

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 319**

51 Int. Cl.:

A61K 31/506 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2006 PCT/EP2006/004084**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.11.2006 WO06117185**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2006 E 06724677 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2016 EP 1879584**

54 Título: **Derivados de pirimidilaminobenzamida para síndrome hipereosinofílico**

30 Prioridad:

02.05.2005 US 676751 P

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

07.12.2016

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse, 35
4056 Basel , CH**

72 Inventor/es:

**MANLEY, PAUL, W.;
MESTAN, JÜRGEN y
FABBRO, DORIANO**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones :

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

ES 2 593 319 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

Derivados de pirimidilaminobenzamida para síndrome hipereosinofílico

Sumario de la invención

5 La presente invención tal como se define en las reivindicaciones 1-2 se refiere a derivados de pirimidilaminobenzamida para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad mieloproliferativa inducida por FIP1L1-PDGFR α , y a la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad mieloproliferativa inducida por FIP1L1-PDGFR α , tal como se define en las reivindicaciones 3-4. Las enfermedades mieloproliferativas inducidas por FIP1L1-PDGFR α , incluyen síndrome hipereosinofílico y leucemia eosinofílica crónica; y más especialmente síndrome hipereosinofílico con resistencia a.

10 Antecedentes de la invención

La TEL-PDGFR β es una cinasa de fusión que está asociada con leucemia mielomonocítica crónica (CMML), un trastorno mieloproliferativo caracterizado por mielopoyesis anómala, eosinofilia, mielofibrosis, y progresión frecuente a leucemia mieloide aguda.

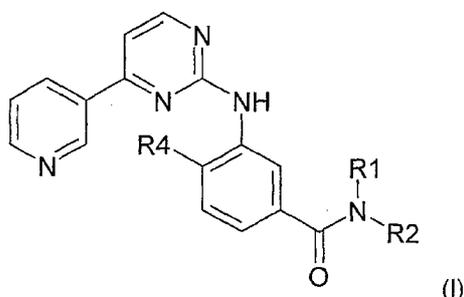
15 La FIP1L1-PDGFR α es una cinasa de fusión asociada con síndrome hipereosinofílico (HES) o leucemia eosinofílica crónica (CEL), un trastorno mieloproliferativo clonal asociado con eosinofilia de sangre importante y daño de órganos. (Martinelli *et al.*, Haematologica 2004, 89(2), 236-237 y Cools *et al.*, Current Opinion in Hematology 2004, 11:51-57).

20 Se ha demostrado ahora que los derivados de pirimidilaminobenzamida son activos contra las cinasas de fusión TEL-PDGFR β y FIP1L1-PDGFR α , relevantes clínicamente, que están asociadas con las enfermedades mieloproliferativas CMML y HES, respectivamente. Además, tales derivados de pirimidilaminobenzamida son efectivos contra enfermedades mieloproliferativas causadas por TEL-PDGFR β y/o FIP1L1-PDGFR α . Los derivados de pirimidilaminobenzamida inhiben efectivamente el crecimiento de células Ba/F3 transformadas mediante ambas cinasas de fusión, y pueden inhibir la fosforilación de residuos de tirosina en estas cinasas de fusión así como también la activación de sus dianas de señalización aguas abajo. Los derivados de pirimidilaminobenzamida también son efectivos *in vitro* contra una mutación T681I resistente a imatinib en TEL-PDGFR β . Este residuo corresponde a T315I en BCR-ABL, una mutación que confiere resistencia a imatinib en pacientes, que es notoriamente difícil de inhibir. El imatinib (Denominación Común Internacional) es un inhibidor de tirosina cinasa que se comercializa bajo la designación GLEEVEC® en los EE.UU. y GLIVEC® en Europa.

30 Se ha encontrado ahora que los derivados de pirimidilaminobenzamida son útiles en el tratamiento de enfermedades mieloproliferativas inducidas por TEL-PDGFR β o FIP1L1-PDGFR α , especialmente para el tratamiento curativo y/o profiláctico de leucemia mielomonocítica, síndrome hipereosinofílico, leucemia eosinofílica crónica y síndrome hipereosinofílico con resistencia a imatinib.

Sumario de la Invención

La presente invención describe el uso de compuestos de pirimidilaminobenzamida de fórmula (I):



35

en la que:

R₁ representa hidrógeno, alquilo inferior, alcoxi inferior-alquilo inferior, aciloxi-alquilo inferior, carboxi-alquilo inferior, alcocarbonil inferior-alquilo inferior o fenil-alquilo inferior;

R₂ representa hidrógeno, alquilo inferior, opcionalmente sustituido por uno o más radicales R₃ idénticos o diferentes, cicloalquilo, benzocicloalquilo, heterociclilo, un grupo arilo, o un grupo heteroarilo mono- o bicíclico que comprende cero, uno, dos o tres átomos de nitrógeno en el anillo y cero o un átomo de oxígeno y cero o un átomo de azufre, cuyos grupos en cada caso no están sustituidos o están mono- o polisustituidos;

5 y R₃ representa hidroxilo, alcoxilo inferior, aciloxilo, carboxilo, alcoxicarbonilo inferior, carbamoilo, carbamoilo N-mono- o N,N-disustituido, amino, amino mono- o disustituido, cicloalquilo, heterociclilo, un grupo arilo, o un grupo heteroarilo mono- o bicíclico que comprende cero, uno, dos o tres átomos de nitrógeno en el anillo y cero o un átomo de oxígeno y cero o un átomo de azufre, cuyos grupos en cada caso no están sustituidos o están mono- o polisustituidos;

10 o en la que R₁ y R₂ juntos representan alquileo con cuatro, cinco o seis átomos de carbono opcionalmente mono- o disustituidos por alquilo inferior, cicloalquilo, heterociclilo, fenilo, hidroxilo, alcoxilo inferior, amino, amino mono- o disustituido, oxo, piridilo, pirazinilo o pirimidinilo; benzoalquileo con cuatro o cinco átomos de carbono; oxaalquileo con un oxígeno y tres o cuatro átomos de carbono; azaalquileo con un nitrógeno y tres o cuatro átomos de carbono en donde el nitrógeno no está sustituido o está sustituido por alquilo inferior, fenil-alquilo inferior, alcoxicarbonil inferior-alquilo-inferior, carboxi-alquilo inferior, carbamoil-alquilo inferior, carbamoil-alquilo inferior N-mono- o N,N-disustituido, cicloalquilo, alcoxicarbonilo inferior, carboxilo, fenilo, fenilo sustituido, piridinilo, pirimidinilo o pirazinilo;

R₄ representa hidrógeno, alquilo inferior o halógeno;

20 y un N-óxido o una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de este tipo para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad mieloproliferativa inducida por FIP1L1-PDGFR α , especialmente para el tratamiento curativo y/o profiláctico de síndrome hipereosinofílico, leucemia eosinofílica crónica y síndrome hipereosinofílico con resistencia a imatinib. La presente invención además describe el uso de compuestos de fórmula I para tratar o prevenir enfermedades mieloproliferativas inducidas por FIP1L1-PDGFR α , especialmente para el tratamiento curativo y/o profiláctico de leucemia eosinofílica crónica, síndrome hipereosinofílico y síndrome hipereosinofílico con resistencia a imatinib.

25 Los términos generales usados anteriormente en la presente y posteriormente en la presente tienen preferiblemente, dentro del contexto de esta divulgación, los siguientes significados, a menos que se indique otra cosa:

Las sales son especialmente las sales farmacéuticamente aceptables de compuestos de fórmula I.

30 Tales sales se forman, por ejemplo, como sales de adición de ácido, preferiblemente con ácidos orgánicos o inorgánicos, a partir de compuestos de fórmula I con un átomo de nitrógeno básico, especialmente las sales farmacéuticamente aceptables. Los ácidos inorgánicos adecuados son, por ejemplo, ácidos de halógeno, tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, o ácido fosfórico. Los ácidos orgánicos adecuados son, por ejemplo, los ácidos carboxílico, fosfónico, sulfónico o sulfámico, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido octanóico, ácido decanóico, ácido dodecanóico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido adípico, ácido pimélico, ácido subérico, ácido azeláico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, aminoácidos, tales como ácido glutámico o ácido aspártico, ácido maleico, ácido hidroximaléico, ácido metilmaleico, ácido ciclohexanocarboxílico, ácido adamantanocarboxílico, ácido benzoico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido ftálico, ácido fenilacético, ácido mandélico, ácido cinámico, ácido metano- o etanosulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 2-naftaleno-sulfónico, ácido 1,5-naftaleno-disulfónico, ácido 2-, 3- o 4-metilbencenosulfónico, ácido metilsulfúrico, ácido etilsulfúrico, ácido dodecilsulfúrico, ácido N-ciclohexilsulfámico, ácido N-metil-, N-etil- o N-propil-sulfámico u otros ácidos protónicos orgánicos, tal como ácido ascórbico.

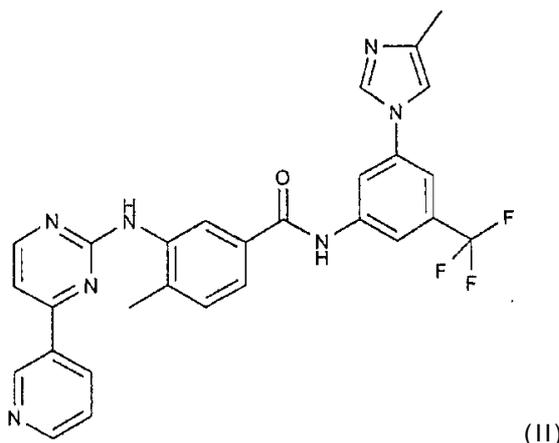
45 En presencia de radicales cargados negativamente, tales como carboxi o sulfo, las sales también pueden formarse con bases, por ejemplo, sales de amonio o metal, tal como sales de metal alcalino o metal alcalinotérreo, por ejemplo, sales de sodio, potasio, magnesio o calcio, o sales de amonio con amoniaco o aminas orgánicas adecuadas, tales como monoaminas terciarias, por ejemplo, trietilamina o tri(2-hidroxietil)amina, o bases heterocíclicas, por ejemplo, N-etilpiperidina o N,N'-dimetilpiperazina.

Cuando están presentes un grupo básico y un grupo ácido en la misma molécula, un compuesto de fórmula I también puede formar sales internas.

50 Para propósitos de aislamiento o purificación también es posible usar sales farmacéuticamente inaceptables, por ejemplo, picratos o percloratos. Para uso terapéutico, se emplean solamente sales o compuestos libres farmacéuticamente aceptables (cuando es aplicable, en forma de preparaciones farmacéuticas) y por tanto se prefieren éstos.

En vista de la relación estrecha entre los compuestos en forma libre y aquellos en forma de sus sales, incluyendo aquellas sales que pueden usarse como compuestos intermedios, por ejemplo, en la purificación o identificación de los compuestos, cualquier referencia a los compuestos libres anteriormente en la presente y posteriormente en la presente debe entenderse como referencia también a las sales correspondientes, como sea apropiado y oportuno.

- 5 Los compuestos dentro del alcance de fórmula I y el procedimiento para su elaboración se dan a conocer en WO 04/005281 publicada el 15 de enero de 2004. El compuesto según la presente invención es 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil]benzamida, su N-óxido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de fórmula (II):



- 10 Este compuesto se describe en Weisberg *et al.* (Cancer Cell, 2005, vol. 7, n.º 2, págs. 129-141) como un inhibidor selectivo novedoso de Bcr-Abl, que es significativamente más potente que imatinib y activo contra una variedad de mutantes Bcr-Abl resistentes a imatinib.

Se ha encontrado ahora de manera sorprendente que los compuestos de fórmula (II) poseen propiedades terapéuticas, que los hacen particularmente útiles como un inhibidor de PDGFR α (factor α de crecimiento derivado de plaquetas, abreviado también como PDGRA) y especialmente para el tratamiento y profilaxis de enfermedades inducidas por TEL-PDGFR β y FIP1L1-PDGFR α tales como HES, CEL y HES con resistencia a imatinib.

FIP1L1-PDGFR α , tal como se usa anteriormente en la presente y posteriormente en la presente, es la designación del producto de fusión de los genes FIP1L1 (FIP1 como 1) con PDGFR α . TEL-PDGFR β , tal como se usa anteriormente en la presente y posteriormente en la presente, es la designación del producto de fusión de los genes TEL con PDGFR β .

El compuesto (II) inhibió células Ba/F3 transformadas con TEL-PDGFR β y también inhibió efectivamente la autofosforilación de tirosina TEL-PDGFR β , así como la fosforilación de intermedios de señalización PDGFR β conocidos incluyendo PLC γ y PI3K. El compuesto (II) inhibió también células Ba/F3 transformadas con mutante T6811 TEL-PDGFR β , que es la mutación homóloga a la mutación T3151 en BCR-ABL que confiere resistencia a imatinib.

25 La presente invención por tanto se refiere al uso de un compuesto de fórmula (II) para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad mieloproliferativa inducida por FIP1L1-PDGFR α .

El término "una enfermedad mieloproliferativa inducida por FIP1L1-PDGFR α " tal como se usa en la presente incluye leucemia eosinofílica crónica, síndrome hipereosinofílico y síndrome hipereosinofílico con resistencia a imatinib. Este término incluye también específicamente enfermedades que resultan de la mutación de FIP1L1-PDGFR α , particularmente a partir de la mutación FIP1L1-PDGFR α T674I.

La presente invención más particularmente se refiere al uso de compuestos de fórmula (II) para la preparación de un fármaco para el tratamiento de leucemia eosinofílica crónica, síndrome hipereosinofílico, síndrome hipereosinofílico con resistencia a imatinib.

35 En otra realización, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (II) para la preparación de una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad mieloproliferativa inducida por FIP1L1-PDGFR α , más particularmente para tratar leucemia mielomonocítica, leucemia eosinofílica crónica,

síndrome hipereosinofílico o síndrome hipereosinofílico con resistencia a imatinib.

5 En la presente descripción, el término “tratamiento” incluye tratamiento tanto profiláctico como preventivo así como tratamiento curativo o supresor de la enfermedad, incluyendo el tratamiento de pacientes en riesgo de contraer la enfermedad o que se sospecha que han contraído la enfermedad así como pacientes enfermos. Este término incluye además el tratamiento para el retraso de la progresión de la enfermedad.

El término “curativo”, tal como se usa en la presente, significa eficacia el tratamiento de episodios en curso que implican enfermedades mieloproliferativas inducidas por FIP1L1-PDGFR α .

El término “profiláctico” significa la prevención del comienzo o recurrencia de enfermedades que implican enfermedades mieloproliferativas inducidas por FIP1L1-PDGFR α .

10 El término “retraso de la progresión”, tal como se usa en la presente, significa la administración del compuesto activo a pacientes que están en una etapa previa o en una fase temprana de la enfermedad que va a tratarse, en la que a los pacientes, por ejemplo, se les diagnostica una preforma de la enfermedad correspondiente, o por la cual los pacientes están en una condición, por ejemplo, durante un tratamiento médico o una condición que resulta de un accidente, bajo lo que es probable que se desarrolle una enfermedad correspondiente.

15 Este intervalo impredecible de propiedades significa que el uso de compuestos de fórmula (I) es de interés particular para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades que implican enfermedades mieloproliferativas inducidas por FIP1L1-PDGFR α .

Especialmente este efecto puede ser relevante clínicamente para pacientes con síndrome hipereosinofílico o síndrome hipereosinofílico con resistencia a imatinib.

20 Para demostrar que los compuestos de fórmula (I) son particularmente adecuados para el tratamiento de enfermedades mieloproliferativas inducidas por FIP1L1-PDGFR α con buen margen terapéutico y otras ventajas, se pueden llevar a cabo pruebas clínicas de manera conocida para el experto.

25 La dosificación precisa de los compuestos de fórmula (I) que va a emplearse para inhibir la actividad de FIP1L1-PDGFR α o para tratar enfermedades mieloproliferativas inducidas por FIP1L1-PDGFR α , depende de varios factores incluyendo el huésped, la naturaleza y la gravedad de la condición que va a tratarse, el modo de administración. El compuesto de fórmula I puede administrarse mediante cualquier ruta incluyendo por vía oral, parenteral, por ejemplo, de manera intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intratumoral o rectal, o enteral. Preferiblemente el compuesto de fórmula I se administra de manera oral, preferiblemente a una dosificación diaria de 1-300 mg/kg de peso corporal o, para la mayoría de los grandes primates, una dosificación diaria de 50-5000, preferiblemente de 300-3000 mg. Una dosificación diaria oral preferida es de 1-75 mg/kg de peso corporal o, para la mayoría de los grandes primates, una dosificación diaria de 10-2000 mg, administrada como una sola dosis o dividida en dosis múltiples, tal como una dosificación de dos veces al día.

30 Usualmente, se administra una pequeña dosis inicialmente y la dosificación se incrementa gradualmente hasta que se determina la dosificación óptima para el huésped bajo tratamiento. El límite superior de la dosificación es aquel impuesto por los efectos secundarios y puede determinarse mediante prueba para el huésped que se está tratando.

35 Los compuestos de fórmula I pueden combinarse con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, uno o más adyuvantes farmacéuticos convencionales y administrados de manera enteral, por ejemplo, oralmente, en forma de comprimidos, cápsulas, pastillas, etc., o de manera parenteral, por ejemplo, de manera intraperitoneal o intravenosa, en forma de disoluciones o suspensiones estériles inyectables. Las composiciones enterales y parenterales pueden prepararse por medios convencionales.

40 Los compuestos de fórmula (I) pueden usarse solos o en combinación con al menos otro compuesto activo farmacéuticamente para su uso en estas patologías. Estos compuestos activos pueden combinarse en la misma preparación farmacéutica o en forma de “kit de partes” de preparaciones combinadas en el sentido de que los componentes de la combinación pueden dosificarse independientemente o usando combinaciones fijas diferentes con cantidades distintas de los componentes de la combinación, es decir, simultáneamente o en momentos diferentes. Las partes del kit de partes pueden administrarse entonces, por ejemplo, simultáneamente o escalonadas cronológicamente, es decir, en momentos diferentes y con intervalos de tiempo iguales o diferentes para cualquier parte del kit de partes. Ejemplos no limitativos de compuestos que pueden citarse para su uso en combinación con compuestos de fórmula (I) son fármacos citotóxicos de quimioterapia, tales como citosina arabinosida, daunorubicina, doxorubicina, ciclofosfamida, VP-16 o imatinib etc. Además, los compuestos de fórmula (I) pueden

combinarse con otros inhibidores de transducción de señal u otros fármacos dirigidos a oncogenes con la expectativa de que resultara una sinergia significativa.

5 La invención además describe la combinación de compuestos de fórmula (I) tal como se describe anteriormente en la presente, con imatinib para el tratamiento de las enfermedades y condiciones descritas anteriormente en la presente. La administración de una combinación de este tipo puede efectuarse al mismo tiempo, por ejemplo, en forma de una composición o preparación farmacéutica combinada fija, o secuencialmente o escalonada en el tiempo. La administración de compuestos de fórmula (I) en una forma de dosificación tal como se describe anteriormente en la presente y de imatinib en su forma comercializada de GLEEVEC® en los EE.UU./GLIVEC® en Europa y con las dosificaciones concebidas para estas formas de dosificación se prefiere actualmente.

10 El tratamiento de las enfermedades mieloproliferativas inducidas por FIP1L1-PDGFR α con la combinación anterior puede ser un tratamiento denominado de primera línea, es decir, el tratamiento de una enfermedad recientemente diagnosticada sin ninguna quimioterapia precedente o los similares, o puede ser también un tratamiento denominado de segunda línea, es decir, el tratamiento de la enfermedad después de un tratamiento precedente con imatinib o compuestos de fórmula (I), dependiendo de la gravedad o etapa de la enfermedad así como la condición global del paciente, etc.

15 La eficacia de los compuestos de fórmula (I) para el tratamiento de enfermedades mieloproliferativas inducidas por FIP1L1-PDGFR α se ilustra mediante los resultados de los siguientes ejemplos. Estos ejemplos ilustran la invención sin limitar de ninguna manera su alcance:

Constructos

20 TEL-PDGFR β [T/P], FIP1L1-PDGFR α [F/P] y FIP1L1-PDGFR α T674I clonados en MSCV-IRES-GFP [MSCV-GFP] y TEL-PDGFR β , TEL-PDGFR β T681I y TEL-FGFR3 [T/F] se clonan en MSCV-neomicina [MSCV-neo]. Se introduce una mutación D842V en ADNc de PDGFRA de tipo silvestre y se clonan en MSCV-puromicina [MSCV-puro].

Cultivo celular, producción de retrovirus y transducción de células Ba/F3

25 Se cultivan células 293T en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) + suero bovino fetal (FBS) al 10%. Las células Ba/F3 se cultivan en RPMI 1640 + FBS al 10% + 1 ng/ml de interleucina de ratón (IL)-3. Se generan sobrenadantes retrovirales y se usan para transducir células Ba/F3. Se seleccionan las líneas celulares T/P MSCV-neo y T/F MSCV-neo con 1 mg/ml de G418 en presencia de IL-3 durante 8-10 días. Se seleccionan las líneas celulares F/P MSCV-GFP en RPMI sin IL-3 durante 7-10 días. Se seleccionan las líneas celulares PDGFR α D842V MSCV-puro en 2 μ g/ml de puromicina durante 7-14 días. Las células Ba/F3 transformadas se cultivan en RPMI sin IL-3.

Ensayos de proliferación celular con independencia de IL-3

35 Los efectos de los compuestos en la viabilidad y proliferación de las células se determinaron usando el kit de ensayo de detección de ATP luminiscente ATPLite™ de Perkin Elmer Life Sciences (n.º de cat.: 6016947) según las instrucciones de los proveedores. Este sistema de ensayo está basado en la producción de luz (luminiscencia) causada por la reacción de ATP con luciferasa y D-luciferina añadidas.

40 Las líneas celulares Ba/F3 FIP-PDGFR α y Ba/F3 Tel-PDGFR β , cultivadas en suspensión en RPMI 1640 (Invitromex, n.º de cat.: L0501), suero de ternera fetal al 10% (Amimed, n.º de cat.: 2-01F86-I), 2 mM de L-glutamina (Gibco), se sembraron en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos, negras, (Packard) a una densidad de 10000 células por pocillo en 50 μ l de medio completo seguido inmediatamente por la adición de 50 μ l por pocillo de diluciones en serie de dos veces de compuestos concentrados 2x (duplicados). Se usaron células sin compuesto como un control y se usó medio sin células para determinar la señal de fondo del ensayo. Después de 70 h de incubación (37° C, CO₂ al 5%), las células se lisaron mediante la adición de 50 μ l por pocillo de disolución de lisis de células de mamífero (proporcionada con el kit) y 5 min de agitación en un agitador de placa orbital a 700 rpm. Subsiguientemente, se agregaron 50 μ l de disolución de sustrato (luciferasa y D-luciferina) y después de 5 min de agitación y 10 min de adaptación a la oscuridad de las placas, se midió la emisión de luz con un TopCount de Packard.

45 La actividad del compuesto se determinó como inhibición total de crecimiento (TGI) de los cultivos celulares y se calculó como sigue: después de la resta de la señal de fondo la señal obtenida de las células de control se tomó como el 100%. El efecto del compuesto se expresó como reducción en porcentaje de la señal de control. Los valores de TGI50 se determinaron a partir de las curvas de respuesta de dosis mediante extrapolación gráfica.

El compuesto (II) inhibió la proliferación de ambas células Ba/F3 FIP-PDGFR α y Ba/F3 Tel-PDGFR β con valores de CI50 de <100 nM.

5 La mutación T315I en BCR-ABL confiere resistencia a imatinib y no está inhibida por ningún inhibidor de tirosina cinasa de molécula pequeña conocido. La mutación homóloga en TEL-PDGFR β es T681I, y esta mutación también confiere resistencia a imatinib. El compuesto (II) inhibió células Ba/F3 transformadas por un mutante T681I de TEL-PDGFR β con un CI50 de <25 nM, similar a aquel de la fusión de TEL-PDGFR β sin mutar.

Inmunotransferencias de tipo Western

10 Para F/P: se incuban células Ba/F3 con las concentraciones indicadas de compuesto (II) durante 4 h en RPMI sin FBS o IL-3. Las células se lisan en tampón de lisis [PBS con Na₂EDTA 1 M, NaF 1M, Triton X-100 al 0,1%, Na₃VO₄ 200 mM, óxido de fenilarsina 200 mM y comprimidos de inhibidor de proteasa completos (Roche)]. Se combinan 50 μ g de lisado de proteína con tampón de carga SDS reductor + ditioneitol (Cell Signaling) antes de la electroforesis en geles PAGE-SDS al 10-12% (geles listos Tris-HCl, Bio-Rad) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Los anticuerpos usados son: fosfo-PDGFR α (Tyr 720), PDGFR α 951, Stat5-b (Santa Cruz); fosfo-Stat5 (Tyr 694) (Cell Signaling); peroxidasa anti-conejo (Amersham Pharmacia Biotech).

15 Para T/P: se tratan células Ba/F3 que expresan T/P o T/F de manera estable, con falta de suero en RPMI 1640 solo durante 4 h antes de la lisis. Los extractos de células se clarifican mediante centrifugación y se usan para la inmunoprecipitación o inmunotransferencia. Los procedimientos de inmunotransferencia vinculada a enzimas se realizan tal como se describe. Los anticuerpos aplicados incluyen: suero anti-PDGFR β de conejo (Pharmingen); suero anti-PI3K (p85) de conejo; anti-fosfotirosina 4G10 de ratón (Upstate Biotechnology); anticuerpos contra FGFR3, fosfo-PI3K p85 (Tyr-508) (Santa Cruz Biotechnology); PLC γ , fosfo-PLC γ (Tyr-783) (Cell Signaling).

20

Trasplantes de médula ósea y tratamiento con fármaco de ratones

25 Se realizan experimentos de trasplante de médula ósea en murinos tal como se describió previamente. Los sobrenadantes retrovirales MSCV-GFP se titulan mediante transducción de células Ba/F3 con sobrenadante (plus polibrene, 10 μ g/ml) y se analiza para obtener el porcentaje de células GFP+ mediante citometría de flujo a 48 h después de la transducción. Se tratan ratones donantes Balb/C (Taconic) durante 5-6 días con 5-fluorouracil (150 mg/kg, inyección intraperitoneal). Las células de la médula ósea de ratones donantes se cosechan, se tratan con tampón de lisis de glóbulos rojos, y se cultivan 24 h en medio de trasplante (RPMI + FBS al 10% + 6 ng/ml de IL-3, 10 ng/ml de IL-6 y 10 ng/ml de factor de células madre). Las células se tratan mediante infección por centrifugación con sobrenadantes retrovirales (1 ml de sobrenadante por 4x10⁶ células, plus polibrene) y se centrifuga a 2500 rpm durante 90 min. 24 h más tarde, se repite la infección por centrifugación, después se lavan las células, se resuspenden en solución salina equilibrada de Hank, y se inyectan en venas laterales de la cola de ratones receptores Balb/C (Taconic) irradiados letalmente (2x450 rad) a 0,5-1x10⁶ células/ratón. El compuesto (II) se suministra como un polvo y se prepara como una disolución madre en NPM (N-metil-2-pirrolidona, Aldrich) y se diluye en polietilenglicol 300 (Sigma) para inyecciones. Empezando en el día 11 después del trasplante, los animales se tratan con 75 mg/kg/día de compuesto (II) o placebo (polietilenglicol, volumen idéntico al compuesto (II)) cada 24 h mediante sonda oral con agujas de sonda oral. Los animales se sacrifican cuando tienen esplenomegalia palpable o cuando estaban moribundos, o, si están sanos, 7 días después del sacrificio del último animal en el grupo de placebo.

30

35

Análisis de enfermedad mieloproliferativa en ratones

40 Se recolecta sangre periférica de la cavidad retroorbital usando tubos capilares de vidrio heparinizado y se analiza mediante conteos de células sanguíneas completos y diferenciales automatizados y se tiñen (teñido con Wright y Giemsa). Se preparan suspensiones celulares únicas de bazo y médula ósea presionando tejido a través de un filtro celular, seguido por lisis de glóbulos rojos. Las células se congelan en FBS al 90%, DMSO al 10%.

45 Para la histopatología, los tejidos se fijan por lo menos 72 h en formalina tamponada neutra al 10%, se deshidratan en alcohol, aclarados en xileno, e infiltrados con parafina en un procesador automatizado (Leica). Las secciones de tejido (4 μ m) de los bloques de tejido incrustados en parafina se colocan en portaobjetos cargados y se desparafinan en xileno, se rehidratan a través de disoluciones de alcohol graduadas, y se tiñen con hematoxilina y eosina.

50 Para la citometría de flujo, las células se lavan en PBS + albúmina de suero bovino al 1% (BSA), se bloquean con Fc-Block (BD Pharmingen) durante 10 min en hielo, y se tiñen con anticuerpos monoclonales en PBS + BSA al 1% durante 20 min en hielo. Los anticuerpos usados son: Gr1 CD19, y TCRB, conjugados con alofococianina (APC); y Mac-1, B220, y CD3 conjugados con ficoetrina (PE) (BD Pharmingen). El análisis citométrico de flujo se realiza en un

instrumento FACSCalibur y se analiza con el software CellQuest. La viabilidad se evalúa incubando células con 7AAD (BD Pharmingen) durante 5 min antes de la citometría de flujo. Las células se separan según la viabilidad (usando dispersión delantera/lateral y 7AAD) y positividad para GFP, y se analizan 10000 acontecimientos de este subconjunto para obtener la expresión de marcador.

- 5 La significación estadística de las diferencias entre los grupos tratados con el compuesto (II) y con placebo en tiempo de supervivencia, conteos de glóbulos blancos, y pesos de bazo, se evalúan usando una prueba de U bilateral de Mann-Whitney (prueba de suma de rangos Wilcoxon).

El compuesto (II) es eficaz para el tratamiento de enfermedad mieloproliferativa inducida por TEL-PDGFR β y FIP1L1-PDGFR α en un ensayo de BMT murino

- 10 Se usa un protocolo de trasplante de médula ósea de murino para simular la enfermedad mieloproliferativa causada por TEL-PDGFR β y FIP1L1-PDGFR α . La transducción retroviral de estas cinasas de fusión en células de médula ósea de ratones donantes tratados con 5FU, seguido por trasplante en receptores irradiados letalmente, produce rápidamente un fenotipo mieloproliferativo fatal caracterizado por leucocitosis con predominancia mieloide, esplenomegalia y hematopoyesis extramedular.

- 15 Las células de médula ósea del donador se transduce con un vector retroviral de murino que expresa TEL-PDGFR β o FIP1L1-PDGFR α y se trasplanta en receptores. Los ratones trasplantados con T/P o T/F se dividen en dos grupos que se trataron con sonda oral diaria de placebo o compuesto (II) que se dosificó a 150 mg/kg/día, comenzando en el día 11 después del trasplante.

- 20 El grupo de placebo TEL-PDGFR β desarrolló una enfermedad mieloproliferativa completamente penetrante con una latencia media de 17 días; todos los animales tratados con T/P se sacrificaron debido a la progresión de la enfermedad en el día 18. En contraste, todos los animales en el grupo tratado con compuesto (II) todavía estaban vivos en el punto final del estudio definido previamente de 7 días después del momento del sacrificio de los animales placebo, y hubo una prolongación de supervivencia estadísticamente significativa en el grupo del compuesto (II) (26 días; p<0,001). En comparación con los animales tratados con placebo, los animales tratados con compuesto (II) también tuvieron reducciones estadísticamente significativas en glóbulos blancos totales (WBC) ($563,7 \times 10^6$ células/ml para placebo frente a $18,6 \times 10^6$ células/ml para compuesto (II), p<0,05) y peso de bazo (802,5 mg para placebo frente a 350,0 mg para compuesto (II), p<0,01) (Tabla 1).

- 25

Tabla 1

Efectos del compuesto (II) sobre las características de la enfermedad mieloproliferativa inducida por TEL-PDGFRβ y FIP1L1-PDGFRα				
	TEL-PDGFRβ	TEL-PDGFRβ	FIP1L1-PDGFRα	FIP1L1-PDGFRα
	Placebo	Compuesto (II)	Placebo	Compuesto (II)
WBC ($\times 10^6$ /ml)				
Media	563,7	18,6	569,7	5,6
Desviación típica	96,0	8,8	88,2	2,3
Mediana	583,4	15,9	613,2	4,7
Intervalo	459,3-648,3	10,9-33,5	452,8-659,2	4,0-9,6
n	3	5	5	5

Efectos del compuesto (II) sobre las características de la enfermedad mieloproliferativa inducida por TEL-PDGFRβ y FIP1L1-PDGFRα				
	TEL-PDGFRβ Placebo	TEL-PDGFRβ Compuesto (II)	FIP1L1-PDGFRα Placebo	FIP1L1-PDGFRα Compuesto (II)
Peso del bazo (mg)				
Media	802,5	350,0	731,8	88,0
Desviación típica	214,8	89,0	120,0	21,7
Mediana	800	340	700	100
Intervalo	380-1130	250-470	575-880	50-100
n	8	8	5	5
Peso del hígado (mg)				
Media	1746,3	1492,5	1666,4	1128,0
Desviación típica	546,9	103,3	135,5	90,9
Mediana	1910	1535	1596	1090
Intervalo	590-2410	1320-1590	1550-1830	1080-1290
n	8	8	5	5

5 La histopatología de los órganos hematopoyéticos de los ratones de placebo con enfermedad inducida por TEL-PDGFR β demuestra una infiltración masiva de formas mieloides en maduración que borran completamente la arquitectura esplénica normal. El examen adicional demuestra una médula ósea marcadamente hiper celular con una predominancia completa de formas mieloides en maduración. Se observa hematopoyesis extramedular en el hígado y leucocitosis marcada en la sangre periférica. El examen histopatológico de órganos de los ratones tratados con compuesto (II) TEL-PDGFR β mostró una enfermedad mieloproliferativa significativamente menos grave que sus contrapartes tratados con placebo, aunque los aspectos de expansión mieloides están aún presentes. Aunque la arquitectura esplénica de los animales tratados con compuesto (II) TEL-PDGFR β está alterada, hay una conservación relativa de pulpa esplénica roja y blanca en comparación con bazos del grupo tratado con placebo. El análisis adicional de bazos de animales tratados con compuesto (II) demuestra también que la pulpa roja esplénica parece estar expandida mediante una mezcla de ambas formas mieloides en maduración y elementos eritroides en contraste con la población predominantemente mieloides observada en animales tratados con placebo. Se notan también cambios similares en la médula ósea de animales tratados con compuesto (II) que, a pesar de ser hiper celular, exhiben una mezcla de ambos elementos mieloides y eritroide frente a las médulas espinales completamente mieloides de manera predominante del grupo tratado con placebo. Finalmente, la carga del tumor significativamente reducida de los animales tratados con compuesto (II) TEL-PDGFR β se refleja también en las secciones de hígado de estos animales que exhiben solamente parches focales de hematopoyesis extramedular en comparación con la participación extensiva del hígado observada en los animales tratados con placebo.

El análisis mediante FACS del bazo de animales de placebo T/P muestra un incremento marcado en células

Gr1+/Mac1+ y una disminución en células B linfoides (B200+, CD19+) en comparación con un bazo normal. En corroboración con los hallazgos histopatológicos, los animales tratados con compuesto (II) muestran un patrón similar de mieloproliferación, pero con un porcentaje consistentemente reducido de células Gr1+/Mac1+ y un porcentaje ligeramente incrementado de B220+/CD19+ en comparación con el grupo de placebo.

5 En el experimento de trasplante de médula ósea FIP1L1-PDGFR α , se observan más diferencias entre los grupos de placebo y compuesto (II). Los animales tratados con placebo desarrollan rápidamente una enfermedad mieloproliferativa fatal similar a aquella descrita previamente para FIP1L1-PDGFR α . Mientras que todos los animales de placebo se pierden por enfermedad en el día 24, todos los animales tratados con compuesto (II) permanecieron vivos y saludables hasta el día 33 cuando se terminó el estudio. En comparación con el placebo, el tratamiento con
10 compuesto (II) se correlacionó con reducciones significativas de WBC total ($569,7 \times 10^6$ células/ml para placebo frente a $5,6 \times 10^6$ células/ml para compuesto (II), $p < 0,01$) y el peso del bazo (731,8 mg para placebo frente a 88,0 mg para compuesto (II), $p < 0,01$) (Tabla 1).

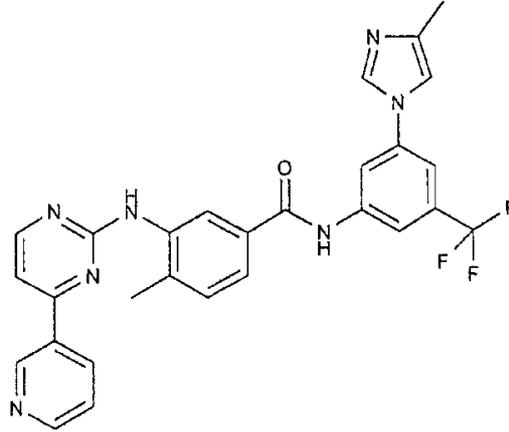
15 El análisis histopatológico y mediante FACS reveló evidencia de enfermedad mieloproliferativa grave en animales tratados con placebo FIP1L1-PDGFR α , como se demuestra por una infiltración masiva de elementos mieloides en maduración en los vasos y las médulas óseas, así como también grados extensivos de hematopoyesis extramedular en los hígados del grupo tratado con placebo. En contraste, el examen de órganos hematopoyéticos de animales tratados con compuesto (II) exhibe una conservación sorprendente de arquitectura esplénica normal con cantidades sustancialmente reducidas de elementos mieloides en maduración en la pulpa roja lo cual se corroboró mediante
20 análisis citométricos de flujo de esplenocitos derivados de estos animales. Las secciones de médula ósea de animales tratados con fármaco mostraron también una mejoría dramática sobre los animales tratados con placebo y fueron menos celulares con la reaparición de espacios de grasa y proporciones más normales de elementos mieloides a eritroides. Finalmente, la eficacia del compuesto (II) en estos animales tratados con fármaco se demostró por la ausencia notable de cualquier hematopoyesis extramedular en sus hígados.

Estudio clínico

25 Se evalúa el efecto del compuesto (II) sobre los niveles de transcripción de FIP1L1-PDGFR α y el estado de mutación de c-kit/PDGFR-a en células malignas tomadas de la sangre y/o la médula ósea. HES, SM y CEL pueden resultar de una cinasa de fusión: FIP1L1-PDGFR α SM puede resultar también de una mutación de activación en el gen KIT. Q-RT-PCR para el transcrito de FIP1L1-PDGFR α en la línea de base, ciclo 1 día 15, ciclo 1, 2, 3 día 28 y cada tercer ciclo subsiguiente, fin del estudio. Análisis de mutación de c-kit, PDGFR-a. Tres grupos separados, cada
30 uno con las siguientes poblaciones de pacientes: HES/CEL puntos finales: tasas de respuesta después de 3 meses de terapia.

REIVINDICACIONES

1. Derivado de pirimidilaminobenzamida denominado 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil]benzamida de fórmula (II):



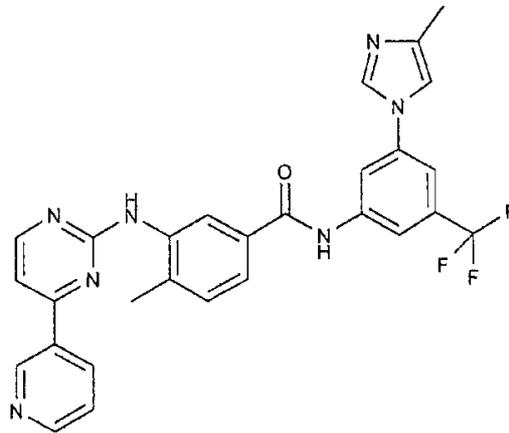
(II)

5 o un N-óxido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad mieloproliferativa seleccionada de síndrome hipereosinofílico, leucemia eosinofílica crónica y síndrome hipereosinofílico con resistencia a imatinib.

2. Compuesto de fórmula II o un N-óxido o una sal farmacéuticamente aceptable para su uso según la reivindicación 1, en el que la enfermedad mieloproliferativa es síndrome hipereosinofílico.

10 3. Uso de un derivado de pirimidilaminobenzamida denominado 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil]benzamida de fórmula (II):

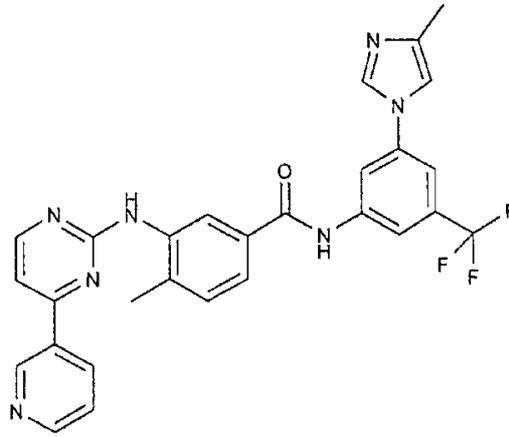


(II)

15 o un N-óxido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad mieloproliferativa seleccionada de síndrome hipereosinofílico, leucemia eosinofílica crónica y síndrome hipereosinofílico con resistencia a imatinib.

4. Uso según la reivindicación 3, en el que la enfermedad mieloproliferativa es síndrome hipereosinofílico.

5. Composición farmacéutica para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad mieloproliferativa seleccionada de síndrome hipereosinofílico, leucemia eosinofílica crónica y síndrome hipereosinofílico con resistencia a imatinib, que comprende un compuesto de fórmula (II):



(II)

o un N-óxido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 6. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 5, en donde la enfermedad mieloproliferativa es síndrome hipereosinofílico.