

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 353**

51 Int. Cl.:

A61K 31/517 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2011** **E 11752707 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015** **EP 2608793**

54 Título: **Uso de un modulador de quinasa de tipo receptor para el tratamiento de la enfermedad poliquística del riñón**

30 Prioridad:

26.08.2010 US 377211 P

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

10.09.2015

73 Titular/es:

SYMPHONY EVOLUTION, INC. (100.0%)
7361 Calhoun Place, Suite 325
Rockville, MD 20850, US

72 Inventor/es:

FROST, PHILIP;
LIAO, WILLIAM W. N. y
ROWINSKY, ERIC K.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 545 353 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 modulador de quinasa de tipo receptor para el tratamiento de la enfermedad poliquística del riñón

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

5 Esta descripción se refiere a compuestos para la modulación de múltiples actividades enzimáticas de la proteína quinasa para afectar a actividades celulares tales como la proliferación, la diferenciación y la muerte celular programada. Específicamente, la descripción se refiere a quinazolininas que inhiben, regulan y/o modulan un conjunto de enzimas quinasa y a las rutas de transducción de señales del receptor relacionadas con los cambios en las actividades celulares como se menciona anteriormente, a las composiciones que contienen estos compuestos, y a los métodos de utilización de los mismos para tratar enfermedades y afecciones dependientes de quinasa. La invención se refiere al uso de un compuesto inhibidor de quinasa tal como se especifica en las reivindicaciones que regula a la baja un grupo único de quinazolininas activas en el progreso de la enfermedad poliquística del riñón (EPR) para el tratamiento de la EPR. La materia que no está abarcada por el alcance de las reivindicaciones no forma parte de la presente invención reivindicada.

15 Compendio de la técnica relacionada

El desarrollo de la terapia dirigida se centró inicialmente en la búsqueda de fármacos que pudieran dirigirse específicamente a una enzima quinasa seleccionada esencial para la proliferación celular en el cáncer. El propósito de la búsqueda de selectividad fue tratar de limitar la toxicidad. Este enfoque en general no tuvo éxito porque era difícil lograr la inhibición de la quinasa diana sola debido a la "superposición" y a la homología de los dominios quinasa activos de las 540 quinazolininas conocidas. En segundo lugar, está cada vez más claro que el direccionamiento orientado da como resultado la selección de células capaces de eludir cualquier punto de la inhibición individual en una ruta. El pensamiento actual se inclina hacia el direccionamiento a múltiples sitios en vías únicas o múltiples. Esta observación, aprendida de la experiencia en oncología se puede aplicar a otras enfermedades (como se describe a continuación).

25 Las proteínas quinazolininas son enzimas que catalizan la fosforilación de proteínas, en particular, de los grupos hidroxilo en los residuos de tirosina, serina y treonina de las proteínas. Las consecuencias de esta actividad aparentemente simple son asombrosas, influyendo en la diferenciación y la proliferación celulares. Prácticamente todos los aspectos de la vida celular dependen de un modo u otro de la actividad proteína quinasa. Además, la actividad anormal de la proteína quinasa se ha relacionado con una serie de trastornos, que van desde enfermedades que no ponen la vida en peligro tales como la psoriasis a enfermedades extremadamente virulentas tales como el glioblastoma (cáncer cerebral).

Las proteínas quinazolininas se pueden clasificar como de tipo receptor o de tipo no receptor. Las tirosina quinazolininas de tipo receptor tienen un dominio extracelular, uno transmembrana y uno intracelular, mientras que las tirosina quinazolininas de tipo no receptor son totalmente intracelulares.

35 Las tirosina quinazolininas de tipo receptor se componen de un gran número de receptores transmembrana con actividad biológica diversa. De hecho, se han identificado aproximadamente veinte subfamilias diferentes de tirosina quinazolininas de tipo receptor. Una subfamilia de tirosina quinasa, denominada subfamilia HER, está compuesta por EGFR (HER1), HER2, HER3, y HER4. Los ligandos de esta subfamilia de receptores identificados hasta el momento incluyen factor de crecimiento epitelial, TGF-alfa, anfirregulina, HB-EGF, betacelulina y herregulina. Otra subfamilia de estas tirosina quinazolininas de tipo receptor es la subfamilia de la insulina, que incluye INS-R, IGF-IR, e IR-R. La subfamilia de PDGF incluye los receptores de PDGF-alfa y -beta, CSFIR, c-kit y FLK-II. Además, existe la familia FLK, que está compuesta por el receptor de dominio de inserción de quinasa (KDR), la quinasa de hígado fetal-1 (FLK-1), la quinasa de hígado fetal-4 (FLK-4) y la tirosina quinasa de tipo fms 1 (ft-1). Las familias PDGF y FLK se consideran normalmente juntas debido a las similitudes de los dos grupos. Para una discusión detallada de las tirosina quinazolininas de tipo receptor, véase Plowman et al., 1994 DN&P 7(6): 334-339, que se incorpora a la presente como referencia para todos los propósitos.

Las tirosina quinazolininas de tipo no receptor también se componen de numerosas subfamilias, incluyendo Src, Frk, Btk, Csk, Abl, Zap70, Fes/Fps, Fak, Jak, Ack y LIMK. Cada una de estas subfamilias está subdividida adicionalmente en diferentes receptores. Por ejemplo, la subfamilia Src es una de las más grandes e incluye Src, Yes, Fyn, Lyn, Lck, Blk, Hck, Fgr e Yrk. La subfamilia de enzimas Src se ha relacionado con la oncogénesis. Para una discusión más detallada de las tirosina quinazolininas de tipo no receptor, véase Bolen, Oncogene, 8: 2025-2031 (1993), que se incorpora a la presente como referencia para todos los propósitos.

La desregulación de la actividad enzimática de la proteína quinasa puede conducir a propiedades celulares alteradas, tales como el crecimiento celular descontrolado asociado con el cáncer. Además de las indicaciones oncológicas, la señalización de quinasa alterada está implicada en otras numerosas enfermedades patológicas.

Estas incluyen, pero no se limitan a: trastornos inmunológicos, enfermedades cardiovasculares, enfermedades inflamatorias, y enfermedades degenerativas. Por lo tanto, tanto las proteína quinasas receptoras como no receptoras son dianas atractivas para el descubrimiento de fármacos de molécula pequeña.

5 Un objetivo particularmente atractivo para el uso terapéutico de la modulación de quinasas se refiere a las indicaciones oncológicas. Por ejemplo, se ha demostrado con éxito la modulación de la actividad proteína quinasa para el tratamiento del cáncer con la aprobación de la FDA de Gleevec® (mesilato de imatinib, producido por Novartis Pharmaceutical Corporation de East Hanover, NJ) para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LMC) y cánceres del estroma gastrointestinal (CEGI). El Gleevec es un inhibidor de quinasa c-Kit y Abl.

10 La modulación (particularmente la inhibición) de la proliferación celular y la angiogénesis, dos procesos celulares clave necesarios para el crecimiento y la supervivencia tumorales (Matter A. 2001 Drug Disc. Technol 6: 1005-24), es un objetivo atractivo para el desarrollo de fármacos de molécula pequeña. La terapia anti-angiogénica representa un enfoque potencialmente importante para el tratamiento de tumores sólidos y otras enfermedades asociadas con la vascularización desregulada, incluyendo la enfermedad de la arteria coronaria isquémica, la retinopatía diabética, la psoriasis y la artritis reumatoide. Asimismo, los agentes antiproliferativos celulares son deseables para ralentizar o
15 detener el crecimiento de tumores.

La inhibición de EGF, VEGF y la transducción de señales de efrina evitará la proliferación celular y la angiogénesis, dos procesos celulares clave necesarios para el crecimiento y la supervivencia tumorales (Matter A. 2001 Drug Disc. Technol. 6: 1005-24). Los receptores de VEGF son dianas descritas anteriormente para la inhibición de moléculas pequeñas.

20 Los receptores Eph comprenden la familia más grande de tirosina quinasas receptoras y se dividen en dos grupos, EphA y EphB, basándose en su homología de secuencia. Los ligandos para los receptores Eph son las efrinas, que están ancladas a la membrana. Los ligandos efrina A se unen preferentemente a los receptores EphA mientras los ligandos efrina B se unen a receptores EphB. La unión de efrina a los receptores Eph provoca la autofosforilación del receptor y normalmente requiere una interacción célula-célula debido a que tanto el receptor como el ligando están
25 unidos a la membrana.

La expresión en exceso de receptores Eph se ha relacionado con el aumento de la proliferación celular en una variedad de tumores (Zhou R 1998 Pharmacol Ther. 77:151-181; Kiyokawa E, Takai S, Tanaka M et al. 1994 Cancer Res 54:3645-3650; Takai N, Miyazaki T, Fujisawa K, Nasu K y Miyakawa. 2001 Oncology Reports 8:567-573). La familia de tirosina quinasas receptoras Eph y sus ligandos efrina juegan papeles importantes en una variedad de
30 procesos durante el desarrollo embrionario y también en la angiogénesis patológica y potencialmente en la metástasis. Por lo tanto la modulación de la actividad de la quinasa receptora Eph debería proporcionar los medios para tratar o prevenir los estados de enfermedad asociados con la proliferación celular anormal, tales como los descritos anteriormente.

35 El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, HER1, erbB1) es parte de una familia de tirosina quinasas receptoras de la membrana plasmática que controlan el crecimiento, la proliferación y la apoptosis celulares. El ligando para EGFR es el factor de crecimiento epidérmico y la desregulación de la ruta de transducción de señales de EGFR ha sido implicada en la tumorigénesis y el progreso del cáncer, por lo que es una diana clínicamente relevante para los tratamientos novedosos contra el cáncer (Dreves J et al. 2003 Curr Drugs Targets 4, 113-121; Ciardiello F y Tortora G. 2001 Clin. Cancer Res.7:2958-2970; Thomas M. 2002 Semin Onc. Nurs.18: 20-27).

40 El EGFR se expresa en exceso en diferentes cánceres humanos, especialmente en el cáncer de pulmón de células no pequeñas y en los glioblastomas. En estos tipos de cáncer, la expresión en exceso de EGFR se asocia comúnmente con enfermedad avanzada y de mal pronóstico (Baselga J et al. 1999 Semin. Oncol. 26:78-83).

"La enfermedad poliquística del riñón" (EPR) se refiere a un grupo de trastornos monogénicos que se traducen en el desarrollo de quistes renales bilaterales que, en última instancia, conducen a la insuficiencia renal. La EPR es la más
45 común de todas las enfermedades genéticas mortales, y afecta de 12 a 15 millones de personas en todo el mundo. Hay dos formas principales de EPR: autosómica recesiva (EPRAR) y autosómica dominante (EPRAD). La EPRAR es una forma de la enfermedad frecuentemente menos heredada que a menudo causa una mortalidad significativa en los primeros meses de vida. La EPRAR está causada por una mutación en el gen PKHD1, mientras que la EPRAD está causada por una mutación en el gen PKD1 o PKD2 (y por lo tanto estas formas se conocen como
50 EPRAD de tipo 1 o de tipo 2). Estas mutaciones individuales dan como resultado cambios drásticos en la capacidad de las células tubulares renales para mantener su polaridad planar (posición dentro del órgano), y para controlar su proliferación. La EPRAD es la enfermedad genética hereditaria más común. Debido a que cada individuo tiene un alelo normal heredado de su progenitor no portador, el gen mutante dominante no manifiesta sus efectos hasta que el alelo normal se pierde o se inactiva. Por lo tanto, algunos pacientes desarrollan síntomas en la niñez, mientras
55 que la mayoría se vuelven sintomáticos a los 40 años, dependiendo de cuando se pierda el alelo normal. Se cree que el mecanismo bioquímico responsable de los hallazgos clínicos asociados con la EPR se refieren a anomalías en los canales de iones de calcio.

Como se señaló anteriormente, la EPR se caracteriza por la formación y el crecimiento bilaterales de quistes

múltiples que conducen a la alteración de la arquitectura renal, nefronas deformadas e insuficiencia renal. En la EPRAD, los quistes se forman cuando la proliferación de las células tubulares renales conduce a la obstrucción del flujo tubular normal. Las células tubulares renales que forman el revestimiento interior de los quistes conservan sus funciones secretoras normales y llenan los quistes con líquido que contiene muchos ligandos de receptores (proteínas de señalización), tales como TGF-alfa y EGF (Wilson SJ et al. 2006 *Biochim Biophys Acta* Jul 1762(7): 647-55). A medida que los quistes se agrandan, los riñones se agrandan tanto como de 9 a 13 kilos en la enfermedad en fase tardía.

Los síntomas clínicos humanos en pacientes con EPRAD incluyen dolor abdominal y en el costado (a medida que los quistes se agrandan), hipertensión, quistes hepáticos, hematuria, infección e insuficiencia renal en última instancia. No se encuentra disponible ningún tratamiento específico para la prevención del progreso de la EPR (Grantham JJ 2008 *NEJM* 359:1477-1485).

Del mismo modo, la EPR afecta aproximadamente a 38% de los gatos persas en todo el mundo, por lo que es la enfermedad felina hereditaria más prominente (Young AE et al. 2005 *Mammalian Genome* 16:59-65). Se parece a la enfermedad humana y es secundaria a una mutación en el gen PKD1.

15 **Compendio de la invención**

Se han propuesto muchas estrategias para el tratamiento de la EPR, pero pocas se han aplicado. Los autores de la presente invención proponen en la presente memoria una modalidad de tratamiento basada en la inhibición de al menos cuatro (4) quinasas - tres tirosina quinasas receptoras (HER1, HER2, y VEGFR) y una tirosina quinasa citoplasmática (SRC). La propuesta de los autores de la presente invención hace hincapié en la necesidad de dirigirse a las cuatro quinasas para lograr la inhibición eficaz del progreso de la EPR.

Por lo tanto, en un aspecto, la invención está dirigida a los compuestos y composiciones descritos en la presente memoria, para su uso en el tratamiento de la EPR.

En otro aspecto, la invención comprende el uso de un compuesto o composición descrito en la presente memoria para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la EPR.

25 Estas y otras características y ventajas de la presente invención se describirán con más detalle a continuación.

Descripción detallada de la invención

Los autores de la presente invención reconocieron que XL-647 (también conocido como PRIM-001 y KD019) y los compuestos relacionados (que se describen en la Patente de los Estados Unidos Núm. 7.576.074 son únicos en el direccionamiento de los elementos clave de la cascada de señalización de EGFR, así como VEGF-R, que, como se describe a continuación, están implicados en la EPR. Por lo tanto, se dieron cuenta de que tales compuestos proporcionan toda la inhibición necesaria para el tratamiento de la EPR en un solo compuesto. La potencia de la actividad de XL-647 contra cada diana es tal que pronostica una dosis inferior a la utilizada en los estudios clínicos de oncología. XL-647 es menos tóxico que cada uno de los agentes de direccionamiento individuales solos y sería claramente menos tóxico que los agentes utilizados combinados. El uso de XL-647 en la EPR proporcionaría por lo tanto una actividad de amplio espectro contra las dianas clave y añadiría el beneficio de la reducción de la actividad VEGF-R y de un perfil de seguridad potencialmente mejorado en el riñón.

Las descripciones anteriores del papel del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) en la EPR fueron presentadas por Du y Wilson (Grantham JJ 2008 *NEJM* 359: 1477-1485; Wilson PD et al. 1993 *Eur J Cell Biol Jun*; 61(1): 131-8; Du J y Wilson PD 1995 *Am J Physiol Cell Physiol* 269: C487-C495) y ampliadas por Sweeney y Avner (Sweeney WE y Avner ED 1998 *Am J Physiol* 275: 387-394). Las líneas celulares se obtuvieron mediante cría por entrecruzamiento de ratones BPK (un modelo murino de EPRAR) y el ratón Immorto (Sweeney WE et al. 2001 *Am J Physiol Cell Physiol* 281: 1695-1705). Estos animales desarrollaron riñones quísticos agrandados, así como ectasia de los conductos biliares que dieron como resultado insuficiencia renal y alteraciones hepáticas. Se establecieron líneas celulares quísticas *in vitro* y se demostró una mala localización del EGFR en su superficie apical. Esto fue confirmado *in vivo* y justificado por Wilson y Du (Wilson PD et al. 1993 *Eur J Cell Biol Jun*; 61(1):131-8; Du J y Wilson PD 1995 *Am J Physiol Cell Physiol* 269: C487-C495), que también había demostrado un papel de TGF-alfa y EGF en la proliferación de células tubulares renales en la EPR. Además, se demostró que el líquido del quiste humano contenía EGF y TGF-alfa (Wilson S J et al. 2006 *Biochim Biophys Acta Jul*; 1762(7): 647-55; Klinger R et al. 1992 *Am J Kidney Dis* 19(1): 22-30). Esta mala localización del EGFR fue validada en modelos murinos adicionales y en tejidos humanos en EPRAR y EPRAD (Wilson P D et al 1993 *Eur J Cell Biol Jun*; 61(1): 131-8; Du J y Wilson P D 1995 *Am J Physiol Cell Physiol* 269: C487-C495; Avner ED y Sweeney WE 1995 *Pediatr Res* 37: 359A; Orellana SA et al. 1995 *Kidney Int* 47: 490-499; Richards WG et al. 1998 *J Clin Invest* 101: 935-939). Pugh et al (Pugh JL et al. 1995 *Kidney Int* 47: 774-781) mostraron adicionalmente actividades tirosina quinasa de EGFR elevadas en la EPR. Finalmente, el cruzamiento del alelo EGFR hipomorfo (waved-2) en ratones quísticos que portaban la mutación de ratón orpk (Riñón Poliquístico Oak Ridge), redujo significativamente la actividad de EGFR y la formación de quistes (Richards WG et al. 1998 *J Clin Invest* 101: 935-939). Estudios posteriores han demostrado un papel potencial para los ligandos de EGFR en la promoción de la enfermedad citogénica. Tanto EGF como TGF-alfa son quistogénicos *in vitro* (Pugh JL et al. 1995 *Kidney Int* 47: 774-781; Avner ED y Sweeney WE 1990 *Pediatr Nephrol* 4: 372-

377; Neufield TK et al. 1992 *Kidney Int* 41: 1222-36). Los riñones quísticos tienen una mayor expresión de ARN de EGF-alfa y el líquido del quiste renal de modelos murinos y de rata de EPR contenían múltiples péptidos EGF a concentraciones mitogénicas (Lowden DA et al. 1994 *J Lab Clin Med* 124, 386-394).

5 Aunque el mecanismo exacto por el cual los genes mutantes de EPR producen anomalías de EGFR no está bien caracterizado, era lógico evaluar el efecto de la inhibición de EGFR sobre el desarrollo de quistes en modelos de roedores de EPR. Sweeney et. al. (Sweeney WE et al. 2000 *Kidney Int* 57: 33-40) demostraron que el tratamiento de ratones bpk con el inhibidor de quinasa EGFR (EKI-785) era eficaz en la prevención del progreso de la EPR. Los animales mantenidos en EKI-785 sobrevivieron durante largos períodos de tiempo, pero progresaron cuando se retiró el fármaco (Sweeney et al. 2000 *Kidney Int* 57: 33-40). Este hallazgo se confirmó usando dos diferentes
10 inhibidores de EGFR.

15 La evidencia del papel de EGFR en la EPR fue apoyada además por la demostración de que la inhibición de la liberación del ligando de EGFR también puede mejorar la EPR. El tratamiento de ratones bpk con un inhibidor de TACE (enzima convertidora de TNF-alfa) dio como resultado una reducción drástica en el tamaño renal y un aumento de la supervivencia de los animales (Dell KM et al. 2001 *Kidney Int* 60: 1240-1248). TACE es un miembro de la familia de enzimas metaloproteinasas cuya función es procesar los prepro péptidos para permitir la destrucción del péptido activo. En la EPR, la inhibición de la enzima TACE ADAM-17 reduce la liberación de TGF-alfa que da como resultado la disminución de la activación de EGFR.

20 Análisis posteriores por Wilson et al. (Wilson SJ et al. 2006 *Biochim Biophys Acta Jul*; 1762 (7): 647-55) han demostrado además un papel para HER-2 como parte de la mala localización del complejo EGFR. En algunos modelos animales, HER-2 parece ser el EGFR dominante que induce la proliferación celular de los túbulos celulares. La rata PCK constituye tal modelo donde los inhibidores de HER-2 específicos (dos han sido sometidos a ensayo) son eficaces para prevenir el desarrollo de EPR. Algunos argumentan que los heterodímeros y HER-1 y HER-2 son un factor importante en el progreso de la enfermedad (Wilson SJ et al. 2006 *Biochim Biophys Acta Jul*; 1762 (7): 647-55). Por lo tanto, sería más probable que un inhibidor de quinasa HER-1/HER-2 bi-funcional fuera eficaz en el
25 tratamiento.

30 La activación del EGFR da como resultado una cascada de eventos que afecta en última instancia, a los factores de transcripción de ADN y a la producción de proteínas. Uno de los elementos clave en los eventos de señalización de EGFR está mediado por la enzima citoplasmática SRC. Si la inhibición del dominio quinasa de EGFR inhibe el progreso de la enfermedad, es lógico que se pueda producir el mismo resultado mediante la inhibición de un miembro de la ruta de señalización, p. ej., SRC. SRC fue elegido como diana, ya que actúa al afectar a múltiples etapas en al menos dos rutas de señalización (MER/ERK y PKA/bRAF). Además, se sabe que SRC facilita la actividad EGFR y mejora la fosforilación de EGFR de dianas aguas abajo (Browman PA et al. 2004 *Oncogene* 23: 7957-68; Roskoski R 2005 *Biochem Biophys Res Commun* 331: 1-14). SRC también estimula la activación de las MMP en la membrana celular y potencia la liberación del ligando. El tratamiento de ratones bpk o ratas PCK con el
35 inhibidor de SRC SKI-606 mejoró la formación de quistes renales y las anomalías de los conductos biliares en el modelo de roedor dependiente tanto de HER-1 como de HER-2 (Roskoski R 2005 *Biochem Biophys Res Commun* 331: 1-14). La inhibición de SRC también se correlaciona con una reducción de AMPc elevada (Roskoski R 2005 *Biochem Biophys Res Commun* 331: 1-14).

40 El VEGF juega un papel importante en la angiogénesis durante la cicatrización de las heridas y la formación de tumores. El ligando VEGF se produce en respuesta a la hipoxia y a la producción de HIF1-alfa. El VEGF está presente en fluido quístico de la EPR y se piensa que es una respuesta a la hipoxia producida por la destrucción mecánica y la restricción vascular causada por los quistes. VEGFR-1 y VEGFR-2 están presentes en las células endoteliales renales y se cree que la activación de la ruta de VEGF facilita el crecimiento del quiste mediante el fomento de la neo-vascularización de una manera similar a la propuesta para los tumores. Por lo tanto, la inhibición
45 de VEGFR impediría el crecimiento de los vasos y reduciría el aumento de quistes renales.

50 Se ha demostrado que los inhibidores de quinazas individuales activas contra HER-1, HER-2 o SRC (Wilson SJ et al. 2006 *Biochim Biophys Acta Jul*; 1762(7): 647-55; Lowden DA et al. 1994 *J. Lab. Clin. Med.* 124, 386-394; Sweeney WE et al. 2008 *J Am Soc Nephrol* 19: 1331-1341) son activos en modelos de roedores de EPR. La presente invención se basa en la posición de que una combinación de agentes sería clínicamente más efectiva y a dosis más bajas. El uso de la terapia combinada tiene un precedente en oncología donde casi nunca se usan agentes individuales. De hecho, este principio se ha demostrado mediante experimentos en un modelo de EPR en el que los autores de la presente invención trataron animales con una combinación de inhibidores de EGFR (EKB-569) y TACE. Mientras que el inhibidor de EGFR fue eficaz en la reducción de la formación de quistes y el mantenimiento de la función renal normal; la adición de un inhibidor de TACE permitió una reducción de la dosis de EKB-569 en
55 67%, mientras se alcanzaba un efecto equivalente de EKB-569 solo a una dosis más alta (Sweeney WE et al. 2003 *Kidney Int* 64: 1310-1319).

El documento WO-A-03/050090 describe el uso de inhibidores duales de EGFR (HER1) y HER2 para el tratamiento de la enfermedad poliquística del riñón (EPR).

Si bien en teoría se podría utilizar una terapia combinada simplemente amalgamando fármacos que se dirigen

individualmente a HER-1, HER-2, SRC y VEGF-R, esto es poco probable que se produzca como un asunto práctico debido a la complejidad de regulación y a las restricciones comerciales. Además, el espectro de actividad quinasa sería excesivamente amplio lo que daría como resultado un aumento del riesgo de toxicidad. Por ejemplo, una combinación de Lapatanib con Sunitinib no sólo afectaría a ERB-1, ERB-2 y VEGF-R, sino que también se dirigiría a ERK-1, ERK-2, AKT, Ciclina-D, PDGFR, cKIT y FLT-3, mientras que no afectaría a SRC. Si se añadiera Dastinib a esta combinación, se podría afectar a SRC pero también a ABL y potencialmente aumentar la toxicidad por la inhibición excesiva de cKIT y PDGFR. Por otra parte, los ensayos clínicos de estos estudios de combinación serían demasiado complejos y probablemente no alcanzables en un periodo de tiempo razonable. Por ejemplo, cada fármaco tiene diferentes características PK/PD y puede haber superposición de toxicidades complicando así los programas de dosificación. Finalmente, el coste de la combinación de tres o cuatro agentes de diferentes fabricantes puede ser prohibitivo.

Los autores de la presente invención han descubierto que XL-647 y los compuestos relacionados pueden dirigirse a HER-1, HER-2, SRC y VEGF-R y, por lo tanto, evitar la necesidad y superar las complicaciones asociadas con las terapias combinadas.

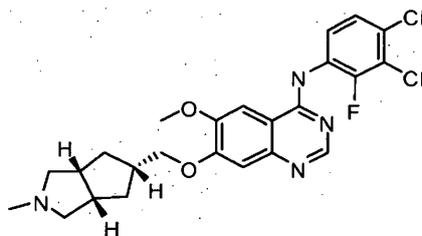
Por lo tanto, en un aspecto, la invención se dirige a la XL-647 o a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y a composiciones farmacéuticamente aceptables del mismo para su uso en el tratamiento de EPR. Tales composiciones farmacéuticamente aceptables comprenden XL-647 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un portador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el portador es agua. En otras realizaciones, el portador es distinto del agua.

La invención comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de XL-647 (o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) a un mamífero que tiene EPR. En una realización, XL-647 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se encuentra en forma de una composición farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones el mamífero es un ser humano. En otras realizaciones, el mamífero es un felino, tal como un gato persa.

En otro aspecto, la invención comprende el uso de un compuesto o composición descritos en la presente memoria para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de EPR en un mamífero tal como un ser humano o un felino, en particular un gato persa.

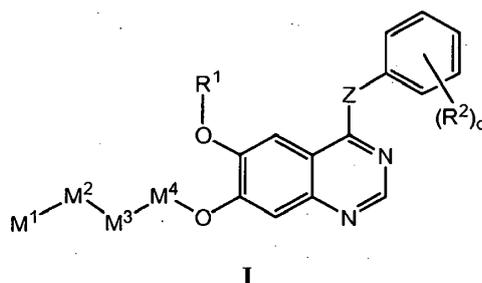
En otro aspecto, la invención comprende compuestos y composiciones para su uso en el tratamiento de EPR en un mamífero tal como un ser humano o un felino, en particular un gato persa.

XL-647 es N-(3,4-dicloro-2-fluorofenil)-7-(((3aR,5r,6aS)-2-metiloctahidrociclopenta[c]pirrol-5-il)metil)oxi)-6-(metiloxi)quinazolin-4-amina:



Se puede sintetizar de acuerdo con los métodos descritos en la Patente de los Estados Unidos 7.576.074 (Véase el Ejemplo 14).

Como se describe en la presente memoria, los compuestos relacionados son los de la Patente de los Estados Unidos 7.576.074 de Fórmula I



o una sal, hidrato, o profármaco farmacéuticamente del mismo, en donde,

R¹ es alquilo C₁-C₃ opcionalmente sustituido con entre uno y tres sustituyentes R⁵⁰,

R² se selecciona entre -H, halógeno, trihalometilo, -CN, -NH₂, -NO₂, -OR³, -N(R³)R⁴, -S(O)₀₋₂R⁴, -SO₂N(R³)R⁴, -CO₂R³, -C(=O)N(R³)R⁴, -N(R³)SO₂R⁴, -N(R³)C(=O)R³, -N(R³)CO₂R⁴, -C(=O)R³, alquilo inferior opcionalmente sustituido, alquenilo inferior opcionalmente sustituido, y alquinilo inferior opcionalmente sustituido;

R³ es -H o R⁴;

- 5 R⁴ se selecciona entre alquilo inferior opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, arilalquilo inferior opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, y heterocicilalquilo inferior opcionalmente sustituido; o

10 R³ y R⁴, cuando se toman junto con un nitrógeno común al que están unidos, forman un heterociclilo de cinco a siete miembros opcionalmente sustituido, conteniendo dicho heterociclilo de cinco a siete miembros opcionalmente sustituido, opcionalmente al menos un heteroátomo adicional seleccionado entre N, O, S, y P;

q es de cero a cinco;

Z se selecciona entre -OCH₂-, -O-, -S(O)₀₋₂-, -N(R⁵)CH₂-, y -NR⁵-;

R⁵ es -H o alquilo inferior opcionalmente sustituido;

- 15 M¹ es -H, alquilo C₁-C₈-L²-L¹- opcionalmente sustituido con R⁵⁰, G(CH₂)₀₋₃-, o R⁵³(R⁵⁴)N(CH₂)₀₋₃-; en donde G es un heterociclilo saturado de cinco a siete miembros que contiene uno o dos heteroátomos anulares y opcionalmente sustituido con entre uno y tres sustituyentes R⁵⁰; L¹ es -C=O- o -SO₂-; L² es un enlace directo, -O-, o -NH-; y R⁵³ y R⁵⁴ son independientemente alquilo C₁-C₃ opcionalmente sustituido con entre uno y tres sustituyentes R⁵⁰;

20 M² es un hidrocarbilo mono- o poli-cíclico fusionado C₃-C₁₄ saturado o mono- o poli-insaturado que contiene opcionalmente uno, dos, o tres heteroátomos anulares por anillo y opcionalmente sustituido con entre cero y cuatro sustituyentes R⁵⁰; y

M³ es -NR⁹-, -O-, o está ausente;

M⁴ es -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂-, o está ausente;

R⁹ es -H o alquilo inferior opcionalmente sustituido;

- 25 R⁵⁰ es -H, halo, trihalometilo, -OR³, -N(R³)R⁴, -S(O)₀₋₂R⁴, -SO₂N(R³)R⁴, -CO₂R³, -C(=O)N(R³)R⁴, -C(=NR²⁵)N(R³)R⁴, -C(=NR²⁵)R⁴, -N(R³)SO₂R⁴, -N(R³)C(O)R³, -NCO₂R³, -C(=O)R³, alcoxi opcionalmente sustituido, alquilo inferior opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, arilalquilo inferior opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, y heterocicilalquilo inferior opcionalmente sustituido; o

dos de R⁵⁰, cuando se toman junto con el mismo carbono son oxo; o

30 dos de R⁵⁰, cuando se toman junto con un carbono común al que están unidos, forman un espirociclilo de tres a siete miembros opcionalmente sustituido, conteniendo opcionalmente dicho espirociclilo de tres a siete miembros opcionalmente sustituido al menos un heteroátomo adicional seleccionado entre N, O, S y P; y

R²⁵ se selecciona entre -H, -CN, -NO₂, -OR³, -S(O)₀₋₂R⁴, -CO₂R³, alquilo inferior opcionalmente sustituido, alquenilo inferior opcionalmente sustituido, y alquinilo inferior opcionalmente sustituido,

e incluye los subgéneros y especies descritos en la Patente de los Estados Unidos 7.576.074.

- 35 XL-647 es un agente terapéutico eficaz en un modelo murino clave, el modelo BPK de EPRAR. El modelo BPK de EPRAR conserva la misma ubicación alterada de EGFR que se observa en la EPRAD murina y humana. Este modelo es, por tanto, ampliamente aceptado como un medio general para afectar a la anomalía de EGFR en EPR, tanto EPRAR como EPRAD. El modelo de BPK surgió como una mutación espontánea en una colonia endogámica de ratones BALB/c. Los ratones bpk homocigotos desarrollan riñones masivamente agrandados y mueren de
- 40 insuficiencia renal a una edad postnatal promedio de 24 días (PN-24). La edad promedio de muerte de los animales afectados no tratados es de 25 días, con un intervalo de 21 a 29 días. Las manifestaciones renales adicionales incluyen la proliferación biliar y la ectasia ductal. Debido a la naturaleza recesiva de la enfermedad, los ratones de tipo salvaje +/+ y heterocigotos bpk/+ son fenotípicamente normales. La medición primaria utilizada en estos estudios es una comparación de la razón de peso del riñón con respecto al peso corporal (PR/PC). Se ha
- 45 demostrado de manera consistente que esta razón es una evaluación precisa de la eficacia de la terapia de EPR. Las medidas adicionales incluyen la evaluación de la función renal (BUN, creatinina y MUCA) y la evaluación histológica del tamaño renal y los túbulos colectores-índice quístico (TC-IQ).

50 En el modelo de ratones bpk descrito a continuación, el tratamiento con XL-647 disminuyó la razón del peso de los riñones con respecto al peso corporal con respecto a los animales no tratados en 21,5% para 7,5 mg/kg en días alternos, 36,7% para 15,0 mg/kg en días alternos, y 41,19% para 15,0 mg/kg una vez al día. Estas razones son comparables o superiores a las observadas en los experimentos con los fármacos solos ("Src Inhibition ameliorates

Polycystic Kidney Disease", J Am Soc Nephrol 19:2008, págs.1331-1341; "Treatment of PKD with a novel tyrosine kinase inhibitor", Kidney International, Vol. 57, 2000, págs. 33-40). El tratamiento con XL-647 redujo el peso del riñón 21,8% con 7,5 mg/kg una vez al día y 40,3% con 15 mg/kg una vez al día. Además, BUN disminuyó 42% y 60,5%, la creatinina 8,3% y 25%, mientras que MUCA mejoró 20,1% y 66,2% (respectivamente para 7,5 mg/kg una vez al día y 15 mg/kg una vez al día). El índice TC-IQ disminuyó 25% y 45,8% respectivamente. Estos hallazgos demuestran que XL-647 es un medio eficaz para la prevención del progreso de la EPR.

Del mismo modo, XL-647 es una terapia eficaz en un modelo de roedor, el modelo de rata PCK. El tratamiento con XL-647 disminuyó el peso del riñón en 13,4% con 7,5 mg/kg una vez al día y 26,0% con 15 mg/kg una vez al día. Esto correspondía a una disminución dependiente de la dosis en la razón PR/PC en la rata PCK tratada (enferma). El TC-IQ se redujo 19,6% y 35,7%, respectivamente, para 7,5 mg/kg una vez al día y 15 mg/kg una vez al día. El nivel de BUN se redujo en 19,2% con 7,5 mg/kg una vez al día y 28,8% con 15 mg/kg una vez al día.

La administración de XL-647 o un compuesto relacionado, o sus sales farmacéuticamente aceptables, en forma pura o en una composición farmacéutica apropiada, puede llevarse a cabo a través de cualquiera de los modos aceptados de administración o agentes con utilidades similares. Por lo tanto, la administración puede ser, por ejemplo, por vía oral, nasal, parenteral (intravenosa, intramuscular, o subcutánea), tópica, transdérmica, intravaginal, intravesical, intracisternal, o rectal, en forma de polvo sólido, semi-sólido, liofilizado, o en formas de dosificación líquidas, tales como por ejemplo, comprimidos, supositorios, píldoras, cápsulas de gelatina elástica blandas y duras, polvos, soluciones, suspensiones, o aerosoles, o similares, preferiblemente en formas de dosificación unitarias adecuadas para la administración sencilla de las dosis precisas.

Las composiciones incluirán un portador o excipiente farmacéutico convencional y un compuesto de la invención como el/un agente activo, y, además, pueden incluir otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, portadores, coadyuvantes, etc. Las composiciones de la invención se pueden utilizar combinadas con agentes contra el cáncer y otros que por lo general se administran a un paciente que está siendo tratado de cáncer. Los coadyuvantes incluyen agentes conservantes, humectantes, de suspensión, edulcorantes, aromatizantes, perfumantes, emulsionantes y de dispensación. La prevención de la acción de los microorganismos se puede asegurar por medio de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, cloruro de sodio, y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede ser ocasionada por el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Si se desea, una composición farmacéutica de la invención también puede contener cantidades menores de sustancias coadyuvantes tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH, antioxidantes, y similares, tales como, por ejemplo, ácido cítrico, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, hidroxitolueno butilado, etc.

Las composiciones adecuadas para la inyección parenteral pueden comprender soluciones dispersiones, suspensiones o emulsiones estériles acuosas o no acuosas, fisiológicamente aceptables, y polvos estériles para su reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles. Los ejemplos de los portadores, diluyentes, disolventes o vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (propilenglicol, polietilenglicol, glicerol, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (tales como aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

Una ruta de administración preferida es la oral, utilizando un régimen de dosificación diario conveniente que puede ajustarse de acuerdo con el grado de severidad de la patología a tratar.

Las formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos, y gránulos. En tales formas de dosificación sólidas, el compuesto activo se mezcla con al menos un excipiente inerte habitual (o portador) tal como citrato sódico o fosfato dicálcico o (a) cargas o propagadores, como por ejemplo, almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y ácido silícico, (b) aglutinantes, como por ejemplo, derivados de celulosa, almidón, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma de acacia, (c) humectantes, como por ejemplo, glicerol, (d) agentes disgregantes, como por ejemplo, agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido alginico, croscarmelosa de sodio, silicatos complejos, y carbonato sódico, (e) retardadores de la disolución, como por ejemplo parafina, (f) aceleradores de la absorción, como por ejemplo, compuestos de amonio cuaternario, (g) agentes humectantes, como por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; estearato de magnesio y similares (h) adsorbentes, como por ejemplo, caolín y bentonita, e (i) lubricantes, como por ejemplo, talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio, o mezclas de los mismos. En el caso de las cápsulas, comprimidos, y píldoras, las formas de dosificación también pueden comprender agentes tamponadores.

Las formas de dosificación sólidas descritas anteriormente se pueden preparar con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros bien conocidos en la técnica. Pueden contener agentes opacificadores, y también pueden tener una composición tal que liberen el compuesto o los compuestos activos en una cierta parte del

tracto intestinal de una manera retardada. Los ejemplos de las composiciones embebidas que se pueden utilizar son sustancias poliméricas y ceras. Los compuestos activos también pueden estar en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes mencionados anteriormente.

5 Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes, y elixires farmacéuticamente aceptables. Tales formas de dosificación se preparan, por ejemplo, disolviendo, dispersando, etc., uno o varios compuestos de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y coadyuvantes farmacéuticos opcionales en un portador, tal como, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol y similares; agentes solubilizantes y emulsionantes, como por ejemplo, alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida; aceites, en particular, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de germen de maíz, aceite de oliva, aceite de ricino y aceite de sésamo, glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán; o mezclas de estas sustancias, y similares, para formar de ese modo una solución o suspensión.

15 Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión, como por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, o mezclas de estas sustancias, y similares.

20 Las composiciones para administración rectal son, por ejemplo, supositorios que se pueden preparar mezclando los compuestos de la presente invención con, por ejemplo, excipientes o portadores no irritantes adecuados tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera para supositorios, que son sólidos a temperaturas ordinarias pero líquidos a la temperatura corporal y por lo tanto, se funden cuando se encuentran en una cavidad corporal adecuada y liberan el componente activo en la misma.

25 Las formas de dosificación para la administración tópica de un compuesto de esta invención incluyen ungüentos, polvos, pulverizaciones, e inhaladores. El componente activo se mezcla en condiciones estériles con un portador fisiológicamente aceptable y cualquier conservante, tampón, o propelente que pueda ser necesario. Las formulaciones oftálmicas, pomadas oculares, polvos y soluciones también se contemplan dentro del alcance de esta invención.

30 Generalmente, dependiendo del modo pretendido de administración, las composiciones farmacéuticamente aceptables contendrán de aproximadamente 1% a aproximadamente 99% en peso de uno o varios compuestos de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y de 99% a 1% en peso de un excipiente farmacéutico adecuado. En un ejemplo, la composición tendrá entre aproximadamente 5% y aproximadamente 75% en peso de uno o varios compuestos de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, siendo el resto excipientes farmacéuticos adecuados.

35 Los métodos actuales para preparar tales formas de dosificación son conocidos, o serán evidentes, para los expertos en esta técnica; por ejemplo, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a ed., (Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990). La composición que se va a administrar, en cualquier caso, contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para el tratamiento de un estado de enfermedad de acuerdo con las enseñanzas de esta invención.

40 Los compuestos de la invención, o sus sales farmacéuticamente aceptables, se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz que variará dependiendo de una variedad de factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de acción del compuesto, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el modo y tiempo de administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad de los estados de enfermedad concretos, y el anfitrión sometido a terapia. Los compuestos de la presente invención se pueden administrar a un paciente a niveles de dosificación en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1000 mg por día. Para un ser humano adulto normal que tiene un peso corporal de aproximadamente 70 kilogramos, un ejemplo es una dosificación en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal por día. La dosificación específica usada, sin embargo, puede variar. Por ejemplo, la dosificación puede depender de numerosos factores, incluyendo los requerimientos del paciente, la gravedad de la afección a tratar, y la actividad farmacológica del compuesto que se utiliza. La determinación de las dosificaciones óptimas para un paciente concreto es bien conocida por los expertos en la técnica.

Ejemplos

Los protocolos in vitro e in vivo ilustrativos se pueden encontrar en Gendreau SB, Ventura. R, Keast P, et al., Inhibition of the T790M Gatekeeper Mutant of the Epidermal Growth factor by EXEL-7647, Clin Cancer Res 3713, 13(12) (2007), que se incorpora a la presente como referencia en su totalidad.

55 Preparación de Compuesto

Para los ensayos in vitro, se preparó una solución de partida de 10 mmoles/L de XL-647 en DMSO y se diluyó en tampones de análisis o medio de cultivo óptimos. La concentración de análisis final en DMSO no excedió de 0,3%

(v/v). Para los estudios in vivo, XL-647 fue formulado para la administración oral por disolución de polvo seco, o bien el HCl o bien la sal tosilato, en solución salina filtrada estéril (0,45 µm; Nalge Nunc International) (USP al 0,9%, Baxter Corp.) o bien en agua estéril (Baxter). Todos los compuestos se mezclaron mediante agitación con vórtex y se sometieron a sonicación en un baño de agua para desorganizar las partículas grandes. Todas las disoluciones/suspensiones de dosificación se prepararon diariamente.

Ejemplo 1

Modelo BPK de EPRAR

La eficacia de XL-647 en el tratamiento de EPRAR se sometió a ensayo usando el modelo BPK de EPRAR. Los ratones bpk tienen un fondo BALB/c, y contienen la misma mutación en el gen EGFR que se observa en la EPRAD murina y humana. Estos animales fueron alojados en las instalaciones del terrario del Medical College of Wisconsin. Todos los experimentos con animales se realizaron de conformidad con las políticas de la NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals y el Institutional Animal Care and Use Committee del Medical College of Wisconsin.

A partir del día postnatal 7 (PN-7), camadas enteras de criadores contrastados de bpk heterocigotos que incluían animales homocigotos (enfermos), así como heterocigotos y de tipo salvaje recibieron inyecciones con XL-647 dosificado cada dos días a 7,5 o 15 mg/kg o cada día a 15 mg/kg. Los animales fueron tratados de PN-7 a PN-21 y se evaluó el grado de la enfermedad. La identidad de los animales bpk +/- se puede determinar fácilmente post-mortem por la presencia de los riñones enormemente agrandados. El PN-21, el estudio se terminó y los animales fueron sacrificados. Se determinó la masa de cada animal. Ambos riñones de cada animal se extirparon y se pesaron. La razón de peso del riñón con respecto al peso corporal (PR/PC) se determinó mediante la siguiente fórmula: PR/PC = [masa de ambos riñones]/[masa del animal].

Además, se calculó el índice quístico renal (IQ). Las lectinas específicas para los túbulos proximales (TP) (lotus tetragonolobus [LTA]) y túbulos colectores (TC) (aglutininas de Dolichbs biflorus [DBA]) se tiñeron y se utilizaron para evaluar la gravedad de las dilataciones quísticas en una escala de 0-5. La función renal se evaluó mediante la obtención de BUN y niveles de creatinina por medio de punción cardíaca. MUCA se midió después de mantener a los animales sin agua durante 12 horas.

Los resultados mostrados en la Tabla 1, demuestran que XL-647 redujo significativamente el peso del riñón en ratones bpk tratados 21,8% (7,5 mg/kg una vez al día: 1,61 ± 0,23) y 40,3% (15 mg/kg una vez al día: 1,28 ± 0,09). El PR/PC disminuyó 21,5% (7,5 mg/kg una vez al día: 15,34 ± 1,26) y 36,7% (15 mg/kg una vez al día) con el tratamiento. La reducción del tamaño renal también refleja un TC-IQ disminuido en ratones bpk tratados en 25% y 45,8%, respectivamente, en 7,5 mg y 15 mg/kg una vez al día.

Tabla 1: Peso y morfología del riñón en ratones BALB/C y bpk tratados con PR1M-001 y de control el día PN 21

Parámetro	Ratones BALB/C (N)				Ratones bpk (N)			
	Simulado (N = 8)	Vehículo (N = 8)	7,5 mg/kg/día (N = 7)	15 mg/kg/día (N = 7)	Simulado (N = 8)	Vehículo (N = 14)	7,5 mg/kg/día (N = 7)	15 mg/kg/día (N = 10)
Peso corporal (g)	10,21 ± 0,23	10,83 ± 0,79	10,67 ± 0,93	10,06 ± 0,26	10,35 ± 0,52	10,52 ± 0,64	10,46 ± 1,16	9,96 ± 0,47
Peso riñón (g)	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,13 ± 0,01	2,04 ± 0,27	2,06 ± 0,30	1,61 ± 0,23	1,28 ± 0,09
Peso riñón/corporal (%)	1,42 ± 0,06	1,45 ± 0,06	1,33 ± 0,07	1,25 ± 0,10	19,71 ± 2,00	19,53 ± 1,76	15,34 ± 1,26	12,36 ± 1,14
TC-IQ [†]	0	0	0	0	4,60 ± 0,55	4,80 ± 0,45	3,60 ± 0,55	2,60 ± 0,55

Valor p para ratones bpk tratados con vehículo vs tratados con XL647: * p <0,05; ** p <0,001

Los resultados de la Tabla 2 muestran que el tratamiento con XL-647 mejora significativamente la función renal. Los niveles de BUN disminuyeron 42,0% con 7,5 mg/kg una vez al día y 60,5% con 15 mg/kg una vez al día mientras que los niveles de creatinina disminuyeron 8,3% y 25%, respectivamente. La mejora en las mediciones del MUCA en ratones bpk tratados con XL-647 fue de 20,1% y 66,2% respectivamente. Se utilizó el análisis de transferencia Western para confirmar la eficacia de XL-647.

Tabla 2: Evaluación de la función renal en ratones BALB/C y bpk tratados con PRIM-001 y de control el día PN 21

Parámetro	Ratones BALB/C (N)				Ratones bpk (N)			
	Simulado	Vehículo	7,5 mg/kg/día	15 mg/kg/día	Simulado	Vehículo	7,5 mg/kg/día	15 mg/kg/día
BUN (mg/dL)	21,13 ± 2,23 (8)	19,38 ± 1,06 (8)	19,00 ± 2,24 (7)	19,29 ± 1,60 (7)	104,4 ± 25,56 (8)	109,3 ± 18,80 (14)	63,43 ± 24,28 (7)	43,20 ± 13,99 (10)
Creatinina (mg/dL)	0,28 ± 0,10 (8)	0,24 ± 0,05 (8)	0,24 ± 0,05 (7)	0,29 ± 0,07 (7)	0,56 ± 0,12 (8)	0,48 ± 0,11 (14)	0,44 ± 0,10 (7)	0,36 ± 0,10 (10)
MUCA (mOsmoles)	1,080 ± 52,4 (6)	1,044 ± 35,8 (5)	1,029 ± 50,1 (4)	1,029 ± 28,7 (4)	487,5 ± 105,1 (7)	466,3 ± 93,8 (8)	560,0 ± 71,3 (4)	775,0 ± 100,5 (6)

Valor p para ratones enfermos tratados con vehículo vs ratones tratados con XL647: * p <0,05; ** p <0,001

Ejemplo 2

Modelo PCK

5 Se utilizó XL-647 en el modelo de rata PCK, un modelo ortólogo de EPRAR, para determinar su eficacia en la inhibición de ErbB2. El fenotipo de la rata PCK es diferente del de los seres humanos ya que tiene un progreso más lento de la enfermedad y una disminución más lenta de la función renal. Las ratas PCK procedían de una colonia mutada de ratas Sprague-Dawley, de Fujita Health University y fueron alojadas en el Medical College of Wisconsin. Todos los experimentos con animales se realizaron de conformidad con las políticas de la NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals y el Institutional Animal Care and Use Committee del Medical College of Wisconsin.

10 Del PN 30 al PN 90, las ratas PCK (enfermas) recibieron XL-647 a 7,5 mg/kg/una vez al día y 15 mg/kg/una vez al día por medio de una sonda. Dos horas después de la última inyección en PN 90, las ratas fueron sacrificadas y los riñones y el hígado se retiraron y se pesaron. Las mediciones post-mortem incluyeron la razón PR/PC y el índice quístico (IQ) utilizando secciones renales de la corteza, la médula, y la papila. A continuación, se determinó TC-IQ a partir del índice quístico que se basa en el tamaño del quiste renal a intervalos de 15 días desde PN 0 hasta PN 135.

15 La función renal se evaluó con los niveles de BUN y creatinina a partir de la punción cardíaca.

La Tabla 3 muestra que las ratas PCK tratadas con XL-647 mostraron una reducción significativa en la razón de PR/PC con la correspondiente disminución en el peso del riñón en 13,4% (7,5 mg/kg una vez al día: 5,77 ± 0,47) y 26,0% (15 mg/kg una vez al día: 4,93 ± 0,42). Al reducir el tamaño del riñón, hay una reducción en los quistes TC. La Tabla 3 demuestra que el tratamiento con XL-647 disminuye TC-IQ 19,6% y 35,7% para 7,5 mg y 15 mg/kg una vez al día respectivamente.

20

Tabla 3: Peso y morfología del riñón en ratas SD de control y ratas PCK tratadas con vehículo y PRIM-001 el día PN 90

Parámetro	Rata SD (simulado) (N = 12)	Rata SD (vehículo) (N = 10)	Rata PCK (simulado) (N = 6)	Rata PCK (vehículo) (N = 12)	Rata PCK (7,5 mg/kg/día) (N = 8)	Rata PCK (15 mg/kg/día) (N = 8)
Peso corporal (g)	355,9 ± 12,58	369,8 ± 19,46	394,2 ± 23,11	393,8 ± 21,01	384,5 ± 23,69	379,4 ± 15,39
Peso riñón (g)	3,44 ± 0,45	3,58 ± 0,25	6,87 ± 0,26	6,66 ± 0,60	5,77 ± 0,47	4,93 ± 0,42
Peso riñón/corporal (%)	0,96 ± 0,10	0,97 ± 0,04	1,74 ± 0,045	1,69 ± 0,08	1,5 ± 0,08	1,31 ± 0,08
TC-IQ	N/A	N/A	7,17 ± 0,75	7,00 ± 0,60	5,63 ± 0,74	4,50 ± 0,92

* Valor p para el tratamiento con vehículo para ratas SD vs ratas PCK: p < 0,001; ** valor p para ratas PCK tratadas con vehículo vs PRIM-001: p <0,05;*** valor p para ratas PCK tratadas con vehículo vs PRIM-001: p <0,001

25 La Tabla 4 muestra las mediciones de la función renal. Las ratas PCK que recibieron tratamiento presentaban una disminución de los niveles de BUN en 19,2% (7,5 mg/kg una vez al día: 27,50 ± 3,74) y 28,8% (15 mg/kg una vez al día: 24,25 ± 4,3). Se utilizó el análisis de transferencia Western para confirmar y validar la eficacia de XL-647.

Tabla 4: Parámetros de la química clínica del riñón en ratas SD de control y ratas PCK tratadas con vehículo y PRIM-0,01 el día PN 90

Parámetro	Ratas SD (simulado) (N = 12)	Rata SD (vehículo) (N = 10)	Rata PCK (simulado) (N = 5)	Rata PCK (vehículo) (N = 12)	Rata PCK (7,5 mg/kg/día) (N = 8)	Rata PCK (15 mg/kg/día) (N = 8)
BUN (mg/dL)	21,17 ± 1,19 (12)	22,40 ± 1,55 (10)	34,00 ± 4,74 (5)	32,71 ± 4,57 (12)	27,50 ± 3,74 (8)	24,25 ± 4,30 (8)
Creatinina (mg/dL)	0,33 ± 0,08 (12)	0,34 ± 0,12 (10)	0,54 ± 0,5 (5)	0,54 ± 0,09 (12)	0,48 ± 0,09 (8)	0,46 ± 0,07 (8)
Valor p para ratones enfermos tratados con vehículo vs XL647: * p 0,05; ** p < 0,001						

Ejemplo 3

Análisis bioquímico *in vitro* para la inhibición con XL-647

- 5 Se midió el efecto del compuesto XL-647 sobre la actividad de varias quinasas, incluyendo EGFR, ErbB2/HER2, y KDR/VEGFR2, utilizando uno de los tres formatos de análisis. Los experimentos de dosis-respuesta se realizaron utilizando 10 concentraciones inhibitoras diferentes en placas de microtitulación de 384 pocillos. La concentración de ATP utilizada para cada análisis fue equivalente a la K_m para cada quinasa. Los valores de CI_{50} se calcularon mediante análisis de regresión no lineal usando la ecuación de cuatro variables: $Y = \text{min} + (\text{máx} - \text{min})/[1 + ([I]/CI_{50})^N]$, donde Y es la señal observada, [I] es la concentración de inhibidor, min es la señal de fondo en ausencia de enzima (0% de actividad enzimática), max es la señal en ausencia de inhibidor (100% de actividad enzimática), CI_{50} es la concentración de inhibidor requerida para una inhibición de la enzima de 50%, y N representa la pendiente de Hill empírica como una medida de cooperatividad. Los resultados se resumen en la Tabla 5.

- 15 Se utilizó un análisis radiométrico de quinasas con transferencia de ^{33}P -fosforilo para medir la actividad de EphB4, receptor del factor de crecimiento de tipo insulínico-1 (IGFR-1), y receptor de insulina (IRK). Las reacciones se realizaron en placas de microtitulación de alta unión, de fondo claro, de 384 pocillos de color blanco (Greiner). Las placas se recubrieron con 2 μg /pocillo de sustrato peptídico en un volumen de 50 μl . El tampón de recubrimiento contenía 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de sustrato para EphB4 e IRK poli(Ala-Glu-Lys-Tyr) o sustrato para IGFR-1 poli(Glu-Tyr) 6:2:5:1 (Perkin-Elmer), 22,5 mmoles/L de NaH_2CO_3 , 27,5 mmoles/L de NaHCO_3 , 150 mmoles/L de NaCl, y 3 mmoles/L de NaN_3 . Las placas recubiertas se lavaron una vez con 50 μl de tampón de análisis después de la incubación durante la noche a temperatura ambiente. El compuesto de ensayo y, o bien 5 nmoles/L de EphB4 (residuos E605-E890 de EphB4 humano que contenía una etiqueta NH_2 terminal de seis histidinas, expresado en un sistema de expresión de baculovirus y purificado utilizando cromatografía con quelato metálico), 4 nmoles/L de receptor de factor de crecimiento de tipo insulínico 1 (residuos M954-C1367 de receptor de factor de crecimiento de tipo insulínico 1 humano, Proqinase GmbH), o 15 nmoles/L de receptor de insulina 1 (residuos P948-S1343 de receptor de insulina humano 1, Proqinase) se combinaron con [^{33}P]g-ATP (5 $\mu\text{moles}/\text{L}$, 3,3 $\mu\text{Ci}/\text{nmol}$) en un volumen total de 20 μL . La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1,5 a 2,5 h y se terminó por aspiración. Las placas de microtitulación fueron posteriormente lavadas seis veces con tampón Tween-PBS al 0,05%. Se añadió fluido de centelleo (50 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$) y se midió el ^{33}P incorporado por medio de espectrometría de centelleo líquido usando un contador de centelleo MicroBeta (Perkin-Elmer).

- 35 Se utilizó un análisis de quimioluminiscencia acoplada a luciferasa para medir la actividad de EGFR y KDR (VEGFR2). La actividad quinasa se midió como el porcentaje de ATP consumido después de la reacción de la quinasa utilizando quimioluminiscencia acoplada a luciferasa-luciferina. Las reacciones se llevaron a cabo en placas de microtitulación de unión media, de 384 pocillos de color blanco (Greiner). Las reacciones de la quinasa se iniciaron combinando XL-647, 3 $\mu\text{moles}/\text{L}$ de ATP, 1,6 $\mu\text{moles}/\text{L}$ de sustrato (poli (Glu, Tyr) 4:1; Perkin-Elmer), y, o bien EGFR (7 nmoles/L, residuos H672-A1210 de EGFR humano, Proqinase) o bien KDR (5 nmoles/L, residuos D807-V1356 de KDR humano, Proqinase) en un volumen de 20 μL . La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 4 h. Después de la reacción de la quinasa, se añadió una alícuota de 20 μl de quinasa Glo (Promega) y la señal de luminiscencia se midió usando un lector de placa Victor2 (Perkin-Elmer). El consumo total de ATP se limitó a 50%.

- 45 Se utilizó un análisis de tirosina quinasa AlphaScreen para medir la actividad ErbB2 y Flt-4. Se utilizaron cuentas donadoras recubiertas con estreptavidina y cuentas aceptoras recubiertas con anticuerpo anti-fosfotirosina pY100 (Perkin-Elmer). Se utilizó poli(Glu, Tyr) biotinilado 4:1 como sustrato. La fosforilación del sustrato se midió mediante luminiscencia después de la adición de cuentas donadoras-aceptoras seguido de la formación de complejos. El compuesto de ensayo, 3 $\mu\text{moles}/\text{L}$ de ATP, 3 nmoles/L de poli(Glu, Tyr) biotinilado 4:1, y 1 nmol/L de ErbB2 (residuos Q679-V1255 de ErbB2 humano, Proqinase) o Flt-4 (residuos D725-R1298 de Flt-4 humano, Proqinase) se combinaron en un volumen de 20 μl de tampón de análisis (Tris HCl 20 mM, pH 7,5, MgCl_2 10 mM, MnCl_2 3 mM, DTT 1 mM, Tritón al 0,01%) en una placa de microtitulación de unión media de 384 pocillos de color blanco

(Greiner). Las mezclas de reacción se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Las reacciones se sofocaron mediante la adición de 10 μ L de 15 a 30 μ g/mL de suspensión de cuentas AlphaScreen que contenía 75 mmoles/L de HEPES (pH 7,4), 300 mmoles/L de NaCl, 120 mmoles/L de EDTA, albúmina de suero bovino al 0,3%, y Tween 20 al 0,03%. Después de 2 a 16 h de incubación a temperatura ambiente, las placas se leyeron utilizando un lector AlphaQuest (Perkin-Elmer).

Tabla 5: Perfil de inhibición de quinasa *in vitro* de XL-647.

Quinasa	CI ₅₀ \pm DT (nmoles/L)
EGFR	0,3 \pm 0,1
ErbB2	16 \pm 3
KDR	1,5 \pm 0,2
Flt-4	8,7 \pm 0,6
EphB4	1,4 \pm 0,2
Src	10,3 \pm 2,0
IGF1R	> 10000
InsR	> 26000

Los resultados se presentan como la media \pm DT de al menos tres determinaciones independientes.

Los estudios del mecanismo de acción para EGFR, ErbB2, KDR, y EphB4 confirmaron que XL-647 es un inhibidor competitivo con ATP y reversible. Se combinaron altas concentraciones de enzima y XL-647 ($\gg K_i$) y se incubaron durante 2 horas sobre hielo. Se utilizaron las siguientes concentraciones de enzima y XL-647: EphB4 200 nM, XL-647 400 nM; EGFR 0,5 nM, XL-647 5 nM; KDR 3 nM, XL-647 1000 nM. La actividad enzimática se midió mediante procedimientos convencionales después de la dilución del complejo enzima-inhibidor. La actividad se comparó con un control de DMSO tratado bajo condiciones idénticas.

Tabla 6: Determinaciones de K_i para XL-647 contra quinastas seleccionadas.

Parámetros	EphB4	EGFR	ErbB2	KDR
Reversible	Sí	Sí	Sí	Sí
Competitiva con ATP	Sí	Sí	Sí	Sí
K _M (μ M) (ATP)	5,0	0,5	2,5	0,7
K _i (nM)	1	0,05	3	0,6

15 Ejemplo 3

Escrutinio bioquímico *in vitro* para determinar la especificidad de XL-647

Se evaluó la especificidad de XL-647 frente a un panel de dianas farmacológicas, incluyendo receptores, transportadores y enzimas (NovaScreen, Hanover, MD). A una única concentración *in vitro* de 10 μ M, se demostró que XL-647 interactuaba con muy pocas dianas farmacológicas (Tabla 7). Sólo el transportador de serotonina humano se inhibió con una CI₅₀ < 1 μ M (CI₅₀ = 188 nM). Los efectos también se observaron en los receptores muscarínicos, los receptores α 2-adrenérgicos y el transportador de dopamina, que exhibían valores de CI₅₀ de 1 a 2,7 μ M.

Tabla 7: Panel de análisis NovaScreen contra XL-647

Análisis diana	Inhibición, XL-647 10 μ M	CI ₅₀ (nM)
Adenosina, no selectiva	47,89%	
Alfa 1 adrenérgico, no selectivo	49,40%	
Alfa 2 adrenérgico, no selectivo	84,56%	1800
Beta adrenérgico, no selectivo	18,01%	
Transportador de dopamina	87,14%	2480

ES 2 545 353 T3

Análisis diana	Inhibición, XL-647 10 µM	CI₅₀ (nM)
Dopamina, no selectiva	34,88%	
GABA A, sitio agonista	1,07%	
GABA-B*	-1,19%	
Glutamato, sitio AMPA	10,79%	
Glutamato, sitio kainato	0,89%	
Glutamato, sitio agonista NMDA	-1,66%	
Glutamato, NMDA, Glicina (sitio Stry-InSens)*	6,46%	
Glicina, sensible a estricnina	12,95%	
Histamina, H1	59,82%	
Histamina, H2*	45,68%	
Histamina, H3	38,64%	
Melatonina, no selectiva	0,18%	
Muscarínico, M1 (humano recombinante)*	98,13%	2330
Muscarínico, M2 (humano recombinante)*	98,73%	1180
Muscarínico, no selectivo, Central	97,91%	2570
Muscarínico, no selectivo, Periférico	87,74%	2650
Nicotínico (insensible a a-bungarotoxina)	53,97%	
Transportador de norepinefrina	-5,38%	
Opiáceos, no selectivo	39,73%	
Transportador de serotonina	100,94%	188
Serotonina, no selectiva	24,52%	
Sigma, no selectiva	50,90%	
Estrógeno	15,75%	
Testosterona (citósólica)	18,09%	
Canal de calcio, Tipo L (sitio dihidropiridina)	46,77%	
Canal de calcio, Tipo N	16,82%	
Canal de potasio, sensible a ATP	5,02%	
Canal de potasio, Ca ²⁺ Act., VI	17,02%	
Canal de potasio, Ca ²⁺ Act., VS	22,72%	
Sodio, Sitio 2	88,06%	
NOS (Unión Neuronal)	16,80%	
GABA A, BDZ, alfa 1, Central	7,34%	
Leucotrieno B4, LTB4	32,17%	
Leucotrieno D4, LTD4	-11,89%	
Tromboxano A2 (humano)	1,51%	
Factor de liberación de corticotropina, no selectivo	32,32%	
Oxitocina	-2,59%	
Factor activador de plaquetas, PAF*	11,72%	
Hormona liberadora de tirotrópina, TRH	4,59%	

Análisis diana	Inhibición, XL-647 10 μ M	CI ₅₀ (nM)
Angiotensina II, AT1 (humana)	6,85%	
Angiotensina II, AT2	16,64%	
Bradiquinina, BK2	48,81%	
Colecistoquinina, CCK1 (CCKA)	47,54%	
Colecistoquinina, CCK2 (CCKB)	17,12%	
Endotelina, ET-A (humana)	-11,07%	
Endotelina, ET-B (humana)	-13,61%	
Galanina, no selectiva	1,57%	
Neuroquinina, NK1	20,44%	
Neuroquinina, NK2 (NKA) (recombinante humana) *	34,23%	
Neuroquinina, NK3 (NKB)	19,96%	
Péptido intestinal vasoactivo, no selectivo	17,02%	
Vasopresina 1	32,83%	
Acetilcolinesterasa	49,40%	
Colina acetiltransferasa	1,27%	
Ácido glutámico descarboxilasa	-8,46%	
Monoaminoxidasa A, Periférica	1,66%	
Monoaminoxidasa B, Periférica	2,03%	

XL-647 fue inactivo contra un panel de 10 tirosina quinasas (incluyendo la insulina y el factor de crecimiento de tipo insulínico 1) y 55 serina-treonina quinasas (incluyendo quinasas dependientes de ciclina, proteína quinasas activadas por estrés, e isoformas de proteína quinasa C).

5 Se llevó a cabo un escrutinio adicional utilizando los métodos de análisis bioquímico del Ejemplo 2. La descripción adicional de los componentes y las concentraciones se resumen en la Tabla 8, la Tabla 9, y la Tabla 10, a continuación. Los resultados del escrutinio se encuentran en la Tabla 11.

Tabla 8: Componentes de análisis para los análisis radiométricos de quinasas

Enzima	[Enz]	[ATP]	Sustrato	[sust] (μ g/pocillo)	T(min)	Tampón Análisis	Constructo
Flt-1	6 nM	5 μ M	poli-EY	2	120	TrisHCl 20 mM, pH 7,5, MgCl ₂ 10 mM, MnCl ₂ 3 mM, DTT 1 mM, Tritón al 0,01%	Humano, dominio citoplásmico, N-GST-Factor X, ProQinase
Flt-1	6 nM	5 μ M	poli-EY	2	120	TrisHCl 20 mM, pH 7,5, MgCl ₂ 10 mM, MnCl ₂ 3 mM, DTT 1 mM, Tritón al 0,01%	Humano, dominio citoplásmico, N-GST-Factor X, ProQinase

Enzima	[Enz]	[ATP]	Sustrato	[sust] ($\mu\text{g/pocillo}$)	T(min)	Tampón Análisis	Constructo
Tie-2(Tek)	15 nM	5 μM	poli-AEKY	5	120	TrisHCl 20 mM, pH 7,5, MgCl ₂ 10 mM, Tritón al 0,03%, DTT 1 mM	Humano, K956-S1390, N-GST-His6-Trombina, ProQinase
PKC-epsilon	600 pM	2 μM	MBP	1,2	90	Hepes 20 mM, MgCl ₂ 10 mM, CaCl ₂ 1 mM, Tritón X-100 al 0,03%, DTT 1 mM	Humano, PanVera
PKC-eta	200 pM	2 μM	MBP	1	90	Hepes 20 mM, MgCl ₂ 10 mM, CaCl ₂ 1 mM, Tritón X-100 al 0,03%, DTT 1 mM	Humano, PanVera
Chk1	10 nM	10 μM	MBP	2	120	1X tampón STX (HEPES 5 mM, pH 7,6, NaCl 15 mM, IgG Bovina BGG al 0,01%), MgCl ₂ 10 mM, DTT 1 mM, Tritón al 0,02%	Humano, etiqueta N-GST, Upstate Bio-technology
Chk2	20 nM	30 μM	MBP	2	120	1X tampón STX, MgCl ₂ 10 mM, DTT 1 mM, Tritón al 0,02%	Humano, 5-543, N-GST/C-His, Upstate Biotechnology
Plk-1	100 nM	5 μM	Caseína	2,5	120	TrisHCl 20 mM, pH 8,0, MgCl ₂ 10 mM, CHAPS al 0,02%	Humano, His6
Cdc2	10 nM	5 μM	MBP	2	120	Hepes 25 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, MgCl ₂ 10 mM, MnCl ₂ 3 mM, DTT 1 mM, Tritón al 0,01%	Humano, M1-M297/h ciclina B M1-V433, N-GST-His6-Trombina, ProQinase

Tabla 9: Componentes del análisis para los análisis de quinasa AlphaScreen

Enzima	[Enz]	[ATP]	Sustrato	[sust]	T(min)	Tampón análisis	Constructo
FGFR1	1 nM	3 μM	poli-EY	2 nM	60	TrisHCl 20 mM, pH 7,5, MgCl ₂ 10 mM, MnCl ₂ 3 mM, DTT 1 mM, Tritón al 0,01%	Humano, dominio citoplásmico, N-GST-HIS6, ProQinase

Enzima	[Enz]	[ATP]	Sustrato	[sust]	T(min)	Tampón análisis	Constructo
c-Kit	1 nM	3 µM	poli-EY	3 nM	60	TrisHCl 20 mM, pH 7,5, MgCl ₂ 10 mM, MnCl ₂ 3 mM, DTT 1 mM, Tritón al 0,01%	Humano, T544-V976, N- GST, ProQinase
Fyn	10 pM	3 µM	poli-EY	5 nM	60	TrisHCl 20 mM, pH 7,5, MgCl ₂ 10 mM, MnCl ₂ 2 mM, DTT 1 mM, Tritón al 0,02%	Humano, N-His6, Upstate Biotechnology

Tabla 10: Componentes del análisis para los análisis de quinasa con quimioluminiscencia

Enzima	[Enz]	[ATP]	Sustrato	[sust]	T (min)	Tampón análisis	Constructo
EphA2	20 nM	3 µM	poli-EY	1,6 µM	180	TrisHCl 20 mM, pH 7,5, MgCl ₂ 10 mM, MnCl ₂ 3 mM, Tritón al 0,01%	Humano, N598-R890, N- His6
c-Met	10 nM	1 µM	poli-EY	1 µM	120	TrisHCl 20 mM, pH 7,5, MgCl ₂ 10 mM, Triton X-100 al 0,02%, DTT 1 mM, MnCl ₂ 2 mM	Humano, P948-S1343, etiqueta N- GST, ProQinase
Ab1	15 nM	1 µM	poli-EY	2 µM	120	TrisHCl 20 mM, pH 7,5, MgCl ₂ 10 mM, MnCl ₂ 3 mM, DTT 1 mM, Tritón al 0,01%	Humano, P118-S553, N-GST, ProQinase
Lck	12 nM	1 µM	poli-AEKY	4 µM	120	TrisHCl 20 mM, pH 7,5, MgCl ₂ 10 mM, MnCl ₂ 3 mM, DTT 1 mM, Tritón al 0,03%	Humano, Q225-P510, N-GST/C-terminal EF
Src	1,6 nM	3 µM	poli-EY	1,6 µM	180	TrisHCl 20 mM, pH 7,5, MgCl ₂ 10 mM, MnCl ₂ 3 mM, DTT 1 mM, Tritón al 0,01%	Humano, etiqueta N- His, Upstate Biotech
ZAP70	4 nM	1 µM	poli-EY	0,8 µM	120	TrisHCl 20 mM, pH 7,5, MgCl ₂ 10 mM, MnCl ₂ 3 mM, DTT 1 mM, Tritón al 0,01%	Humano, MBL
PKA	10 nM	5 µM	MBP	5 µM	120	Hepes 20 mM, pH 7,4, MgCl ₂ 10 mM, DTT 1 mM, Tritón al 0,03%	Bovino (Corazón), Upstate Biotechnology

Enzima	[Enz]	[ATP]	Sustrato	[sust]	T (min)	Tampón análisis	Constructo
MAP4K3	10 nM	5 μ M	MBP	5 μ M	120	Hepes 20 mM, pH 7,4, MgCl ₂ 10 mM, DTT 1 mM, Tritón al 0,03%	Dominio quinasa, N- His6
EMK	30 nM	250 nM	Caseína	1 μ M	180	Hepes 20 mM, MgCl ₂ 10 mM, CaCl ₂ 1 mM, MnCl ₂ 2 mM, CHAPS al 0,03%, DTT 1 mM	Humano, N-His6
GSK-3 β	5 nM	3 μ M	Péptido Fosfo-Glicógeno Sintasa	5 μ M	90	Hepes 20 mM, pH 7,4, MgCl ₂ 10 mM, DTT 1 mM, Tritón al 0,03%	Humano, epítipo N-His6/Glu-Glu, Upstate Biotechnology

Tabla 11: Perfil adicional de inhibición *in vitro* de XL-647

Quinasa	Cl ₅₀ \pm DT (nmoles/L)
EphA2	6,8 \pm 0,8
Flt1	56,5 \pm 15,5
PDGFR- α	64,4 \pm 7,2
PDGFR- β	345,7 \pm 37,0
c-Kit	132,2 \pm 8,2
c-Abl	336,8 \pm 3,6
FGFR1	855,3 \pm 96,3
Tie-2	54,0 \pm 13,4
ZAP-70	7806,0 \pm 655,3
c-Met	332,0 \pm 50,7
Fyn	41,0 \pm 8,1
Lck	31,0 \pm 0,3
Blk	15
Yes	1,1
Fes	474
Lyn	2
CSK	402

Las enzimas con valores de Cl₅₀ superiores a 1 μ M incluyen: AMPK, c-Raf, CamKII, CaMKIV, CDK1, CDK2, CDK3, CDK5, CDK6, CDK7, CK2, GSK3 β , IKK α , IKK β , JNK1 α , JNK2 α , JNK3 α , MAPK1, MAPK2, PRAK MEK1, MKK4, MKK6, MKK7 β , MAP4K3, MAP4K5, p70S6K, PAK2, Plk1, CK1PRAK2, ROCK II, Rsk1, RSK2, Rsk3, SAPK3, SAPK4, Syk. Las enzimas con valores de Cl₅₀ superiores a 10 μ M incluyen: Chk1, Chk2, Ckl1, Clk2, EMK, MAPKAP2, PKB α , PKB β , PKC α , PKC- γ , PKC- ϵ , PKC- ζ , PKA, p70S6K, SGK.

Ejemplo 4

Análisis de actividad basada en células *in vivo*

Se confirmó la inhibición de EGFR por XL-647 *in vivo*, utilizando células de carcinoma epidermoide humano A431 (Colección de Cultivos Tipo Americana), adenocarcinoma humano MDA-MB-231 (Universidad de Georgetown), adenocarcinoma CPCNP H1975 (Colección de Cultivos Tipo Americana), y carcinoma de células escamosas Lx-1 (Department of Oncology Drug Discovery, Bristol-Myers Squibb) células. A431 contiene EGFR humano de tipo salvaje expresado en exceso. H1975 contiene tanto una mutación activadora en EGFR (L858R) como una mutación supresora intragénica (T790M) que confiere resistencia a gefitinib y erlotinib. Las células Lx-1 no expresan EGFR

endógeno, y se utilizaron para expresar constructos de EGFR exógeno. Otras líneas celulares se resumen en la Tabla 12.

Se mantuvieron las líneas celulares A431 y MDA-MB-231 y se propagaron como cultivos en monocapa en DMEM (Mediatech) que contenía L-glutamina con un suplemento de suero bovino fetal inactivado con calor al 10% (Hyclone), 100 unidades/mL de penicilina G, 100 µg/mL de estreptomina (penicilina/estreptomina al 1%, Mediatech), y aminoácidos no esenciales al 1% (Mediatech) a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5% humidificada. Las líneas celulares H1975, y Lx-1 se mantuvieron en RPMI 1640 completo (30-2.001; Colección de Cultivos Tipo Americana; que contenía L-glutamina con un suplemento de suero bovino fetal inactivado con calor al 10%, penicilina/estreptomina al 1%, y aminoácidos no esenciales al 1%) a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5% humidificada. Otras líneas celulares se mantuvieron y propagaron por métodos similares en medios convencionales.

Se midió el efecto de XL-647 sobre EGFR de tipo salvaje *in vivo* por medio de un análisis de autofosforilación de EGFR basado en células en células A431. Las células A431 se sembraron a 5×10^4 por pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos (3904 Costar, VWR) y se incubaron en DMEM completamente complementado durante 16 h después de lo cual el medio de crecimiento fue reemplazado por DMEM libre de suero y las células se incubaron durante 24 h más. Se añadieron diluciones seriadas de XL-647 (por triplicado) en medio libre de suero a las células quiescentes y se incubaron durante 1 h antes de la estimulación con 100 ng/mL de EGF humano recombinante (R & D Systems) durante 10 min. Los pocillos de control negativo no recibieron EGF. Después del tratamiento, las monocapas de células se lavaron con PBS frío y se lisaron inmediatamente con tampón de lisis frío (50 mmoles/L de Tris-HCl (pH 8,0), 150 mmoles/L de NaCl, glicerol al 10%, NP40 al 1%, SDS al 0,1%, desoxicolato de sodio al 0,5%, 1 mmol/L de EDTA, 50 mmoles/L de NaF, 1 mmol/L de pirofosfato de sodio, 1 mmol/L de ortovanadato de sodio, 2 mmoles/L de fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 10 µg/mL de aprotinina, 5 µg/mL de leupeptina, 5 µg/mL de pepstatina). Los productos lisados se centrifugaron, se transfirieron a placas recubiertas con estreptavidina de 96 pocillos (Pierce) que contenían anti-EGFR humano monoclonal de ratón conjugado con biotina, (2 µg/mL; Research Diagnostics), y se incubaron durante 2 h. Las placas se lavaron tres veces con TBST (25 mmoles/L de Tris, 150 mmoles/L de NaCl (pH 7,2), albúmina de suero bovino al 0,1%, y Tween 20 al 0,05%) y se incubaron con anticuerpo anti-fosfotirosina conjugado con peroxidasa de rábano picante (1:10.000; Zymed Laboratories). La actividad de la peroxidasa de rábano picante se determinó mediante la lectura de las placas en un lector de placas Victor2 después de la adición del sustrato ELISA Fento (Pierce). Los valores de CI₅₀ se determinaron basándose en la fosforilación de la tirosina EGFR total con el tratamiento XL-647 frente a la fosforilación de la tirosina EGFR total con el tratamiento de factor de crecimiento solo, normalizado a los niveles del receptor.

Se midió el efecto de XL-647 sobre EGFR de tipo salvaje y mutado *in vivo*, usando células Lx-1 transfectadas transitoriamente. Se utilizaron células Lx-1 porque carecen de actividad EGFR de fondo. Se utilizó un clon correspondiente a la isoforma más larga de EGFR (Núm. de acceso GenBank NM_005228.3/NP_005219.2 núm. 21-176, Upstate Biotechnology) como un molde para producir dos genes EGFR mutantes (que codifican L858R y L861Q) mediante mutagénesis dirigida al sitio. El tipo salvaje y los dos mutantes de secuencia verificada se transfirieron a un vector de expresión de mamífero dirigido por un promotor de citomegalovirus retroviral etiquetado con Flag en COOH terminal. Los dos vectores de expresión Tet-On, EGFR WT (Tet-On) y EGFRVIII (Tet-On), que estaban etiquetados con Flag en COOH terminal, fueron proporcionados generosamente por el Dr. Abhijit Guha (Universidad de Toronto, Toronto, Ontario, Canadá).

Las transfecciones transitorias de células Lx-1 se realizaron utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para las transfecciones de los constructos WT, L858R, y L861 Q, se utilizó 1 µg de ADN plasmídico para cada transfección (cada pocillo de una placa de 12 pocillos). Para las transfecciones de los constructos WT y variante III de EGFR controlados por Tet, se combinaron 0,5 µg de cualquier constructo con 0,5 µg del plásmido pTet-On (BD Biosciences) para cada transfección. Las células se cosecharon 24 h después de la transfección y se volvieron a cultivar en placa, ya sea en placas de 96 pocillos (4×10^4 células por pocillo) para los tratamientos de compuestos ya sea en placas de 12 pocillos (2×10^5 células) para los análisis de inmunotransferencia. La expresión del transgén EGFRVIII se indujo 24 h después de la transfección mediante la adición de 1 µg/ml de doxiciclina al medio. Estas células se mantuvieron en presencia de doxiciclina durante el resto del experimento. Después de 12 h de incubación; las células fueron privadas de suero (en medio libre de suero bovino fetal) y se trataron inmediatamente con los compuestos indicados por triplicado durante 24 h seguido de un tratamiento de 10 min con EGF humano recombinante (100 ng/mL). Los productos lisados de células completas se elaboraron mediante la adición de 125 µL de tampón de análisis de radioinmunoprecipitación (Boston Bioproducts) que contenía inhibidores de proteasa (Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) además de 50 mmoles/L de NaF, 1 mmol/L de pirofosfato de sodio, 1 mmol/L de ortovanadato de sodio, 2 mmoles/L de fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 10 µg/mL de aprotinina, y 5 µg/mL de leupeptina a cada pocillo, ya sea para el ELISA de fosforilación de EGFR o para la inmunotransferencia.

Para el ELISA de fosforilación de EGFR, las placas recubiertas con estreptavidina Reacti-Bind (Pierce) se recubrieron con 2 µg/mL de anticuerpo anti-Flag conjugado con biotina (Sigma). Los productos lisados de células completas (10 µg) se añadieron a continuación a los pocillos recubiertos con anti-Flag en un volumen final de 100 µL durante 2 h a la temperatura ambiente y después se lavaron tres veces con TBST. Se utilizó anticuerpo secundario anti-fosfotirosina acoplado a peroxidasa de rábano picante (1:10.000; Zymed) para detectar el EGFR fosforilado

(pEGFR; 1 h a temperatura ambiente seguido de tres lavados con TBST). La actividad de la peroxidasa de rábano picante se determinó mediante la lectura de las placas en un lector de placas Victor2 después de la adición del sustrato Femto de ELISA.

Tabla 12: Inhibición de la fosforilación de EGFR WT y mutante por XL-647 en células A431 y LX-1.

EGFR	CI50 (nmoles/L)
WT (A431)	1
WT (pCMV/LX-1)	12
L858R (pCMV/LX-1)	5
L861Q (pCMV/LX-1)	10
WT (pTet-On/LX-1)	5
Variante III (pTet-On/LX-1)	74

5 El ELISA de autofosforilación de EphB4 utilizó células EphB4/Hep3B. Las células se sembraron a 2×10^4 células/pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos (Costar 3904), en MEME (Cellgro) que contenía FBS al 10% (inactivado por calor, Hyclone), penicilina-estreptomocina al 1% (Cellgro) y 450 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418 (Invitrogen). Las células fueron incubadas a continuación a 37°C , CO_2 al 5% durante 24 h. El medio de crecimiento se reemplazó por MEME libre de suero y las células se incubaron durante 16 h más. Se añadió una dilución seriada de XL-647 en medio libre de suero de nueva aportación a las células en modo inactivo y se incubó durante 1 h antes de la estimulación durante 30 min con una mezcla de proteína quimérica Efrina B2/Fc de ratón recombinante (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, R & D Systems) y anti IgG/Fc humano de cabra (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Pierce). Los pocillos de control negativos no se trataron con factor de crecimiento. Después del tratamiento, el medio se retiró, la monocapa de células se lavó con PBS frío y se lisó inmediatamente con tampón de lisis frío (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 200 mM, NP-40 al 0,5%, desoxicolato de sodio al 0,2%, EDTA 1 mM, NaF 50 mM, pirofosfato de sodio 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 2 mM, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de aprotinina, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de leupeptina y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de pepstatina A). Los productos lisados se centrifugaron y se incubaron en placas de 96 pocillos de alta unión (BSA al 1%) bloqueadas (Costar 3925) recubiertas con anti-EphB4 de ratón (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, R & D Systems). Las placas se incubaron a continuación con el cóctel anti-fosfotirosina conjugado con HRP (1:10.000, Zymed Laboratories, Inc) seguido por la adición de una disolución de sustrato a base de luminol. Las placas se leyeron usando un espectrofotómetro Victor (Wallac). Los valores de CI_{50} se determinaron basándose en la fosforilación de la tirosina receptora EphB4 total con el tratamiento con XL-647 versus la fosforilación de tirosina receptora EphB4 total con el tratamiento de factor de crecimiento solo.

25 El ELISA de autofosforilación de EphA2 utilizó células PC-3 (ATCC). Las células se sembraron a $2,5 \times 10^4$ células/pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos (Costar 3904), en DMEM (Cellgro) que contenía FBS al 10% (inactivado por calor, Hyclone), penicilina-estreptomocina al 1% (Cellgro), y solución de NEAA al 1% (Cellgro). Las células se incubaron a continuación a 37°C , CO_2 al 5% durante 16 h. El medio de crecimiento se reemplazó por DMEM libre de suero y las células se incubaron durante 24 horas más. Se añadió una dilución seriada de XL-647 en medio libre de suero de nueva aportación a las células quiescentes y se incubó durante 1 h antes de la estimulación durante 20 min con una mezcla de proteína quimérica Efrina A1/Fc recombinante de ratón (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, R & D Systems) y anti-IgG humana/Fc de cabra (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Pierce). Los pocillos de control negativos no se trataron con factor de crecimiento. Después del tratamiento, el medio se retiró, la monocapa de células se lavó con PBS frío e inmediatamente se lisó con tampón de lisis frío. Los productos lisados se centrifugaron y se incubaron en placas recubiertas con estreptavidina de 96 pocillos (Pierce) recubiertas con anti-fosfotirosina de ratón conjugado con biotina, PY20 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Calbiochem). Las placas se incubaron con anticuerpo policlonal de conejo anti-EphA2, C-20 (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Inc), seguido de anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo de cabra conjugado con HRP, 1:1000 de Cell Signalling) y la adición de una disolución de sustrato basada en luminol. Las placas se leyeron con un espectrofotómetro Victor (Wallac). Los valores de CI_{50} se determinaron basándose en la fosforilación de tirosina receptora EphA2 total con el tratamiento de XL-647 versus fosforilación de tirosina receptora EphA2 total con el tratamiento de factor de crecimiento solo.

40 El ELISA de autofosforilación de c-Kit utilizó células HeLa (ATCC). Las células se sembraron a 6×10^5 células/pocillo en placas de 100 mm. Veinticuatro horas después, las células HeLa fueron transfectadas con un plásmido de expresión de mamífero que contenía un promotor de CMV unido operativamente al marco de lectura abierto de c-kit humano con una etiqueta epitópica Flag en el extremo C-terminal. Veinticuatro horas después, las células HeLa transfectadas con c-Kit se tripsinizaron y se volvieron a sembrar a 6×10^3 células/pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos (Costar 3904), en DMEM (Cellgro) que contenía FBS al 10% (inactivado con calor, Hyclone), penicilina-estreptomocina al 1% (Cellgro), y disolución de NEAA al 1% (Cellgro). Las células se incubaron a 37°C , CO_2 al 5% durante 24 horas. Se añadieron diluciones seriadas de XL-647 en medio libre de suero de nueva aportación a las células y se incubaron durante 1 hr antes de la estimulación con SCF humano recombinante (100 ng/ml, R & D Systems) durante 10 min. Los pocillos de control negativos se dejaron sin estimular. Después de la estimulación, el medio se retiró, la monocapa de células se lavó con PBS frío y se lisó inmediatamente con tampón

de lisis frío. Los productos lisados se incubaron en placas de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina (Pierce) recubiertas con anti-c-Kit humano de cabra conjugado con biotina (1 µg/ml, R & D Systems). Las placas se lavaron 3 veces con TBST y se incubaron con anti-fosfotirosina conjugado con HRP (1:10.000, Zymed Laboratories, Inc) o anti-Flag conjugado con HRP (M2) (1:2000, Sigma). Las placas se lavaron de nuevo como se ha descrito anteriormente seguido de la adición de una disolución de sustrato basada en luminol y se leyeron con un espectrofotómetro Victor (Wallac). Los valores de CI₅₀ se determinaron basándose en la fosforilación de tirosina c-Kit con el tratamiento de XL-647 versus fosforilación de tirosina c-Kit con el tratamiento de SCF solo, después de la normalización.

El ELISA de autofosforilación de Flt-4 utilizó células COS. Las células se sembraron a 200.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos en DMEM con FBS al 10% y se cultivaron con CO₂ al 5% y 37°C. Después de 24 h de crecimiento, las células se transfectaron con 1 µg/pocillo de ADNc de Flt-4, utilizando 3 µl de FuGENE 6 (Roche). Las células se trataron 24 horas después de la transfección con XL-647 en DMEM libre de suero, de nueva aportación durante 1 hora, después se estimularon con 300 ng/ml de VEGF-C durante 10 min. La monocapa de células se lavó dos veces con PBS frío y se cosechó por raspado en 150 µl de tampón de lisis enfriado con hielo. Los productos lisados celulares se centrifugaron a 13.000 g durante 15 min, se diluyeron 1:10 en PBS enfriado con hielo, y se transfirieron a placas de estreptavidina claras (Pierce) recubiertas con IgG de cabra biotinilada anti-VEGF-C humano (Flt-4) (2 µg/pocillo, R & D Biosciences). Después del lavado, se utilizó IgG-HRP de ratón anti-Flag M2 (Sigma dilución 1 a 10000) o IgG-HRP de conejo anti-fosfotirosina (Zymed, 61-5820, 1:10.000) para detectar Flt-4 total y Flt-4 fosforilado. Las muestras se normalizaron y se determinaron los valores de CI₅₀ mediante la comparación de la fosforilación de tirosina Flt-4 con el tratamiento de XL-647 versus la fosforilación de tirosina Flt-4 con el tratamiento de VEGF-C solo.

El ELISA de autofosforilación de ErbB2 utilizó células BT474 (ATCC). Las células se sembraron a 3 x 10⁴ células/pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos (Costar 3904), en (DMEM:F12K) 1:1 (Cellgro) que contenía FBS al 10% (inactivado por calor, Hyclone), penicilina-estreptomicina al 1% (Cellgro), disolución de NEAA al 1% (Cellgro), y L-glutamina al 2% (Cellgro). Las células se incubaron después a 37°C, CO₂ al 5% durante 40 h. Las células se trataron con una dilución seriada de XL-647 en medio libre de suero de nueva aportación y se incubaron durante 1 hr. Después del tratamiento, el medio se retiró, la monocapa celular se lavó con PBS frío y se lisó inmediatamente con tampón de lisis frío. Los productos lisados se centrifugaron y se transfirieron placas de unión elevada de 96 pocillos (Costar 3925) bloqueadas (BSA al 1%) recubiertas con anticuerpo policlonal de conejo anti-ErbB2 (1,3 µg/ml, Cell Signaling Technology). Las placas se incubaron a continuación con cóctel anti-fosfotirosina conjugado con HRP (1:10.000, Zymed Laboratories, Inc), seguido de la adición de una disolución de sustrato basada en luminol. Las placas se leyeron con un espectrofotómetro Victor (Wallac). Los valores de CI₅₀ se determinaron basándose en la fosforilación de la tirosina ErbB2 total con tratamiento con compuesto versus fosforilación de la tirosina ErbB2 total sin ningún tratamiento con compuesto.

Tabla 13: Inhibición de la autofosforilación por XL-647

Tirosina Quinasa	CI ₅₀ celular (nM)
EGFR	1
EphB4	3
KDR	137
c-Kit	90
Flt-4	90
ErbB2	552
EphA2	1100
PDGFRβ	> 1200

Ejemplo 5

Análisis por inmunotransferencia

Los productos lisados de células H1975 tratadas con XL-647 se analizaron por inmunotransferencia. Para los estudios de inmunotransferencia de H1975 se cultivaron en placa 3 x 10⁵ células en cada pocillo (placa de 12 pocillos) y se incubaron durante 16 h en RPMI 1640 completo, se enjuagaron con RPMI 1640 libre de suero bovino fetal, y se incubaron con diluciones seriadas de compuestos de ensayo en medio libre de suero bovino fetal durante 2 h seguido de la estimulación con 100 ng/mL de EGF humano recombinante durante 10 min. Los productos lisados de proteínas celulares completos se prepararon como se ha descrito anteriormente y se centrifugaron durante 10 min a 13.000 x g a 4°C para eliminar cualquier material insoluble. La proteína total se determinó usando el reactivo ácido bicinónico y una cantidad igual de proteína se combinó con tampón de carga LDS (Invitrogen) de acuerdo

con las instrucciones del fabricante. Las proteínas se separaron por electroforesis en gel con geles de poliacrilamida de 4% a 15%, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, y se detectaron por inmunotransferencia. Se detectaron complejos de anticuerpo:antígeno por medio de quimioluminiscencia. Se utilizaron los siguientes anticuerpos de Cell Signaling Technology a una dilución 1:1000: anti-EGFR, anti-pEGFR^{Tyr1068}, anti-AKT, anti-pAKT^{Ser473}, anti-ERK, y anti-pERK^{Thr202/Tyr204}. El anticuerpo primario anti-β-actina (Accurate Chemical y Scientific) se utilizó a 1:10.000 y los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano picante se adquirieron de Jackson ImmunoResearch y se utilizaron a 1:5000.

La inmunotransferencia demostró que XL-647 inhibe la fosforilación de EGFR a 30 y 10 μmoles/L, y también inhibe la fosforilación de AKT y ERK, que se encuentran aguas abajo de la fosforilación de EGFR. Se puede encontrar un ejemplo de una inmunotransferencia en Gendreau SB, Ventura R, Keast P, et al., Inhibition of the T790M Gatekeeper Mutant of the Epidermal Growth Factor by EXEL-7647, Clin Cancer Res 3713, 13(12) (2007), que se incorpora a la presente como referencia.

Ejemplo 6

Modelo de xenoinjerto A431

Se adquirieron ratones inmunodeficientes hembra graves y ratones carentes de sistema inmunitario atímicos hembra combinados (NCr), de 5 a 8 semanas de edad y un peso de ~ 20 a 25 g, del Jackson Laboratory and Taconic, respectivamente. Los animales fueron alojados en las instalaciones del terrario Exelixis de acuerdo con las directrices señaladas por el Exelixis Institutional Animal Care and Use Committee. Durante todos los estudios, se proporcionaron a los animales alimentos y agua ad libitum y se los alojó en una habitación acondicionada de 21,1°C a 23,8°C y una humedad relativa del 60%.

Antes del tratamiento, se cosecharon células H1975, A431, o MDA-MB-231 a partir de cultivos de crecimiento exponencial, se desprendieron mediante un breve tratamiento con tripsina, se lavaron dos veces en HBSS frío, se resuspendieron en HBSS enfriado con hielo, y se implantaron s.c. (H1975, 3 x 10⁶ células por ratón) o i.d. (A431, 1 x 10⁶ células por ratón) en el flanco trasero dorsal o s.c. en la almohadilla adiposa mamaria (MDA-MB-231, 1 x 10⁶ células por ratón). Los tumores palpables se midieron mediante un calibre dos veces por semana hasta que el peso medio del tumor estuvo en el intervalo de ~80 a 120 mg. El peso del tumor se determinó midiendo los diámetros perpendiculares con un calibre y multiplicando las mediciones de los diámetros en dos dimensiones: volumen del tumor (mm³)/2 = longitud (mm) x ancho² (mm²)/2. El peso del tumor (mg) se extrapoló a partir del volumen del tumor (mm³) suponiendo un factor de conversión de 1. En el día apropiado después de la implantación, los ratones se agruparon (10 ratones por grupo) de modo que el peso medio del tumor en el grupo fuera de ~100 ± 15 mg. El peso medio del tumor de cada animal en los respectivos grupos de control y tratamiento se determinó dos veces por semana durante los periodos de dosificación. Se establecieron xenoinjertos de tumores en ratones hembra y se dejó que alcanzaran aproximadamente 100 mg antes del tratamiento. Se describe un ejemplo en Gendreau SB, Ventura R, Keast P, et al., Inhibition of the T790M Gatekeeper Mutant of the Epidermal Growth Factor Receptor by EXEL-7647, Clin Cancer Res 3713, 13(12) (2007), que se incorpora a la presente como referencia.

La respuesta de los tumores al tratamiento se determinó comparando el peso medio del tumor del grupo de tratamiento con el grupo de control apropiado. El porcentaje de inhibición del crecimiento del tumor se determinó con la siguiente fórmula: Porcentaje de inhibición = 100 x [1 - (X_f - X₀)/(Y_f - Y₀)], donde X_f y Y_f son los pesos medios de los tumores de los grupos de tratamiento y de control, respectivamente, en el día f, y X₀ e Y₀ son los pesos medios de los tumores de los grupos de tratamiento y de control, respectivamente, el día cero (pesos de los tumores representados después del agrupamiento).

Para la determinación de los niveles de compuestos en plasma después de la administración oral de XL-647, se colocó sangre completa en tubos Eppendorf heparinizados sobre hielo y se centrifugó a 20.000 xg durante 4 min. El sobrenadante de plasma (50 μL) se añadió a 100 μL de disolución patrón interna (250 ng/mL de patrón interno en acetonitrilo), se mezcló mediante agitación con vórtex y se centrifugó. El extracto de la muestra (20 μL) se analizó para el análisis de XL-647 por LC/MS/MS. Los niveles en plasma se calcularon utilizando una curva patrón auténtica. El límite de cuantificación fue de 0,004 μmoles/L (2 ng/mL) para XL-647. Se calcularon los valores medios y la DT para cada punto temporal y se evaluó la concentración de la dosis.

Para el análisis inmunohistoquímico de H1975, MDA-MB-231 y otros xenoinjertos, se extirparon los tumores después de la eutanasia y se fijaron en fijador de zinc (BD Biosciences) durante 48 h antes de ser procesados en bloques de parafina. Se obtuvieron secciones seriadas a 5 μm a partir del área de superficie más grande posible para cada tumor y se tiñeron utilizando métodos convencionales. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: Ki67 (SP6; Labvision), CD31 (MECA.32; BD Biosciences), pERK^{Thr202/Tyr204} (proteína quinasa activada con mitógeno fosfo-p44/42; Cell Signalling Technology), pAKT^{Ser473} (Cell Signaling Technology), y pEGFR^{Tyr1068} (Cell Signaling Technology). Para la tinción de inmunofluorescencia, las secciones se incubaron a continuación con anticuerpo secundario anti-conejo de cabra conjugado con Alexa 594 (Invitrogen) y se montaron en Fluorescent Mounting Medium (DAKO) que contenía 4',6-diamidino-2-fenilindol (Molecular Probes) como contratinción nuclear. La tinción fluorescente se visualizó utilizando un Zeiss AxioImager y se capturó digitalmente utilizando una cámara Zeiss de alta resolución acoplada a un soporte lógico de análisis de imágenes AxioVision. Se capturaron de dos a tres

campos representativos no superpuestos a un aumento x200 o x400 en función de lectura histológica y se cuantificaron utilizando las funciones de análisis morfométrico integrado en el soporte lógico Metamorph (Universal Imaging Corp.). Las células apoptóticas se detectaron utilizando el kit de detección de muerte celular in situ por marcaje de extremos con muescas con dUTP mediado por desoxinucleotidil-transferasa terminal de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics GmbH).

Se identificaron los vasos de tumores positivos para CD31, las células en proliferación positivas para Ki67 y la tinción de Perk en cada sección del tumor y se cuantificaron utilizando las funciones de análisis morfométricos integrados en el sistema automático de formación de imágenes celulares ACIS (Clariant, Inc.) y fueron revisados por un observador ciego. Se identificó el número de vasos positivos para CD31 a través de 5 a 10 campos elegidos al azar de igual tamaño a un aumento de 100 x en el tejido tumoral viable y se calculó como el número de vasos por milímetro cuadrado para cada tumor, se promedió para cada grupo de tratamiento, y se comparó con controles tratados con vehículo. Se calculó el porcentaje de células positivas para Ki67 como la razón entre las células positivas para Ki67 divididas por el número total de células identificadas a través de 5 a 10 campos elegidos al azar de igual tamaño en el tejido tumoral viable. Los resultados para cada grupo de tumor y tratamiento se promediaron y se compararon con los controles tratados con vehículo. Se determinó el nivel de tinción de pERK como se ha descrito anteriormente y se calculó como la razón de tinción de anticuerpo dividida por el número total de células identificadas, se promedió para cada grupo de tratamiento, y se comparó con los controles tratados con vehículo.

Los resultados se presentan como la media \pm DT o ET según se indica para cada gráfico o tabla. Para la comparación de las CI_{50} en el experimento de viabilidad celular de A431, se aplicaron pruebas t de Student de dos muestras para determinar los valores de P para cada par de CI_{50} suponiendo que las fluctuaciones aleatorias de las réplicas en torno la curva de dosis-respuesta se distribuyen [log] normalmente con las réplicas individuales utilizadas como "tamaño de la muestra" para la prueba t (respuesta a la dosis de nueve puntos realizada por triplicado). Para el análisis estadístico de los resultados inmunohistoquímicos de los estudios in vivo, se realizaron análisis de la prueba t de Student de dos colas y la corrección de Bonferroni para identificar las diferencias significativas en comparación con el grupo de control con vehículo (uso múltiple de un solo grupo de control con vehículo) con un requisito mínimo acumulativo de $P < 0,05$. Se analizaron las mediciones del peso tumoral final al término del estudio de eficacia de H1975 y el porcentaje de pEGFR, pAKT, índice de Ki67, CD31 y marcaje de extremos con muescas con dUTP mediado por desoxinucleotidil-transferasa terminal en xenoinjertos H1975 con ANOVA de una vía seguido de análisis de Student-Newman post hoc para la determinación de las diferencias estadísticas entre XL-647 y erlotinib.

En los ratones con xenoinjerto A431, la administración oral una vez al día de XL-647 (10, 30, y 100 mg/kg/día) durante 14 días inhibió el crecimiento del tumor significativamente de una manera dependiente de la dosis. A 10 mg/kg/día, se observó una inhibición del crecimiento tumoral de 65%, con la evidencia de cese del crecimiento del tumor hacia el final del estudio. Una dosis de 100 mg/kg/día dio como resultado una marcada regresión de los tumores (peso inicial: 109 \pm 20 mg; peso final: 36 \pm 15 mg).

El análisis inmunohistoquímico demostró que el tratamiento de tumores A431 desarrollados subcutáneamente en ratones carentes de sistema inmunitario atímicos hembra con XL-647 a 100 mg/kg una vez al día x 14 aumentó significativamente el porcentaje de necrosis tumoral total en 2,9 veces en comparación con los tumores tratados con vehículo (Tabla 14). El porcentaje de vasos positivos para CD31 en el tejido tumoral viable se redujo significativamente por medio del tratamiento con XL-647 en 10, 30, y 100 mg/kg. Esta inhibición de la angiogénesis tumoral demostró una dependencia de la dosis. El porcentaje de células que expresaban Ki67 en los tumores A431 se redujo significativamente a todos los niveles de dosificación, lo que indica una reducción en el número de células en proliferación en el tumor al final del estudio.

Tabla 14: Resumen de los análisis inmunohistoquímicos de A431 durante 14 días de dosificación

Dosis (mg/kg)	Necrosis		Analitos CD31		Expresión Kf67	
	% Aumento	Multiplicidad del Aumento	MVC	% Reducción	% de células	% Reducción
Vehículo	21,2 \pm 8,6	N/A	27,9 \pm 7,1	N/A	37,6 \pm 4,9	N/A
10	20,7 \pm 6,4	1,0	18,6 \pm 9	33,5	17,6 \pm 4,9	53,3
30	26,5 \pm 18,6	1,3	15,9 \pm 5,5	43,2	12,3 \pm 5,5	67,2
100	61,7 \pm 10,4	2,9	3,6 \pm 2,9	87,3	6,5 \pm 2	82,6

MVC, recuento de vasos medio; NA, no aplicable.

Los valores son la media \pm DT.

El Día 14 de la dosificación, se recogió sangre completa por punción cardiaca terminal y se determinó el perfil de concentración en plasma de XL-647 por medio de cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC/MS/MS). XL-647 mostró un perfil PK de la exposición prolongada al fármaco en plasma con concentraciones plasmáticas

micromolares observadas hasta 24 horas después de la administración de la última dosis del estudio a las dosis de 30 y 100 mg/kg.

Ejemplo 7

Modelos de xenoinjertos oncológicos adicionales

5 Se utilizaron varios modelos adicionales para explorar la eficacia y la potencia de XL-647 con respecto a la inhibición del crecimiento del tumor y a la regresión del tumor in vivo. Las líneas de células tumorales utilizadas son representativas de tumores sólidos y se enumeran en la Tabla 15. El diseño experimental convencional para estos estudios, como se ha descrito con detalle anteriormente, implicó la administración oral una vez al día de L-647, comenzando cuando los tumores sólidos establecidos alcanzaron una masa designada (aproximadamente 100 mg para la mayoría de los modelos de xenoinjerto). A lo largo de todo el periodo de dosificación, el tamaño del tumor se midió dos veces por semana (cuando fue aplicable), y el peso corporal se midió diariamente. XL-647 exhibió una potente actividad antitumoral en estos estudios, observándose una regresión sustancial para los tumores sólidos. Los tumores se extirparon al terminar algunos estudios y se examinaron histológicamente para determinar la densidad microvascular (tinción CD31), la proliferación de células (tinción Ki67), y la necrosis (tinción con hematoxilina/eosina). La inhibición del crecimiento del tumor se correspondía generalmente con el aumento de necrosis tumoral, la disminución de la vascularización del tumor, y la disminución del índice de proliferación tumoral, lo que sugiere que la actividad anti-angiogénica contribuyó a la potente eficacia antitumoral de XL-647.

La tolerabilidad se controló en estos estudios por medio de la medición diaria del peso corporal. XL-647 parecía ser bien tolerado generalmente en ratones sin pérdida sustancial de peso corporal en la dosificación durante 14 días a 100 mg/kg/día.

De las líneas examinadas, A431 y HN5 fueron las más sensibles, con dosis eficaces de XL-647 que dieron como resultado una inhibición del crecimiento del tumor de 50% (DE₅₀) estimado a 5,9 mg/kg/día y 3,8 mg/kg/día después de 14 o 28 días de dosificación para el modelo de A431, respectivamente, y menos de 3 mg/kg/día después de 14 días de dosificación para el modelo de HN5 (resumido en la Tabla 15).

25 Tabla 15: Valores de DE₅₀ para XL-647 en xenoinjertos de tumor humano

Xenoinjerto de tumor humano ^a	Tejido de origen	DE ₅₀ (mg/kg) ^a	
		Una vez al día × 14	Una vez al día × 28
MDA-MB-231	Mama	21,9	22,9
BT474	Mama	9,8	21,9
HT-29	Colon	20,2	16,0
A431	Epidermis	5,9	3,8
Calu-6	Pulmón	ND	16,4
PC-3	Próstata	ND	34,0
H1975	Pulmón	17	ND
HN5	Cabeza y cuello	<3	ND

A431, carcinoma epidermoide; BT474, carcinoma de mama; Calu-6, CPCNP; H1975, CPCNP que contiene tanto una mutación activadora en EGFR (L858R) como una mutación supresora intragénica (T790M) que confieren resistencia a gefitinib y erlotinib (Pao et al 2005.); HN5, carcinoma de cabeza y cuello, HT-29, carcinoma de colon, MDA-MD-231, carcinoma de mama; ND, no realizado; PC-3, carcinoma de próstata, qd una vez al día.

^a DE₅₀= Dosis requerida para una inhibición del tumor de 50%, los ratones atímicos portadores de tumores se trataron con XL647 durante 14 o 28 días

Tabla 16: Resumen de los análisis inmunohistoquímicos de H1975 durante 14 días de dosificación.

Dosis (mg/kg)	TUNEL		Análisis CD31		Expresión KI67	
	% de Células	Multiplicidad de aumento	MVC	% Reducción	% de Células	% Reducción
Control con vehículo	1 ± 0,2	N/A	62 ± 8	N/A	35 ± 3	N/A
10	6 ± 0,8	7,1 ^a	44 ± 10	30,0 ^b	27 ± 4	23,2 ^b
30	11 ± 1,4	11.9 ^a	34 ± 9	46-1 ^a	20 ± 5	41,9 ^a

Dosis (mg/kg)	TUNEL		Análisis CD31		Expresión KI67	
	% de Células	Multiplicidad de aumento	MVC	% Reducción	% de Células	% Reducción
100	15 ± 1,8	16.5 ^a	19 ± 11	69,6 ^a	8,9 ± 2	74,6 ^a

MVC, significa recuento de vasos. N/A, no aplicable; TUNEL, marcaje de extremos con muescas con dUTP-biotina mediado por desoxinucleotidil-transferasa terminal

Los valores son la media ± DT.

^a $P < 0,0001$.

^b $P < 0,005$.

Tabla 17: Resumen de los análisis inmunohistoquímicos de H1957 de fosforilación durante 14 días de dosificación.

Dosis (mg/kg)	Fosfo EGFR ^{Tyr1068}		Fosfo-ERK ^{Thr303/Tyr304}		Fosfo-AKT ^{Ser473}	
	% de Células	% Reducción	% de Células	% Reducción	% de Células	% Reducción
Control con vehículo	27 ± 1,8	N/A	23 ± 2,6	N/A	42 ± 2,0	N/A
10	14 ± 1,9	49.0 ^a	20 ± 4,3	11.8	19 ± 2,1	53.6 ^a
30	12 ± 1,3	56.1 ^a	13 ± 4,9	41.8 ^a	12 ± 1,9	72.4 ^a
100	10 ± 1,8	63.7 ^a	10 ± 3,7	57.1 ^a	11 ± 1,9	74.4 ^a

N/A. no aplicable

Los valores son la media ± DT.

^a $P < 0,0001$.

El efecto in vivo de XL-647 sobre la actividad de las tirosina quinasas receptoras (RTK) diana (EGFR, HER2/ErbB2, VEGFR2/KDR) se evaluó mediante la medición de los niveles de fosforilación de los receptores en xenoinjertos tumorales (EGFR, HER2/ErbB2) o pulmón murino (VEGFR2/KDR) después de la administración oral (PO) de XL-647 (Tabla 18), utilizando métodos similares a los descritos anteriormente.

5

Tabla 18: Resumen de la inhibición de la fosforilación por XL-647 en pulmón y modelos de xenoinjerto

	HER2/ErbB2			
	p-Y-EGFR	Fosfo	Total	p-Y-VEGFR2/KDR
<u>Cl₅₀ estimada</u> (Concentración en plasma)	0,72 µM	3,6 µM	<6,4 µM	1,2 µM
<u>Dosis única</u> Duración de la acción (100 mg/kg, inhibición > 50%)	> 72 h	> 72 h	> 96 h	ND

Cl₅₀, Concentración requerida para una inhibición de 50%; ND. no determinado: fosfo = nivel de fosforilación.

El análisis de p-Y-EGFR, PY-HER2/ErbB2 (y HER2/ErbB2 total) y PY-VEGFR2/KDR se realizó en xenoinjertos de A431 y BT474 y en pulmón murino, respectivamente.

Los datos de estos experimentos farmacodinámicos demuestran que, in vivo, XL-647 inhibe las RTK clave implicadas en la promoción de la proliferación tumoral y la angiogénesis, y también implicadas en la EPR (EGFR, HER2/ErbB2, VEGFR2/KDR). Esto proporciona apoyo a la hipótesis de que la eficacia de XL-647 contra los xenoinjertos múltiples es el resultado de la inhibición de la división de las células tumorales y de las respuestas de las células endoteliales del anfitrión. En general hubo una buena correlación entre los aumentos en las concentraciones plasmáticas del fármaco y el aumento de la inhibición de la fosforilación del receptor a las dosis sometidas a ensayo. Las dosis individuales de 100 mg/kg de XL-647 produjeron la inhibición prolongada de la fosforilación del receptor (> 72 horas).

10

Una comparación de la exposición de plasma y la farmacodinámica para la inhibición de EGFR mostró dependencia de la dosis. Una concentración plasmática 4 µM dio como resultado una inhibición de 89% de la fosforilación de EGFR en xenoinjertos de A431 (Tabla 19). Basándose en la relación de concentración plasmática/inhibición de

15

EGFR fosforilado, se pronostica que se producirá una inhibición de 50% de la fosforilación de EGFR a una concentración en plasma de 0,72 μ M.

Tabla 19: Concentración en plasma de XL-647 Versus inhibición de EGFR

Dosis (mg/kg)	Concentración en plasma (μ M) Media (DT)	Inhibición de p-Y-EGFR
Vehículo	-	0,0
3	0,42 (0,08)	41,0
10	1,49 (0,35)	70,0
30	4,01 (1,06)	89,0
100	6,50 (1,39)	93,0
CI 50 In Vivo	0,72	50

EGFR. Receptor del factor de crecimiento epidérmico; CI₅₀, concentración requerida para una inhibición de 30%; DT, desviación típica. XL647 se administró 3,5 horas antes de la administración de EGF. Los niveles de p-Y-EGFR se midieron 30 minutos después de la administración de EGF

5 La cinética con la que XL-647 afecta a la proliferación tumoral y a la vascularización se determinó usando la inmunohistoquímica cuantitativa y la histología sobre tumores de xenoinjertos MDA-MB-231 seccionados tomados de ratones tratados diariamente con XL-647 durante 3, 5, ó 7 días. La proliferación del tumor se midió por tinción para Ki67, que identifica selectivamente las células en fase S. El grado de vascularización del tumor se midió mediante tinción con el marcador de células endoteliales CD31 (Tabla 20).

Tabla 20: Efecto de XL-647 sobre la proliferación y la vascularidad de las células tumorales MDA-MB-231 In Vivo

Dosis (mg/kg)	Tiempo (días)	KI67	CD31
		(% Reducción) ^a	(% Reducción) ^a
100	3	9,62	76,5
	5	33,8	90,18
	7	48,7	95,7

^a Con respecto al vehículo.

10 A 100 mg/kg XL-647 causó una disminución rápida de la vascularidad, con una inhibición evidente de 76% en 3 días y la pérdida casi completa de las células endoteliales en el tumor en 7 días. Se produjo progresivamente una reducción en el número de células en proliferación durante la duración del experimento, observándose una reducción de 50% el día 7.

15 El rápido inicio y el grado de pérdida de microvasos a partir de estos tumores sugieren fuertemente que XL-647 afecta a la supervivencia de las células endoteliales en la neovascularura, en lugar de inhibir solamente la angiogénesis en curso.

Ejemplo 8

Ejemplos preclínicos - Farmacocinética no clínica

20 La farmacocinética no clínica (PK) de XL-647 se estudió en ratones, ratas, perros y monos. A los animales se les administró una dosis una vez o diariamente durante varios días, como se describe en las Tablas 21 y 22 a continuación. También se puede encontrar un resumen de los resultados en las Tablas 21 y 22 de más abajo. XL-647 se administró como una formulación líquida con disolución salina normal al 100% o como un sólido en una cápsula de gelatina a 10 mg/kg o 30 mg/kg. La exposición sistémica al fármaco (es decir, AUC) pareció aumentar aproximadamente la dosis de manera proporcional a lo largo de intervalos de dosis más bajas en ratas (10-100 mg/kg), monos (2-20 mg/kg), y perros (3-30 mg/kg), pero menos que la dosis proporcional a lo largo de intervalos de dosis más altas en los estudios de dosis únicas (200-2000 mg/kg en ratas, 5-300 mg/kg en monos y 100-1000 mg/kg en perros). Se observó una acumulación mínima (<2 veces) de XL-647 en el plasma con la administración diaria repetida. Los valores de t_{max} medios fueron aproximadamente de 4 a 8 horas, y las vidas medias en plasma variaron desde 9,41 hasta 20,9 horas. No se observaron diferencias aparentes relacionadas con el género en XL-647 PK. Se observaron grandes volúmenes de distribución (es decir, > 18 L/kg después de la administración IV) en todas las especies. XL-647 estuvo biodisponible por vía oral en ratones, ratas y perros. La biodisponibilidad más alta se midió en perros (63% -74%), y fue similar para el comprimido y las formulaciones líquidas.

XL-647 mostró una unión de proteínas moderadamente alta, 91-96%, a las proteínas plasmáticas en plasma de rata, ratón y humano como se determina por ultrafiltración, utilizando métodos convencionales. La diálisis en equilibrio indicó que XL-647 estaba unido a proteínas en 93-97,5% en el plasma humano.

Tabla 21: Farmacocinética de dosis única no clínica de XL-647

Estudio	Especie	GLP	Ruta	Dosis	AUC _{0-t}	C _{max}	t _{1/2}
				(mg/kg)	(ng•h/mL)	(ng/mL)	
XL-647-NC-011	rata	sí	po	200	29470	1001	N/A
				600	41241	1327	N/A
				2000	52961	1687	N/A
XL-647-NC-001	perro	no	po	100	M: 8969	407	10,4
					F: 21174	1103	14,2
				300	M: 7793	936	12,7
					F: 17106	1608	12,1
				1000	M: 27251	3769	13,2
					F: 34211	5088	16,1
XL-647-NC-012	mono	sí	po	50	M: 11119	485	20,5
					F: 11465	611	14,8
				150	M: 14532	737	19,8
					F: 7032	379	20,4
				300	M: 15116	547	20,7
					F: 13078	603	20,9

AUC_{0-t}, área bajo la curva de concentración plasmática-vs-tiempo desde 0 horas hasta el último punto temporal de muestreo; C_{max}, concentración plasmática máxima; F, hembras; GI, gastrointestinal; GLP, Buenas Prácticas de Laboratorio; HCT, hematocrito; HGB, hemoglobina; LOAEL, nivel de efecto adverso observable más bajo; M, machos; DMT, dosis máxima tolerada; NA, no disponible; NOAEL, sin nivel de efecto adverso observable; po, por vía oral; RBC, glóbulos rojos; t_{1/2}, vida media terminal

5

Tabla 22: Farmacocinética no clínica de dosis reiteradas de XL-647

Estudio	Especie	GLP	Ruta	Dosis	AUC ₀₋₂₄	C _{max}	t _{1/2}
					(ng•h/mL)	(ng/mL)	(Horas)
XL-647- NC-006	mono	no	oral	Fase 1, 50 mg/kg dos veces al día × 2, después se terminó debido a la toxicidad	M: 14.508	755	NC
					F: 17449	912	NC
				Fase 1, 100 mg/kg una vez al día × 2, después se terminó debido a la toxicidad	M: 19605	1220	20,7
					F: 27987	2161	11,6
				Fase 1, 300 mg/kg una vez al día × 2, después se terminó debido a la toxicidad	M: 38377	2941	12,1
					F: 21076	1505	14,8

ES 2 545 353 T3

Estudio	Especie	GLP	Ruta	Dosis	AUC ₀₋₂₄	C _{max}	t _{1/2}
				Fase 2, 10 mg/kg una vez al día × 7	M: 3627c	230c	14,7c
					F: 4269	216	14,9
XL-647- NC-013	rata	sí	oral	10 mg/kg una vez al día × 14	2.013	138	11,4
				30 mg/kg una vez al día × 14	5.741	319	20,4
				100 mg/kg una vez al día × 12	18.311	909	NC
XL-647-NC-014	mono	sí	oral	2 mg/kg una vez al día × 14	M: 488	28,4	N/A
					F: 450	38	N/A
				6 mg/kg una vez al día × 14	M: 1855	106	N/A
					F: 1690	116	N/A
				20 mg/kg una vez al día × 7 u 8b, después se terminó debido a la toxicidad observada en los Días 6 y 7	M: 3901	194	N/A
					F: 3912	202	N/A
XL-647- NC-019	rata	sí	oral	1 mg/kg una vez al día × 90	198	12,7	14,4
				3 mg/kg una vez al día × 90	776	50,4	20,4
				10 mg/kg una vez al día × 90	3433	183	16,4
XL-647- NC-022	rata	sí	oral	3 mg/kg una vez al día × 180	N/A	N/A	N/A
		sí		10 mg/kg una vez al día × 180	N/A	N/A	N/A
				30 mg/kg una vez al día × 180	N/A	N/A	N/A
XL-647-NC-021	mono	N/A	NG	0,3 mg/kg una vez al día × 180	N/A	N/A	N/A
				1 mg/kg una vez al día × 180	N/A	N/A	N/A
				3 mg/kg una vez al día × 180	N/A	N/A	N/A
				6 mg/kg una vez al día × 270	N/A	N/A	N/A

Estudio	Especie	GLP	Ruta	Dosis	AUC ₀₋₂₄	C _{max}	t _{1/2}
Razón A/G, razón albúmina con respecto a globulina; ALT, alanina aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa; AUC ₀₋₂₄ , área bajo la curva de concentración del fármaco en plasma versus tiempo de 0 a 24 horas; BUN, nitrógeno ureico en sangre; C _{max} , concentración plasmática máxima; F, hembras; GI, gastrointestinal; GLP, Buenas Prácticas de Laboratorio; HGB, hemoglobina; HCT, hematocrito; M, machos; NA, no disponible; NG nasogástrica; NOAEL, nivel de efecto adverso no observable; po, por vía oral; qd, una vez al día; t _{1/2} , vida media terminal ^a determinado después de la última dosis, referido como una media, y, a menos que se indique lo contrario, aplicable a machos y hembras combinados ^b los valores toxicocinéticos son para el día 7 ^c valores basados en 0-48 horas de muestreo el Día 7.							

Ejemplo 9

Resumen de los estudios clínicos en seres humanos

5 Se suministró XL-647 en forma de comprimidos de color blanco a blanquecino de 50 mg. Estos comprimidos se presentan en dos configuraciones: 1) comprimidos de forma ovalada de color blanco a blanquecino, con un lado biseccionado y el otro lado plano, que contiene 50 mg de XL-647 en una formulación de concentración de fármaco de 33,33%, y 2) comprimidos redondos de color blanco a blanquecino que contienen 50 mg de XL-647 en una formulación de concentración de fármaco de 50%.

10 Las composiciones para ambas formulaciones a base de lactosa, de liberación inmediata se proporcionan en la Tabla 23 y en la Tabla 24, a continuación. Los estudios de disolución comparativos de las dos formulaciones de XL-647 se evaluaron en condiciones relevantes para la biodisponibilidad in vivo y se ha confirmado la comparabilidad de ambas formulaciones. Toda la medicación del estudio se almacenó a temperatura ambiente y se inventarió de acuerdo con las regulaciones estatales y federales aplicables. Si el fármaco del estudio se volvía a empaquetar, se dispensaba en viales de polietileno de alta densidad (HDPE).

Tabla 23: Composición cuantitativa de la unidad de comprimido de XL-647 (Formulación al 33,3%)

Ingrediente	% p/p	mg por comprimido
Sustancia fármaco XL-647	33,33	50,00
Lactosa monohidrato 80, NF	40,00	60,00
Celulosa microcristalina, NF (Avicel PH101)	11,37	17,05
Hipromelosa 2910 (HPMC), USP	5,00	7,50
Crospovidona, NF	5,00	7,50
Lauril sulfato de sodio, NF	4,00	6,00
Dióxido de silicio coloidal (Cab-O-Sil M5P)	0,70	1,05
Estearato de magnesio, NF (Calidad Vegetal)	0,60	0,90
Agua purificada, USP	Eliminada durante la fabricación	Eliminada durante la fabricación
Total	100,00	150,00

15 Tabla 24: Composición cuantitativa de la unidad de comprimido de XL-647 (Formulación al 50%)

Ingrediente	% p/p	mg/comprimido
Sustancia fármaco XL-647	50,00	50,00
Lactosa monohidrato 80, NF	25,70	25,70
Celulosa microcristalina, NF (Avicel PH101)	10,00	10,00
Hipromelosa 2910 (HPMC), USP	3,00	3,00

Ingrediente	% p/p	mg/comprimido
Crospovidona, NF	7,00	7,00
Laurilsulfato de sodio, NF	3,00	3,00
Dióxido de silicio coloidal (Cab-O-Sil M5P)	0,70	0,70
Estearato de magnesio, NF (Calidad Vegetal)	0,60	0,60
Agua purificada, USP	Eliminada durante la fabricación	Eliminada durante la fabricación
Total	100,00	100,00
NF, Formulario Nacional; USP, Farmacopea de Estados Unidos.		

Los estudios en individuos se realizaron de la siguiente manera:

- 5 Estudio de XL-647-001: Se administraron dosis a sujetos con tumores sólidos avanzados (n = 41) en un programa de dosificación intermitente de 14 días (el "programa intermitente 5 y 9"). El día 1-5, los sujetos recibieron XL-647, seguido de 9 días (días 6-14) sin ningún tratamiento. XL-647 se administró en el programa intermitente 5 y 9 a niveles de dosificación que oscilaban de 0,06 a 7,00 mg/kg a 41 sujetos con una variedad de tumores sólidos. La inscripción se completó, y todos los sujetos estuvieron fuera del estudio a 31 de mayo de 2007. Los sujetos recibieron inicialmente una formulación de polvo en una botella (PIB) usando dosificación basada en la masa. Se determinó que la DMT era de 4,68 mg/kg, que se convirtió en una dosis fija de 350 mg. La cohorte final recibió una dosis fija de 350 mg en una formulación en comprimidos.
- 10 Estudio de XL-647-002: Los sujetos con tumores sólidos avanzados se inscribieron en cohortes sucesivas para recibir XL-647 en una única dosis oral diaria. Se trataron un total de 31 sujetos a través de 5 niveles de dosificación que oscilaban de 75 a 350 mg. Se determinó que la DMT era de 300 mg, y se trataron 18 sujetos con este nivel de dosificación.
- 15 Estudio de XL-647-004: Se administró a voluntarios sanos (n = 24) una dosis única de 300 mg de XL-647, tanto en estado de ayuno como alimentado, y después se pasaron al grupo opuesto 22 días más tarde. Se analizó el efecto de alimentos sobre la biodisponibilidad.
- Estudio de XL-647-005: Se administró una única dosis oral de 300 mg de XL-647 marcado (¹⁴C-XL-647) a voluntarios sanos (n = 8), y se evaluaron el metabolismo y la eliminación del fármaco. Se analizaron la absorción, el metabolismo, la excreción y el balance de masas.
- 20 Estudio de XL-647-201: Se inscribieron sujetos con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) (n = 52) con histología de adenocarcinoma, Fase IIIB, con derrame pleural maligno, o Fase IV sin tratamiento previo para la enfermedad metastásica. Los sujetos se seleccionaron por las características clínicas de predicción de la respuesta a los inhibidores de EGFR (asiático, hembra, y/o con un historial de hábito de fumar mínimo y remoto). Se administró XL-647 a 350 mg en el programa intermitente 5 y 9 (n = 41) o a 300 mg en el programa diario (n = 13).
- 25 Estudio de XL-647-203: Se inscribieron sujetos (n = 41) con CPCNP con recaídas o recurrente (Fase IIIB o IV) con enfermedad progresiva documentada después de beneficiarse del tratamiento con un solo agente de tratamiento erlotinib o gefitinib o con una mutación de EGFR T790M conocida. Los sujetos recibieron XL-647 a 300 mg por vía oral una vez al día.
- 30 A partir del 1 de Agosto de 2008, se encuentran disponibles los datos de seguridad clínica para los 159 pacientes con cáncer tratados con XL-647. Los eventos adversos más comunes (EA) que experimentan los sujetos que recibieron un solo agente XL-647 (frecuencia ≥ 10%, en orden decreciente de frecuencia) fueron diarrea, erupción cutánea, fatiga, náuseas, sequedad de la piel, tos, disnea, anorexia, prolongación del QT del electrocardiograma (lectura de la máquina), vómitos, estreñimiento, disgeusia, infección del tracto respiratorio superior, dolor abdominal, dolor de espalda, fiebre, mareos y sequedad de boca. La mayoría de estos EA fueron de grado 1 o grado 2 y no dieron lugar a la interrupción del fármaco del estudio. No se han registrado muertes atribuidas al fármaco del estudio.
- 35 Se ha observado actividad anti-tumoral en los sujetos que recibieron XL-647 tanto en el programa intermitente 5 y 9 como en el programa de administración diaria. En los estudios de Fase 1 utilizando el programa intermitente, un sujeto con CPCNP tuvo una enfermedad estable hasta el Día 228, cuando se obtuvo una respuesta parcial sin confirmar (RP) y otros 14 sujetos (entre ellos tres sujetos con CPCNP) tuvieron una enfermedad estable prolongada (EE) con una duración mayor de 3 meses. En el segundo estudio en Fase 1, XL-647-002, 16 sujetos, incluyendo 3 sujetos con CPCNP, habían logrado una EE con una duración superior a 3 meses. De los 38 sujetos evaluables inscritos en el Estudio en Fase 2 XL-647-201 (primera línea, en los sujetos seleccionados por las características clínicas para enriquecer las mutaciones de EGFR) en el programa intermitente 5 y 9, 10 tuvieron una RP y 17
- 40

5 sujetos experimentaron una EE que duró 3 meses o más para una tasa de beneficio clínico (RP + EE) de 71%. De estos sujetos que lograron un beneficio clínico, seis sujetos cuyos tumores contenían deleciones en el exón 19 de EGFR y un sujeto con una mutación L858R experimentaron una RP, y 2 con mutaciones puntuales L858R tuvieron una EE. En el segundo estudio en Fase 2 en sujetos con CPCNP con recaídas o recurrente (Fase IIIB o IV, n = 41) con una enfermedad progresiva documentada después de beneficiarse de un solo agente, erlotinib o gefitinib, o con una mutación T790M de EGFR conocida, un sujeto logró una RP, y 19 sujetos alcanzaron una EE como mejor respuesta.

10 En un análisis preliminar de los datos de farmacocinética clínica (PK) para los sujetos que recibieron dosis orales de XL-647 en el programa intermitente 5 y 9, el área bajo la curva de tiempo-concentración (AUC) y la concentración máxima de fármaco en plasma (C_{\max}) generalmente aumentaron en proporción a la dosis a lo largo de todo el intervalo de dosificación estudiado (es decir, dosis total de 3,4 a 586 mg). La mediana de la vida media terminal después de 5 dosis consecutivas fue de aproximadamente 60 horas, y pareció generalmente independiente de la dosis. XL-647 se absorbía rápidamente tras la administración oral, con una mediana de t_{\max} de aproximadamente 4 horas. Después de la dosificación oral diaria con 300 mg/día (DMT), XL-647 se acumulaba aproximadamente 4 veces en el plasma, alcanzando un estado de equilibrio aproximadamente el Día 15. La administración una vez al día de 300 mg de XL-647 dio lugar a un aumento de aproximadamente 2 veces en la exposición promedio durante un período de 28 días versus una dosificación Intermitente 5 y 9 con 350 mg.

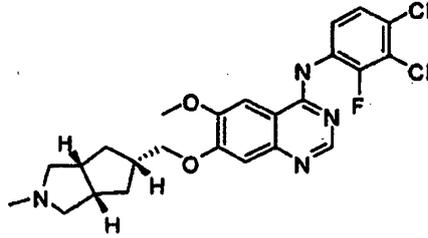
20 Los estudios no clínicos y de perfiles metabólicos in vitro sugieren que XL-647 es un sustrato para el metabolismo mediado por CYP3A4 en microsomas hepáticos humanos. XL-647 era un inhibidor de las isoenzimas CYP2D6 y CYP2C8 in vitro, pero no de CYP3A4 en microsomas hepáticos humanos. XL-647 se encuentra biodisponible por vía oral en múltiples especies y está altamente unido a proteínas (93-99%) en el plasma humano.

25 En un estudio clínico de los efectos de los alimentos (XL-647-004) en sujetos sanos, el AUC aumentó aproximadamente 18% en presencia de alimentos, mientras que C_{\max} sólo aumentó aproximadamente 5%. Por lo tanto, la administración de XL-647 con los alimentos o cuando se combina con fármacos o sustancias que inhiben la actividad de CYP3A4 puede dar lugar a una elevada exposición a XL-647.

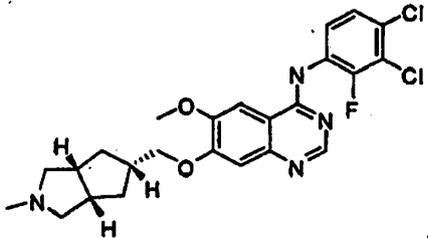
Los datos preliminares de un estudio de balance de masas sugirieron que XL-647 era significativamente metabolizado y excretado principalmente en las heces.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto o composición que comprende un compuesto para su uso en el tratamiento de la enfermedad poliquística del riñón (EPR) en un mamífero en donde el compuesto tiene la fórmula



- 5
- 2. El compuesto o la composición para su uso de la reivindicación 1, en donde el mamífero es un ser humano.
 - 3. El compuesto o la composición para su uso de la reivindicación 1, en donde el mamífero es un felino.
 - 4. El compuesto o la composición para su uso en la reivindicación 3, en donde el felino es un gato persa.
 - 5. El uso de un compuesto de fórmula



- 10
- o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la EPR en un mamífero.
 - 6. El uso de la reivindicación 5, en donde el mamífero es un ser humano.
 - 7. El uso de la reivindicación 5, en donde el mamífero es un felino.
 - 8. El uso de la reivindicación 7, en donde el felino es un gato persa.