

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 173**

51 Int. Cl.:

A61K 31/47 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 5/18 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C07D 215/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2007 E 07743994 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015 EP 2036557**

54 Título: **Agente antitumoral para un cáncer de tiroides**

30 Prioridad:

18.05.2006 US 747570 P

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

13.01.2016

73 Titular/es:

**EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (100.0%)
6-10, Koishikawa 4-chome, Bunkyo-ku
Tokyo 112-8088, JP**

72 Inventor/es:

MATSUI, JUNJI

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 556 173 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

Agente antitumoral para un cáncer de tiroides

CAMPO DEL INVENTO

- 5 El presente invento se refiere a un agente terapéutico que comprende una sustancia que inhibe a la actividad de la cinasa de RET, que se definirá más adelante, (aquí a continuación, también referida como una "sustancia inhibidora de una cinasa de RET"), y que destinado a su uso en un método para tratar por lo menos una enfermedad seleccionada entre el conjunto que se compone del carcinoma de tiroides medular familiar, del carcinoma de tiroides papilar y del carcinoma de tiroides medular esporádico, al uso de la sustancia inhibidora de una cinasa de RET para producir dicho agente terapéutico y a la sustancia inhibidora de una cinasa de RET para dicho agente terapéutico.
- 10 El presente invento se refiere también a un agente terapéutico que comprende una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, que se definirá más adelante, y que está destinado a tratar un carcinoma de tiroides, al uso de la sustancia inhibidora de una cinasa de RET para producir dicho agente terapéutico y a la sustancia inhibidora de una cinasa de RET para dicho agente terapéutico.
- 15 Por otra parte, el presente invento se refiere a una composición farmacéutica destinada a su uso en un método para tratar un carcinoma de tiroides, comprendiendo la composición una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, que se definirá más adelante, para administrarla a un organismo que tiene una célula que expresa una RET mutante, al uso de la sustancia inhibidora de una cinasa de RET para producir dicha composición farmacéutica y a la sustancia inhibidora de una cinasa de RET para dicha composición farmacéutica.
- 20 La presente divulgación se refiere a un método para tratar un carcinoma de tiroides, que comprende la administración a un organismo que tiene una célula que expresa una RET mutante.
- La presente divulgación también se refiere a un agente inhibidor de una cinasa de RET, que se definirá más adelante.
- 25 Por lo demás, la presente divulgación se refiere a un método para predecir el efecto de una sustancia inhibidora de una cinasa de RET en un paciente, usando la presencia o la ausencia de una mutación de RET en la célula como una indicación.

ANTECEDENTES DEL INVENTO

- 30 Una RET es una de las tirosina cinasas de receptores y es una molécula de superficie de células que transduce señales para el crecimiento y la diferenciación de células.
- 35 Se sabe que una mutación de RET está implicada en unas enfermedades tales como la neoplasia endocrina múltiple del tipo IIA, la neoplasia endocrina múltiple del tipo IIB, el carcinoma de tiroides medular familiar, el carcinoma de tiroides medular esporádico, el carcinoma de tiroides papilar y la enfermedad de Hirschsprung^(1,2). Se ha sugerido a la sustancia inhibidora de una cinasa de RET como un agente terapéutico potencialmente efectivo para dichas enfermedades^(1,2).
- 40 La mutación de uno de entre cinco residuos de cisteína en los codones 609, 611, 618, 620 y 634 de RET es encontrada en un 93-98 % de los pacientes con la neoplasia endocrina múltiple del tipo IIA, en donde la mutación en el codón 634 de RET es encontrada de un modo sumamente frecuente^(3,4).
- 45 Por otro lado, la mutación M918T (mutación desde metionina hasta tirosina en el codón 918) de RET es encontrada en un 95 % de los pacientes con la neoplasia endocrina múltiple del tipo IIB⁽⁴⁾.
- Una mutación en uno de los codones 609, 611, 618, 620, 634, 768, 790, 791, 804 y 891 de RET es encontrada en muchos de los pacientes con el carcinoma de tiroides medular familiar⁽⁴⁾.
- 50 Se sabe que todas estas mutaciones puntuales causan una constante activación de una RET que es independiente del ligando^(3,4).
- 55 Un síndrome de neoplasia endocrina múltiple del tipo IIA está caracterizado por el carcinoma de tiroides medular, el feocromocitoma y la hiperplasia paratiroidea mientras que un síndrome de neoplasia endocrina múltiple del tipo IIB está asociado con el carcinoma de tiroides medular, el feocromocitoma y los neuromas mucosales del tracto gastrointestinal. El síntoma principal de un síndrome de carcinoma de tiroides medular familiar es el carcinoma de tiroides medular⁽⁵⁾.

Una mutación puntual de células somáticas con RET es encontrada en aproximadamente un 40 % de los pacientes con el carcinoma de tiroides medular esporádico mientras que las mutaciones son encontradas con la máxima frecuencia en el codón 918⁽⁶⁾.

Por otra parte, un gen de fusión del gen de RET y de otro gen, a saber una reordenación del gen de RET, se encuentra en el carcinoma de tiroides papilar debido a unas inversiones cromosomales o a una translocación cromosomal. Se sabe que la proteína de fusión generada por intermedio de una reordenación del gen de RET conduce a una dimerización independiente del ligando y a una constante activación de una RET⁽⁷⁾.

La enfermedad de Hirschsprung está caracterizada por un persistente estreñimiento y una dilatación intestinal en recién nacidos, que se causan por un plexo nervioso colónico anormal. Se sabe que una de las causas de la enfermedad de Hirschsprung es una mutación de RET⁽⁸⁾.

Se ha informado de que una mutación de RET causa una proliferación independiente del andamiaje y una tumorigénesis en células NIH3T3⁽²⁾.

Se ha informado de que la sustancia inhibidora de una cinasa de RET ZD6474 suprime la proliferación independiente del andamiaje en unas células NIH3T3 transformadas con una RET mutante e inhibe la formación de tumores después de una infusión de dichas células en ratones desprovistos de inmunidad⁽²⁾.

Se ha informado de que la sustancia inhibidora de una cinasa de RET BAY 43-9006 reduce el tamaño de un tumor en un modelo para el trasplante subcutáneo de un linaje celular (TT) del carcinoma de tiroides medular humano⁽⁹⁾.

En consecuencia, se sugiere que las sustancias inhibidoras de la cinasa de RET inducen una inhibición del crecimiento celular para unas células que expresan una RET mutante y muestran un efecto antitumoral contra estas células de tumores. También parece ser que unas sustancias inhibidoras de la cinasa de RET son eficaces contra unas enfermedades causadas por una mutación de RET.

Por lo tanto, se espera que las sustancias inhibidoras de la cinasa de RET sean eficaces contra la neoplasia endocrina múltiple del tipo IIA, la neoplasia endocrina múltiple del tipo IIB, el carcinoma de tiroides medular familiar, el carcinoma de tiroides papilar del carcinoma de tiroides medular esporádico, la enfermedad de Hirschsprung, el feocromocitoma, una hiperplasia paratiroidea, unos neuromas mucosales del tracto gastrointestinal y un carcinoma de tiroides.

La 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida y unos compuestos análogos a ella se conocen como sustancias inhibidoras de la angiogénesis⁽¹⁰⁻²⁰⁾. Sin embargo, no se ha informado nada acerca de que la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida y unos compuestos análogos a ella tengan una actividad inhibidora de una cinasa de RET.

Lista de referencias:

(1) Oncogen, 19, 5590-5597, 2000.

(2) Cancer Research, 15, 7284-7290, 2002.

(3) Cancer Research, 66, 1177-1180, 2006.

(4) Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 88, 5438-5443, 2003.

(5) Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 89, 4142-4145, 2004.

(6) Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 89, 5823-5827, 2004.

(7) Endocrinology, 145, 5448-5451, 2004.

(8) Proceedings de the National Academy de Sciences de the United States de America, 102, 8949-8954, 2005.

(9) Journal of the National Cancer Institute, 98, 326-334, 2006.

(10) publicación de patente internacional N° 02/32872, documento

(11) publicación de patente internacional N° 2004/080462, documento

(12) publicación de patente internacional N° 2005/063713, documento

Unos agentes inhibidores de proteína cinasas en forma de moléculas pequeñas en el tratamiento de un cáncer de tiroides han sido discutidos por Santoro y colaboradores (Nat Clin Pract Endocrinol Metab. 2006 Ene; 2(1): 42-52).

La inhibición de la tirosina cinasa de RET por la SU5416 ha sido discutida por Mogni y colaboradores (J Mol Endocrinol. 2006 Oct; 37(2): 199-212).

La inhibición por la BAY 43-9006 de mutantes de RET oncogénicos ha sido discutida por Carlomagno y colaboradores (J Natl Cancer Inst. 2006 Mar 1; 98(5): 326-34).

El documento de publicación de patente internacional WO 2005/051366 describe unos derivados de diaril ureas para el tratamiento de enfermedades dependientes de proteína cinasas.

5 El documento de solicitud de patente de los EE.UU. US 2004/191254 describe unos métodos de tratar unas enfermedades mediadas o caracterizadas por unas mutaciones en el gen de RET y/o un cáncer de tiroides, administrando un compuesto que disminuye la actividad del factor de crecimiento epidérmico (EGF).

10 El documento US 2005/176802 describe unos compuestos de 2-indolinona sustituidos con pirrol que modulan la actividad de proteína cinasas y por lo tanto se espera que sean útiles en la prevención y el tratamiento de trastornos celulares relacionados con proteína cinasas, tales como un cáncer.

15 El documento WO 2007/015578 describe un método para predecir el efecto de un agente inhibidor de la vascularización.

La actividad anti-angiogénica del 146 E7080 (un nuevo agente inhibidor de tirosina cinasas provisto de dianas múltiples) por intermediodio de una inhibición de la señalización por KIT en un modelo de xenoinjerto de cáncer de pulmón de células pequeñas ha sido discutido por Matsui y colaboradores (European Journal Of Cancer, Suplemento, Pergamon, Oxford, Septiembre de 2004, Volumen 2, Tírada 8, Página 47).

20 El documento US 2004/253205 describe un compuesto del que se afirma que muestra una fuerte actividad inhibidora de una cinasa c-Kit, y que inhibe la proliferación de unas células de cáncer activadas por la cinasa c-Kit *in vitro* e *in vivo*.

25 DIVULGACIÓN DEL INVENTO

El presente invento se consiguió tomando en cuenta las circunstancias anteriormente descritas y los problemas que se han de resolver por el invento son los de proporcionar un agente terapéutico destinado a su uso en un método para tratar un carcinoma de tiroides, tales como el carcinoma de tiroides medular familiar, el carcinoma de tiroides papilar o el carcinoma de tiroides medular esporádico, y una composición farmacéutica destinada a su uso en un método para tratar un carcinoma de tiroides, altamente eficaz para unos organismos que incluyen células que expresan una RET mutante.

35 Se divulgan aquí un agente inhibidor de una cinasa de RET, que se definirá más adelante, y un método para predecir el efecto de la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilamino-carbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida y de unos compuestos análogos a ella.

40 Los presentes autores del invento han pasado por una sutil investigación y han encontrado que la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida tiene una actividad inhibidora de una cinasa de RET y que la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilamino-carbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida y unos compuestos análogos a ella son altamente eficaces contra un carcinoma de tiroides, tales como el carcinoma de tiroides medular familiar, el carcinoma de tiroides papilar o el carcinoma de tiroides medular esporádico. Los autores del presente invento han encontrado también que la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida y unos compuestos análogos a ella son altamente eficaces para unos organismos que incluyen células que expresan una RET mutante y han encontrado además que el efecto de la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida y de unos compuestos análogos a ella puede ser predicho usando la presencia o la ausencia de una mutación de RET en la célula como una indicación.

50 Por lo tanto, el presente invento se refiere a los siguientes objetivos.

(1) Un agente terapéutico que comprende una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, que se definirá más adelante, destinado a su uso en un método para tratar por lo menos una enfermedad seleccionada entre el conjunto que se compone del carcinoma de tiroides medular familiar, del carcinoma de tiroides papilar y del carcinoma de tiroides medular esporádico.

55 (2) Un agente terapéutico destinado a su uso en un método para tratar un carcinoma de tiroides, que comprende una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, que se definirá más adelante.

60 (3) Una composición farmacéutica destinada a su uso en un método para tratar un carcinoma de tiroides, comprendiendo la composición una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, que se definirá más adelante, para administrarla a un organismo que comprende una célula que expresa una RET mutante.

También se divulgan en el presente texto los siguientes objetivos.

5 (4) Un método para tratar por lo menos una enfermedad seleccionada entre el conjunto que se compone del carcinoma de tiroides medular familiar, del carcinoma de tiroides papilar y del carcinoma de tiroides medular esporádico, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, que se definirá más adelante, a un paciente.

(5) Un método para tratar un carcinoma de tiroides, que comprende administrar una cantidad eficaz de una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, que se definirá más adelante, a un paciente.

10 (6) Un método para tratar un carcinoma de tiroides, que comprende administrar una cantidad eficaz de una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, que se definirá más adelante, a un organismo que comprende una célula que expresa una RET mutante.

15 El presente invento también se refiere a los siguientes objetivos.

(7) El uso de una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, que se definirá más adelante, para producir un agente terapéutico destinado a su uso en un método para tratar por lo menos una enfermedad seleccionada entre el conjunto que se compone del carcinoma de tiroides medular familiar, del carcinoma de tiroides papilar y del carcinoma de tiroides medular esporádico.

20 (8) El uso de una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, que se definirá más adelante, para producir un agente terapéutico destinado a su uso en un método para tratar un carcinoma de tiroides.

25 (9) El uso de una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, que se definirá más adelante, para producir una composición farmacéutica destinada a su uso en un método para tratar un carcinoma de tiroides, comprendiendo la composición la sustancia inhibidora de una cinasa de RET, para administrarla a un organismo que comprende una célula que expresa una RET mutante.

30 (10) Una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, que se definirá más adelante, para un agente terapéutico destinado a su uso en un método para tratar por lo menos una enfermedad seleccionada entre el conjunto que se compone del carcinoma de tiroides medular familiar, del carcinoma de tiroides papilar y del carcinoma de tiroides medular esporádico.

35 (11) Una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, que se definirá más adelante, para un agente terapéutico destinado a su uso en un método para tratar un carcinoma de tiroides.

40 (12) Una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, que se definirá más adelante, para una composición farmacéutica destinada a su uso en un método para tratar un carcinoma de tiroides, comprendiendo la composición la sustancia inhibidora de una cinasa de RET, para administrarla a un organismo que comprende una célula que expresa una RET mutante.

También se divulgan en el presente texto los siguientes objetivos.

45 (13) Un método para predecir si un paciente es altamente sensible a una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, que se definirá más adelante, que comprende usar la presencia o la ausencia de una mutación de RET en la célula como una indicación.

50 (14) Un método para analizar la sensibilidad de una célula a una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, que se definirá más adelante, que comprende determinar la presencia o la ausencia de una mutación de RET en la célula.

(15) Un método para seleccionar una célula que es altamente sensible a una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, que se definirá más adelante, que comprende determinar la presencia o la ausencia de una mutación de RET en la célula.

55 (16) Un método para seleccionar a un paciente que es altamente sensible a una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, que se definirá más adelante, que comprende determinar la presencia o la ausencia de una mutación de RET en la célula.

60 (17) Un método para clasificar a un paciente de acuerdo con el resultado obtenido a partir del análisis de la sensibilidad del paciente a una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, que se definirá más adelante, que comprende determinar la presencia o la ausencia de una mutación de RET en la célula.

(18) Un método para seleccionar a un paciente pensado para la administración de una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, que se definirá más adelante, que comprende determinar la presencia o la ausencia de una

mutación de RET en la célula, y seleccionar a un paciente que comprende una célula que expresa una RET mutante a partir de los resultados de la determinación.

5 (19) Un método para predecir un efecto terapéutico de una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, que se definirá más adelante, en un paciente, que comprende determinar la presencia o la ausencia de una mutación de RET en una célula.

10 (20) Un método para determinar la presencia o la ausencia de una mutación de RET en la célula procedente de un paciente para predecir la sensibilidad del paciente a una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, que se definirá más adelante.

Dicha sustancia inhibidora de una cinasa de RET es por lo menos una seleccionada entre el conjunto que se compone de:

15 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida;
4-(3-cloro-4-(etilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida;
N6-metoxi-4-(3-cloro-4-(((ciclopropilamino)carbonil)amino)fenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida;
4-(3-cloro-4-(metilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida;
20 N6-metoxi-4-(3-cloro-4-(((etilamino)carbonil)amino)fenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida; y
N-{2-cloro-4-[(6,7-dimetoxi-4-quinolil)oxi]fenil}-N'-(5-metil-3-isoxazolil) urea;
una sal farmacológicamente aceptable de ellas o un solvato de ellas.

25 Por otra parte, la sustancia inhibidora de una cinasa de RET puede ser el compuesto N-{2-cloro-4-[(6,7-dimetoxi-4-quinolil)oxi]fenil}-N'-(5-metil-3-isoxazolil)urea, una sal farmacológicamente aceptable de ella o un solvato de ella.

Preferiblemente, el presente invento también se refiere a los siguientes objetivos.

30 (21) Un agente terapéutico que comprende la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida, una sal farmacológicamente aceptable de ella o un solvato de ella destinado a su uso en un método para tratar por lo menos una enfermedad seleccionada entre el conjunto que se compone del carcinoma de tiroides medular familiar, del carcinoma de tiroides papilar y del carcinoma de tiroides medular esporádico.

35 (22) Un agente terapéutico que comprende la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida, una sal farmacológicamente aceptable de ella o un solvato de ella destinado a su uso en un método para tratar un carcinoma de tiroides.

40 (23) Una composición farmacéutica destinada a su uso en un método para tratar un carcinoma de tiroides, comprendiendo la composición la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilamino-carbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida, una sal farmacológicamente aceptable de ella o un solvato de ella para administrarla a un organismo que comprende una célula que expresa una RET mutante.

También se divulgan en el presente texto los siguientes objetivos.

45 (24) Un método para tratar por lo menos una enfermedad seleccionada entre el conjunto que se compone del carcinoma de tiroides medular familiar, del carcinoma de tiroides papilar y del carcinoma de tiroides medular esporádico, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida, una sal farmacológicamente aceptable de ella o un solvato de ella a un paciente.

50 (25) Un método para tratar un carcinoma de tiroides, que comprende administrar una cantidad eficaz de la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida, una sal farmacológicamente aceptable de ella o un solvato de ella a un paciente.

55 (26) Un método para tratar un carcinoma de tiroides, que comprende administrar una cantidad eficaz de la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida, una sal farmacológicamente aceptable de ella o un solvato de ella a un organismo que comprende una célula que expresa una RET mutante. Preferiblemente, el presente invento se refiere a los siguientes objetivos.

60 (27) El uso de la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida, de una sal farmacológicamente aceptable de ella o de un solvato de ella para producir un agente terapéutico destinado a su uso en un método para tratar por lo menos una enfermedad seleccionada entre el conjunto que se compone del carcinoma de tiroides medular familiar, del carcinoma de tiroides papilar y del carcinoma de tiroides medular esporádico.

- (28) El uso de la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida, de una sal farmacológicamente aceptable de ella o de un solvato de ella para producir un agente terapéutico destinado a su uso en un método para tratar un carcinoma de tiroides.
- 5 (29) El uso de la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida, de una sal farmacológicamente aceptable de ella o de un solvato de ella para producir una composición farmacéutica destinada a su uso en un método para tratar un carcinoma de tiroides, comprendiendo la composición una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, como se ha definido en el presente texto, para administrarla a un organismo que comprende una célula que expresa una RET mutante.
- 10 (30) La 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida, una sal farmacológicamente aceptable de ella o un solvato de ella para un agente terapéutico destinado a su uso en un método para tratar por lo menos una enfermedad seleccionada entre el conjunto que se compone del carcinoma de tiroides medular familiar, del carcinoma de tiroides papilar y del carcinoma de tiroides medular esporádico.
- 15 (31) La 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida, una sal farmacológicamente aceptable de ella o un solvato de ella para un agente terapéutico destinado a su uso en un método para tratar un carcinoma de tiroides.
- 20 (32) La 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida, una sal farmacológicamente aceptable de ella o un solvato de ella para una composición farmacéutica destinada a su uso en un método para tratar un carcinoma de tiroides, comprendiendo la composición una sustancia inhibidora de una cinasa de RET para administrarla a un organismo que comprende una célula que expresa una RET mutante.
- 25 También se divulgan en el presente texto los siguientes objetivos.
- (33) Un método para predecir si un paciente es altamente sensible a la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida, a una sal farmacológicamente aceptable de ella o a un solvato de ella, comprendiendo el método usar la presencia o la ausencia de una mutación de RET en la célula como una indicación.
- 30 (34) Un método para analizar la sensibilidad de una célula a la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)-aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida, a una sal farmacológicamente aceptable de ella o a un solvato de ella, comprendiendo el método determinar la presencia o la ausencia de una mutación de RET en la célula.
- 35 (35) Un método para seleccionar una célula que es altamente sensible a la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida, a una sal farmacológicamente aceptable de ella o a un solvato de ella, comprendiendo el método determinar la presencia o la ausencia de una mutación de RET en la célula.
- 40 (36) Un método para seleccionar a un paciente que es altamente sensible a la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida, a una sal farmacológicamente aceptable de ella o a un solvato de ella, comprendiendo el método determinar la presencia o la ausencia de una mutación de RET en la célula.
- 45 (37) Un método para clasificar a un paciente de acuerdo con el resultado obtenido a partir de un análisis de la sensibilidad del paciente a 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida, a una sal farmacológicamente aceptable de ella o a un solvato de ella, comprendiendo el método determinar la presencia o la ausencia de una mutación de RET en la célula.
- 50 (38) Un método para seleccionar a un paciente pensado para la administración de la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida, de una sal farmacológicamente aceptable de ella o de un solvato de ella, comprendiendo el método determinar la presencia o la ausencia de una mutación de RET en la célula y seleccionar a un paciente que comprende una célula que expresa una RET mutante a partir de los resultados de la determinación.
- 55 (39) Un método para predecir un efecto terapéutico de la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida, de una sal farmacológicamente aceptable de ella o de un solvato de ella en un paciente, comprendiendo el método determinar la presencia o la ausencia de una mutación de RET en una célula.
- 60 (40) Un método para determinar la presencia o la ausencia de una mutación de RET en la célula de un paciente, para predecir la sensibilidad del paciente a la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida, una sal farmacológicamente aceptable de ella o un solvato de ella.

(41) Un agente inhibidor de una cinasa de RET que comprende la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)-aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida, una sal farmacológicamente aceptable de ella o un solvato de ella.

5 El presente invento proporciona un agente terapéutico que comprende una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, como se ha definido en el presente texto, y que está destinado a su uso en un método para tratar por lo menos una enfermedad seleccionada entre el conjunto que se compone del carcinoma de tiroides medular familiar, del carcinoma de tiroides papilar y del carcinoma de tiroides medular esporádico, el uso de la sustancia inhibidora de una cinasa de RET para producir dicho agente terapéutico y la sustancia inhibidora de una cinasa de RET para dicho agente terapéutico.

10 El presente invento también proporciona un agente terapéutico que comprende una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, como se ha definido en el presente texto, y que está destinado a su uso en un método para tratar un carcinoma de tiroides, el uso de la sustancia inhibidora de una cinasa de RET para producir dicho agente terapéutico y la sustancia inhibidora de una cinasa de RET para dicho agente terapéutico.

15 El presente invento proporciona adicionalmente una composición farmacéutica destinada a su uso en un método para tratar un carcinoma de tiroides, comprendiendo la composición una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, como se ha definido en el presente texto, para administrarla a un organismo que tiene una célula que expresa una RET mutante, el uso de la sustancia inhibidora de una cinasa de RET para producir dicha composición farmacéutica y la sustancia inhibidora de una cinasa de RET para dicha composición farmacéutica. También se divulga en el presente texto un método para tratar un carcinoma de tiroides, que comprende administrar a un organismo que tiene una célula que expresa una RET mutante.

20 También se divulga en el presente texto un agente inhibidor de una cinasa de RET, como se ha definido en el presente texto.

25 También se divulga en el presente texto un método para predecir el efecto de una sustancia inhibidora de una cinasa de RET.

30 Más específicamente, el efecto de una sustancia inhibidora de una cinasa de RET puede ser predicho usando la presencia o la ausencia de una mutación de RET en la célula como una indicación.

35 Puesto que el método hace posible predecir el efecto del compuesto sin tener que administrar el compuesto al paciente, se ha hecho posible seleccionar un paciente del que se espera que sea más susceptible al compuesto. Por lo tanto, se ha hecho posible una contribución a la QOL (calidad de vida) del paciente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

40 La Figura 1 muestra un efecto de la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida sobre las activaciones de la cinasa de RET y de la Erk1/2 (siendo la indicación una fosforilación) en un linaje celular (TT) del carcinoma de tiroides medular humano en un cultivo. La pista situada más a la izquierda es la determinación de las activaciones de la cinasa de RET y de la Erk1/2 (siendo la indicación una fosforilación) sin la adición de una sustancia de ensayo.

La Figura 2 muestra el efecto antitumoral de la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida en un modelo de trasplante subcutáneo del linaje celular (TT) del carcinoma de tiroides medular humano.

45 La Figura 3 muestra el efecto de la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida sobre una cinasa de RET en un tejido de tumor de un modelo de trasplante subcutáneo del linaje celular (TT) del carcinoma de tiroides medular humano. (A) muestra el efecto sobre una fosforilación de RET a las 2 horas después de la administración por vía oral de la sustancia de ensayo en cada dosificación (10, 30 o 100 mg/kg) mientras que (B) muestra el efecto sobre una fosforilación de RET a las 2, 8, 12 o 24 horas después de la administración de la sustancia de ensayo a razón de 100 mg/kg.

MEJORES MODOS PARA LLEVAR A CABO EL INVENTO

55 A continuación de esto, se describirán unas formas de realización del presente invento. Las siguientes formas de realización ilustran el presente invento, de las que no se piensa que limiten al presente invento.

1. Agente terapéutico y composición farmacéutica del invento, y un método terapéutico

(1) RET

- 5 De acuerdo con el presente invento, una RET es una proteína codificada por el proto-oncogén *ret*, por ejemplo, un polipéptido que se compone de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 (N° de acceso al GenBank:NM_020975) o la SEQ ID NO: 4 (N° de acceso al GenBank:NM_020630). Las secuencias de aminoácidos representadas por la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 4 tienen una longitud de 1114 aa (aminoácidos) y 1072 aa, respectivamente.
- 10 El proto-oncogén *ret* es, por ejemplo, un polinucleótido 181-3522 de la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 1 (N° de acceso al GenBank:NM_020975), o un polinucleótido 181-3396 de la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 3 (N° de acceso al GenBank:NM_020630).

En el presente texto, estas RETs pueden también ser citadas como "RETs de tipo salvaje".

(2) Una RET mutante

- 15 De acuerdo con el presente invento, una RET mutante es un polipéptido que comprende una versión mutada de la secuencia de aminoácidos de una RET de tipo salvaje, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que tiene uno o varios aminoácidos suprimidos, sustituidos, añadidos o variados por una combinación de ellos en la secuencia de aminoácidos que está representada por la SEQ ID NO: 2 o 4. Un ejemplo incluye un polipéptido que tiene una actividad de cinasa de RET. Preferiblemente, una RET mutante puede ser, por ejemplo, un polipéptido que tiene una actividad de cinasa de RET y que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene un aminoácido sustituido en la secuencia de aminoácidos de una RET de tipo salvaje (p.ej., la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 o 4).
- 20

En el presente texto, la "actividad de cinasa de RET" se refiere a la capacidad de una RET para fosforilar a un residuo de tirosina de ella misma o de otra proteína.

- 25 Unos ejemplos de unas mutantes de RET incluyen unos polipéptidos que incluyen las secuencias que se describirán en (i)-(xix) presentados más abajo.

(i) Una secuencia de aminoácidos que tiene la glicina en 321 sustituida por otro aminoácido, preferiblemente arginina, en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 o 4 (Journal of Endocrinology Investigation, 28, 905-909, 2005.).

- 30 (ii) Una secuencia de aminoácidos que tiene la glicina en 533 sustituida por otro aminoácido, preferiblemente cisteína, en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 o 4 (Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 88, 5438-5443, 2003.).

(iii) Una secuencia de aminoácidos que tiene la cisteína en 609 sustituida por otro aminoácido, preferiblemente serina, en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 o 4 (Clin Endocrinol, 63, 676-682, 2005.).

- 35 (iv) Una secuencia de aminoácidos que tiene la cisteína en 611 sustituida por otro aminoácido, preferiblemente serina, tirosina o fenilalanina, en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 o 4 (European Journal of Human Genetics, 11, 364-368, 2003, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 86, 1104-1109, 2001.).

- 40 (v) Una secuencia de aminoácidos que tiene la cisteína en 618 sustituida por otro aminoácido, preferiblemente arginina, serina, glicina o fenilalanina, en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 o 4 (American Journal of Pathology, 168, 1262-1275, 2006., Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 86, 1104-1109, 2001.).

- 45 (vi) Una secuencia de aminoácidos que tiene la cisteína en 620 sustituida por otro aminoácido, preferiblemente arginina o serina, en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 o 4 (American Journal of Pathology, 168, 1262-1275, 2006, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 86, 1104-1109, 2001.).

(vii) Una secuencia de aminoácidos que tiene la cisteína en 630 sustituida por otro aminoácido, preferiblemente arginina o tirosina, en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 o 4 (Thyroid, 15, 668-671, 2005., Biochemical and Biophysical Research Communications, 255, 587-590, 1999.).

- (viii) Una secuencia de aminoácidos que tiene el ácido aspártico en 631 sustituido por otro aminoácido, preferiblemente tirosina, glicina, asparagina o alanina, en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 o 4 (Biochemical and Biophysical Research Communications, 255, 587-590, 1999.).
- 5 (ix) Una secuencia de aminoácidos que tiene la cisteína en 634 sustituida por otro aminoácido, preferiblemente arginina, glicina, tirosina, fenilalanina, serina o triptófano, en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 o 4 (Biochemical and Biophysical Research Communications, 255, 587-590, 1999., Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 86, 1104-1109, 2001., Biochemical and Biophysical Research Communications, 207, 1022-1028, 1995.).
- 10 (x) Una secuencia de aminoácidos que tiene la glicina en 691 sustituida por otro aminoácido, preferiblemente serina, en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 o 4 (Cancer Research, 66, 1177-1180, 2006.).
- (xi) Una secuencia de aminoácidos que tiene el ácido glutámico en 768 sustituido por otro aminoácido, preferiblemente el ácido aspártico, en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 o 4 (Clinical Chemistry, 50, 522-529, 2004., Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 86, 1104-1109, 2001.).
- 15 (xii) Una secuencia de aminoácidos que tiene la leucina en 790 sustituida por otro aminoácido, preferiblemente fenilalanina, en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 o 4 (Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 83, 770-774, 1998., Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 86, 1104-1109, 2001.).
- (xiii) Una secuencia de aminoácidos que tiene la tirosina en 791 sustituida por otro aminoácido, preferiblemente fenilalanina, en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 o 4 (Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 83, 770-774, 1998.).
- 20 (xiv) Una secuencia de aminoácidos que tiene la valina en 804 sustituida por otro aminoácido, preferiblemente metionina, en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 o 4 (Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 86, 1104-1109, 2001.).
- (xv) Una secuencia de aminoácidos que tiene la tirosina en 806 sustituida por otro aminoácido, preferiblemente cisteína, en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 o 4 (Japanese Journal of Cancer Research, 90, 1-5, 1999.).
- 25 (xvi) Una secuencia de aminoácidos que tiene la arginina en 844 sustituida por otro aminoácido, preferiblemente leucina, en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 o 4 (Exp Clin Endocrinol Diabetes, 108, 128-132, 2000.).
- 30 (xvii) Una secuencia de aminoácidos que tiene la alanina en 883 sustituida por otro aminoácido, preferiblemente fenilalanina o tirosina, en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 o 4 (European Journal of Endocrinology, 142, 573-575, 2000., Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 89, 5823-5827, 2004.).
- (xviii) Una secuencia de aminoácidos que tiene la serina en 891 sustituida por otro aminoácido, preferiblemente alanina, en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 o 4 (Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 89, 4142-4145, 2004.).
- 35 (xix) Una secuencia de aminoácidos que tiene la metionina en 918 sustituida por otro aminoácido, preferiblemente treonina, en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 o 4 (Clinical Cancer Research, 8, 457-463, 2002.).
- 40 Además de ello, unas mutantes de RET pueden ser las que incluyen por lo menos una de las sustituciones indicadas en (i)-(xix) con anterioridad, específicamente las que incluyen unos sitios de mutación en donde por lo menos un aminoácido seleccionado entre el conjunto que se compone de los aminoácidos en los codones 321, 533, 609, 611, 618, 620, 630, 631, 634, 691, 768, 790, 791, 804, 806, 844, 883, 891 y 918 es sustituido por otro aminoácido, en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 o 4. Por ejemplo, un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que contiene un sitio de mutación en donde la valina en la posición 804 es sustituida por otro aminoácido y un sitio de mutación en donde la tirosina en la posición 806 es sustituida por otro aminoácido en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, está comprendido en una RET mutante. En el presente texto, el número y la combinación de las sustituciones de (i)-(xix) con anterioridad que se han de incluir en una RET mutante no se han limitado particularmente.
- 45 De acuerdo con el presente invento, una RET mutante es preferiblemente un polipéptido que incluye una secuencia representada por (iii), (iv), (v), (vi), (ix), (xi), (xii), (xiii), (xiv), (xviii) o (xix) con anterioridad, más preferiblemente una secuencia representada por (ix) o (xix).
- 50

En el presente texto, la notación alfabética de los aminoácidos es expresada en unos códigos de tres letras o de una única letra, generalmente usados. El alfabeto que precede al número indica el código de una única letra del aminoácido que ha de ser sustituido, el alfabeto que sigue al número indica el código de una única letra del aminoácido que reemplaza al aminoácido original, y el número indica la posición del aminoácido en la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, como se ha indicado en (xix) con anterioridad, cuando la metionina en posición 918 es sustituida por treonina, esto se puede indicar como "M918T".

Por otra parte, el número que sigue al codón puede indicar la posición del aminoácido en la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, "un aminoácido en el codón 918" se refiere al 918º aminoácido en la secuencia de aminoácidos.

De acuerdo con el presente invento, una RET mutante puede ser un polipéptido que tiene una actividad de cinasa de RET y es codificado por un gen reordenado entre un gen que codifica una RET de tipo salvaje (seguidamente en el presente texto, también referido como "gen de RET") y otro gen. Por otra parte, una RET mutante del invento es, por ejemplo, un polipéptido que tiene una actividad de cinasa de RET y es codificado por un polinucleótido en el que el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 1 o 3 es parcialmente reordenado con otro gen. Por lo demás, una RET mutante del invento es, por ejemplo, un polipéptido que tiene una actividad de cinasa de RET y es codificado por un polinucleótido en el que el polinucleótido 181-3522 de SEQ ID NO: 1 o el polinucleótido 181-3396 de SEQ ID NO: 3 es reordenado con otro gen.

En el presente texto, una "reordenación de un gen" se refiere a una recombinación entre genes que da como resultado un nuevo gen.

Ejemplos de unas RET mutantes incluyen unos polipéptidos de (i)-(xi) presentados más abajo. Unas formas de realización de una reordenación de genes para los polipéptidos de (i)-(xi) presentados más abajo se describen en la bibliografía mencionada entre paréntesis.

(i) Un polipéptido codificado por un gen reordenado (también referido como "RET/PTC1") entre el gen de RET y H4 (también referido como CCDC6, dominio de enrollamiento enrollado que contiene el gen 6 o D10S170; N° de acceso al GenBank:NM_005436) (European Journal of Cancer, 41, 816-821, 2005., Cell, 60, 557-563, 1990.).

(ii) Un polipéptido codificado por un gen reordenado (también referido como "RET/PTC2") entre el gen de RET y el gen R1α (también referido como PRKAR1A, regulador tipo I alfa dependiente de cAMP; N° de acceso al GenBank:NM_212471) (Eur J Endocrinology, 147, 741-745, 2002.).

(iii) Un polipéptido codificado por un gen reordenado (también referido como "RET/PTC3") entre el gen de RET y el gen ELE1 (también referido como NCOA4, coactivador del receptor nuclear 4 o RFG; N° de acceso al GenBank:NM_005437) (European Journal of Cancer, 41, 816-821, 2005.).

(iv) Un polipéptido codificado por un gen reordenado (también referido como "RET/PTC4") entre el gen de RET y el gen ELE1 (también referido como NCOA4, coactivador del receptor nuclear 4 o RFG; N° de acceso al GenBank:NM_005437) (Oncogen, 13, 1093-1097, 1996.).

(v) Un polipéptido codificado por un gen reordenado (también referido como "RET/PTC5") entre el gen de RET y el gen RFG5 (también referido como GOLGA5, golgin-84; N° de acceso al GenBank:NM_005113) (Cancer Research, 58, 198-203, 1998.).

(vi) Un polipéptido codificado por un gen reordenado (también referido como "RET/PTC6") entre el gen de RET y el gen hTIF (también referido como TRIM24, que contiene el motivo tripartito 24 o PTC6; N° de acceso al GenBank:NM_003852) (Oncogen, 18, 4388-4393, 1999.).

(vii) Un polipéptido codificado por un gen reordenado (también referido como "RET/PTC7") entre el gen de RET y RFG7 (también referido como TRIM33, que contiene el motivo tripartito 33, PTC7; N° de acceso al GenBank:NM_033020) (Cancer Research, 60, 2786-2789, 2000.).

(viii) Un polipéptido codificado por un gen reordenado (también referido como "RET/PTC8") entre el gen de RET y el gen de kinectina (también referido como KTN1, kinectina 1; N° de acceso al GenBank:NM_182926) (Cancer Research, 60, 7028-7032, 2000., Cancer Research, 60, 2786-2789, 2000.).

(ix) Un polipéptido codificado por un gen reordenado (también referido como "RET/ELKS") entre el gen de RET y el gen ELKS (también referido como RAB6IP2 o RAB6 proteína interactuante 2; N° de acceso al GenBank:NM_178037) (Genes Chromosomes Cancer, 25, 97-103, 1999.).

(x) Un polipéptido codificado por un gen reordenado (también referido como "RET/PCM-1") entre el gen de RET y el gen PCM-1 (también referido como PCM1 o material pericentriolar 1; N° de acceso al GenBank:NM_006197) gen (Oncogen, 19, 4236-4242, 2000.).

5 (xi) Un polipéptido codificado por un gen reordenado (también referido como "RFP-RET") entre el gen de RET y el gen RFP (también referido como proteína de dedo ret; N° de acceso al GenBank:NM_006510) (Endocrinology, 145, 5448-5451, 2004.).

10 La presencia o la ausencia de una mutación de RET pueden ser verificadas por un análisis de la secuencia del gen de RET o de la secuencia de un transcrito del gen de RET, es decir, un ARNm (mensajero). El proceso de análisis, puede ser, por ejemplo, el método de terminación de cadena con un didesoxinucleótido (Sanger y colaboradores. (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463). La secuencia se puede analizar usando un apropiado secuenciador de ADN.

15 Alternativamente, la presencia o la ausencia de una mutación de RET se pueden analizar, por ejemplo, por medio de una técnica tal como una hibridación *in situ*, unos análisis por transferencia de borrón Northern, un microchip de ADN, una RT-PCR (acrónimo de "reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa") o una SSCP-PCR (acrónimo de Single-Strand Conformation Polimorphism-PCR = PCR con polimorfismo de conformación de una única hebra). Estas técnicas se pueden llevar a cabo de acuerdo con unos procesos rutinarios (Clinical Cancer Research, 8, 457-463, 2002.).

20 La presencia o la ausencia de una mutación de RET se pueden analizar también, por ejemplo, por medio de un método inmunoquímico (p.ej., un método inmunohistoquímico, una inmunoprecipitación, una transferencia de borrón Western, una citometría de flujo, un ELISA, un RIA, etc.). Estas técnicas se pueden llevar a cabo de acuerdo con unos procesos rutinarios.

25 Las secuencias de cebadores para una PCR con el fin de analizar la presencia o la ausencia de una RET mutante se pueden designar de acuerdo con un proceso rutinario. Por ejemplo, las secuencias de cebadores se pueden designar usando una Expresión de Cebadores (de Perkin-Elmer Applied Biosystems).

30 Con el fin de analizar la presencia o la ausencia de una RET mutante se pueden usar, por ejemplo, los cebadores que se mencionan en la Tabla 1. Por ejemplo, para analizar el RET/PTC1, se pueden emplear como cebadores los polinucleótidos que tienen las secuencias representadas por las SEQ ID NOS: 5 y 6.

35 Tabla 1

Una RET mutante pensada para análisis	Cebador 1	Cebador 2
RET/PTC1	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
RET/PTC2	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 6
RET/PTC3	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9
RET/PTC4	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11
RET/PTC5	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 13
RET/PTC6	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 14
RET/PTC7	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 15
RET/PTC8	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 16
RET/ELKS	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
RET/PCM-1	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20

La Tabla 1 indica algunos de los cebadores para unas RET mutantes pensada para realizar análisis.

Las secuencias de nucleótidos representadas por las SEQ ID NOS: 5-20 se muestran más abajo.

40 SEQ ID NO: 5 ATT GTC ATC TCG CCG TTC
 SEQ ID NO: 6 TGC TTC AGG ACG TTG AAC
 SEQ ID NO: 7 TAT CGC AGG AGA GAC TGT GAT
 SEQ ID NO: 8 TGG AGA AGA GAG GCT GTA TC
 SEQ ID NO: 9 CGT TGC CTT GAC TTT TC
 45 SEQ ID NO: 10 TGC CCC TTC AGT GTT CCT ACT
 SEQ ID NO: 11 CTT GAT AAC ACT GGC AGG TT

SEQ ID NO: 12 GAG GCG TTC TCT TTC AGC AT
 SEQ ID NO: 13 TGG AAG AAC TTC GGC ATG AG
 SEQ ID NO: 14 GAA TTC ACA GCC ACC AAG TG
 SEQ ID NO: 15 CTA CTT AGC TTT CCA AGT GG
 5 SEQ ID NO: 16 GGG ACA GAC ACC TTT GGA AAT A
 SEQ ID NO: 17 GTTGAAGGAGTCCTTGACTG
 SEQ ID NO: 18 CTTTCAGCATCTTCACGG
 SEQ ID NO: 19 AGTGAAGTTTCTACCATCC
 10 SEQ ID NO: 20 GGCGTTCTCTTTCAGCATCT

(3) Célula que expresa una RET mutante

De acuerdo con el presente invento, una célula que expresa una RET mutante es una célula procedente de un carcinoma de tiroides, tal como una célula procedente del carcinoma de tiroides medular familiar, del carcinoma de tiroides papilar o del carcinoma de tiroides medular esporádico.

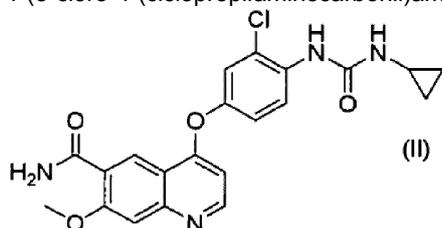
(4) Sustancia inhibidora de una cinasa de RET destinada a usarse en el invento

Unos ejemplos preferibles de la sustancia inhibidora de una cinasa de RET incluyen:

4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida;
 4-(3-cloro-4-(etilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida;
 N6-metoxi-4-(3-cloro-4-(((ciclopropilamino)carbonil)amino)fenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida;
 4-(3-cloro-4-(metilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida; and
 25 N6-metoxi-4-(3-cloro-4-(((etilamino)carbonil)amino)fenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida.

Un ejemplo todavía más preferible es la 4-(3-cloro-4-(ciclopropil-aminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida (véase la Fórmula (II)).

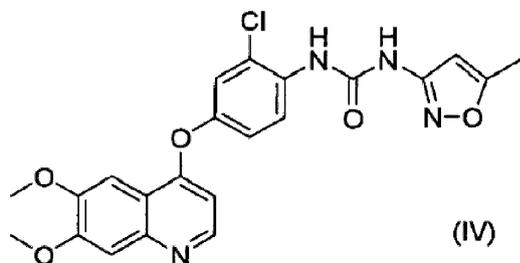
El ejemplo sumamente preferible de la sustancia inhibidora de una cinasa de RET incluye el metanosulfonato de 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida.



La sustancia inhibidora de una cinasa de RET se puede producir por medio de un método conocido, por ejemplo, los métodos que se describieron en el documento de publicación de patente internacional N° 02/32872 (WO02/32872) y en el documento de publicación de patente internacional N° 2005/063713 (WO2005/063713).

Además de ello, la sustancia inhibidora de una cinasa de RET destinada a usarse en el invento es, por ejemplo:

La N-{2-cloro-4-[(6,7-dimetoxi-4-quinolil)oxi]fenil}-N'-(5-metil-3-isoxazolil)urea (posteriormente en el presente texto, también referida como "KRN951"; documento WO02/088110) (véase la Fórmula (IV)).



La KRN951 se puede producir de acuerdo con un método conocido. Ella se puede producir, por ejemplo, de acuerdo con los métodos que se han descrito en la respectiva bibliografía.

De acuerdo con el presente invento, la sustancia inhibidora de una cinasa de RET puede formar una sal farmacológicamente aceptable con un ácido o con una base. De acuerdo con el presente invento, la sustancia

inhibidora de una cinasa de RET también comprende tales sales farmacológicamente aceptables. Unos ejemplos de sales formadas con un ácido incluyen unas sales con ácidos inorgánicos tales como un hidrocloreto, un hidrobromato, un sulfato y un fosfato, y unas sales con ácidos orgánicos tales como el ácido fórmico, el ácido acético, el ácido láctico, el ácido succínico, el ácido fumárico, el ácido maleico, el ácido cítrico, el ácido tartárico, el ácido esteárico, el ácido benzoico, el ácido metanosulfónico, el ácido bencenosulfónico, el ácido p-toluenosulfónico y el ácido trifluoroacético. Unos ejemplos de sales formadas con bases incluyen unas sales de metales alcalinos tales como una sal de sodio y una sal de potasio, unas sales de metales alcalino-térreos, tales como una sal de calcio y una sal de magnesio, unas sales de bases orgánicas tales como unas sales de trimetilamina, trietilamina, piridina, picolina, dicitclohexilamina, N, N'-dibencil etilendiamina, arginina y lisina y de amonio.

Por lo demás, de acuerdo con el presente invento, la sustancia inhibidora de una cinasa de RET también comprende, si es que lo hace, los solvatos y los enantiómeros de estos compuestos. Unos ejemplos de solvatos incluyen hidratos y no hidratos, preferiblemente hidratos. Unos ejemplos de disolventes incluyen agua, alcoholes (por ejemplo, metanol, etanol, n-propanol) y dimetilformamida.

Por otra parte, de acuerdo con el presente invento, la sustancia inhibidora de una cinasa de RET puede ser cristalina o amorfa. Si está presente un polimorfo cristalino, éste puede ser un único polimorfo o una mezcla de polimorfos en cualquier forma cristalina.

La presente divulgación también se refiere a unas sustancias inhibidoras de la cinasa de RET que son susceptibles a un proceso de metabolismo, tal como una oxidación, una reducción, una hidrólisis y una conjugación *in vivo*, y unos compuestos que generan una sustancia inhibidora de una cinasa de RET al ser sometidos a un proceso de metabolismo tal como una oxidación, una reducción y una hidrólisis *in vivo*.

La sustancia inhibidora de una cinasa de RET del invento tiene una actividad de inhibir la actividad de la cinasa de RET (aquí en lo sucesivo, también referida como "actividad inhibidora de una cinasa de RET"). La capacidad de inhibición de la sustancia inhibidora de una cinasa de RET del invento no está limitada, siempre y cuando que ella inhiba a la actividad como cinasa de una RET. Unos ejemplos de métodos para determinar la actividad de la sustancia inhibidora de una cinasa de RET para inhibir a una cinasa de RET incluyen un ensayo de cinasa libre de células, una transferencia de borrón Western, un ensayo de crecimiento de células y un ensayo de viabilidad.

Unos ejemplos del ensayo de crecimiento de células incluyen el método de captación de tritio timidina, el método de MTT, el método de XTT (con el estuche 8 de recuento de células = cell counting kit-8 (de Dojindo Laboratories)), el método de AlamarBlue, el método de Neutral Red, el método de BrdU, la tinción con Ki67 y la tinción con PCNA. Unos ejemplos del ensayo de viabilidad incluyen la tinción con TUNNEL, la detección de la disociación de Caspase-3 y la detección de la disociación de PARP. Estos métodos se pueden llevar a cabo de acuerdo con técnicas convencionales (Blood. 2005, 105, 2941-2948., Molecular Cancer Therapeutics. 2005, 4, 787-798).

Aquí en lo sucesivo, se va a describir un ejemplo de un método para determinar la actividad inhibidora de una cinasa de RET.

La actividad inhibidora de una cinasa de RET se puede determinar por medio de un ensayo de cinasa libre de células.

Una RET se puede preparar por unos medios de ingeniería genética de acuerdo con un método convencional. Por ejemplo, de acuerdo con el método del Sistema de Expresión de Baculovirus, la proteína de fusión de GST humana recombinante, la proteína de fusión de histidina y marca humana recombinante, u otra similar, puede ser expresada en una célula de insecto (*Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9)). Por lo demás, la proteína recombinante expresada se puede purificar por medio de una cromatografía de afinidad (p.ej., con GSH-agarosa (de Sigma) o con Ni-NTH-agarosa (de Qiagen)). La pureza y la identificación de la proteína se pueden confirmar mediante SDS-PAGE, tinción con plata y una transferencia de borrón Western usando un anticuerpo específico para RET.

El ensayo de cinasa libre de células se puede llevar a cabo de la siguiente manera.

En primer lugar, a cada pocillo de una placa (p.ej., de 96 pocillos, de 384 pocillos, etc.), se le pueden añadir secuencialmente una solución mezclada que incluye 20 μ l de una solución de reacción patrón, 5 μ l de una solución de ATP, 5 μ l de la sustancia de ensayo, y una solución mezclada que incluye 10 μ l de una solución que contiene 50 ng de la proteína RET recombinante y 10 μ l de una solución que contiene 125 ng de Poli(Glu, Tyr)_{4:1} biotilado.

Esta solución de reacción de una cinasa (50 μ l) puede contener 60 mM de HEPES-NaOH (de pH 7,5), 3 mM de MgCl₂, 3 mM de MnCl₂, 3 μ M de ortovanadato de Na, 1,2 mM de DTT, 50 μ g/ml de PEG₂₀₀₀₀ y 1 μ M de ATP. En este caso, se puede usar el ATP marcado con un isótopo radiactivo tal como [γ -³²P]-ATP o [γ -³³P]-ATP.

La solución de reacción se puede incubar durante un cierto período de tiempo, y luego se pueden añadir 50 µl de una solución al 2 % (v/v) de H₃PO₄ para terminar la reacción.

5 Cada pocillo puede ser sometido a un apropiado proceso de lavado.

La actividad inhibidora de una cinasa de RET se puede evaluar determinando la cantidad de incorporación de ATP. Cuando se usa el ATP marcado con un isótopo radiactivo, la cantidad de incorporación de ATP se puede evaluar determinando la radioactividad capturada sobre la placa con un contador de la escintilación.

10 De acuerdo con este método, se puede evaluar la actividad inhibidora de una cinasa de RET del compuesto.
(5) Agente terapéutico, composición farmacéutica y método terapéutico

15 El agente terapéutico del invento que comprende la sustancia inhibidora de una cinasa de RET es un agente destinado a su uso en un método para tratar por lo menos una enfermedad seleccionada entre el conjunto que se compone del carcinoma de tiroides medular familiar, del carcinoma de tiroides papilar y del carcinoma de tiroides medular esporádico. Por otra parte, el agente terapéutico del invento que comprende una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, como se ha definido en el presente texto, es un agente destinado a tratar un carcinoma de tiroides. Preferiblemente, el agente terapéutico del invento se usa para un carcinoma de tiroides que incluye una célula que expresa una RET mutante.

20 El agente terapéutico del invento puede ser administrado a un organismo vivo, es decir, un mamífero (p.ej., un ser humano, una rata, un conejo, un cordero, un cerdo, un bovino, un gato, un perro, un mono, etc.) que requiere el tratamiento de un carcinoma de tiroides.

25 La composición farmacéutica del invento destinada a su uso en un método para tratar un carcinoma de tiroides comprende una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, como se ha definido en el presente texto, para administrarla a un organismo que incluye una célula que expresa una RET mutante.

30 La composición farmacéutica del invento destinada a su uso en un método para tratar un carcinoma de tiroides se puede usar como un agente terapéutico destinado a tratar un carcinoma de tiroides expresando una RET mutante. Unos ejemplos de enfermedades que expresan una RET mutante incluyen el carcinoma de tiroides medular familiar, el carcinoma de tiroides, el carcinoma de tiroides papilar y el carcinoma de tiroides medular esporádico.

35 La composición farmacéutica del invento destinada a su uso en un método para tratar un carcinoma de tiroides puede ser administrado a un organismo vivo, es decir a un mamífero (p.ej., un ser humano, una rata, un conejo, un cordero, un cerdo, un bovino, un gato, un perro, un mono, etc.), incluyendo dicho organismo vivo una célula que expresa una RET mutante.

40 El agente terapéutico del invento se puede usar para mejorar los pronósticos, para prevenir la recurrencia u otra finalidad similar. A este respecto, el agente terapéutico puede comprender un agente antitumoral, un agente para suprimir metástasis de cáncer u otra finalidad similar.

45 El efecto de un tratamiento puede ser verificado por observación de una imagen de rayos X, una TC (tomografía computarizada) u otro proceso similar, por diagnóstico histopatológico de biopsia, o a partir del valor de un marcador de una enfermedad.

50 Cuando se usa un agente terapéutico o una composición farmacéutica del invento, la dosificación dada de la sustancia inhibidora de una cinasa de RET difiere dependiendo del grado del síntoma, de la edad, del sexo, del peso y de la diferencia de sensibilidades del paciente, del modo de administración, del período de administración, del intervalo de administración, de la naturaleza, de la prescripción y del tipo de la formulación farmacéutica, y del tipo del elemento activo. Usualmente, pero sin limitación, la dosificación de la sustancia inhibidora de una cinasa de RET es de 0,1-1.000 mg/día, preferiblemente de 0,5-100 mg/día, más preferiblemente de 1-30 mg/día para un adulto (con un peso de 60 kg), que se puede administrar de una a tres veces por día.

55 Aunque el agente terapéutico o la composición farmacéutica que comprende la sustancia inhibidora de una cinasa de RET del invento como un elemento activo se pueden usar a solas, usualmente se mezclan con unos apropiados aditivos y se pueden constituir en una formulación.

60 Ejemplos de dichos aditivos incluyen excipientes, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes desintegrantes, materiales colorantes, agentes saborizantes, agentes emulsionantes, agentes tensioactivos, agentes solubilizantes, agentes suspendedores, agentes de tonicidad, tampones, agentes antisépticos, agentes antioxidantes, agentes estabilizadores, agentes promotores de la absorción y otros similares que se usan generalmente para la medicina. Si

se requiere, ellos se pueden usar en combinación. Unos ejemplos de tales aditivos son como los que se exponen seguidamente.

5 Excipientes: lactosa, sacarosa, glucosa, almidón de maíz, manitol, sorbitol, un almidón, un alfa-almidón, una dextrina, una celulosa cristalina, ácido silícico anhidro ligero, silicato de aluminio, silicato de calcio, aluminometasilicato de magnesio e hidrógeno fosfato de calcio.

10 Agentes aglutinantes: por ejemplo, un poli(alcohol vinílico), una metil celulosa, una etil celulosa, una goma arábiga, un tragacanto, una gelatina, una goma laca, una hidroxipropil metilcelulosa, una hidroxipropilcelulosa, una carboximetilcelulosa de sodio, una poli(vinilpirrolidona) y un macrogol.

Agentes lubricantes: estearato de magnesio, estearato de calcio, estearil fumarato de sodio, talco, un poli(etilenglicol) y sílice coloidal.

15 Agentes desintegrantes: una celulosa cristalina, un agar, una gelatina, carbonato de calcio, hidrógeno carbonato de sodio, citrato de calcio, una dextrina, una pectina, una hidroxipropilcelulosa sustituida en bajo grado, una carboximetilcelulosa, una carboximetilcelulosa de calcio, croscarmellosa de sodio, un carboximetil almidón y un carboximetil almidón de sodio.

20 Materiales colorantes: óxido férrico, óxido férrico amarillo, carmín, caramelo, beta-caroteno, un óxido de titanio, talco, riboflavina fosfato de sodio, laca de aluminio amarilla y otros similares que hayan sido aprobados como aditivos en medicina.

25 Agentes saborizantes: un polvo de cacao, mentol, un polvo aromático, un aceite de menta piperita, alcanfor y un polvo de canela.

Agentes emulsionantes o tensioactivos: estearil trietanolamina, lauril sulfato de sodio, un laurilaminopropionato, lecitina, monoestearato de glicerina, un éster de ácido graso de sacarosa y un éster de ácido graso de glicerina.

30 Agentes solubilizantes: un poli(etilenglicol), propilen glicol, benzoato de bencilo, etanol, colesterol, trietanolamina, carbonato de sodio, citrato de sodio, un Polisorbato 80 y amida de ácido nicotínico.

35 Agentes suspendedores: además de los agentes tensioactivos mencionados con anterioridad, polímeros hidrófilos tales como un poli(alcohol vinílico), una poli(vinilpirrolidona), una metilcelulosa, una hidroximetilcelulosa, una hidroxietilcelulosa y una hidroxipropilcelulosa.

Agentes de tonicidad: glucosa, cloruro de sodio, manitol y sorbitol.

40 Tampones: unos tampones hechos de fosfato, acetato, carbonato y citrato.

Agentes antisépticos: metilparabeno, propilparabeno, clorobutanol, alcohol bencílico, alcohol fenético, ácido deshidroacético y ácido sórbico.

45 Agentes antioxidantes: un hidrosulfato, ácido ascórbico y alfa-tocoferol.

Agentes estabilizadores: los generalmente usados para medicina.

Agentes promotores de la absorción: los generalmente usados para medicina.

50 Si se requiere, se pueden mezclar unos componentes tales como vitaminas y aminoácidos.

55 Unos ejemplos de formulaciones incluyen unas formulaciones orales, tales como tabletas, agentes dispersantes, gránulos, gránulos finos, cápsulas, jarabes, pastillas rómbicas y formulaciones para inhalar; unas formulaciones externas tales como supositorios, ungüentos, ungüentos oculares, tiras de cataplasmas, gotas oculares, gotas nasales, gotas para los oídos, parches cutáneos y lociones; y formulaciones inyectables.

Las formulaciones orales mencionadas más arriba se pueden formular combinando apropiadamente los aditivos mencionados más arriba. Si fuese necesario, la superficie de estas formulaciones puede ser revestida.

60 Las formulaciones externas mencionadas más arriba se pueden formular combinando apropiadamente los aditivos mencionados más arriba, particularmente excipientes, agentes aglutinantes, agentes saborizantes, agentes emulsionantes, agentes tensioactivos, agentes solubilizantes, agentes suspendedores, agentes de tonicidad, agentes antisépticos, agentes antioxidantes, agentes estabilizadores y agentes promotores de la absorción.

5 Las formulaciones inyectables mencionadas más arriba se pueden formular combinando apropiadamente los aditivos mencionados más arriba, particularmente agentes emulsionantes, agentes tensioactivos, agentes solubilizantes, agentes suspendedores, agentes de tonicidad, tampones, agentes antisépticos, agentes antioxidantes, agentes estabilizadores y agentes promotores de la absorción. Las formulaciones inyectables se pueden usar mediante unos medios tales como los de infusión, inyección intramuscular, inyección subcutánea, inyección intradérmica e inyección intravenosa.

10 La presente divulgación se refiere a un método para tratar por lo menos una enfermedad seleccionada entre el conjunto que se compone del carcinoma de tiroides medular familiar, del carcinoma de tiroides papilar y del carcinoma de tiroides medular esporádico, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, como se ha definido en el presente texto, a un paciente. La presente divulgación también se refiere a un método para tratar un carcinoma de tiroides, que comprende administrar una cantidad eficaz de una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, como se ha definido en el presente texto, a un paciente.

15 La presente divulgación se refiere además a un método para tratar un carcinoma de tiroides, que comprende administrar una cantidad eficaz de una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, como se ha definido en el presente texto, a un organismo que incluye una célula que expresa una RET mutante. De acuerdo con la presente divulgación, dicha enfermedad es preferiblemente por lo menos una enfermedad seleccionada entre el conjunto que se compone del carcinoma de tiroides medular familiar, del carcinoma de tiroides, del carcinoma de tiroides papilar y del carcinoma de tiroides medular esporádico.

20 De acuerdo con el método terapéutico de la presente divulgación, la ruta y el método para administrar la sustancia inhibidora de una cinasa de RET no se limitan particularmente y se puede hacer referencia a la descripción del agente terapéutico o la composición farmacéutica anteriores.

25 El presente invento comprende el uso de una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, como se ha definido en el presente texto, para producir un agente terapéutico destinado a tratar por lo menos una enfermedad seleccionada entre el conjunto que se compone del carcinoma de tiroides medular familiar, del carcinoma de tiroides papilar y del carcinoma de tiroides medular esporádico. El presente invento también comprende el uso de una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, como se ha definido en el presente texto, para producir un agente terapéutico destinado a tratar un carcinoma de tiroides.

30 El presente invento comprende además el uso de una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, como se ha definido en el presente texto, para producir una composición farmacéutica destinada a su uso en un método para tratar un carcinoma de tiroides, comprendiendo la composición a la sustancia inhibidora de una cinasa de RET para administrarla a un organismo que incluye una célula que expresa una RET mutante. La composición farmacéutica es efectiva como un agente destinado a tratar por lo menos una enfermedad seleccionada entre el conjunto que se compone del carcinoma de tiroides medular familiar, del carcinoma de tiroides, del carcinoma de tiroides papilar y del carcinoma de tiroides medular esporádico.

35 El presente invento comprende una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, como se ha definido en el presente texto, para un agente terapéutico destinado a tratar por lo menos una enfermedad seleccionada entre el conjunto que se compone del carcinoma de tiroides medular familiar, del carcinoma de tiroides papilar y del carcinoma de tiroides medular esporádico. Además de ello, el presente invento comprende una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, como se ha definido en el presente texto, para un agente terapéutico destinado a tratar un carcinoma de tiroides.

40 Por lo demás, el presente invento comprende una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, como se ha definido en el presente texto, para una composición farmacéutica destinada a su uso en un método para tratar un carcinoma de tiroides, comprendiendo la composición a la sustancia inhibidora de una cinasa de RET para administrarla a un organismo que incluye una célula que expresa una RET mutante. De acuerdo con el presente invento, dicha composición farmacéutica es útil como un agente terapéutico destinado a tratar por lo menos una enfermedad seleccionada entre el conjunto que se compone del carcinoma de tiroides medular familiar, del carcinoma de tiroides, del carcinoma de tiroides papilar y del carcinoma de tiroides medular esporádico.

45 De acuerdo con el presente invento, el agente inhibidor de una cinasa de RET comprende preferiblemente la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida, una sal farmacológicamente aceptable de ella o un solvato de ella.

50 En un aspecto del invento, el agente inhibidor de una cinasa de RET comprende la N-{2-cloro-4-[(6,7-dimetoxi-4-quinolil)oxi]fenil}-N'-(5-metil-3-isoxazolil)urea (KRN951), una sal farmacológicamente aceptable de ella o un solvato de ella.

La actividad inhibidora de una cinasa de RET del agente inhibidor de una cinasa de RET destinado a usarse en el invento se puede determinar como se ha descrito más arriba.

5 El compuesto se puede usar o bien a solas o mezclado con unos apropiados aditivos mencionados más arriba y transformado en una formulación, como el agente inhibidor de una cinasa de RET del invento.

En cuanto al uso y a la dosificación del agente inhibidor de una cinasa de RET del invento, se puede hacer referencia a la descripción del agente terapéutico o de la composición farmacéutica anteriores.

10 El presente invento también comprende el uso de por lo menos un compuesto seleccionado entre el conjunto que se compone de:

la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida;

una sal farmacológicamente aceptable de ella o un solvato de ella.

15 la 4-(3-cloro-4-(etilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida;

la N6-metoxi-4-(3-cloro-4-(((ciclopropilamino)carbonil)amino)fenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida;

la 4-(3-cloro-4-(metilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida;

la N6-metoxi-4-(3-cloro-4-(((etilamino)carbonil)amino)fenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida; y

la KRN951,

20 una sal farmacológicamente aceptable de ella o un solvato de ella, para producir un agente inhibidor de una cinasa de RET.

La presente divulgación comprende además un método para inhibir a la cinasa de RET con por lo menos un compuesto seleccionado entre el conjunto que se compone de:

25 la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida;

la 4-(3-cloro-4-(etilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida;

la N6-metoxi-4-(3-cloro-4-(((ciclopropilamino)carbonil)amino)fenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida;

la 4-(3-cloro-4-(metilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida;

la N6-metoxi-4-(3-cloro-4-(((etilamino)carbonil)amino)fenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida; y

30 la KRN951,

una sal farmacológicamente aceptable de ella o un solvato de ella. De acuerdo con el método, el uso y la dosificación del compuesto no se limitan particularmente y se puede hacer referencia a la descripción del agente terapéutico o de la composición farmacéutica citados más arriba.

35 2. Método para Predecir la Sensibilidad

La presente divulgación proporciona un método para predecir si un paciente es o no altamente sensible a una sustancia inhibidora de una cinasa de RET destinada a usarse en el invento usando la presencia o la ausencia de una mutación de RET en la célula como una indicación. El efecto terapéutico de una sustancia inhibidora de una cinasa de RET es más prospectivo para unos pacientes que son altamente sensibles a dicha sustancia inhibidora de una cinasa de RET.

40 una cinasa de RET es más prospectivo para unos pacientes que son altamente sensibles a dicha sustancia inhibidora de una cinasa de RET.

De acuerdo con el método de la presente divulgación, un paciente es un paciente sufre de por lo menos una enfermedad seleccionada entre el conjunto que se compone del carcinoma de tiroides medular familiar, del carcinoma de tiroides, del carcinoma de tiroides papilar y del carcinoma de tiroides medular esporádico.

45 del carcinoma de tiroides, del carcinoma de tiroides papilar y del carcinoma de tiroides medular esporádico.

(1) Etapa de determinar la presencia o la ausencia de una mutación de RET en la célula

En esta etapa, la célula es extraída preferiblemente a partir del paciente. La célula se puede obtener, por ejemplo, retirándola desde un paciente por medio de un proceso quirúrgico (p.ej., una biopsia, etc.). Preferiblemente, se usan células sanguíneas para unas enfermedades inducidas por unas variaciones genéticas tales como el carcinoma de tiroides medular familiar, un carcinoma de tiroides y el carcinoma de tiroides papilar.

50 retirándola desde un paciente por medio de un proceso quirúrgico (p.ej., una biopsia, etc.). Preferiblemente, se usan células sanguíneas para unas enfermedades inducidas por unas variaciones genéticas tales como el carcinoma de tiroides medular familiar, un carcinoma de tiroides y el carcinoma de tiroides papilar.

La presencia o la ausencia de una mutación de RET se pueden determinar de acuerdo con el método que se ha descrito más arriba.

55 La presencia o la ausencia de una mutación de RET se pueden determinar de acuerdo con el método que se ha descrito más arriba.

(2) Etapa de predecir si un paciente es o no altamente sensible a una sustancia inhibidora de una cinasa de RET

En esta etapa, se puede predecir si un paciente es altamente sensible a una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, como se ha definido en el presente texto, preferiblemente usando la presencia o la ausencia de una mutación de RET en la célula determinada en (1) como una indicación. Específicamente, cuando la célula determinada está expresando una RET mutante, se juzga que el paciente es altamente sensible a la sustancia inhibidora de una cinasa de RET.

60 En esta etapa, se puede predecir si un paciente es altamente sensible a una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, como se ha definido en el presente texto, preferiblemente usando la presencia o la ausencia de una mutación de RET en la célula determinada en (1) como una indicación. Específicamente, cuando la célula determinada está expresando una RET mutante, se juzga que el paciente es altamente sensible a la sustancia inhibidora de una cinasa de RET.

Otro aspecto de la presente divulgación es un método para analizar la sensibilidad de una célula a una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, como se ha definido en el presente texto, usando el resultado de la determinación en (1) como una indicación. Específicamente, cuando la célula está expresando una RET mutante tomando como base los resultados de las determinaciones en (1), se juzga que esta célula es más sensible a la sustancia inhibidora de una cinasa de RET cuando se la compara con unas células que no expresan la RET mutante.

Todavía otro aspecto de la presente divulgación es un método para seleccionar una célula o un paciente que es altamente sensible a una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, como se ha definido en el presente texto, usando el resultado de la determinación en (1) como una indicación. Específicamente, cuando la célula está expresando una RET mutante como se ha determinado a partir de los resultados en (1), se juzga que esta célula o un paciente que tiene esta célula, es altamente sensible a la sustancia inhibidora de una cinasa de RET. Por lo tanto, se puede seleccionar dicha célula o dicho paciente como una célula o un paciente que es altamente sensible a la sustancia inhibidora de una cinasa de RET.

Aún todavía otro aspecto de la presente divulgación es un método para clasificar a unos pacientes mediante el análisis de la sensibilidad a una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, como se ha definido en el presente texto, usando el resultado de la determinación en (1) como una indicación. Específicamente, de acuerdo con el método, se analiza la sensibilidad de unos pacientes a la sustancia inhibidora de una cinasa de RET basándose en el resultado de las determinaciones en (1) como se ha descrito más arriba, y los pacientes que tienen la célula que interesa pueden ser clasificados de acuerdo con este resultado. Por ejemplo, los pacientes pueden ser clasificados en un grupo que incluye unas células que expresan una RET mutante y un grupo sin dichas células. Alternativamente, los pacientes pueden ser clasificados en un grupo que es altamente sensible a una sustancia inhibidora de una cinasa de RET y en un grupo de otros.

Aún todavía otro aspecto de la presente divulgación es un método para seleccionar a un paciente para administrarle una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, como se ha definido en el presente texto, comprendiendo el método seleccionar a un paciente que tiene una célula que expresa una RET mutante basándose en los resultados de la determinación en (1). Los pacientes que tienen una célula que expresa una RET mutante pueden ser un objetivo pensado para administrarle la sustancia inhibidora de una cinasa de RET.

Aún todavía otro aspecto de la presente divulgación es un método para predecir el efecto terapéutico de la sustancia inhibidora de una cinasa de RET en un paciente basándose en los resultados de la determinación en (1). De acuerdo con el método, cuando la célula está expresando una RET mutante como se determina a partir de los resultados en (1), se juzga que la célula es altamente sensible a la sustancia inhibidora de una cinasa de RET, y por lo tanto se predice que el efecto terapéutico de esta sustancia inhibidora de una cinasa de RET es alto en la célula o en un paciente que tiene esta célula.

La presente divulgación también se refiere a un método para determinar la presencia o la ausencia de una mutación de RET en la célula que se deriva de un paciente para predecir el nivel de sensibilidad del paciente a la sustancia inhibidora de una cinasa de RET. Este método de determinación es como se ha descrito en (1) más arriba.

La determinación de la presencia o la ausencia de una mutación de RET hace posible la predicción del nivel de sensibilidad de un paciente a la sustancia inhibidora de una cinasa de RET.

En esta etapa, aunque la sustancia inhibidora de una cinasa de RET es como se ha descrito más arriba, preferiblemente ella es la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida, una sal farmacológicamente aceptable de ella o un solvato de ella.

El método de la presente divulgación se puede emplear para predecir el nivel de la eficacia de la sustancia inhibidora de una cinasa de RET en un paciente antes de administrarle la sustancia inhibidora de una cinasa de RET al paciente. Por lo tanto, unos pacientes de los que se espera que sean más susceptibles a la sustancia inhibidora de una cinasa de RET se pueden seleccionar para llevar a cabo el tratamiento de la enfermedad. Por lo tanto, la presente divulgación es altamente eficaz desde el aspecto clínico.

La presente divulgación proporciona un estuche de ensayo para determinar la presencia o la ausencia de una mutación de RET que se usa para el método de la presente divulgación. El estuche de ensayo comprende los reactivos mencionados más arriba que se usan para la determinación. El estuche de ensayo permite la predicción de si un paciente es o no altamente sensible a la sustancia inhibidora de una cinasa de RET.

La presente divulgación también se refiere al uso del estuche de ensayo para la predicción que se ha mencionado más arriba.

Aquí en lo sucesivo, el presente invento será ilustrado por intermedio de unos específicos ejemplos, aunque el invento no debería ser limitado a ellos.

5 EJEMPLO 1: Determinación de la actividad inhibidora de una cinasa de RET de la sustancia inhibidora de una cinasa de RET (Ejemplo de referencia)

Las actividades inhibidoras de la cinasa de RET de unas sustancias de ensayo se ensayaron por medio de una ProQinase (Freiburg, Alemania, GmbH) a petición nuestra. Para ser más precisos, la actividad inhibidora de una cinasa de RET se determinó de la siguiente manera.

1. Expresión y purificación de una RET

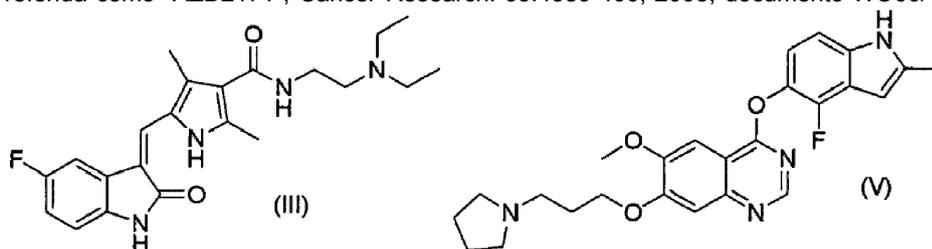
Una RET fue expresada como una proteína de fusión con GST recombinante humana (aquí en lo sucesivo, también referida como "proteína recombinante RET") en una célula de insecto (*Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9)) de acuerdo con el método del Sistema de Expresión de Baculovirus. La proteína recombinante RET expresada fue purificada por cromatografía de afinidad usando una GSH-agarosa (de Sigma) o una Ni-NTH-agarosa (de Qiagen). La pureza y la identificación de la proteína se pueden confirmar por una tinción con plata por SDS-PAGE y una transferencia de borrón Western usando un anticuerpo específico para RET.

2. Determinación de la actividad inhibidora de la actividad de la cinasa de RET

En primer lugar, a cada pocillo de una FlashPlate de 96 pocillos revestida con estreptavidina (de Perkin Elmer/NEM), se le añadieron consecutivamente 20 µl de una solución de reacción patrón, 5 µl de una solución de ATP (diluida con H₂O), 5 µl de la sustancia de ensayo (como una solución acuosa al 10 % en dimetilsulfóxido) y una solución mezclada que incluía 10 µl de una solución que contenía 50 ng de la proteína recombinante RET y 10 µl de una solución que contenía 125 ng de Poli(Glu, Tyr)_{4:1} biotinilado. Esta solución de reacción de cinasa (50 µl) contenía 60 mM de HEPES-NaOH (pH 7,5), 3 mM de MgCl₂, 3 mM de MnCl₂, 3 µM ortovanadato de Na, 1,2 mM de DTT, 50 µg/ml de PEG₂₀₀₀₀, y 1 µM de [γ-³³P]-ATP.

Como las sustancias de ensayo se usaron las siguientes:

- (a) la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida (metanosulfonato);
 (b) el 6-[2-(metilcarbamoil)fenilsulfanil]-3-E-[2-(piridin-2-il)etenil]indazol (aquí en lo sucesivo, también referido como "AG013736"),
 (c) la (2-dietilaminoetil)amida del ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-3-ilidenmetil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (aquí en lo sucesivo, también referida como "SU11248"; Clinical Cancer Research, 9, 327-337, 2003, Journal of Medicinal Chemistry., 46: 1116-9, 2003., documento WO01/060814) (véase la Fórmula (III))
 (d) la KRN951; o
 (e) la 4-[(4-fluoro-2-metilindol-5-il)oxi]-6-metoxi-7-[3-(pirrolidin-1-il)propoxi] quinazolina (aquí en lo sucesivo, también referida como "AZD2171"; Cancer Research. 65:4389-400, 2005, documento WO00/47212) (véase la Fórmula (V))



La 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida se produjo de acuerdo con las descripciones de la publicación de patente internacional N° 02/32872 documento (WO02/32872) y de la publicación de patente internacional N° 2005/063713 documento (WO2005/063713).

El AG013736 se produjo basándose en la descripción de la publicación de patente internacional N° 01/002369 documento (WO01/002369). La SU11248 se produjo basándose en la descripción de la publicación de patente internacional N° 01/060814 documento (WO01/060814). La KRN951 se produjo basándose en la descripción de la publicación de patente internacional N° 02/088110 documento (WO02/088110). La AZD2171 se produjo basándose en la descripción de la publicación de patente internacional N° 00/47212 documento (WO00/47212).

Seguidamente, la solución de reacción fue incubada a 30°C durante 80 minutos, después de lo cual se añadieron 50 µl de una solución al 2 % (v/v) de H₃PO₄ para terminar la reacción.

La placa de 96 pocillos fue lavada y aspirada dos veces con 200 μ l de una solución al 0,9 % (p/v) de NaCl.

5 La cantidad de la incorporación de $^{33}\text{P}_i$ se puede evaluar determinando la radiactividad sobre la placa con un contador de la escintilación sobre una microplaca (de Microbeta, Wallac).

La manipulación fue realizada con un sistema robótico de BeckmanCoulter/Sagian.

10 La concentración de la sustancia de ensayo que se requería con el fin de inhibir la actividad de una cinasa de RET en un 50 % (IC_{50}) fue calculada usando una radiactividad específica de ^{33}P en concentraciones variables (10 valores puntuales variando desde 10 μM hasta 0,0003 μM) con el Prism 3.03 (de Windows, Graphpad, San Diego, California, EE.UU.).

15 En este caso, se supuso que era de 0 % el valor obtenido para el caso de que se añadiese solamente el substrato Poli(Glu, Tyr) $_{4:1}$ (sin la adición de la proteína recombinante RET) mientras que se supuso que era de 100 % el valor obtenido para el caso de que se añadiesen la proteína recombinante RET y el substrato Poli(Glu, Tyr) $_{4:1}$ (sin la adición de la sustancia de ensayo).

20 La actividad como cinasa en la presencia de la sustancia de ensayo en cada concentración fue evaluada como el porcentaje del valor obtenido restando el valor de 0 % desde el valor de la radiactividad con respecto del valor obtenido restando el valor de 0 % desde el valor de 100 %. Basándose en este porcentaje (%), se calculó la concentración de la sustancia de ensayo que se requería con el fin de inhibir la actividad de la cinasa de RET en un 50 % (IC_{50}).

25 Como un resultado de ello, se encontró que la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida tiene una actividad inhibitoria de una cinasa de RET (IC_{50} = 35 nM) Además de ello, se encontró que la SU11248, la KRN951 y la AZD2171 tienen una actividad inhibitoria de una cinasa de RET (IC_{50} = 64, 92 y 75 nM, respectivamente). El AG013736 tiene una IC_{50} de 5.600 nM. Por lo demás, las sustancias de ensayo diferían en el nivel de la actividad inhibitoria de una cinasa de RET.

30 EJEMPLO 2: Efecto de una sustancia inhibitoria de una cinasa de RET sobre una fosforilación RET que es independiente del ligando en el linaje celular (TT) del carcinoma de tiroides medular humano

35 1. Preparación de un extracto de células

El linaje celular del carcinoma de tiroides medular humano (TT, adquirido de ATCC) fue suspendido en el medio RPMI1640 que contenía 15 % de FBS (adquirido de Sigma). TT es una célula que expresa una RET en donde la cisteína situada en el codón 634 en la secuencia de aminoácidos de RET de tipo salvaje ha sido mutada con triptófano (Biochemical and Biophysical Research Communications, 207, 1022-1028, 1995). Dos ml de esta suspensión de células por pocillo (4×10^5 células/ml) se añadieron a una placa de cultivo de células con 6 pocillos (adquirida de FALCON), y se cultivaron en una incubadora con CO_2 al 5 % (37°C) durante una noche. Después de una cultivación, el material sobrenadante se retiró de cada pocillo y se añadieron 1,8 ml del medio RPMI1640 que contenía 15 % de FBS. Luego, se añadieron 0,2 ml de la sustancia de ensayo 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida (metanosulfonato) (diluida en el medio RPMI1640 que contenía 15 % de FBS) disuelta en dimetilsulfóxido y se cultivaron en una incubadora con CO_2 al 5 % (37°C) durante una hora. El material sobrenadante se retiró de cada pocillo, que fue luego lavado con 400 μ l, de PBS, y añadido con 100 μ l de un tampón solubilizante (50 mM de Hepes (pH 7,4), 150 mM de NaCl, 10 % (v/v) de glicerol, 1 % de Triton X-100, 1,5 mM de MgCl_2 , 1 mM de EDTA (pH 8,0), 100 mM de NaF, 1 mM de PMSF, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Aprotinina, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Leupeptina, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Pepstatina A y 1 mM de Na_3VO_4). Las células presentes en esta solución se cosecharon con un dispositivo raspador y se trataron a 15.000 rpm y 4°C durante 15 minutos. Se añadió un tampón SDS al material sobrenadante y se sometió a un tratamiento a 94°C durante 5 minutos para solubilizar la proteína, que fue luego preparada a razón de 20 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$, como un extracto de células.

55 2. Electroforesis y transferencia de borrón Western

El extracto de células (20 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) fue sometido a una electroforesis en un gel de poliacrilamida con un gradiente de 4-20 % (adquirido de Daiichi Pure Chemicals), seguida por una transferencia en una membrana de PVDF (adquirida de Amersham farmacia biotech) por una técnica convencional. Luego, la membrana transferida fue sometida a una inmunotransferencia usando un anticuerpo anti-RET (anti-RET, adquirido de Cell Signalling), un anticuerpo anti-RET fosforilada (anti-fosfo RET (Tyr 905), adquirido de Cell Signalling), un anticuerpo anti-Erk1/2 (anti-Erk1/2, adquirido de Cell Signalling) o un anticuerpo anti-Erk1/2 fosforilada (anti-fosfo-Erk1/2, adquirido de Cell Signalling) como anticuerpo primario, y un anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa de rábano rusticano (Anticuerpo anti-IgG de conejo, engarzado con HRP (adquirido de Cell Signalling)) como anticuerpo secundario. La membrana fue lavada y luego tratada con Super Señal (adquirido de PIERCE) para el revelado del color.

La actividad de autofosforilación de una RET (en %) de cada pista se determinó suponiendo que la absorbencia del extracto de células, libre de la sustancia de ensayo, que se había añadido a un pocillo era una actividad de autofosforilación de una RET de 100 %. La actividad de autofosforilación de una RET (en %) se determinó mientras que se hacía variar escalonadamente la concentración de la sustancia de ensayo para calcular la concentración (en %) de la sustancia de ensayo que se requería para inhibir en un 50 % la actividad de autofosforilación de una RET (IC₅₀).

Como un resultado de ello, la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolina-carboxamida inhibe a la fosforilación de una RET de una manera dependiente de la concentración (IC₅₀ = 27 nM) (Figura 1). Además de ello, también se encontró que la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolina-carboxamida inhibe una fosforilación de una de las moléculas situadas corriente abajo de RET, Erk1/2, que está asociada con una señal de crecimiento de células, en una concentración similar a la usada para la cinasa de RET (Figura 1).

EJEMPLO 3: Efecto de una sustancia inhibidora de una cinasa de RET sobre el crecimiento de células del el linaje celular (TT) del carcinoma de tiroides medular humano

El linaje celular del carcinoma de tiroides medular humano (TT, adquirido de ATCC) fue suspendido en el medio RPMI1640 que contenía 15 % de FBS (adquirido de Sigma). 0,1 ml por pocillo de esta suspensión de células (3 x 10⁴ células/ml) se añadieron a una placa de cultivo de células de 96 pocillos (adquirido de NUNC), y se cultivaron en una incubadora con CO₂ al 5 % (37°C) durante una noche. Después de la cultivación, se añadieron a cada pocillo 0,1 ml de la sustancia de ensayo 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida (metanosulfonato) diluida en el medio RPMI1640 que contenía 15 % de FBS y se cultivaron ulteriormente en una incubadora con CO₂ al 5 % (37°C) durante 10 días. Después de la cultivación, se añadieron a cada pocillo 10 µl de Cell Counting Kit-1 (adquirido de DOJINDO), tratado en una incubadora con CO₂ al 5 % (37°C) para el revelado del color y se determinó la absorbencia de cada pocillo con el lector de placas MTP-500 (de Corona Electric) en la longitud de onda de medición de 415 nm y la longitud de onda de referencia de 660 nm. Se determinó el porcentaje (en %) de la absorbencia de cada pocillo con la sustancia de ensayo comparándolo con la absorbencia de un pocillo sin la sustancia de ensayo, basándose en lo cual se determinó la concentración de la sustancia de ensayo que se requería con el fin de inhibir el crecimiento de células en un 50 % (IC₅₀).

Como un resultado de ello, se encontró que la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida tiene una actividad inhibidora de IC₅₀ = 78 nM contra el crecimiento del linaje celular (TT) del carcinoma de tiroides medular humano.

EJEMPLO 4: Efecto antitumoral de una sustancia inhibidora de una cinasa de RET en un modelo para el trasplante subcutáneo del linaje celular (TT) del carcinoma de tiroides medular humano.

El linaje celular del carcinoma de tiroides medular humano. (TT, adquirido de ATCC) se cultivó a 37°C en un medio RPMI1640 (que contenía 15 % de FBS) en una incubadora con CO₂ al 5 % hasta una confluencia de aproximadamente 80 %, y las células se cosecharon con tripsina-EDTA de acuerdo con un método general. Las células se suspendieron en un tampón de fosfato para preparar una suspensión de 1 x 10⁶ células/ml. 0,1 ml cada una de las resultantes suspensiones de células se trasplantaron por vía subcutánea a un ratón desprovisto de inmunidad en el costado de su cuerpo (adquirido de Charles River).

Una vez que el volumen de un tumor llegó a aproximadamente 100-200 mm³ después del trasplante, se administró por vía oral la sustancia de ensayo 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida (metanosulfonato) a razón de 10 mg/kg, 30 mg/kg o 100 mg/kg, una vez por día, durante cuatro semanas. Los ejes mayor y menor de los tumores se midieron con un calibre Digimatic (de Mitsutoyo), y los volúmenes de los tumores se calcularon de acuerdo con la siguiente fórmula.

$$\text{Volumen de un tumor (TV)} = \text{Eje mayor del tumor (en mm)} \times (\text{Eje menor del tumor})^2 \text{ (en mm}^2\text{)} / 2$$

Como un resultado de ello, se encontró que la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida tiene un efecto antitumoral dependiente de la dosis en un modelo para el trasplante subcutáneo del linaje celular (TT) del carcinoma de tiroides medular humano (Figura 2).

EJEMPLO 5: Efecto de una sustancia inhibidora de una cinasa de RET sobre la fosforilación de RET en un modelo para el trasplante subcutáneo del linaje celular (TT) del carcinoma de tiroides medular humano

El linaje celular del carcinoma de tiroides medular humano. (TT, adquirido de ATCC) se cultivó a 37°C en un medio RPMI1640 (que contenía 15 % de FBS) en una incubadora con CO₂ al 5 % hasta una confluencia de aproximadamente 80 %, y las células se cosecharon con tripsina-EDTA de acuerdo con un método general. Las

células se suspendieron en un tampón de fosfato para preparar una suspensión de 1×10^8 células/ml. 0,1 ml cada una de las resultantes suspensiones de células se trasplantaron por vía subcutánea a un ratón desprovisto de inmunidad en el costado de su cuerpo (adquirido de Charles River).

5 Una vez que el volumen de un tumor llegó a aproximadamente $100-200 \text{ mm}^3$ después del trasplante, se administró por vía oral la sustancia de ensayo 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida (metanosulfonato) a razón de 10 mg/kg, 30 mg/kg o 100 mg/kg. Los tumores se reseccionaron a las 2, 8, 12 ó 24 horas después de la administración, y a ellos se les añadieron un tampón solubilizante (50 mM de Hepes (pH 7,4), 150 mM de NaCl, 10 % (v/v) de glicerol, 1 % de Triton X-100, 1,5 mM de MgCl_2 , 1 mM de EDTA (pH 8,0), 100 mM de NaF, 1 mM de PMSF, 10 $\mu\text{g/ml}$ de Aprotinina, 50 $\mu\text{g/ml}$ de Leupeptina, 1 $\mu\text{g/ml}$ de Pepstatina A, 1 mM de Na_3VO_4), 25 mM de β -glicerofosfato, y el cóctel II de inhibidores de fosfatasa (de SIGMA)) y se homogeneizó. El tratamiento a 15.000 rpm y 4°C durante 15 minutos y la adición de un tampón de SDS al material sobrenadante fueron seguidos por un tratamiento a 94°C durante 5 minutos para solubilizar a la proteína a razón de 20 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ con el fin de preparar el extracto de células. El extracto de células fue sometido a una electroforesis y a una inmunotransferencia de la misma manera que en el Ejemplo 2.

Como un resultado de ello, se encontró que la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida tiene una actividad inhibidora de la autofosforilación de una RET en la dosis que se encontró que ejerce un efecto antitumoral en el modelo para el trasplante subcutáneo del linaje celular (TT) del carcinoma de tiroides medular humano (Figura 3).

A partir de estos resultados, se mostró que se esperaba que la sustancia inhibidora de una cinasa de RET destinada a usarse en el invento sea más eficaz para unos organismos que comprenden unas células que expresan una RET mutante. Se demostró también que la sustancia inhibidora de una cinasa de RET destinada a usarse en el invento es útil como un agente terapéutico destinado a tratar por lo menos una enfermedad seleccionada entre el conjunto que se compone del carcinoma de tiroides medular familiar, del carcinoma de tiroides papilar y del carcinoma de tiroides medular esporádico, así como del carcinoma de tiroides.

[Ejemplo de referencia]

Aquí en lo sucesivo, se describirá un método para producir una formulación de una de las sustancias inhibidoras de la cinasa de RET, la 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida como un ejemplo de referencia.

(Producción de una composición farmacéutica)

(1) Tableta de 1 mg

24 g de crystal (C) de metanosulfonato de 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida (aquí en lo sucesivo, también referida como "crystal (C)", que se produjo de acuerdo con el método que se ha descrito en el Ejemplo 7 del documento WO2005/063713) y 192 g de ácido silícico anhidro ligero (agente antigelificante vendido bajo la marca comercial de AEROSIL (marca comercial registrada) 200, de Nippon Aerosil) se mezclaron con 20 l de Super Mixer, y luego se añadieron ulteriormente 1.236 g de D-manitol (excipiente, de Towa-Kasei), 720 g de celulosa cristalina (excipiente vendido bajo la marca comercial de Avicel PH101, de Asahi Kasei) y 72 g de una hidroxipropilcelulosa (agente aglutinante vendido bajo la marca comercial de HPC-L, de Nippon Soda) y se mezclaron conjuntamente. Subsiguientemente, se añadió una cantidad apropiada de etanol anhidro para obtener un cuerpo granulado que contenía crystal (C). Este cuerpo granulado se secó en un secador de estantes (a 60°C), y luego se reguló en cuanto al tamaño usando un Power Mill (molino enérgico) para obtener gránulos. Conjuntamente con los gránulos, se colocaron 120 g de croscarmellosa de sodio (agente desintegrante vendido bajo la marca comercial de Ac-Di-Sol, FMC International Inc.) y 36 g de estearil fumarato de sodio (agente lubricante, de JRS Pharma LP) y se mezclaron conjuntamente en un mezclador volteador con una capacidad de 20 l, y se moldearon con una máquina para producir tabletas con el fin de obtener tabletas con una masa total de 100 mg por tableta. Por lo demás, las tabletas se revistieron usando una solución acuosa al 10 % de Opadry yellow (OPADRY 03F42069 YELLOW, de Colorcon Japón) como una solución de revestimiento con una máquina para revestir tabletas, obteniendo de esta manera unas tabletas revestidas con una masa total de 105 mg por tableta.

(2) Tableta de 10 mg

60 g de crystal (C) y 192 g de ácido silícico anhidro ligero (agente antigelificante vendido bajo la marca comercial de AEROSIL (marca comercial registrada) 200, de Nippon Aerosil) se mezclaron con 20 l de Super Mixer, y luego se añadieron ulteriormente 1.200 g de D-manitol (excipiente, de Towa-Kasei), 720 g de celulosa cristalina (excipiente vendido bajo la marca comercial de Avicel PH101, de Asahi Kasei) y 72 g de una hidroxipropilcelulosa (agente aglutinante vendido bajo la marca comercial de HPC-L, de Nippon Soda) y se mezclaron conjuntamente. Subsiguientemente, se añadió una cantidad apropiada de etanol anhidro para obtener un cuerpo granulado que

5 contenía crystal (C). Este cuerpo granulado se secó en un secador de estantes (a 60°C), y luego se reguló en cuanto al tamaño usando un Power Mill para obtener gránulos. Conjuntamente con los gránulos, se colocaron 120 g de croscarmellosa de sodio (agente desintegrante vendido bajo la marca comercial de Ac-Di-Sol, FMC International Inc.) y 36 g de estearil fumarato de sodio (agente lubricante, de JRS Pharma LP) y se mezclaron conjuntamente en un mezclador volteador con una capacidad de 20 l, y se moldearon con una máquina para producir tabletas con el fin de obtener tabletas con una masa total de 400 mg por tableta. Por lo demás, las tabletas se revistieron usando una solución acuosa al 10 % de Opadry yellow (OPADRY 03F42069 YELLOW, de Colorcon Japón) como una solución de revestimiento con una máquina para revestir tabletas, obteniendo de esta manera unas tabletas revestidas con una masa total de 411 mg por tableta.

10 (3) Tableta de 100 mg

15 31,4 g de crystal (C) y 4 g de ácido silícico anhidro ligero (agente antigelificante vendido bajo la marca comercial de AEROSIL (marca comercial registrada) 200, de Nippon Aerosil) se mezclaron con 1 l de Super Mixer, y luego se añadieron ulteriormente 40,1 g de hidrógeno fosfato de calcio anhidro (excipiente, Kyowa Chemical Industry), 10 g de una hidroxipropilcelulosa sustituida en bajo grado (agente aglutinante vendido bajo la marca comercial de L-HPC (LH-21), de Shin-Etsu Chemical) y 3 g de una hidroxipropilcelulosa (agente aglutinante vendido bajo la marca comercial de HPC-L, de Nippon Soda) y se mezclaron conjuntamente. Subsiguientemente, se añadió una cantidad apropiada de etanol anhidro para obtener un cuerpo granulado que contenía crystal (C). Este cuerpo granulado se secó en un secador de estantes (60°C), y luego se granuló usando un Power Mill para obtener gránulos. Conjuntamente con los gránulos, se mezclaron 10 g de croscarmellosa de sodio (agente desintegrante vendido bajo la marca comercial de Ac-Di-Sol, FMC International Inc.) y 1,5 g de estearil fumarato de sodio (agente lubricante, JRS Pharma LP) y se moldearon con una máquina para producir tabletas con el fin de obtener tabletas con una masa total de 400 mg por tableta.

25 APLICABILIDAD INDUSTRIAL

30 El presente invento proporciona un agente terapéutico que comprende una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, como se ha definido más arriba, destinada a su uso en un método para tratar por lo menos una enfermedad seleccionada entre el conjunto que se compone del carcinoma de tiroides medular familiar, del carcinoma de tiroides papilar y del carcinoma de tiroides medular esporádico, el uso de la sustancia inhibidora de una cinasa de RET para producir dicho agente terapéutico, y la sustancia inhibidora de una cinasa de RET para dicho agente terapéutico.

35 El presente invento también proporciona un agente terapéutico que comprende una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, como se ha definido en el presente texto, destinado a tratar un carcinoma de tiroides, el uso de la sustancia inhibidora de una cinasa de RET para producir dicho agente terapéutico, y la sustancia inhibidora de una cinasa de RET para dicho agente terapéutico.

40 Por otra parte, el presente invento proporciona una composición farmacéutica destinada a su uso en un método para tratar un carcinoma de tiroides, comprendiendo la composición una sustancia inhibidora de una cinasa de RET, como se ha definido más arriba, para administrarla a un organismo que incluye una célula que expresa una RET mutante, el uso de la sustancia inhibidora de una cinasa de RET para producir dicha composición farmacéutica, y la sustancia inhibidora de una cinasa de RET para dicha composición farmacéutica.

45 La presente divulgación también se refiere a unos métodos de usar el agente terapéutico del invento, a un método para tratar un carcinoma de tiroides que comprende la administración a un organismo que incluye una célula que expresa una RET mutante, y un agente inhibidor de una cinasa de RET como se ha definido más arriba.

50 Por lo demás, la presente divulgación proporciona un método para predecir el efecto de una sustancia inhibidora de una cinasa de RET.

Más específicamente, el efecto de una sustancia inhibidora de una cinasa de RET se puede predecir usando la presencia o la ausencia de una mutación de RET en la célula como una indicación.

55 Puesto que el método de acuerdo con la presente divulgación hace posible predecir el efecto del compuesto sin administrar el compuesto al paciente, se ha hecho posible seleccionar un paciente del que se espera que sea más susceptible al compuesto. Por lo tanto, se ha hecho posible una contribución a la QOL del paciente.

SEQ ID NOS: 5-20 Cebadores

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Eisai R&D Management Co., Ltd.
 <120> AGENTE ANTITUMORAL PARA UN CÁNCER DE TIROIDES
 <130> G08-0027
 <140> PCT/JP2007/060560
 < 141> 2007-05-17
 10 <150> US 60/747.570
 < 151> 2006-05-18
 <160> 20
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 15 < 211> 4757
 < 212> ADN
 < 213> Homo sapiens
 <400> 1
 ccgaagcagg gcgcgcagca gcgctgagtg ccccggaacg tgcgtcgcgc cccagtgtc 60
 cgtcgcgtcc gccgcgcccc gggcggggat gggcgggcca gactgagcgc cgcaccgcgc 120
 atccagacc gccggccta gccgcagtcc ctccagccgt ggccccagcg cgcacgggcg 180
 atggcgaagg cgacgtccgg tgccgcgggg ctgcgtctgc tgttgctgct gctgctgccg 240
 ctgctaggca aagtggcatt gggcctctac ttctcgaggg atgcttactg ggagaagctg 300
 tatgtggacc aggcggccgg cagcccttg ctgtacgtcc atgccctgcg ggacgccctt 360
 gaggaggtgc ccagcttccg cctgggccag catctctacg gcacgtaccg cacacggctg 420
 catgagaaca actggatctg catccaggag gacaccggcc tcctctacct taaccggagc 480
 ctggaccata gctcctggga gaagctcagt gtccgcaacc gcggctttcc cctgctcacc 540
 gtctacctca aggtcttctt gtcacccaca tcccttcgtg agggcgagtg ccagtggccca 600
 ggctgtgccc gcgtatactt ctcttcttc aacacctcct ttccagcctg cagctccctc 660
 aagccccggg agctctgctt ccagagaca aggcctcct tccgattcg ggagaaccga 720
 cccccaggca ccttcacca gttccgcctg ctgcctgtgc agttcttgtg cccaacatc 780
 agcgtggcct acaggctcct ggagggtgag ggtctgccct tccgctgogc cccggacagc 840
 ctggaggtga gcacgcgctg ggccctggac cgcgagcagc gggagaagta cgagctggtg 900
 gccgtgtgca ccgtgcacgc cggcgcgcgc gaggaggtgg tgatggtgcc cttcccggtg 960
 accgtgtacg acgaggacga ctcggcgccc accttccccg cgggcgtcga caccgccagc 1020

20

ES 2 556 173 T3

gccgtggtgg agttcaagcg gaaggaggac accgtggtgg ccacgctgcg tgtcttcgat 1080
 gcagacgtgg tacctgcatc aggggagctg gtgaggcgg acacaagcac gctgctcccc 1140
 ggggacacct gggcccagca gaccttccgg gtggaacact ggccaacga gacctcggtc 1200
 caggccaacg gcagcttcgt gcgggcgacc gtacatgact ataggctggt tctcaaccgg 1260
 aacctctcca tctcggagaa ccgcacatg cagctggcgg tgctggtcaa tgactcagac 1320
 ttccagggcc caggagcggg cgtcctcttg ctccactca acgtgtcggg gctgccggtc 1380
 agcctgcacc tgcccagtac ctactccctc tccgtgagca ggagggctcg ccgatttgcc 1440
 cagatcggga aagtctgtgt ggaaaactgc caggcattca gtggcatcaa cgtccagtac 1500
 aagctgcatt cctctggtgc caactgcagc acgctagggg tggcacctc agccgaggac 1560
 acctcgggga tcctgtttgt gaatgacacc aaggccctgc ggcggcccaa gtgtgccgaa 1620
 cttactaca tgggtggtgc caccgaccag cagacctcta ggaggccca gcccagctg 1680
 cttgtaacag tggaggggtc atatgtggcc gaggaggcgg gctccccct gtcctgtgca 1740
 gtcagcaaga gacggctgga gtgtgaggag tgtggcggcc tgggctcccc aacaggcagg 1800
 tgtgagtgga ggcaaggaga tggcaaagg atcaccagga acttctccac ctgctctccc 1860
 agcaccaaga cctgccccga cggccactgc gatgttgtgg agaccaaga catcaacatt 1920
 tgcctcagg actgcctccg ggcagcatt gttgggggac acgagcctgg ggagccccgg 1980
 gggattaaag ctggctatgg cacctgcaac tgcttccctg aggaggagaa gtgcttctgc 2040
 gagcccgaag acatccagga tccactgtgc gacgagctgt gccgcacggt gatcgcagcc 2100
 gctgtcctct tctccttcat cgtctcggtg ctgctgtctg ccttctgcat cactgctac 2160
 cacaagttg cccacaagcc acccatctcc tcagctgaga tgaccttccg gaggccccgc 2220
 caggccttcc cggtcagcta ctctcttcc ggtgcccgc gccctcctg ggactccatg 2280
 gagaaccagg tctccgtgga tgccttcaag atcctggagg atccaaagt ggaattccct 2340
 cggaagaact tggttcttg aaaaactcta ggagaaggc aatttgaaa agtggtaag 2400
 gcaacggcct tccatctgaa aggcagagca ggttacacca cggtgccgt gaagatgctg 2460
 aaagagaacg cctccccgag tgagctgcga gacctgctgt cagagttaa cgtcctgaag 2520
 caggtaacc acccatatg catcaaattg tatggggcct gcagccagga tggcccgtc 2580
 ctctcatcg tggagtacg caaatacggc tcctgcggg gcttctcctg cgagagccgc 2640
 aaagtggggc ctggctacct gggcagtgga ggcagccga actccagctc cctggaccac 2700

ES 2 556 173 T3

ccggatgagc gggccctcac catgggcgac ctcatctcat ttgcctggca gatctcacag 2760
 gggatgcagt atctggccga gatgaagctc gttcatcggg acttggcagc cagaaacatc 2820
 ctggtagctg aggggcggaa gatgaagatt tcggatttcg gcttgtcccg agatgtttat 2880
 gaagaggatt cctacgtgaa gaggagccag ggtcggatc cagttaaag gatggcaatt 2940
 gaatcccttt ttgatcatat ctacaccacg caaagtgatg tatggtcttt tgggtcctg 3000
 ctgtgggaga tcgtgaccct aggggaaaac ccctatcctg ggattcctcc tgagcggctc 3060
 ttcaaccttc tgaagaccgg ccaccggatg gagaggccag acaactgcag cgaggagatg 3120
 taccgcctga tgctcaatg ctggaagcag gagccggaca aaaggccggt gtttcggac 3180
 atcagcaaag acctggagaa gatgatggtt aagaggagag actacttggg ccttgcggcg 3240
 tccactccat ctgactccct gatttatgac gacggcctc cagaggagga gacaccgctg 3300
 gtggactgta ataatgcccc cctccctcga gccctccctt ccacatggat tgaaaacaaa 3360
 ctctatggca tgcagaccc gaactggcct ggagagagtc ctgtaccact cacgagagct 3420
 gatggcacta aactggggtt tccaagatat ccaaatgata gtgtatatgc taactggatg 3480
 cttcacctc cagcggcaaa attaatggac acgtttgata gttaacattt ctttgtgaaa 3540
 ggtaatggac tcacaagggg aagaacatg ctgagaatgg aaagtctacc ggccctttct 3600
 ttgtgaactg cacattggcc gagccgtggt cagtcccgag gtggcagact cgtttttggt 3660
 agtttgttt aactccaag gtggttttac ttctgatagc cggtgatttt ccctcctagc 3720
 agacatgcca caccgggtaa gagctctgag tcttagtggg taagcattcc tttctcttca 3780
 gtgccagca gcaccagtg ttggtctgtg tccatcagt accaccaaca ttctgtgttc 3840
 acatgtgtgg gtccaacact tactacctgg tgatgaaat tggacctgaa ctgttgatt 3900
 tttctagtg ccgcaaaaca aggcacaaaa atttaacat gaagcacaca cacaaaaaag 3960
 gcagtaggaa aaatgctggc cctgatgacc tgccttatt cagaatgaga gactgcgggg 4020
 ggggcctggg gtagtgtca atgccctcc agggctggag ggggaagagg gccccgagga 4080
 tgggcctggg ctacagcattc gagatcttga gaatgatttt ttttaataca tgcaacctt 4140
 ccttaggaag acatttggtt ttcatcatga ttaagatgat tcctagattt agcacaatgg 4200
 agagattcca tgccatcttt actatgtgga tgggtgtatc agggaagagg gctcacaaga 4260
 cacattgtc ccccgggccc accacatcat cctcacgtgt tcggtactga gcagccacta 4320
 ccctgatga gaacagtatg aagaaagggg gctgttgag tcccagaatt gctgacagca 4380
 gaggcttgc tgctgtgaat cccacctgcc accagcctgc agcacacccc acagccaagt 4440

ES 2 556 173 T3

agaggcgaag gcagtggtc atctacctg ttaggagcag gtagggcttg tactcacttt 4500
aattgaatc ttatcaactt actcataaag ggacaggcta gctagctgtg ttagaagtag 4560
caatgacaat gaccaaggac tgctacacct ctgattacaa ttctgatgtg aaaaagatgg 4620
tgtttggtc ttatagagcc tgtgtgaaag gcccatggat cagctcttcc tgtgtttgta 4680
attaatgct gctacaaggt gtttctgttt cttagattct gaccatgact cataagcttc 4740
ttgtcattct tcattgc 4757

<210> 2
<211> 1114
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2

5

Met Ala Lys Ala Thr Ser Gly Ala Ala Gly Leu Arg Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Pro Leu Leu Gly Lys Val Ala Leu Gly Leu Tyr Phe Ser
20 25 30

Arg Asp Ala Tyr Trp Glu Lys Leu Tyr Val Asp Gln Ala Ala Gly Thr
35 40 45

Pro Leu Leu Tyr Val His Ala Leu Arg Asp Ala Pro Glu Glu Val Pro
50 55 60

Ser Phe Arg Leu Gly Gln His Leu Tyr Gly Thr Tyr Arg Thr Arg Leu
65 70 75 80

His Glu Asn Asn Trp Ile Cys Ile Gln Glu Asp Thr Gly Leu Leu Tyr
85 90 95

Leu Asn Arg Ser Leu Asp His Ser Ser Trp Glu Lys Leu Ser Val Arg
100 105 110

Asn Arg Gly Phe Pro Leu Leu Thr Val Tyr Leu Lys Val Phe Leu Ser
115 120 125

Pro Thr Ser Leu Arg Glu Gly Glu Cys Gln Trp Pro Gly Cys Ala Arg
130 135 140

ES 2 556 173 T3

Val Tyr Phe Ser Phe Phe Asn Thr Ser Phe Pro Ala Cys Ser Ser Leu
 145 150 155 160

Lys Pro Arg Glu Leu Cys Phe Pro Glu Thr Arg Pro Ser Phe Arg Ile
 165 170 175

Arg Glu Asn Arg Pro Pro Gly Thr Phe His Gln Phe Arg Leu Leu Pro
 180 185 190

Val Gln Phe Leu Cys Pro Asn Ile Ser Val Ala Tyr Arg Leu Leu Glu
 195 200 205

Gly Glu Gly Leu Pro Phe Arg Cys Ala Pro Asp Ser Leu Glu Val Ser
 210 215 220

Thr Arg Trp Ala Leu Asp Arg Glu Gln Arg Glu Lys Tyr Glu Leu Val
 225 230 235 240

Ala Val Cys Thr Val His Ala Gly Ala Arg Glu Glu Val Val Met Val
 245 250 255

Pro Phe Pro Val Thr Val Tyr Asp Glu Asp Asp Ser Ala Pro Thr Phe
 260 265 270

Pro Ala Gly Val Asp Thr Ala Ser Ala Val Val Glu Phe Lys Arg Lys
 275 280 285

Glu Asp Thr Val Val Ala Thr Leu Arg Val Phe Asp Ala Asp Val Val
 290 295 300

Pro Ala Ser Gly Glu Leu Val Arg Arg Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Pro
 305 310 315 320

Gly Asp Thr Trp Ala Gln Gln Thr Phe Arg Val Glu His Trp Pro Asn
 325 330 335

Glu Thr Ser Val Gln Ala Asn Gly Ser Phe Val Arg Ala Thr Val His
 340 345 350

Asp Tyr Arg Leu Val Leu Asn Arg Asn Leu Ser Ile Ser Glu Asn Arg
 355 360 365

Thr Met Gln Leu Ala Val Leu Val Asn Asp Ser Asp Phe Gln Gly Pro

ES 2 556 173 T3

370 375 380
 Gly Ala Gly Val Leu Leu Leu His Phe Asn Val Ser Val Leu Pro Val
 385 390 395 400
 Ser Leu His Leu Pro Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Val Ser Arg Arg Ala
 405 410 415
 Arg Arg Phe Ala Gln Ile Gly Lys Val Cys Val Glu Asn Cys Gln Ala
 420 425 430
 Phe Ser Gly Ile Asn Val Gln Tyr Lys Leu His Ser Ser Gly Ala Asn
 435 440 445
 Cys Ser Thr Leu Gly Val Val Thr Ser Ala Glu Asp Thr Ser Gly Ile
 450 455 460
 Leu Phe Val Asn Asp Thr Lys Ala Leu Arg Arg Pro Lys Cys Ala Glu
 465 470 475 480
 Leu His Tyr Met Val Val Ala Thr Asp Gln Gln Thr Ser Arg Gln Ala
 485 490 495
 Gln Ala Gln Leu Leu Val Thr Val Glu Gly Ser Tyr Val Ala Glu Glu
 500 505 510
 Ala Gly Cys Pro Leu Ser Cys Ala Val Ser Lys Arg Arg Leu Glu Cys
 515 520 525
 Glu Glu Cys Gly Gly Leu Gly Ser Pro Thr Gly Arg Cys Glu Trp Arg
 530 535 540
 Gln Gly Asp Gly Lys Gly Ile Thr Arg Asn Phe Ser Thr Cys Ser Pro
 545 550 555 560
 Ser Thr Lys Thr Cys Pro Asp Gly His Cys Asp Val Val Glu Thr Gln
 565 570 575
 Asp Ile Asn Ile Cys Pro Gln Asp Cys Leu Arg Gly Ser Ile Val Gly
 580 585 590
 Gly His Glu Pro Gly Glu Pro Arg Gly Ile Lys Ala Gly Tyr Gly Thr
 595 600 605

ES 2 556 173 T3

Cys Asn Cys Phe Pro Glu Glu Glu Lys Cys Phe Cys Glu Pro Glu Asp
610 615 620

Ile Gln Asp Pro Leu Cys Asp Glu Leu Cys Arg Thr Val Ile Ala Ala
625 630 635 640

Ala Val Leu Phe Ser Phe Ile Val Ser Val Leu Leu Ser Ala Phe Cys
645 650 655

Ile His Cys Tyr His Lys Phe Ala His Lys Pro Pro Ile Ser Ser Ala
660 665 670

Glu Met Thr Phe Arg Arg Pro Ala Gln Ala Phe Pro Val Ser Tyr Ser
675 680 685

Ser Ser Gly Ala Arg Arg Pro Ser Leu Asp Ser Met Glu Asn Gln Val
690 695 700

Ser Val Asp Ala Phe Lys Ile Leu Glu Asp Pro Lys Trp Glu Phe Pro
705 710 715 720

Arg Lys Asn Leu Val Leu Gly Lys Thr Leu Gly Glu Gly Glu Phe Gly
725 730 735

Lys Val Val Lys Ala Thr Ala Phe His Leu Lys Gly Arg Ala Gly Tyr
740 745 750

Thr Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Glu Asn Ala Ser Pro Ser Glu
755 760 765

Leu Arg Asp Leu Leu Ser Glu Phe Asn Val Leu Lys Gln Val Asn His
770 775 780

Pro His Val Ile Lys Leu Tyr Gly Ala Cys Ser Gln Asp Gly Pro Leu
785 790 795 800

Leu Leu Ile Val Glu Tyr Ala Lys Tyr Gly Ser Leu Arg Gly Phe Leu
805 810 815

Arg Glu Ser Arg Lys Val Gly Pro Gly Tyr Leu Gly Ser Gly Gly Ser
820 825 830

ES 2 556 173 T3

Arg Asn Ser Ser Ser Leu Asp His Pro Asp Glu Arg Ala Leu Thr Met
835 840 845

Gly Asp Leu Ile Ser Phe Ala Trp Gln Ile Ser Gln Gly Met Gln Tyr
850 855 860

Leu Ala Glu Met Lys Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile
865 870 875 880

Leu Val Ala Glu Gly Arg Lys Met Lys Ile Ser Asp Phe Gly Leu Ser
885 890 895

Arg Asp Val Tyr Glu Glu Asp Ser Tyr Val Lys Arg Ser Gln Gly Arg
900 905 910

Ile Pro Val Lys Trp Met Ala Ile Glu Ser Leu Phe Asp His Ile Tyr
915 920 925

Thr Thr Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile
930 935 940

Val Thr Leu Gly Gly Asn Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Pro Glu Arg Leu
945 950 955 960

Phe Asn Leu Leu Lys Thr Gly His Arg Met Glu Arg Pro Asp Asn Cys
965 970 975

Ser Glu Glu Met Tyr Arg Leu Met Leu Gln Cys Trp Lys Gln Glu Pro
980 985 990

Asp Lys Arg Pro Val Phe Ala Asp Ile Ser Lys Asp Leu Glu Lys Met
995 1000 1005

Met Val Lys Arg Arg Asp Tyr Leu Asp Leu Ala Ala Ser Thr Pro
1010 1015 1020

Ser Asp Ser Leu Ile Tyr Asp Asp Gly Leu Ser Glu Glu Glu Thr
1025 1030 1035

Pro Leu Val Asp Cys Asn Asn Ala Pro Leu Pro Arg Ala Leu Pro
1040 1045 1050

ES 2 556 173 T3

Ser Thr Trp Ile Glu Asn Lys Leu Tyr Gly Met Ser Asp Pro Asn
 1055 1060 1065

Trp Pro Gly Glu Ser Pro Val Pro Leu Thr Arg Ala Asp Gly Thr
 1070 1075 1080

Asn Thr Gly Phe Pro Arg Tyr Pro Asn Asp Ser Val Tyr Ala Asn
 1085 1090 1095

Trp Met Leu Ser Pro Ser Ala Ala Lys Leu Met Asp Thr Phe Asp
 1100 1105 1110

Ser
 <210> 3
 <211> 4161
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 3

ccgaagcagg gcgcgcagca gcgctgagtg ccccggaacg tgcgtcgcgc ccccagtgtc 60
 cgtcgcgtcc gccgcgcccc gggcggggat ggggcggcca gactgagcgc cgcacccgcc 120
 atccagacc gccggccta gccgcagtcc ctccagccgt ggccccagcg cgcacgggcg 180
 atggcgaagg cgacgtccgg tgccgcgggg ctgcgtctgc tgttgctgct gctgctgccg 240
 ctgctaggca aagtggcatt gggcctctac ttctcagagg atgcttactg ggagaagctg 300
 tatgtggacc aggcggccgg cacgcccttg ctgtacgtcc atgccctgcg ggacgccctt 360
 gaggaggtgc ccagcttccg cctgggccag catctctacg gcacgtaccg cacacggctg 420
 catgagaaca actggatctg catccaggag gacaccggcc tcctctacct taaccggagc 480
 ctggaccata gctcctggga gaagctcagt gtccgcaacc gcggctttcc cctgctcacc 540
 gtctacctca aggtcttctt gtcaccaca tcccttcgtg agggcgagtg ccagtggcca 600
 ggctgtgccc gcgtatactt ctcttcttc aacacctctt ttccagcctg cagctccctc 660
 aagccccggg agctctgctt cccagagaca aggccctcct tccgattcgc ggagaaccga 720
 cccccaggca ccttccacca gttccgcctg ctgcctgtgc agttcttctg cccaacatc 780
 agcgtggcct acaggctcct ggagggtgag ggtctgccct tccgctgcgc cccggacagc 840
 ctggaggtga gcacgcgctg ggccctggac cgcgagcagc gggagaagta cgagctggtg 900
 gccgtgtgca cgtgcacgc cggcgcgcgc gaggaggtgg tgatggtgcc cttcccgggtg 960

ES 2 556 173 T3

accgtgtacg acgaggacga ctggcgccc accttccccg cgggcgtcga caccgccagc 1020
 gccgtggtgg agttcaagcg gaaggaggac accgtggtgg ccacgtgcg tgtcttcgat 1080
 gcagacgtgg tacctgcatc aggggagctg gtgaggcgg acacaagcac gctgctcccc 1140
 ggggacacct gggcccagca gacctccgg gtggaacct ggccaacga gacctcggtc 1200
 caggccaacg gcagcttctg gcggcgacc gtacatgact ataggctggt tctcaaccgg 1260
 aacctctcca tctcggagaa ccgacccatg cagctggcgg tgctggtcaa tgactcagac 1320
 ttccagggcc caggagcggg cgtcctcttg ctccacttca acgtgtcggg gctgccggtc 1380
 agcctgcacc tgcccagtac ctactccctc tccgtgagca ggagggctcg ccgatttgcc 1440
 cagatcggga aagtctgtgt ggaaaactgc caggcattca gtggcatcaa cgtccagtac 1500
 aagctgcatt cctctggtgc caactgcagc acgctagggg tggcacctc agccgaggac 1560
 acctcgggga tctgtttgt gaatgacacc aaggccctgc ggcggcccaa gtgtgccgaa 1620
 cttcactaca tgggtggtgc caccgaccag cagacctta ggcaggccca ggcccagctg 1680
 ctigtacag tggaggggtc atatgtggcc gaggagcgg gctgccccct gtcctgtgca 1740
 gtcagcaaga gacggctgga gtgtgaggag tgtggcggcc tgggctcccc aacaggcagg 1800
 tgtgagtgga ggcaaggaga tggcaaagg atcaccagga acttctccac ctgctctccc 1860
 agcaccaaga cctgccccga cggccactgc gatgttgtgg agaccaaga catcaacatt 1920
 tgcctcagg actgcctcgg gggcagcatt gttgggggac acgagcctgg ggagccccgg 1980
 gggattaaag ctggctatgg cacctgcaac tgcttccctg aggaggagaa gtgcttctgc 2040
 gagcccgaag acatccagga tccactgtgc gacgagctgt gccgcaggt gatcgcagcc 2100
 gctgtcctct tctcctcat cgtctcggtg ctgctgtctg ccttctgcat cactgctac 2160
 cacaagttg cccacaagcc acccatctcc tcagctgaga tgaccttcg gaggcccgcc 2220
 caggccttc cggtcagcta ctctcttcc ggtgcccgcc ggccctcgt gactccatg 2280
 gagaaccagg tctcctgga tccttcaag atcctggagg atccaaagt ggaattcct 2340
 cggaagaact tggttcttg aaaaacteta ggagaaggcg aatttgaaa agtggtaag 2400
 gcaacggcct tccatctgaa aggcagagca ggttacacca cggtagccgt gaagatgctg 2460
 aaagagaacg cctccccgag tgagctgcga gacctgctgt cagagttcaa cgtcctgaag 2520
 caggtaacc acccatatg catcaaattg tatgggcct gcagccagga tggcccgtc 2580
 ctctcatcg tggagtacg caaatacggc tccctcggg gcttctcgg cgagagccc 2640

ES 2 556 173 T3

aaagtggggc ctggctacct gggcagtgga ggcagccgca actccagctc cctggaccac 2700
 ccggatgagc gggccctcac catggcgac ctcatctcat ttgcctggca gatctcacag 2760
 gggatgcagt atctggccga gatgaagctc gttcatcggg acttggcagc cagaaacatc 2820
 ctggtagctg aggggcggaa gatgaagatt tcggatttcg gcttgtcccg agatgtttat 2880
 gaagaggatt cctacgtgaa gaggagccag ggtcggattc cagttaaag gatggcaatt 2940
 gaatcccttt ttgatcatat ctacaccacg caaagtgatg tatggtcttt tgggtctctg 3000
 ctgtgggaga tcgtgacct agggggaaac ccctatcctg ggattcctcc tgagcggctc 3060
 ttcaaccttc tgaagaccgg ccaccggatg gagaggccag acaactgcag cgaggagatg 3120
 taccgcctga tgctgcaatg ctggaagcag gagccggaca aaaggccggt gtttgcggac 3180
 atcagcaaag acctggagaa gatgatggtt aagaggagag actacttggc ccttgcggcg 3240
 tccactccat ctgactcctt gatttatgac gacggcctct cagaggagga gacaccgctg 3300
 gtggactgta ataatcccc cctccctcga gccctccctt ccacatggat tgaaaacaaa 3360
 ctctatggta gaatttccca tgcatttact agattctagc accgctgtcc cctctgcaact 3420
 atccttcctc tctgtgatgc tttttaaaaa tgtttctggt ctgaacaaaa ccaaagtctg 3480
 ctctgaacct ttttatttgt aaatgtctga ctttgcattc agtttacatt taggcattat 3540
 tgcaactatg tttttctaaa aggaagtga aataagtga attaccacat tgcccagcaa 3600
 cttaggatgg tagaggaaaa aacagatcag ggcggaactc tcaggggaga ccaagaacag 3660
 gttgaataag gcgcttctgg ggtgggaatc aagtcatagt acttctactt taactaagtg 3720
 gataaatata caaatctggg gaggtattca gttgagaaag gagccaccag caccactcag 3780
 cctgcaactg gagcacagcc aggttcccc agaccctcc tgggcaggca ggtgcctctc 3840
 agaggccacc cggcaactggc gagcagccac tggccaagcc tcagccccag tcccagccac 3900
 atgtcctcca tcaggggtag cgaggttgca ggagctggct ggccctggga ggacgcaccc 3960
 ccaactgctgt tttcacatcc tttcccttac ccacctcag gacggttgc acttatgaag 4020
 tcagtgctaa agctggagca gttgcttttt gaaagaacat ggtctgtggt gctgtggtct 4080
 tacaatggac agtaaatatg gttcttgcca aaactccttc ttttgccttt gattaatac 4140
 tagaaattta aaaaaaaaaa a 4161

ES 2 556 173 T3

<210> 4
 < 211> 1072
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens

5

<400> 4
 Met Ala Lys Ala Thr Ser Gly Ala Ala Gly Leu Arg Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15

 Leu Leu Leu Pro Leu Leu Gly Lys Val Ala Leu Gly Leu Tyr Phe Ser
 20 25 30

 Arg Asp Ala Tyr Trp Glu Lys Leu Tyr Val Asp Gln Ala Ala Gly Thr
 35 40 45

 Pro Leu Leu Tyr Val His Ala Leu Arg Asp Ala Pro Glu Glu Val Pro
 50 55 60

 Ser Phe Arg Leu Gly Gln His Leu Tyr Gly Thr Tyr Arg Thr Arg Leu
 65 70 75 80

 His Glu Asn Asn Trp Ile Cys Ile Gln Glu Asp Thr Gly Leu Leu Tyr
 85 90 95

 Leu Asn Arg Ser Leu Asp His Ser Ser Trp Glu Lys Leu Ser Val Arg
 100 105 110

 Asn Arg Gly Phe Pro Leu Leu Thr Val Tyr Leu Lys Val Phe Leu Ser
 115 120 125

 Pro Thr Ser Leu Arg Glu Gly Glu Cys Gln Trp Pro Gly Cys Ala Arg
 130 135 140

 Val Tyr Phe Ser Phe Phe Asn Thr Ser Phe Pro Ala Cys Ser Ser Leu
 145 150 155 160

 Lys Pro Arg Glu Leu Cys Phe Pro Glu Thr Arg Pro Ser Phe Arg Ile
 165 170 175

 Arg Glu Asn Arg Pro Pro Gly Thr Phe His Gln Phe Arg Leu Leu Pro
 180 185 190

 Val Gln Phe Leu Cys Pro Asn Ile Ser Val Ala Tyr Arg Leu Leu Glu
 195 200 205

 Gly Glu Gly Leu Pro Phe Arg Cys Ala Pro Asp Ser Leu Glu Val Ser
 210 215 220

ES 2 556 173 T3

Thr Arg Trp Ala Leu Asp Arg Glu Gln Arg Glu Lys Tyr Glu Leu Val
 225 230 235 240

Ala Val Cys Thr Val His Ala Gly Ala Arg Glu Glu Val Val Met Val
 245 250 255

Pro Phe Pro Val Thr Val Tyr Asp Glu Asp Asp Ser Ala Pro Thr Phe
 260 265 270

Pro Ala Gly Val Asp Thr Ala Ser Ala Val Val Glu Phe Lys Arg Lys
 275 280 285

Glu Asp Thr Val Val Ala Thr Leu Arg Val Phe Asp Ala Asp Val Val
 290 295 300

Pro Ala Ser Gly Glu Leu Val Arg Arg Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Pro
 305 310 315 320

Gly Asp Thr Trp Ala Gln Gln Thr Phe Arg Val Glu His Trp Pro Asn
 325 330 335

Glu Thr Ser Val Gln Ala Asn Gly Ser Phe Val Arg Ala Thr Val His
 340 345 350

Asp Tyr Arg Leu Val Leu Asn Arg Asn Leu Ser Ile Ser Glu Asn Arg
 355 360 365

Thr Met Gln Leu Ala Val Leu Val Asn Asp Ser Asp Phe Gln Gly Pro
 370 375 380

Gly Ala Gly Val Leu Leu Leu His Phe Asn Val Ser Val Leu Pro Val
 385 390 395 400

Ser Leu His Leu Pro Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Val Ser Arg Arg Ala
 405 410 415

Arg Arg Phe Ala Gln Ile Gly Lys Val Cys Val Glu Asn Cys Gln Ala
 420 425 430

Phe Ser Gly Ile Asn Val Gln Tyr Lys Leu His Ser Ser Gly Ala Asn
 435 440 445

ES 2 556 173 T3

Cys Ser Thr Leu Gly Val Val Thr Ser Ala Glu Asp Thr Ser Gly Ile
 450 455 460

Leu Phe Val Asn Asp Thr Lys Ala Leu Arg Arg Pro Lys Cys Ala Glu
 465 470 475 480

Leu His Tyr Met Val Val Ala Thr Asp Gln Gln Thr Ser Arg Gln Ala
 485 490 495

Gln Ala Gln Leu Leu Val Thr Val Glu Gly Ser Tyr Val Ala Glu Glu
 500 505 510

Ala Gly Cys Pro Leu Ser Cys Ala Val Ser Lys Arg Arg Leu Glu Cys
 515 520 525

Glu Glu Cys Gly Gly Leu Gly Ser Pro Thr Gly Arg Cys Glu Trp Arg
 530 535 540

Gln Gly Asp Gly Lys Gly Ile Thr Arg Asn Phe Ser Thr Cys Ser Pro
 545 550 555 560

Ser Thr Lys Thr Cys Pro Asp Gly His Cys Asp Val Val Glu Thr Gln
 565 570 575

Asp Ile Asn Ile Cys Pro Gln Asp Cys Leu Arg Gly Ser Ile Val Gly
 580 585 590

Gly His Glu Pro Gly Glu Pro Arg Gly Ile Lys Ala Gly Tyr Gly Thr
 595 600 605

Cys Asn Cys Phe Pro Glu Glu Glu Lys Cys Phe Cys Glu Pro Glu Asp
 610 615 620

Ile Gln Asp Pro Leu Cys Asp Glu Leu Cys Arg Thr Val Ile Ala Ala
 625 630 635 640

Ala Val Leu Phe Ser Phe Ile Val Ser Val Leu Leu Ser Ala Phe Cys
 645 650 655

Ile His Cys Tyr His Lys Phe Ala His Lys Pro Pro Ile Ser Ser Ala
 660 665 670

ES 2 556 173 T3

Glu Met Thr Phe Arg Arg Pro Ala Gln Ala Phe Pro Val Ser Tyr Ser
 675 680 685

Ser Ser Gly Ala Arg Arg Pro Ser Leu Asp Ser Met Glu Asn Gln Val
 690 695 700

Ser Val Asp Ala Phe Lys Ile Leu Glu Asp Pro Lys Trp Glu Phe Pro
 705 710 715 720

Arg Lys Asn Leu Val Leu Gly Lys Thr Leu Gly Glu Gly Glu Phe Gly
 725 730 735

Lys Val Val Lys Ala Thr Ala Phe His Leu Lys Gly Arg Ala Gly Tyr
 740 745 750

Thr Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Glu Asn Ala Ser Pro Ser Glu
 755 760 765

Leu Arg Asp Leu Leu Ser Glu Phe Asn Val Leu Lys Gln Val Asn His
 770 775 780

Pro His Val Ile Lys Leu Tyr Gly Ala Cys Ser Gln Asp Gly Pro Leu
 785 790 795 800

Leu Leu Ile Val Glu Tyr Ala Lys Tyr Gly Ser Leu Arg Gly Phe Leu
 805 810 815

Arg Glu Ser Arg Lys Val Gly Pro Gly Tyr Leu Gly Ser Gly Gly Ser
 820 825 830

Arg Asn Ser Ser Ser Leu Asp His Pro Asp Glu Arg Ala Leu Thr Met
 835 840 845

Gly Asp Leu Ile Ser Phe Ala Trp Gln Ile Ser Gln Gly Met Gln Tyr
 850 855 860

Leu Ala Glu Met Lys Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile
 865 870 875 880

Leu Val Ala Glu Gly Arg Lys Met Lys Ile Ser Asp Phe Gly Leu Ser
 885 890 895

Arg Asp Val Tyr Glu Glu Asp Ser Tyr Val Lys Arg Ser Gln Gly Arg

ES 2 556 173 T3

900 905 910

Ile Pro Val Lys Trp Met Ala Ile Glu Ser Leu Phe Asp His Ile Tyr
 915 920 925

Thr Thr Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile
 930 935 940

Val Thr Leu Gly Gly Asn Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Pro Glu Arg Leu
 945 950 955 960

Phe Asn Leu Leu Lys Thr Gly His Arg Met Glu Arg Pro Asp Asn Cys
 965 970 975

Ser Glu Glu Met Tyr Arg Leu Met Leu Gln Cys Trp Lys Gln Glu Pro
 980 985 990

Asp Lys Arg Pro Val Phe Ala Asp Ile Ser Lys Asp Leu Glu Lys Met
 995 1000 1005

Met Val Lys Arg Arg Asp Tyr Leu Asp Leu Ala Ala Ser Thr Pro
 1010 1015 1020

Ser Asp Ser Leu Ile Tyr Asp Asp Gly Leu Ser Glu Glu Glu Thr
 1025 1030 1035

Pro Leu Val Asp Cys Asn Asn Ala Pro Leu Pro Arg Ala Leu Pro
 1040 1045 1050

Ser Thr Trp Ile Glu Asn Lys Leu Tyr Gly Arg Ile Ser His Ala
 1055 1060 1065

Phe Thr Arg Phe
 1070

<210> 5

<211> 18

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 5

10 attgtcatct cgccgttc 18

<210> 6

<211> 18

<212> ADN

15 <213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 6

20 tgcttcagga cgttgaac 18

<210> 7
 < 211> 21
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 5 <220>
 < 223> cebador
 <400> 7
 tatcgagga gagactgtga t 21

10 <210> 8
 < 211> 20
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 15 < 223> cebador
 <400> 8
 tggagaagag aggctgtatc 20

20 <210> 9
 < 211> 17
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> cebador
 25 <400> 9
 cgttgccttg acttttc 17

30 <210> 10
 < 211> 21
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> cebador
 <400>10
 35 tgcccctca gtgtcctac t 21

40 <210> 11
 < 211> 20
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> cebador
 <400> 11
 45 ctgataaca ctggcagggt 20

50 <210> 12
 < 211> 20
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> cebador
 <400> 12
 gaggcgttct ctttcagcat 20

55 <210> 13
 < 211> 20
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 60 < 223> cebador
 <400> 13
 tggaagaact tcggcatgag 20

<210> 14
 < 211> 20
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 5 <220>
 < 223> cebador
 <400> 14
 gaattcacag ccaccaagtg 20

10 <210> 15
 < 211> 20
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 15 < 223> cebador
 <400> 15
 ctacttagct ttccaagtgg 20

20 <210> 16
 < 211> 22
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> cebador
 25 <400> 16
 gggacagaca ccttggaaa ta 22

30 <210> 17
 < 211> 20
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> cebador
 <400> 17
 35 gttgaaggag tccttgactg 20

40 <210> 18
 < 211> 18
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> cebador
 <400> 18
 45 cttcagcat ctcacgg 18

50 <210> 19
 < 211> 19
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> cebador
 <400> 19
 agtgaagttt ctaccatcc 19

55 <210> 20
 < 211> 20
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 60 < 223> cebador
 <400> 20
 ggcgttctt ttcagcatct 20

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un agente terapéutico que comprende una sustancia inhibidora de una cinasa de RET destinada a su uso en un método para tratar un carcinoma de tiroides, en donde la sustancia inhibidora de una cinasa de RET es por lo menos un compuesto seleccionado entre el conjunto que se compone de:
- 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida;
 4-(3-cloro-4-(etilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida;
 N6-metoxi-4-(3-cloro-4-(((ciclopropilamino)carbonil)amino)fenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida;
 4-(3-cloro-4-(metilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida;
 10 N6-metoxi-4-(3-cloro-4-(((etilamino)carbonil)amino)fenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida; y
 N-{2-cloro-4-[(6,7-dimetoxi-4-quinolil)oxi]fenil}-N'-(5-metil-3-isoxazolil) urea;
 una sal farmacológicamente aceptable de ella o un solvato de ella.
- 15 **2.** El agente terapéutico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la sustancia inhibidora de una cinasa de RET es:
- (a) 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida,
 una sal farmacológicamente aceptable de ella o un solvato de ella; o
 (b) metanosulfonato de 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida.
- 20 **3.** El agente terapéutico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha sustancia inhibidora de una cinasa de RET es N-{2-cloro-4-[(6,7-dimetoxi-4-quinolil)oxi]fenil}-N'-(5-metil-3-isoxazolil) urea, una sal farmacológicamente aceptable de ella o un solvato de ella.
- 25 **4.** El uso de una sustancia inhibidora de una cinasa de RET como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 3 para la preparación de un agente terapéutico destinado a tratar un carcinoma de tiroides.
- 5.** El agente terapéutico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 3 o el uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicho carcinoma de tiroides es el carcinoma de tiroides medular familiar, el carcinoma de tiroides papilar o el carcinoma de tiroides medular esporádico.
- 30

Figura 1

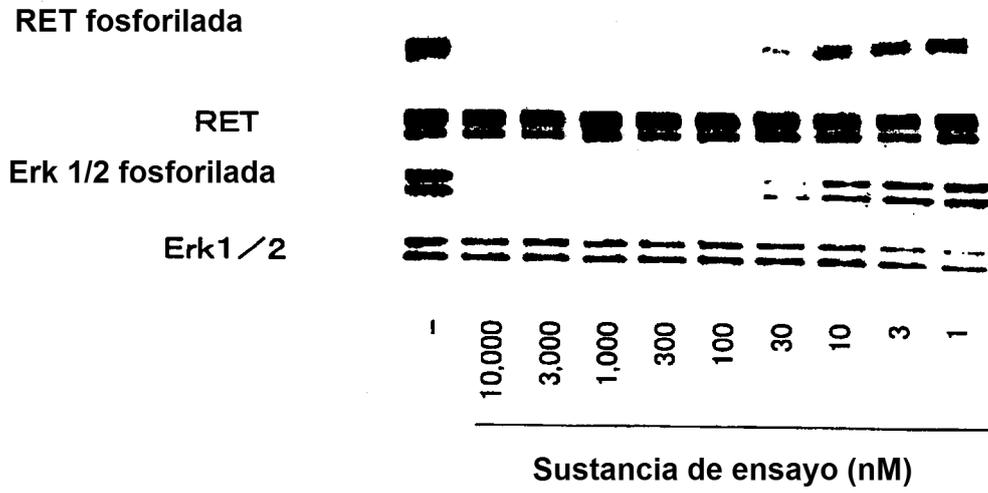


Figura 2

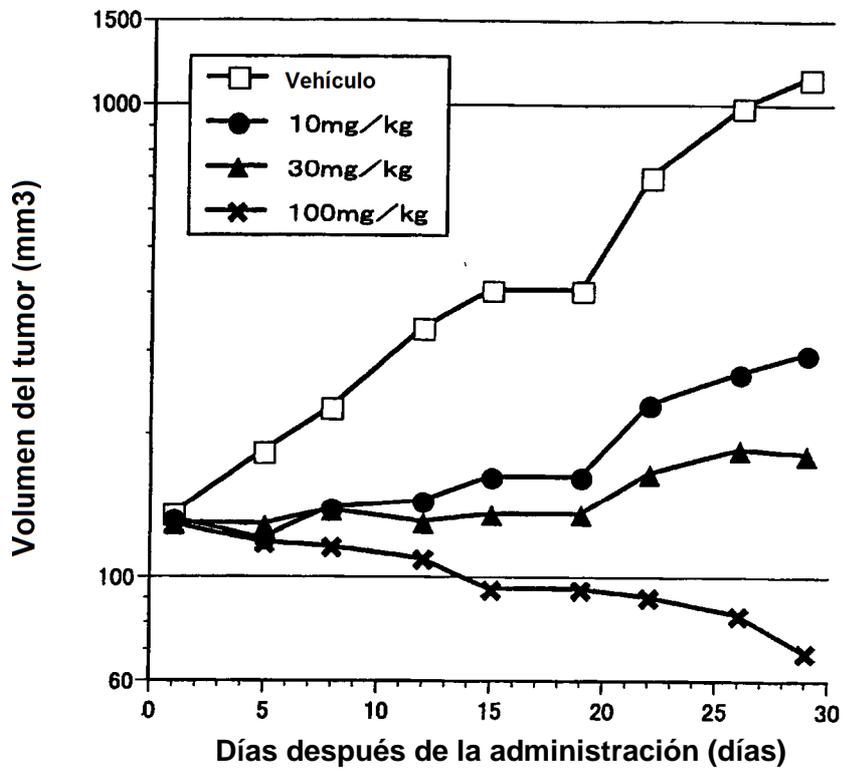


Figura 3

