no inhibe la expresión del gen reportero dependiente de NF – κ B inducida por TNF – α . Las células HEK293 transfectadas en κ B – LH se incubaron en ausencia o presencia de 2 y 5 μ M de tipifarnib durante 18 horas, a continuación se estimularon con TNF – α durante 4 horas. La actividad de la luciferasa se midió y se expresó como un cambio múltiplo en presencia de TNF – α contra ningún TNF – α , o TNF – α / tipifarnib contra tipifarnib. Los valores se presentan como un factor de aumento $\pm$ D. E.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION Y REALIZACIONES PREFERIDAS

[0030] Los términos "que comprende", "que incluye" y "que contiene" se utiliza aquí en su sentido amplio, no limitado.

[0031] Los efectos biológicos de los FTI ahora se han elucidado aún más, como se discute en la sección Experimentos a continuación. La inhibición de la farnesil transferasa (FPTasa) se ha descubierto para regular a la baja los genes y proteínas identificadas en las Tablas 2, 3 y 4. Así, los niveles de dichos genes y proteínas pueden ser monitoreadas como marcadores biológicos para determinar la respuesta de un paciente al tratamiento con un FTI. Por ejemplo, diversos subconjuntos de genes y/o proteínas inducidos por LPS que se muestran en las tablas siguientes pueden ser regulados a la baja por la administración de un inhibidor de farnesiltransferasa y por lo tanto utilizarse como marcadores en los estudios clínicos.

Tabla 2: Genes para los que la transcripción inducida por LPS fue regulada a la baja por la inhibición de farnesiltransferasa, según lo medido por el análisis de microarrays de ADNc

Número de registro	Nombre del gen	Descripción del gen
NM_002982	CCL2	proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1)
NM_005623	CCL8	proteína quimiotáctica de monocitos 2 (MCP-2)
NM_002983	CCL3	citoquina A3 pequeña inducible (homóloga de Mip-1a de ratón) (SCYA3)
NM_002984	CCL4	citoquina A4 pequeña inducible (homóloga de MiP-1b de ratón) (SCYA4)
NM_005409	CXCL11	subfamilia B de citoquina pequeña inducible (SCYB11)
NM_000576	IL1B	interleucina 1, beta
MM_000577	IL1RN	interleucina-1 antagonista del receptor
MM_002852	PTX3	gen relacionado de pentaxina, rápidamente inducido por IL-1B
NM_007315	STAT1	transductor de señales y activador de transcripción 1
NM_002176	IFNB1	interferón, beta 1, fibroblastos
NM_005531	IFI16	interferón, proteína 16 inducible por gamma

5	NM_001548	IFIT1	proteína inducida por interferón con repeticiones tetratricopeptidas 1
	MM_002462	MX1	mixovirus (influenza) resistencia 1
10	NM_000598	IGFBP3	Gen de proteína-3 de unión de factor de crecimiento a modo de insulina
	NM_053056	CCND1	ciclina D1 (PRAD1: adenomatosis paratiroidea 1)
15	NM_002965	S100A9	S100 calcio-proteína de unión A9 (calgranulina B)
	NM_002468	MYD88	proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide
20	NM_000593	TAP1	transportador 1, cassette ATP de unión, subfamilia B (MDR / TAP)
	MM_000544	TAP2	transportador 2, cassette ATP de unión, subfamilia B (MDR / TAP)
25	NM_007188	ABCB8	cassette ATP de unión, subfamilia B (MDR / TAP), miembro 8
	NM_031460	KCNK17	potassium channel, subfamily K, member 17 (TASK-4)
30	NM_002659	PLAUR	plasminogen activator, urokinase receptor
	NM_004054	C3AR1	C3a anaphylatoxin chemotactic receptor (C3a-R)
35	NM_004048	B2M	beta-2-microglobulin
	MM_015907	LAP3	leucine aminopeptidase
40	NM_004994	MMP9	type IV collagenase, matrix metalloproteinase 9
45	NM_006074	TRIM22	tripartite motif-containing 22
	MM_144573	NEXN	nexilin (F actin binding protein)
50	NM_021634	LGR7	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 7
	NM_198066	GNPNAT1	glucosamine-phosphate N-acetyltransferase 1
55	No_002346	LY6E	lymphocyte antigen 6 complex, locus E

Tabla 3: Genes para los que la transcripción inducida por LPS fue regulada a la baja por la inhibición de farnesiltransferasa, como se mide por la transcriptasa inversa y análisis en tiempo real PCR

Número de registro	Nombre del gen	Descripción del gen
NM_000576	IL1B	interleukin 1, beta
NM_002982	CCL2	monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1)
NM_004994	MMP9	type IV collagenase, matrix metalloproteinase 9
NM_007315	STAT1	signal transducer and activator of transcription 1
NM_002468	MYD88	myeloid differentiation primary response protein
NM_000600	IL6	interleukin 6

Tabla 4. Proteínas para las que la producción inducida por LPS se regula a la baja por la inhibición de farnesiltransferasa, medida por ELISA o análisis Luminex

Número de registro	Nombre de proteína	Descripción de proteína
NP_000585	TNF- α	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
NP_000591	IL-6	interleukin 6, interferon beta 2
NP_000567	IL-1 β	interleukin 1, beta proprotein
NP_002973	CCL2	MCP-1, small inducible cytokine A2 precursor
NP_002974	CCL3	small inducible cytokine A3 (homologous to mouse Mip-1a)
AAG32620	IL12p40	interleukin 12 p40 subunit
NP_004985	MMP-9	type IV collagenase, matrix metalloproteinase 9

[0032] Como se describió anteriormente, uno o más de los genes identificados anteriormente y proteínas puede ser utilizado como un marcador para estudiar la respuesta de un sujeto a un tratamiento con un FTI.

[0033] La inhibición de la FPTasa puede disminuir LPS inducida por la transcripción de, por ejemplo, IL-1 β , MCP-1, MMP-9, MyD88, STAT1, MIP-1 α , TNF- α o IL-6. Por consiguiente, la transcripción de IL-1 β , MCP-1, MMP-9, MyD88, STAT1, MIP-1 α , TNF- α o IL-6 puede ser reducida por la administración de un inhibidor de farnesiltransferasa y éstos se pueden usar como un panel de marcadores para el seguimiento de pacientes en un estudio clínico. La inhibición de la FPTasa también puede disminuir o inhibir la transcripción de IL-1 β , MCP-1, MMP-9, MyD88, STAT1, MIP-1 α , TNF- α o IL-6 inducida por otros agentes de LPS. Así, la administración de un FTI a un paciente puede ser útil para tratar enfermedades y condiciones médicas mediadas a través de la transcripción de IL-1 β , MCP-1, MMP-9, MyD88, STAT1, MIP-1 α , TNF- α o IL-6. La inhibición de la FPTasa también puede disminuir inducida por LPS traducción de la proteína o la secreción de IL-1 p, MCP-1, MMP-9, MyD88, STAT1, MIP-1 α , TNF- α o IL-6. Así, una condición o enfermedad médica mediada por la traducción de proteínas inducida por LPS o la secreción de IL-1 β , MCP-1, MMP-9, MyD88, STAT1, MIP-1 α , TNF- α o IL-6 se puede tratar mediante la administración a un sujeto en necesidad de tal tratamiento un inhibidor de la farnesiltransferasa, y el progreso del tratamiento puede monitorizarse mediante la medición de los niveles de dichos marcadores. Además, ya que la inhibición de FPTasa puede servir para inhibir la traducción de la proteína o la secreción de IL-1 β , MCP-1, MMP-9, MyD88, STAT1, MIP-1 α , TNF- α o IL-6 inducida por otros agentes de LPS, la administración de un IVR puede ser útil para tratar enfermedades y condiciones médicas mediadas a través de la traducción de proteínas o la secreción de IL-1 β , MCP-1, MMP-9, MyD88, STAT1, MIP-1 α , TNF- α y / o IL- 6. La inhibición de la FPTasa también puede servir para inhibir la transcripción o la traducción de MyD88 o STAT1. La inhibición de la traducción de la transcripción o la proteína o la secreción de TNF- α , IL-1 β , MCP-1, IL-6, MMP-9, o MIP-1 α también puede alcanzarse mediante la administración de

un inhibidor de farnesyltrans FERASE, y el progreso de tratamiento puede ser monitorizada mediante medición de los niveles de este conjunto de marcadores.

5 **[0034]** En consecuencia, FTIs se puede usar para tratar la inflamación y las enfermedades inflamatorias. Enfermedades y CON médica condiciones que pueden beneficiarse del tratamiento con un FTI incluyen: la aterosclerosis y otras enfermedades vasculares como la trombosis, restenosis después de la angioplastia y / o colocación de stent, y la enfermedad de injerto de vena después de la cirugía de derivación, así como la colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, rinitis alérgica, enfermedad de injerto contra huésped crónica, asma conjuntivitis, artritis reumatoide, osteoartritis, ARDS, enfermedad de Behcet, rechazo de trasplantes, urticaria, dermatitis alérgica, alopecia areata, esclerodermia, exan-thema, eczema, dermatomiositis, acné, diabetes, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Kawasaki, esclerosis múltiple, enfisema, fibrosis quística, bronquitis crónica y psoriasis.

10 **[0035]** FTIs también se pueden usar para tratar inflamación inducida por LPS en particular. Por lo tanto, una cantidad terapéuticamente eficaz de un IVR se puede administrar para tratar un paciente en necesidad de tratamiento para una de las siguientes enfermedades o condiciones médicas: sepsis, choque endotóxico, síndrome de disfunción orgánica múltiple, periodontitis, peritonitis, anorexia, microvas-cular leucocitosis , inflamación pulmonar, hiperreactividad de las vías respiratorias, la lesión pulmonar aguda, insuficiencia respiratoria aguda, enfermedad crónica de las vías aéreas, la hiperplasia de células caliciformes, pancreatitis, síndrome nefrótico, pirexia, lesión hepática, parto prematuro, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, edema cerebral, aterosclerosis, insuficiencia cardíaca, ictericia obstructiva, neuro-inflamación, isquemia cerebral, hiperalgesia, alodinia rectal, síndrome de coagulación intravascular diseminada, la hiperglucemia, resistencia a la insulina, la apnea obstructiva del sueño.

15 **[0036]** FTIs también se pueden usar para tratar la aterosclerosis. Por lo tanto, una cantidad terapéuticamente eficaz de un IVR se pueden administrar a un sujeto diagnosticado con la aterosclerosis para tratar al sujeto en necesidad de tal tratamiento.

20 **[0037]** Además, FTIs se puede usar para tratar el asma. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un FTI por lo tanto se pueden administrar a un sujeto en necesidad de tratamiento para el asma.

25 **[0038]** Además, una cantidad terapéuticamente eficaz de un IVR se puede administrar a un sujeto diagnosticado con esclerosis múltiple (EM) para tratar el sujeto en necesidad de tal tratamiento.

30 **[0039]** Además, una cantidad terapéuticamente eficaz de un IVR se pueden administrar a un sujeto diagnosticado con o experimentando sepsis o shock séptico a tratar al sujeto en necesidad de tal tratamiento.

35 **[0040]** Por consiguiente, los métodos de seguimiento son por lo tanto útiles en relación con la determinación de la eficacia en el tratamiento de FTI las indicaciones anteriormente descritas.

40 **[0041]** Ejemplos de compuestos inhibidores de farnesiltransferasa útiles en tales tratamientos se describen a continuación. Una especialmente preferido FTI es tipifarnib.

45 **[0042]** La presente invención proporciona varios métodos para determinar la respuesta de un sujeto que padece sepsis o shock séptico al tratamiento con un inhibidor de la farnesil transferasa (IFT). En tales métodos, se toman una muestra de sangre sin tratar y una muestra de sangre tratada con IFT. Lo siguiente puede ser utilizado como tipos de "muestras de sangre": sangre total; plasma (por ejemplo, separado por centrifugación); suero de plasma (por ejemplo, obtenido por coagulación o tubos separadores de suero), o células totales o subconjuntos aislados (por ejemplo, CMSP).

50 **[0043]** Como una medida de control útil con cualquiera de los tipos anteriores de muestras de sangre, IL-8 niveles de proteína opcionalmente puede ser determinado antes y después del tratamiento con un FTI (por ejemplo, tipifarnib), por ejemplo, mediante el uso de la tinción de inmunofluorescencia, citometría de flujo, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica , inmunotransferencia, ELISA, o el análisis multiplex de citoquinas matriz. Como un experto en la técnica se dará cuenta, las mediciones se pueden utilizar otros como control, o el método puede ponerse en práctica sin el uso de un control. Por ejemplo, en plasma o suero, los niveles de proteína de albúmina pueden ser utilizados como un control. Además, el método puede ponerse en práctica sin un control interno mediante la comparación de las mediciones en una muestra de sangre no tratada a una muestra de sangre tratada con FTI.

55 **[0044]** Como el marcador (s) útil para monitorizar el progreso del tratamiento con cualquiera de las muestras de sangre, los niveles de proteína correspondientes a uno o más de los genes o proteínas en las Tablas 2, 3, y 4 se puede medir antes y después del tratamiento IVR, por ejemplo, por utilizando cualquiera de los métodos descritos anteriormente, donde una disminución es indicativo de una respuesta al tratamiento.

60 **[0045]** Alternativamente, con sangre entera o células totales o subconjuntos particulares de células (por ejemplo, PBMC), IL-8 niveles de ARN pueden medirse como un control antes y después del tratamiento FTI (bajo condiciones donde los niveles de IL-8 no cambian con el tratamiento, este gen sirve como control), por ejemplo, mediante la

realización de protección de RNasa, la transcriptasa inversa (RT) de polímero-asa reacción en cadena (PCR), RT y PCR en tiempo real cuantitativa, transferencia Northern, y análisis de ADNc o microarrays de oligonucleótidos. Como un experto en la técnica se darán cuenta, las mediciones se pueden utilizar otros como control, o el método puede ponerse en práctica sin el uso de un control. Otras mediciones de control comúnmente empleados incluyen los niveles de mRNA de deshidrogenasa glyc-eraldehyde-3-fosfato (GAPDH) o beta-actina. Además, el método puede ponerse en práctica sin un control interno mediante la comparación de las mediciones en una muestra de sangre no tratada a una muestra de sangre tratada con FTI.

[0046] Para esta descripción general que se utiliza con los tipos especificados de muestras de sangre, los niveles de ARN de uno o más de los genes o proteínas que figuran en las Tablas 2, 3, y 4 se miden antes y después del tratamiento con un FTI (donde una disminución con tratamiento refleja respuesta).

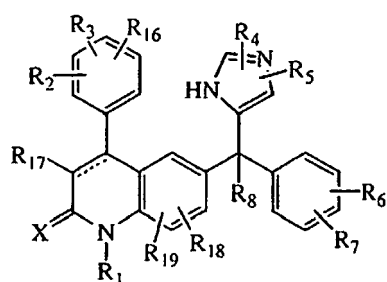
[0047] En otra revelación general alternativa, sangre completa, células totales, o subconjuntos de PBMC o de otro tipo de células se tratan con LPS. Como control, los niveles de IL-8 están opcionalmente mide en proteína o ARN, o como de otra manera conocida en la técnica, como se describe anteriormente. Los niveles de uno o más marcadores de las Tablas 2, 3 y 4 se midieron en muestras tratadas con LPS de proteína o ARN como en las otras revelaciones, con una disminución en los niveles de proteína / ARN con el tratamiento con un FTI en el tiempo indicado respuesta a el tratamiento. Del mismo modo, un agente distinto de LPS que induce un ARN o proteína para el marcador (s) pueden ser usados en lugar de LPS para el tratamiento de las muestras, y entonces la proteína o ARN opcionalmente los niveles de IL-8 (u otros controles) y uno o más marcadores puede ser medido como antes para monitorizar la respuesta al tratamiento FTI.

[0048] En una descripción, la respuesta de un sujeto sometido a dicho tratamiento comprende las siguientes etapas: (1) tomar una muestra de sangre de dicho sujeto antes del tratamiento y después del tratamiento FTI, y, opcionalmente, en diferentes momentos durante el tratamiento FTI, (2) separar opcionalmente las células y plasma (preferiblemente por centrifugación), (3) opcionalmente midiendo el nivel de IL-8 u otro control (preferiblemente por inmunotransferencia, ELISA o análisis multiplex de citoquinas matriz) en el plasma antes y después del tratamiento FTI como un control, (4) de medición (preferiblemente por inmunotransferencia o ELISA o análisis multiplex de citoquinas array) un nivel de uno o más de los marcadores identificados en las Tablas 2, 3, y 4, preferiblemente uno o más de IL-6, MCP-1, IL-1 β , MMP -9, TNF- α en el plasma antes y después del tratamiento FTI, y (5) la comparación de los niveles de estos marcadores (s) medida antes y después del tratamiento FTI. En una divulgación en particular, la disminución de los niveles de IL-6, MCP-1, IL-1 β , MMP-9, MIP 1- α y / o TNF-después de una, y, opcionalmente, durante el tratamiento FTI, con respecto a antes del tratamiento FTI, haría indican una respuesta al tratamiento FTI.

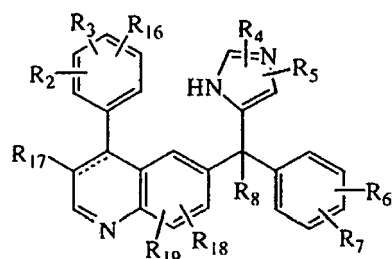
[0049] En una realización adicional, La presente descripción proporciona un método para determinar la respuesta al tratamiento con un inhibidor de la farnesiltransferasa (FTI) que comprende: (1) tomar una muestra de sangre del sujeto antes del tratamiento y después del tratamiento FTI, y, opcionalmente, en diferentes momentos durante el tratamiento FTI; (2) opcionalmente aislar las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre (preferiblemente por separación por gradiente de Ficoll-Paque), (3) la estimulación de la PBMC aislados con LPS (preferiblemente 10 μ g / ml de LPS), (4) opcionalmente, la medición de un nivel de IL-8 u otro control (preferiblemente por inmunotransferencia o ELISA o análisis multiplex de citoquinas matriz) en el plasma antes y después del tratamiento FTI como un control, (4) de medición (preferiblemente por inmunotransferencia o ELISA o análisis multiplex de citoquinas array) un nivel de uno o más de los marcadores de las Tablas 2, 3 y 4 (por ejemplo, IL-6, MCP-1, IL-1 β , MMP-9, MIP-1 α y / o TNF- α) en la PBMC antes y después del tratamiento FTI, y (5) la comparación de los niveles de estos marcadores (s) medida antes y después del tratamiento FTI, en el que disminuye los niveles de marcador (s) después de, y opcionalmente durante el tratamiento FTI, relativa a tratamiento antes de la IVR, indicaría una respuesta al tratamiento FTI.

[0050] En otra realización, la presente invención proporciona un método para determinar la respuesta al tratamiento con un inhibidor de la farnesil transferasa (IFT), en un sujeto en necesidad del tratamiento con el mismo, que comprende las etapas siguientes en una muestra de sangre tomada de dicho sujeto antes del tratamiento del IFT, después de tratamiento del IFT y, opcionalmente, en diferentes momentos durante el tratamiento del IFT, (1) aislar las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de la sangre (preferentemente por separación por gradiente de Ficoll - Paque), (2) estimular las CMSP aisladas con LPS (preferentemente 10 ng / ml de LPS); (3) aislar ARN a partir de la sangre o muestras de CMSP, (4) medir la expresión de ARN (preferentemente por transferencia de Northern, análisis de microarrays de ADNc u oligonucleótidos, o la transcriptasa inversa y PCR en tiempo real) de uno o más marcadores (preferentemente IL - 1 β , MCP - 1, MMP - 9, MyD88, STAT1 y / o IL - 6) en las muestras de ARN, (5) opcionalmente, medir la expresión del ARN de IL - 8 (u otros) como control; y (6) comparar los niveles del (los) marcador (es) en el ARN medido antes y después del tratamiento del IFT, en el que disminuyó la expresión inducida por LPS del (los) marcador (es) después de, y opcionalmente durante el tratamiento del IFT, con respecto a antes del tratamiento del IFT, indicaría una respuesta al tratamiento del IFT.

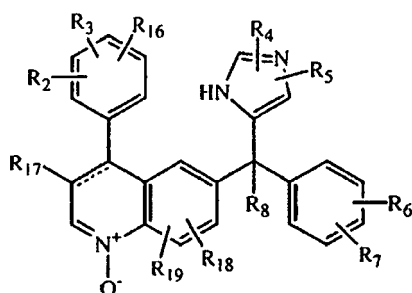
[0051] Ejemplos de inhibidores de la farnesil transferasa que se pueden emplear en los métodos o tratamientos de acuerdo con la presente descripción incluyen compuestos de fórmula (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII) o (IX) anteriores. Los IFT preferidos incluyen compuestos de fórmula (I), (II) o (III):



(I)



(II)



(III)

el ácido farmacéuticamente aceptable o sales de adición de base y las formas estereoquímicamente isoméricas de los mismos, en donde la línea de puntos representa un enlace opcional;

X es oxígeno o azufre;

R₁ es hidrógeno, C₁₋₁₂alquilo, Ar¹, Ar²C₁₋₆alquilo, quinolinylC₁₋₆alquilo, pirimidilC₁₋₆alquilo, hidroxilC₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquiloC₁₋₆alquilo, mono-o di (alquilC₁₋₆) aminoC₁₋₆alquilo, aminoC₁₋₆alquilo, o un radical de fórmula-Alk¹-C(=O)-R⁹, -Alk¹-S(O)-R⁹ o-Alk¹-S(O)₂-R⁹, en el que

ALK¹ es C₁₋₆alkanediyl,

R⁹ es hidroxil, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆alquilo, amino, C₁₋₈alquilamino o C₁₋₈alquilamino-sustituido con alquilo C₁₋₆alquilo, carbonilo;

R², R³ y R¹⁶ son cada uno independientemente hidrógeno, hidroxil, halo, ciano, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆alquilo, hidroxilC₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquiloC₁₋₆alquilo, aminoC₁₋₆alquilo, mono-o di (alquilC₁₋₆) aminoC₁₋₆alquilo, Ar¹, Ar²C₁₋₆, Ar²oxil, Ar²C₁₋₆(alquilo, hidroxilcarbonilo, C₁₋₆alquilo, carbonilo, trihalometil, trihalometoxil, C₂₋₆alqueno, 4,4-dimetiloxazolil; o

cuando R² en posiciones adyacentes y R³ tomados juntos pueden formar un radical bivalente de fórmula

-O-CH₂-O-(a-1),

-O-CH₂-CH₂-O-(a-2),

-O-CH=CH-(a-3),

-O-CH₂-CH₂-(a-4),

-O-CH₂-CH₂-CH₂-(a-5), o

-CH=CH-CH=CH-(a-6);

R⁴ y R⁵ son cada uno independientemente hidrógeno, halo, Ar¹, alquilo C₁₋₆, hidroxilC₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquiloC₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquilthio, amino, hidroxilcarbonilo, C₁₋₆alquilo, carbonilo, C₁₋₆alquilS(O)alquiloC₁₋₆alquilo o C₁₋₆alquilS(O)₂C₁₋₆;

R⁶ y R⁷ son cada uno independientemente hidrógeno, halo, ciano, alquiloC₁₋₆, alquiloC₁₋₆alquilo, Ar²oxil, trihalometil, alquilo C₁₋₆alquilthio, di (alquilC₁₋₆) amino, o cuando están en posiciones adyacentes R⁶ y R⁷ tomados juntos pueden formar un bivalente radical de fórmula

-O-CH₂-O-(c-1),

o

5 -CH = CH-CH = CH-(c-2);

10 R⁸ es hidrógeno, alquiloC₁₋₆, ciano, hidroxycarbonilo, C₁₋₆alquiloxicarbonilo, C₁₋₆alquilo C₁₋₆alquilcarbonilo, cianoC₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquilo C₁₋₆alquiloicarbonilo, carboxiC₁₋₆alquilo, hidroxyc₁₋₆alquilo, aminoC₁₋₆alquilo, mono-o di (C₁₋₆) aminoC₁₋₆alquilo, imidazolilo, haloC₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquiloC₁₋₆alquilo, aminocarboniloC₁₋₆alquilo, o un radical de fórmula

-O-R¹⁰ (b-1),

15 -S-R¹⁰ (b-2),

-N-R¹¹R¹² (b-3),

donde

20 R¹⁰ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆alquilcarbonilo, Ar¹, Ar²C₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquiloC₁₋₆alquiloicarbonilo, o un radical de fórmula-Alk²-OR¹³ o-NR¹⁴R¹⁵ Alk²;

R¹¹ es hidrógeno, C₁₋₁₂alquilo, Ar¹ o Ar²C₁₋₆alquilo;

25 R¹² es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₁₆alquilcarbonilo, C₁₋₆alquiloicarbonilo, C₁₋₆alquilaminocarbonilo, Ar¹, Ar²C₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquilo 6alquilcarboniloC₁, un aminoácido natural, Ar¹carbonyl, Ar²C₁₋₆alquilcarbonilo-, aminocarbonilcarbonyl, C₁₋₆alquiloC₁ 6alquilcarbonilo-, hidroxyc₁₋₆alquilo, aminocarbonilo, di(alquil C₁₋₆) aminoC₁₋₆alquilcarbonilo, amino, C₁₋₆alquilamino, C₁₋₆alquilcarboniloamino, o un radical de fórmula-Alk²-OR¹³ o-NR¹⁴R¹⁵ Alk²;

donde

30 Alk² es alquilo C₁₋₆alkanediyl;

R¹³ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆alquilcarbonilo, hidroxyc₁₋₆alquilo, Ar¹ o Ar²C₁₋₆alquilo;

R¹⁴ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, Ar¹ o Ar²C₁₋₆alquilo;

35 R¹⁵ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆alquilcarbonilo, Ar¹ o Ar²C₁₋₆alquilo;

R¹⁷ es hidrógeno, halo, ciano, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆alquiloicarbonilo, Ar¹;

R¹⁸ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆alquilo o halo;

R¹⁹ es hidrógeno o alquilo C₁₋₆;

Ar¹ es fenilo o fenilo sustituido con alquilo C₁₋₆, hidroxyc₁₋₆alquilo, amino, C₁₋₆alquilo o halo; y

40 Ar² es fenilo o fenilo sustituido con alquilo C₁₋₆, hidroxyc₁₋₆alquilo, amino, C₁₋₆alquilo o halo.

45 **[0052]** En las fórmulas (I), (II) y (III), R⁴ o R⁵ también puede estar unido a uno de los átomos de nitrógeno en el anillo de imidazol. En ese caso, el hidrógeno en el nitrógeno está sustituido por R⁴ o R⁵ y el significado de R⁴ y R⁵ cuando se une al nitrógeno está limitado a hidrógeno, Ar¹, alquilo C₁₋₆, hidroxyc₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquiloC₁₋₆alquilo, C₁₋₆alquiloicarbonilo, alquilo C₁₋₆alquilS(O) alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆alquilS(O)₂C₁₋₆.

[0053] Preferiblemente el sustituyente R¹⁸ está situado en la posición 5 ó 7 del resto de quinolinona y el sustituyente R¹⁹ está situado en la posición 8 cuando R¹⁸ es sobre el 7-posición.

50 **[0054]** Los ejemplos preferidos de los FTI son aquellos compuestos de fórmula (I) en la que X es oxígeno.

[0055] Además, los ejemplos de útiles FPTasa compuestos inhibidores son estos compuestos de fórmula (I) en la que la línea de puntos representa un enlace, a fin de formar un doble enlace.

55 **[0056]** Otro grupo de compuestos ilustrativos son los compuestos de fórmula (I) en la que R¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, C₁₋₆alquiloicarbonilo, di (alquil C₁₋₆) aminoC₁₋₆alquilo, o un radical de fórmula-Alk¹-C(=O)-R⁹, en donde ALK¹ es metileno y R⁹ es alquilo C₁₋₈alquilamino sustituido con alquilo C₁₋₆alquiloicarbonilo.

60 **[0057]** Todavía otro grupo de compuestos ejemplares son aquellos compuestos de fórmula (I) en donde R³ es hidrógeno o halo, y R² es halo, C₁₋₆alquilo, C₂₋₆alquilenilo, C₁₋₆alquilo, trihalometoxi o hidroxyc₁₋₆alquilo.

[0058] Un grupo adicional de compuestos ilustrativos son los compuestos de fórmula (I) en la que R² y R³ están en posiciones adyacentes y tomadas juntos para formar un radical bivalente de fórmula (a-1), (a-2) o (a-3).

65 **[0059]** Un grupo adicional de compuestos ejemplares son aquellos compuestos de fórmula (I) en la que R⁵ es hidrógeno y R⁴ es hidrógeno o alquilo C₁₋₆.

[0060] Sin embargo, otro grupo de compuestos ilustrativos son los compuestos de fórmula (I) en la que R^7 es hidrógeno y R^6 es alquilo C_{1-6} o halo, preferiblemente cloro, especialmente 4-cloro.

[0061] Otro grupo de ejemplo de compuestos son aquellos compuestos de fórmula (I) en la que R^8 es hidrógeno, hidroxilo, halo C_{1-6} alquilo, hidroxilo C_{1-6} alquilo, ciano C_{1-6} alquilo, C_{1-6} alquilo C_{1-6} alquiloxycarbonilo, imidazolilo, o un radical de fórmula- $NR^{11}R^{12}$ en el que R^{11} es hidrógeno o C_{1-12} alquilo y R^{12} es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquilo C_{1-6} alquiloxi, hidroxilo, C_{1-6} alquiloxi C_{1-6} alquilcarbonilo, o un radical de fórmula- Alk^2-OR^{13} en el que R^{13} es hidrógeno o alquilo C_{1-6} .

[0062] Los compuestos preferidos son aquellos compuestos en donde R^1 es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquilo C_{1-6} alquilo C_{1-6} alquiloxi, di (alquil C_{1-6}) amino C_{1-6} alquilo, o un radical de fórmula- $Alk^1-C(=O)-R^9$, en donde Alk^1 es metileno y R^9 es alquilo C_{1-6} alquilamino sustituido con alquilo C_{1-6} alquiloxycarbonilo; R^2 es halo, alquilo C_{1-6} , C_{2-6} alqueno, C_{1-6} alquiloxi, trihalometoxi, hidroxilo C_{1-6} alquiloxi-o Ar^1 ; R^3 es hidrógeno; R^4 es metilo unido al nitrógeno en 3-posición del imidazol; R^5 es hidrógeno; R^6 es cloro; R^7 es hidrógeno; R^8 es hidrógeno, hidroxilo, halo C_{1-6} alquilo, hidroxilo C_{1-6} alquilo, ciano C_{1-6} alquilo, C_{1-6} alquilo C_{1-6} alquiloxycarbonilo, imidazolilo, o un radical de fórmula - $NR^{11}R^{12}$ en el que R^{11} es hidrógeno o C_{1-12} alquilo y R^{12} es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquilo C_{1-6} alquiloxi, C_{1-6} alquiloxi C_{1-6} alquilcarbonilo, o un radical de fórmula- Alk^2-OR^{13} donde R^{13} es alquilo C_{1-6} ; R^{17} es hidrógeno y R^{18} es hidrógeno.

[0063] Compuestos especialmente preferidos son:

4-(3-clorofenil)-6-[(4-clorofenil)hidroxilo(1-metil-1H-imidazol-5-il)metil]-1-metil-2(1H)-quinolinon;
6-[amino(4-clorofenil)-1-metil-1H-imidazol-5-il]metil]-4-(3-clorofenilo)-1-metil-2(1H)-quinolinon;
6-[(4-clorofenil)hidroxilo(1-metil-1H-imidazol-5-il)metil]-4-(3-etoxifenilo)-1-metil-2(1H)-quinolinon;
6-[(4-clorofenil)(1-metil-1H-imidazol-5-il)metil]-4-(3-etoxifenilo)-1-metil-2(1H)-quinolinona-monoclorhidrato.
Monohidrato.
6-[amino(4-clorofenil)-1-metil-1H-imidazol-5-il]metil]-4-(3-etoxifenilo)-1-metil-2(1H)-quinolinon;
6-[amino(4-clorofenil)-1-metil-1H-imidazol-5-il]metil]-1-metil-4-(3-propifenilo)-1-metil-2(1H)-quinolinon; un forma estereoisómera del mismo o un ácido farmacéuticamente aceptable o una sal de adición de base; y
(+)-6-[amino(4-clorofenil)-1-metil-1H-imidazol-5-il]metil]-4-(3-propifenilo)-1-metil-2(1H)-quinolinon;(Tipifarnib;
compuesto 75 en la Tabla 1 del documento WO 97/21701), o un ácido farmacéuticamente aceptable sal de adición del mismo.

[0064] Tipifarnib o Zarnestra® es un IVR especialmente preferido.

[0065] También se describen compuestos de fórmula (IX) en la que uno o más de los siguientes casos:

- $=X^1-X^2-X^3$ es un radical trivalente de fórmula (x-1), (x-2), (x-3), (x-4) o (x-9) en la que cada R^6 es independientemente hidrógeno, alquilo C_{1-4} , C_{1-4} alquiloxycarbonilo, amino o arilo y R^7 es hidrógeno;
- $>Y^1-Y^2$ es un radical trivalente de fórmula (y-1), (Y-2), (Y-3), o (Y-4) en donde cada R^9 es independientemente hidrógeno, halo, carboxilo, alquilo C_{1-4} o C_{1-4} alquiloxycarbonilo;
- r es 0, 1 o 2;
- s es 0 o 1;
- t es 0;
- R^1 es halo, alquilo C_{1-6} o dos sustituyentes R^1 orto entre sí en el anillo de fenilo pueden formar juntos independientemente un radical bivalente de fórmula (a-1);
- R^2 es halo;
- R^3 es halo o un radical de fórmula (b-1) o (b-3) R^{10} es hidrógeno o un radical de fórmula- $Alk-OR^{13}$.
- R^{11} es hidrógeno;
- R^{12} es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquilo C_{1-6} alquilcarbonilo, hidroxilo, C_{1-6} alquiloxi o mono-o di (alquil C_{1-6}) amino C_{1-6} alquilcarbonilo; Alk es C_{1-6} alkanediyl y R^{13} es hidrógeno;
- R^4 es un radical de fórmula (c-1) o (c-2) en el que
- R^{16} es hidrógeno, halo o mono-o di (alquil C_{1-4}) amino;
- R^{17} es hidrógeno o alquilo C_{1-6} ;
- arilo es fenilo.

[0066] Un grupo ejemplar de compuestos está constituido por aquellos compuestos de fórmula (IX) en la que $=X^1-X^2-X^3$ es un radical trivalente de fórmula (x-1), (x-2), (x-3), (x-4) o (x-9), $>Y^1-Y^2$ es un radical trivalente de fórmula (y-2), (Y-3) o (Y-4), r es 0 o 1, s es 1, t es 0, R^1 es halo, C_{1-4} alquilo, o forma un radical bivalente de fórmula (a-1), R^2 es halo o alquilo C_{1-4} , R^3 es hidrógeno o un radical de fórmula (b-1) o (b-3), R^4 es un radical de fórmula (c-1) o (c-2), R^6 es hidrógeno, alquilo C_{1-4} o fenilo, R^7 es hidrógeno, R^9 es hidrógeno o alquilo C_{1-4} , R^{10} es hidrógeno o-Alquil- OR^{13} , R^{11} es hidrógeno y R^{12} es hidrógeno o C_{1-6} alquilcarbonilo y R^{13} es hidrógeno.

[0067] Los compuestos preferentes son compuestos de fórmula (IX) en la que $=X^1-X^2-X^3$ es un radical trivalente de fórmula (x-1) o (x-4), $>Y^1-Y^2$ es un radical trivalente de fórmula (y-4), r es 0 o 1, s es 1, t es 0, R^1 es halo, preferiblemente cloro, y lo más preferiblemente R^2 cloro, es halo, preferiblemente 4-cloro o fluoro-4, R^3 es hidrógeno

o un radical de fórmula (b-1) o (b-3), R^4 es un radical de fórmula (c-1) o (c-2), R^6 es hidrógeno, R^7 es hidrógeno, R^9 es hidrógeno, R^{10} es hidrógeno, R^{11} es hidrógeno y R^{12} es hidrógeno.

[0068] Otros compuestos preferentes son aquellos compuestos de fórmula (IX) en la que $=X^1-X^2-X^3$ es un radical trivalente de fórmula (x-2), (x-3) o (x-4), $>Y^1-Y^2$ es un radical trivalente de fórmula (y-2), (y-3) o (y-4), r y s son 1, t es 0, R^1 es halo, preferiblemente cloro, y lo más preferiblemente de 3-cloro o R^1 es alquilo C_{1-4} , preferiblemente 3-metil, R^2 es halo, preferiblemente cloro, y lo más preferiblemente cloro, R^3 es un radical de fórmula (b-1) o (b-3), R^4 es un radical de fórmula (c-2), R^6 es alquilo C_{1-4} , R^9 es hidrógeno, R^{10} y R^{11} son hidrógeno y R^{12} es hidrógeno o hidroxilo.

[0069] También se describen compuestos de fórmula (IX) 7 - [(4-fluorofenil) (1H-imidazol-1-il) metil]-5-fenilimidazo[1,2-a] quinolina;

α -(4-clorofenil)- α -(1-metil-1H-imidazol-5-il)-5-fenilimidazo[1,2-a]quinolina-7-metanol;

5-(3-clorofenil)- α -(4-clorofenil)- α -(1-metil-1H-imidazol-5-il)-imidazo[1,2-a]quinolina-7-metanol;

5-(3-clorofenil)- α -(4-clorofenil)- α -(1-metil-1H-imidazol-5-il)-imidazo[1,2-a]quinolina-7-metanamina;

5-(3-clorofenil)- α -(4-clorofenil)- α -(1-metil-1H-imidazol-5-il)-tetrazolo[1,5-a]quinolina-7-metanamina;

5-(3-clorofenil)- α -(4-clorofenil)-1-metil- α -(1-metil-1H-imidazol-5-il)-1,2,4-triazolo[4,3-a]quinolina-7-metanol;

5-(3-clorofenil)- α -(4-clorofenil)- α -(1-metil-1H-imidazol-5-il)-tetrazolo[1,5-a]quinolina-7-metanamina;

5-(3-clorofenil)- α -(4-clorofenil)- α -(1-metil-1H-imidazol-5-il)-tetrazolo[1,5-a]quinazolina-7-metanol;

5-(3-clorofenil)- α -(4-clorofenil)-4,5-dihidro- α -(1-metil-1H-imidazol-5-il)-tetrazolo[1,5-a]quinolina-7-metanol;

5-(3-clorofenil)- α -(4-clorofenil)- α -(1-metil-1H-imidazol-5-il)-tetrazolo[1,5-a]quinazolina-7-metanamina;

5-(3-clorofenil)- α -(4-clorofenil)-N-hidroxi- α -(1-metil-1H-imidazol-5-il)-tetrahidro[1,5-a]quinolina-7-metanamina;

α -(4-clorofenil)- α -(1-metil-1H-imidazol-5-il)-5-(3-metilfenilo)tetrazolo[1,5-a]quinolina-7-metanamina; las sales farmacéuticamente aceptables de adición de ácido y las formas estereoquímicamente isoméricas de los mismos.

[0070] Son especialmente preferidos 5 - (3 - clorofenil) - α - (4 - clorofenil) - α - (1 - metil - 1H - imidazol - 5 - il) tetrazolo [1,5 - a] quinazolina - 7 - metanamina, en especial el enantiómero (-), y sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables.

[0071] Tal como se utiliza en las definiciones que anteceden y en lo sucesivo, "halo" incluye fluoro, cloro, bromo y yodo; " C_{1-6} alquilo" abarca radicales lineales y ramificados hidrocarbonados saturados de cadena que tienen de 1 a 6 átomos de carbono tales como, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo y similares; "alquilo C_{1-8} " abarca los lineales y ramificados radicales hidrocarbonados saturados de cadena como se define para alquilo C_{1-6} , así como los homólogos superiores de los mismos que contienen 7 u 8 átomos de carbono, tales como heptilo u octilo; " C_{1-12} alquilo" también comprende alquilo C_{1-8} y sus homólogos superiores que contienen de 9 a 12 átomos de carbono, tales como nonilo, decilo, undecilo, dodecilo; " C_{1-16} alquil" abarca igualmente C_{1-12} alquilo y los homólogos superiores que contienen 13 a 16 átomos de carbono, tales como tridecilo, tetradecilo, hexadecilo y pentadecyl; "alqueno C_{2-6} " incluye radicales de cadena lineal y ramificada de hidrocarburo que contienen un doble enlace y que tienen de 2 a 6 átomos de carbono, tal como etenilo, 2-propenilo, 3-butenilo, 2-pentenilo, 3-pentenilo, 3-metil-2-butenilo, y similares, y " C_{1-6} alkanediyl" abarca bivalentes lineales y ramificados radicales hidrocarbonados saturados de cadena que tienen de 1 a 6 átomos de carbono, tal como metileno, 1,2-etanodiilo, 1,3 propanodiilo, 1,4-butanediilo, 1,5-pentanodiilo, 1,6 hexanodiilo y sus isómeros ramificados. El término "C (= O)" se refiere a un grupo carbonilo, "S (O)" se refiere a un sulfóxido, y "S (O) 2" se refiere a una sulfona. El término "aminoácido natural" se refiere a un aminoácido natural que está unido mediante un enlace amida covalente formado por la pérdida de una molécula de agua entre el grupo carboxilo del aminoácido y el grupo amino del resto de la molécula (ejemplos de aminoácidos naturales son glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, prolina, fenilalanina, triptófano, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, e histidina).

[0072] El ácido farmacéuticamente aceptables o sales de adición de base como se ha mencionado anteriormente se entiende que comprenden la terapéuticamente activas y no tóxicas de ácido no tóxicas y formas de sal de adición de base que los compuestos de fórmulas (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII) o (IX) son capaces de formar. Los compuestos de fórmulas (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII) o (IX) que tienen propiedades básicas se pueden convertir en su farmacéuticamente aceptable sales de adición de ácido por tratamiento de la forma de base con un ácido apropiado. Los ácidos apropiados incluyen, por ejemplo, ácidos inorgánicos tales como hidrácidos halogenados, por ejemplo, ácido clorhídrico o bromhídrico; sulfúrico, nítrico, fosfórico y similares; o ácidos orgánicos, tales como ácido acético, propanoico, hidroxiacético, láctico, pirúvico, oxálico, malónico, succínico (es decir ácido butanodioico), maleico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, p-toluenosulfónico, ciclámico, salicílico, p-aminosalicílico, pamoico y los ácidos afines.

[0073] Los compuestos de fórmulas (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII) o (IX) que tienen propiedades ácidas se pueden convertir en sus sales de adición de base farmacéuticamente aceptables por tratamiento de la forma ácida con una base orgánica o inorgánica apropiada. Las formas de sales de base apropiadas comprenden, por ejemplo, las sales de amonio, las sales de metales alcalinos y alcalinotérreos, por ejemplo, de litio, sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, sales con bases orgánicas, por ejemplo, las sales de benzatrina, N - metil - D - glucamina, sales de hidrabamina, y sales con aminoácidos, por ejemplo, arginina, lisina y similares.

[0074] Sales de adición de ácido y de base comprenden también los hidratos y las formas de adición de disolvente que los compuestos de fórmulas (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII) o (IX) son capaces de formar. Ejemplos de dichas formas son, por ejemplo, hidratos, alcoholatos y similares.

[0075] Los compuestos de fórmula (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII) o (IX), como se usa aquí anteriormente, abarcan todas las formas estereoquímicamente isómeras de las fórmulas representadas estructural (todos los compuestos posibles constituidos por los mismos átomos unidos por la misma secuencia de enlaces pero que tienen diferentes estructuras tridimensionales que no son intercambiables). A menos que se mencione o indique lo contrario, la designación química de un compuesto se debe entender como que abarca la mezcla de todas las formas estereoquímicamente isómeras posibles que el compuesto pueda poseer. Dicha mezcla puede contener todos los diastereómeros y / o enantiómeros de la estructura molecular básica del compuesto. Todas las formas estereoquímicamente isómeras de los compuestos de fórmula (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII) o (IX) tanto en forma pura o en mezcla unos con otros están destinadas a ser abarcadas dentro del alcance de las fórmulas representadas.

[0076] Algunos de los compuestos de fórmulas (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII) o (IX) pueden existir también en sus formas tautómeras. Tales formas, aunque no se muestra explícitamente en la fórmula anterior, se pretende que estén incluidas dentro del alcance de la misma.

[0077] Por lo tanto, a menos que se indique lo contrario en lo sucesivo, el término "compuestos de fórmula (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII) o (IX)" se entiende que incluye también el ácido farmacéuticamente aceptable o sales de adición de base y todas las formas estereoisoméricas y tautoméricas.

[0078] Otros inhibidores de la farnesiltransferasa descritos incluyen Argabin, alcohol perrilyl, SCH 66336, 2 (S) - [2 (S) - 2 [(R)-amino-3-mercapto] propilamino-3 (S)-metil]-pentiloxi-3 -fenilpropionil-metionina sulfona (Merck); L778123, BMS 214662, Pfizer compuestos A y B descritos anteriormente. Las dosis adecuadas o cantidades terapéuticamente eficaces para el Argabin compuestos (WO98/28303), perrilyl alcohol (WO 99/45712), SCH-66336 (EE.UU. 5.874.442), L778123 (WO 00/01691), 2 (S) - [2 (S) - [2 (R)-amino-3-mercapto] propilamino-3 (S)-metil]-pentiloxi-3-fenilpropionil-metionina sulfona (WO94/10138 BMS 214662 (WO 97/30992), Pfizer compuestos A y B (WO 00/12499 y WO 00/12498) se dan en las especificaciones de patente publicadas o son conocidos o se pueden determinar fácilmente por una persona experta en la técnica.

[0079] Una variedad de inhibidores de la farnesiltransferasa se pueden preparar y formular en composiciones farmacéuticas mediante métodos descritos en la técnica, tales como las publicaciones citadas en la presente memoria. Por ejemplo, para los compuestos de fórmulas (I), y (III) los ejemplos adecuados se pueden encontrar en WO-97/21701. Los compuestos de fórmulas (IV), (V) y (VI) pueden prepararse y formularse usando métodos descritos en el documento WO 97/16443, los compuestos de fórmulas (VII) y (VIII) de acuerdo con los métodos descritos en el documento WO 98/40383 y WO 98/49157 y los compuestos de fórmula (IX) de acuerdo con los métodos descritos en el documento WO 00/39082, respectivamente. Tipifarnib (R115777) y su enantiómero menos activo puede ser sintetizado por métodos descritos en el documento WO 97/21701.

[0080] Para preparar las composiciones farmacéuticas anteriormente mencionadas, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto particular, opcionalmente en forma de sal de adición, como el ingrediente activo se combina o se mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable, vehículo, o diluyente, que puede tomar una amplia variedad de formas dependiendo en la forma de preparación deseada para la administración. Estas composiciones farmacéuticas se encuentran deseablemente en forma de dosificación unitaria adecuada, preferiblemente, para administración sistémica tal como administración oral, percutánea, o parenteral, o administración tópica, tal como mediante inhalación, un aerosol nasal, gotas oculares o mediante una crema, gel, champú o similares. Por ejemplo, en la preparación de las composiciones en forma de dosificación oral, cualquiera de los medios farmacéuticos usuales pueden ser empleados, tal como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes y similares en el caso de preparaciones líquidas orales tales como suspensiones, jarabes, elixires y soluciones; o vehículos sólidos tales como almidones, azúcares, caolín, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares en el caso de polvos, píldoras, cápsulas y tabletas.

[0081] Debido a su facilidad de administración, tabletas y cápsulas representan una forma preferida de dosificación oral unitaria, en cuyo caso farmacéuticas portadores sólidos se emplean obviamente. Para composiciones parenterales, el vehículo comprenderá usualmente agua estéril, al menos en gran parte, aunque otros ingredientes, por ejemplo, para ayudar a la solubilidad, pueden ser incluidos. Las soluciones inyectables, por ejemplo, se pueden preparar en las que el vehículo comprende solución salina, solución de glucosa o una mezcla de solución salina y solución de glucosa. Soluciones inyectables que contienen compuestos de fórmula (I) pueden formularse en un aceite para acción prolongada. Los aceites apropiados para este fin son, por ejemplo, aceite de cacahuate, aceite de sésamo, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de soja, ésteres sintéticos de glicerol de ácidos grasos de cadena larga y mezclas de estos y otros aceites.

[0082] Las suspensiones inyectables también se pueden preparar en la que las compañías de casos líquidos apropiados, agentes de suspensión y similares pueden ser empleados. En las composiciones adecuadas para

administración percutánea, el vehículo comprende opcionalmente un agente mejorador de la penetración y / o un agente humectable adecuado, opcionalmente combinado con aditivos adecuados de cualquier naturaleza en proporciones minoritarias, aditivos que no causan ningún efecto deletéreo significativo en la piel. Dichos aditivos pueden facilitar la administración a la piel y / o pueden ser útiles para preparar las composiciones deseadas. Estas composiciones se pueden administrar de diversas maneras, por ejemplo, como un parche transdérmico, como una aplicación local o como una pomada. Según sea apropiado, las composiciones para aplicación tópica pueden incluir todas las composiciones empleadas usualmente para la administración de fármacos por vía tópica, por ejemplo, cremas, geles, apósitos, champús, tinturas, pastas, ungüentos, pomadas, polvos y similares. La aplicación de dichas composiciones puede ser por aerosol, por ejemplo con un propelente tal como nitrógeno, dióxido de carbono, un freón, o sin un propelente tal como un pulverizador de bomba, gotas, lociones, o un semisólido tal como una composición espesada que puede ser aplicada por un hisopo. En particular, las composiciones semisólidas tales como pomadas, cremas, geles, ungüentos y similares se utilizan convenientemente.

[0083] Es especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente en forma de dosificación unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Unidad de dosificación o forma unitaria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de ingrediente activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Ejemplos de tales formas unitarias de dosificación son tabletas (incluyendo tabletas ranuradas o recubiertas), cápsulas, píldoras, paquetes de polvos, pastillas, soluciones o suspensiones inyectables, cucharaditas, cucharadas y similares, y múltiples segregados de las mismas.

[0084] Un compuesto farnesiltransferasa inhibir o una composición que contiene dicho compuesto se utiliza en un uso terapéutico de la invención para tratar un sujeto diagnosticado con, o que sufre de un trastorno o afección mediada a través de la inhibición de farnesiltransferasa. Tratamientos de acuerdo con la invención comprenden administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un IVR o de composición que contiene un FTI para tratar el trastorno o afección. El término "tratar" o "tratamiento" como se usa aquí, pretende referirse a la administración de un compuesto o composición a un sujeto en necesidad de tratamiento con el fin de efectuar un beneficio terapéutico o profiláctico deseado a través de la inhibición de la actividad de farnesiltransferasa. El tratamiento incluye invertir, mejorar, aliviar, inhibir el progreso de, reducir la gravedad de, o prevenir un trastorno o afección, o uno o más síntomas de tal trastorno o afección. El término "sujeto" se refiere a un paciente mamífero, tal como un humano.

[0085] En un método de tratamiento, una cantidad eficaz de un compuesto o composición TFI se administra a un paciente que sufre de o diagnosticados con el trastorno o condición especificada. Una "cantidad eficaz" significa una cantidad o dosis generalmente suficiente para producir el beneficio terapéutico o profiláctico deseado en sujetos sometidos a tratamiento.

[0086] Las cantidades efectivas o dosis de los agentes de la presente invención puede determinarse por métodos rutinarios tales como modelado, estudios de aumento de dosis o pruebas clínicas, y tomando en consideración factores rutinarios, por ejemplo, el modo o vía de administración o la administración de fármacos, la farmacocinética del agente, la gravedad y el curso del trastorno o afección, la terapia previa o en curso del sujeto, el estado de salud del sujeto y la respuesta a los fármacos, y el juicio del médico tratante. Una dosis ejemplar se encuentra en el intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 200 mg por kg de peso corporal del sujeto por día, preferiblemente aproximadamente 0,05 a 100 mg / kg / día, o aproximadamente 1 a 35 mg / kg / día, en única o dividida unidades de dosificación (por ejemplo, BID, TID, QID). Para un humano de 70 kg, una cantidad de dosificación ilustrativa es de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 7 g / día, o aproximadamente 0,2 a aproximadamente 2,5 g / día.

[0087] Para comprender mejor e ilustrar la invención y sus realizaciones ejemplares y ventajas, se hace referencia a la siguiente sección experimental.

EXPERIMENTALES

[0088] En los estudios de los efectos siguientes, in vitro e in vivo, de una estatina (simvastatina) se comparan con los de la IVR, tipifarnib (R115777, Zarnestra™), un inhibidor potente, oralmente activo. Los resultados confirman que algunos, pero no todos, de los efectos anti-inflamatorios de las estatinas son mediados a través de la inhibición de la farnesilación de proteínas. Tipifarnib mostró claramente la inhibición global de la inflamación inducida por LPS in vitro e in vivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

[0089] Reactivos químicos se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Simvastatina (forma activa) se adquirieron de Calbiochem (La Jolla, CA). Tipifarnib (R115777) y su enantiómero menos activo se obtuvieron de Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development, LLC. Humanos células THP-1 se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). RPMI-1640 medio de cultivo celular y penicilina estreptomycin se

obtuvieron de Sigma-Aldrich, y suero bovino fetal (FBS) de Gibco / Invitrogen (Carlsbad, CA). LPS fue de Sigma-Aldrich.

Cultivo celular

[0090] THP-1 células fueron cultivadas en medio RPMI 1640, suplementado con 10% FBS/100 unidades / ml de estreptomicina Penicillin/10 mg / ml a 37 ° C, bajo 5% de CO₂. Los componentes en el medio fueron todos probados para la contaminación por endotoxinas y demostrado que contienen menos de 0,3 unidades de endotoxina / ml. Para el aislamiento de ARN, THP-1 células fueron cosechadas y lavadas dos veces con PBS, después se resuspendieron en 4.5x10⁵/ml en 20 ml de RPMI 1640 que contenía 0,5% de FBS / 100ng/ml LPS y simvastation (10µM), o tipifarnib (5µM). Para el grupo de control no tratado (sin LPS, sin compuesto) y LPS solo grupo, volúmenes equivalentes de DMSO se añadieron al medio. Las células se cultivaron a 37°C y los sedimentos se recogieron en 0hr, 1 hora, 3 horas, 6 horas, 12 horas y 24 horas. Los sedimentos celulares se almacenaron a -80°C si el aislamiento de ARN no se llevó a cabo inmediatamente. Para los experimentos para estudiar la secreción de citoquinas en sobrenadantes de cultivo, células THP-1 se lavaron dos veces con PBS, se resuspendieron en 3,4 x 10⁵/ml y se cultivaron en placas de 96 pocillos a 250 ml por pocillo a 37°C. Las células se cultivaron en medio que contiene 0,5% de FBS / RPMI 1640, en la ausencia o presencia de LPS 100ng/ml y simvastatina (5µM y 10 µM), o tipifarnib (2µM y 5 µM). Los sobrenadantes se recogieron en diferentes puntos de tiempo, como se indica en las figuras y se mantuvieron a <-20°C hasta el análisis de la producción de citoquinas.

Aislamiento de ARN

[0091] ARN total fue aislado utilizando RNeasy mini kit de Qiagen (Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante. Las muestras de ARN se almacenaron a -80 ° C.

Microarray experimentos y análisis de datos

[0092] Cinco µg de RNA total se amplificó linealmente a ADNc de doble cadena utilizando T7 basada en la amplificación. El cDNA fue purificado utilizando el QIAquick 96 kit de purificación de PCR (QIAGEN Valencia, CA), y se utiliza para generar amplificado (a) ARN utilizando AmpliScribe T7 Kit [™] High Yield Transcripción (Epicentre, Madison, WI). Diez mg de ARNa purificada se transcribió de forma inversa a cDNA utilizando el SuperScript RTII kit (Invitrogen) y marcado por incorporación directa de Cy3-dCTP. La sonda de cDNA generada se utiliza para hibridar con microarrays de ADNc.

[0093] Los microarrays de cDNA humanos eran hechos a medida como se ha descrito anteriormente (Peterson KS 2004), y contenía aproximadamente 8.000 genes humanos y tecnologías ecológicamente racionales. Cada clon fue descubierto por duplicado en la matriz. Preparación de ARN, síntesis de la sonda de cDNA y la hibridación se realizaron como se describe por Shaw et al. (Shaw KJ 2003).

[0094] La normalización de datos y la preparación se realizó como se ha descrito previamente (Peterson KS 2004).

[0095] Los genes fueron seleccionados como LPS-regulado si las proporciones entre LPS tratados y no tratados con muestras fueron mayores que 1,5-veces en más de dos puntos de tiempo. Genes que son regulados además por la estatina o FTI se seleccionaron si su expresión era de al menos 40% inferior, en uno o más puntos de tiempo, para el tratamiento por LPS y una estatina, o LPS y FTI, frente a LPS solo. Después de eliminar la redundancia, hubo 22 genes seleccionados como LPS-inducida por los genes que fueron inhibidas por el tratamiento con estatinas o IVR.

Transcriptasa reversa y PCR en tiempo real cuantitativa

[0096] De dos a tres microgramos de DNasa tratados ARN total fueron transcritas inversa a ADNc usando el Transcriptor First Strand cDNA Kit de Síntesis (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN) según las instrucciones.

[0097] PCR en tiempo real se llevó a cabo con el LightCycler FastStart DNA MasterPlus kit SYBR Green I (Roche Diag [™] nóstico) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El volumen final de 20 µl contiene: 4 µM MgCl₂, 0,5 µM de cada cebador, mezcla de 2 µl Maestro y 2 µl de cDNA.

[0098] El perfil de PCR fue como sigue: (i) desnaturalización a 90°C durante 10 min. (ii) 45 ciclos de 0 s a 95°C, 5 s a 54-58°C (dependiendo de la T_m de los cebadores), 6-16s (determinado por la longitud del amplicón) a 72°C. (iii) las curvas de fusión de 0 s a 95°C, 15s a 65°C y 0 s a 95°C. (iv) el enfriamiento a 40°C durante 30s. Las tasas de transición fueron: 20°C / s para todas las etapas excepto 0,1°C / s para 95°C segmento 3 de las curvas de fusión.

[0099] Para el análisis de datos, el ajuste de línea de base se llevó a cabo en el "aritmética" el modo, y el análisis de la curva de fluorescencia se llevó a cabo en el "segundo máximo de la derivada" modo de la LightCycler [™] software (Versión 3,5).

[0100] Los cebadores utilizados para la PCR en tiempo real fueron como sigue (5 'a 3'):

IL-1 β sentido, GGATAACGAGGCTTATGTGCACG (SEQ ID NO: 1);
 antisentido, GGACATGGAGAACACCACTTGTTG (SEQ ID NO: 2).
 MCP-1 sentido, AGCCAGATGCAATCAATGCCC (SEQ ID NO: 3);
 antisentido, CCTTGGCCACAATGG'FCTTGAA (SEQ ID NO: 4).
 MMP-9 sentido, ACCGCTATGGTTACACTCGG (SEQ ID NO: 5);
 antisentido, AGGGACCACAACCTCGTCATC (SEQ ID NO: 6).
 IL-8 sentido, CTGATTCTGTCAGCTCTGTGTGAA (SEQ ID NO: 7);
 antisentido, TGGCATCTTCACTGATTCTTGGA (SEQ ID NO: 8).
 STAT1 sentido, TTCAGAGCTCGTTTGTGGTG (SEQ ID NO: 9);
 antisentido, AGAGGTCTGCTCGAGGTCAA (SEQ ID NO: 10).
 MyD88 sentido, TGGACCCAGCATTGAGGAGGATT (SEQ ID NO: 11);
 antisentido, AAAGTGGATGTCGCTGGGGCAA (SEQ ID NO: 12).
 IL6 sentido, TGGATTCAATGAGGAGACTTGC (SEQ ID NO: 13);
 antisentido, CAGGAAGTGGATCAGGACTT (SEQ ID NO: 14).

En experimentos in vivo

[0101] Los experimentos se realizaron en ratones BALB / c hembra (6-7 semanas de edad, Charles River Laboratories, Inc. MA). Simvastatina y tipifarnib se disolvieron en 20% ciclodextrano a una concentración de 10 mg / ml y administrado por vía oral a ratones a una dosis de 50mg/kg a las 24 horas, 17 horas y 1 hora antes de la inyección de LPS. Los ratones de control recibieron el vehículo (20% ciclodextrano) solamente. 20 μ g de LPS (Sigma), diluido en PBS, se inyectó intraperitonealmente en cada ratón. Las muestras de sangre se recogieron ya sea por sangrado ocular o punción cardiaca a 1 y 2 horas después de la inyección de LPS en un experimento, y a las 2 y 3 horas después de la inyección de LPS en un segundo experimento. Las muestras de plasma se recogieron por centrifugación, y se almacenaron a <-20°C antes de ser ensayadas para citoquinas utilizando kits ELISA individuo o análisis Luminex (ver más abajo).

Cytokine ensayo por ELISA

[0102] Humano-6 IL, IL8, IL1 β , MCP-1, MMP-9, y el ratón IL-6, IL 8, TNF- α , MCP-1 e IL-1 β se midió con kits de ELISA (R & D Systems) según las instrucciones del fabricante .

Cytokine ensayo por Luminex

[0103] Las muestras se analizaron para las citoquinas utilizando el kit de citoquinas Bio-Plex ensayo (Bio-Rad Laboratories, Inc.) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, 50 μ l de citoquinas anti-anticuerpos conjugados perlas se añadieron a pocillos de una placa de filtro pre-equilibrada con tampón de ensayo. Las perlas se lavaron, a continuación, 50 μ l de sobrenadante de cultivo celular sin diluir o 4 pliegue muestras de plasma diluido se añadieron y se incubaron durante 2 horas. Biotina anti-citoquina con un anticuerpo (25 μ l) se añadió a cada pocillo y la placa se incubó con agitación durante 1,5 horas. Estreptavidina-PE (50 μ l) se añadió a cada pocillo y la placa se incubó con agitación durante 45 min. entre una incubación, los pocillos se lavaron 3 veces con 100 μ l de tampón de lavado y analitos no unidos se filtraron usando un colector de vacío. Tras el último lavado, 125 μ l de tampón de ensayo se añadió a cada pocillo y la placa se colocó en un agitador durante 10 min. La placa se leyó en un instrumento Luminex¹⁰⁰ (Luminex Corporation, Austin, TX) según las instrucciones del fabricante. La concentración de citocinas se determinó a partir de una curva patrón ensayada al mismo tiempo.

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

[0104] La sangre heparinizada humana (25 ml) de un donante sano se sobrepuso en unos tubos de 50 ml cónicos que contienen 20 ml de Ficoll-Paque y se centrifugó durante 20 min a 2000 rpm a temperatura ambiente y después se dejó detener sin usar el freno de la centrifuga. La capa superior se aspiró, dejando la capa de células mononucleares sin perturbaciones en la interfaz. Las células se trasladan a la atención de un nuevo tubo de 250 ml cónico. El tubo cónico se llenó con PBS, se mezcló y se centrifugó a 1500 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue cuidadosamente y completamente eliminado. El sedimento celular se resuspendió en 50 ml de PBS y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Esta etapa de lavado se repitió una vez más. Las células se contaron y se resuspendieron las células en 1.7×10^6 /ml en baja endotoxina RPMI 1640/10% de FBS.

LPS / Tipifarnib tratamiento de PBMC humanas

[0105] Humana PBMC (180 ml en 1.7×10^6 /ml) se pipetearon en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. 10 μ l de tipifarnib (R115777) o su enantiómero menos activo (100-veces menos activo para la inhibición de farnesil) se añadieron a hacer final de concentraciones de 5 mM y 2 mM. Las células se incubaron a 37 ° C, bajo 5% de CO₂ durante 1 hora, luego 10 ml de LPS (diluido en medio) se añadieron por pocillo para llegar a una concentración final

de 10ng/ml. Las células se cultivaron a 37 ° C, bajo 5% de CO₂. Se recogieron los sobrenadantes a las 16 horas, 24 horas y 40 horas de tratamiento con LPS e IL-6 secreción cuantificó.

NF-κB ensayos de gen reportero

[0106] Las células HEK293 se transfectaron con el plásmido de NF-B-LH (Biomyx) usando Lipofectamine 2000, y los clones estables se seleccionaron por cultivo en higromicina (176 µg / ml). Los resultantes NF-KB-LH-transfectadas las células fueron sembradas en DMEM/10% de FCS en placas de 96 pocillos para su uso en ensayos de reportero de luciferasa. Al día siguiente, las células fueron tratadas con tipifarnib durante 18 horas, luego se estimularon con TNF-α (10ng/ml) durante 4 horas, después de lo cual la actividad de NF-κB se midió usando el sistema del Steady-Glo® luciferase ensayo (Promega). NF-KB activación se calculó como el pliegue de inducción por TNF-a muestras de control sobre no estimuladas.

SDS-PAGE y Western blot

[0107] Células THP-1 en 0,5% de FBS / RPMI fueron pre-tratados con o sin tipifarnib durante 18 horas, y posteriormente se estimularon con LPS (100ng/ml), TNF-α (10ng /ml) o IL-1α-(5 ng/ml) durante 30 minutos. Las células se recogieron, se lavaron tres veces en PBS enfriado en hielo, y se lisaron en tampón de lisis (20 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, EGTA mM, 1% Triton X-100, 2,5 mM pirofosfato sódico, 1 mM de β-glicerofosfato, 1 µM de Na₃VO₄, 1 mg / ml de leupeptina, 1 mM PMSF). Los lisados celulares de cada muestra se mezcla con una cantidad igual de tampón 2x muestra SDS-PAGE (Invitrogen), y las proteínas se separaron por electroforesis en geles de Tris-glicina de gradiente 10-20% (Novex), y se transfirieron a membranas de celulosa nitró (Protran; Schleicher & Schuell). Las membranas se bloquearon con 3% de BSA en PBS-0.05% Tween-20, y secuencialmente se incubaron con anticuerpos primarios y HRP-conjugado con anticuerpos secundarios (anti IgG de conejo o anti-ratón IgG e IgM; PIERCE), seguido por la detección ECL (Amersham Biosciences). Los anticuerpos primarios utilizados fueron conejo policlonal anti-KBA, κ-β38 (Santa Cruz), anticuerpo monoclonal de ratón anti-H-Ras (Chemicon), monoclonal de ratón anti-fosfo-p38 y policlonal de conejo anti-fosfo-Erk (Tecnología de Señalización Celular).

Resultados Efecto de la simvastatina y tipifarnib de la transcripción génica inducida por LPS.

[0108] El análisis inicial de los efectos globales para simvastatina y tipifarnib en la transcripción de genes inflamatorios eran realizados por cDNA microarray análisis de muestras de ARN a partir de células THP-1, tratadas con LPS, en la presencia o ausencia de simvastatina o tipifarnib, respectivamente. De los 121 genes que muestran al menos 1,5 veces la inducción por LPS a 2 puntos de tiempo, 37 mostraron al menos 1,5 veces la disminución en la inducción por uno o ambos fármacos, en uno o más puntos de tiempo (véanse las Tablas 1a, 1b, 1e y 1d a continuación). Con estos criterios, la simvastatina mostró regulación a la baja de 15, y de 34 tipifarnib, LPS-inducida transcripciones. Incluido en los genes regulados por los fármacos fueron quimiocinas (MCP-1 y -2), citoquinas (IL-1β), genes de interferón vía, (STAT-1, interferón β1), receptores (receptor de uroquinasa) y proteasas (MMP-9).

Cuadro 1.a

Numero de acceso	Nombre Gen	Descripción de gen
NM_002982	CCL2	monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1)
NM_005623	CCL8	monocyte chemotactic protein 2 (MCP-2)
NM_002983	CCL3	small inducible cytokine A3 (homologous to mouse Mip-1a) (SCYA3)
NM_002984	CCL4	small inducible cytokine A4 (homologous to mouse
		Mip-1b) (SCYA4)
NM_005409	CXCL11	small inducible cytokine subfamily B, member 11 (SCYB11)
NM_000584	IL8	interleukin 8
NM_000576	IL1B	interleukin 1, beta
NM_+000577	IL1RN	interleukin-1 receptor antagonist
NM_002852	PTX3	pentaxin-related gene, rapidly induced by IL-1B
NM_007315	STAT1	signal transducer and activator of transcription 1
NM_002176	IFNB1	interferon, beta 1, fibroblast
NM_005531	IF116	interferon, gamma-inducible protein 16

NM_001548	IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
NM_002462	MX1	myxovirus (influenza) resistance 1
NM_000598	IGFBP3	insulin-like growth factor-binding protein-3 gene
NM_053056	CCND1	cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1)
NM_002965	S100A9	S100 calcium-binding protein A9 (calgranulin B)
NM_003897	IER3	immediate early response 3
MM_002468	MYD88	myleoid differentiation primary response protein
NM_002502	NFKB2	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2
NM_000593	TAP1	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
NM_000544	TAP2	transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
NM_007188	ABCB8	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 8
NM_031460	KCNK17	potassium channel, subfamily K, member 17 (TASK-4)
NM_002659	PLAUR	plasminogen activator, urokinase receptor
NM_004054	C3AR1	C3a anaphylatoxin chemotactic receptor (C3a-R)
NM_004048	B2M	beta-2-microglobulin
NM_015907	LAP3	leucine aminopeptidase
NM_004994	MMP9	type IV collagenase, matrix metalloproteinase 9
NM_000362	TIMP3	tissue inhibitor of metalloproteinase 3
NM_006074	TRIM22	tripartite motif-containing 22
NM_004223	UBE2L6	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6
NM_144573	NEXN	nexilin (F actin binding protein)
NM_021634	LGR7	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 7
NM_198066	GNPNAT1	glucosamine-phosphate N-acetyltransferase 1
NM_002346	LY6E	lymphocyte antigen 6 complex, locus E

Tabla 1.b

Número de acceso	Nombre gen	Factor de cambio (LPS vs control)				
		1hr	3hr	6hr	2hr	24hr
NM_002982	CCL2	1.00	1.41	9.8	9.85	21.11
NM_005623	CCL8	1.00	1.00	3.48	2.30	3.7
NM_002983	CCL3	1.32	4.92	6.06	4.29	7.46
NM_002984	CCL4	1.32	5.28	8.00	5.66	6.96
NM_005409	CXCL11	1.00	1.15	7.46	3.03	2.30
NM_000584	IL8	1.41	8.00	6.06	22.63	22.63
NM_000576	IL1B	1.41	5.66	8.00	6.96	8.00
NM_000577	IL1RN	1.07	1.00	3.25	1.87	4.29
NM_002852	PTX3	-1.07	2.00	4.00	3.03	3.48
NM_007315	STAT1	-1.23	1.15	4.29	3.73	4.29
NM_002176	IFNB1	1.07	1.23	3.25	6.06	1.87

NM_005531	IF116	-1.07	1.00	1.74	2.00	2.83
NM_001548	IFIT1	1.00	1.07	2.83	2.83	3.03
NM_002462	MX1	1.00	1.07	4.92	3.03	3.25
NM_000598	IGFBP3	1.00	1.15	1.62	4.00	7.46
NM_053056	CCND1	1.00	1.07	1.23	1.74	2.00
NM_002965	S100A9	-1.07	-1.07	1.00	1.52	1.74
NM_003897	IER3	1.23	1.41	1.87	2.00	2.14
NM_002468	MYD88	1.00	1.07	3.25	1.74	1.74
NM_002502	NFKB2	1.07	1.41	2.83	2.46	1.52
NM_000593	TAP1	1.23	1.32	4.92	2.14	1.74
NM_000544	TAP2	1.07	1.07	2.00	1.87	1.41
NM_007188	ABCB8	1.00	1.00	2.30	1.52	1.52
NM_031460	KCNK17	1.07	1.23	3.03	1.52	2.00
NM_002659	PLAUR	-1.07	1.15	1.62	1.87	3.25
NM_004054	C3AR1	-1.07	1.15	2.00	2.30	3.48
NM_004048	B2M	-1.07	1.07	1.62	1.52	2.14
NM_015907	LAP3	-1.07	1.00	2.46	2.30	4.00
NM_004994	MMP9	-1.07	-1.07	1.52	3.48	13.93
NM_000362	TIMP3	NA	NA	2.46	-1.41	-2.00
NM_006074	TRIM22	1.00	1.00	2.83	3.03	2.83
NM_004223	UBE2L6	1.00	-1.07	5.28	5.28	4.59
NM_144573	NEXN	1.00	1.00	2.00	1.52	1.52
NM_021634	LGR7	1.07	-1.07	1.62	1.52	1.87
NM_198066	GNPNAT1	1.00	1.00	3.25	2.14	1.74
NM_002346	LY6E	1.15	1.00	3.03	3.73	5.28

Tabla 1.c

Número de acceso	Nombre Gen	Factor de cambio (simvastatin/LPS vs LPS)				
		1hr	3hr	6hr	12hr	24hr
NM_002982	CCL2	1.00	-1.23	-1.62	-2.14	NA
NM_005623	CCL8	-1.07	-1.07	-1.32	-1.52	-1.23
NM_002983	CCL3	1.15	1.00	-1.62	-1.15	1.41
NM_002984	CCL4	-1.07	1.74	-1.32	-1.15	1.41
NM_005409	CXCL11	1.00	1.00	-1.15	1.32	-1.32
NM_000584	IL8	-1.15	-1.23	-1.07	-1.74	1.23
NM_000576	IL1B	1.00	-1.15	-1.62	-2.14	-2.00
NM_000577	IL1RN	-1.15	-1.07	-1.15	-1.07	-1.62
NM_002852	PTX3	-1.07	-1.07	-1.07	-1.23	1.23
NM_007315	STAT1	1.07	1.07	-1.32	1.07	-1.52
NM_002176	IFNB1	-1.15	-1.15	1.23	-1.87	-1.23

ES 2 522 830 T3

NM_005531	IFI16	1.00	1.00	1.00	-1.07	-1.32
NM_001548	IFIT1	1.00	1.00	1.00	-1.07	-1.15
NM_002462	MX1	1.00	1.07	-1.15	1.23	-1.41
NM_000598	IGFBP3	1.00	1.07	1.00	1.15	1.07
NM_053056	CCND1	-1.07	1.00	-1.07	-1.62	-1.52
NM_002965	S100A9	-1.07	-1.07	-1.07	-1.32	1.41
NM_003897	IER3	1.00	1.00	-1.23	-1.62	1.23
NM_002468	MYD88	1.07	1.07	-1.07	1.00	1.00
NM_002502	NFKB2	-1.07	1.00	-1.74	-1.07	1.41
NM_000593	TAP1	-1.07	1.15	-1.41	1.00	1.15
NM_000544	TAP2	1.00	1.00	-1.23	1.00	-1.15
NM_007188	ABCB8	1.00	1.07	1.00	1.00	-1.07
NM_031460	KCNK17	1.00	1.00	1.07	1.00	-1.32
NM_002659	PLAUR	1.00	-1.15	-1.23	-1.87	-1.41
NM_004054	C3AR1	-1.15	1.00	1.00	-1.32	1.32
NM_004048	B2M	1.07	1.00	1.07	-1.07	1.00
NM_015907	LAP3	1.00	1.00	1.15	1.07	-1.52
NM_004994	MMP9	1.00	1.00	-1.15	-1.32	-2.14
NM_000362	TIMP3	NA	NA	-2.64	-1.07	-1.07
NM_006074	TRIM22	1.00	1.07	1.07	1.07	-1.15
NM_004223	UBE2L6	-1.07	1.00	1.00	1.15	-1.62
NM_144573	NEXN	-1.07	1.07	-1.07	1.15	-1.32
NM_021634	LGR7	1.07	1.15	-1.07	-1.41	-1.32
NM_198066	GNPNAT1	1.00	1.00	-1.07	1.15	-1.23
NM_002346	LY6E	1.15	1.00	-1.07	1.52	-1.15

Tabla 1.d

Número de acceso	Nombre Gen	Factor de cambio (tipifarnib/LPS vs LPS)				
		1hr	3hr	6hr	12hr	24hr
NM_002982	CCL2	-1.07	-1.32	-2.83	-3.25	-4.29
NM_005623	CCL8	-1.07	1.00	-2.30	-2.30	-3.48
NM_002983	CCL3	-1.07	1.00	-1.07	1.23	-1.52
NM_002984	CCL4	1.07	1.87	1.07	-1.52	-1.52
NM_005409	CXCL11	1.00	-1.07	-2.83	-1.52	-2.00
NM_000584	IL8	-1.07	-1.23	-1.15	1.32	-1.07
NM_000576	IL1B	1.07	1.32	-1.87	-2.46	-1.23
NM_000577	IL1RN	-1.15	-1.15	-1.62	-1.15	-3.73
NM_002852	PTX3	1.15	-1.15	-1.32	-1.32	-2.00
NM_007315	STAT1	1.23	-1.32	-2.14	1.00	-1.62
NM_002176	IFNB1	-1.23	-1.15	-1.62	-3.03	2.14

NM_005531	IFI16	1.07	1.00	-1.32	-1.23	-1.74
NM_001548	IFIT1	1.00	1.00	-1.41	-1.32	-2.1
NM_002462	MX1	1.00	-1.07	-1.74	1.32	-1.32
NM_000598	IGFBP3	1.00	-1.07	1.00	-1.52	-2.00
NM_053056	CCND1	1.00	-1.07	-1.15	-1.62	-1.23
NM_002965	S100A9	1.00	-1.15	-1.07	-2.00	-1.62
NM_003897	IER3	1.32	1.52	1.15	1.00	1.23
NM_002468	MYD88	1.07	-1.15	-2.14	-1.23	-1.32
NM_002502	NFKB2	-1.07	1.23	-1.07	-1.32	1.52
NM_000593	TAP1	-1.23	1.15	-1.74	-1.15	-1.23
NM_000544	TAP2	1.07	-1.15	-1.62	-1.32	-1.23
NM_007188	ABCB8	1.07	1.00	-1.62	-1.23	-1.23
NM_031460	KCNK17	-1.07	-1.15	-1.32	1.00	-1.74
NM_002659	PLAUR	1.00	-1.23	-1.62	-1.87	-1.62
NM_004054	C3AR1	1.00	1.07	-1.23	-1.6	-1.74
NM_004048	B2M	1.15	1.00	-1.23	-1.62	1.15
NM_015907	LAP3	-1.07	-1.07	-1.62	-1.23	-2.83
NM_004994	MMP9	-1.07	-1.07	-1.41	-1.74	-1.41
NM_000362	TIMP3	NA	-1.41	-1.23	-1.15	1.15
NM_006074	TRIM22	1.00	1.00	-1.62	-1.07	-1.52
NM_004223	UBE2L6	1.00	-1.07	-1.41	-1.15	-1.41
NM_144573	NEXN	1.00	1.00	-1.41	-1.15	-1.62
NM_021634	LGR7	1.23	-1.15	-1.41	-1.62	-1.52
NM_198066	GNPNAT1	1.00	1.00	-2.00	-1.41	-1.74
NM_002346	LY6E	1.52	-1.15	-1.52	1.15	-1.32

[0109] Las Tablas 1a, 1b, 1c y 1d muestran los genes inducida por LPS que fueron inhibidos por la simvastatina o tipifarnib. Los genes fueron seleccionados (véase Tabla 1A para la descripción de genes) como LPS inducido si la relación entre LPS tratados y no tratados con muestras fue mayor que 1,5-veces en más de dos puntos de tiempo. Estos se muestran como números en negrita cursiva en el "factor de cambio (LPS versus control)" de la columna (Tabla 1.b). La expresión génica durante el tratamiento con LPS y la estatina (simvastatina / LPS) (Tabla 1.c), o LPS y la IVR (tipifarnib / LPS) (Tabla 1.d), se comparó con el LPS solo en puntos de tiempo correspondientes. Genes que mostraron al menos 1,5 veces la disminución en la inducción por uno o ambos fármacos, en uno o más puntos de tiempo fueron seleccionados para su inclusión en la tabla. Los genes para el que se inhibe la inducción LPS de acuerdo con estos criterios se muestran como números negativos, negrita y cursiva.

[0110] Los resultados del análisis de microarrays se confirmó por los genes seleccionados por análisis en tiempo real PCR (Figura 2). La transcripción de IL-1 p fue inducida por LPS tan pronto como 3 horas, y la inducción no se vio afectada por la simvastatina o tipifarnib hasta este punto de tiempo. Sin embargo, después de 6 horas, y en mayor medida, después de 12 horas de la inducción inducida por LPS significativamente downregulated de simvastatina y tipifarnib (Figura 2.a). MCP-1 fue inducida por LPS a partir de 6 horas, y esta inducción fue inhibida significativamente por la simvastatina y tipifarnib (Figura 2.b). MMP-9 inducción por LPS aumentó hasta 12 horas, en cuyo tiempo del punto de una disminución del 50% en la inducción se observó para la simvastatina y la no inducción en presencia de tipifarnib (figura 2.c). La inducción de IL-8 por LPS fue evidente tan pronto como 3 horas y no fue afectada por los fármacos en este punto de tiempo. A las 6 y 12 horas, la inducción de IL-8 fue inhibida por la simvastatina, mientras que la FTI no mostró ningún efecto significativo (figura 2.d). STAT1 inducción fue inhibida por tipifarnib a las 6 y 12 horas, mientras que la inhibición por la estatina sólo se observó a las 12 horas (figura 2.e). Factor de diferenciación mieloide, MyD88, el adaptador de tipo Toll respuestas mediadas por el receptor, se upregulated significativamente por LPS a 6 y 12 horas, y esto fue ligeramente inhibida por la simvastatina en 12 horas (Figura 2.f). En contraste, tipifarnib mostraron una inhibición casi completa de MyD88 inducción, a niveles

similares a la de las células no impugnados. Mientras que la IL-6 transcripción no cumplía con los criterios del análisis de microarrays para su inclusión en la Tabla 1, el análisis cuantitativo por PCR en tiempo real mostró inhibición por la simvastatina, y tipifarnib en particular, del pico de LPS inducido por IL-6 de transcripción en 6 horas (Figura 2g). A las 12 horas, sólo tipifarnib mostró inhibición.

[0111] Así, tanto la simvastatina y tipifarnib fueron capaces de inhibir la inducción de LPS de numerosos genes inflamatorios y tipifarnib mostraron una inhibición más fuerte en la mayoría de los casos. Tipifarnib también mostró regulación a la baja de algunas transcripciones no afectados por la estatina.

Efecto de la simvastatina y tipifarnib en la producción de citoquinas inducida por LPS

[0112] Para investigar más los efectos de la simvastatina y tipifarnib a nivel de proteínas, citoquinas y la secreción de MMP-9 por células THP-1 en respuesta a LPS se examinó en diferentes puntos de tiempo durante 48 horas, en presencia o ausencia de la simvastatina (5 y 10 μ M) o tipifarnib (2 y 5 μ M), respectivamente.

[0113] La secreción de MCP-1 (figura 3.a) era dependiente de la dosis inhibida por simvastatina a 22 y 30 h después de la adición de LPS, pero el efecto inhibitor se perdió a las 48 horas. Tipifarnib mostró una inhibición dosis dependiente de la secreción de MCP-1 hasta 48 horas. Incluso a 2 μ M, la extensión de la inhibición por tipifarnib era mucho mayor que la observada para la simvastatina 10 μ M. Ambos fármacos mostraron inhibición de la secreción de IL-6 (Figura 3b), la extensión de la cual fue de nuevo mayor en presencia de tipifarnib. Inhibición por la simvastatina 5 μ M sólo se observó a 30 horas, y a 10 μ M, se observó a los 30 y 48 horas. El grado de inhibición de la liberación de IL-6 fue similar para los 2 y 5 μ M tipifarnib y la inhibición se observó en todos los puntos temporales.

[0114] Una IC_{50} de aproximadamente 1 mM se obtuvo para la inhibición tipifarnib de LPS inducido por la secreción de IL-6 en un experimento separado (Figura 4). El IC_{50} de aproximadamente 1 μ M se obtuvo para la inhibición de LPS inducido por IL-6 liberación por tipifarnib de la siguiente manera: THP-1 células fueron cultivadas en medio RPMI-1640, que contiene 10% de FBS, 100 unidades / ml de penicilina, 10 mg / ml de estreptomycin, a 37 ° C, bajo 5% de CO_2 . Los componentes del medio fueron certificados para contener menos de 0,3 unidades de endotoxina / ml. Células THP-1 a $3,4 \times 10^5$ /ml se cultivaron en placas de 96 pocillos en 0,5% de FBS / RPMI 1640, en la ausencia o presencia de LPS 100ng/ml más o menos tipifarnib (a partir de 5 μ M, seguido de 3-pliegue series dilución). Las concentraciones de concen-tipifarnib fueron: 5 μ M, 1.67 μ M, 0.56 μ M, 0,19 μ M y 0,06 μ M. Se recogieron los sobrenadantes a las 48 h. IL6 fue probada usando un kit ELISA de R & D Systems. Los resultados se muestran en la Figura 4.

[0115] Tanto la simvastatina como tipifarnib mostraron una inhibición significativa de LPS inducido por IL-1 β transcripción (Figura 2.a). Sin embargo, los resultados sobre la secreción de IL-1 β eran más complejos (Figura 3c). Mientras tipifarnib mostró una inhibición dosis dependiente de la secreción de IL-1 β , simvastatina a 5 μ M tuvo poco efecto, y en 10 μ M mostró una estimulación de la secreción de IL-1 β a 22 y 30 horas. Simvastatina inhibieron la inducida por LPS de IL-8 a 22, 30 y 48 horas, mostrando dependencia de la dosis a las 48 h (Figura 3.d). En contraste, tipifarnib, no mostró una inhibición significativa de la producción de IL-8, a excepción de 5 μ M a 22 horas. Estos resultados son consistentes con la falta de efecto de tipifarnib en la transcripción de IL-8 (figura 2.d). Tanto la simvastatina y tipifarnib dosis-dependiente inhibe LPS inducido por la secreción de MMP-9 en 30 y 48 horas (Figura 3e).

[0116] Inducida por LPS de TNF- α por células THP-1 alcanzó su punto máximo entre 5 y 10 horas, y luego mostró una inducción secundaria después de 22 h hasta 48 horas. El pico inicial de inducción parece no estar afectada por la presencia de cualquiera de inhibidor, pero la segunda fase de inducción mostró una inhibición dosis dependiente por la simvastatina, y, más significativamente, por tipifarnib (Figura 3f). A 5 mM, tipifarnib inhibe totalmente la segunda fase de LPS inducido por TNF- α , mientras tipifarnib 2 μ M mostró un grado similar de inhibición a 10 μ M simvastatina.

Efecto de tipifarnib y su enantiómero menos activo en inducida por LPS de IL-6 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

[0117] Este experimento se realizó para probar el efecto de tipifarnib en inducida por LPS de IL-6 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) como un ejemplo de cómo la respuesta al tratamiento con tipifarnib podría ser monitoreado en PBMC aisladas de pacientes tratados con tipifarnib. El enantiómero de tipifarnib es aproximadamente 100-veces menos activo que tipifarnib (R 115 777) para la inhibición de farnesil transferasa (Venet M., "R115777 como inhibidor de la farnesil proteína transferasa: Síntesis y SAR" Meeting ACS 2001, 222a: Chicago (Abs MEDI 5)). IL-6 no pudo ser detectado después de la incubación de PBMC humana por hasta 40 horas. La incubación de PBMC humana con LPS fuertemente inducida de IL-6 después de 16 horas y la producción continuó aumentando hasta 40 horas. No hay diferencia en la producción se observó cuando el enantiómero menos activo se añade a la incubación a 2 o 5 μ M. La presencia de tipifarnib a 2 μ M durante la estimulación con LPS no tuvo efecto en IL-6, pero a 5 μ M, la inhibición altamente significativa de la producción de IL-6 se observó después de 16 y 40 horas ($P < 0,01$). A las 24 horas, el valor medio en la presencia de 5 μ M tipifarnib fue aproximadamente 40% menor que en su ausencia, pero los datos no alcanzaron significación estadística ($P = 0,104$). Así, tipifarnib mostró

dependiente de la dosis de inhibidor de LPS inducido por la IL-6 en los PBMC humanos. La concentración requerida para la inhibición en PBMC fue mayor que la requerida para la inhibición en células THP-1 y esta diferencia puede estar relacionada con las diferentes concentraciones de suero bovino fetal en estos dos experimentos (10% y 0,5% de FBS, respectivamente) porque es tipifarnib sabe que es altamente unido a proteínas.

Efecto de la simvastatina y tipifarnib en la producción de citoquinas inducida por LPS in vivo

[0118] Para el seguimiento de nuestras observaciones in vitro, los efectos de la simvastatina y pretratamiento tipifarnib se ensayaron en un modelo murino de inflamación inducida por LPS. Los compuestos se administraron por vía oral a las 24 horas, 17 horas y 1 hora antes de la inyección de LPS.

[0119] Especialmente llamativos efectos de la estatina y la FTI fueron su inhibición muy significativa de LPS inducido por TNF- α en 1 y 2 horas (Figura 5.a). Un resultado similar se ha obtenido previamente de otra estatina cerivastatina, (Ando, Takamura et al. 2000). Este efecto ha sido observado para un IVR.

[0120] No hay efectos significativos se observaron para la simvastatina en IL-6 y IL-1 β , mientras que aproximadamente el 50% de inhibición de la producción de IL-6 (Figura 5.b), y la inhibición casi completa de la producción de IL-1 β (Figura 5.c), se observó en los animales tratados con tipifarnib después de 3 horas.

[0121] Aproximadamente el 50% de inhibición de la producción de MIP-1 α por tanto la estatina y el FTI se observó a las 2 horas en el primer experimento (Figura 5.d). En el segundo experimento, la inhibición similar para tipifarnib se observó a las 2 y 3 horas, y menos, pero una inhibición significativa de la simvastatina en 2 horas. No se observaron efectos significativos para el tratamiento de la simvastatina sobre la producción de MCP-1, mientras que tipifarnib mostraron una inhibición significativa a las 2 horas y una disminución que no alcanzó significación estadística a las 3 horas (figura 5.e).

[0122] Inducción En el segundo experimento, IL12-p40 y p70-por LPS se inhibió por tipifarnib en 3 horas, mientras que la simvastatina no tuvo efecto significativo (resultados no mostrados). No hay efectos de simvastatina o tipifarnib en LPS inducido por IL-8 o RANTES se observaron (resultados no mostrados).

[0123] En general, los resultados muestran downregulation significativa de numerosas citoquinas inducidos por LPS in vivo por tipifarnib, y de TNF- α y MIP-1 para un simvastatina.

Efecto de tipifarnib en el TNF- α , LPS, y la señalización de IL-1-inducida

[0124] Se ha informado recientemente que el TNF- α inducida por NF-KB actividad fue inhibida por otro FTI (SCH 66336) (Takada, Y., et al. 2004. J Biol Chem 279, 26287-99). Para comparar los efectos de tipifarnib a este hallazgo, la activación de NF-KB se ensayó en células HEK 293, transfectadas establemente con un reportero de luciferasa NF-KB plásmido. Las células fueron tratadas con tipifarnib durante la noche, seguido por la estimulación con TNF- α durante 4 horas. En contraste con los resultados observados para el SCH 66336, TNF- α inducida por NF-KB actividad no fue inhibida por tipifarnib en 2 o 5 μ M.

[0125] El efecto de tipifarnib en varias vías de señalización también se examinó en células THP-1. Las células fueron tratadas con tipifarnib 2 μ M durante 18 horas, después se estimularon con LPS o TNF- α durante 4 horas. Los lisados celulares se ensayaron para la expresión de p38 y la fosforilación de p38 mediante análisis de transferencia Western. La fosforilación de p38 se incrementó significativamente por LPS y TNF- α la estimulación, y solamente el aumento inducido por LPS se redujo parcialmente mediante tratamiento tipifarnib. No se observó inhibición significativa de TNF- α inducida por fosforilación de p38. Expresión P38 proteína no se vio afectada por LPS o TNF- α un tratamiento de estimulación y / o tipifarnib.

[0126] En un experimento separado, IL-1 α también fue incluido como un estímulo además de LPS y TNF- α , y estos tres estímulos aumentaron significativamente kB-una degradación. Curiosamente, tipifarnib inhibió significativamente inducida por LPS I κ B degradado, pero no mostró una inhibición de la degradación de I κ B inducida por TNF- α e IL-1 α . Se observaron resultados similares en tres experimentos separados. El nivel de fosforilación de ERK fue similar en el control y las células estimuladas, y tipifarnib pre-tratamiento redujo la fosforilación de ERK en un grado similar en todas las muestras. El efecto de tipifarnib en H-Ras farnesilación también fue examinado. El nivel de farnesylated H-Ras no mostró cambios significativos en la ausencia o presencia de estímulos. Tipifarnib inhibe parcialmente la H-Ras farnesilación en el mismo grado en los diferentes grupos de tratamiento, y esta inhibición correlacionado con el grado de inhibición de la fosforilación de ERK

DISCUSIÓN

[0127] Algunos de los efectos anti-inflamatorios de las estatinas parecen ser mediadas a través de su inhibición de la proteína pre-nylation, incluyendo farnesilación. En la comparación de la estatina (simvastatina) a la IVR (tipifarnib), la IFA mostraron similar, si no superior, actividad anti-inflamatoria.

[0128] Ambos fármacos inhiben la transcripción y secreción de IL-6, MCP-1 y MMP-9, y la fase secundaria de la secreción de TNF- α en vitro.

[0129] En los experimentos de la presente invención, se encontró que la simvastatina y tipifarnib dosis-dependiente inhibe LPS inducido por la secreción de MMP-9.

[0130] La inhibición de la transcripción STAT1 inducida por LPS se observó tanto para tipifarnib y para la simvastatina. Estudios anteriores han demostrado la inhibición de la fosforilación de STAT1 por las estatinas (Huang, KC, et al 2003 Journal of Biomedical Science (Basilea, Suiza) 10, 396-405; Chung, HK, et al 2002 Experimental y Molecular Medicine 34, 451-461; y Horiuchi, M., et al 2003 Circulación 107, 106-112 En contraste, la presente invención proporciona la primera evidencia de la inhibición de la transcripción STAT1 por tipifarnib y, en menor medida, la simvastatina.

[0131] Inducida por LPS MyD88 transcripción fue significativamente inhibida por tipifarnib, pero no por la simvastatina, lo que sugiere que la inhibición selectiva de la farnesilación puede inhibir la señalización a través de receptores de tipo Toll.

[0132] Simvastatina y tipifarnib había contraste de los efectos sobre la inhibición de LPS inducido por IL-8 y IL-1 p. Simvastatina inhibieron la inducción de IL-8 mRNA y la secreción de IL-8 por células THP-1, como se informó anteriormente (Ito, T., et al 2002 aterosclerosis 165, 51-5;.. Takata, M., et al 2001 Br... J Pharmacol 134, 753-62;.. Terkeltaub, R., et al 1994 J Leukoc Biol 55, 749-55).

[0133] En contraste, sin embargo, que no hay inhibición de LPS inducido por IL-8 transcripción o la secreción se observó en los estudios de la presente solicitud para la IVR, tipifarnib, en concentraciones que eran altamente eficaces en la inhibición de IL-6, MCP-1 y MMP- 9 producción. Estos resultados sugieren que el LPS inducido por IL-8 de inducción no requiere la farnesilación de proteínas en las condiciones en los estudios mostrados en la presente solicitud. Sin embargo, bajo ciertas condiciones, por ejemplo, preincubación de PBMC humano con un FTI durante la noche, seguido por el tratamiento con LPS durante 24 horas, algo de inhibición de LPS inducido por IL-8 se puede observar.

[0134] Si bien tanto la estatina y la FTI inhibe LPS-inducida por IL-1 transcripción p, sólo la FTI mostró una inhibición de la secreción de IL-1 β . La simvastatina no mostró ningún efecto sobre la secreción de IL-1 β a 5 mM, y la inducción a 10 μ M. Potenciación similar de mediadores inflamatorios por tratamiento con estatinas se ha observado previamente en numerosos estudios (Terkeltaub, R., et al 1994 J Leukoc Biol 55, 749-55; Sadeghi, MM, et al 2000 J Immunol 165, 2712 -8; Sun, D. et al 2003 Cell Immunol 223, 52.62; Monick, MM, et al 2003 J Immunol 171, 2625-30; y Matsumoto, M., et al 2004 J Immunol 172 , 7377-84.)

[0135] La diferencia entre los efectos de la simvastatina sobre la transcripción y secreción de IL-1 β puede estar relacionada con el requisito para la escisión de la proteína precursora inmaduro por la caspasa-1 para la secreción. Una estatina lipofílica, similar a la simvastatina, se ha demostrado que estimula la actividad de caspasa-1 y IL-1 β secreción en células humanas mononucleares de sangre periférica (Montero, Hernández et al. 2000).

[0136] LPS se ha demostrado que activan la caspasa-1 en células THP-1, y esta activación contribuye a la inducción de LPS de IL-1 secreción p (Schumann, Belka et al. 1998) activación adicional de la caspasa-1 por la simvastatina por lo tanto puede potenciar LPS la secreción inducida de IL-1 madura proteína p, aunque se inhibe la transcripción.

[0137] Los efectos de la simvastatina y tipifarnib pre-tratamiento en la inducción in vivo de las citoquinas en ratones por LPS también se analizaron. Los efectos más notables de la estatina y la IVR eran su inhibición muy significativa de LPS inducido por TNF- α .

[0138] Simvastatina pre-tratamiento dio una inhibición similar de TNF- α e IL-1 β a la observada previamente para la cerivastatina (Ando, Takamura et al. 2000), aunque en el presente estudio, la inhibición de la IL-1 β no alcanzó significación estadística.

[0139] Los estudios de la presente invención, además, mostró downregulation de LPS inducido por MIP-1 por un simvastatina. Esto no ha sido demostrado in vivo, aunque un estudio anterior informó de disminución de la liberación espontánea de MIP-1a en PBMCs cultivadas, criopreservados de pacientes después de seis meses de tratamiento con atorvastatina (Waehre T, et al. 2003. J Am Coll Cardiol 41 (9) , 1,460-7).

[0140] En los estudios de la presente invención la inhibición, de la producción de IL-8 in vivo mediante cualquiera de simvastatina o tipifarnib no se observó, aunque regulación a la baja de esta citocina in vitro por la simvastatina se observó. De manera similar, en Waehre al observaron una disminución modesta en espontánea, y ninguna disminución de LPS inducido por IL-8 a partir de PBMC antes y después del tratamiento ator-vastatin. En contraste, se ha informado de que la simvastatina redujo los niveles séricos de IL-8 en pacientes hipercolesterolémicos después de 6 semanas de tratamiento (Rezaie-Majd, A., et al. 2002. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 22, 1194-9.) Las

diferencias en los efectos sobre la producción de IL-8 puede estar relacionada con diferentes estatinas, diferentes poblaciones de pacientes (CAD contra la hipercolesterolemia), y / o in vivo frente a las mediciones de cultivo ex vivo.

[0141] Los estudios de la presente invención proporcionar pruebas in vivo para globales efectos antiinflamatorios de los FTI, tipifarnib, en particular, incluyendo la regulación negativa de LPS inducido por TNF- α , IL-6, IL-1 y MIP-1 β . La investigación anterior con tipifarnib ha demostrado una inhibición de la caquexia (solicitud de patente publicada EE.UU. N° 2004/0157773 y WO 02/085364), y la reducción de las puntuaciones de la enfermedad en el dextrano sulfato de sodio inducida por la colitis (WO 02/43733) y la artritis inducida por colágeno (WO 00/01386), pero el mecanismo de estos efectos no se informó. Las funciones principales de la TNF- α , IL-6, IL-1 y 1 en la patogénesis de estas enfermedades sugieren que su inhibición por la IVR puede haber sido responsable de la mejora observada. Es de interés notar que en estudios de Fase I con tipifarnib en el síndrome mielodisplásico, la única correlación con la respuesta positiva al tratamiento produjo una disminución en los niveles séricos de TNF- α (Kurzrock, Kantarjian et al. 2003).

[0142] Las concentraciones de simvastatina utilizados en la in vitro e in vivo estudios informaron de la presente invención fueron mayores que las típicas dosis terapéuticas, pero similar a los utilizados anteriormente en otros estudios in vitro y modelos animales de eficacia (Leung, Sattar et al 2003; McKay A 2004). Numerosos estudios han demostrado actividad anti-inflamatoria de las estatinas a dosis terapéuticas en seres humanos (Rezaie-Majd, Maca et al 2002; Waehre T 2003; McCarey DW 2004), lo que indica que los resultados de los estudios in vitro y animales tienen relevancia clínica.

[01433] En el caso de la IVR, tipifarnib, 300 mg dos veces al día fue la dosis máxima tolerada en una serie de estudios (Head y Johnston, 2003). A esta dosis, los niveles plasmáticos alcanzan aproximadamente 2 mM (Karp, Lancet et al. 2001), en la que los efectos de concentración significativos se obtuvieron in vitro en los experimentos de la presente invención. Las dosis utilizadas en el modelo de inflamación inducida por LPS murino de la presente invención eran similares a los utilizados en reportado efectos tumorocidas en modelos de ratón (extremo, Smets et al. 2001).

[0144] La inhibición de mediadores inflamatorios por la estatina y el FTI parecían requerir tiempos de pretratamiento. Por ejemplo, citocinas tales como IL-1 β y IL-8-mostraron la inducción transcripcional significativa por LPS tan pronto como 3 horas in vitro. Cuando el tratamiento de fármacos in vitro se inició en el mismo tiempo que la estimulación con LPS, los primeros signos de inhibición transcripcional se observó sólo después de 6 horas, y de la liberación de citocinas después de sólo 22 horas. El pico inicial de LPS inducido por TNF- α de liberación no fue afectado por la presencia de cualquiera de inhibidor, pero la segunda fase, después de 22 horas, mostró la dosis y del tiempo de la inhibición dependiente de simvastatina y tipifarnib. En contraste, cuando los animales fueron previamente tratados con los fármacos durante 24 horas antes del desafío con LPS in vivo, la inhibición de TNF- α de liberación se puede observar tan pronto como una hora después del reto. El tiempo de retraso en la inhibición de las respuestas inflamatorias puede indicar un requisito para agotar piscinas intracelulares de proteínas particulares de preñilados.

[0145] Los efectos antiinflamatorios de las estatinas y los FTIs puede estar relacionado con la inhibición de los pasos comunes en la vía del mevalonato, y / o la evidencia reciente de que ambas clases de fármacos inhiben la activación de NFκB (Ortego M 1999; Takada, Khuri et al 2004, Na et al. 2004).

[0146] Para explorar el mecanismo subyacente para la actividad anti-inflamatoria de tipifarnib, el efecto de tipifarnib en diferentes vías de señalización proinflamatorias se examinó. La FTI, SCH 66336, se había demostrado que inhiben el TNF- α inducida por fosforilación de IKB, la degradación y la actividad de NF-KB (Takada, Khuri et al. 2004). Sin embargo, en los estudios que apoyan la presente invención, tipifarnib no afectó TNF- α inducida por NF-KB actividad (según se mide mediante un ensayo de indicador de luciferasa). Además, tipifarnib no mostró inhibición de TNF- α inducida por la degradación de IKB en células THP-1. La razón de tales resultados contrastantes no está clara, pero se puede señalar que estos dos FTIs también han demostrado eficacia en ensayos clínicos diferente para diferentes tipos de tumores. (Lancet y Karp. 2003).

[0147] La vía de Ras / Raf / MAPK se ha estudiado bien. Los estudios de la presente invención demuestran que tipifarnib inhibe parcialmente la ERK1 / 2 fosforilación, y que el grado de inhibición se correlaciona con el de la inhibición de la farnesilación de Ras tanto en ausencia o en presencia de estímulos inflamatorios. Este dato confirma que tipifarnib suprime ERK1 / 2 fosforilación a través de la inhibición de Ras.

[0148] LPS, TNF- α y IL-1 interactuar con sus propios receptores para activar la señalización inflamatoria correspondiente cascadas. TNF(X enlaces de señalización a través de IKK TNFR / RIP (Aggarwal, B. Nat Rev Immunol 2003). IL-1/IL-1R y LPS/TLR4 señalización tanto enlace a través de la IKK compartida vía MyD88/IRAK4/TRAFF6/TAK (Takeda, SAK Nature Reviews Inmunología 2004). IKK fosforila IKB, lo que conduce a la ubiquitinación y degradación de IKB, y así permite la translocación de NF-KB en el núcleo y la inducción de la expresión del gen diana, tales como TNF- α , IL-1 p, IL-6, CL y otros. En los estudios de la presente invención, tipifarnib no inhibir el TNF- α e IL-1 inducida por la degradación de IKB, lo que sugiere que la proteína diana para tipifarnib no está implicada en estas dos rutas de señales. Además de la ruta dependiente de MyD88 común

compartida con la IL-1, la vía de LPS/TLR4 también induce la degradación de I κ B a través de MyD88 independiente de las vías, es decir, a través de TRIF y TRAM (Takeda, SAK Nature Reviews Inmunología, 2004). La inhibición específica por tipifarnib sólo de LPS inducido por la degradación de I κ B sugiere que la proteína está afectada por tipifarnib, bien asociadas a TLR4 o involucrados en una vía exclusiva para LPS/TLR4, tales como la vía de MyD88 independiente. Un estudio reciente ha demostrado que Ras está implicado en la señalización de oligonucleótido CpG como un evento temprano, mediante la asociación con TLR9 y promover IRAK/TRAF6 formación del complejo (Xu, H. A, J Bio Chem. 2003). Otro estudio ha demostrado que Ras controla TRAF-6-dependiente de la inducción de NF- κ B (Caunt, CJ J Bio Chem. 2001) En la presente invención, la inhibición de la farnesilación de Ras fue constantemente observada en el control, LPS, IL-1-y TNF- α . células tratadas, pero la inhibición de la degradación de I κ B sólo se observó en las células tratados con LPS Esta falta de correlación indica que Ras es poco probable que la proteína diana implicada en la mediación de los efectos anti-inflamatorios de tipifarnib.

[0149] Aunque la invención se ha ilustrado anteriormente por referencia a una descripción detallada y realizaciones ejemplares y preferentes, la invención no pretende estar limitada por la descripción anterior, sino que se define por las siguientes reivindicaciones correctamente interpretadas de conformidad a los principios del derecho de patentes.

[0150]

REFERENCIAS

- Aggarwal, B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3(9):745.
- Aiello, R., et al. (1999). "Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1518.
- Almog, Y., et al. (2004). "Prior statin therapy is associated with a decreased rate of severe sepsis." *Circulation*: 110:880.
- Aiello, R. J., P. A. Bourassa, et al. (1999). "Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(6): 1518-25.
- Almog, Y., A. Shefer, et al. (2004). "Prior statin therapy is associated with a decreased rate of severe sepsis." *Circulation* 110(7): 880-5.
- Ando, H., T. Takamura, et al. (2000). "Cerivastatin improves survival of mice with lipopolysaccharide-induced sepsis." *J Pharmacol Exp Ther* 294(3): 1043-6.
- Bossink, A. W., L. Paemen, et al. (1995). "Plasma levels of the chemokines monocyte chemoattractant proteins-1 and -2 are elevated in human sepsis." *Blood* 86(10): 3841-7.
- Brown, J. L. G. M. S. (1990). "Regulation of the mevalonate pathway." *Nature* 343: 425 - 430.
- Casey, P.J. (1995). "Protein lipidation in cell signaling." *Science* 268(5208): 221-5. Caunt, C. J. K.-T., Endre; Carlotti, Franco; Chapman, Robert; Qvarnstrom, Eva E. 2001. Ras controls tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6-dependent induction of nuclear factor- κ B. Selective regulation through receptor signaling components. *Journal of Biological Chemistry* 276(9):6280
- Das, U. N. (2003). "Current advances in sepsis and septic shock with particular emphasis on the role of insulin." *Med Sci Monit* 9(8): RA181-92.
- Dawson, T. C., W. A. Kuziel, et al. (1999). "Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." *Atherosclerosis* 143(1): 205-11.
- Dichtl, W., J. Dulak, et al. (2003). "HMG-CoA reductase inhibitors regulate inflammatory transcription factors in human endothelial and vascular smooth muscle cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(1): 58-63.
- Diomedede L, A. D., Sottocorno M, Polentarutti N, Donati MB, Bianchi M, Fruscella P, Salmona M (2001). "The in vivo anti-inflammatory effect of statins is mediated by nonsterol mevalonate products." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 1327-1332.
- End, D. W., G. Smets, et al. (2001). "Characterization of the antitumor effects of the selective farnesyl protein transferase inhibitor R115777 in vivo and in vitro." *Cancer Res* 61(1): 131-7.
- Gu, L., Y. Okada, et al. (1998). "Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice." *Mol Cell* 2(2): 275-81.
- Guijarro C, B.-C. L., Ortego M, Alonso C, Ortiz A, Plaza JJ, Diaz C, Hernandez G, Edigo J. (1998). "3-Hidroxi-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture." *Circ Res* 83: 490-500.
- Haddy, N., C. Sass, et al. (2003). "IL-6, TNF-alpha and atherosclerosis risk indicators in a healthy family population: the STANISLAS cohort." *Atherosclerosis* 170(2): 277-83.
- Head, J. E. and S. R. Johnston (2003). "Protein farnesyltransferase inhibitors." *Expert Opin Emer Drugs* 8(1): 163-78.
- Ito, T., U. Ikeda, et al. (2002). "HMG-CoA reductase inhibitors reduce interleukin-6 synthesis in human vascular smooth muscle cells." *Cardiovasc Drugs Ther* 16(2): 121-6.
- Karp, J. E., J. E. Lancet, et al. (2001). "Clinical and biologic activity of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in adults with refractory and relapsed acute leukemias: a phase 1 clinical-laboratory correlative trial." *Blood* 97(11): 3361-9.
- Kirii, H., T. Niwa, et al. (2003). "Lack of interleukin-1beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(4): 656-60. Kurzrock, R., H. M. Kantarjian, et al. (2003). "Farnesyltransferase

- inhibitor R115777 in myelodysplastic syndrome: clinical and biologic activities in the phase 1 setting." *Blood* 102 (13): 4527-34.
- Lalu, M. M., C. Q. Gao, et al. (2003). "Matrix metalloproteinase inhibitors attenuate endotoxemia induced cardiac dysfunction: a potential role for MMP-9." *Mol Cell Biochem* 251(1-2): 6₁₋₆.
- 5 Lancet, J.E., Karp, J.E. (2003). "Farnesyltransferase inhibitors in hematologic malignancies: new horizons in therapy." *Blood* 102(12) 3880-9)
- Leung, B. P., N. Sattar, et al. (2003). "A novel anti-inflammatory role for simvastatin in inflammatory arthritis." *Journal of Immunology* 170(3): 1524-1530.
- 10 Liu L, M. P., Kovach NL, Bailey R, Hamilton AD, Sebt SM, Harlan JM (1999). "Integrin-dependent leukocyte adhesion involves geranylgeranylated protein(s)." *J Biol Chem* 274: 33334-33340.
- Luo, J. L., S. Maeda, et al. (2004). "Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation- induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression." *Cancer Cell* 6(3): 297-305.
- 15 Luttmann, A., E. Lutgens, et al. (2004). "Loss of matrix metalloproteinase-9 or matrix metalloproteinase-12 protects apolipoprotein E-deficient mice against atherosclerotic media destruction but differentially affects plaque growth." *Circulation* 109(11): 1408-14.
- Mancuso, G., A. Midiri, et al. (2004). "Dual role of TLR2 and myeloid differentiation factor 88 in a mouse model of invasive group B streptococcal disease." *J Immunol* 172(10): 6324-9.
- 20 McCarey DW, M. I., Madhok R, Hampson R, Scherbakov O, Ford I, Capell HA, Sattar N (2004). "Trial of Atorvastatin in Rheumatoid Arthritis (TARA): double-blind, randomised placebo-controlled trial." *Lancet* 363(9426): 2015-21.
- McKay A, L. B., McInnes IB, Thomson NC, Liew FY. (2004). "A novel anti-inflammatory role of simvastatin in a murine model of allergic asthma." *J Immunol.* 172(5): 2903-8.
- 25 Michelsen, K. S., M. H. Wong, et al. (2004). "Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(29): 10679-10684.
- Montero, M. T., O. Hernandez, et al. (2000). "Hidroximethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition stimulates caspase-1 activity and Th1-cytokine release in peripheral blood mononuclear cells." *Atherosclerosis* (Shannon, Ireland) 153(2): 303-313.
- 30 Na, H. J., S. J. Lee, et al. (2004). "Inhibition of farnesyltransferase prevents collagen-induced arthritis by down-regulation of inflammatory gene expression through suppression of p21(ras)-dependent NF-kappaB activation." *J Immunol* 173(2): 1276-83.
- 35 Ortego M, B. C., Hernandez-Presa MA, Tunon J, Diaz C, Hernandez G, Egido J (1999). "Atorvastatin reduces NF-kappaB activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells." *Atherosclerosis* 147(2): 253-61.
- Peterson KS, H. J., Zhu J, D'Agati V, Liu X, Miller N, Erlander MG, Jackson MR, Winchester RJ (2004). "Characterization of heterogeneity in the molecular pathogenesis of lupus nephritis from transcriptional profiles of laser-captured glomeruli." *J Clin Invest* 113(12): 1722-33.
- 40 Pikarsky, E., R. M. Porat, et al. (2004). "NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer." *Nature* 431(7007): 46₁₋₆.
- Prendergast, G. C. and N. Rane (2001). "Farnesyltransferase inhibitors: mechanism and applications." *Expert Opin Investig Drugs* 10(12): 2105-16.
- 45 Rezaie-Majd, A., T. Maca, et al. (2002). "Simvastatin reduces expression of cytokines interleukin-6, interleukin-8, and monocyte chemoattractant protein-1 in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(7): 1194-9.
- Schonbeck U, L. P. S. U., Libby P (2004). "Inflammation, immunity, and HMG-CoA reductase inhibitors: statins as antiinflammatory agents?" *Circulation* 109(21 Suppl 1): II18-26.
- 50 Schumann, R. R., C. Belka, et al. (1998). "Lipopolysaccharide activates caspase-1 (interleukin-1-converting enzyme) in cultured monocytic and endothelial cells." *Blood* 91(2): 577-84.
- Shaw KJ, M. N., Liu X, Lerner D, Wan J, Bittner A, Morrow BJ (2003). "Comparison of the changes in global gene expression of Escherichia coli induced by four bactericidal agents." *J Mol Microbiol Biotechnol* 5(2): 105-22.
- 55 Stanislaus, R., K. Pahan, et al. (1999). "Amelioration of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats by lovastatin." *Neurosci Lett* 269(2): 7₁₋₄.
- Takada, Y., F. R. Khuri, et al. (2004). "Protein farnesyltransferase inhibitor (SCH 66336) abolishes NF-kappaB activation induced by various carcinogens and inflammatory stimuli leading to suppression of NF-kappaB-regulated gene expression and up-regulation of apoptosis." *J Biol Chem* 279(25): 26287-99.
- 60 Takeda, S. A. K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology* 4:499.
- Waehre T, D. J., Gullestad L, Holm AM, Pedersen TR, Arnesen KE, Torsvik H, Froland SS, Semb AG, Aukrust P (2003). "Hidroximethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors down-regulate chemokines and chemokine receptors in patients with coronary artery disease." *J Am Coll Cardiol* 41(9): 1460-7.
- Weighardt, H., S. Kaiser-Moore, et al. (2002). "Cutting edge: myeloid differentiation factor 88 deficiency improves resistance against sepsis caused by polymicrobial infection." *J Immunol* 169(6): 2823-7.

Wong, B., W. C. Lumma, et al. (2001). "Statins suppress THP-1 cell migration and secretion of matrix metalloproteinase 9 by inhibiting geranylgeranylation." J Leukoc Biol 69 (6): 959-62.

Xu, H. A., Huazhang; Yu, Yizhi; Zhang, Minghui; Qi, Runzi; Cao, Xuetao. (2003) Ras Participates in CpG Oligodeoxynucleotide

Signaling through Association with Toll-like Receptor 9 and Promotion of Interleukin-1 Receptor-associated Kinase/Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 6 Complex Formation in Macrophages. Journal of Biological Chemistry 278(38).

Youssef, S., O. Stueve, et al. (2002). "The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease." Nature (London, United Kingdom) 420(6911): 78-84.

Zhang FL, C. P. (1996). "Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences." Annu Rev Biochem 65: 241-269.

Zhong, W-B, Wang, C. Y. Chang, T. C. and Lee, W. S. (2003). "Lovastatin Induces Apoptosis of Anaplastic Thyroid Cancer Cells via Inhibition of Protein Geranylgeranylation and de Novo Protein Synthesis." Endocrinology 144(9): 3852 - 3859.

[0151]

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Janssen Pharmaceutica, N.V. FOURIE, Anne

<120> USO TERAPÉUTICO DE INHIBIDORES DE LA FARNESILTRANSFERASA Y MÉTODOS DE CONTROL DE LA EFICACIA DE LOS MISMOS

<130> PRD-2387WOPCT

<150> 60/625,204

<151> 2004-11-05

<150> 60/708,075

<151> 2005-08-12

<160> 14

<170> Patente versión 3.1

<210> 1

<211> 23

<212> ADN

<213> Primer

<400> 1

ggataacgag gcttatgtgc acg 23

<210> 2

<211> 24

<212> ADN

<213> Primer

<400> 2

ggacatggag aacaccactt gttg 24

<210> 3

<211> 21

<212> ADN

<213> Primer

<400> 3

agccagatgc aatcaatgcc c 21

<210> 4

<211> 22

<212> ADN

<213> Primer

	<400> 4 ccttgccac aatggtcttg aa	22
5	<210> 5 <211> 20 <212> ADN <213> Primer	
10	<400> 5 accgctatgg ttacactcg	20
15	<210> 6 <211> 20 <212> ADN <213> Primer	
20	<400> 6 agggaccaca actcgtcatc	20
25	<210> 7 <211> 24 <212> ADN <213> Primer	
30	<400> 7 ctgatttctg cagctctgtg tgaa	24
35	<210> 8 <211> 23 <212> ADN <213> Primer	
40	<400> 8 tggcatcttc actgattctt gga	23
45	<210> 9 <211> 20 <212> ADN <213> Primer	
50	<400> 9 ttcagagctc gttgtggtg	20
55	<210> 10 <211> 20 <212> ADN <213> Primer	
60	<400> 10 agaggctgctc tcgagggtcaa	20
65	<210> 11 <211> 24 <212> ADN <213> Primer	
	<400> 11 tgggacccag cattgaggag gatt	24
	<210> 12 <211> 22 <212> ADN <213> Primer	
	<400> 12	

	aaactggatg tcgctggggc aa	22
	<210> 13	
	<211> 22	
5	<212> ADN	
	<213> Primer	
	<400> 13	
10	tggattcaat gaggagactt gc	22
	<210> 14	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> Primer	
	<400> 14	
	caggaactgg atcaggactt	20
20		
25		
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		

Reivindicaciones

1. Un método para determinar una respuesta de un sujeto que padece sepsis o shock séptico al tratamiento con un inhibidor de la farnesil transferasa, que comprende las etapas:

- (i) medir un nivel de al menos un marcador seleccionado entre el grupo que consiste en proteínas identificadas en la Tabla 4 y en los transcritos de los genes identificados en las Tablas 2 y 3 en una muestra de sangre sin tratar obtenida del sujeto antes del tratamiento con el inhibidor de la farnesil transferasa, y
- (ii) medir un nivel del marcador en una muestra de sangre tratada obtenida del sujeto al menos una vez después del comienzo del tratamiento con el inhibidor de la farnesil transferasa, y
- (iii) comparar dichos nivel del marcador, donde una disminución del nivel del marcador medido en la muestra de sangre sin tratar con el nivel del marcador medido en la muestra de sangre tratada indica una respuesta al tratamiento.

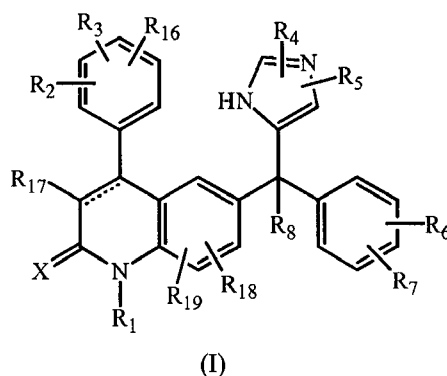
2. El método de la reivindicación 1, en el que el método comprende las etapas:

- a) aislar las células o plasma de las muestras de sangre sin tratar para obtener un extracto de la muestra sin tratar, y (ii) aislar las células o plasma de cada muestra de sangre tratada para obtener un extracto de la muestra tratada;
- b) (i) medir el nivel de al menos uno de los IL - 6, MCP - 1, IL - 1 β , MMP - 9, y TNF - α en el extracto de muestra sin tratar, y (iii) comparar dichos niveles de al menos uno de los IL - 6, MCP - 1, IL - 1 β , MMP - 9, y TNF - α , donde una disminución del nivel de al menos uno de los IL - 6, MCP - 1, IL - 1 β , MMP - 9, y TNF - α medido en el extracto de la muestra sin tratar en el nivel de al menos uno de los IL - 6, MCP - 1, IL - 1 β , MMP - 9, y TNF - α medidos en el extracto de la muestra tratada indica una respuesta al tratamiento.

3. El método de la reivindicación 1, en el que el método comprende las etapas:

- (a) (i) aislar las células mononucleares de sangre periférica de la muestra de sangre sin tratar para obtener una muestra de CMSP, y (ii) aislar las células mononucleares de sangre periférica de cada muestra de sangre tratada para obtener una muestra de CMSP tratada;
- (b) (i) estimular la muestra de CMSP sin tratar con lipopolisacáridos para obtener una muestra de CMSP sin tratar estimulada con LPS, y (ii) estimular cada muestra de CMSP tratada con lipopolisacáridos para obtener una muestra de CMSP tratada estimulada con LPS;
- (c) (i) aislar el ARN de una muestra de CMSP sin tratar estimulada con LPS, y (ii) aislar el ARN de cada muestra de CMSP tratada estimulada con LPS;
- (d) (i) medir la expresión de al menos uno de los IL - 1 β , MCP - 1, MMP - 9, MyD88, STAT1 y IL - 6 en el ARN de la muestra de CMSP sin tratar estimulada con LPS, y (ii) medir la expresión de al menos uno de los IL - 1 β , MCP - 1, MMP - 9, MyD88, STAT1, e IL - 6 en el ARN de cada muestra de CMSP tratada estimulada con LPS, y (iii) comparar dichas mediciones de la expresión en al menos uno de los IL - 1 β , MCP - 1, MMP - 9, MyD88, STAT1, e IL - 6, donde una disminución indica una respuesta al tratamiento.

4. Un método definido en cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, o 3, en el que el inhibidor de la farnesil transferasa comprende un compuesto de fórmula (I):



una forma estereoisomérica de la misma, una sal de adición de base o de ácido farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que la línea de puntos representa un enlace adicional;
X es oxígeno o azufre;

R¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₁₂, Ar¹, Ar² - alquilo C₁₋₆, quinolinil - alquilo C₁₋₆, piridil - alquilo C₁₋₆, hidroxil - alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆, mono - o di (alquil C₁₋₆) amino - alquilo C₁₋₆, amino - alquilo C₁₋₆, o un radical de fórmula - Alk¹ - C (= O) - R⁹, - Alk¹ - S (O) - R⁹ o - Alk¹ - S (O)₂ - R⁹, donde Alk¹ es alcanediil C₁₋₆, R⁹ es hidroxil, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆, amino, alquilamino C₁₋₈ o alquilamino C₁₋₈ sustituido con alquilo carbonilo C₁₋₆; R², R³ y R¹⁶ son cada uno independientemente hidrógeno, hidroxil, halo, ciano, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆, hidroxil - alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆, amino - alquilo C₁₋₆, mono - o di (alquil C₁₋₆) amino - alquilo C₁₋₆, Ar¹, Ar² - alquilo C₁₋₆, Ar² - oxil, Ar² - alquilo C₁₋₆, hidroxil carbonilo, alquilo carbonilo C₁₋₆, trihalometil, trihalometoxil, alquilo C₂₋₆, 4,4 - dimetil - oxazolil; o cuando en posiciones contiguas R² y R³ tomados conjuntamente pueden formar un radical bivalente de fórmula

R⁴ y R⁵ son cada uno independientemente hidrógeno, halo, Ar¹, alquilo C₁₋₆, hidroxil - alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆, amino, hidroxil carbonilo, alquilo carbonilo C₁₋₆, alquil C₁₋₆ - S (O) - alquilo C₁₋₆ o alquil C₁₋₆ S(O)₂ - alquilo C₁₋₆;

R⁶ y R⁷ son cada uno independientemente hidrógeno, halo, ciano, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆, Ar² - oxil, trihalometil, alquilo C₁₋₆, di (alquil C₁₋₆) amino, o cuando en posiciones contiguas R⁶ y R⁷ tomados conjuntamente pueden formar un radical bivalente de fórmula

R⁸ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, ciano, hidroxil carbonilo, alquilo carbonilo C₁₋₆, alquil carbonilo C₁₋₆ - alquilo C₁₋₆, ciano - alquilo C₁₋₆, alquilo carbonilo C₁₋₆ - alquilo C₁₋₆, carboxil - alquilo C₁₋₆, hidroxil - alquilo C₁₋₆, amino - alquilo C₁₋₆, mono - o di (alquil C₁₋₆) - amino - alquilo C₁₋₆, imidazolil, halo - alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ - alquilo C₁₋₆, aminocarbonilo - alquilo C₁₋₆, o un radical de fórmula

donde R¹⁰ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alquil carbonilo C₁₋₆, Ar¹, Ar² - alquilo C₁₋₆, alquilo carbonilo C₁₋₆ - alquilo C₁₋₆, un radical o fórmula - Alk² - OR¹³ o Alk² - NR¹⁴R¹⁵;

R¹¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₁₂, Ar¹ o Ar² - alquilo C₁₋₆;

R¹² es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alquil carbonilo C₁₋₆, alquilo carbonilo C₁₋₆, alquilaminocarbonilo C₁₋₆, Ar¹, Ar² - alquilo C₁₋₆, alquil carbonilo C₁₋₆ - alquilo C₁₋₆, un aminoácido natural, Ar¹ - carbonilo, Ar² - alquil carbonilo C₁₋₆, aminocarbonil carbonilo, alquilo C₁₋₆ - alquil carbonilo C₁₋₆, hidroxil, alquilo C₁₋₆, aminocarbonilo, di (alquil C₁₋₆) amino - alquil carbonilo C₁₋₆, amino, alquilamino C₁₋₆, alquil carbonil amino C₁₋₆, o un radical de fórmula - Alk² - OR¹³ o - Alk²NR¹⁴R¹⁵, donde Alk² es alcanediil C₁₋₆; R¹³ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alquil carbonilo C₁₋₆, hidroxil - alquilo C₁₋₆, Ar¹ o Ar² - alquilo C₁₋₆; R¹⁴ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, Ar¹ o Ar² - alquilo C₁₋₆; R¹⁵ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alquil carbonilo C₁₋₆, Ar¹ o Ar² - alquilo C₁₋₆;

R¹⁷ es hidrógeno, halo, ciano, alquilo C₁₋₆, alquilo carbonilo C₁₋₆, Ar¹;

R¹⁸ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ o halo;

R¹⁹ es hidrógeno o alquilo C₁₋₆;

Ar¹ es fenil o fenil sustituido con alquilo C₁₋₆, hidroxil, amino, alquilo C₁₋₆ o halo, y

Ar² es fenil o fenil sustituido con alquilo C₁₋₆, hidroxil, amino, alquilo C₁₋₆ o halo.

5. El método de la reivindicación 4, en el que dicho inhibidor de la farnesiltransferasa es:

- un compuesto de fórmula (I) en el que X es oxígeno y la línea de puntos representa un enlace; o
- un compuesto de fórmula (I) en el que R¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ - alquilo C₁₋₆, o, mono - o di (alquil C₁₋₆) amino - alquilo C₁₋₆; R² es halo, alquilo C₁₋₆, alquilo C₂₋₆, alquilo C₁₋₆, trihalometoxil, o hidroxil - alquilo C₁₋₆; y R³ es hidrógeno; o
- (+) - 6 - [amino (4 - clorofenil) (1 - metil - 1H - imidazol - 5 - il) metil] - 4 - (3 - clorofenil) - 1 - metil - 2 (1H) - quinolinona; o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de los mismos.

6. El método de la reivindicación 4, en el que R⁸ es hidrógeno, hidroxil, halo - alquil C₁₋₆, hidroxil - alquilo C₁₋₆, ciano - alquilo C₁₋₆, alquilo carbonilo C₁₋₆ - alquilo C₁₋₆, imidazolil, o un radical de fórmula NR¹¹R¹² en el que R¹¹ es hidrógeno o alquilo C₁₋₁₂ y R¹² es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ - alquil carbonilo C₁₋₆, hidroxil, o un radical de fórmula - Alk² - OR¹³ en el que R¹³ es hidrógeno o alquilo C₁₋₆.

7. Un método según se define en la reivindicación 1, dicho al menos un marcador seleccionado del grupo entre IL - 6, MCP - 1, IL - 1β, MMP - 9, y TNF - α.

8. Un método según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que en una subetapa (ii), se utilizan las muestras plurales de sangre tratada del sujeto que fueron tomadas en intervalos periódicos de tiempo después del comienzo del tratamiento con el inhibidor de la farnesil transferasa.

9. Un método según se define en la reivindicación 1, en el que la muestra de sangre es sangre entera, plasma, suero, células totales, o células mononucleares de sangre periférica.

10. Un método según se define en la reivindicación 2, en el que las subetapas (b) (i) y (b) (ii) comprenden: aislar plasma de la muestra de sangre sin tratar mediante centrifugación para obtener un extracto de la muestra sin tratar, y (ii) aislar plasma de cada muestra de sangre tratada mediante centrifugación para obtener un extracto de sangre tratada.

- 5 11. Un método según se define en la reivindicación 2, en el que las subetapas (b) (i) y (b) (ii) comprenden: aislar las células mononucleares de sangre periférica de la muestra de sangre sin tratar por separación por gradiente Ficoll – Paque para obtener el extracto de la muestra sin tratar, y (ii) aislar las células mononucleares de sangre periférica por separación por gradiente Ficoll – Paque de cada muestra de sangre tratada para obtener el extracto de la muestra tratada.
- 10 12. Un método según se define en la reivindicación 2, comprende además: (i) estimular el extracto de la muestra sin tratar con lipopolisacáridos, y (ii) estimular el extracto de la muestra tratada con lipopolisacáridos.
- 15 13. Un método según se define en la reivindicación 3, en el que las subetapas (b) (i) y (b) (ii) comprenden cada una aislar las células mononucleares de sangre periférica utilizando la separación por gradiente Ficoll – Paque.
- 20 14. Un método según se define en la reivindicación 13, en el que el sujeto es un paciente en un ensayo clínico.
- 25 15. Un método según se define en las reivindicaciones 1 o 14, en el que el inhibidor de la farnesil transferasa utilizado para tratar al sujeto es tipifarnib.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

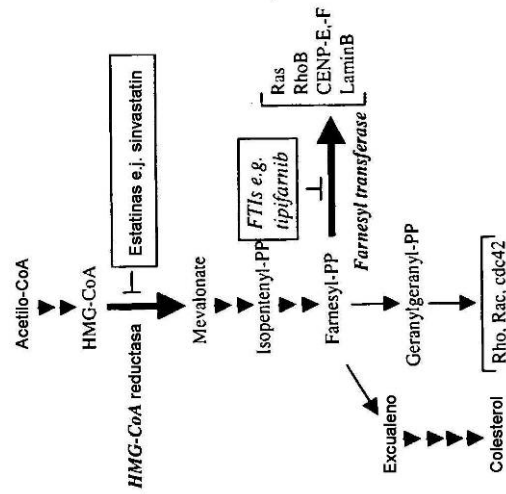


FIGURA 1

Vía mevalonato para síntesis de isoprenoides y colesterol

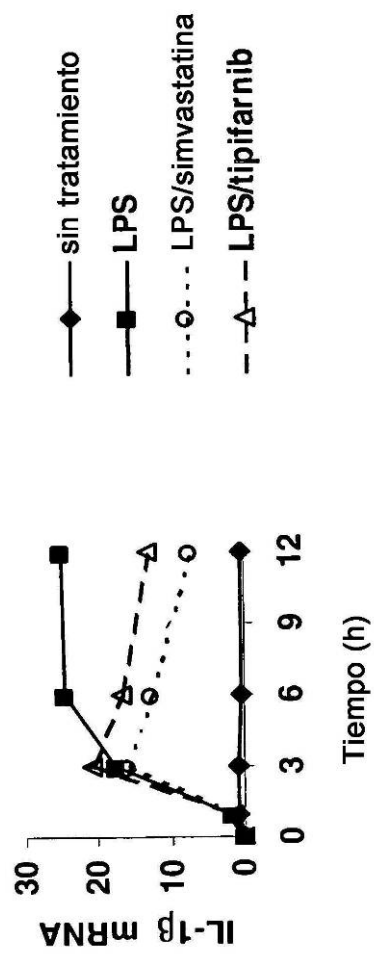


FIGURA 2.a

Efecto de la simvastatina y tipifarnib en la transcripción inducida por LPS de IL-1 β

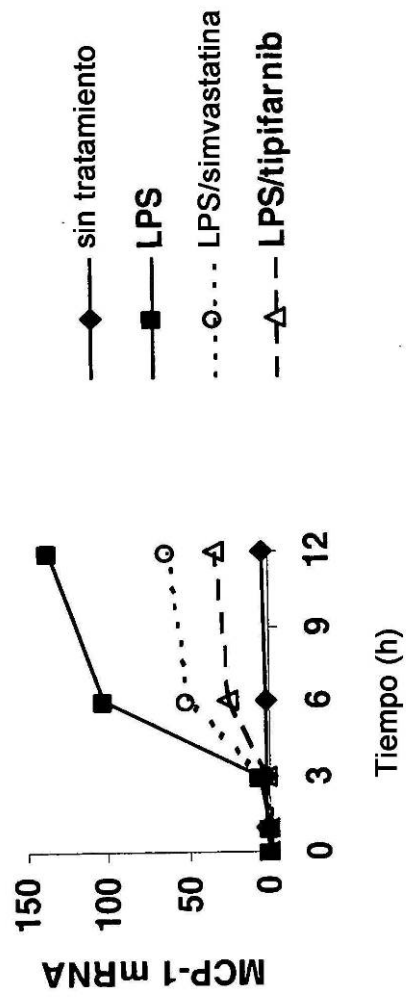


FIGURA 2.b

Efecto de la simvastatina y tipifarnib en la transcripción inducida por LPS de MCP-1

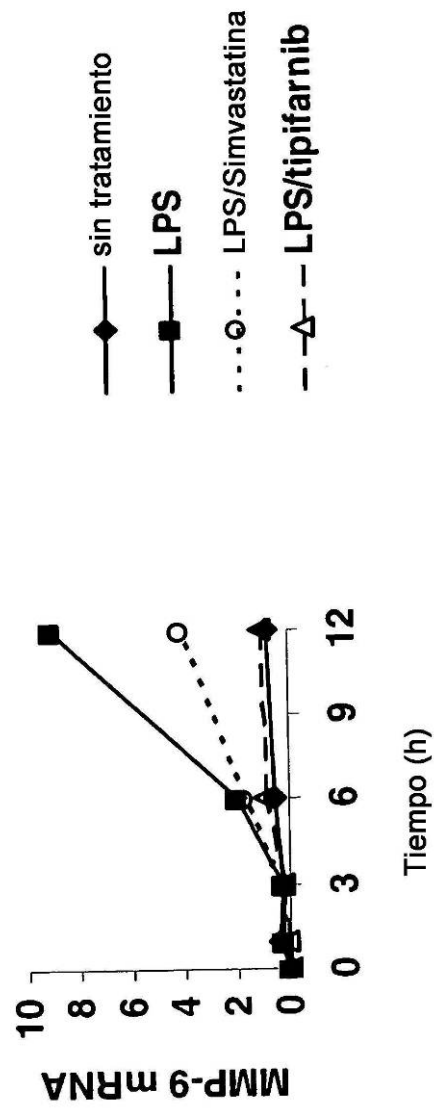
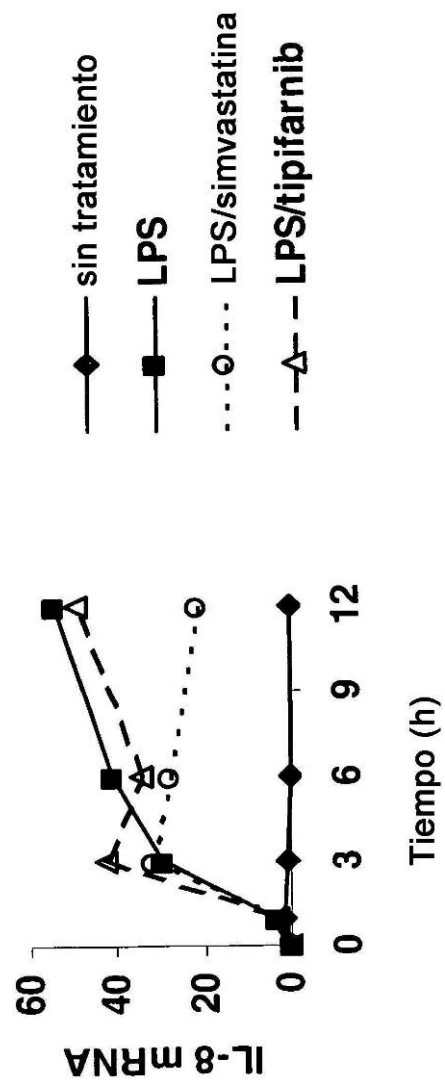


FIGURA 2.c

Efecto de la simvastatina y tipifarnib en la transcripción inducida por LPS de MMP-9

**FIGURA 2.d**

Efecto de la simvastatina y tipifarnib en la transcripción inducida por LPS de IL-8

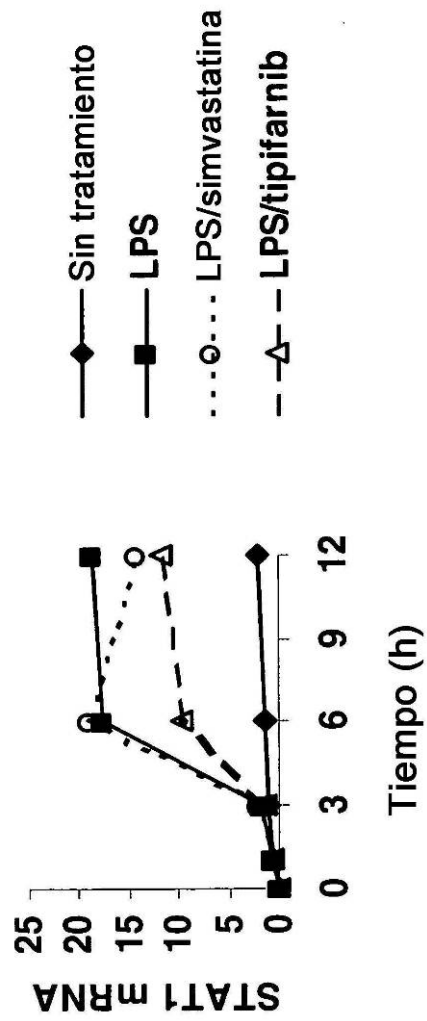


FIGURA 2.e

Efecto de la simvastatina y tipifarnib en la transcripción inducida por LPS de STAT1

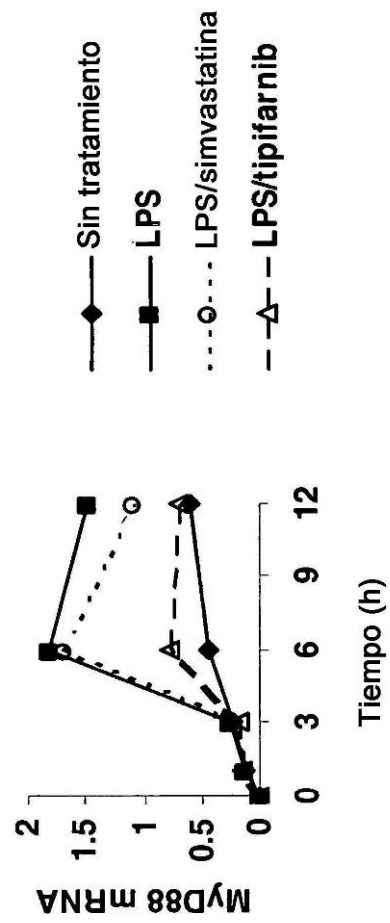
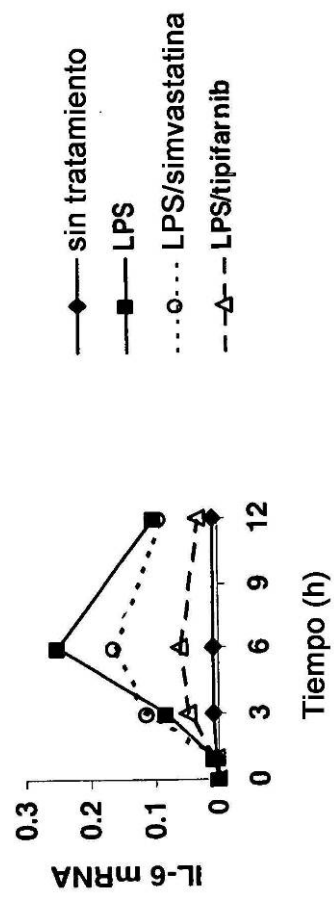


FIGURA 2.f

Efecto de la simvastatina y tipifarnib en la transcripción inducida por LPS de MyD88

**FIGURA 2.g**

Efecto de la simvastatina y tipifarnib en la transcripción inducida por LPS de IL-6

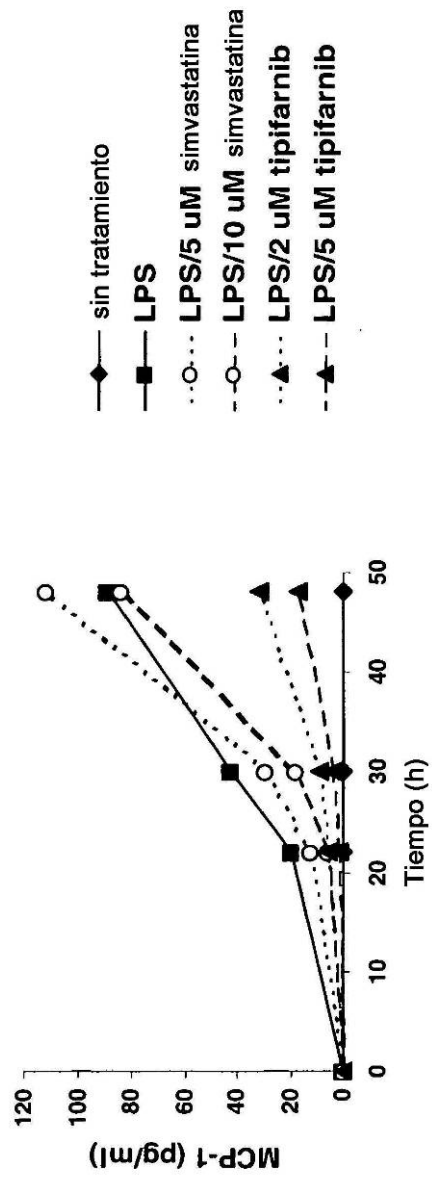


FIGURA 3.a

Efecto de la simvastatina y tipifarnib en la secreción inducida por LPS de MCP-1

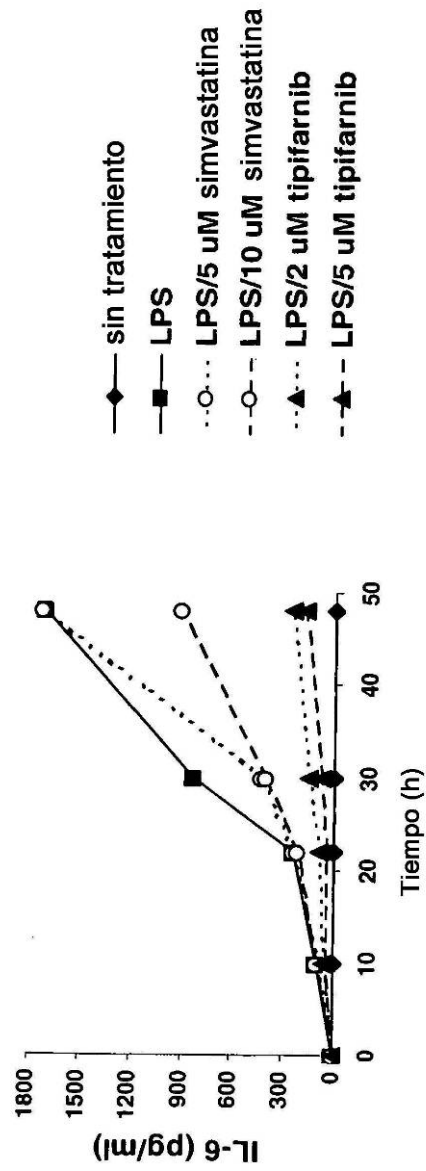


FIGURA 3.b

Efecto de la simvastatina y tipifarnib en la secreción inducida por LPS de IL-6

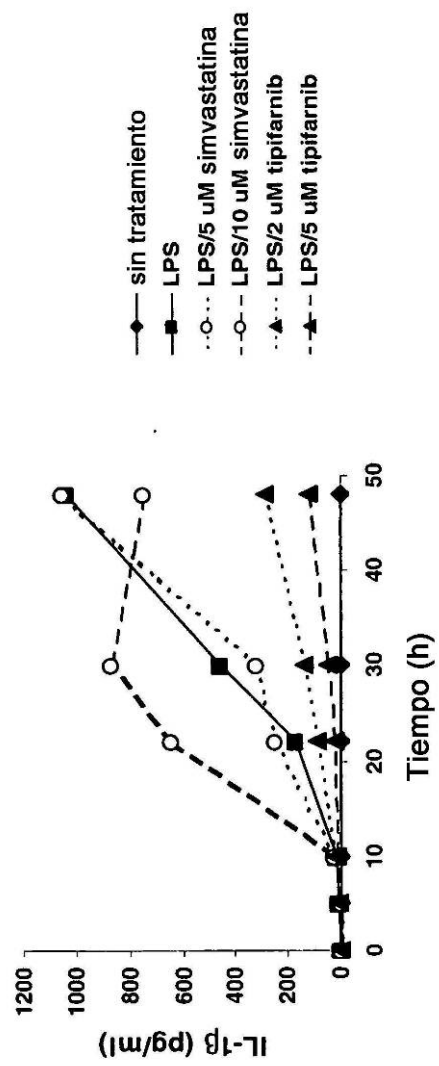


FIGURA 3.c

Efecto de la simvastatina y tipifarnib en la secreción inducida por LPS de IL-1 β

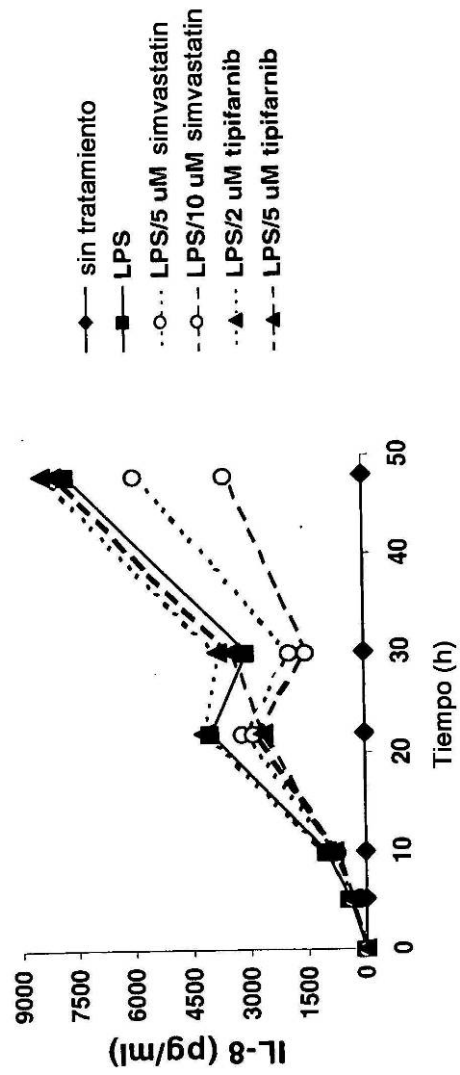
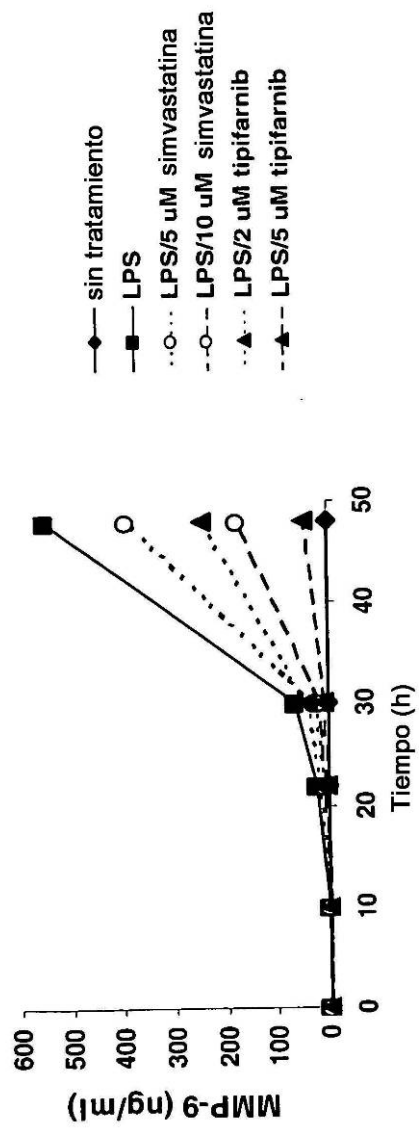


FIGURA 3.d

Efecto de la simvastatina y tipifarnib en la secreción inducida por LPS de IL-8

**FIGURA 3.e**

Efecto de la simvastatina y tipifarnib en la secreción inducida por LPS de MMP-9

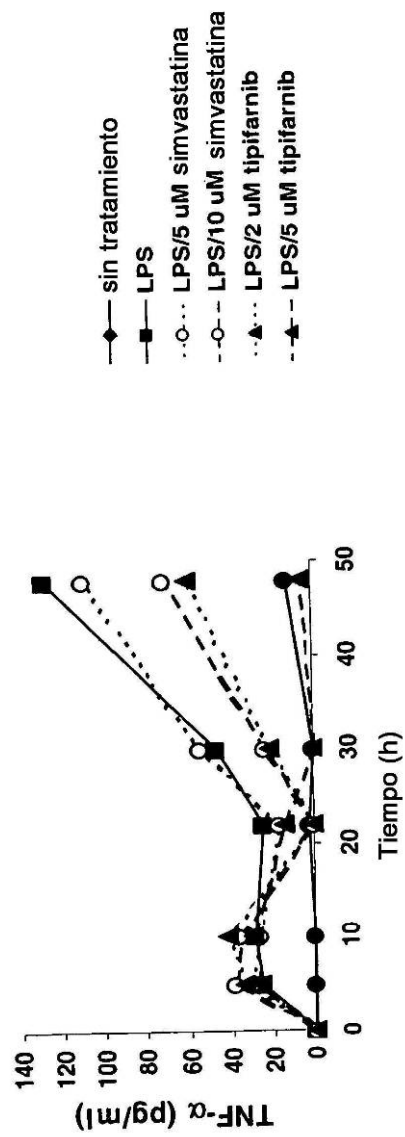


FIGURA 3.f

Efecto de la simvastatina y tipifarnib en la secreción inducida por LPS de TNF- α

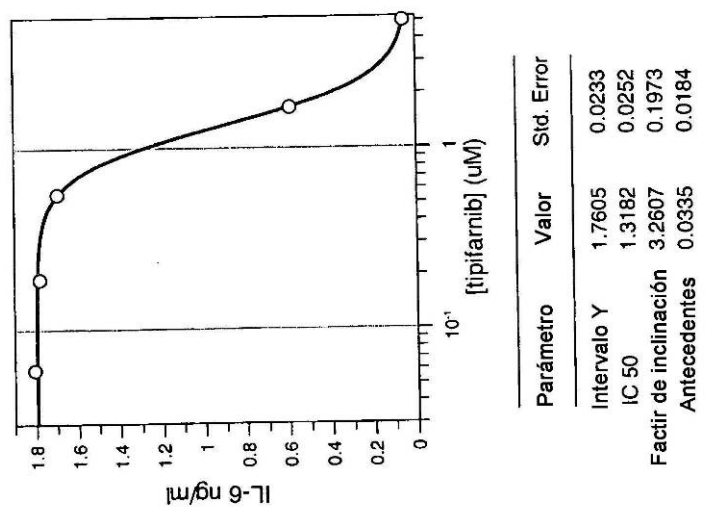


FIGURA 4

Inhibición de la liberación de IL-6 inducida por LPS por tipifarnib

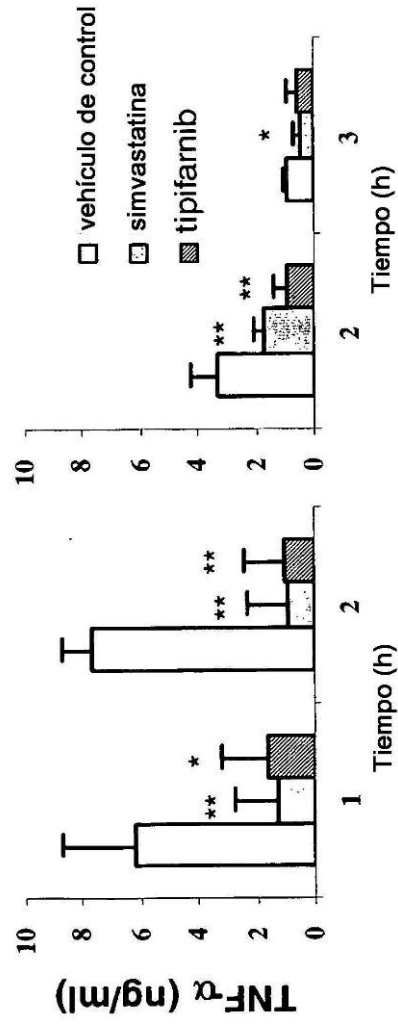


FIGURA 5.a

Efecto de la simvastatina y tipifarnib en la producción inducida por LPS de TNF- α *in vivo*

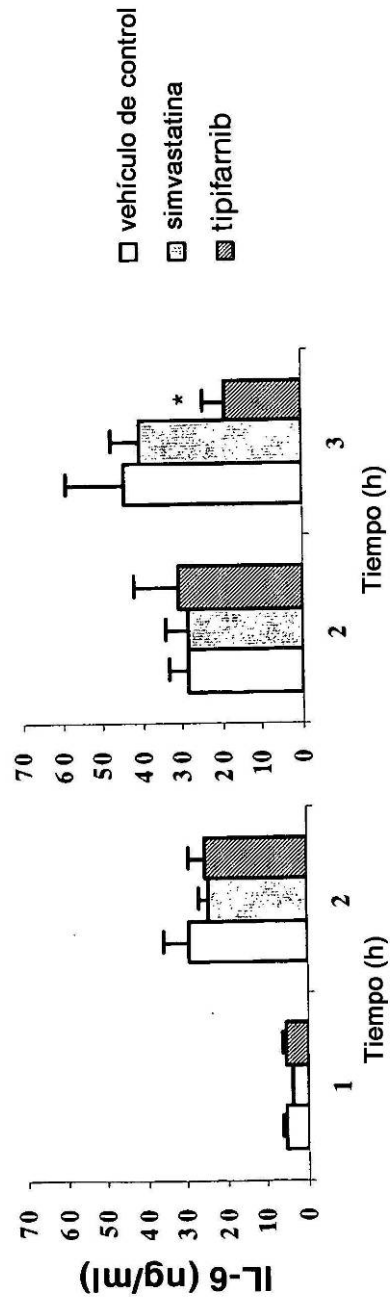


FIGURA 5.b

Efecto de la simvastatina y tipifarnib en la producción inducida por LPS de IL-6 *in vivo*

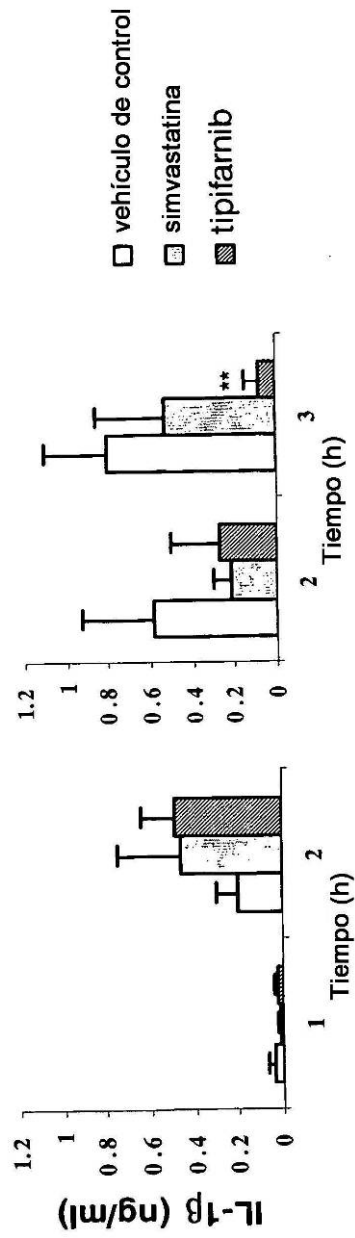


FIGURA 5.C

Efecto de la simvastatina y tipifarnib en la producción inducida por LPS de IL-1 β *in vivo*

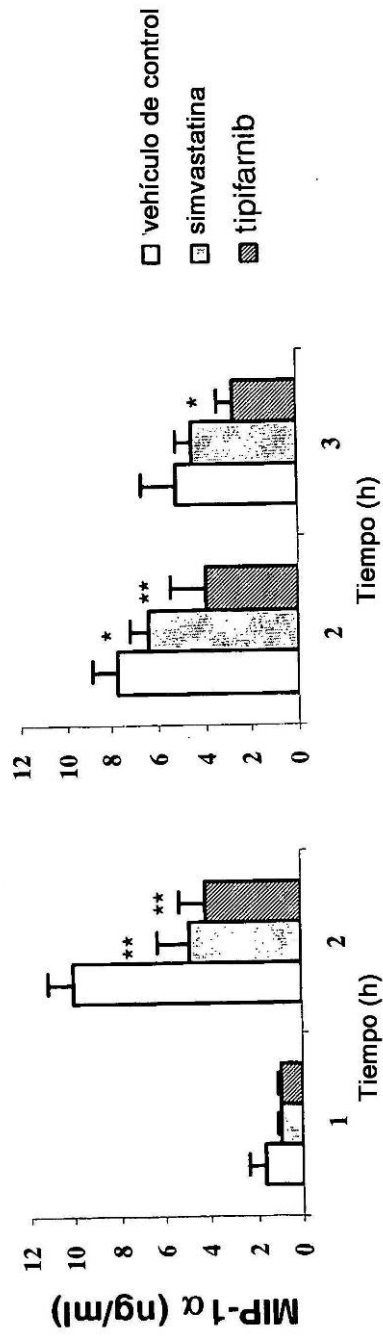


FIGURA 5.d

Efecto de la simvastatina y tipifarnib en la producción inducida por LPS de MIP-1α *in vivo*

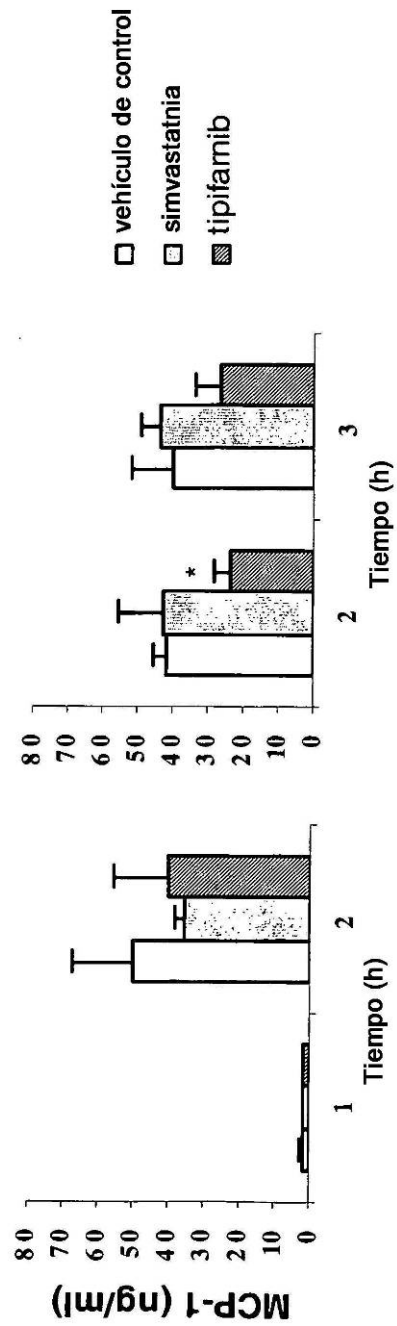


FIGURA 5.e

Efecto de la simvastatina y tipifarnib en la producción inducida por LPS de MCP-1 *in vivo*

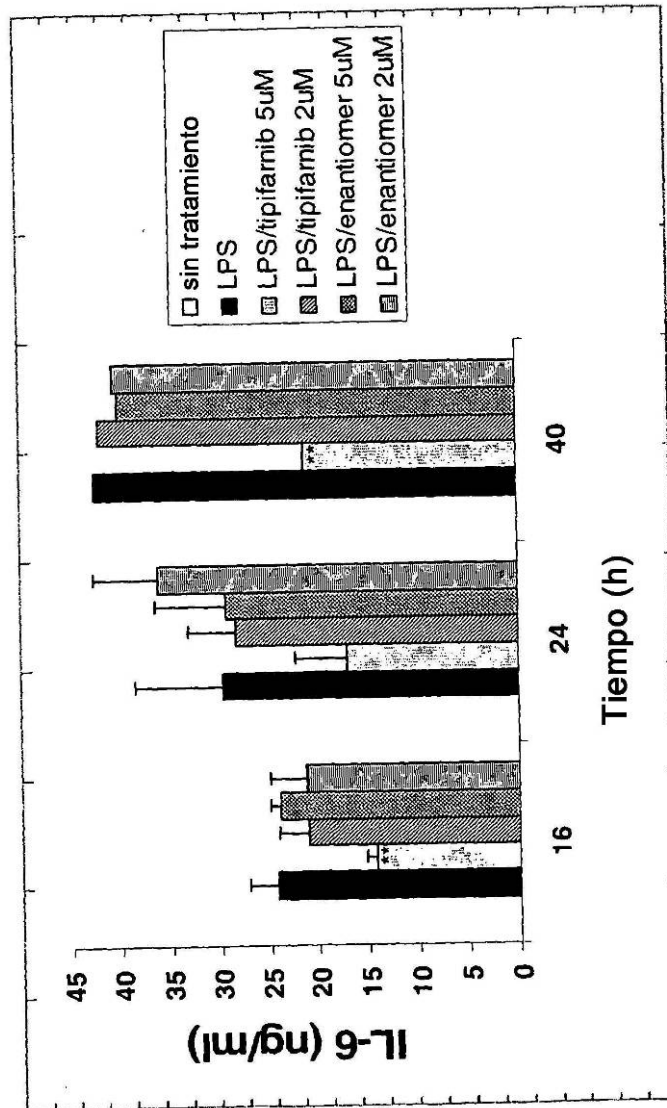


FIGURA 6

Inhibición de producción de IL-6 inducida por LPS en humanos PBMC por tipifarnib, pero no en el enantiomero menos activo de tipifarnib

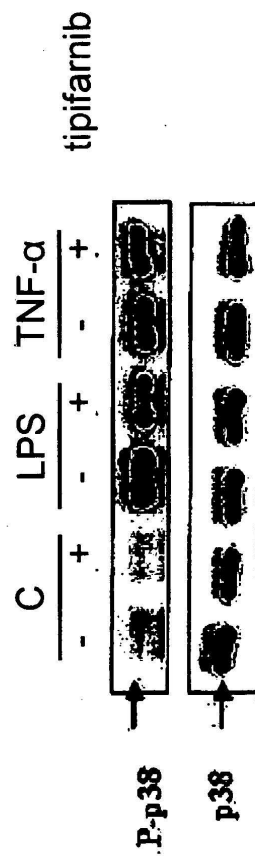


FIGURA 7.a

Efecto del tipifarnib en LPS, TNF- α , - fosforilación inducida por p38 y expresión



FIGURA 7.b

Efecto de la tipifarnib en LPS, TNF-α, degradación IκB-α de IL-1 inducido, fosforilación Erk1/2 y farnesilación de H-Ras

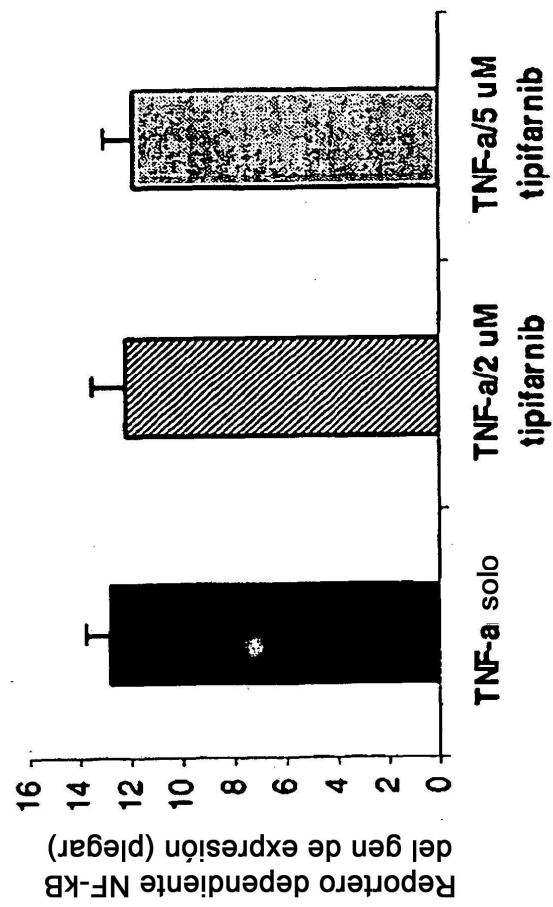


FIGURA 8