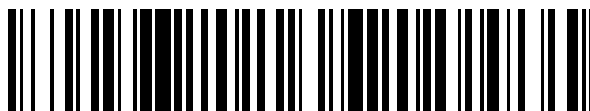


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 732**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/519** (2006.01)

**A61K 31/4188** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2009 E 09781195 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2323664**

54 Título: **Uso de un inhibidor de CDK para el tratamiento del glioma**

30 Prioridad:

**29.07.2008 EP 08161323**

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

**31.03.2015**

73 Titular/es:

**NERVIANO MEDICAL SCIENCES S.R.L. (100.0%)  
11 Viale Pasteur, 10 P.O. Box 11  
20014 Nerviano (MI), IT**

72 Inventor/es:

**CIOMEI, MARINA;  
FIORENTINI, FRANCESCO y  
PESENTI, ENRICO**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 532 732 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

Uso de un inhibidor de CDK para el tratamiento del glioma

5

**Campo técnico**

La presente invención se refiere al tratamiento de pacientes de glioma mediante el uso de un inhibidor de CDK (del inglés Cyclin-Dependent Kinase, quinasa dependiente de ciclina) ATP competitivo de bajo peso molecular, capaz de cruzar la barrera sanguínea del cerebro.

10

**Técnica anterior**

Los gliomas malignos son tumores altamente invasivos y neurológicamente destructivos, cuya manifestación más agresiva es el glioblastoma. El término "glioma" abarca un grupo de cánceres que incluyen astrocitomas, oligodendrogliomas, oligoastrocitomas y ependimomas. El esquema para la clasificación y gradación de gliomas más ampliamente usado es el de la Organización Mundial de la Salud, donde se clasifican los gliomas de acuerdo con su hipotética línea de diferenciación, es decir si presentan características de células astrocíticas, oligodendriales o ependimales. Se clasifican en una escala de I a IV de acuerdo con su grado de malignidad. Se clasifica el glioblastoma (GBM) como astrocitoma anaplásico de grado IV.

15

20

El glioblastoma es el tumor cerebral primario más común en adultos. Más de la mitad de los 18.000 pacientes diagnosticados de tumores cerebrales primarios malignos en EEUU cada año tienen GBM. El GBM es un tumor anaplásico, altamente celular, con índices de proliferación elevados, proliferación microvascular y necrosis focal. Los signos y síntomas dependen de varios factores (tamaño, velocidad de crecimiento, localización del tumor en el cerebro) y están representados principalmente por dolor de cabeza, ataques, déficits neurológicos, cambios en el estado mental. El pronóstico de GMB permanece pésimo. El tiempo de supervivencia es inferior a 2 años para la mayoría de pacientes. La escala de valoración funcional de Karnofsky (KPS, del inglés Karnofsky performance status) es uno de los factores de pronóstico más importantes: los pacientes con KPS > 70 permanecen con vida 18 meses en aproximadamente el 18% de los casos, comparados con el 13% de pacientes con valores inferiores de KPS. El GMB primario se desarrolla de novo a partir de células gliales, tiene típicamente una historia clínica de menos de seis meses, es más común en pacientes mayores y presenta histología de células pequeñas. El GMB secundario se desarrolla a lo largo de meses o años a partir de astrocitomas de bajo grado pre-existentes, afecta predominantemente a gente más joven y presenta histología de células gigantes.

25

30

35

La biología molecular de los gliomas ha proporcionado nuevas perspectivas en el desarrollo de esta enfermedad y el control de la desregulación de las rutas de señalización celular a través de terapias orientadas molecularmente es la nueva frontera terapéutica.

40

Múltiples cambios genéticos están involucrados en el desarrollo de los GMBs primarios y secundarios y las mismas rutas genéticas están desmanteladas tanto en los tumores primarios como en los secundarios.

Las rutas principales involucradas en la patogénesis del GMB son dos [Rich JN, Bigner DD. Nat Rev Drug Discov 2004; 3(5):430-46]. La primera es la ruta de señalización mediada por receptores del factor de crecimiento de tirosina quinasa: la cascada de transducción de señal de ras-MAP quinasa está activada en casi todos los GMBs y Akt está activada en aproximadamente el 70% de GMBs. De hecho, también se ha informado de la amplificación de muchos receptores de tirosina quinasa [Puputti M y col. Mol Cancer Res 2006; 4(12):927-934].

45

La segunda ruta alterada frecuentemente en esta patología, así como en muchos otros cánceres humanos es el circuito regulador RB-CDK-CDKI (inhibidor de quinasa dependiente de ciclina): se detecta la pérdida de INK4A (también conocido como p16) en el 40-57% de GMBs y se identifica la pérdida del supresor tumoral retinoblastoma (RB) en el 14-33% de GMBs. En total se detectan mutaciones en INK4A/CDK2/RB en más del 80% de GMBs y en el 50% de astrocitomas anaplásicos [Zhu Y y Parada LF. Nature Reviews Cancer 2002; 2:616-626].

50

Las opciones terapéuticas actuales para el GMB incluyen cirugía, radioterapia y quimioterapia. Los fármacos usados más ampliamente son carmustina, lomustina, vincristina, procarbazona, carboplatino, etopósido e irinotecán. La terapia neoadyuvante o adyuvante con estos fármacos ha demostrado prolongar la supervivencia libre de enfermedad pero no la supervivencia global.

55

Temozolomida (TMZ) y radioterapia (RT) simultáneas se ha convertido en el nuevo estándar de tratamiento para los pacientes con GMB que se acaba de diagnosticar, con una mejora clínicamente significativa en cuanto a la supervivencia comparado con la RT sola (tiempo medio de supervivencia de 15 meses para pacientes tratados con TMZ/RT frente a 12 meses para pacientes tratados sólo con RT; una relación de supervivencia de 2 años del 26% para el grupo TMZ/RT frente al 10% del grupo RT).

60

65

A pesar de la introducción exitosa de la TMZ, los médicos coinciden en que es necesario continuar la investigación para el desarrollo de nuevos principios activos contra el glioma. De hecho, todavía hay una necesidad médica no

cubierta de nuevos agentes potentes para el tratamiento de gliomas. La presente invención aborda a este problema.

### Resumen de la invención

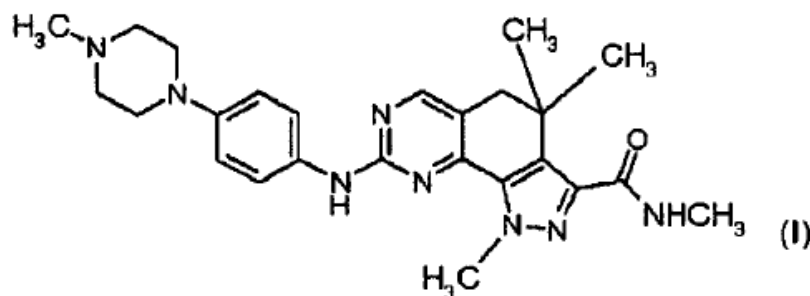
La invención proporciona un compuesto de bajo peso molecular capaz de cruzar la barrera sanguínea del cerebro, capaz de inhibir dos de las rutas principales involucradas en la patogénesis del glioma a través de la inhibición de CDKs y de las rutas de señalización de la tirosina quinasa mediadas por receptores del factor de crecimiento y que es eficaz en la inhibición de la proliferación del glioma.

El compuesto de la presente invención que presenta la actividad deseada es una pirazoloquinazolina diseñada como diana del bolsillo de ATP de las proteína quinasa. El compuesto se ha revelado como un potente inhibidor ATP competitivo de CDKs. Inesperadamente, se ha encontrado que el compuesto presenta una potencia inhibidora significativa respecto a TRKA (tropomiosina receptor quinasa A). Además, se ha encontrado que el compuesto es capaz de entrar en el cerebro en cantidad elevada.

En vista de su actividad biológica, el compuesto de la invención ofrece una nueva vía para el desarrollo de un tratamiento para la población de pacientes que sufren gliomas.

### Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en un método para el tratamiento de un glioma maligno.

Como se usa aquí, el término "glioma maligno" o "glioma" incluye astrocitomas (en particular glioblastomas), oligodendrogliomas, oligoastrocitomas, ependimomas, así como tumores glio-neuronales mezclados (tumores que presentan tanto un componente neuronal como glial, p. ej. gangliogliomas, tumores neuroepiteliales disembrionarios) y tumores originados por células neuronales (p. ej. gangliocitoma, gangliocitoma central).

En una realización preferida de la invención, el compuesto de fórmula (I) como se define arriba se usa en un método para el tratamiento de un glioblastoma (GBM).

El compuesto de fórmula (I) tiene el nombre químico metilamida del ácido 8-[4-(4-metil-piperazin-1-il)-fenilamino]-1,4,4-trimetil-4,5-dihidro-1H-pirazolo[4,3-h]quinazolin-3-carboxílico. Se puede preparar como se describe en el documento WO2004104007, está dotado de actividad inhibitoria de proteína quinasa y por tanto es útil en la terapia como agente antitumoral. En particular, la preparación preferida del compuesto de fórmula (I) es la que se describe en el ejemplo 58 de la Solicitud de Patente Internacional mencionada arriba. Las combinaciones que comprenden el compuesto de fórmula (I) junto con un agente antineoplásico para el uso en el tratamiento de tumores, incluyendo glioma, se revela en la Solicitud de Patente Internacional WO2007090794.

Las sales farmacéuticamente aceptables del compuesto de fórmula (I) incluyen las sales de adición de ácido con ácidos orgánicos o inorgánicos, p. ej., ácido nítrico, clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, perclórico, fosfórico, acético, trifluoroacético, propiónico, glicólico, láctico, oxálico, malónico, málico, maleico, tartárico, cítrico, benzoico, cinámico, mandélico, metanosulfónico, isetiónico y salicílico y similares.

Aquí se revela también el uso de todos los posibles isómeros y sus mezclas y tanto de metabolitos como de bio-precusores farmacéuticamente aceptables (denominados también pro-fármacos) de los compuestos de fórmula (I). Los pro-fármacos son cualquier compuesto unido covalentemente que libera el fármaco activo precursor, de acuerdo con la fórmula (I), in vivo.

Se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de acuerdo con la fórmula (I) a un sujeto al determinar que el sujeto padece una enfermedad o una condición no deseada que mejoraría mediante el tratamiento con dicho compuesto. El personal médico o clínico puede hacer la determinación como parte de un diagnóstico de una enfermedad o condición en un sujeto. El compuesto también se puede usar en la prevención de

dichas condiciones, lo que se puede contemplar como una reducción de la probabilidad de un sujeto de padecer una o varias de las condiciones.

5 Como se usa aquí, una “cantidad terapéuticamente eficaz” de un compuesto se refiere a una cantidad suficiente para alcanzar la finalidad pretendida. La determinación de las cantidades eficaces se incluye en la capacidad de los expertos en la materia basada en la consecución de un efecto deseado. Una cantidad eficaz dependerá de factores que incluyen, sin limitar, el tamaño de un sujeto y/o el grado de progresión de la enfermedad o la condición no deseada que sufre el sujeto. La cantidad eficaz dependerá también de si el compuesto se administra al sujeto en una dosis única o periódicamente a lo largo del tiempo.

10 El compuesto de fórmula (I) de la presente invención está dirigido al tratamiento de sujetos. Como se usa aquí, el término “sujeto” abarca mamíferos y no mamíferos. Los ejemplos de mamíferos incluyen, sin limitar, cualquier miembro de la clase de los mamíferos: humanos, primates no humanos como chimpancés, y otros simios y especies de monos; animales de granja como ganado bovino, caballos, ovejas, cabras, cerdos; los animales domésticos como conejos, perros y gatos; los animales de laboratorio incluyen roedores, como ratas, ratones y cobayas, y similares. Los ejemplos de no mamíferos incluyen, sin limitar, pájaros, peces y similares.

15 El término “tratar” como se usa aquí incluye conseguir un beneficio terapéutico. Por beneficio terapéutico se entiende la erradicación o mejora del trastorno subyacente que es tratado. Por ejemplo, en un paciente de cáncer, el beneficio terapéutico incluye la erradicación o mejora del cáncer subyacente. Además, se consigue un beneficio terapéutico con la erradicación o mejora de uno o varios de los síntomas fisiológicos asociados al trastorno subyacente, de modo que se observa una mejora en el paciente, a pesar del hecho que el paciente pueda estar aquejado todavía del trastorno subyacente.

20 Otro objeto de la presente invención es una combinación terapéutica que comprende el compuesto de fórmula (I) como se define arriba y (b) uno o varios agentes antineoplásicos seleccionados del grupo que consiste en temozolomida y radiación ionizante, para el uso en un método para el tratamiento de un glioma maligno.

25 La radiación ionizante, también denominada radioterapia, es adoptada convencionalmente en el campo terapéutico del tratamiento contra el cáncer e incluye fotones con energía suficiente para la ionización de enlaces, como por ejemplo, rayos alfa, beta y gama de los núcleos radioactivos, así como rayos X.

30 La presente invención se refiere también a una composición farmacéutica que consiste en un compuesto de fórmula (I) como se define arriba mezclado con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, para el uso en el tratamiento de gliomas malignos.

35 En otra realización la composición farmacéutica de acuerdo con la invención comprende además uno o varios agentes antineoplásicos seleccionados del grupo consistente en temozolomida y radiación ionizante.

40 Se preparan normalmente las composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos de la invención siguiendo métodos convencionales y se administran en una forma farmacéutica apropiada.

45 Por ejemplo, las formas orales sólidas pueden contener, junto con el compuesto activo, diluyentes, p. ej. lactosa, dextrosa, sacarosa, sucrosa, celulosa, almidón de maíz o almidón de patata; lubricantes, p. ej. sílice, talco, ácido esteárico, estearato magnésico o cálcico, y/o polietilenglicoles; agentes aglutinantes, p. ej. almidones, goma arábiga, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o polivinil pirrolidona; agentes desintegrantes, p. ej. almidón, ácido algínico, alginatos o glicolato sódico de almidón; mezclas efervescentes; colorantes; edulcorantes; agentes humectantes como lecitina, polisorbatos, laurilsulfatos; y en general, sustancias no tóxicas y farmacológicamente inactivas usadas en formulaciones farmacéuticas. Se pueden fabricar estas preparaciones farmacéuticas de forma conocida, por ejemplo, mediante procesos de mezclado, granulado, compresión, grajeado o recubrimiento con película.

50 Las dispersiones líquidas para administración oral pueden ser, p. ej. jarabes, emulsiones o suspensiones.

55 Como ejemplo, los jarabes pueden contener, como portador, sacarosa o sacarosa con glicerina y/o manitol y sorbitol.

60 Las suspensiones y las emulsiones pueden contener, como ejemplos de portadores, goma natural, agar, alginato sódico, pectina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o alcohol polivinílico.

65 En el uso terapéutico, se administra el compuesto de fórmula (I) a un sujeto a niveles de dosis desde aproximadamente 10 mg/m<sup>2</sup> hasta 600 mg/m<sup>2</sup> de superficie corporal por día. Un nivel de dosis de aproximadamente 20 mg/m<sup>2</sup> hasta 200 mg/m<sup>2</sup> constituye un intervalo particularmente adecuado. Para un sujeto humano adulto, se puede usar como un ejemplo no limitante, una dosificación de aproximadamente 20 mg hasta aproximadamente 1000 mg por dosis, más preferentemente desde aproximadamente 60 mg hasta aproximadamente 400 mg por dosis, de 1 a 28 días consecutivos. Otros ejemplos de pautas de administración son: diariamente en los días 1 a 7 de un ciclo de dos semanas; diariamente en los días 1 a 4 en cada una de las tres

semanas consecutivas de un ciclo de cuatro semanas; diariamente en los días 1 a 14 de un ciclo de tres semanas; diariamente en los días 1 a 7 y 15 a 21 de un ciclo de cuatro semanas.

Si es necesario se pueden usar dosis mayores o menores que las presentadas aquí. Sin embargo, se pueden modificar dichas dosificaciones dependiendo de muchas variables, no limitadas a la actividad del compuesto usado, la condición que se debe tratar, el modo de administración, el régimen de tratamiento, los requerimientos del sujeto individual, la severidad de la condición que se trata y el juicio del médico. Los intervalos anteriores son meramente sugerencias, ya que el número de variables en relación a un régimen de tratamiento individual es grande y no son infrecuentes excursiones considerables desde estos valores recomendados.

Con la intención de ilustrar mejor la presente invención, sin suponer ninguna limitación a la misma, ahora se indican los ejemplos siguientes.

### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra la expresión de proteínas en células sin tratar (C) y en células tratadas con dos dosis (1 y 3  $\mu$ M) del compuesto de fórmula (I) (T). Se analizaron las proteínas involucradas en el control de la progresión del ciclo de la célula (cdc6; Ciclina A y Ciclina B) así como la fosforilación del sustrato directo de CDK2 (proteína RB).

La Figura 2 ilustra la expresión de proteínas en células sin tratar (C) y en células tratadas con 3  $\mu$ M del compuesto de fórmula (I) (T). Se muestra la cantidad de TRKA fosforilado, proteína TRKA total, p44/42MAPK fosforilado y AKT y p44/42MAPK total.

La Figura 3 ilustra la supervivencia de ratones implantados intracranealmente con la línea de células de glioma: ratones no tratados (línea negra), ratones tratados con el compuesto de fórmula (I) (línea discontinua).

### Ejemplos

Ejemplo 1. Ensayo de proximidad de centelleo (SPA, del inglés Scintillation Proximity Assay) en formato para quinasas

Este ensayo permite medir la inhibición de la actividad quinasa de una enzima específica obtenida con el compuesto ensayado. Se pueden examinar diferentes quinasas en paralelo.

Se transfosforila un sustrato biotinilado mediante una quinasa específica en presencia de ATP incluyendo un trazador  $^{33}$ P-ATP. Al final de la reacción el sustrato fosforilado se captura usando perlas SPA recubiertas de estreptavidina. Se añade una solución densa de CsCl 5M y la mezcla se incuba durante 4 horas. Esto provoca que las perlas SPA floten sobre la solución de CsCl que contiene el ATP libre marcado radioactivamente. La extensión de la fosforilación se mide utilizando un contador- $\beta$ .

En estos ensayos, el compuesto de fórmula (I) mostró una potente actividad inhibitoria sobre el complejo CDK2/Ciclina A ( $IC_{50}$  = 45 nM), mostrando también actividad respecto a CDKs estrechamente relacionadas, p. ej. CDK1, CDK4 y CDK5 ( $IC_{50}$  = 398, 160 y 265 nM, respectivamente), pero también sobre Tropomiosina Receptor Quinasa A (TRKA) ( $IC_{50}$  = 53 nM).

Ejemplo 2. Niveles del compuesto de fórmula (I) en el cerebro

Se trataron ratas Han Wistar durante 6 días consecutivos con una administración oral del compuesto de fórmula (I) con una dosis de 60 mg/kg. Se sacrificó a los animales en el sexto día a 2 y 6 horas después de suministrar la dosis. Se tomó cerebro y plasma en el momento del sacrificio. Se colocó sangre en tubos de plástico heparinizado, se mantuvo en baño de agua-hielo, y se centrifugó (10 minutos, 1200 g a 4°C). Se almacenaron muestras de cerebro y plasma en un congelador a -80 °C hasta su análisis. Los niveles del compuesto de fórmula (I) se analizaron mediante LC/MS/MS.

Los niveles del compuesto de fórmula (I) en el cerebro resultaron ser en promedio 88,9 y 69,4 nmol/g de tejido a 2 y 6 horas tras el suministro de la dosis. Los niveles correspondientes en plasma fueron 9,8 y 8,4 nmol/mL, respectivamente. Asumiendo una densidad igual a 1, los niveles cerebrales del compuesto de fórmula (I) son 6,1-9,6 veces más altos que los niveles en plasma.

Ejemplo 3. Determinación de la distribución de radioactividad en el cerebro tras la administración de compuestos de fórmula (I) marcados con [ $^{14}$ C] en ratas Sprague Dawley mediante autoradioluminografía

Se administró el compuesto de fórmula (I) marcado con [ $^{14}$ C] (actividad específica de 5  $\mu$ Ci/mg, preparado in situ) mediante una sola aplicación vía oral (20 mg/kg como sal de maleato, aproximadamente 3,7 MBq/kg, 100 mCi/kg como dosis radioactiva) a 6 ratas macho albinas (ratas Sprague Dawley de Charles River Italia; peso corporal en la dosificación 259-273 g).

Los animales se sacrificaron 2, 6 y 24 horas después de la administración (2 animales en cada momento

seleccionado) y después de la extirpación se evaluó en el cerebro intacto la distribución de radioactividad del material relacionado con el compuesto. Se usó el método de autoradioluminografía para evaluar la distribución cuantitativa de la radioactividad en el cerebro.

5 La distribución de la radioactividad se evaluó también en la sangre y el plasma recogidas de los animales tras el sacrificio. Los niveles de radioactividad en sangre y plasma se determinaron mediante recuento por centelleo líquido (LSC, del inglés Liquid Scintillation Counting).

10 [La Tabla 1 muestra la distribución del compuesto de fórmula (I) marcado con <sup>14</sup>C después de administrar una única dosis oral (20 mg/kg) en una rata.

Tabla 1

Tejido	□g eq/g		
	2h	6h	24h
Cerebro (radioactividad total)	4,6	1,4	0,4
Cerebelo (radioactividad total)	4,4	1,5	0,4
Plasma (radioactividad total)	1,43	0,89	0,14

15 Ejemplo 4. Efecto del compuesto de fórmula (I) en células de glioma in vitro

Se cultivaron las líneas celulares SF-268, SF-295, SF-539 y U251 en RPMI 1640 con la adición de FCS 10% y glutamina 2 mM y se cultivó la línea celular U-87MG en EMEM con la adición de FCS 10%, glutamina 2 mM y NEAA 1%. En todos los experimentos se sembraron las células con una densidad de  $1 \times 10^4/cm^2$ , el día posterior al tratamiento con el compuesto durante el tiempo prescrito y se recolectaron en los tiempos indicados.

20 Inhibición de la proliferación celular

Se lavaron y contaron células 72 horas después del tratamiento. Se determinó la proliferación celular mediante un sistema de monitorización de adenosín trifosfato celular. Se comparó la proliferación celular con células de control. Se calculó la concentración de inhibición de la proliferación celular al 50% (IC<sub>50</sub>).

25 Análisis de incorporación de BrdU

30 Se añadió BrdU (5-bromo-2' desoxiuridina) al cultivo de células a la concentración final de 30 □M en la última hora de un tratamiento de 24 horas. Se lavaron las células con PBS, se fijaron con etanol al 70% y se almacenaron a -20°C. En el momento del análisis se centrifugaron las células, se lavaron con FCS 1% en PBS y ADN desnaturizado con HCl 2N durante 20 minutos. Después de lavar con Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> 0,1 M pH 8,5, Se incubaron las células con una solución de Tween20 0,5% en PBS + FCS 1% durante 15 minutos y se centrifugó. Se resuspendieron los gránulos en 150 □L de anticuerpo monoclonal anti-BrdU sin conjugar diluido a un factor de 1:10 (Becton Dickinson) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS, se repitió la incubación con Tween20 0,5%; entonces se añadió el anticuerpo secundario (inmunoglobulina de cabra anti-ratón conjugada con FITC diluida a un factor de 1:50 (Jackson Lab.)). Después de una hora a temperatura ambiente se enjuagaron de nuevo las células, se tiñeron durante la noche con contraste de yoduro de propidio (2 □g/mL + 12,5 □g/mL RNAsa libre de ADNsa) y se analizó mediante FACS.

40 Evaluación de autofagia con tinción de naranja de acridina

45 Durante los últimos 15 minutos de incubación se añadió naranja de acridina (1 □g/mL) a las células que se recogieron posteriormente, se lavaron con PBS y se analizó su emisión de fluorescencia mediante FACS. El naranja de acridina se mueve libremente a través de las membranas biológicas pero en el citoplasma y el nucleolo presenta fluorescencia verde brillante y rojo tenue; en las vacuolas ácidas generadas por autofagia se muestra rojo brillante.

50 Los resultados de todos estos ensayos se presentan en la Tabla 1. El compuesto de fórmula (I) es activo en todas las células de glioma ensayadas (primera columna): es capaz de inhibir la proliferación con un IC<sub>50</sub> en el intervalo de 1,4-5,4 □M (segunda columna), tiene un efecto sobre la síntesis de ADN medido como inhibición de incorporación de BrdU desde el 39 al 92% (tercera columna) y es capaz de inducir autofagia en el 36-70% de las células (cuarta columna). Se ha descrito que este tipo de tumores experimentan preferentemente autofagia en lugar de apoptosis en respuesta a quimioterapia y radiaciones □.

55 Tabla 2

Glioma	IC50 (□M)	% inhib. BrdU	Autofagia %
U251	2,8 ± 0,8	74	58 (3 □M)

SF539	1,4 ± 0,5	39	35 (6 □M)
SF268	2,5 ± 0,6	78	70 (3 □M)
SF295	5,4 ± 0,6	74	68 (3 □M)
U87MG	1,6 ± 0,8	92	50 (3 □M)

Ejemplo 5. Evaluación del modo de acción del compuesto de fórmula (I) mediante análisis Western Blot

5 Se lisaron las células tratadas mediante adición de tampón de muestra SDS (Tris-HCl 0,125M pH 6,8, SDS 5%). Las muestras se calentaron a 95 °C durante 5 minutos y luego se sonicaron usando un Ultrasonic 2000 ARTEK. Se centrifugó el lisado de células a 13000 rpm durante 10 minutos. Se determinó la cuantificación de proteína utilizando tampón BCA (Pierce) y una curva estándar de BSA. Se cargaron 20 □g de extracto de proteína por pocillo y se separaron mediante gel SDS-PAGE al 7,5-10% (concentrado 40% PAGE-PLUS AMRESCO). Se transfirió el gel a filtros de nitrocelulosa (Hybon Amersham) en un tampón que contiene Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM y metanol 20%. Se saturaron los filtros con leche desnatada al 5% en TBS que contiene Tween 20 0,1% (TBS-T) durante 2 horas a temperatura ambiente y se incubaron durante la noche a 4°C con el anticuerpo monoclonal primario seguido de lavados con TBS-T e incubación que utiliza un anticuerpo anti-ratón secundario. Las bandas se visualizaron utilizando el "Super Signal West Pico" Pierce.

15 Los resultados obtenidos en todas las líneas celulares ensayadas mostraron que el compuesto de fórmula (I) es capaz de interferir con las dos rutas principales involucradas en la patogénesis de glioma. De hecho, la disminución de marcadores relacionados con el ciclo celular se observa en todas las líneas celulares de glioma independientemente del estado de la ruta Rb. La Figura 1, por ejemplo, muestra el resultado obtenido con dos dosis de compuesto de fórmula (I) en células U251 tratadas durante 24 horas. Es evidente una fuerte inhibición de la fosforilación de Rb así como de la expresión de cdc6, ciclina A y B1.

25 Se evaluó también la capacidad del compuesto de fórmula (I) de inhibir también la ruta mediada por receptores del factor de crecimiento de la tirosina quinasa. La inhibición en la fosforilación del receptor de TRKA y de las proteínas siguientes en la secuencia metabólica, en ambas rutas de MAPK y AKT, se muestra en la Figura 2 en células SF-539 tratadas durante 6 horas.

Ejemplo 6. Efecto del compuesto de fórmula (I) en células de glioma in vivo Eficacia antitumoral en un modelo xenotransplantado de glioma humano.

30 Se mantuvieron ratones macho Balb, Nu/Nu, de Harlan (Italia), en jaulas con recubrimiento de papel de filtro, comida y lecho esterilizados y agua acidulada. Se inyectaron subcutáneamente en ratones atímicos  $2,5 \times 10^6$  células de glioma humano U251 (de la Colección Americana de Cultivos Tipo). Se administró por vía oral el compuesto de fórmula (I) en un volumen de 10 mL/kg a la dosis de 40 mg/kg dos veces al día (BID) durante 10 días consecutivos. Se midió el crecimiento del tumor y el peso corporal cada 3 días. Se determinó el crecimiento del tumor mediante calibrador. Se grabaron los dos diámetros y se calculó el peso del tumor de acuerdo con la siguiente fórmula: longitud (mm) × anchura<sup>2</sup>/2. Se evaluó la toxicidad en base a la reducción de peso corporal.

Los resultados presentados en la tabla 2 muestran que el compuesto de fórmula (I) produjo un claro efecto antitumoral en el modelo xenotransplantado de glioma humano U251.

40 Tabla 3

Tratamiento	Inhibición máx. crecimiento tumor (%)	Toxicidad
Compuesto de fórmula (I) 40 mg/kg	80	0/8

Eficacia en el modelo de tumor de glioma implantado intracranealmente

45 Se anestesiaron los animales sometidos a los procedimientos quirúrgicos siguiendo uno de los protocolos mencionados anteriormente, p. ej. quetamina, 80-100 mg/kg i.p. + xilacina: 10 mg/kg i.p.; isofluorano: 1,5-2%. Se anestesiaron ratones atímicos desnudos macho, de 6-8 semanas de edad, se colocaron en un aparato estereotáxico y se fijaron con cuidado mediante barras auriculares y en el soporte para la cabeza. Se cortó piel de la cabeza longitudinalmente (paralelamente a las orejas) y se descubrió el cráneo del ratón. Con el controlador de los ejes X e Y del aparato, se identificaron bregma (intercepción entre las suturas mediana sagital y anterior coronal para realizar la inyección en el núcleo cerebral) y lambda (intercepción entre las suturas mediana sagital y posterior coronal para realizar la inyección en el cerebelo) como punto 0. Se introdujeron las siguientes coordenadas en el aparato y se identificó el punto de inyección. Se realizó un pequeño agujero con un microtaladro en el punto deseado. Se aspiraron las células con una jeringa Hamilton (habitualmente 2-5 mL) inmediatamente antes de la inyección (se mezclaron brevemente las células antes de la aspiración para evitar la precipitación de las mismas).

55 Apuntando al agujero se fijó el 0 para el eje Z y se insertó la jeringa cuidadosamente en el cerebro hasta alcanzar la coordenada correcta (-3,0 mm de profundidad). Se inyectaron células U251 a una velocidad de 1 □l por minuto. Se dejó la jeringa en el agujero 5 minutos adicionales antes de retirarla para evitar aspiración de células. Se cerró el agujero utilizando cera ósea y la herida con grapas quirúrgicas estériles. Después de finalizar la cirugía, se

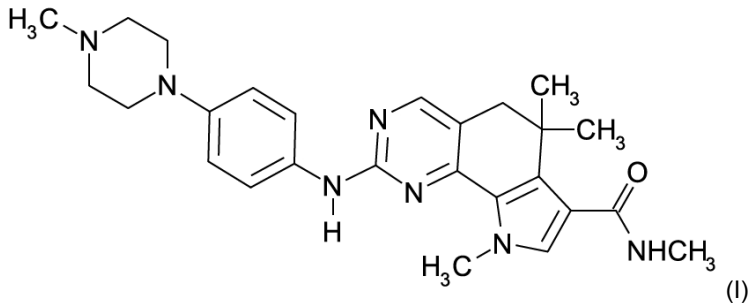
monitoreó la recuperación de los ratones hasta que estuvieron completamente despiertos.

5 Los resultados presentados en la Figura 3 muestran que los ratones sometidos al modelo de glioma humano implantado intracranealmente y tratados con el compuesto de fórmula (I) a una dosis de 40 mg/kg bid OS presentan un 30% de incremento en el tiempo de supervivencia en comparación con los ratones de control tratados con placebo.



REIVINDICACIONES

1.Un compuesto de fórmula (I)



5

una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en un método de tratamiento de un glioma maligno.

2.El compuesto para el uso en un método para el tratamiento de un glioma maligno de acuerdo con la reivindicación 1 donde el glioma maligno es un glioblastoma.

10

3.Una combinación terapéutica que comprende el compuesto de fórmula (I) tal y como se define en la reivindicación 1 y (b) uno o varios agentes antineoplásicos seleccionados del grupo que comprende temozolomida y radiación ionizante, para el uso en un método para el tratamiento de un glioma maligno.

15

4.La combinación terapéutica para el uso en un método para el tratamiento de un glioma maligno de acuerdo con la reivindicación 3 donde el glioma maligno es un glioblastoma.

5.Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) tal y como se define en la reivindicación 1 mezclado con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptables, para el uso en el tratamiento de gliomas malignos.

20

6.Una composición farmacéutica para el uso en un método para el tratamiento de un glioma maligno de acuerdo con la reivindicación 5 que comprende adicionalmente uno o varios agentes antineoplásicos seleccionados del grupo que comprende temozolomida y radiación ionizante, para el uso en un método para el tratamiento de un glioma maligno.

25

Figura 1

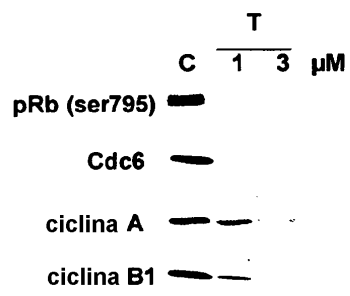


Figura 2

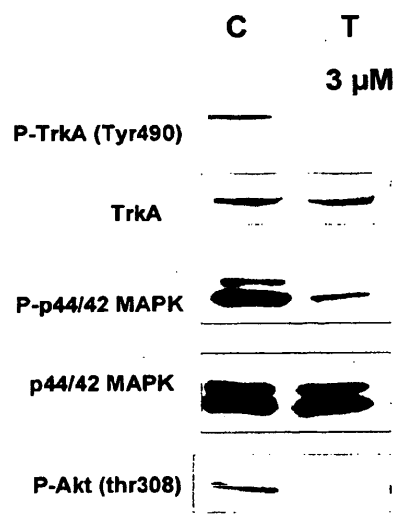


Figura 3

