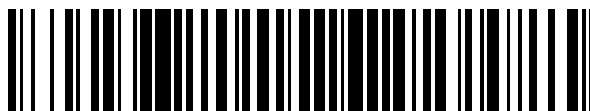


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 485**

51 Int. Cl.:

A61K 31/502 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2010** **E 10755044 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014** **EP 2475368**

54 Título: **N-(4-((3-(2-amino-4-pirimidinil)-2-piridinil)oxi)fenil)-4-(4-metil-2-tienil)-1-ftalazinamina para su uso en el tratamiento del cáncer resistente a agentes antimitóticos**

30 Prioridad:

11.09.2009 US 241527 P

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

10.02.2015

73 Titular/es:

AMGEN, INC (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320-1799, US

72 Inventor/es:

PAYTON, MARC y
KENDALL, RICHARD

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 528 485 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

N-4-((3-(2-amino-4-pirimidinil)-2-piridinil)oxi)fenil)-4-(4-metil-2-tienil)-1-ftalazinamina para su uso en el tratamiento del cáncer resistente a agentes antimitóticos

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a N-4-((3-(2-amino-4-pirimidinil)-2-piridinil)oxi)fenil)-4-(4-metil-2-tienil)-1-ftalazinamina para su uso en el tratamiento de cánceres, incluyendo tumores sólidos, que se han hecho resistentes al tratamiento con agentes antimitóticos y/o otros agentes quimioterápicos.

Antecedentes de la invención

- 10 El cáncer es una de las enfermedades más extendidas que afectan a la humanidad, y una causa principal de muerte en todo el mundo. Sólo en los Estados Unidos, el cáncer es la segunda causa principal de muerte, superado sólo por la cardiopatía. El cáncer se caracteriza a menudo por desregulación de los procesos celulares normales o por proliferación celular no regulada. Las células que se han transformado en células cancerosas tienden a proliferar de una manera no controlada y no regulada lo que conduce, en algunos casos, a metástasis o propagación del cáncer. La desregulación de la proliferación celular podría resultar de la modificación en uno o más genes, responsables de las rutas celulares que controlan la progresión del ciclo celular. O podría resultar de modificaciones en el ADN (incluyendo, pero sin limitarse a mutaciones, amplificaciones, transposiciones, deleciones y silenciamiento génico epigenético) en uno o más reguladores de puntos de control del ciclo celular que permiten que la célula cambie de una fase del ciclo celular a otra de manera no controlada. Otra forma es que modificaciones en la propia maquinaria celular podrían dar como resultado errores mitóticos que no se detectan o reparan apropiadamente, y podría permitirse que la célula avanzara por el ciclo celular de manera no controlada.

- 20 La mitosis es el proceso mediante el cual una célula eucariota segrega sus cromosomas duplicados dando lugar a dos núcleos hijos idénticos. Generalmente va seguida inmediatamente por la citocinesis, que divide los núcleos, el citoplasma, los orgánulos y las membranas celulares en dos células hijas que contienen partes prácticamente iguales de estos componentes celulares. La mitosis y la citocinesis juntas definen la fase mitótica (M) del ciclo celular: la división de la célula madre en dos células hijas, genéticamente idénticas entre sí y a su célula original.

- 25 El proceso de mitosis es complejo y está altamente regulado. La secuencia de acontecimientos se divide en distintas fases, correspondientes a la finalización de un conjunto de actividades y al comienzo del siguiente. Estas fases son profase, prometafase, metafase, anafase y telofase. Durante el proceso de mitosis, los cromosomas duplicados se condensan y se unen a fibras que tiran de las cromátidas hermanas hacia lados opuestos de la célula. La célula se divide entonces en la citocinesis, para producir dos células hijas idénticas. Los errores en la mitosis o bien pueden destruir una célula a través de apoptosis o bien pueden producir segregación errónea de los cromosomas, lo que puede conducir a cáncer.

- 30 Normalmente, se activan puntos de control del ciclo celular si se detectan errores en el ADN (por ejemplo, daño en el ADN). Si no pueden repararse estos errores en el genoma, la célula normalmente experimenta apoptosis. Sin embargo, si se permite que la célula avance por su ciclo celular y progrese de manera no controlada, entonces pueden acumularse más mutaciones a lo largo del tiempo. Estas modificaciones génicas pueden acumularse y finalmente conducir a una progenie celular con características neoplásicas premalignas o malignas (por ejemplo proliferación no controlada) a través de adaptación.

- 35 Los agentes antimitóticos son agentes anticancerígenos que inhiben la función de los microtúbulos. Los microtúbulos son polímeros de proteína formados por heterodímeros de α -tubulina y β -tubulina que desempeñan un papel importante en la formación del aparato del huso mitótico y la citocinesis al final de la mitosis. Los agentes anticancerígenos que seleccionan como diana los microtúbulos representan un enfoque comprobado para intervenir en la proliferación de células cancerosas.

- 40 Se han desarrollado varias clases de agentes antimitóticos como agentes anticancerígenos. Los taxanos son la clase de agentes antimitóticos más destacada que incluye paclitaxel (Taxol) y docetaxel (Taxotere). Los alcaloides de la vinca son una clase de agentes desestabilizadores de microtúbulos que incluye vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina. Otra clase emergente incluye las epotilonas (ixabepilona). Estos agentes antimitóticos actúan impidiendo la proliferación de células cancerosas o bien estabilizando o bien desestabilizando microtúbulos. Esta inhibición directa de los microtúbulos da como resultado la detención celular y la muerte a través de apoptosis o catástrofe mitótica. El paclitaxel fue el primer compuesto de la serie de taxanos que se descubrió. El docetaxel, un análogo estructural de paclitaxel, se descubrió más tarde. El paclitaxel y el docetaxel se usan comúnmente para tratar una variedad de tumores malignos humanos, incluyendo cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer esofágico, cáncer de próstata y sarcoma de Kaposi relacionado con sida. El principal efecto secundario de los taxanos es la mielosupresión, principalmente neutropenia, mientras que otros efectos secundarios incluyen edema periférico y neurotoxicidad (neuropatía periférica).

La resistencia a taxanos es un factor de complicación para el tratamiento satisfactorio del cáncer y a menudo está asociada con el aumento de la expresión del gen codificado *mdr-1* y su producto, la glicoproteína P (gp-P). Otros

mecanismos documentados de resistencia adquirida a taxanos incluyen mutaciones, sobreexpresión, amplificación y cambio de isotipo de tubulina). Las mutaciones en la α - o β -tubulina inhiben la unión de los taxanos en el lugar correcto en los microtúbulos; esto vuelve al fármaco ineficaz. Además, algunas células resistentes también muestran aumento de aurora cinasa, una enzima que promueve la finalización de la mitosis.

5 Los alcaloides de la vinca (*Vincas*; también denominados alcaloides vegetales), pueden unirse a la subunidad de β -tubulina de los microtúbulos, bloqueando su capacidad para polimerizarse con la subunidad de α -tubulina para formar microtúbulos completos. Esto hace que el ciclo celular se detenga en metafase conduciendo a muerte celular apoptótica porque, en ausencia de un huso mitótico intacto, los cromosomas duplicados no pueden alinearse a lo largo de la placa de división. La investigación ha identificado alcaloides de la vinca asimétricos diméricos: vinblastina, vincristina, vinorelbina y vindesina, siendo cada uno de ellos útil en el tratamiento del cáncer, incluyendo cánceres de vejiga y testicular, sarcoma de Kaposi, neuroblastoma y enfermedad de Hodgkin, y carcinoma de pulmón y cáncer de mama. Los principales efectos secundarios de los alcaloides de la vinca son que pueden producir neurotoxicidad y mielosupresión en pacientes.

15 Puede producirse rápidamente resistencia a los alcaloides de la vinca en modelos experimentales. Los efectos antitumorales de los alcaloides de la vinca pueden bloquearse en líneas celulares resistentes a múltiples fármacos que sobreexpresan transportadores de flujo de salida de fármacos mediado por transportadores de casete de unión a ATP (ABC) tales como gp-P y MRP1. Otras formas de resistencia se derivan de mutaciones en β -tubulina que impiden la unión de los inhibidores a su diana.

20 Otros agentes quimioterápicos incluyen inhibidores de topoisomerasa, tales como irinotecán y topotecán (inhibidores de tipo I) y amsacrina, etopósido, fosfato de etopósido y tenopósido (inhibidores de tipo II). Los inhibidores de topoisomerasa afectan a la síntesis de ADN y, en particular, trabajan impidiendo la transcripción y replicación del ADN.

25 Aún otra clase de agentes quimioterápicos es la clase de antibióticos de antraciclina que incluye daunorubicina, doxorubicina, idarubicina, epirubicina y mitoxantrona. Actualmente, las antraciclinas se usan para tratar un gran número de cánceres incluyendo linfomas, leucemias y cánceres de útero, ovario, pulmón y mama. Las antraciclinas funcionan formando radicales libres de oxígeno que rompen las hebras del ADN inhibiendo de ese modo la síntesis y la función del ADN. Uno de los principales efectos secundarios de las antraciclinas es que pueden dañar células del músculo cardíaco conduciendo a toxicidad cardíaca.

30 La resistencia a agentes anticancerígenos, incluyendo agentes quimioterápicos y agentes antimitóticos, se ha convertido en un inconveniente principal en el tratamiento del cáncer. Tal resistencia ha dado como resultado pacientes que llegan a tener resistencia cruzada a los efectos de muchos fármacos diferentes. Más particularmente, la resistencia a múltiples fármacos es un problema. Además, tal resistencia a tratamiento(s) anticancerígeno(s) conduce inevitablemente a la muerte del paciente. Por consiguiente, el desarrollo de resistencia a fármacos sigue siendo un problema con todas las terapias anticancerígenas y, por consiguiente, sigue habiendo la necesidad de identificar un tratamiento para cánceres que ya no responden, o que son sólo ligeramente eficaces, a los tratamientos contra el cáncer, incluyendo tratamiento tradicional con agentes quimioterápicos, tales como taxanos y alcaloides de la vinca, así como agentes anticancerígenos que se someten a pruebas clínicas para su aprobación normativa.

Breve descripción de los dibujos/las figuras

40 La figura 1 es un gráfico que representa los efectos de AMG 900 y Taxol sobre las líneas celulares MES-SA y MES-SA Dx5, valores de CE_{50} de p-histona H3;

la figura 2 es un gráfico que representa los efectos de AMG 900 y Taxol sobre las líneas celulares NCI-H460 original y NCI-H460 resistente a Taxol, valores de CE_{50} de contenido en ADN del ciclo celular;

45 la figura 3 es un gráfico que representa el efecto de AMG 900 y Taxol sobre las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-231 resistente a Taxol, valores de CE_{50} de contenido en ADN del ciclo celular;

la figura 4 es un gráfico que ilustra cómo inhibe AMG 900 el crecimiento de tumores de xenoinjerto de MES-SA Dx5 establecidos; y

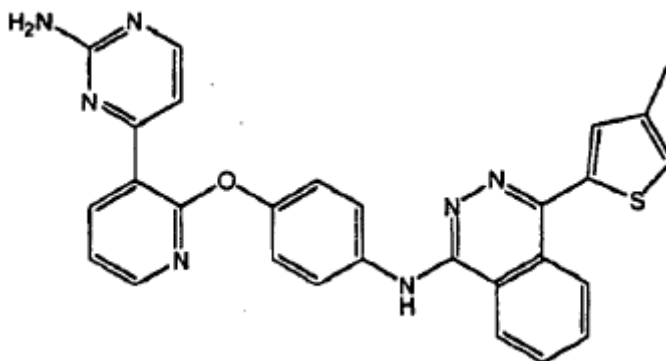
la figura 5 es un gráfico que representa los efectos del tratamiento con AMG 900 y Taxol sobre el crecimiento de xenoinjertos resistentes a Taxol de NCI-H460 establecidos.

50 La figura 6 es un gráfico que representa los efectos de AMG 900 sobre las líneas celulares HCT116 original, HCT116 resistente a AZD1152 y líneas celulares resistentes a paclitaxel.

Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona el compuesto N-(4-((3-(2-amino-4-pirimidinil)-2-piridinil)oxi)fenil)-4-(4-metil-2-tienil)-1-ftalazinamina (también denominado en el presente documento "AMG 900" o "el compuesto") y formas de sal

farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso en el tratamiento de cánceres avanzados, incluyendo tumores sólidos y células cancerosas, que son refractarios a agentes antimitóticos aprobados por el gobierno, de tratamiento de referencia tales como taxanos, incluyendo paclitaxel y docetaxel y otros agentes quimioterápicos, incluyendo doxorubicina y otros agentes que se administran en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer. AMG 900 tiene la estructura química de:



La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende este compuesto, o una forma de sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento terapéutico, profiláctico, agudo o crónico de cáncer y células cancerosas en pacientes que se han tratado previamente con agentes quimioterápicos, incluyendo agentes antimitóticos. En una realización, la invención proporciona el uso de AMG 900 en la fabricación de medicamentos y composiciones farmacéuticas para el de tratamiento del cáncer en sujetos que se han tratado previamente con agentes antimitóticos, incluyendo inhibidores del huso mitótico y agentes antimicrotubulina, u otros fármacos usados en la quimioterapia contra el cáncer (también denominados en el presente documento agentes quimioterápicos), incluyendo doxorubicina, daunorubicina, dactinomicina, colchicina, vinblastina, vincristina, etopósido y mitoxantrona. En otra realización, la invención proporciona una cantidad de dosificación eficaz de AMG 900 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de tipos de tumor resistentes a taxano, incluyendo cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama y cáncer de próstata que no responde al tratamiento con hormonas en un sujeto.

Descripción detallada de la invención

Se ha encontrado que AMG 900, un inhibidor de aurora cinasa, proporciona una ventaja sorprendente e inesperada sobre los agentes terapéuticos contra el cáncer de tratamiento de referencia actuales que seleccionan como diana tubulina (tales como paclitaxel, ixabepilona y alcaloides de la vinca) y otros agentes quimioterápicos (tales como doxorubicina), incluyendo AZD1152, en ensayos clínicos humanos. Particularmente, AMG 900 ofrece eficacia en la inhibición o ralentización de la progresión o el crecimiento de tumores que llegan a tener resistencia cruzada a agentes antimitóticos a través de una variedad de mecanismos propuestos, incluyendo por ejemplo, a través del flujo de salida de fármacos mediado por transportadores de casete de unión a ATP (ABC), amplificación o modificación génica de tubulina, o alteraciones estructurales en una proteína α o β -tubulina. Además, AMG 900 selecciona como diana células en proliferación en la fase G₂M del ciclo celular y por tanto es poco probable que produzca la neuropatía periférica observada con antimitóticos que seleccionan como diana microtúbulos.

Definiciones

Las siguientes definiciones deben ayudar adicionalmente en la comprensión del alcance de la invención descrita en el presente documento.

Los términos “cáncer” y “canceroso” cuando se usan en el presente documento se refieren a o describen el estado fisiológico en sujetos que normalmente se caracteriza por crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen carcinoma, linfoma, sarcoma, blastoma y leucemia. Los ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon y cáncer de cabeza y cuello. Aunque el término “cáncer” tal como se usa en el presente documento no se limita a ninguna forma específica de la enfermedad, se cree que los métodos de la invención serán particularmente eficaces para cánceres, en un sujeto, que se han hecho resistentes en algún grado al tratamiento con agentes anticancerígenos, incluyendo agentes quimioterápicos, agentes antimitóticos, antraciclinas y similares, y para cánceres que han experimentado recidiva tras el tratamiento con tales agentes anticancerígenos.

El término “agente quimioterápico” cuando se usa en el presente documento se refiere al tratamiento de un cáncer destruyendo células cancerosas. Este término se refiere adicionalmente a fármacos antineoplásicos usados para tratar cáncer o a una combinación de estos fármacos en un régimen de tratamiento normalizado. Los ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen agentes alquilantes tales como cisplatino, carboplatino, oxaliplatino; alcaloides incluyendo alcaloides de la vinca (los ejemplos incluyen vincristina, vinblastina, vinorelbina y vindesina) y taxanos

(los ejemplos incluyen paclitaxel (Taxol) y docetaxel); inhibidores de topoisomerasa tales como irinotecán, topotecán, amsacrina, etopósido, fosfato de etopósido y tenipósido; y diversos agentes antineoplásicos tales como dactinomicina, doxorubicina, epirubicina, bleomicina y otros.

5 El término “que comprende” pretende ser abierto, incluyendo el/los componente(s) indicado(s) pero sin excluir otros elementos.

El término “resistente a múltiples fármacos” cuando se usa en el presente documento se refiere a células cancerosas que presentan resistencia a múltiples fármacos de diferentes estructuras químicas y/o que presentan resistencia a fármacos dirigidos a diferentes dianas.

10 El término “refractario” cuando se usa en el presente documento pretende referirse a que no cede a, es resistente o no es sensible al tratamiento, estímulos (terapia) o cura, incluyendo resistencia a múltiples agentes curativos terapéuticos. “Refractario” cuando se usa en el presente documento en el contexto de caracterizar un cáncer o tumor pretende referirse al cáncer o tumor que no responde o que tiene una respuesta resistente o disminuida al tratamiento con uno o más agentes anticancerígenos. El tratamiento normalmente es continuo, prolongado y/o repetitivo a lo largo de un periodo de tiempo dando como resultado que el cáncer o tumor desarrolle resistencia o que llegue a ser refractario a ese mismo tratamiento.

15 El término “sujeto” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier mamífero, incluyendo seres humanos y animales, tales como vacas, caballos, perros y gatos. Por tanto, la invención puede usarse en pacientes humanos así como en sujetos y pacientes veterinarios. En una realización de la invención, el sujeto es un ser humano.

20 Se pretende que la expresión “terapéuticamente eficaz” cuantifique la cantidad del compuesto (AMG 900) que logrará una reducción en el tamaño o la gravedad del cáncer o tumor a lo largo del tratamiento del cáncer mediante terapias contra el cáncer antimitóticas convencionales, mientras se reducen o evitan efectos secundarios adversos asociados normalmente con las terapias contra el cáncer antimitóticas convencionales.

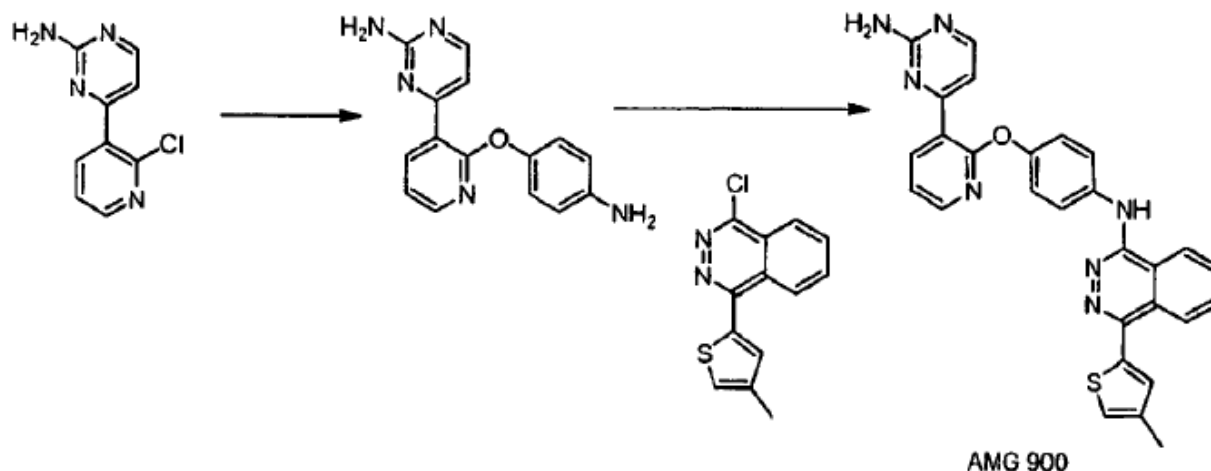
25 Los términos “tratar”, “que trata” y “tratamiento” tal como se usan en el presente documento se refieren a terapia, incluyendo terapia curativa, terapia profiláctica y terapia preventiva. El tratamiento profiláctico generalmente constituye o bien impedir la aparición de los trastornos completamente o bien retrasar la aparición de una fase preclínicamente evidente de trastornos en individuos.

30 El término “sales farmacéuticamente aceptables” abarca sales usadas comúnmente para formar sales de metales alcalinos y para formar sales de adición de ácidos libres o bases libres. La naturaleza de la sal no es crítica, siempre que sea farmacéuticamente-aceptable. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables adecuadas del compuesto pueden prepararse a partir de un ácido inorgánico o a partir de un ácido orgánico. Los ejemplos de tales ácidos inorgánicos incluyen ácido clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, carbónico, sulfúrico y fosfórico. Los ejemplos de ácidos orgánicos incluyen las clases alifática, cicloalifática, aromática, arilalifática, heterocíclica, carboxilica y sulfónica de ácidos orgánicos, ejemplos de los cuales son ácido fórmico, acético, adípico, butírico, propiónico, succínico, glicólico, glucónico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, glucurónico, maleico, fumárico, pirúvico, aspártico, glutámico, benzoico, antranílico, mesílico, 4-hidroxibenzoico, fenilacético, mandélico, embónico (pamoico), metanosulfónico, etanosulfónico, etanodisulfónico, bencenosulfónico, pantoténico, 2-hidroxietanosulfónico, toluenosulfónico, sulfanílico, ciclohexilaminosulfónico, canfórico, canforsulfónico, diglucónico, ciclopentanopropiónico, dodecilsulfónico, glucoheptanoico, glicerofosfónico, heptanoico, hexanoico, 2-hidroxietanosulfónico, nicotínico, 2-naftalenesulfónico, oxálico, palmoico, pectínico, persulfúrico, 2-fenilpropiónico, pícrico, piválico, propiónico, succínico, tartárico, tiocianico, mesílico, undecanoico, esteárico, algínico, β -hidroxibutírico, salicílico, galactárico y galacturónico.

45 Las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables adecuadas del compuesto incluyen sales metálicas tales como sales compuestas por aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio y zinc, o sales compuestas por bases orgánicas incluyendo aminas primarias, secundarias, terciarias y aminas sustituidas incluyendo aminas cíclicas tales como cafeína, arginina, dietilamina, N-etilpiperidina, histidina, glucamina, isopropilamina, lisina, morfolina, N-etilmorfolina, piperazina, piperidina, trietilamina, trimetilamina. Todas las sales contempladas en el presente documento pueden prepararse mediante medios convencionales a partir del compuesto correspondiente haciendo reaccionar, por ejemplo, el ácido o la base apropiado con el compuesto.

50 AMG 900, N-(4-((3-(2-amino-4-pirimidinil)-2-piridinil)oxi)fenil)-4-(4-metil-2-tienil)-1-ftalazinamina, puede prepararse mediante un procedimiento análogo al descrito en la publicación PCT WO2007087276, Métodos de ejemplo A1 o A2 en la pág. 70 pero usando 1-cloro-4-(4-metil-2-tienil)ftalazina como material de partida, conjuntamente con los ejemplos 15 (pág. 50), 25 (pág. 55) y 30 (pág. 59). Estos procedimientos también se describen en la patente estadounidense n.º 7.560.551. Específicamente, AMG 900 puede prepararse tal como se describe en el ejemplo 1 a continuación.

Ejemplo 1



Síntesis de N-4-((3-(2-amino-4-pirimidinil)-2-piridinil)oxi)fenil)-4-(4-metil-2-tienil)-1-ftalazinamina (AMG 900)

Etapas 1: 4-(2-Cloropiridin-3-il)pirimidin-2-amina

En un matraz de fondo redondo de 500 ml purgado con argón colocado en un baño de isopropanol, se añadió metal de sodio (3,40 g, 148 mmol) lentamente a metanol (180 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente (TA) durante aproximadamente 30 minutos. A esto se le añadió clorhidrato de guanidina (12,0 ml, 182 mmol) y se agitó la mezcla a TA durante 30 minutos, seguido por la adición de (E)-1-(2-cloropiridin-3-il)-3-(dimetilamino)prop-2-en-2-ona (12,0 g, 57,0 mmol), se unió un condensador de aire, se cambió la reacción a un baño de aceite, donde se calentó hasta aproximadamente 50°C durante 24 h. Se evaporó aproximadamente la mitad del metanol a presión reducida y se filtraron los sólidos a vacío, luego se lavaron con bicarbonato de sodio saturado (NaHCO₃) y H₂O, se secaron al aire para producir 4-(2-cloropiridin-3-il)pirimidin-2-amina como un sólido blanquecino. EM m/z = 207 [M+1]⁺. Calculado para C₉H₇ClN₄: 206,63.

Etapas 2: 4-(2-(4-Aminofenoxi)piridin-3-il)pirimidin-2-amina

A un tubo resellable se le añadió 4-aminofenol (1,3 g, 12 mmol), carbonato de cesio (7,8 g, 24 mmol) y DMSO (16 ml, 0,75 M). Se calentó la mezcla hasta 100°C durante 5 minutos, y luego se añadió 4-(2-cloropiridin-3-il)pirimidin-2-amina (2,5 g, 12 mmol), y se calentó la mezcla de reacción hasta 130°C durante la noche. Tras la finalización, tal como se determinó mediante CL-EM, se dejó que la mezcla de reacción se enfriase hasta TA y se diluyó con agua. Se filtró el precipitado resultante y se lavó el sólido con agua y dietil éter. Entonces se llevó el sólido a CH₂Cl₂:MeOH 9:1 y se hizo pasar a través de un lecho de gel de sílice con CH₂Cl₂:MeOH 9:1 como eluyente. Se concentró el disolvente a vacío para proporcionar el producto deseado, 4-(2-(4-aminofenoxi)piridin-3-il)pirimidin-2-amina. EM m/z = 280 [M+1]⁺. Calculado para C₁₅H₁₃N₅O: 279,30.

Etapas 3: 1-Cloro-4-(4-metil-2-tienil)ftalazina

Se añadieron 1,4-dicloroftalazina (1,40 g, 7,03 mmol), ácido 4-metil-2-tienilborónico (999 mg, 7,03 mmol) y PdCl₂(DPPF) (721 mg, 985 μmol) a un tubo sellado. Se purgó el tubo con argón. Entonces se añadieron carbonato de sodio (2,0 M en agua) (7,74 ml, 15,5 mmol) y 1,4-dioxano (35,2 ml, 7,03 mmol). Se selló el tubo, se agitó a TA durante 5 min y se colocó en un baño de aceite precalentado a 110°C. Tras 1 h, la CL-EM mostró el producto y el subproducto (acoplamiento doble) y el material de partida dicloroftalazina. Se enfrió la reacción hasta TA, se filtró a través de un lecho de Celite con la ayuda de acetato de etilo (EtOAc), se concentró y se recogió sobre la columna. Se purificó el producto mediante cromatografía en columna usando Hex para eliminar la parte superior, luego hexanos:EtOAc 80:20 para recoger el producto. Se obtuvo el producto, 1-cloro-4-(4-metil-2-tienil)ftalazina, como un sólido amarillo. La CL-EM mostró que el producto estaba contaminado con una pequeña cantidad de dicloroftalazina y subproducto de acoplamiento doble. EM m/z = 261 [M+1]⁺. Calculado para C₁₃H₉ClN₂S: 260,12.

Etapas 4: N-4-((3-(2-amino-4-pirimidinil)-2-piridinil)oxi)fenil)-4-(4-metil-2-tienil)-1-ftalazinamina

A 4-(2-(4-aminofenoxi)piridin-3-il)pirimidin-2-amina y 1-cloro-4-(4-metil-2-tienil)ftalazina se le añadió tBuOH. Se calentó la mezcla resultante a 100°C en un tubo sellado durante 16 horas. Se diluyó la reacción con dietil éter y carbonato de sodio saturado y se agitó vigorosamente. Se filtraron los sólidos resultantes y se lavaron con agua, dietil éter y se secaron al aire para producir N-4-((3-(2-amino-4-pirimidinil)-2-piridinil)oxi)fenil)-4-(4-metil-2-tienil)-1-ftalazinamina como un sólido blanquecino. EM m/z = 504 [M+H]⁺. Calculado para C₂₈H₂₁N₇OS: 503,58.

Método de CL-EM:

Se ejecutaron las muestras en un sistema de CL-DEM de Agilent modelo 1100 con una columna de fase inversa de Agilent Technologies XDB-C₈ (3,5 μ) (4,6 x 75 mm) a 30°C. La velocidad de flujo fue constante y osciló entre aproximadamente 0,75 ml/min y aproximadamente 1,0 ml/min.

- 5 La fase móvil usó una mezcla de disolvente A (H₂O/HOAc al 0,1%) y disolvente B (AcCN/HOAc al 0,1%) con un periodo de tiempo de 9 min para un gradiente de desde el 10% hasta el 90% de disolvente B. Al gradiente le siguió un periodo de tiempo de 0,5 min para volver al 10% de disolvente B y un reequilibrado de 2,5 min al 10% de disolvente B (lavado) de la columna.

- 10 También pueden usarse otros métodos para sintetizar AMG 900. Se conocen en la técnica muchas transformaciones de química de síntesis, así como metodologías con grupos protectores, útiles en la síntesis de AMG 900. La bibliografía de transformación química orgánica útil incluye, por ejemplo, R. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers (1989); T.W. Greene y P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3^a edición, John Wiley and Sons (1999); L. Fieser y M. Fieser, Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1994); A. Katritzky y A. Pozharski, Handbook of Heterocyclic Chemistry, 2^a edición (2001); M. Bodanszky, A. Bodanszky, The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Berlín Heidelberg (1984); J. Seyden-Penne, Reductions by the Alumino- and Borohydrides in Organic Synthesis, 2^a edición, Wiley-VCH, (1997); y L. Paquette, editor, Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1995).

- 20 Se sometió a prueba AMG 900 para determinar su capacidad para reducir o inhibir la progresión tumoral en diversas líneas celulares (*in vitro*) y múltiples tipos de tumores sólidos (*in vivo*), algunos de los cuales se habían expuesto previamente a y habían desarrollado resistencia a agentes antimitóticos de tratamiento de referencia, incluyendo taxanos y alcaloides de la vinca, así como a otros agentes quimioterápicos. Los siguientes ejemplos y datos resultantes ilustrarán la capacidad de AMG 900 para tratar el cáncer, incluyendo cáncer resistente a las terapias de tratamiento de referencia actuales, incluyendo agentes antimitóticos, tales como paclitaxel, y otros fármacos usados conjuntamente con quimioterapia, tales como doxorubicina. A menos que se indique otra cosa, se usó la forma de base libre de AMG 900 en los ejemplos descritos a continuación en el presente documento.

25 Ejemplo 2

- Para investigar si la supresión inducida por AMG 900 de la actividad aurora cinasa A y B inhibe la proliferación celular, se evaluó el efecto antiproliferativo de AMG 900 *in vitro* usando 32 líneas celulares tumorales humanas. Tal como se muestra en la tabla 1 y la tabla 2, AMG 900 mostró actividad antiproliferativa en líneas celulares de tumores tanto sólidos como hematológicos. Esta actividad antiproliferativa se observó con concentraciones de AMG 900 en el intervalo nanomolar bajo (valores de CE₅₀ de 1 a 5 nM). De manera importante, cuatro de estas líneas celulares de tumores sólidos sensibles a AMG 900 (HCT15, MES-SA Dx5, 769P y SNU449) son resistentes a paclitaxel y otros agentes quimioterápicos. Las células cancerosas resistentes a múltiples fármacos de diferentes estructuras químicas y/o resistentes a fármacos dirigidos a diferente dianas se denominan "resistentes a múltiples fármacos". Un mecanismo destacado de resistencia a múltiples fármacos (MDR) utilizado por las células cancerosas es el flujo de salida de fármacos mediado por una familia de transportadores de casete de unión a ATP (ABC), tales como el producto del gen *mdr-1*, la glicoproteína P (gp-P). Por ejemplo, la línea celular uterina humana resistente a doxorubicina MES-SA Dx5 expresa gp-P y es resistente (de 30 a 1200 veces más que la línea original) a varios agentes quimioterápicos incluyendo daunorubicina, dactinomicina, colchicina, vinblastina, vincristina, paclitaxel, etopósido y mitoxantrona. Para investigar adicionalmente la actividad de AMG 900 en células que expresan MDR, se sometieron a prueba tres líneas celulares tumorales resistentes a Taxol y se compararon con sus líneas celulares originales respectivas. Tal como se muestra en las figuras 1-3 y en la tabla 3, AMG 900 mantuvo la potencia en las tres líneas celulares tumorales resistentes y sensibles a Taxol coincidentes con valores de CE₅₀ < 2 nM. Taxol mostró una pérdida de potencia significativa (de 10 a 100 veces) en las sublíneas tumorales que expresaban gp-P en comparación con las líneas originales. Conjuntamente, estos datos indican que AMG 900 inhibe la fosforilación de la histona H3 (un sustrato proximal de aurora cinasa B) y bloquea la división celular de las líneas celulares tumorales resistentes a paclitaxel y otros agentes quimioterápicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales de prueba

- Artículo de prueba: AMG 900
- 50 Formulación: DMSO
- Fuente: Amgen Inc.

Reactivos críticos

Disoluciones de lavado y fijación

ES 2 528 485 T3

1X PBS	Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, n.º de cat. 14090-144, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA 92008
H ₂ O destilada (d)	N.º de cat. 2F7115, Baxter Health care Corp., Deerfield, IL 60015
Metanol al 90% en dH ₂ O	Alcohol metílico, n.º de cat. 3041-10, Mallinckrodt Chemicals, Phillipsburg, NJ 08865
Tampón de lavado (en 1XPBS)- análisis de FACS BSA al 1% Triton X-100 al 0,2%	N.º de cat. 810111, Qty 50 ml, ICN Biomedicals Inc. Aurora, OH 44202 N.º de cat. 9284, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63178
Tampón de lavado - Cellomics 1X PBS Suero de cabra normal al 1% Tween-20 al 1%	Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, n.º de cat. 14090-144, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA 92008 N.º de cat. G-9023-10 ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63178 N.º de cat. P-1379, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63178
Tampón ácido (en dH ₂ O) HCl 2 N Triton X-100 al 0,5%	Ácido clorhídrico 37%, n.º de cat. JT953000, n.º de lote no disponible, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63178 N.º de cat. 9284, n.º de lote no disponible, 500 ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63178
Fijación con 2X formaldehído (en 1X PBS)-Cellomics Formaldehído al 20%, Glutaraldehído al 0,024%	N.º de cat. F1635, 500 ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63178 N.º de cat. 85191, Fluka/Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63178

Reactivos

Tampón de tinción de yoduro de propidio /ARNasa	PI/ARNasa, n.º de cat. 550825, 100 ml, Becton Dickinson, San Jose, CA 95131
DMSO, dimetilsulfóxido	N.º de cat. D2650, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63178
Anticuerpo anti-fosfo-Histona H3 (Ser 10) (p-histona H3), marcador de mitosis	N.º de cat. 06-570, Upstate Cell Signaling Solutions, Lake Placid, NY 12946
Anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-Alexa Fluor 488	N.º de cat. A1 1001, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA 92008
Hoechst 33342, triclorhidrato, trihidratado	N.º de cat. H3570, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA 92008
Anticuerpo IgG1 de ratón anti-bromodesoxiuridina, monoclonal PRB-1, conjugado con Alexa Fluor 647 (anti-BrdU, Alexa-647)	N.º de cat. A21305, n.º de lote 54656A, Invitrogen Corp. Carlsbad, CA 92008
Anticuerpo monoclonal de conejo anti-caspasa-3 activa conjugado con FITC (anti-caspasa-FITC)	100 pruebas, n.º de cat. 559341, n.º de lote 60509, BD Pharmingen, San Diego, C A 92121
Reactivo de marcaje BrdU (concentración de disolución madre no especificada)	N.º de cat. 00-0103, Zymed Laboratories, Carlsbad, CA 92008
1X Tripsina-EDTA, 0,5%	N.º de cat. 25300-054, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA 92008
1X Versene	N.º de cat. 15040-066, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA 92008
Medio McCoys 5A, (+)L-Glut	N.º de cat. 16600-082 Invitrogen Corp., Carlsbad, CA 92008
Medio RPMI 1640 (+) L-Glut.	N.º de cat. 11875-093, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA 92008
DMEM, alto contenido en glucosa, (+) D-glucosa 4,5 g/l, (+) L-Glut.	N.º de cat. 11965-092 Invitrogen Corp., Carlsbad, CA 92008
FBS, suero bovino fetal, origen - Australia	N.º de cat. 10099-141, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA 92008
Taxol (Paclitaxel)	N.º de cat. T7402, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63178
Vinblastina	N.º de cat. V1377, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63178

Equipo de laboratorio, suministros, software

Centrífuga refrigerada de sobremesa	Centrífuga Allegra X-15R, Beckman Coulter, Fullerton, CA 92834
Software GraFit v5	Erithacus Software, Horley Surrey, RH6 9YJ, RU
Software XLfit 4.2	Excel, Microsoft Inc., EE.UU.
GraphPad Prism v5	GraphPad Software, Inc. 2236 Avenida de la Playa, La Jolla, CA 92037
Citómetro de flujo	Becton Dickinson LSRII Flow Cytometer, BD Biosciences, San Jose, CA

	95131
Placa de cultivo tisular de 96 pocillos, de fondo plano con tapa de baja evaporación, estéril	N.º de cat. 3595, n.º de lote no disponible, Corning Incorp. Life Sciences, Lowell MA 01851
Placa de cultivo tisular de 12 pocillos, de fondo plano con tapa de baja evaporación, estéril	N.º de cat. 353043, n.º de lote no disponible, BD Labware, Franklin Lakes, NJ 07417
Placa de cultivo tisular de 6 pocillos, de fondo plano con tapa de baja evaporación, estéril	N.º de cat. 353046, n.º de lote no disponible, BD Labware, Franklin Lakes, NJ 07417
Tiras de tubos para PCR usados para tinción de FACS	N.º de cat. 20170-004, n.º de lote 711C7-7074, tiras de tubos de 2 ml para PCR, VWR Intl., West Chester, PA 19380.
Tubos Eppendorf de 1,5 ml	N.º de cat. 20901-551, n.º de lote no disponible, VWR Intl., West Chester, PA 19380
Placas View-96 de Packard	N.º de cat. 6005182, n.º de lote no disponible, PerkinElmer Life y Analytical Sciences, Waltham, MA 02451
Lavador de placas ELX405	N.º de cat. ELX405HT, BioTek, Winooski, VT 05404
Dispensadores de placas Multidrop DW (pocillo profundo)	N.º de cat. 5840177, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA 02454
Cellomics ArrayScan VTi	Cellomics-Thermo Fisher Inc, Waltham, MA 02454

Métodos

Se evaluó la actividad de AMG 900 *in vitro* en líneas celulares tumorales originales y resistentes a fármacos derivadas de tejidos uterino, de mama y pulmón. Se evaluaron los criterios de valoración de ciclo celular y p-histona H3 mediante citometría de flujo y obtención de imágenes con alto contenido en células, respectivamente.

5 Células humanas y cultivo celular

Se obtuvieron líneas celulares tumorales humanas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA) a menos que se indique otra cosa. Todas las células se mantuvieron a 37 grados Celsius en una atmósfera del 5% de CO₂. Se obtuvo la línea celular CAL51 (ACC 302) derivada de tumor de mama de DSMZ (GmbH). Se obtuvieron las líneas celulares HCT-116_JH (genotipo p21 +/+) y HCT-116_JH (genotipo p21 -/-) derivadas de tumor de colon bajo licencia de John Hopkins University Genetics Resources Core Facility.

10

Líneas celulares tumorales humanas con medios de cultivo correspondientes

Línea celular tumoral	Origen	Condiciones de crecimiento de cultivo celular (todos los medios contienen 1x glutamina)
HCT-116_JH (genotipo p21 +/+)	Colon	5A de McCoy, FBS al 10% + L-glutamina
HCT-116_JH (genotipo p21 -/-)	Colon	5A de McCoy, FBS al 10% + L-glutamina
HCT-15	Colon	RPMI 1640, FBS al 10% + L-glutamina
HT29	Colon	5A de McCoy, FBS al 10% + L-glutamina
SW-620	Colon	RPMI 1640, FBS al 10% + L-glutamina
SW480	Colon	RPMI 1640, FBS al 10% + L-glutamina
HOP-92	Pulmón	RPMI 1640, FBS al 10% + L-glutamina
HOP-62	Pulmón	RPMI 1640, FBS al 10% + L-glutamina
NCI-H460	Pulmón	RPMI 1640, FBS al 10% + L-glutamina
A549	Pulmón	F12F de Ham + FBS al 10%+ L-glutamina
PC-3	Próstata	RPMI 1640, FBS al 10% + L-glutamina
DU-145	Próstata	RPMI 1640, FBS al 10% + L-glutamina
BT-549	Mama	RPMI 1640, FBS al 10% + L-glutamina
BT-474	Mama	RPMI 1640, FBS al 10% + L-glutamina
MDA-MB-231	Mama	RPMI 1640, FBS al 10% + L-glutamina
T47D	Mama	RPMI 1640, FBS al 10% + L-glutamina
MCF-7 p53(+)	Mama	RPMI 1640, FBS al 10% + L-glutamina
MCF-7 p53(-)	Mama	RPMI 1640, FBS al 10% + L-glutamina
CAL51	Mama	DMEM+ +FBS al 10%+ 1XNEAA + L-glutamina
SK-OV-3	Ovario	5A de McCoy, FBS al 10% + L-glutamina
MES-SA/Dx5	Útero	5A de McCoy, FBS al 10% + L-glutamina
MES-SA	Útero	5A de McCoy, FBS al 10% MEM, FBS al 10%, Piruvato de Na 1 mM, NEAA + 0,1 mM
SK-MEL-2	Piel	L-glutamina
A498	Renal	MEM, FBS al 10%, 1x NEAA + L-glutamina
769P	Renal	RPMI 1640, FBS al 10% + L-glutamina

CAKI-1	Renal	5A de McCoy, FBS al 10% + L-glutamina
SK-HEP-1	Hígado	MEM, FBS al 10%, 1x NEAA + L-glutamina
		RPMI 1640, FBS al 10%, HEPES 10 mM, Na 1 mM
SNU449	Hígado	Piruvato + L-glutamina
K562	Leucemia	RPMI 1640, FBS al 10% + L-glutamina
MOLT-4	Leucemia	RPMI 1640, FBS al 10% + L-glutamina
HL-60	Leucemia	RPMI 1640, FBS al 10% + L-glutamina
Jurkat	Leucemia	RPMI 1640, FBS al 10% + L-glutamina
U266-B1	Mieloma	RPMI 1640, FBS al 15% + L-glutamina
RPMI-8226	Mieloma	RPMI 1640, FBS al 20% + L-glutamina
NCI-H460 Taxol-r	Pulmón	RPMI 1640, FBS al 10%, Taxol 75 nM
MDA-MB-231(F11)-luc	Mama	DMEM, FBS al 10%
MDA-MB-231(F11)-luc Taxol-r	Mama	DMEM, FBS al 10%, Taxol 50 nM

Panel línea celular de tumor sólido tratada con AMG 900: Ensayo antiproliferativo (ArrayScan VTi)

Se sembraron las células tumorales en una placa de 96 pocillos Packard View en 100 µl de medios completos apropiados a una densidad de 3000 ó 5000 células/pocillo dependiendo de la cinética de crecimiento de la línea celular (ampliamente definida como lenta frente a rápida). Todas las diluciones se realizaron usando la estación de trabajo Biomek FX. Al día siguiente, se trataron las células con AMG 900 (intervalo de dosis de 11 puntos de 0,156 a 0,0003 µM) con una concentración de DMSO final del 0,12% en los medios. Tras 24 horas, se retiraron los medios que contenían compuesto y se lavaron las células con medios completos. Entonces se incubaron las células en 100 µl de medios completos recién preparados (sin compuesto) durante 48 horas. Tras 48 horas, se fijaron las células añadiendo 100 µl de tampón de fijación a 100 µl de medios completos. Se incubaron las células a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se aspiró el tampón de fijación y entonces se permeabilizaron las células en 100 µl de tampón de lavado durante 30 minutos a temperatura ambiente seguido por la adición de 100 µl de tampón de tinción de ADN y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad. A continuación, se lavaron las células con 100 µl de tampón de lavado y se almacenaron en 100 µl de 1x PBS a 4 grados Celsius hasta el análisis. Se obtuvieron los datos celulares mediante barrido de las placas de 96 pocillos en un sistema de obtención de imágenes ArrayScan VTi (Cellomics). Se realizó la cuantificación del área nuclear de células individuales y la intensidad basándose en el colorante de fluorescencia de ADN Hoechst 33342. Se fijó un umbral en el área nuclear basándose en el control tratado con DMSO para cuantificar el número de núcleos de tamaño normal a partir de residuos nucleares y células con poliploidía. Se aplicó este valor de umbral para enumerar el número de núcleos normales en seis campos de imágenes/pocillo usando una ampliación de 10x. Se calcularon las curvas de dosis-concentración y los valores de CE₅₀ usando una ecuación de 4 parámetros.

Panel de línea celular hematológica tratada con AMG 900: Ensayo de contenido en ADN del ciclo celular con múltiples parámetros (citometría de flujo)

Se sembraron las células tumorales en una placa de 96 pocillos de 300 µl de profundidad en 150 µl de medios completos apropiados a una densidad de 100.000 células/pocillo. Se trataron las células con AMG 900 (intervalo de dosis de 10 puntos de 0,156 a 0,0003 µM) con una concentración de DMSO final del 0,2% en los medios. Dos horas antes del momento de la recogida, se pulsaron las células con BrdU a la concentración final de 1:100 en los medios. Tras 48 horas, se retiraron 100 µl de medios de cada pocillo con un pipeteador de múltiples pocillos. Entonces, se transfirieron las células a tiras de tubos para PCR en 200 µl de medios. Se centrifugaron las células a 2000 rpm a 18°C durante 4 minutos y se aspiró el sobrenadante. Entonces se fijaron las células en 200 µl de metanol al 90% helado y se almacenaron a -20°C durante al menos 24 horas antes de la tinción de anticuerpos y ADN. Se centrifugaron las células fijadas a 2000 rpm durante 4 minutos para eliminar el metanol al 90%. Se lavaron las células con 200 µl de tampón de lavado y luego se trataron con 100 µl de tampón ácido a temperatura ambiente durante 1 hora en la oscuridad. Se lavaron las células dos veces con 200 µl de tampón de lavado (hasta que el pH fue de 7,0, confirmado con papel de pH). Se incubaron las células con un cóctel de anticuerpos anti-BrdU-Alexa 647 (3 µg/ml) y anti-caspasa 3-FITC (20 µl/pocillo) en tampón de lavado durante 2 horas a temperatura ambiente en la oscuridad. Se centrifugaron las células teñidas y se lavaron con 200 µl de tampón de lavado. Se contratiñeron las células con 200 µl de yoduro de propidio (PI) durante la noche a 4°C en la oscuridad. Se adquirieron los datos y se analizaron mediante un citómetro de flujo (LSRII). Se aplicó una separación umbral según el contenido en ADN, BrdU y poblaciones positivas/negativas para caspasa-3 basándose en los grupos control con DMSO y tratados con fármaco en baja/alta concentración. Se representaron los datos como un porcentaje de contenido en ADN en SubG1, contenido en ADN 4N+, BrdU y poblaciones positivas para escisión con caspasa-3. Se calcularon las curvas de concentración-respuesta y los valores de CE₅₀ usando una ecuación de 4 parámetros.

Líneas celulares MES-SA Dx5 y MES-SA tratadas con AMG 900 o paclitaxel (Taxol): Ensayo de p-histona H3 (ArrayScan VTi)

Se sembraron en placa células MES-SA Dx5 y MES-SA a una densidad de 10.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos en medios completos y se cultivaron durante 24 horas. Al día siguiente, se trataron las células con AMG 900 o Taxol a lo largo de un intervalo de concentración de 10 puntos (de 1,25 µM a 0,0024 µM) durante 24 horas con una

concentración de DMSO final del 0,1% en los medios. Se lavaron las células y se fijaron añadiendo 100 µl de 2x tampón de fijación de formaldehído durante 10 minutos y temperatura ambiente. Se lavaron las células y se permeabilizaron con 100 µl de tampón de lavado durante 15 minutos. Se inmunotifieron las células con anticuerpo anti-p-histona H3 (5 µg/ml) y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Se lavaron las células en 100 µl de tampón de lavado. A continuación, se incubaron las células con un anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con Alexa-488 (1,5 µg/ml) en tampón de lavado complementado con colorante de ADN Hoechst (1 µg/ml) y se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 minutos. Se lavaron las células dos veces con 100 µl de tampón de lavado. Se analizaron las placas de 96 pocillos en un dispositivo ArrayScan VTi (Cellomics) usando un algoritmo de bioaplicación (TargetActivation.V2). Se usó el porcentaje de p-histona H3 + objetos (suma de 6 campos de imágenes/pocillo con un objetivo 10x) para generar curvas de concentración-respuesta y valores de CE₅₀ usando una ecuación de 4 parámetros.

Líneas celulares NCI-H460 original y resistente a Taxol tratadas con AMG 900 o paclitaxel (Taxol): Ensayo de contenido en ADN del ciclo celular (citometría de flujo)

Se sembraron células NCI-H460 originales y NCI-H460 resistentes a Taxol a una densidad de 500.000 células/pocillo en una placa de 6 pocillos en 2 ml de medios completos apropiados. Al día siguiente, se trataron las células con AMG 900 o Taxol a lo largo de un intervalo de concentración de 6 puntos con una concentración de DMSO final del 0,05% en los medios. Tras 24 horas, se pulsaron las células con BrdU (dilución 1:100) y se recogieron. Se centrifugaron las células a 1600 rpm durante 4 minutos y se aspiró el sobrenadante. Se lavaron las células en 1x PBS y se fijaron en 900 µl de metanol al 90% helado y se almacenaron a -20°C. Se centrifugaron las células fijadas a 2000 rpm durante 4 minutos para eliminar el metanol al 90%. Se lavaron las células con 200 µl de tampón de lavado y se tiñeron con 200 µl de yoduro de propidio (PI) durante la noche a 4°C en la oscuridad. Se adquirieron los datos y se analizaron mediante citometría de flujo (LSRII). Se aplicó una separación umbral según el contenido en ADN +4N (igual a $\geq 4N$) y poblaciones positivas para SubG1 basándose en los grupos control tratados con DMSO y tratados con fármaco en baja/alta concentración. Se representaron los datos como un porcentaje de ADN +4N y subpoblaciones positivas para SubG1. Se calculó el contenido en ADN +4N (igual a $\geq 4N$) o los valores de CE₅₀ celulares en SubG1 usando una ecuación de 4 parámetros.

Líneas celulares MDA-MB-231 (F11)-luc original y resistente a Taxol tratadas con AMG 900 o paclitaxel (Taxol): Ensayo de contenido en ADN del ciclo celular (citometría de flujo)

Se sembraron células MDA-MB-231 (F11)-luc originales y resistentes a Taxol a una densidad de 250.000 células/pocillo en una placa de 12 pocillos en 1 ml de los medios apropiados, por duplicado. Al día siguiente se trataron las células con AMG 900 o Taxol a lo largo de un intervalo de concentración de 10 puntos con una concentración de DMSO final del 0,1% en medios libres de Taxol. Tras 24 horas, se recogieron las células con 1x tripsina-EDTA y se transfirieron a tubos de PCR. Se centrifugaron las células a 2000 rpm durante 4 minutos y se aspiró el sobrenadante. Se fijaron las células en 200 µl de metanol al 90% helado y se almacenaron a -20°C durante al menos 24 horas. Se centrifugaron las células fijadas a 2000 rpm durante 4 minutos para eliminar el metanol al 90%. Se lavaron las células con tampón de lavado y se tiñeron con 200 µl de yoduro de propidio (PI) durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad. Se añadieron 400 µl adicionales de PI antes de la adquisición de datos. Se adquirieron los datos y se analizaron mediante citometría de flujo (LSRII). Se aplicó una separación umbral según el contenido en ADN +4N (igual a $\geq 4N$) en los grupos control con DMSO y tratados con fármaco en baja/alta concentración. Se representaron los datos como el porcentaje de control para poblaciones positivas para contenido en ADN +4N. Se asignaron los valores de CE₅₀ celulares de contenido en ADN +4N usando una ecuación de 4 parámetros.

Tabla 1. AMG 900 *in vitro* inhibe la proliferación celular de múltiples tipos de tumores sólidos

Línea celular tumoral	Origen	CE ₅₀ (µM) de AMG 900
HCT 116 JH p21 -/-	Colon	0,001
HCT 116 JH p21 +/+	Colon	0,001
HCT15*	Colon	0,002
HT29	Colon	0,005
SW620	Colon	0,002
SW480	Colon	0,002
HOP-92	Pulmón	0,002
HOP-62	Pulmón	0,002
NCI-H460	Pulmón	0,001
A549	Pulmón	0,001
PC3	Próstata	0,002
DU145	Próstata	0,002
BT549	Mama	0,004
MDA-MB-231	Mama	0,002
T47D	Mama	0,005

MCF7-p53+	Mama	0,001
MCF7-P53-	Mama	0,003
CAL51	Mama	0,002
SK-OV-3	Ovario	0,002
MES-SA Dx5*	Útero	0,001
SK-MEL-2	Piel	0,002
A498	Riñón	0,001
769P*	Riñón	0,002
CAKI-1	Riñón	0,001
SK-HEP-1	Hígado	0,001
SNU449*	Hígado	0,002

*Líneas celulares tumorales resistentes a paclitaxel (Gyorffy *et al.* 2006;

Harker, G.A. *et al.* Multidrug (Pleiotropic) Resistance in Doxorubicin-selected Variants of Human Sarcoma Cell Line MES-SA. *Cancer Research* 1985: 45: 4091-4096;

5 Szakacs, G. *et al.* Predicting drug sensitivity and resistance: Profiling ABC transporter genes in cancer cells. *Cancer Cell* 2004: 6: 129-137;

Szakacs, G. *et al.* Targeting multi-drug resistance in cancer. *Nat. Rev. Drug Discovery* 2006: 5: 219-234

Tabla 2. AMG 900 *in vitro* bloquea la división celular en varios tipos de tumor hematológico

Línea celular tumoral	Tipo hematológico	CE ₅₀ (μM) de AMG 900
HL-60	Leucemia promielocítica	0,002
K562	Leucemia mieloide crónica	0,001
MOLT-4	Leucemia de células T	0,002
Jurkat	Leucemia de células T	0,001
RPMI-8226	Mieloma múltiple	0,002
U266-B1	Mieloma múltiple	0,002

10 Se trataron las células con AMG 900 durante 48 horas (sin retirada de compuesto). Se realizó el análisis basado en citometría de flujo usando múltiples criterios de valoración (escisión con caspasa-3, BrdU, SubG1 y contenido en ADN +4N (contenido en ADN ≥ 4N)). Se generaron los valores de CE₅₀ usando el criterio de valoración de contenido en ADN +4N. Los valores de CE₅₀ notificados representan una única curva de dosis-respuesta de 10 puntos.

Tabla 3. AMG 900 *in vitro* mantiene la potencia en las líneas celulares tumorales resistentes a paclitaxel

Origen	Línea celular tumoral		CE ₅₀ (μM) de AMG 900 a las 24 horas	CE ₅₀ (μM) de paclitaxel a las 24 horas
Útero ^a	MES-SA	Línea original	< 0,002	0,01
	MES-SA Dx5 ¹	Doxorubicina	< 0,002	>1,25
Mama ^a	MDA-MB-231	Línea original	0,001	0,002
	MDA-MB-231-Taxol-r ²	Paclitaxel	0,001	0,095
Pulmón ^a	NCI-H460	Línea original	0,001	0,01
	NCI-H460-Taxol-r ²	Paclitaxel	0,001	>0,1

Resistencia (r), definida como una pérdida de potencia ≥ 10 veces (valor de CE₅₀) en la sublínea en comparación con la línea original.

15 ^aAnálisis de p_histona H3 basado en Cellomics. Los valores notificados de CE₅₀ representan un único experimento con curva de dosis-respuesta de 10 puntos.

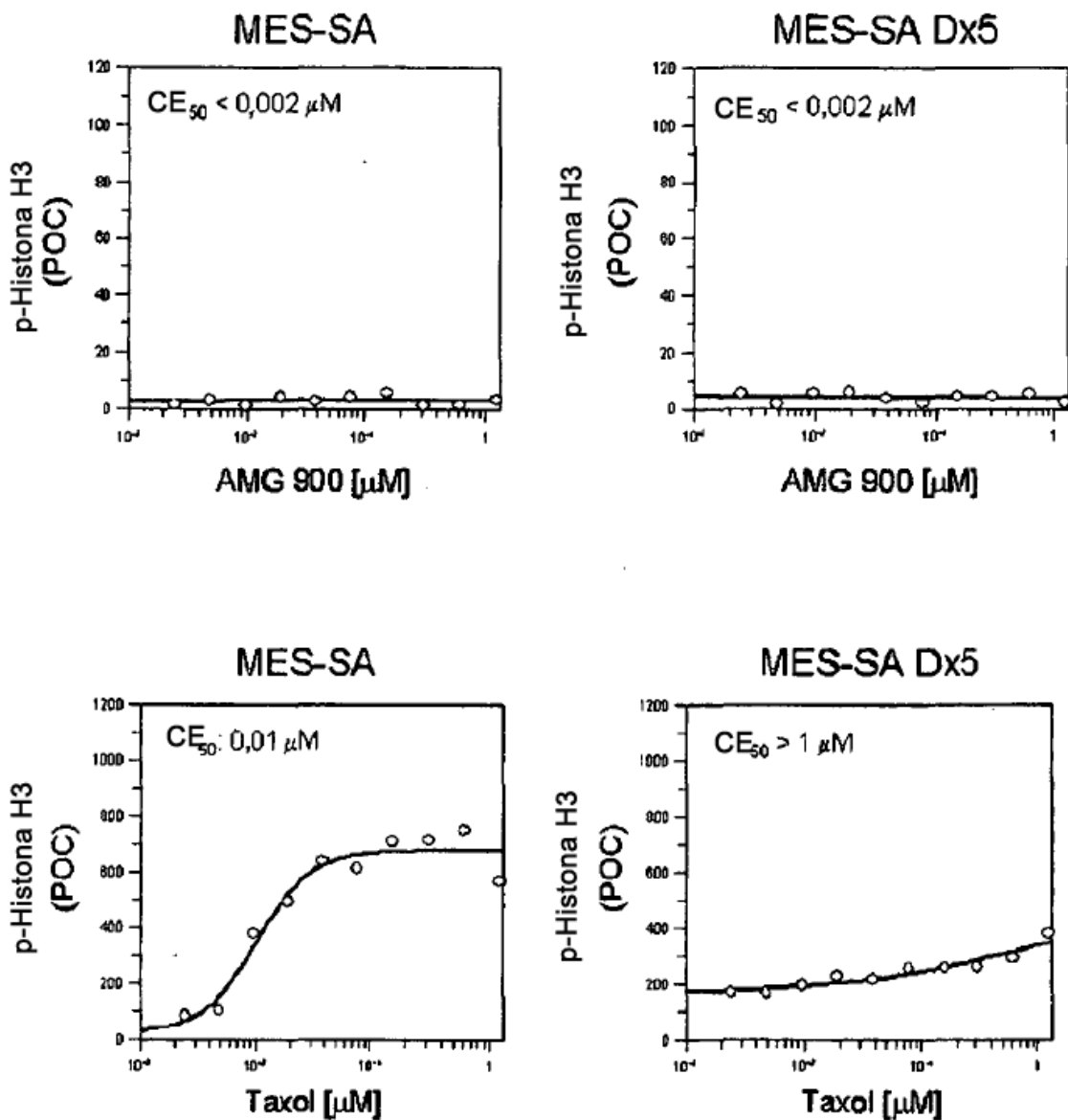
20 ^bAnálisis de contenido en ADN basado en citometría de flujo. Los valores de CE₅₀ se generaron con el criterio de valoración de contenido en ADN apropiado (contenido en ADN ≥ 4N (AMG 900) y Sub G₁ (paclitaxel)). Los valores de CE₅₀ representan un único experimento realizado por duplicado con curva de dosis-respuesta de 10 puntos. Las líneas celulares MDA-MB-231 contienen un transgén que expresa tanto la proteína fluorescente verde como la proteína luciferasa.

^cAnálisis de contenido en ADN basado en citometría de flujo. Los valores de CE_{50} se generaron con el criterio de valoración de contenido en ADN apropiado (contenido en ADN $\geq 4N$ (AMG 900) y Sub G_1 (paclitaxel)). Los valores de CE_{50} representan un único experimento realizado con la curva de dosis-respuesta de 6 puntos.

¹La sublínea resistente a múltiples fármacos, MES-SA Dx5, se estableció a partir de la línea celular original MES-SA haciendo crecer las células en presencia de concentraciones crecientes de doxorubicina. La línea celular MES-SA Dx5 sobreexpresa gp-P (Harker *et al*, 1985).

²Las sublíneas resistentes a paclitaxel MDA-MB-231-Taxol-r y NCI-H460-Taxol-r se derivaron de su línea original respectiva haciendo crecer las células en presencia de concentraciones crecientes de paclitaxel. Ambas sublíneas son positivas para gp-P mediante citometría de flujo.

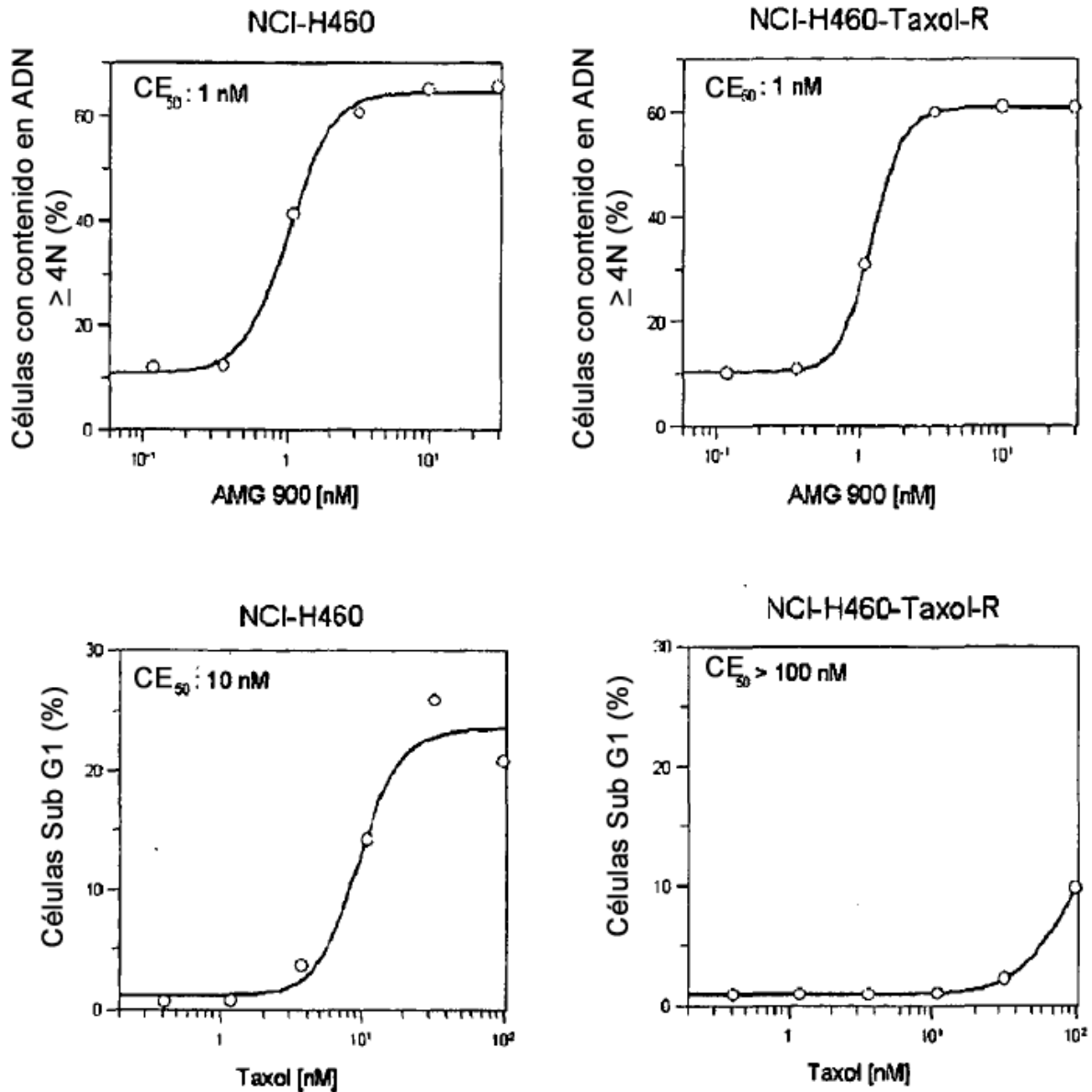
Figura 1: Efecto de AMG 900 y Taxol sobre las líneas celulares MES-SA y MES-SA Dx5, valores de CE_{50} de p-histona H3



Se trataron líneas celulares tumorales uterinas con control (DMSO), AMG 900 o paclitaxel (Taxol) a lo largo de un intervalo de dosis de 10 puntos (de 0,0024 a 1,25 μM) durante 24 horas. Entonces se fijaron las células y se tiñeron con anticuerpo anti-p-histona H3 y se contratiñeron con un colorante de ADN (Hoechst). Se realizó un análisis basado en obtención de imágenes (ArrayScan VTi) para medir el porcentaje de células positivas para p-histona H3. Las curvas de dosis-respuesta representan las concentraciones de o bien AMG 900 o bien Taxol representadas

frente a células positivas para p-histona H3 como un porcentaje del control tratado con DMSO (POC). Se calcularon los valores de CE_{50} mediante el modelo de ajuste de 4 parámetros.

Figura 2: Efecto de AMG 900 y Taxol sobre las líneas celulares NCI-H460 original y NCI-H460 Taxol-r, valores de CE_{50} de contenido en ADN del ciclo celular

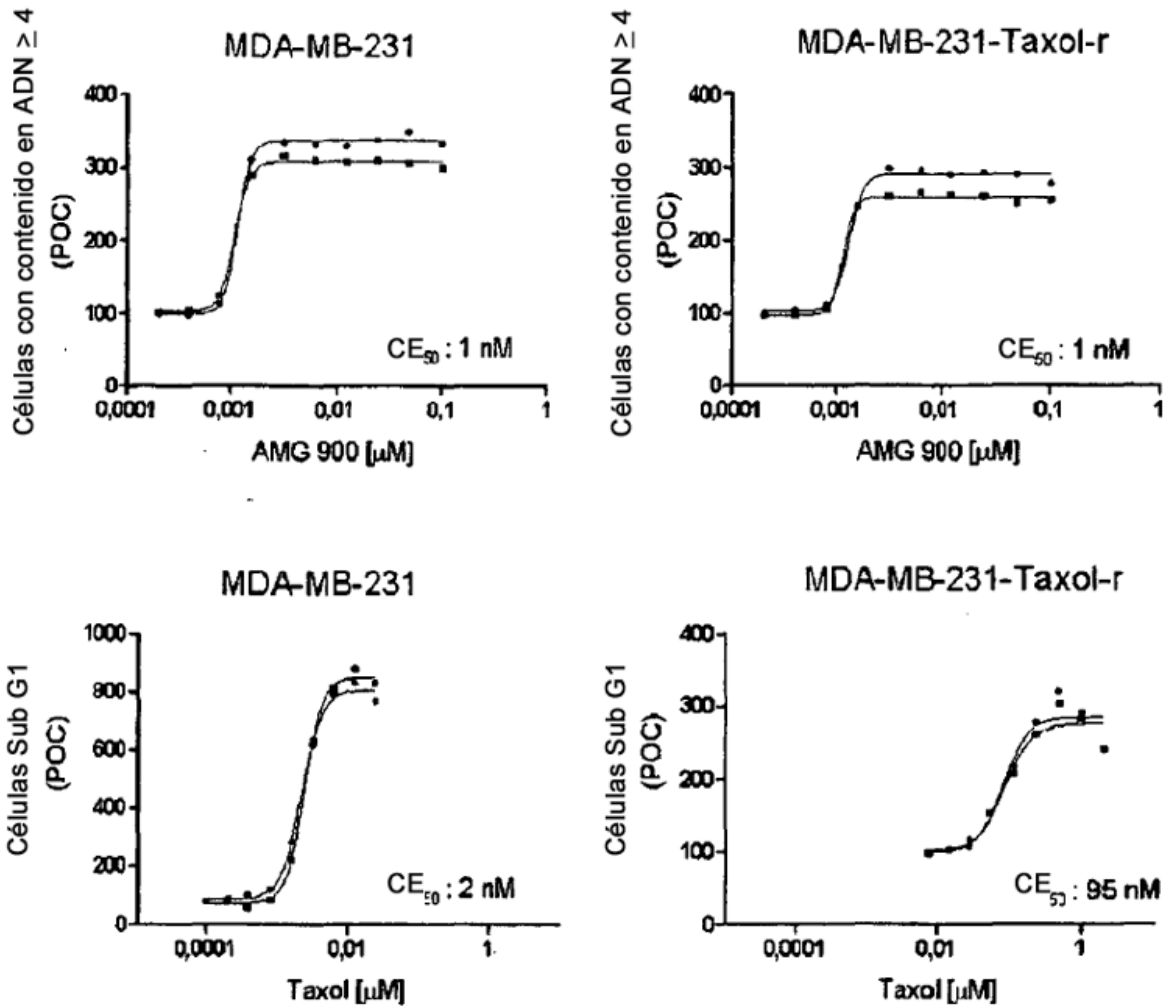


5

Se trataron líneas celulares tumorales de pulmón con control (DMSO), AMG 900 o Taxol a lo largo de un intervalo de dosis de 6 puntos durante 24 horas. Se realizó análisis del ciclo celular basado en citometría de flujo para medir el porcentaje de células positivas para contenido en ADN $\geq 4N$ o contenido en ADN de Sub G1. Las curvas de dosis-respuesta para AMG 900 representan la concentración de fármaco representada frente al porcentaje de células positivas para contenido en ADN $\geq 4N$. Las curvas de dosis-respuesta para Taxol representan la concentración de fármaco representada frente al porcentaje de células positivas para contenido en ADN de Sub G1. Se calcularon los valores de CE_{50} mediante el modelo de ajuste de 4 parámetros.

10

Figura 3: Efecto de AMG 900 y Taxol sobre las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-231 resistente a Taxol, valores de CE_{50} de contenido en ADN del ciclo celular



Se trataron líneas celulares tumorales de mama con control (DMSO), AMG 900 o Taxol a lo largo de un intervalo de dosificación de 10 puntos durante 24 horas. Se realizó análisis del ciclo celular basado en citometría de flujo para medir el porcentaje de células positivas para contenido en ADN $\geq 4N$ o contenido en ADN de Sub G1. Las curvas de dosis-respuesta para AMG 900 representan la concentración de fármaco representada frente al porcentaje de células positivas para contenido en ADN $\geq 4N$. Las curvas de dosis-respuesta para Taxol representan la concentración de fármaco representada frente al porcentaje de células positivas para contenido en ADN de Sub G1. Se calcularon los valores de CE_{50} mediante el modelo de ajuste de 4 parámetros.

Ejemplo 3

Para investigar si la supresión inducida por AMG 900 de la actividad aurora cinasa inhibe la proliferación celular, se evaluó la eficacia antiproliferativa de AMG 900 *in vivo* en múltiples modelos de xenoinjerto de cáncer humano, incluyendo modelos de cáncer de mama, colon, leucemia, pulmón, pancreático y uterino, crecidos en ratones desnudos atímicos. Se les administró a los ratones AMG 900 por vía oral a 3,75, 7,5 ó 15 mg/kg b.i.d. durante 2 días consecutivos a la semana o 3 mg/kg b.i.d. cada día durante la duración del estudio que comenzó cuando se establecieron los tumores. Los reactivos, disoluciones, equipo, formulación de AMG 900, mediciones del volumen tumoral y cálculos fueron en general tal como se describe en el ejemplo 4 a continuación. Se encontró que AMG 900 inhibía significativamente el crecimiento tumoral en todos los modelos de xenoinjerto sometidos a prueba en comparación con el grupo control con vehículo (tabla 4).

Tabla 4. AMG 900 inhibe el crecimiento de múltiples modelos de xenoinjerto

Sensible a paclitaxel <i>in vitro</i>	Origen del tumor	Línea celular	AMG 900 % de TGI*
sí	Colon	HCT 116	83
no	Colon	HCT15	51
sí	Colon	Colo 205	58
sí	Pulmón	NCI-H460	85

no	Pulmón	NCI-H460-Taxol-r	66
no	Útero	MES-SA Dx5	73
sí	Útero	MES-SA	86
sí	Leucemia	HL60	68
sí	Mama	MDA-MB-231	82
ND	Páncreas	MiaPaCa2	62

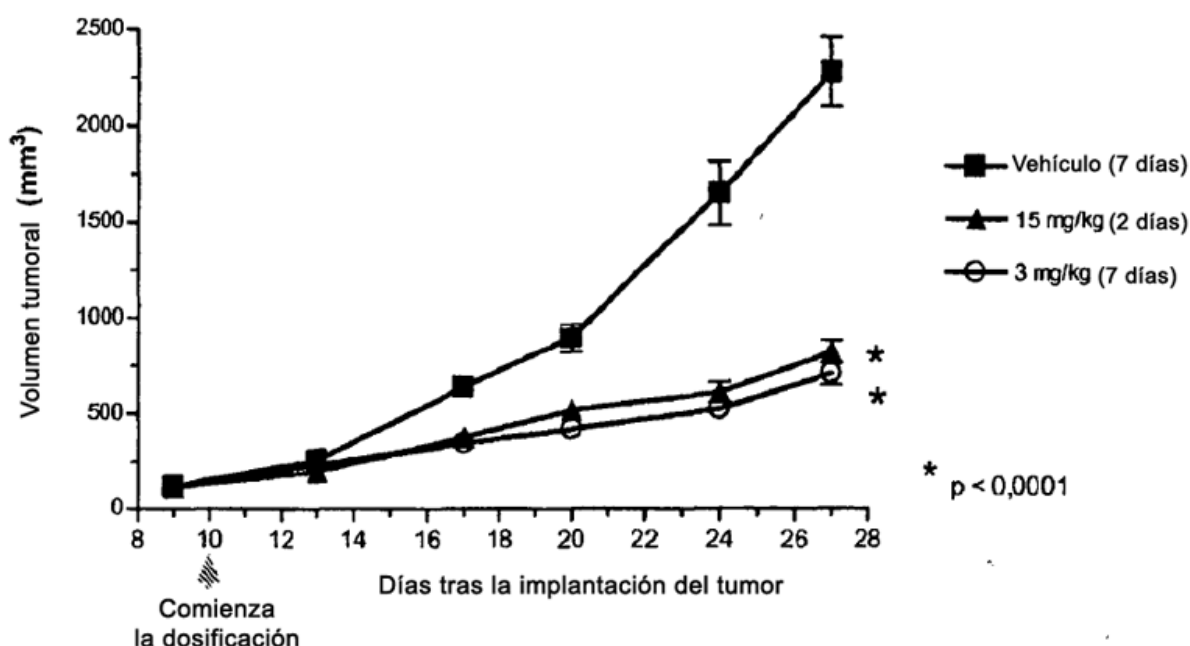
(TGI) Inhibición del crecimiento tumoral, % de TGI recogido de un programa de dosis o bien intermitente o bien continuo basado en la mejor respuesta de eficacia.

(ND) No determinado, Resistencia (r), definida como una pérdida de potencia ≥ 10 veces (valor de CE_{50}) en comparación con las líneas celulares tumorales sensibles a taxano

- 5 Se sometió a prueba el efecto de AMG 900 sobre la línea celular resistente a múltiples fármacos MES-SA Dx5 crecida *in vivo* como un xenoinjerto tumoral. Se les administró a los ratones AMG 900 por vía oral a 15 mg/kg b.i.d. durante 2 días consecutivos a la semana o 3,0 mg/kg b.i.d. cada día durante la duración del estudio. Se inició la dosificación cuando se establecieron los tumores (10 días tras la implantación tumoral). El tratamiento con AMG 900 dio como resultado inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa usando ambas dosis y programas de AMG 900 en comparación con el grupo control con vehículo (figura 4; $p < 0,0001$, prueba de comparaciones múltiples a posteriori de Dunnett). También se logró sorprendentemente inhibición del crecimiento tumoral comparable en otros 2 modelos resistentes a fármacos (HCT 15 y NCI-H460-Taxol-r [resistente]) usando programas de tratamiento similares (véase la tabla 4).

Figura 4

- 15 AMG 900 inhibe el crecimiento de tumores de xenoinjerto de MES-SA Dx5 establecidos



- 20 Se inyectaron por vía subcutánea células MES-SA Dx5, resistentes a múltiples fármacos (2×10^6) en el costado derecho de ratones desnudos atímicos hembra. Se midieron los tumores dos veces a la semana. El tratamiento comenzó en el día 10 cuando los tumores tenían ~ 100 mm³. Se les dosificó a los ratones v.o. AMG 900 (b.i.d.) o bien de manera intermitente o bien continua. Se facilitó a todos los grupos complementos nutricionales de manera diaria a lo largo de todo el estudio para mantener el peso corporal. Los datos representan la media $\pm$ EEM para cada grupo ($n = 10$ por grupo). Los valores de P corresponden a la diferencia estadística entre los grupos tratados con vehículo y AMG 900 determinada por RMANOVA seguido por la prueba de comparaciones múltiples a posteriori de Dunnett. La flecha indica el comienzo de la dosificación.

25 Ejemplo 4

Para investigar si la supresión inducida por AMG 900 de la actividad aurora cinasa inhibe la proliferación celular, se evaluó la eficacia antitumoral de AMG 900 *in vivo* frente a xenoinjertos tumorales resistentes a NCI-H460-Taxol en ratones desnudos atímicos. Se les dosificó a los ratones v.o. AMG 900 (b.i.d.) o bien de manera intermitente o bien

continua. Se les dosificó a los ratones por vía i.p. paclitaxel (Taxol) 5 días/semana. Se usó un compuesto interno de Amgen como control positivo en este estudio (datos no mostrados). Se midieron los tumores dos veces a la semana. El tratamiento comenzó en el día 12 cuando se establecieron los tumores. Se facilitó a todos los grupos complementos nutricionales de manera diaria a lo largo de todo el estudio para mantener el peso corporal.

5	Animales y tejidos	
	Especie/variedad:	Desnudos atímicos
	Número/sexo:	125/hembras
	Peso medio:	20 - 30 gramos en el día de la aleatorización
	Tipo de tejido:	NCI-H460 resistente a Taxol
10	Fuente:	Amgen Cancer Pharmacology Cell Bank
	Estado patológico del sujeto:	Ratones portadores de tumores
	Cuidado de los animales:	Instalación AMALAR

Materiales de prueba

	Artículo de prueba:	AMG 900
15	Fabricante:	Amgen Inc.
	Artículo de prueba:	Taxol
	Fabricante:	Bristol-Myers

Formulación de reactivos críticos

	Compuesto de prueba:	AMG 900
20	Concentración de disolución madre:	1,5, 0,3 mg/ml
	Formulado:	Semanalmente, usado en el plazo de 7 días
	Vehículo:	HPMC al 2%/TW80 al 1%, pH 2,2
	Dosis (10 ml/kg de peso corporal individual):	Intervalo de dosis: 0,20 - 0,30 ml
	Vía de administración:	v.o.
25	Compuesto de prueba:	Taxol
	Concentración de disolución madre:	6 mg/ml
	Formulado:	Adquirido de Burt's Pharmacy
		Fabricante: Bristol-Meyer's Squibb
	Vehículo:	Solución salina
30	Dosis (10 ml/kg de peso corporal individual):	Intervalo de dosis: 0,20 - 0,30 ml
	Vía de administración:	i.p.

Formulaciones

35	Se formuló AMG 900 (base libre) en suspensión hasta concentraciones de 1,5 y 0,3 mg/ml. El volumen dosificado fue equivalente a 10 ml/kg. Se adquirió Taxol (Bristol Meyers Squibb) comercialmente de Burt's Pharmacy (Newbury Park, CA) y se diluyó diariamente a partir de la concentración de disolución madre de 6 mg/ml a 1,25 mg/ml de disolución de trabajo.	
----	---	--

Protocolo de tratamiento

Grupo	n	Vía	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Programa
1	10	v.o.	Vehículo	-	b.i.d. 7 días/semana x 3 semanas
2	10	v.o.	AMG 900	3	b.i.d. 7 días/semana x 3 semanas

3	10	v.o.	AMG 900	15	b.i.d. 2 días administrado/5 días sin administrar/semana x 3 semanas
4	10	i.p.	Taxol	12,5	q.d. 5 días/semana x 2 semanas

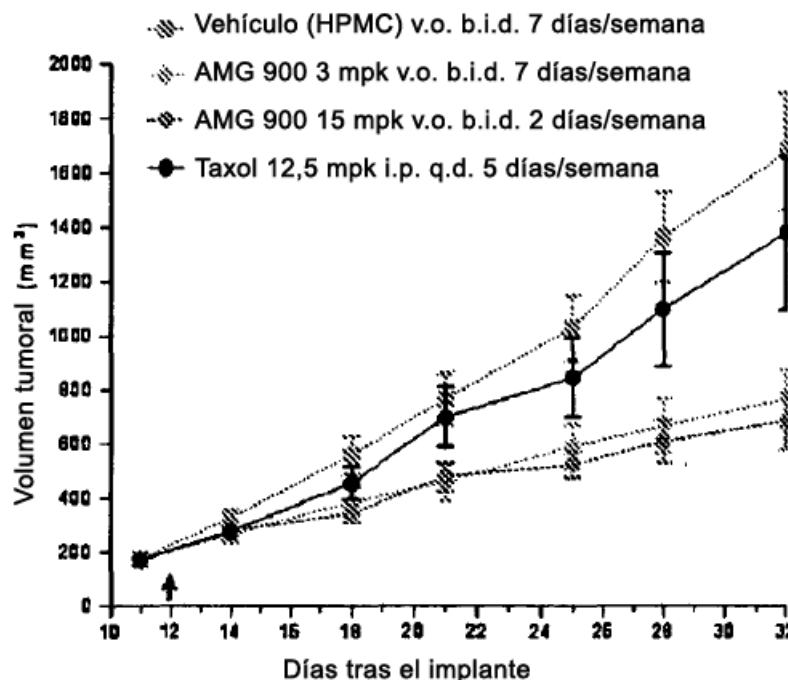
La duración de la fase de dosificación para AMG 900 fue de tres semanas, y dos semanas para el grupo con Taxol. Se midieron los tumores con un calibre digital y se pesaron los ratones dos veces a la semana. Se calcularon los volúmenes tumorales tal como sigue: Volumen tumoral (mm^3) = $[(W^2 \times L)/2]$ donde la anchura (W) se define como la más pequeña de las 2 mediciones y la longitud (L) se define como la más grande de las 2 mediciones. Se calculó la inhibición tumoral tal como sigue: En primer lugar, se toma el [volumen tumoral inicial menos el volumen tumoral final] para los grupos control y todos los de tratamiento; en segundo lugar, se toma el cambio en el volumen tumoral tratado dividido entre el volumen tumoral control, menos uno y luego se multiplica por 100. La tabla 5 y la figura 5 a continuación en el presente documento describen los resultados de inhibición del crecimiento tumoral y volumen tumoral.

Tabla 5. Resumen de datos de volumen tumoral

Grupo	Media	EE	% de inhibición	Mediana
Vehículo (HPMC) v.o. b.i.d. 7 días	1680	215	0,0	1749,7
AMG 900 3 mpk v.o. b.i.d. 7 días	771	104	60,4	715,6
AMG 900 15 mpk v.o. b.i.d. 2 días	689	107	65,7	612,5
Taxol 12,5 mpk IP q.d. 5 días	1383	283	19,7	1072,0

Figura 5

Efectos del tratamiento con AMG 900 y Taxol sobre el crecimiento de xenoinjertos de H460-resistentes a Taxol establecidos



La figura 5 ilustra los efectos del tratamiento con AMG 900 y Taxol sobre el crecimiento de tumores H460-resistentes a Taxol establecidos. Se inyectaron células (2×10^6 por animal) por vía subcutánea en el costado derecho de ratones desnudos hembra ($n = 10$ por grupo). Se midieron los tumores dos veces a la semana. El tratamiento comenzó 12 días tras la implantación del tumor (flecha) cuando los tumores tenían aproximadamente 170 mm^3 . Se les dosificó a los ratones por vía i.p. o v.o. una vez o dos veces al día durante 3 semanas. Los datos representan la media $\pm$ EE para cada grupo. Los valores de *P (no mostrados) corresponden a la diferencia estadística entre los grupos tratados con vehículo y AMG 900 o Taxol analizados con ANOVA de Sheffe de medidas repetidas a lo largo del tiempo usando STATview. Los días programados enumerados en la leyenda representan días/semana. Se

facilitó a todos los grupos complementos nutricionales a lo largo de todo el estudio.

Tal como ilustra la figura 5, el tratamiento de ratones portadores de tumores con AMG 900 inhibió significativamente el crecimiento tumoral cuando se administró o bien de manera continua (3 mg/kg b.i.d. durante 7 días (inhibición del 60%, $p = 0,0003$)) o bien de manera intermitente (15 mg/kg b.i.d. durante 2 días administrado/5 días sin administrar/semana (inhibición del 66%, $p < 0,0001$)). Taxol no inhibió de manera significativa el crecimiento tumoral cuando se dosificó a 12,5 mg/kg i.p. durante 5 días/semana durante dos ciclos de dosificación (inhibición del 20%, $p = 0,5399$) en este experimento.

Resultó sorprendente e inesperado encontrar que AMG 900 sigue siendo activo en las líneas celulares tumorales que son resistentes a tres inhibidores de aurora cinasa bien caracterizados: AZD1152; VX-680 (denominado también comúnmente MK-0457); y PHA-739358 (Danusertib). Los inhibidores usados para estos experimentos son compuestos publicados y caracterizados en la bibliografía. Por ejemplo, véase Expert Opinion Investigational Drugs (2009) 18 (4) pág. 379-398; Expert Opinion Therapeutic Patents, (2009) 19 (3), pág. 321-356. Un perfil detallado de seguridad, tolerancia y pK, incluyendo la estructura química, de Danusertib (PHA-739358) en fase I en pacientes con tumores sólidos avanzados o metastásicos, está disponible en Steeghs *et al*, Journal of Clinical Oncology, 27, 2009.

Los datos presentados a continuación indican la actividad de AMG 900 en líneas celulares resistentes a Taxol en comparación con la capacidad de los tres inhibidores de aurora cinasa bien conocidos, mencionados anteriormente, para inhibir la fosforilación de histona H3 en las mismas células resistentes a Taxol.

Ejemplo 5

Se evaluaron tres inhibidores de aurora cinasa (AZD1152, MK-0457 y PHA-739358) en un subconjunto de líneas celulares tumorales MDR que expresan los transportadores de flujo de salida de fármacos o bien gp-P o bien BCRP. Inesperadamente, AMG 900 inhibió p-histona H3 o indujo poliploidía en todas las líneas celulares independientemente del estado de gp-P o BCRP con valores de Cl_{50} o CE_{50} uniformes (de 2 a 3 nmol/l). En cambio, los otros inhibidores de aurora cinasa eran menos potentes en una o más de las líneas celulares MDR en comparación con las líneas celulares tumorales sensibles coincidentes, tal como se muestra en la tabla 6 a continuación.

Materiales y métodos

Materiales de compuestos: Las estructuras moleculares de los siguientes compuestos: paclitaxel y docetaxel, MLN8054, MK-0457, AZD1152 y PHA-739358, están disponibles públicamente. Se adquirieron los materiales de fuentes comerciales, cuando fue aplicable, como lo fueron los taxanos.

Líneas celulares: Se obtuvieron líneas celulares tumorales de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) a menos que se especifique otra cosa. Se establecieron las líneas celulares MDA-MB-231-PTX y NCI-H460-PTX haciendo crecer las células en presencia de concentraciones crecientes de paclitaxel a lo largo de un periodo de 6 meses. Se estableció la línea celular resistente a AZD1152 HCT116 haciendo crecer las células en presencia de AZD1152 a 80 nmol/l.

Animales: Se realizaron todos los procedimientos experimentales según el reglamento del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales (*Institutional Animal Care and Use Committee*) y el Departamento de Agricultura (U.S. Department of Agriculture) de los EE.UU. Se alojaron ratones desnudos atímicos hembra de cuatro a seis semanas de edad (Harlan Sprague Dawley) en jaulas esterilizadas y se mantuvieron en condiciones asépticas. El laboratorio que aloja a los animales proporcionó ciclos de luz y oscuridad alternos (12 horas cada uno) y cumplió las normas de las especificaciones de la Asociación para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio (*Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care*). Se ofrecieron a voluntad alimento, agua y complementos nutricionales. Se administraron todos los fármacos basándose en el peso corporal individual de cada ratón.

Ensayos de obtención de imágenes de células basados en fluorescencia: Se realizaron todos los ensayos con alto contenido en células en un lector ArrayScan VTi HCS (Cellomics). Se trataron líneas celulares tumorales con AMG 900, AZD1152, MK-0457 o PHA-739358 (el intervalo de concentración variaba basándose en la potencia). Se prepararon las células para la tinción intracelular con un anticuerpo anti-p-histona H3 Ser¹⁰ tal como se describió anteriormente (1). Se realizó la detección con un anticuerpo anti-IgG de conejo-alexa-568 y DAPI. Se analizaron los niveles celulares de p-histona H3 usando el algoritmo Target Activation V2 (Cellomics) para determinar el porcentaje de células positivas. Para los ensayos de obtención de imágenes, se calcularon las curvas de concentración-respuesta y los valores de Cl_{50} y CE_{50} correspondientes usando el porcentaje de células afectadas frente al control con DMSO.

Ensayo de formación de colonias: Se trataron células tumorales con AMG 900, paclitaxel o AZD1152 (0,5, 5, 50 nmol/l) durante 48 horas, se lavaron dos veces con medios completos y volvieron a sembrarse en placa las células a una densidad de 5000 células por pocillo en medios completos libres de fármacos. Se hicieron crecer las células hasta que los pocillos control con DMSO eran confluentes. Se tiñeron las células con colorante cristal violeta (Sigma), se lavaron con agua destilada y se obtuvieron imágenes de las mismas usando un escáner digital (Hewlett-

Packard).

Ensayo de contenido en ADN $\geq 4N$: Se trataron células tumorales con AMG 900, AZD1152, MK-0457 o PHA-739358 (el intervalo de concentración variaba basándose en la potencia) durante 24 horas y se procesaron para el análisis del ciclo celular (tinción de ADN sólo) tal como se describió anteriormente (1). Se analizaron las células en un citómetro de flujo LSRII usando el software BD FACS Diva. Se calcularon las curvas de concentración-respuesta y los valores de CE_{50} correspondientes usando el porcentaje de células con un contenido en ADN $\geq 4N$ frente al control con DMSO.

Tinción de superficie celular de gp-P y BCRP: Se determinaron la expresión en superficie celular de gp-P (ABCB1) y BCRP (ABCG2) mediante tinción de células vivas en hielo durante 30 minutos con anticuerpos frente a gp-P conjugados con FITC (BD Bioscience) o frente a BCRP conjugados con APC (Millipore). Se usaron anticuerpos de isotipo coincidente (BD Bioscience) como controles así como la tinción de viabilidad con 7-aminoactinomicina D (BD Biosciences) para excluir células muertas. Se analizaron las células en un citómetro de flujo LSRII usando el software BD FACS Diva.

Análisis génico de aurora cinasa: Se aislaron el ARN total y el ADN genómico de sedimentos de células HCT116 congeladas (tres subclones de células resistentes a AZD1152 y un control de célula original) usando métodos de extracción de ácidos nucleicos convencionales. Se usó el ARN total para generar ADNc (kit de RT-PCR Advantage, Clontech). Se realizó la amplificación por PCR de transcritos de genes de aurora A y B de longitud completa usando el kit Expand-polimerase-long-template (Roche). Los pares de cebadores de PCR incluían: aurora A (GCTTGTTACTTATTACAGCTAGAGGCATCATG y TCAAGGATTCTCCCCCTGCACGATTC), aurora B (TCTCCTCCCCCTTTCTCTCTAAGGATG y ACCCGAGTGAATGACAGGGACCATC). Se amplificaron siete exones de aurora C usando el mismo kit de PCR que se describió anteriormente a partir de ADN genómico usando siete conjuntos de cebadores basados en intrones flanqueantes en 5' y 3' ((AACAGCCATCCAGAGGGTTCAGGAAG y CCACACACCCAGTCTGTTCTTCATCC), (AAGGGGAGCATTGGCATCCCTGACTTTC y GTATTTGGGGAAAATGCTGGGCTCAGAC), (ACCAGGCAGTGACGGTGGCATCATATG y TGACAGCCACAAACAGAGCTCCCAC), (GGTAAGTGTTCACCTCAGACGGAAATTG y CATTAACTGGGTCATTCTTAAGTGGTACTCAG), (CTCAATGAAAGCTGGGGAAGGAGAATTTCC y AGAGGCATTGATAGTGGAAACCTCACATC), y (ACAGTGAGACTTACAGACGCATCCTCAAG y AGGAGAGCTCCCTGAACACACAAAAG)). Se subclonaron los productos de ADN de PCR en el vector pCR2.1 según el protocolo recomendado por el fabricante (Invitrogen). Se sometieron los plásmidos purificados que contenían los productos génicos de aurora A, B y C a secuenciación por ciclo de dideoxi usando cebadores flanqueantes para el vector. Se realizaron las reacciones de secuenciación en analizadores de ADN 3730x1 (Applied Biosystems), y se analizaron las secuencias de salida usando el software Sequencher (Gene Codes Corporation).

La tabla 6 ilustra cómo AMG 900 presenta una potencia uniforme a través de líneas celulares tumorales resistentes a múltiples fármacos.

Tabla 6-A

Designación de línea celular	Estado de gp-P	Ensayo de p-histona H3, valor de CI_{50} (nmol/l)			
		AMG 900	AZD1152	MK-0457	PHA-738358
NCI-H460 original	-	3	131	123	510
NCI-H460 PTX resistente a paclitaxel	+	3	>500	468	>1250
MDA-MB-231 original	-	2	16	43	49
MDA-MB-231 PTX resistente a paclitaxel	+	3	>500	277	>1250
MES-SA original	-	3	51	51	113
MES-SA-Dx5 resistente a doxorubicina	+	2	>500	>1250	>1250
Línea celular	Estado de BCRP	Ensayo de contenido en ADN $\geq 4N$, valor de CE_{50} (nmol/l)			
		AMG 900	AZD1152	MK-0457	PHA-738358
U226-B1	-	2	12	46	67
RPMI8226	+	3	865	162	>1250

Nota: El origen de la línea celular NCI-H460-PTX es el pulmón; el de la línea celular MDA-MB-231-PTX es la mama, el de la línea celular MES-SA Dx5 es el útero y las células RPMI-8226 son de mieloma múltiple.

Se realizaron experimentos similares con líneas celulares adicionales tal como se muestra en la tabla 6-B a continuación.

Tabla 6-B

CE ₅₀ celular (nM)		AMG 900	AZD1152-HQPA	PHA-739358	MK-0457
Línea celular	Origen				
MCF-7	Mama	1	11	68	27
NCI-H460-PTX*	Pulmón	3	>500	>1250	468
HCT15*	Colon	2	>625	>1250	908
MES-SA Dx5*	Útero	2	>500	>1250	>1250
MDA-MB-231-PTX*	Mama	3	>500	>1250	277
SNU499*	Hígado	2	>1250	>1250	ND
769P*	Riñón	4	703	>1250	ND
RPMI-8226**	Mieloma múltiple	3	865	>1250	162

Nota: Estado del transportador ABC (* = gp-P+; ** = gp-P- y/o BCRP+)

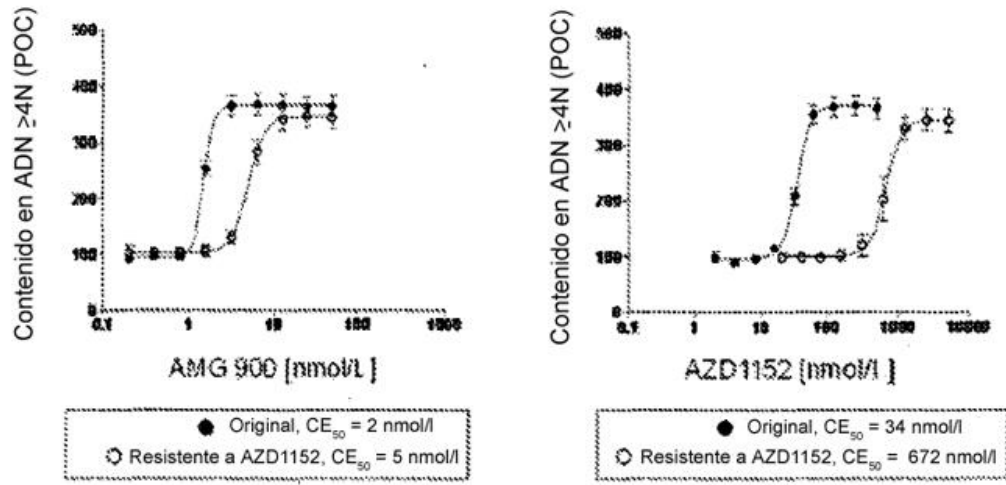
ND = no determinado

Ejemplo 6

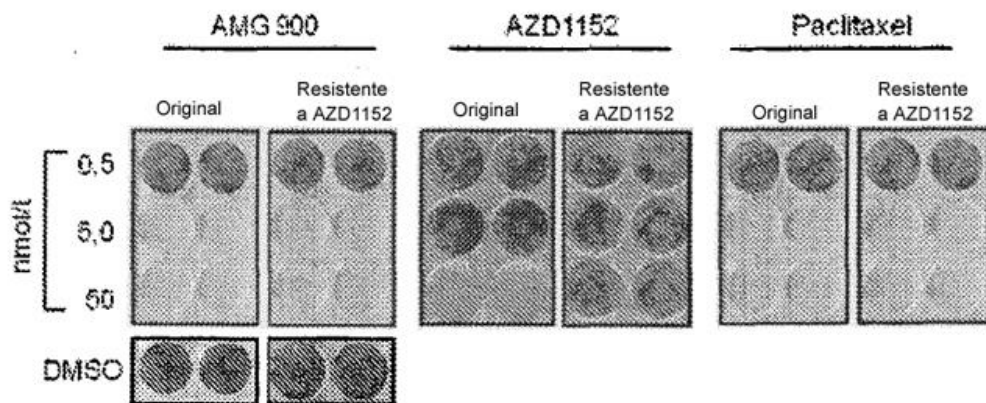
- 5 Además, se evaluó AMG 900 *in vivo* frente a células HCT-116 adaptadas a crecer en presencia de AZD1152, un inhibidor selectivo de aurora cinasa B. Este experimento también arrojó algo de luz sobre posibles mecanismos alternativos de resistencia a inhibidores de aurora cinasa. Por tanto, se adaptaron células HCT116 a crecer en presencia de AZD1152. Entonces se evaluó la actividad de AMG 900 en las líneas celulares HCT116 original y resistente a AZD1152.
- 10 Se encontró sorprendentemente que AMG 900 inducía poliploidía e inhibía la formación de colonias de una sublínea de HCT116 adaptada a crecer en presencia de AZD1152. Los valores celulares de CE₅₀ de contenido en ADN $\geq 4N$ para AMG 900 fueron de 2 y 5 nmol/l en comparación con 34 y 672 nmol/l para AZD1152, respectivamente (figura 6-A). AMG 900 inhibió la formación de colonias en ambas líneas celulares HCT116 a concentraciones ≥ 5 nmol/l, mientras que la sublínea variante era insensible a AZD1152 a 50 nmol/l (figura 6-B). Ambas líneas celulares HCT116
- 15 eran igualmente insensibles a paclitaxel y eran negativas para la expresión de gp-P y BCRP (figura 6-C). De manera interesante, la sublínea variante HCT116 alberga una mutación de cambio de sentido en un alelo del gen de aurora B (TGG $\rightarrow$ TTG; W221L), mientras que no se detectaron mutaciones en los genes de aurora A y C. Estos resultados sugieren que AMG 900 mantiene la actividad en células tumorales que son resistentes a AZD1152 y, más particularmente, células tumorales que portan una mutación heterocigota en aurora B que puede ser responsable de
- 20 la resistencia a AZD1152. Por tanto, los datos inesperadamente positivos indican la sorprendente capacidad de AMG 900 de seguir siendo eficaz en el tratamiento de células tumorales que se han vuelto resistentes a AZD1152.

Figura 6: Efecto de AMG 900 sobre las líneas celulares HCT116 original, HCT116 resistente a AZD1152 (figura 6-A) y líneas celulares resistentes a paclitaxel (figura 6-B)

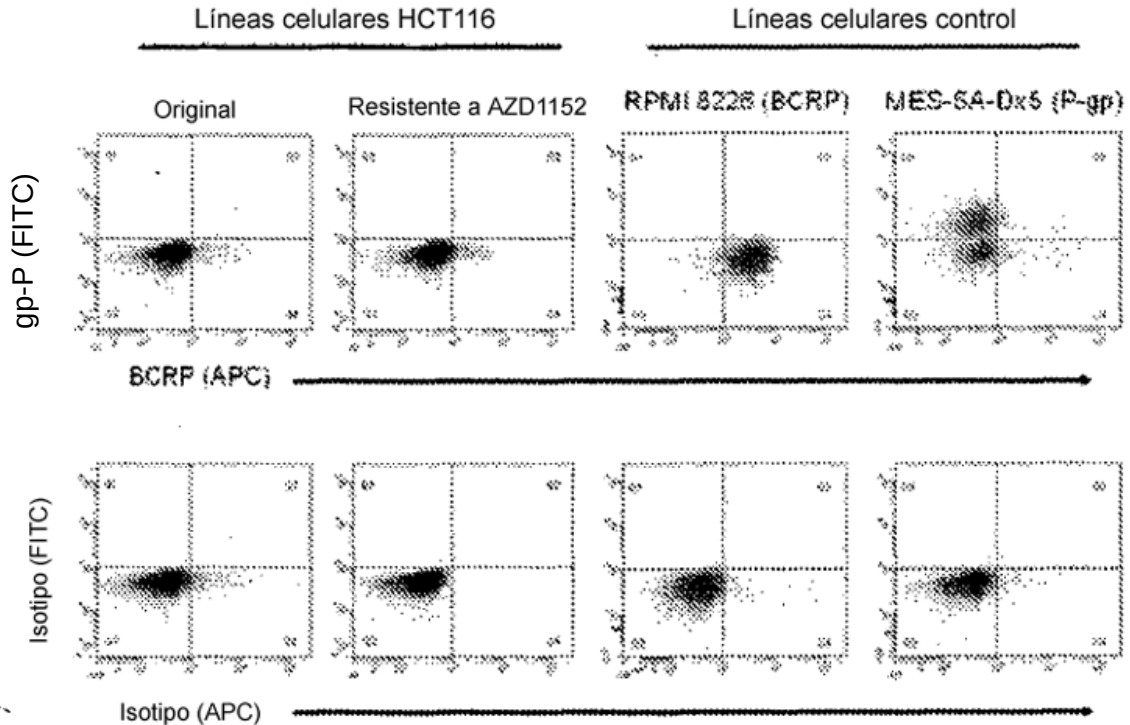
A



B



C



Métodos:

Figura 6-A: Se trataron las líneas celulares HCT116 con concentraciones crecientes de AMG 900 o AZD1152 durante 24 horas. Se usó citometría de flujo para evaluar la acumulación de células con contenido en ADN $\geq 4N$ expresado como un porcentaje del control tratado con DMSO (POC). Se determinaron las curvas de concentración-respuesta y los valores de CE_{50} calculados a partir de dos experimentos independientes (barras, $\pm DE$).

Figura 6-B: Se realizó el ensayo de formación de colonias con las líneas celulares HCT116 (original y resistente a AZD1152). Se trataron las células con DMSO, AMG 900, AZD1152 o paclitaxel a las concentraciones indicadas durante 48 horas y volvieron a sembrarse en placa en medios completos que carecían del inhibidor. Después de que las células tratadas con DMSO alcanzaran la confluencia, se tiñeron las células con cristal violeta y se obtuvieron imágenes de las mismas (pocillos por duplicado).

Figura 6-C: Se evaluó el grado de expresión de gp-P y BCRP sobre la superficie celular de las líneas celulares HCT116 (original y resistente a AZD1152) teñidas conjuntamente con anticuerpos frente a gp-P conjugados con ficoeritrina (PE) y frente a BCRP conjugados con alofocianina (APC) y se analizó mediante citometría de flujo. Se usaron controles de isotipo para cada línea celular para establecer la fluorescencia de fondo. Se usaron las líneas celulares MES-SA-Dx5 y RPMI 8226 como controles positivos para la expresión de gp-P y BCRP, respectivamente.

Animales:

Se recibieron ratones desnudos atímicos hembra (Harlan Sprague Dawley) de edades de 5-6 semanas y se alojaron en jaulas esterilizadas. Se suministraron a voluntad alimento esterilizado en autoclave y agua sometida a ósmosis inversa. Se realizaron todos los estudios con animales según un protocolo de IACUC interno y cumplían todos los requisitos de la AAALAC.

Ensayos farmacodinámicos (detección de fosfo-Histona H3):

Se administró a ratones con tumores de xenoinjerto de HCT 116 o Colo 205 humanos establecidos una única dosis oral de control (vehículo solo) o AMG 900 a la dosificación indicada ($n=3$ animales por grupo). A las 3 ó 6 horas, se recogieron tejidos de tumor, médula ósea o piel para la evaluación farmacodinámica (niveles de p-histona H3). También se recogió plasma para análisis farmacocinéticos.

Citometría de flujo (FCM): Se disociaron los tumores para dar una suspensión de células individuales y se fijaron en

metanol al 90% a -20°C durante al menos 24 horas. Entonces se tiñeron las células con anticuerpos anti-p-histona H3 (ser-10) y anti-citoqueratina y se contratiñeron con yoduro de propidio. Se adquirieron datos en un citómetro de flujo LSRII que funcionaba con el software FACSDiva. Se evaluaron células tumorales positivas para médula ósea y citoqueratina en la fase G2M del ciclo celular para determinar p-histona H3. Se recogieron células tumorales y de médula ósea de los ratones tratados con vehículo para que sirvieran como controles de nivel inicial de p-histona H3. Se determinó la significación estadística mediante análisis de ANOVA de una vía.

Citometría de barrido láser (LSC): Se tiñeron secciones por triplicado de muestras de tejido de FFPE (piel y tumor) usando anticuerpo anti-p-histona H3 seguido por un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con alexa-633. Se montaron portaobjetos con el montante de fluorescencia Prolong Gold que incluía el colorante de ADN Hoechst33342. Se capturaron imágenes en el LSC usando un objetivo de 40x (a una resolución de 0,5 μ pixel). Se determinó el número de acontecimientos de p-histona H3 basándose en un umbral de fluorescencia roja definido. Sólo se contaron los acontecimientos mayores de 20 μ m². Se reubicaron los acontecimientos contorneados en una galería de imágenes para verificar la precisión de la segmentación. Se analizaron los datos usando SAS V9.3 con ajuste de Dunnett aplicado. Se evaluaron todas las pruebas estadísticas a un nivel de significación de alfa = 0,05.

Aspirados con aguja fina (FNA): Se recogieron aspirados de tumor insertando una aguja de calibre 25 a través de una pequeña incisión en la piel que rodeaba el tumor en un patrón predeterminado y constante (3x), entonces se expulsaron en paraformaldehído al 2%. Se citocentrifugaron las células sobre portaobjetos de microscopio y se tiñeron con anticuerpos específicos para EpCAM (marcador de tumor epitelial, Alexa Fluor 488) y pHH3 (marcador de mitosis, Alexa Fluor 647) y se contratiñeron con DAPI (contenido en ADN). Se usó una LSC iCyte (láseres de 405 nm, 488 nm, 633 nm, filtros PMT: 450/40, 530/30, 650/LP) para capturar imágenes de campo de 40x aumentos y para cuantificar EpCAM, pHH3 y el contenido en ADN. Se verificó la integridad de la población reubicando imágenes de células en galerías. Se notificaron los números de células positivas para EpCAM, pHH3 en G2M. Se representaron los datos como una media $\pm$ error estándar de la media (EEM). Se determinó la significación estadística usando ANOVA seguido por análisis de comparaciones múltiples a posteriori de Bonferroni Dunnett.

Concentración de AMG 900 en plasma (ensayo farmacocinético):

Se extrajeron muestras de plasma (50 μ l) mediante adición de una mezcla de disolventes (el 90% de metanol, el 10% de agua con el 0,01% de ácido trifluoroacético) para aislar el analito y precipitar las proteínas plasmáticas. Se determinaron las concentraciones de AMG 900 en muestras extraídas mediante CL-EM/EM usando cromatografía de líquidos de fase inversa en una columna analítica Pursuit PFP de Varian (2,0 x 30 mm, 5 μ m) con ácido fórmico al 0,1% en agua (fase móvil A) y acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1% (fase móvil B).

Modelos de xenoinjerto

Se inyectó por vía subcutánea a ratones 2×10^6 células de tumor de colon HCT 116 humano. Cuando se establecieron los tumores (aproximadamente 200 mm³), se aleatorizaron los ratones en grupos de tratamiento experimentales (n = 10) y se trataron por vía oral con AMG 900 a 1,5, 2,25 ó 3 mg/kg todos los días o 3,75, 7,5 ó 15 mg/kg de manera intermitente durante la duración del experimento. Se proporcionaron a los ratones complementos nutricionales diariamente. Se registraron los volúmenes tumorales y los pesos corporales dos veces a la semana usando un calibre y una balanza digital analítica, respectivamente. Se representaron los datos de tumores mediante el volumen tumoral medio $\pm$ EEM. Se determinó la significación estadística para la inhibición del crecimiento tumoral mediante ANOVA de mediciones repetidas (RMANOVA) seguido por análisis de comparaciones múltiples a posteriori de Scheffe.

Ejemplo 7

Se evaluó adicionalmente el efecto *in vivo* de AMG 900 sobre el crecimiento tumoral en un panel de xenoinjertos humanos de cinco tipos tumorales diferentes (mama, colon, pulmón, pancreático y uterino), incluyendo tres modelos de xenoinjerto MDR. Se administró por vía oral a los ratones que portaban tumores establecidos AMG 900 a 15 mg/kg b.i.d. durante 2 días consecutivos a la semana durante 3 semanas o a 3 mg/kg b.i.d. cada día durante 3 semanas. Se notifica el porcentaje máximo de inhibición del crecimiento tumoral (TGI), en la tabla 7 a continuación, para cada modelo de xenoinjerto. Se calculó el porcentaje de TGI como la diferencia entre el cambio en los volúmenes tumorales control tratados con vehículo y tratados con AMG 900 durante el periodo de estudio. Se determinó la inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa en comparación con los controles tratados con vehículo mediante RMANOVA seguido por pruebas de comparaciones múltiples a posteriori de Scheffe o Dunnett y se indica mediante asteriscos (*P < 0,005, ** < 0,0005).

AMG 900 presentó una actividad antitumoral significativa en los 9 modelos de xenoinjerto (inhibición del crecimiento tumoral (TGI) del 50 al 97% en comparación con el grupo control tratado con vehículo. De manera importante, AMG 900 era activo en los modelos de xenoinjerto MES-SA-Dx5 (TGI del 84%, P < 0,0001) y NCI-H460-PTX (TGI del 66%, P < 0,0001) que eran resistentes a o bien docetaxel o bien paclitaxel administrado sus dosis toleradas máximas respectivas.

Por tanto, AMG 900 inhibe el crecimiento de múltiples xenoinjertos tumorales humanos *in vivo*, incluyendo modelos

resistentes a múltiples fármacos y fármacos antimitóticos de tratamiento de referencia. Específicamente, los datos muestran que AMG 900 inhibe sorprendentemente la actividad de aurora B en tumores HCT116 y suprime el crecimiento de múltiples xenoinjertos representativos de diversos tipos tumorales.

Tabla 7

Modelo tumoral	Origen	TGI máxima (%)
MDA-MB-231	Mama	82**
COLO 205	Colon	73*
HCT-15 (MDR)	Colon	50*
HCT116	Colon	85**
NCI-H460	Pulmón	85**
NCI-H460-PTX (MDR)	Pulmón	65**
MiaPaCa2	Páncreas	60**
MES-SA	Uterino	87**
MES-SA-Dx5 (MDR)	Uterino	84**

- 5 Referencias: Payton M, Chung G, Yakowec P, *et al.* Discovery and evaluation of dual CDK1 y CDK2 inhibitors. Cancer Res 2006; 66:4299-4308.

INDICACIONES

Los mecanismos mediante los cuales los tumores desarrollan resistencia a inhibidores de aurora cinasa difieren probablemente para diferentes agentes. Aunque una comprensión más clara de las fuerzas moleculares que impulsan los fenotipos de cáncer proporcionaría la base para medicamentos o terapias dirigidos molecularmente que podrían aprovechar susceptibilidades genéticas o epigenéticas identificables a una terapia dada, también es crucial comprender la base genética de la resistencia a una terapia. Esta comprensión genética puede proporcionar un filtro adicional con el que estratificar una población de pacientes prospectiva. Por ejemplo, pruebas genéticas publicadas sugieren que el inhibidor de aurora cinasa, AZD1152, que está sometiéndose actualmente a evaluación clínica, y posiblemente otro compuesto clínico, VX-680, pueden ser relativamente ineficaces en células tumorales que sobreexpresan MDR1 o BCRP. Mutaciones del dominio cinasa de aurora B que surgen durante la selección de la línea de carcinoma de colon con reparación del ADN defectuosa, HCT116, pueden conducir a resistencia. Se encontró que estas mutaciones del dominio catalítico también eran suficientes para hacer que las células fuesen resistentes a AZD1152 y VX-680, indicando que la resistencia a estos agentes puede producirse independientemente de MDR. The Pharmacogenomics Journal, (2009) 9, págs. 90-102.

La presente invención proporciona un compuesto, AMG 900, un inhibidor de aurora cinasa, que presenta la capacidad para tratar cánceres que no responden al tratamiento con agentes quimioterápicos tradicionales, de tratamiento de referencia, incluyendo agentes antimitóticos, tales como taxanos (paclitaxel y docetaxel) y alcaloides de la vinca. Además, AMG 900 tiene la capacidad de tratar cánceres que son resistentes a otros agentes inhibidores de aurora cinasa, incluyendo pero sin limitarse a AZD 1152, VX-680 y PHA-739358. Generalmente, tales tumores desarrollan resistencia como resultado del tratamiento previo y/o prolongado con agentes anticancerígenos. Por consiguiente, en una realización de la invención, se proporciona una cantidad de dosificación eficaz del compuesto N-(4-((3-(2-amino-4-pirimidinil)-2-piridinil)oxi)fenil)-4-(4-metil-2-tienil)-1-ftalazinamina para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto, en el que el cáncer del sujeto se trató previamente con un agente anticancerígeno. En otra realización, es agente anticancerígeno es un agente quimioterápico. En otra realización, el agente quimioterápico es un agente antimitótico o una antraciclina. Aún en otra realización, el agente quimioterápico es un agente seleccionado del grupo que consiste en Taxol, docetaxel, vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina, daunorubicina, doxorubicina, idarubicina, epirubicina y mitoxantrona. Aún en otra realización, el agente anticancerígeno es AZD1152, PHA-739358, MK-0457 o una combinación de los mismos.

Como tal, AMG 900 puede usarse para tratar trastornos de proliferación celular, incluyendo crecimiento celular no controlado y regulación del ciclo celular aberrante, que también se han tratado previamente con terapias de tratamiento de referencia con taxanos.

Para este fin, AMG 900 es útil para, pero sin limitarse a, la prevención o el tratamiento del cáncer incluyendo, por ejemplo, diversos tumores sólidos y derivados hematológicamente, tales como carcinomas, incluyendo, sin limitación, cáncer de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón (incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas), esófago, vesícula biliar, ovario, páncreas, estómago, cuello uterino, tiroides, próstata, útero y piel (incluyendo carcinoma de células escamosas); tumores hematopoyéticos de linaje linfóide (incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma de células pilosas y linfoma de Burkett); tumores hematopoyéticos de linaje mielóide (incluyendo leucemias mielógenas aguda y crónica (LMA y LMC), síndrome mielodisplásico y leucemia promielocítica); tumores de origen mesenquimatoso (incluyendo fibrosarcoma y rhabdomyosarcoma, y otros sarcomas, por ejemplo de tejido blando y hueso); tumores del sistema nervioso central y periférico (incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas); y otros tumores (incluyendo melanoma, seminoma, teratocarcinoma, osteosarcoma, xeroderma pigmentaria, queratoacantoma, cáncer folicular tiroideo y sarcoma de Kaposi), en los que

tales cánceres han experimentado recidiva o han llegado a ser refractarios. Cánceres, tales como cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de mama, colangiocarcinoma u otros tipos de cáncer, que han llegado a ser refractarios al tratamiento anticancerígeno, tales como con hormonas, también pueden tratarse con AMG 900.

- 5 En una realización, la invención proporciona una cantidad de dosificación eficaz de AMG 900 para su uso en el tratamiento de uno o más cánceres seleccionados del grupo que consiste en cáncer uterino, cáncer de mama, cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de piel, cáncer de riñón, cáncer de hígado, leucemias incluyendo leucemia promielocítica, leucemia mieloide crónica y leucemia de células T, mieloma múltiple, cáncer de ovario y cáncer de médula ósea en un sujeto, en el que el cáncer del sujeto se ha tratado previamente con y ha llegado a ser refractario al tratamiento con uno o más agentes quimioterápicos seleccionados del grupo que consiste en doxorubicina, daunorubicina, dactinomicina, colchicina, vinblastina, vincristina, paclitaxel, docetaxel, etopósido y mitoxantrona. En otra realización, la invención se refiere al tratamiento de uno o más cánceres seleccionados del grupo que consiste en cáncer de la vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, pulmón de células no pequeñas, cabeza y cuello, esofágico, gástrico, ovario, páncreas, estómago, cuello uterino, tiroides y próstata o un linfoma o una leucemia. AMG 900 también es útil para tratar tumores sólidos avanzados, incluyendo sin limitaciones, tumores de la vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, pulmón de células no pequeñas, cabeza y cuello, esofágico, gástrico, ovario, páncreas, estómago, cuello uterino, tiroides y próstata.

- 20 La invención también se refiere al tratamiento de tumores sólidos, sarcomas (especialmente sarcoma de Ewing y osteosarcoma), retinoblastoma, rhabdomyosarcomas, neuroblastoma, tumores malignos hematopoyéticos, incluyendo leucemia y linfoma, efusiones pleurales o pericárdicas inducidas por tumores y ascitis malignas.

- 25 Además de ser útil para el tratamiento de seres humanos, el compuesto también es útil para el tratamiento veterinario de animales de compañía, animales exóticos y animales de granja, incluyendo mamíferos, roedores y similares. Por ejemplo, animales incluyendo caballos, perros y gatos pueden tratarse de manera similar con AMG 900 para cánceres refractarios al tratamiento con quimioterapia contra el cáncer de tratamiento de referencia.

FORMULACIONES

- 30 AMG 900 puede administrarse al sujeto con cáncer como una composición farmacéutica que comprende el compuesto (que es el principio farmacéutico activo o API de la invención), N-(4-((3-(2-amino-4-pirimidinil)-2-piridinil)oxi)fenil)-4-(4-metil-2-tienil)-1-ftalazinamina, en asociación con uno o más portadores, diluyentes y/o adyuvantes no tóxicos, farmacéuticamente aceptables (denominados colectivamente en el presente documento materiales de "excipiente"). AMG 900, o una forma de sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede procesarse según métodos convencionales de farmacia para producir las composiciones medicinales y farmacéuticas para su administración a pacientes, incluyendo seres humanos y otros mamíferos.

- 35 La composición farmacéutica puede administrarse al sujeto mediante cualquier vía adecuada, adaptada a tal vía, y en una dosis eficaz para el tratamiento del cáncer que no responde al tratamiento previsto. La composición, o API, por ejemplo, puede administrarse por vía oral, por vía mucosa, por vía tópica, por vía rectal, por vía pulmonar tal como mediante pulverización de inhalación, o por vía parenteral incluyendo por vía intravascular, por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intraesternal y técnicas de infusión, en formulaciones de unidad de dosificación que contienen portadores, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables convencionales.

- 40 Para la administración oral, la composición farmacéutica puede estar en forma de, por ejemplo, un comprimido, una cápsula, una suspensión o un líquido. La composición farmacéutica se prepara preferiblemente en forma de una unidad de dosificación que contiene una cantidad particular del principio activo. Ejemplos de tales unidades de dosificación son comprimidos o cápsulas. Por ejemplo, estos pueden contener una cantidad de principio activo de desde aproximadamente 1 hasta 2000 mg, y normalmente desde aproximadamente 1 hasta 500 mg. Una dosis diaria adecuada para un ser humano u otro mamífero puede variar ampliamente dependiendo del estado del paciente y otros factores, pero, una vez más, puede determinarse usando métodos y prácticas de rutina.

- 45 La cantidad del API (AMG 900) que se administra y el régimen de dosificación para tratar el estado de cáncer que no responde al tratamiento depende de una variedad de factores, incluyendo la edad, el peso, el sexo y el estado médico del sujeto, el tipo de enfermedad, la gravedad del cáncer, la vía y frecuencia de administración y las propiedades físicas y químicas de AMG 900 o su forma particular, incluyendo la forma de sal específica. Por tanto, un régimen de dosificación puede variar. Una dosis diaria de aproximadamente 0,01 a 500 mg/kg, ventajosamente entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 50 mg/kg, más ventajosamente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 30 mg/kg e incluso más ventajosamente entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal puede ser apropiada. En una realización, la invención proporciona un método de tratamiento del cáncer en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto AMG 900 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una cantidad de dosificación eficaz en el intervalo de desde aproximadamente 0,5 mg/kg hasta aproximadamente 25 mg/kg, en el que el cáncer del sujeto es refractario al tratamiento con un agente antimetabólico. En otra realización, la invención proporciona un método de tratamiento del

cáncer en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto AMG 900 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una cantidad de dosificación eficaz en el intervalo de desde aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, en el que el cáncer del sujeto es refractario al tratamiento con un agente quimioterápico de tratamiento de referencia, incluyendo un agente antimitótico. Aún en otra realización, la invención proporciona un método de tratamiento del cáncer en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto AMG 900 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una cantidad de dosificación eficaz en el intervalo de desde aproximadamente 3,0 mg/kg hasta aproximadamente 15 mg/kg, en el que el cáncer del sujeto es refractario al tratamiento con un agente antimitótico. La dosis diaria puede administrarse en de una a cuatro dosis al día.

Para fines terapéutico, puede combinarse AMG 900 con uno o más adyuvantes o “excipientes” apropiados para la vía de administración indicada. Si se administra por dosis, puede mezclarse AMG 900 con lactosa, sacarosa, polvo de almidón, ésteres de celulosa de ácidos alcanoicos, ésteres alquílicos de celulosa, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, óxido de magnesio, sales de sodio y calcio de ácidos fosfórico y sulfúrico, gelatina, goma arábica, alginato de sodio, polivinilpirrolidona y/o poli(alcohol vinílico), para formar la formulación final. Por ejemplo, AMG 900 y el/los excipiente(s) puede(n) prepararse en comprimidos o encapsularse mediante métodos conocidos y aceptados para su administración conveniente. Los ejemplos de formulaciones adecuadas incluyen, sin limitación, pastillas, comprimidos, cápsulas de gel de vaina dura y blanda, trociscos, formas que pueden disolverse por vía oral y formulaciones de liberación retardada o controlada de los mismos. Particularmente, las formulaciones de cápsula o comprimido pueden contener uno o más agentes de liberación controlada, tales como hidroxipropilmetilcelulosa, como una dispersión con el/los API.

En el caso de psoriasis y otros estados de la piel, puede ser preferible aplicar una preparación tópica del AMG 900 a la zona afectada de dos a cuatro veces al día. Las formulaciones adecuadas para la administración tópica incluyen preparaciones líquidas o semilíquidas adecuadas para la penetración a través de la piel (por ejemplo, linimentos, lociones, pomadas, cremas, pastas, suspensiones y similares) y gotas adecuadas para su administración al ojo, el oído o la nariz. Una dosis tópica adecuada del principio activo es de 0,1 mg a 150 mg administrada de una a cuatro, preferiblemente una o dos veces al día. Para la administración tópica, el API puede comprender desde el 0,001% hasta el 10% p/p, por ejemplo, desde el 1% hasta el 2% en peso de la formulación, aunque puede comprender hasta el 10% p/p, pero preferiblemente no más del 5% p/p, y más preferiblemente desde el 0,1% hasta el 1% de la formulación.

Cuando se formula en una pomada, puede emplearse AMG 900 con una base de pomada o bien parafínica o bien miscible con agua. Alternativamente, puede formularse en una crema con una base de crema de aceite en agua. Si se desea, la fase acuosa la base de crema puede incluir, por ejemplo al menos el 30% p/p de un alcohol polihidroxilado tal como propilenglicol, butano-1,3-diol, manitol, sorbitol, glicerol, polietilenglicol y mezclas de los mismos. La formulación tópica puede incluir de manera deseable un compuesto, que potencia la absorción o penetración del principio activo a través de la piel u otras zonas afectadas. Los ejemplos de tales potenciadores de la penetración dérmica incluyen DMSO y análogos relacionados.

AMG 900 también puede administrarse mediante un dispositivo transdérmico. Preferiblemente, la administración transdérmica se logrará usando un parche del tipo de o bien depósito o bien membrana porosa o de una variedad de matriz sólida. En cualquier caso, se suministra AMG 900 de manera continua desde el depósito o microcápsulas a través de una membrana hacia el adhesivo permeable al agente activo, que está en contacto con la piel o la mucosa del receptor. Si se absorbe AMG 900 a través de la piel, se administra un flujo controlado y predeterminado de AMG 900 al receptor. En el caso de microcápsulas, el agente de encapsulación puede funcionar también como membrana.

La fase oleosa de las emulsiones puede estar constituida por componentes conocidos de una manera conocida. Aunque la fase puede comprender simplemente un emulsionante, puede comprender una mezcla de al menos un emulsionante con una grasa o un aceite o con tanto una grasa como un aceite. Preferiblemente, se incluye un emulsionante hidrófilo junto con un emulsionante lipófilo que actúa como estabilizador. También se prefiere incluir tanto un aceite como una grasa. Juntos, el/los emulsionante(s) con o sin estabilizador(es) constituyen la denominada cera de emulsionamiento, y la cera junto con el aceite y la grasa constituyen la denominada base de pomada de emulsionamiento, que forma la fase oleosa dispersada de las formulaciones de crema. Los emulsionantes y estabilizadores de la emulsión adecuados para su uso en la formulación incluyen, por ejemplo, Tween 60, Span 80, alcohol cetosteárico, alcohol mirístico, monoestearato de glicerilo, laurilsulfato de sodio, diestearato de glicerilo solo o con una cera, u otros materiales bien conocidos en la técnica.

La elección de aceites o grasas adecuados para la formulación se basa en lograr las propiedades cosméticas deseadas, puesto que la solubilidad del API en la mayoría de los aceites que van a usarse probablemente en formulaciones de emulsión farmacéutica es muy baja. Por tanto, la crema debe ser preferiblemente un producto no grasiento, que no manche y lavable con consistencia adecuada para evitar fugas de tubos u otros recipientes. Pueden usarse ésteres alquílicos mono o dibásicos, de cadena lineal o ramificada tales como estearato de diisoadipato, estearato de isocetilo, diéster de propilenglicol de ácidos grasos de coco, miristato de isopropilo, oleato de decilo, palmitato de isopropilo, estearato de butilo, palmitato de 2-etilhexilo o una combinación de ésteres de cadena ramificada. Estos pueden usarse solos o en combinación dependiendo de las propiedades requeridas. Alternativamente, pueden usarse lípidos de alto punto de fusión tales como parafina blanda blanca y/o parafina

líquida u otros aceites minerales.

Las formulaciones adecuadas para la administración tópica al ojo también incluyen colirios en los que los principios activos se disuelven o suspenden en un portador adecuado, especialmente un disolvente acuoso para AMG 900. AMG 900 está presente preferiblemente en tales formulaciones en una concentración del 0,5 al 20%, ventajosamente del 0,5 al 10% y particularmente de aproximadamente el 1,5% p/p.

Las formulaciones para la administración parenteral pueden estar en forma de disoluciones o suspensiones de inyección estériles isotónicas acuosas o no acuosas. Estas disoluciones y suspensiones pueden prepararse a partir de polvos o gránulos estériles usando uno o más de los portadores o diluyentes mencionados para su uso en las formulaciones para la administración oral o usando otros agentes de suspensión y agentes humectantes o de dispersión adecuados. Por ejemplo, puede disolverse AMG 900 en agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, alcohol bencílico, cloruro de sodio, goma tragacanto y/o diversos tampones. Otros adyuvantes y modos de administración se conocen bien y ampliamente en la técnica farmacéutica. AMG 900 también puede administrarse mediante inyección como una composición con portadores adecuados incluyendo solución salina, dextrosa o agua, o con ciclodextrina (es decir, Captisol), solubilización con codisolventes (es decir, propilenglicol) o solubilización micelar (es decir, Tween 80).

La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente aceptable por vía parenteral no tóxico, por ejemplo como una disolución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, disolución de Ringer y disolución de cloruro de sodio isotónica. Además, se emplean convencionalmente aceites fijos, estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite fijo insípido, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, ácidos grasos tales como el ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables.

Para la administración pulmonar, la composición farmacéutica puede administrarse en forma de un aerosol o con un inhalador incluyendo aerosol de polvo seco.

Pueden prepararse supositorios para la administración rectal del fármaco mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado tal como manteca de cacao y polietilenglicoles que son sólidos a las temperaturas habituales pero líquidos a la temperatura rectal y que por tanto se fundirán en el recto y liberarán el fármaco.

Las composiciones farmacéuticas pueden someterse a operaciones farmacéuticas convencionales tales como esterilización y/o pueden contener adyuvantes convencionales, tales como conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, tampones, etc. Pueden prepararse adicionalmente comprimidos y pastillas con recubrimientos entericos. Tales composiciones pueden comprender también adyuvantes, tales como agentes humectantes, edulcorantes, aromatizantes y de perfume.

COMBINACIONES

Aunque AMG 900 puede dosificarse o administrarse como el único agente farmacéutico activo, también puede usarse en combinación con uno o más agentes quimioterápicos y/o antimitóticos. Cuando se administra como una combinación, puede formularse AMG 900 como composiciones separadas que se administran simultáneamente o secuencialmente a diferentes tiempos, o puede administrarse AMG 900 como una composición única.

El término "coterapia" (o "terapia de combinación"), en la definición del uso de AMG 900 de la presente invención y otro agente quimioterápico, pretende abarcar la administración de cada agente de una manera secuencial en un régimen que proporcionará efectos beneficiosos de la combinación de fármacos, y pretende abarcar también la coadministración de estos agentes de una manera sustancialmente simultánea, tal como en una única cápsula que tiene una razón fijada de estos agentes activos o en múltiples cápsulas separadas para cada agente.

Específicamente, la administración de AMG 900 puede ser conjuntamente con un agente quimioterápico adicional, incluyendo terapias antimitóticas, conocidas por los expertos en la técnica en la prevención o el tratamiento del cáncer. La invención no está limitada en la secuencia de administración, es decir, puede administrarse AMG 900 o bien antes, simultáneamente con o después de la administración del agente anticancerígeno o antimitótico conocido.

Lista de secuencias

<110> Amgen Inc.

<120> Uso de N-(4-((3-(2-amino-4-pirimidinil)-2-piridinil)oxi)fenil)-4-(4-metil-2-tienil)-1-ftalazinamina en el tratamiento del cáncer resistente a agentes antimitóticos

<130> EP81180HV210pau

<140> 10 755 044.4

<141> 09-09-2010

	<150> Documento PCT/US2010/048247	
	<151> 09-09-2010	
5	<150> 12/878.539	
	<151> 09-09-2011	
	<150> 61/241.527	
	<151> 11-09-2009	
10	<160> 16	
	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
	<211> 32	
15	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 1	
20	gcttggttact tattacagct agagggcatca tg	32
	<210> 2	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
25	<400> 2	
	tcaaggattt ctccccctgc acgattc	27
	<210> 3	
30	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 3	
35	tctcctcccc ctttctctct aaggatg	27
	<210> 4	
	<211> 25	
	<212> ADN	
40	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 4	
	acccgagtga atgacaggga ccatc	25
45	<210> 5	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
50	<400> 5	
	aacagccatc cagagggttc aggaag	26
	<210> 6	
	<211> 26	
55	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 6	
	ccacacaccc agtctgttct tcatcc	26
60	<210> 7	
	<211> 28	
	<212> ADN	

	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 7	
5	aaggggagca ttggcatccc tgactttc	28
	<210> 8	
	<211> 28	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 8	
	gtattttgggg aaaatgctgg gctcagac	28
	<210> 9	
15	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 9	
20	accaggcagt gacggtggca tcatatg	27
	<210> 10	
	<211> 25	
	<212> ADN	
25	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 10	
	tgacagccac aaacagagct cccac	25
30	<210> 11	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
35	<400> 11	
	ggtaagtgtt ccacctcaga cggaaattg	29
	<210> 12	
	<211> 33	
40	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 12	
45	cattaaactg ggtcattcct aactggtact cag	33
	<210> 13	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
50	<400> 13	
	ctcaatgaaa gctggggaag gagaatttcc	30
	<210> 14	
55	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 14	
60	agaggcattg atagtggaaa cctcacatc	29
	<210> 15	

<211> 29
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 15
acagtgagac ttacagacgc atcctcaag 29

<210> 16
 <211> 27
 10 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 16
aggagagctc cctgaacaca cacaaag 27
 15

REIVINDICACIONES

1. Compuesto N-(4-((3-(2-amino-4-pirimidinil)-2-piridinil)oxi)fenil)-4-(4-metil-2-tienil)-1-ftalazinamina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto, en el que el cáncer del sujeto es refractario al tratamiento con un agente anticancerígeno.
- 5 2. Compuesto para su uso según la reivindicación 1 en el que el agente anticancerígeno es un agente quimioterápico.
3. Compuesto para su uso según la reivindicación 2, en el que el agente quimioterápico es un agente seleccionado del grupo que consiste en un agente antimetabólico y una antraciclina.
- 10 4. Compuesto para su uso según la reivindicación 2, en el que el agente quimioterápico es un agente seleccionado del grupo que consiste en Taxol, docetaxel, vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina, daunorubicina, doxorubicina, idarubicina, epirubicina y mitoxantrona.
5. Compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que el agente anticancerígeno es AZD1152, PHA-739358, MK-0457 o una combinación de los mismos.
- 15 6. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el cáncer es uno o más de (a) un tumor sólido o derivado hematológicamente seleccionado de cáncer de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, cáncer de pulmón de células pequeñas, esófago, vesícula biliar, ovario, páncreas, estómago, cuello uterino, tiroides, próstata y piel, (b) un tumor hematopoyético de linaje linfocítico seleccionado de leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma de células pilosas y linfoma de Burkett, (c) un tumor hematopoyético de linaje mielocítico seleccionado de leucemias mielógenas aguda y crónica, síndrome mielodisplásico y leucemia promielocítica, (d) un tumor de origen mesenquimatoso seleccionado de fibrosarcoma y rhabdomyosarcoma, (e) un tumor del sistema nervioso central y periférico seleccionado de astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannoma, o (f) un melanoma, seminoma, teratocarcinoma, osteosarcoma, xeroderma pigmentaria, queratoacantoma, cáncer folicular tiroideo o sarcoma de Kaposi.
- 20 7. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el cáncer es uno o más de un tumor sólido seleccionado de cáncer de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, pulmón de células no pequeñas, cabeza y cuello, esofágico, gástrico, ovárico, páncreas, estómago, cuello uterino, tiroides y próstata o un linfoma o una leucemia.
- 30 8. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el cáncer es cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de mama, colangiocarcinoma, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielocítica crónica o una combinación de los mismos.
- 35 9. Uso del compuesto N-(4-((3-(2-amino-4-pirimidinil)-2-piridinil)oxi)fenil)-4-(4-metil-2-tienil)-1-ftalazinamina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer refractario al tratamiento con un agente anticancerígeno.
- 40 10. Uso del compuesto según la reivindicación 9, para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer seleccionado de cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de estómago, cáncer de cuello uterino, cáncer de tiroides, cáncer de próstata, linfoma, leucemia, mieloma múltiple o una combinación de los mismos, en el que el cáncer es refractario al tratamiento con un agente anticancerígeno.
11. Uso del compuesto según la reivindicación 9, para reducir el tamaño de un tumor sólido en un sujeto, en el que el tumor del sujeto se trató previamente con un agente quimioterápico seleccionado del grupo que consiste en paclitaxel, docetaxel, doxorubicina y un alcaloide de la vinca.
- 45 12. Uso del compuesto según la reivindicación 9, en el que el agente anticancerígeno es un agente quimioterápico seleccionado del grupo que consiste en un agente antimetabólico y una antraciclina.
13. Uso del compuesto según la reivindicación 9, en el que el agente anticancerígeno es un agente quimioterápico seleccionado del grupo que consiste en Taxol, docetaxel, vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina, daunorubicina, doxorubicina, idarubicina, epirubicina y mitoxantrona.
- 50 14. Uso del compuesto según la reivindicación 9, en el que el agente anticancerígeno es AZD1152, PHA-739358, MK-0457 o una combinación de los mismos.