

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 527**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4439 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

C07D 417/14 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.05.2012 PCT/US2012/036589**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.11.2012 WO12151523**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2012 E 12720761 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2017 EP 2704713**

54 Título: **Inhibidores de CSF-1R para el tratamiento de tumores de cerebro**

30 Prioridad:

05.05.2011 US 201161482723 P
16.04.2012 US 201261624861 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.07.2017

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (50.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH y
SLOAN-KETTERING INSTITUTE FOR CANCER
RESEARCH (50.0%)

72 Inventor/es:

DANIEL, DYLAN;
JOYCE, JOHANNA y
SUTTON, JAMES

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 622 527 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

Inhibidores de CSF-1R para el tratamiento de tumores de cerebro

Antecedentes

5 Los cánceres del cerebro y del sistema nervioso están entre los más difíciles de tratar. El pronóstico para los
pacientes con estos cánceres depende del tipo y de la localización del tumor, así como de su etapa de
desarrollo. Para muchos tipos de cáncer de cerebro, la expectativa de vida promedio después del
establecimiento de los síntomas puede ser de meses o de un año o dos. El tratamiento consiste
10 primordialmente en remoción quirúrgica y terapia de radiación; también se utiliza quimioterapia, pero la gama
de agentes quimioterapéuticos adecuados es limitada, tal vez debido a que la mayoría de los agentes
terapéuticos no penetran en la barrera hematoencefálica adecuadamente para tratar los tumores de cerebro.
La utilización de los productos quimioterapéuticos conocidos junto con cirugía y radiación raramente prolonga
la sobrevivencia mucho más allá de aquella producida por la cirugía y la radiación solas. Por consiguiente, se
necesitan mejores opciones terapéuticas para los tumores de cerebro.

15 Los gliomas son un tipo común de tumor de cerebro. Se presentan a partir del tejido neuronal de soporte
comprendido de las células gliales (de ahí su nombre de glioma), las cuales mantienen la posición y función
de las neuronas. Los gliomas se clasifican de acuerdo con el tipo de células gliales a las que se parecen: los
astrocitomas (incluyendo glioblastomas) se parecen a las células gliales de astrocitos en forma de estrella, los
oligodendrogliomas se parecen a las células gliales de oligodendrocitos; y los ependimomas se parecen a las
20 células gliales ependimales que forman el revestimiento de las cavidades de fluidos en el cerebro. En algunos
casos, un tumor puede contener una mezcla de estos tipos de células, y sería referido como un glioma mixto.

El tratamiento actual típico para los cánceres de cerebro es la remoción quirúrgica de la mayor parte del tejido
tumoral, la cual se puede hacer mediante cirugía invasiva o utilizando biopsia o métodos de extracción. Los
gliomas tienden a diseminarse de una manera irregular y son muy difíciles de remover completamente. Como
un resultado, la recurrencia casi siempre se presenta pronto después de la remoción del tumor. Se puede
25 utilizar terapia de radiación y/o quimioterapia en combinación con la remoción quirúrgica, pero éstas en
general proporcionan una prolongación solamente modesta del tiempo de sobrevivencia. Por ejemplo,
estadísticas recientes mostraron que sólo aproximadamente la mitad de los pacientes en los Estados Unidos
que son diagnosticados con glioblastoma están vivos un año después del diagnóstico, y sólo
aproximadamente el 25 % están todavía vivos después de dos años, inclusive cuando se tratan con el actual
30 estándar de tratamientos de combinación de atención.

El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor de cerebro primario de adultos más común, y es notorio por su
letalidad y falta de respuesta a los planteamientos actuales de tratamiento. Desafortunadamente, no se han
presentado mejoras sustanciales en las opciones de tratamiento en los años recientes, y sólo ha habido
mejoras mínimas en las perspectivas de sobrevivencia para los pacientes con glioblastoma multiforme (GBM).
35 Por consiguiente, sigue existiendo una urgente necesidad de mejores tratamientos para los cánceres del
cerebro, tales como gliomas.

Los gliomas se desarrollan en un micro-ambiente de tejido complejo comprendido de muchos tipos diferentes
de células en el parénquima del cerebro en adición a las células de cáncer mismas. Los TAM son uno de los
tipos de células estromales prominentes presentes, y con frecuencia cuentan por una porción sustancial de
40 las células en los tejidos tumorales. Su origen es incierto: estos TAM se pueden originar ya sea por
microglías, la población de macrófagos residente en el cerebro, o se pueden reclutar a partir de la periferia.

Los TAM pueden modular el inicio y progreso del tumor de una manera específica del tejido: parecen suprimir
el desarrollo de cáncer en algunos casos, pero mejoran el progreso del tumor en la mayoría de los estudios
hasta la fecha. En realidad, en aproximadamente el 80 % de los cánceres en donde hay un incremento en la
infiltración de macrófagos, los niveles elevados de TAM están asociados con la enfermedad más agresiva y
con un mal pronóstico del paciente. Varios estudios han demostrado que los gliomas humanos también
45 exhiben un aumento significativo en los números de TAMs, lo cual se correlaciona con un grado de tumor
avanzado, y los TAM son típicamente el tipo de célula inmunitaria predominante en los gliomas. Sin embargo,
la función de los TAM en la gliomagénesis sigue siendo pobremente entendida, y actualmente no se sabe si la
dirección de estas células representa una estrategia terapéutica viable. De hecho, se han reportado en la
50 literatura efectos opuestos sobre el crecimiento tumoral, en algunos casos incluso en donde se utilizó una
estrategia experimental similar para agotar los macrófagos en el mismo modelo de implantación de glioma
ortotópico. En algunos estudios, se ha implicado al TNF- α o a la integrina- β 3 producida por los TAM en la
supresión del crecimiento del glioma, mientras que en otros reportes, se han propuesto CCL2 y MT1-MMP
55 como potenciadores del desarrollo e invasión de tumores.

La inhibición de la señalización de CSF-1R representa un novedoso planteamiento relevante en la traducción,
que se ha utilizado en varios contextos oncológicos, incluyendo los tumores óseos intra-tibiales de xenoinjerto.
Sin embargo, todavía no se ha demostrado que sea efectiva en los tumores de cerebro. Algunos cánceres no

5 cerebrales se han tratado con compuestos que afectan a una variedad de tipos de células que están asociadas con, o soportan, las células tumorales, en lugar de dirigirse directamente a las células tumorales mismas. Por ejemplo, se reporta que PLX3397 co-inhíbe tres objetivos (FMS, Kit, y Flt3-ITD) y sub-modula diversos tipos de células, incluyendo macrófagos, microglías, osteoclastos, y mastocitos. El PLX3397 se ha probado para el tratamiento de linfoma de Hodgkin. Sin embargo, el linfoma de Hodgkin responde bien a diversos productos quimioterapéuticos, de acuerdo con la literatura del PLX3397, mientras que los tumores de cerebro son mucho más resistentes a los productos quimioterapéuticos y no se han tratado con éxito. Como se demuestra en la presente, un inhibidor de CSF-1R no tuvo ningún efecto directo sobre la proliferación de las células de glioblastoma en cultivo, y no redujo los números de células de macrófagos en los tumores de los animales tratados. Por consiguiente, es sorprendente que, como también se demuestra en la presente, un inhibidor de CSF-1R puede inhibir efectivamente el crecimiento de los tumores de cerebro *in vivo*, puede provocar la reducción en el volumen tumoral de glioblastoma multiforme (GBM) en etapa avanzada, e incluso aparentemente puede erradicar algunos glioblastomas.

Resumen de las realizaciones de la invención

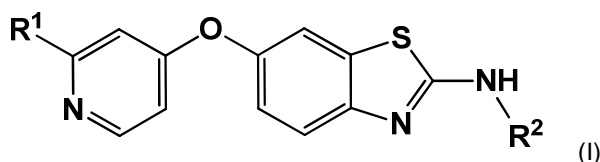
15 La presente invención se basa en la demostración de que los tumores de cerebro, en particular el glioblastoma, se pueden tratar con un inhibidor de CSF-1R. Se cree que la efectividad de los inhibidores de CSF-1R descritos en la presente se debe a su inhibición de ciertas actividades de los TAM, incluso cuando no parezcan reducir significativamente el número de los TAM presentes, y probablemente también es una función de la capacidad demostrada de estos compuestos para penetrar en la barrera hematoencefálica efectivamente en los sujetos con un tumor de cerebro. Estos métodos proporcionan nuevas opciones terapéuticas muy necesarias para los pacientes diagnosticados con tumores de cerebro, en particular glioblastomas.

25 El factor estimulante de colonias-1 (CSF-1), también denominado como factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), señala a través de su receptor CSF-1R (también conocido como c-FMS) para regular la diferenciación, proliferación, reclutamiento y sobrevivencia de los macrófagos. Se han desarrollado inhibidores de moléculas pequeñas del CSF-1R que bloquean la fosforilación del receptor compitiendo por el enlace al ATP en el sitio activo, como para otros inhibidores de la cinasa de tirosina receptora. La presente invención utiliza un potente inhibidor selectivo del CSF-1R, que penetra en la barrera hematoencefálica (BBB), para bloquear la señalización del CSF-1R en el glioma, como se ilustra en el modelo de gliomagénesis de ratón RCAS-PDGF-B-HA/*Nestin-Tv-a;Ink4a/Arf*^{-/-}. Este modelo de glioma genéticamente diseñado es ideal para la prueba pre-clínica como un modelo para el glioblastoma multiforme (GBM) humano, debido a que recapitula todas las características del glioblastoma multiforme (GBM) humano en un establecimiento inmunocompetente. Debido a que modela cercanamente al glioblastoma multiforme (GBM) humano, y en particular el glioblastoma multiforme (GBM) pro-neural, se espera que la eficacia en este modelo se traduzca en eficacia clínica sobre los glioblastomas humanos, tales como el glioblastoma multiforme y los gliomas mixtos.

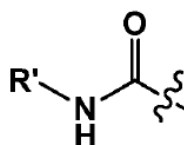
Algunos inhibidores de CSF-1 R capaces de penetrar el cerebro son los compuestos de benzoxazol y de benzotiazol 6-O-sustituidos que se dan a conocer en la WO2007/121484, en particular los compuestos de las fórmulas IIa y IIb de esa referencia, y los compuestos que se dan a conocer en la presente.

40 La WO 2007/119046 A1 se relaciona con 4-anilinoquinolin-3-carboxamidas como inhibidores de CSF-1R como agentes anticáncer.

En un aspecto, la invención proporciona un compuesto de la fórmula (I):

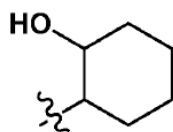


en donde R¹ es



en donde R' es ME o Et; y

R² es



;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o uso en el tratamiento de un tumor de cerebro en un sujeto mamífero.

5 Los compuestos se pueden utilizar para tratar a un paciente, con frecuencia a un sujeto humano, que haya sido diagnosticado con un tumor de cerebro. Otras realizaciones de la invención se describen más adelante.

Breve descripción de los dibujos

10 La Figura 1A es una gráfica que muestra las cantidades relativas de células positivas para DAPI Vivo en el tejido de cerebro normal y de glioblastoma, como se miden mediante el aumento en la proporción de las células que tiñen positivo para CD45 (marcador de pan-leucocitos) y para CD11b (marcador de células mieloides) en el tejido tumoral. También se muestran los datos de la clasificación de células activada por fluorescencia (FACS).

La Figura 1B ilustra las células de cerebro teñidas con CD68 a partir de tejido de cerebro normal y a partir de un glioblastoma de Grado IV, y muestra la abundante infiltración de macrófagos en el tejido tumoral. Véase el Ejemplo 1.

15 La Figura 1C ilustra el aumento del nivel de ARNs para CD68, CSF-1R y CSF-1 en relación con el gen de mantenimiento de Ubiquitina C (Ubc), para el tejido de glioblastoma multiforme (GBM) en relación con el tejido de cerebro normal.

La Figura 1D muestra las cantidades relativas de CD11b, TVA, CSF-1 y CSF-1R en los TAM en relación con las células tumorales.

20 La Figura 2 ilustra las cantidades de BLZ945 en plasma, tejido de cerebro a partir de la mitad izquierda de un cerebro que contiene glioblastoma multiforme (GBM), y a partir de la mitad derecha del mismo cerebro sin glioblastoma multiforme (GBM) visible en varios puntos del tiempo después de tratar a las cohortes de ratones con BLZ945.

25 La Figura 3A muestra la inhibición mediante BLZ945 de la fosforilación del CSF-1R, en seguida de la estimulación del CSF-1, en células de macrófagos derivados de médula ósea (BMDM).

La Figura 3B muestra la velocidad de duplicación de la población de células de macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) no tratadas, y demuestra que el tratamiento de las células con BLZ945 67 nM tiene el mismo efecto sobre esta velocidad que la ausencia de estimulación del CSF-1.

30 Las Figuras 3C a 3E muestran la velocidad de proliferación de las células de macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) a partir de los ratones *Ink4a/Arf*^{-/-}, de las células de cerebro de ratón normales CRL-2647, y para dos cultivos celulares de glioblastoma multiforme (GBM) de ratón.

La Figura 3F muestra que el número total y el tamaño de las neuroesferas no fueron afectados por el BLZ945 en 670 nM.

35 La Figura 4A ilustra la supervivencia sin síntomas de los ratones *RCAS-PDGF-B-HA/Nestin-Tv-a;Ink4a/Arf*^{-/-} tratados con vehículo solo o con vehículo + BLZ945. Véase el Ejemplo 4.

La Figura 4B ilustra el grado del tumor para los ratones tratados y no tratados en el punto final del estudio de 26 semanas. Todos los ratones de control tuvieron tumores de grado III o IV.

La Figura 5A muestra los datos del tamaño del tumor medidos mediante MRI para los animales tratados y de control durante los primeros 6 días de tratamiento con BLZ945.

40 La Figura 5B muestra el volumen del tumor para los ratones de control individuales (gráfica superior) y los ratones tratados (gráfica inferior) durante los primeros 6 días después de iniciarse la dosificación con BLZ945.

Las Figuras 5C y 5D ilustran el volumen del tumor medido mediante MRI en los animales tratados con BLZ945 empezando con los tumores grandes (volumen >40 milímetros cúbicos), y muestra que incluso con los tumores grandes, el volumen del tumor disminuyó en casi todos los sujetos.

45 La Figura 5-2 muestra los datos sobre el volumen del tumor para los animales individuales en el grupo de

control para el Ejemplo 5 (5-2A) y en el grupo tratado (5-2B), y la Figura 5-2C muestra los datos del tamaño del tumor para los sujetos con tumor grande tratados con BLZ945 en el Ejemplo 5.

5 Figura 6: La primera gráfica muestra el porcentaje de células Olig2+ en los cerebros de los animales de los grupos con vehículo, tratados, y con "tumor grande" en el Ejemplo 5. La segunda gráfica muestra la fracción de células tumorales que se estaban dividiendo activamente, como se miden mediante marcado con bromodesoxiuridina (BrdU). La tercera gráfica muestra el nivel de apoptosis en las células tumorales, como se miden mediante el teñido con caspasa 3 (CC3) disociada, y demuestra que el BLZ945 promueve la apoptosis de las células tumorales.

10 La Figura 7A muestra los pasos utilizados para la separación con FACS de las células para los análisis de expresión genética en el Ejemplo 7.

La Figura 7B muestra la firma del gen de SVM para los animales tratados y no tratados, a partir de los cuales se identificaron los genes sobre-regulados y sub-regulados mediante su tratamiento.

Las Figuras 7C a 7E muestran la sobre-regulación selectiva de los genes asociados con M2 y los objetivos del EGR2.

15 La Figura 8A ilustra gráficamente el grado de la sobre-regulación y la relevancia estadística utilizada con el fin de clasificar los genes diferencialmente expresados en la firma del gen de SVM.

La Figura 8B muestra la firma de regresión del gen Lasso-5.

La Figura 8C muestra la predicción de la firma del gen Lasso para los tumores pro-neurales de (GBM) en el conjunto de datos de TCGA.

20 La Figura 8D muestra la predicción de la firma del gen Lasso para los tumores pro-neurales de GBM en el conjunto de datos combinados.

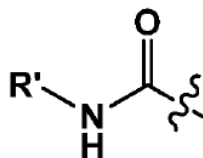
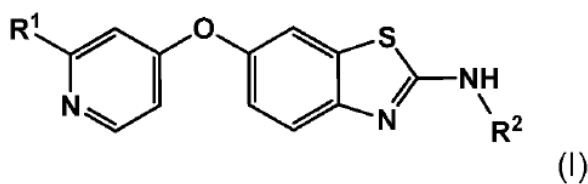
La Figura 8E muestra la predicción de la firma del gen de SVM para los tumores pro-neurales de GBM en el conjunto de datos de TCGA.

25 La Figura 8F muestra la predicción de la firma del gen de SVM para los tumores pro-neurales de GBM en el conjunto de datos combinados.

La Figura 8G ilustra las proporciones de riesgo de la firma del gen de BLZ945 para los conjuntos de datos de TCGA y combinados, para los tumores pro-neurales, clásicos, mesenquimales, y neurales de GBM, y resalta la correlación estadística con el GBM pro-neural a través de todos los datos.

Descripción detallada

30 La invención proporciona los compuestos de la fórmula (I) para usarse en el tratamiento de tumores de cerebro. Los compuestos de la fórmula (I) tienen esta fórmula:

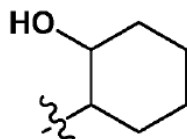


en donde R¹ es

en donde R' es Me o Et, y

35

R² es;

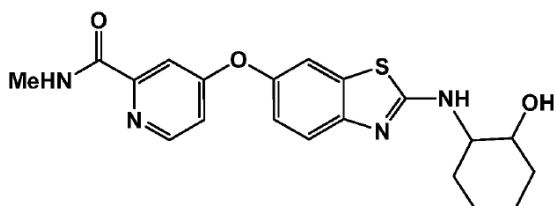


e incluyen las sales farmacéuticamente aceptables, así como los compuestos neutros de esta fórmula.

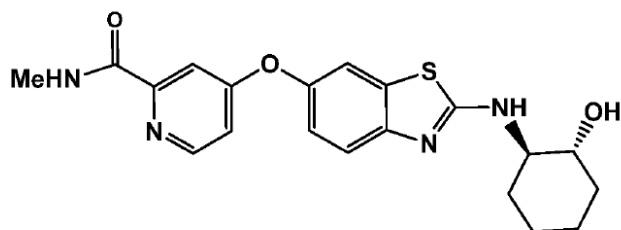
Los compuestos específicos dentro del alcance de la invención se describen adicionalmente más adelante.

5 El tratamiento de un tumor de cerebro puede incluir la inhibición de la velocidad de crecimiento de un tumor de cerebro (hacer más lento el crecimiento tumoral), o la reversión del crecimiento de un tumor de cerebro (es decir, la reducción en el volumen del tumor), o la eliminación sustancial del tumor, lo cual se ha demostrado en la presente mediante el tratamiento de ratones que tienen estos tumores. En particular, el tratamiento puede hacer más lento el progreso o puede revertir el progreso de un glioblastoma. Se puede utilizar en conjunto con otros tratamientos, incluyendo la remoción del volumen de un tumor de cerebro, y se puede utilizar para hacer más lento o revertir el re-crecimiento, o para reducir el volumen o la masa del tejido tumoral residual en seguida de la remoción del tumor del cerebro mediante métodos quirúrgicos o de biopsia. Los compuestos también se pueden utilizar en conjunto con otros productos quimioterapéuticos.

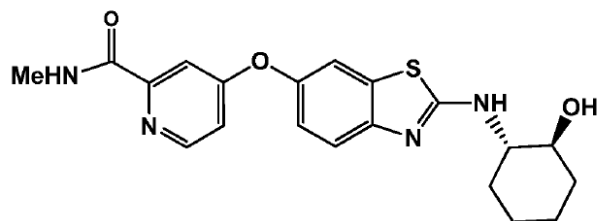
15 Ciertos compuestos preferidos para uso en la invención son cualquiera de los siguientes compuestos, o una mezcla de cualesquiera dos o más de estos compuestos, o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de estos:



(1a);

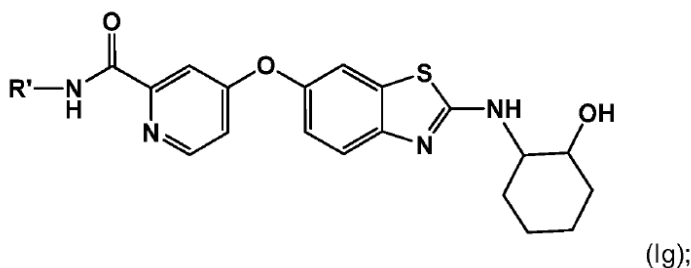


(1c);



(1d);

20 Cada uno de estos compuestos y sus sales farmacéuticamente aceptables son las realizaciones preferidas para los propósitos de la presente invención. Las realizaciones preferidas de estos compuestos también incluyen los compuestos de esta fórmula:



en donde R' es Me, o Et, de preferencia metilo. Las realizaciones específicas de estos compuestos pueden ser de estereoquímica absoluta (R,R) o de estereoquímica absoluta (S,S).

5 Se espera que estos compuestos exhiban penetración en la barrera hematoencefálica como el BLZ945, basándose en sus propiedades físico-químicas muy similares, y por consiguiente, que sean adecuados para utilizarse en los presentes métodos de tratamiento.

Los compuestos de la fórmula (I) son conocidos en la materia, y los métodos para la elaboración de los mismos se dan a conocer, por ejemplo, en la WO2007/121484; su utilidad para tratar glioma y su penetración en la barrera hematoencefálica no se conocían anteriormente. El compuesto (1c) corresponde al BLZ945, el cual se utilizó para las pruebas *in vitro* e *in vivo* descritas en la presente.

Los compuestos se pueden utilizar solos o se pueden formular en una composición farmacéutica que también contenga cuando menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, y con frecuencia contienen cuando menos dos excipientes farmacéuticamente aceptables. Se entenderá que los excipientes farmacéuticamente aceptables son típicamente esterilizados. Algunos excipientes adecuados se dan a conocer en la presente; en algunas realizaciones, el compuesto se formula como una composición que comprende captisol, por ejemplo, captisol al 20 %.

En algunas realizaciones, el tumor de cerebro se selecciona a partir de una metástasis de cerebro, un astrocitoma (incluyendo glioblastoma), un oligodendroglioma, un ependimoma, y un glioma mixto. En las realizaciones preferidas, el tumor de cerebro es un glioma, en particular glioblastoma multiforme. En otras realizaciones, el tumor de cerebro es una metástasis de cerebro, es decir, un tumor metastásico que se presenta a partir de un cáncer que se originó en cualquier otra parte del cuerpo.

En algunas realizaciones, el paciente es uno que tiene glioblastoma. En las realizaciones específicas, el sujeto es uno diagnosticado con glioblastoma pro-neural. Véase Verhaak y colaboradores, *Cancer Cell* 17(1): 98-110 (2010). Este subtipo de glioblastoma tiende a presentarse en los sujetos más jóvenes y a involucrar mutaciones de TP53, IDH1 y PDGFRA. Verhaak y colaboradores reportaron que los pacientes con glioblastoma pro-neural respondían menos que otros subtipos (clásico, neural, mesenquimal) a las agresivas quimioterapias en uso en el 2010, e inclusive sugirieron que este tratamiento podría ser contraindicado para estos pacientes. Los presentes métodos son en especial efectivos para tratar glioblastoma pro-neural, como fue demostrado por el modelo animal de GBM pro-neural utilizado en la presente. Se descubrió que las firmas genéticas específicas encontradas en los TAM en los ratones tratados con BLZ945 concordaban con aquéllas de los pacientes humanos con glioblastoma pro-neural que tuvieron tiempos de supervivencia media más largos que el promedio; esta correlación no se presentó cuando se comparó con los pacientes que tenían otros subtipos de glioblastoma. Por consiguiente, la información de la firma genética se puede utilizar para seleccionar a los pacientes para el tratamiento con un inhibidor de CSF-1R, como se describe en la presente, o para evaluar el pronóstico para un sujeto que reciba dichos tratamientos.

En algunas realizaciones, los compuestos se utilizan para tratar a un sujeto antes de otros métodos de tratamiento, tales como la remoción del tumor. En otras realizaciones, los compuestos se utilizan para tratar a un sujeto en conjunto con otros métodos de tratamiento, tales como la remoción del tumor mediante ya sea los métodos quirúrgicos o de biopsia, o en conjunto con terapia de radiación, o en conjunto con tanto la remoción del tumor como terapia de radiación.

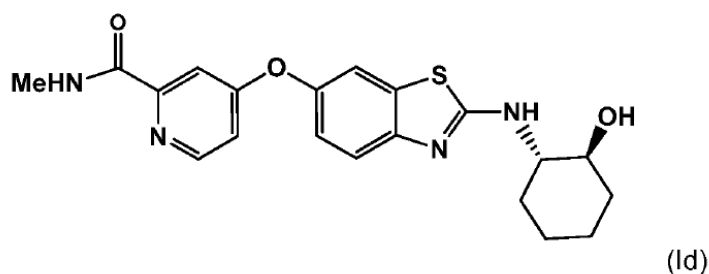
Opcionalmente, se pueden utilizar otros agentes quimio-terapéuticos junto con los compuestos y métodos que se dan a conocer anteriormente. Los agentes quimioterapéuticos adicionales adecuados para utilizarse en estos métodos son aquéllos conocidos en la materia como los convencionales para utilizarse en el tratamiento de glioblastoma. Algunos de estos agentes quimioterapéuticos incluyen agentes anti-angiogénicos, bevacizumab con o sin irinotecano, nitrosoureas tales como Carmustina (BCNU), platinas tales como cisplatino (cisplatina), agentes alquilantes tales como temozolomida, inhibidores de cinasa de tirosina (gefitinib o erlotinib), Ucrania, y cannabinoides. Estos agentes terapéuticos adicionales (agentes co-terapéuticos) se pueden utilizar simultáneamente con el inhibidor de CSF-1R, tal como mediante su administración concurrente, la mezcla del agente co-terapéutico con el inhibidor de CSF-1R, o mediante su administración en

secuencia. Una realización preferida involucra el uso de un compuesto seleccionado a partir de aquéllos de la fórmula I que se dan a conocer en la presente (por ejemplo, las fórmulas Ia, Ic, Id, o Ig) en combinación con temozolomida o con un compuesto de platina.

5 En adición, los macrófagos se han implicado en las respuestas terapéuticas reducidas en el cáncer de mama y en el aumento de la revascularización en xenoinjertos de glioblastoma en seguida de la terapia de radiación. Debido a que estos efectos de los macrófagos reducen la eficacia de otras terapias, se puede esperar que los compuestos de la invención, los cuales inhiben las actividades de los macrófagos en el glioblastoma *in vivo*, proporcionen un efecto sinérgico cuando se utilicen en combinación con otros agentes terapéuticos o con terapia de radiación.

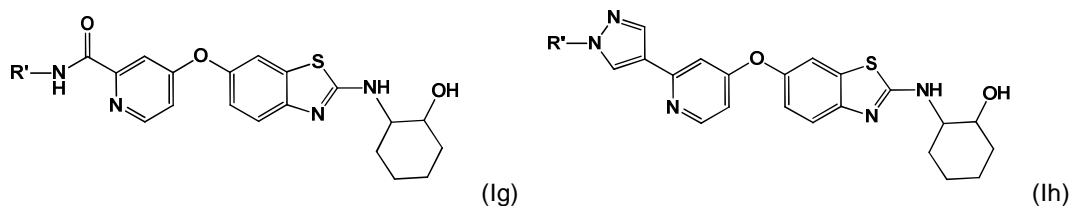
10 En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente se practican con un compuesto de la fórmula (Ic). En otras realizaciones, los métodos se pueden practicar con un compuesto de la fórmula (I) que no sea el compuesto de la fórmula (Ic), tal como las otras especies que se dan a conocer en la presente.

En algunas realizaciones, el compuesto de la fórmula (I) también inhibe cuando menos otro objetivo para proporcionar mejores efectos anti-tumorales. Por ejemplo, el compuesto de esta fórmula:



15 también inhiben al PDGFR en concentraciones que se alcanzan con las dosificaciones terapéuticas típicas, tales como aquéllas descritas en la presente. De conformidad con lo anterior, estos compuestos se pueden utilizar cuando se desee un mecanismo de acción doble, y se pueden utilizar en cualquiera de los métodos descritos anteriormente.

20 Los compuestos de ejemplo de las fórmulas Ig e Ih se incluyen en la siguiente tabla para ilustrar las actividades relativas sobre CSF-1R y PDGFR. Muchos de estos compuestos son conocidos en la materia, véase la WO2007/066898, y los métodos para hacer estos compuestos también son bien conocidos. Los compuestos de la fórmula I son muy activos sobre el CSF-1R independientemente de la estereoquímica en el anillo de ciclohexilo, como se muestra en la siguiente Tabla. Entre los diversos isómeros, los isómeros S,S
25 también son altamente activos sobre el PDGFR-β así como sobre el CSF-1R y, por consiguiente, pueden actuar sobre los gliomas mediante dos mecanismos para proporcionar una mayor eficacia.

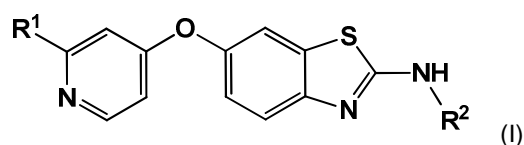


Compuesto	R'	Estereo-química	CSF-1R IC ₅₀ (μM)	PDGFR-β IC ₅₀ (μM)
Ig-A	Me	(1R,2R)	0.001	5.9
Ig-B	Et	(1R,2R)	0.006 μM	13.9
Ig-C	Pr	(1R,2R)	0.008	7.7

Compuesto	R'	Estereo-química	CSF-1R IC ₅₀ (μM)	PDGFR-β IC ₅₀ (μM)
Ig-D	Me	(1S,2S)	0.0008	0.048
Ig-E	Me	(1R,2S)	0.006	6.6
Ig-F	Me	(1S,2R)	0.001	0.78
Ih-A	Me	(1R,2R)	0.0009	0.74
Ih-B	Et	(1R,2R)	0.003	1.7
Ih-C	Pr	(1R,2R)	0.007	1.5
Ih-D	Me	(1S,2S)	0.001	0.02
Ih-E	Me	(1S,2R)	0.002	0.63

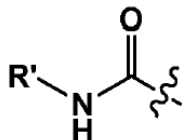
Las siguientes realizaciones enumeradas son representativas de la invención. Las realizaciones 1-8 corresponden a las reivindicaciones 1-8. Las realizaciones 9-14 no forman parte de las reivindicaciones.

1. Un compuesto de la fórmula (I):



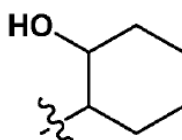
5

en donde R¹ es



en donde R² es Me, o Et; y

R² es

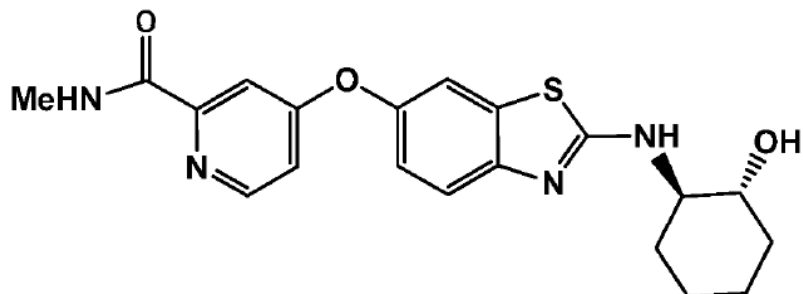


10

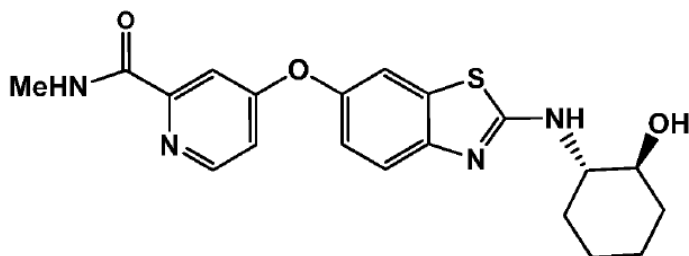
o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

para uso en el tratamiento de un tumor cerebral en un sujeto mamífero.

2. Un compuesto para uso de acuerdo con la realización 1, en donde el compuesto de Fórmula (I) es:



3. Un compuesto para uso de acuerdo con la realización 1, en donde el compuesto de Fórmula (I) es:



5

4. Un compuesto para uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde el tumor de cerebro es un glioma.

5. Un compuesto para uso de acuerdo con la realización 4, en donde el glioma es glioblastoma multiforme.

10 6. Un compuesto para uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, 1-3, en donde el tumor de cerebro es una metástasis de cerebro, astrocitoma (incluyendo glioblastoma), oligodendroglioma, ependimomas, o un glioma mixto.

7. Un compuesto para uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, cuando el compuesto es formulado para uso con un agente coterapéutico.

15 8. Un compuesto para uso de acuerdo con la realización 7, en donde el agente coterapéutico se selecciona de un agente anti-angiogénico, bevacizumab con o sin irinotecano, nitrosoureas tales como Carmustina (BCNU), platinas tales como cis-platino (cisplatina), agentes alquilantes tales como temozolomida, inhibidores de cinasa de tirosina (gefitinib o erlotinib), Ucraina, y cannabinoides.

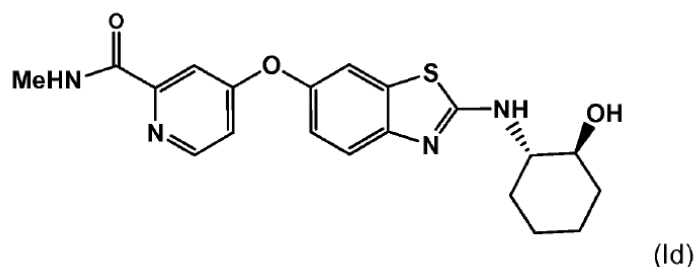
9. Un compuesto para uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el compuesto de la fórmula (I) es para administración oral.

20 10. Un compuesto para uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde la cantidad del compuesto de la fórmula (I) administrada al sujeto es de entre aproximadamente 50 miligramos/kilogramo al día y aproximadamente 500 miligramos/kilogramo al día, o de entre 5 y 500 miligramos/kilogramo, o de entre 100 y 300 miligramos/kilogramo al día.

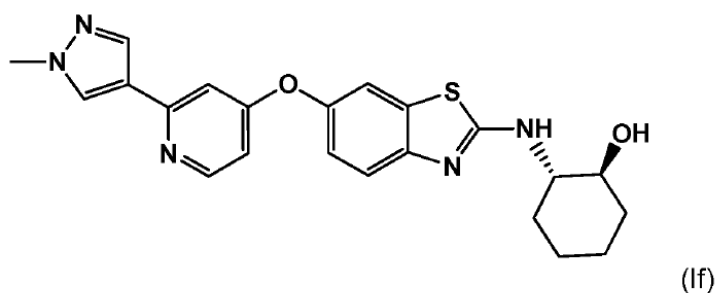
25 11. Un compuesto para uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el sujeto tiene glioblastoma pro-neural.

12. Un compuesto para uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el sujeto es uno seleccionado debido a que el sujeto tiene un nivel elevado de señalización de PDGF o PDGFR.

30 13. Un compuesto para uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el sujeto se trata de una manera contemporánea con un inhibidor de PDGFR, o se trata con un inhibidor de CSF-1R que tiene una actividad sub-nanomolar como un inhibidor de PDGFR, por ejemplo, el compuesto (Id) o (If).



o



14. Un compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el sujeto es un humano.

Como se utilizan en la presente, los términos "sal" o "sales" se refieren a una sal de adición de ácido o de adición de base de un compuesto de la invención. Las "sales" incluyen en particular las "sales farmacéuticamente aceptables". El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a las sales que conservan la efectividad biológica y las propiedades de los compuestos de esta invención y, que típicamente no son biológicamente o de otra manera indeseables.

Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables se pueden formar con ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos, por ejemplo, las sales de acetato, aspartato, benzoato, besilato, bromuro/bromhidrato, bicarbonato/carbonato, bisulfato/sulfato, canfor-sulfonato, cloruro/clorhidrato, clorteofilonato, citrato, etan-disulfonato, fumarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, hipurato, yodhidrato/yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, lauril-sulfato, malato, maleato, malonato, mandelato, mesilato, metil-sulfato, naftoato, napsilato, nicotinato, nitrato, octadecanoato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato/fosfato ácido/fosfato diácido, poligalacturonato, propionato, estearato, succinato, sulfo-salicilato, tartrato, tosilato, y trifluoro-acetato.

Los ácidos inorgánicos a partir de los cuales se pueden derivar las sales incluyen, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares.

Los ácidos orgánicos a partir de los cuales se pueden derivar las sales incluyen, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido mandélico, ácido metan-sulfónico, ácido etansulfónico, ácido toluen-sulfónico, ácido sulfo-salicílico, y similares. Las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables se pueden formar con bases inorgánicas y orgánicas.

Las bases inorgánicas a partir de las cuales se pueden derivar las sales incluyen, por ejemplo, las sales de amonio y de los metales de las columnas I a XII de la Tabla Periódica. En ciertas realizaciones, las sales se derivan a partir de sodio, potasio, amonio, calcio, magnesio, hierro, plata, zinc, y cobre; las sales particularmente adecuadas incluyen las sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio.

Las bases orgánicas a partir de las cuales se pueden derivar las sales incluyen, por ejemplo, aminas primarias, secundarias, y terciarias, aminas sustituidas, incluyendo las aminas sustituidas que se presentan naturalmente, aminas cíclicas, resinas básicas de intercambio de iones, y similares. Ciertas aminas orgánicas incluyen isopropil-amina, benzatina, colinato, dietanolamina, dietil-amina, lisina, meglumina, piperazina y trometamina.

Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden preparar mediante los métodos químicos convencionales. En términos generales, estas sales se pueden preparar mediante la reacción de las formas del ácido libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base apropiada (tal como

hidróxido, carbonato, o bicarbonato de Na, Ca, Mg, o K, o similares), o mediante la reacción de las formas de base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica del ácido apropiado. Estas reacciones típicamente se llevan a cabo en agua o en un solvente orgánico, o en una mezcla de los dos. En términos generales, es recomendable el uso de medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol, o acetonitrilo, cuando sea practicable. Las listas de las sales adecuadas adicionales se pueden encontrar, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 20ª Edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985); y en "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use" por Stahl y Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, 2002).

Cualquier fórmula dada en la presente pretende representar las formas no marcadas así como las formas isotópicamente marcadas de los compuestos. Los compuestos isotópicamente marcados tienen las estructuras ilustradas por las fórmulas dadas en la presente, excepto que uno o más átomos son reemplazados por un átomo que tiene una masa atómica o número de masa seleccionados. Los ejemplos de los isótopos que se pueden incorporar en los compuestos de la invención incluyen los isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor, y cloro, tales como ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{125}I , respectivamente. En las realizaciones preferidas, los compuestos de la invención no están marcados, es decir, comprenden abundancias de los isótopos aproximadamente naturales para todos los átomos. En otras realizaciones, los compuestos de la invención se marcan mediante la incorporación selectiva de un isótopo no natural enriquecido para un átomo en el compuesto de la fórmula (I). La invención incluye diferentes compuestos isotópicamente marcados, como se definen en la presente, por ejemplo, aquéllos en donde hay isótopos radioactivos presentes, tales como ^3H y ^{14}C , o aquéllos en donde hay isótopos no radioactivos presentes, tales como ^2H y ^{13}C . Estos compuestos isotópicamente marcados son útiles en los estudios metabólicos (con ^{14}C), en los estudios de cinética de reacción (con, por ejemplo, ^2H o ^3H), en las técnicas de detección o de formación de imágenes, tales como tomografía por emisión de positrones (PET) o tomografía computarizada con emisión de un solo fotón (SPECT), incluyendo los ensayos de distribución del fármaco o del sustrato en el tejido, o en el tratamiento radioactivo de los pacientes. En particular, un ^{18}F o un compuesto marcado puede ser particularmente deseable para los estudios de PET o SPECT. Los compuestos isotópicamente marcados de la fórmula (I) se pueden preparar en términos generales mediante las técnicas convencionales conocidas por los expertos en este campo en vista de la descripción de la síntesis de los compuestos de la fórmula I, por ejemplo, en la Publicación de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US2008/0045528 (WO2007/121484). El BLZ945 se describe en esa referencia, así como varios de sus isómeros. La misma publicación, en la página 163, describe la síntesis de ambos 1R,2R- y 1S,2S-amino-ciclohexanol, los cuales pueden ser fácilmente utilizados como sustitución en el método del Ejemplo 173 para producir el (If) y otros compuestos de la fórmula I, tanto marcados como no marcados.

Además, la sustitución con isótopos más pesados, en particular con deuterio (es decir, ^2H o D), puede proporcionar algunas ventajas terapéuticas resultantes de la mayor estabilidad metabólica, por ejemplo un aumento de la vida media *in vivo* o requerimientos de dosificación reducida, o una mejora en el índice terapéutico. Se entiende que el deuterio en este contexto se considera como un sustituyente de un compuesto de la fórmula (I). La concentración de este isótopo más pesado, específicamente deuterio, se puede definir por el factor de enriquecimiento isotópico. El término "factor de enriquecimiento isotópico", como se utiliza en la presente, significa la proporción entre la abundancia isotópica y la abundancia natural de un isótopo especificado. Si un sustituyente en un compuesto de esta invención es denotado como deuterio, este compuesto tiene un factor de enriquecimiento isotópico para cada átomo de deuterio designado de cuando menos 3500 (52.5 % de incorporación de deuterio en cada átomo de deuterio designado), cuando menos 4000 (60 % de incorporación de deuterio), cuando menos 4500 (67.5 % de incorporación de deuterio), cuando menos 5000 (75 % de incorporación de deuterio), cuando menos 5500 (82.5 % de incorporación de deuterio), cuando menos 6000 (90 % de incorporación de deuterio), cuando menos 6333.3 (95 % de incorporación de deuterio), cuando menos 6466.7 (97 % de incorporación de deuterio), cuando menos 6600 (99 % de incorporación de deuterio), o cuando menos 6633.3 (99.5 % de incorporación de deuterio).

Como se utiliza en la presente, el término "excipientes farmacéuticamente aceptables" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, tensoactivos, antioxidantes, conservadores (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de absorción, sales, conservadores, estabilizantes de fármacos, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, tintes, y similares y combinaciones de los mismos, como serían conocidos por los expertos en este campo (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición, Mack Printing Company, 1990, páginas 1289-1329). Excepto hasta donde cualquier vehículo convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

El término "una cantidad terapéuticamente efectiva" de un compuesto de la presente invención se refiere a una cantidad del compuesto de la presente invención que provocará la respuesta biológica o médica de un sujeto, por ejemplo, la reducción o inhibición de la actividad de una enzima o de una proteína, o la mitigación de los síntomas, el alivio de las condiciones, el alentamiento o la demora del progreso de la enfermedad, o la prevención de una enfermedad, etc. En una realización no limitante, el término "una cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del compuesto de la presente invención que, cuando se

5 administra a un sujeto, es efectiva para: (1) cuando menos parcialmente aliviar, inhibir, prevenir y/o mitigar una condición, o un trastorno, o una enfermedad (i) mediada por el CSF-1R, o (ii) asociada con la actividad del CSF-1R, o (iii) caracterizada por una actividad (normal o anormal) del CSF-1R; o (2) reducir o inhibir la actividad del CSF-1R; o (3) reducir o inhibir la expresión del CSF-1R. En otra realización no limitante, el término “una cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad del compuesto de la presente invención que, cuando se administra a una célula, o a un tejido, o a un material biológico no celular, o a un medio, es efectiva para reducir o inhibir cuando menos parcialmente la actividad del CSF-1R; o para reducir o inhibir cuando menos parcialmente la expresión del CSF-1R. El significado del término “una cantidad terapéuticamente efectiva”, como se ilustra en la realización anterior para el CSF-1R, también se aplica mediante el mismo significado a cualesquiera otras proteínas/péptidos/enzimas relevantes, tales como el PDGFR y similares.

15 Como se utiliza en la presente, el término “sujeto” se refiere a un animal. Típicamente, el animal es un mamífero. Un sujeto también se refiere, por ejemplo, a primates (por ejemplo, a seres humanos, masculinos o femeninos), reses, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, ratas, ratones, peces, aves y similares. En ciertas realizaciones, el sujeto es un primate. En las realizaciones preferidas, el sujeto es un ser humano.

Como se utiliza en la presente, el término "inhibir", "inhibición" o "inhibiendo", se refiere a la reducción o supresión de una condición, síntoma, o trastorno o enfermedad dados, o a una disminución significativa en la actividad de la línea base de una actividad o proceso biológico.

20 Como se utiliza en la presente, el término "tratar", "tratando" o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno, se refiere, en una realización, a disminuir la enfermedad o el trastorno (es decir, hacer más lento o detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o cuando menos uno de los síntomas clínicos de la misma). En otra realización, "tratar", "tratando" o "tratamiento" se refiere a aliviar o mitigar cuando menos un parámetro físico, incluyendo aquéllos que puedan no ser discernibles por el paciente. En todavía otra realización, "tratar", "tratando" o "tratamiento" se refiere a modular la enfermedad o el trastorno, ya sea físicamente (por ejemplo, la estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente (por ejemplo, la estabilización de un parámetro físico), o ambos. En todavía otra realización, "tratar", "tratando" o "tratamiento" se refiere a prevenir o demorar el establecimiento o desarrollo o progreso de la enfermedad o del trastorno. Con referencia a un tumor de cerebro, 'tratar' típicamente incluye cualquiera de hacer más lenta la velocidad del crecimiento de un tumor o del re-crecimiento de un tumor después de que se haya removido el volumen del tumor, o reducir el tamaño del tumor o de los restos del tumor después de que se haya removido el volumen del tumor.

Como se utiliza en la presente, un sujeto tiene "necesidad de" tratamiento si este sujeto se beneficiaría biológicamente, médicamente, o en su calidad de vida, a partir de dicho tratamiento. Típicamente, el sujeto ha sido diagnosticado con un tumor de cerebro, con frecuencia una forma de glioblastoma, y de preferencia con glioblastoma multiforme.

35 Como se utiliza en la presente, el término "un", "uno", "el" y términos similares utilizados en el contexto de la presente invención (en especial en el contexto de las reivindicaciones) se deben interpretar para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique de otra manera en la presente o que sea claramente contradicho por el contexto.

40 Todos los métodos descritos en la presente se pueden llevar a cabo en cualquier orden adecuado, a menos que sea indicado de otra manera en la presente, o que sea claramente contradicho de otra manera por el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o de lenguaje (de ejemplo, “tal como”) proporcionado en la presente, pretende meramente iluminar mejor la invención, y no presenta una limitación sobre el alcance de la invención reivindicada de otra manera.

45 En algunas realizaciones, la presente invención utiliza una composición farmacéutica, la cual comprende un compuesto de la presente invención, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica se puede formular para vías de administración particulares, tales como administración oral, administración parenteral, y administración rectal, etc. En adición, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden configurar en una forma sólida (incluyendo, sin limitación, cápsulas, tabletas, píldoras, gránulos, polvos o supositorios), o en una forma líquida (incluyendo, sin limitación, soluciones, suspensiones o emulsiones). Las composiciones farmacéuticas se pueden someter a las operaciones farmacéuticas convencionales, tales como esterilización, y/o pueden contener diluyentes inertes, agentes lubricantes, o agentes reguladores convencionales, así como adyuvantes, tales como conservadores, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes y reguladores del pH, etc.

55 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende cuando menos un agente quimioterapéutico adicional, tal como temozolomida, en una cantidad efectiva.

Típicamente, las composiciones farmacéuticas son tabletas o cápsulas de gelatina que comprenden el ingrediente activo junto con cuando menos un excipiente, tal como captisol (utilizado en los Ejemplos de la presente) y uno de los siguientes:

- a) diluyentes, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa y/o glicina;
- b) lubricantes, por ejemplo, sílice, talco, ácido esteárico, su sal de magnesio o de calcio y/o polietilenglicol; para tabletas también,
- 5 c) aglutinantes, por ejemplo, silicato de magnesio y aluminio, pasta de almidón, gelatina, tragacanto, metil-celulosa, carboxi-metil-celulosa de sodio y/o polivinil-pirrolidona; si se desea;
- d) vehículos, tales como un vehículo acuoso que contenga un material co-solvante, tal como captisol, PEG, glicerina, ciclodextrina, o similares;
- e) desintegrantes, por ejemplo, almidones, agar, ácido alginico o su sal sódica, o mezclas efervescentes; y/o
- 10 f) absorbentes, colorantes, saborizantes y edulcorantes.

Las tabletas pueden tener recubrimiento de película o recubrimiento entérico de acuerdo con los métodos conocidos en este campo.

15 De preferencia, el compuesto o una composición se prepara para su administración oral, como una tableta o cápsula, por ejemplo, o como una solución o suspensión del compuesto de la fórmula (I), opcionalmente empacada en un recipiente de una sola dosis, tal como una cápsula.

20 Las composiciones adecuadas para administración oral incluyen una cantidad efectiva de un compuesto de la invención en la forma de tabletas, grageas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsión, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires. Las composiciones destinadas para uso oral se preparan de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la elaboración de las composiciones farmacéuticas, y estas composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados a partir del grupo que consiste en agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes, y agentes conservadores, con el objeto de proporcionar preparaciones farmacéuticamente elegantes y de buen sabor. Las tabletas pueden contener al ingrediente activo mezclado con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos que sean adecuados para la elaboración de tabletas. Estos excipientes son, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio, o fosfato de sodio; agentes de granulación o desintegrantes, por ejemplo almidón de maíz, o ácido alginico; agentes aglutinantes, por ejemplo almidón, gelatina, o acacia; y agentes lubricantes, por ejemplo estearato de magnesio, ácido esteárico, o talco. Las tabletas no se recubren, o bien se recubren mediante técnicas conocidas para demorar la desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal y de esta manera proporcionar una acción sostenida durante un periodo más largo. Por ejemplo, se puede emplear un material de demora de tiempo tal como monestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. Las formulaciones para uso oral se pueden presentar como cápsulas de gelatina dura en donde se mezcla el ingrediente activo con un diluyente sólido inerte, por ejemplo carbonato de calcio, fosfato de calcio, o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda en donde se mezcla el ingrediente activo con agua o con un medio oleoso, por ejemplo aceite de cacahuate, parafina líquida, o aceite de oliva.

35 En algunas realizaciones, el compuesto o la composición se prepara para administrarse mediante inyección. Algunas composiciones inyectables son soluciones o suspensiones isotónicas acuosas, y los supositorios se preparan convenientemente a partir de emulsiones o suspensiones grasas. Estas composiciones se pueden esterilizar y/o pueden contener adyuvantes, tales como agentes conservadores, estabilizantes, humectantes, o emulsionantes, promotores de solución, sales para regular la presión osmótica, y/o reguladores del pH. En adición, también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Estas composiciones se preparan de acuerdo con los métodos convencionales de mezcla, granulación, o recubrimiento, respectivamente, y pueden contener de aproximadamente el 0.1 al 75 %, o contienen de aproximadamente el 1 al 50 % del ingrediente activo.

45 En algunas realizaciones, el compuesto o la composición se prepara para administrarse tópicamente. Las composiciones adecuadas para aplicación transdérmica incluyen una cantidad efectiva de un compuesto de la invención con un vehículo adecuado. Los vehículos adecuados para suministro transdérmico incluyen solventes farmacológicamente aceptables absorbibles para ayudar al paso a través de la piel del huésped. Por ejemplo, los dispositivos transdérmicos están en la forma de un parche, el cual comprende un miembro de respaldo, un depósito que contiene el compuesto opcionalmente con vehículos, opcionalmente una barrera de control de velocidad para suministrar el compuesto a la piel del huésped a una velocidad controlada y previamente determinada durante un periodo de tiempo prolongado, y elementos para asegurar el dispositivo a la piel.

55 Las composiciones adecuadas para aplicación tópica, por ejemplo a la piel y a los ojos, incluyen soluciones acuosas, suspensiones, ungüentos, cremas, geles, o formulaciones rociables, por ejemplo para suministrarse en aerosol o similar. Estos sistemas de suministro tópico serán apropiados en particular para la aplicación dérmica, por ejemplo, para el tratamiento de cáncer de piel, por ejemplo, para su uso profiláctico en cremas,

lociones, aspersiones protectoras del sol, y similares. De esta manera, son particularmente adecuadas para utilizarse en formulaciones tópicas, incluyendo cosméticas, bien conocidas en este campo. Éstas pueden contener solubilizantes, estabilizantes, agentes mejoradores de tonicidad, reguladores del pH, y conservadores.

5 Como se utiliza en la presente, una aplicación tópica también puede pertenecer a una inhalación o a una aplicación intranasal. De una manera conveniente, se pueden suministrar en la forma de un polvo seco (ya sea solo, como una mezcla, por ejemplo una mezcla seca con lactosa, o bien como una partícula componente mezclada, por ejemplo con fosfolípidos) a partir de un inhalador de polvo seco o de una presentación de
10 aspersiones en aerosol a partir de un recipiente presurizado, bomba, aspersor, atomizador o nebulizador, con o sin el uso de un propelente adecuado.

En algunas realizaciones, la cantidad efectiva del compuesto de la fórmula (I) es de entre aproximadamente 10 miligramos/kilogramo al día y aproximadamente 500 miligramos/kilogramo al día. En las realizaciones particulares, la cantidad efectiva es de entre aproximadamente 25 miligramos/kilogramo al día y aproximadamente 300 miligramos/kilogramo al día, tal como de aproximadamente 100 a aproximadamente
15 250 miligramos/kilogramo al día. La dosificación se puede administrar en 1 a 4 dosis al día, o se puede administrar en días alternados. En una realización preferida, la dosificación es de aproximadamente 200 miligramos/kilogramo al día, y se administra en una o dos dosis orales al día.

La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas y formas de dosificación anhidras, las cuales comprenden los compuestos de la presente invención como ingredientes activos, debido a que el
20 agua puede facilitar la degradación de ciertos compuestos.

Se pueden preparar composiciones farmacéuticas anhidras y formas de dosificación de la invención utilizando ingredientes anhidros o que contengan una baja humedad, y condiciones de baja humedad. Una composición farmacéutica anhidra se puede preparar y almacenar de tal manera que se mantenga su naturaleza anhidra. De conformidad con lo anterior, las composiciones anhidras se empacan utilizando materiales que se sepa
25 que previenen la exposición al agua, de tal forma que se puedan incluir en kits de formulación adecuados. Los ejemplos del empaque adecuado incluyen, pero no se limitan a, láminas herméticamente selladas, plásticos, recipientes de dosis unitaria (por ejemplo, frascos), paquetes de burbuja, y paquetes de tiras.

La invención proporciona además composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que comprenden uno o más agentes que reducen la velocidad a la cual se descompondrá el compuesto de la presente
30 invención como un ingrediente activo. Estos agentes, los cuales son referidos en la presente como "estabilizantes", incluyen, pero no se limitan a, antioxidantes, tales como ácido ascórbico, reguladores del pH, o reguladores de sales, etc.

Los compuestos y métodos descritos en la presente son útiles para el tratamiento de una variedad de tumores de cerebro, basándose en su capacidad demostrada para penetrar en la barrera hematoencefálica y para
35 inhibir la acumulación de los TAM en y/o alrededor de un tumor en el cerebro. En algunas realizaciones, el tumor de cerebro es una metástasis de un cáncer que se originó en cualquier otra parte del cuerpo. En otras realizaciones, el tumor de cerebro es un glioma, tal como glioblastoma multiforme.

Los compuestos de la fórmula I, en forma libre o en forma de sal, exhiben valiosas propiedades farmacológicas, por ejemplo, propiedades moduladores del CSF-1R y opcionalmente del PDGFR, por
40 ejemplo, como se indica en las pruebas *in vitro* e *in vivo* proporcionadas en las siguientes secciones y, por consiguiente, se indican para terapia.

La composición o una combinación farmacéutica de la presente invención puede estar en una dosificación unitaria de aproximadamente 1 a 1,000 miligramos de ingrediente(s) activo(s) para un sujeto de
45 aproximadamente 50 a 70 kilogramos, o de aproximadamente 1 a 500 miligramos, o de aproximadamente 1 a 250 miligramos, o de aproximadamente 1 a 150 miligramos, o de aproximadamente 0.5 a 100 miligramos, o de aproximadamente 1 a 50 miligramos de ingredientes activos. La dosificación terapéuticamente efectiva de un compuesto, de la composición farmacéutica, o de las combinaciones de los mismos, depende de la especie del sujeto, del peso corporal, de la edad y condición individual, del trastorno o enfermedad que se esté tratando, o de la gravedad de la misma. Un médico, clínico, o veterinario de una experiencia ordinaria
50 puede determinar fácilmente la cantidad efectiva de cada uno de los ingredientes activos necesaria para tratar o inhibir el progreso del trastorno o de la enfermedad, basándose en la presente divulgación.

Las propiedades de dosificación anteriormente citadas se pueden demostrar en pruebas *in vitro* e *in vivo* utilizando convenientemente mamíferos, por ejemplo, ratones, ratas, perros, monos u órganos aislados, tejidos y preparaciones de los mismos. Los compuestos de la presente invención se pueden aplicar *in vitro* en
55 la forma de soluciones, por ejemplo, soluciones acuosas, e *in vivo* ya sea enteralmente, parenteralmente, de una manera conveniente intravenosamente, por ejemplo, como una suspensión o en solución acuosa. La dosificación *in vitro* puede estar en el intervalo de concentraciones de entre aproximadamente 10^{-3} molar y 10^{-9} molar. Una cantidad terapéuticamente efectiva *in vivo*, dependiendo de la vía de administración, puede estar

en el intervalo de entre aproximadamente 0.1 y 500 miligramos/kilogramo, típicamente de entre 10 y 400 miligramos/kilogramo, o de entre aproximadamente 100 y 300 miligramos/kilogramo, o de entre 1 y 100 miligramos/ kilogramo. En algunas realizaciones, es adecuada una dosis de aproximadamente 200 miligramos/kilogramo para el tratamiento de glioblastoma, y se puede administrar oralmente.

5 La actividad de un compuesto de acuerdo con la presente invención se puede evaluar mediante los siguientes métodos *in vitro* e *in vivo*.

Empleando los métodos de prueba de ensayo descritos en la US20080045528, se puede demostrar que los compuestos de la invención inhiben el CSF-1R. Como se describe en la presente, estos compuestos atraviesan fácilmente la barrera hematoencefálica, y también inhiben o revierten el crecimiento de un tumor en el cerebro. De preferencia, el tumor es detectable mediante los métodos conocidos, y se puede monitorear el progreso del tratamiento mediante los métodos conocidos. En algunas realizaciones, el progreso del tratamiento se monitorea utilizando MRI (imágenes de resonancia magnética) para determinar el tamaño del tumor y cualquier metástasis.

15 El compuesto de la presente invención se puede administrar ya sea simultáneamente con, o antes o después de, uno o más agentes terapéuticos diferentes, tales como los co-agentes terapéuticos descritos en la presente. El compuesto de la presente invención se puede administrar por separado, por la misma o diferente vía de administración, o juntos en la misma composición farmacéutica que los otros agentes.

Se puede proporcionar un producto que comprende un compuesto de la fórmula (I), y cuando menos otro agente terapéutico, como una preparación combinada para su uso simultáneo, separado, o en secuencia, en terapia. La terapia es el tratamiento de una enfermedad o condición mediada por la inhibición del CSF-1R. Los productos proporcionados como una preparación combinada incluyen una composición que comprende el compuesto de la fórmula (I) y los otros agentes terapéuticos juntos en la misma composición farmacéutica, o el compuesto de la fórmula (I) y los otros agentes terapéuticos en una forma separada, por ejemplo, en la forma de un kit.

25 Se puede proporcionar una composición farmacéutica, la cual comprende un compuesto de la fórmula (I) y otros agentes terapéuticos. Opcionalmente, la composición farmacéutica puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable, como se describe anteriormente, o más de uno de estos co-agentes terapéuticos.

Se puede proporcionar un kit, el cual comprende dos o más composiciones farmacéuticas separadas, cuando menos una de las cuales contiene un compuesto de la fórmula (I). El kit comprende medios para contener por separado estas composiciones, tales como un recipiente, un frasco dividido, o un paquete de lámina dividido. Un ejemplo de este kit es un paquete de burbujas, como se utiliza típicamente para el empaque de tabletas, cápsulas, y similares.

35 El kit se puede utilizar para administrar formas de dosificación diferentes, por ejemplo, oral y parenteral, para administrar las composiciones separadas en diferentes intervalos de dosificación, o para titular las composiciones separadas una contra la otra. Para ayudar al cumplimiento, el kit típicamente comprende instrucciones para la administración.

En las terapias de combinación de la invención, el compuesto para uso y el otro agente terapéutico pueden ser elaborados y/o formulados por el mismo o por diferentes fabricantes. Más aún, el compuesto para uso y el otro agente terapéutico se pueden reunir en una terapia de combinación: (i) antes de liberar el producto de combinación a los médicos (por ejemplo, en el caso de un kit que comprenda el compuesto de la invención y el otro agente terapéutico); (ii) por el médico mismo (o bajo la guía del médico) poco antes de la administración; (iii) en el paciente mismo, por ejemplo, durante la administración en secuencia del compuesto de la invención y el otro agente terapéutico.

45 De conformidad con lo anterior, la invención proporciona el uso de un compuesto de la fórmula (I) para el tratamiento de una enfermedad o condición mediada por el CSF-1R, en donde el medicamento se prepara para su administración con otro agente terapéutico, incluyendo uno de los agentes quimioterapéuticos adicionales que se dan a conocer en la presente como adecuados para utilizarse en combinación con los compuestos de la fórmula I. También se puede proporcionar otro agente terapéutico para el tratamiento de una enfermedad o condición mediada por el CSF-1R, en donde el medicamento se administra con un compuesto de la fórmula (I).

La divulgación también proporciona un compuesto de la fórmula (I) para utilizarse en un método para el tratamiento de una enfermedad o condición mediada por el CSF-1R], en donde el compuesto de la fórmula (I) se prepara para su administración con otro agente terapéutico. La divulgación también proporciona otro agente terapéutico para utilizarse en un método para el tratamiento de una enfermedad o condición mediada por el CSF-1R, en donde el otro agente terapéutico se prepara para su administración con un compuesto de la fórmula (I). La divulgación también proporciona un compuesto de la fórmula (I) para utilizarse en un método para el tratamiento de una enfermedad o condición mediada por el CSF-1R, en donde el compuesto de la

fórmula (I) se administra con otro agente terapéutico. La divulgación también proporciona otro agente terapéutico para utilizarse en un método para el tratamiento de una enfermedad o condición mediada por el CSF-1R, en donde el otro agente terapéutico se administra con un compuesto de la fórmula (I).

5 Se puede proporcionar un compuesto de la fórmula (I) para el tratamiento de una enfermedad o condición mediada por el CSF-1R, en donde el paciente ha sido tratado previamente (por ejemplo, dentro de 24 horas) con otro agente terapéutico. También se puede proporcionar el uso de otro agente terapéutico para el tratamiento de una enfermedad o condición mediada por el CSF-1R, en donde el paciente ha sido tratado previamente (por ejemplo, dentro de 24 horas) con un compuesto de la fórmula (I).

10 En una realización, el otro agente terapéutico se selecciona a partir de un agente anti-angiogénico, bevacizumab con o sin irinotecano, nitrosoureas, tales como Carmustina (BCNU), platinas, tales como cisplatino (cisplatina), agentes alquilantes, tales como temozolomida, inhibidores de cinasa de tirosina (gefitinib o erlotinib), Uraquina, y cannabinoides. En algunas realizaciones, el otro agente es un co-agente terapéutico seleccionado a partir de: un compuesto anti-angiogénico, un cannabinoide, y temozolomida.

15 Las combinaciones individuales específicas que pueden proporcionar beneficios de tratamiento particulares incluyen el compuesto Ia, Ic, Id, o 1g, 1h, en combinación con temozolomida. Esta combinación se puede administrar oralmente como se describe en la presente, para tratar diferentes tumores de cerebro, tales como glioblastoma multiforme.

20 En adición a los métodos de tratamiento, a los compuestos, y a la composición farmacéutica, también se han identificado ciertos cambios de firma genética asociados con la eficacia de los compuestos de CSF-1R para el tratamiento de GBM. Los Ejemplos que se encuentran más adelante proporcionan información acerca de estos cambios, e identifican las firmas genéticas o los biomarcadores que se pueden utilizar en conjunto con los métodos de tratamiento que se dan a conocer en la presente. Como será evidente para el lector experto, los datos de la firma de Lasso y de la firma de SVM proporcionados en la presente, se pueden utilizar en la determinación de un pronóstico para un paciente tratado con estos métodos, mediante la obtención de una muestra del paciente, y la comparación de los datos de expresión genética para la muestra contra los cambios y firmas de la expresión genética que se dan a conocer en la presente, correlacionándose con un pronóstico positivo y/o con una supervivencia prolongada.

EJEMPLOS

30 Los compuestos de la invención se prepararon de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica, en particular aquéllos descritos en la WO2007/121484.

35 Los compuestos y/o intermediarios se caracterizaron mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC), utilizando un sistema de cromatografía Waters Millenium con un Módulo de Separación 2695 (Milford, MA). Las columnas analíticas fueron Phenomenex La C18 en fase inversa, de 5 micras, 4.6 x 50 milímetros, de Alltech (Deerfield, IL). Se utilizó una elución en gradiente (flujo 2.5 mililitros/minuto), típicamente empezando con el 5 % de acetonitrilo/95 % de agua, y progresando hasta el 100 % de acetonitrilo durante un período de 10 minutos. Todos los solventes contenían ácido trifluoro-acético (TFA) al 0.1 % (TFA). Los compuestos se detectaron mediante absorción de luz ultravioleta (UV) ya sea a 220 o a 254 nanómetros. Los solventes de HPLC fueron de Burdick and Jackson (Muskegan, MI), o de Fisher Scientific (Pittsburgh, PA).

40 El análisis espectrométrico de masas se llevó a cabo en uno de dos instrumentos de LCMS: un Sistema Waters (Alliance HT HPLC) y un espectrómetro de masas Micromass ZQ; Columna: Eclipse XDB-C18, de 2.1 x 50 milímetros; gradiente: del 5 al 95 % (o del 35 al 95 %, o del 65 al 95 %, o del 95 al 95 %) con acetonitrilo en agua con TFA al 0.05 % durante un período de 4 minutos; velocidad de flujo de 0.8 mililitros/minuto; intervalo de peso molecular de 200 a 1,500; voltaje del cono de 20 V; temperatura de la columna de 40°C) o un Sistema Hewlett Packard (Serie 1100 HPLC; Columna: Eclipse XDB-C18, de 2.1 x 50 milímetros; gradiente: del 5 al 95 % de acetonitrilo en agua con TFA al 0.05 % durante un período de 4 minutos; velocidad de flujo de 0.8 mililitros/minuto; intervalo de peso molecular de 150 a 850; voltaje del cono de 50 V; temperatura de la columna de 30°C). Todas las masas se reportaron como aquéllas de los iones progenitores protonados.

50 Datos analíticos para el compuesto (If): HPLC, tiempo de retención de 1.93 minutos. Ion Molecular (MH⁺): m/z = 422.1 (LC/MS RT = 0.50 minutos).

Ejemplo 1: Los números de macrófagos aumentan en un modelo de gliomagénesis de ratón comparándose con cerebro normal.

55 Este ejemplo demostró la contribución de los macrófagos asociados con tumor (TAMs) a la gliomagénesis en el modelo de ratón RCAS-PDGF-B-HA/*Nestin-Tv-a;Ink4a/Arf*^{-/-}. En estos ratones, cuando se induce el desarrollo de tumores en adultos, la gran mayoría de las lesiones que se desarrollan son glioblastoma multiforme (GBM) de alto grado, el cual modela histológicamente el GBM humano. Figura 1. (A) Los cerebros/

cerebros anteriores a partir de ratones no inyectados Nestin-Tv-a;Ink4a/Arf/- (cerebro normal) o con tumores grado IV (GBM) a partir de ratones sintomáticos RCAS-PDGFB-HA/Nestin-Tv-a;Ink4a/Arf/-(PDG) se procesaron hasta obtener una sola suspensión celular con papaína para la citometría de flujo (n = 5 de cada uno). Hubo un aumento significativo en los leucocitos CD45+ desde el 3.6 ± 0.6 % hasta el 13.1 ± 2.0 %. las células mieloides CD11b+/ macrófagos contaron por una gran mayoría de los leucocitos (del 89.9 al 98.5 % de células CD45+), con un aumento de 3.8 veces en las células CD45+CD11b+ en los tumores (12.7 ± 2.0 %) comparándose con el cerebro normal (3.3 ± 0.5 %), y no hubo diferencias en las poblaciones de células CD45+CD11b-. (B) Las secciones de cerebro normal o del tejido de GBM a partir de ratones PDG sintomáticos, se co-tiñeron inmunofluorescentemente para determinar CSF-1R, CD68 (macrófagos), y DAPI. (C) Se utilizaron cerebro normal y GBM (n = 3 de cada uno) para el aislamiento del ARN, la síntesis del ADNc, y qPCR. Los ensayos se ejecutaron por triplicado, y la expresión se normalizó con la ubiquitina C (Ubc) para cada muestra. La expresión se ilustra en relación con el cerebro normal. (D) Las secciones de cerebro normal o del tejido GBM a partir de ratones PDG sintomáticos se tiñeron para determinar el CSF-1R en combinación con los marcadores de macrófagos F4/80 y CD11b, así como F4/80, CD11b, y CD68 en combinación con Iba-1 (macrófagos/microglía). Se utilizó DAPI para el contra-teñido nuclear. Barra de escala de 50 micras. Los datos se presentan como el promedio + SEM. Los valores P se obtuvieron utilizando la prueba t de Student de dos colas no emparejada; *P<0.05; **P<0.01.

Los números de células de macrófagos fueron sustancialmente más altos en el tejido de GBM en relación con el cerebro normal, como se muestra mediante el teñido con el anticuerpo específico de macrófagos CD68 (Figura 1B). Esto se confirmó mediante el análisis de citometría de flujo, en donde los leucocitos asociados con tumor (CD45+) constituyen el 13.1 % de la masa tumoral, y la gran mayoría son macrófagos (CD11b+) (Figura 1A). El análisis de expresión del cerebro normal comparándose con el GBM reveló que el nivel de ARNm de CSF-1 y CSF-1R, así como de CD68, aumenta en los tumores (Figura 1C).

Las diferentes poblaciones específicas del tipo de célula también fueron a partir de los GBMs, para determinar la fuente de CSF-1 y su receptor. La pureza de las distintas poblaciones se confirmó mediante la expresión del receptor de TVA solamente en la fracción de células tumorales y CD11b exclusivamente en los TAM. Aunque el CSF-1 fue expresado tanto por las células tumorales como por los TAM, el CSF-1R solamente fue expresado por los TAM (Figura 1D). La primera columna de cada grupo de tres en la Figura 1D es de células mixtas, la segunda es de células tumorales purificadas con FACS, y la tercera es de los TAM purificados con FACS; las células mixtas se ajustan a 1 para normalizar los datos. Las gráficas no muestran expresión de CD11b en las células tumorales, y no muestran expresión de CSF-1R en las células tumorales, mientras que el TVA tiñe las células tumorales solamente, y no los TAM, y el CSF-1 está presente en cantidades aproximadamente iguales tanto en el tumor como en las células de TAM. Estos hallazgos se confirmaron mediante inmunoteñido, y todas las células de CSF-1R+ también fueron positivas para CD68 (no mostrado). Esto demuestra que cualquier efecto sobre la tumorigénesis en seguida de la inhibición del CSF-1R en este modelo depende de los macrófagos.

Ejemplo 2: Análisis del inhibidor de CSF-1R BLZ945: farmacocinética y ensayos basados en células.

El BLZ945 (Compuesto Ic) se ha dado a conocer como un inhibidor de cinasa c-fms (CSF-1R) selectivo para la supresión de lesiones osteolíticas inducidas por tumor en el hueso. El BLZ945 es un inhibidor competitivo del ATP que inhibe el CSF-1R en los ensayos bioquímicos a 1 nM, e inhibe la proliferación celular dependiente del CSF a una IC₅₀ de aproximadamente 67 nM. Por comparación, los valores IC₅₀ para la mayoría de las >200 cinasas varias probadas son de >10 μM (10,000 nM), y para cKIT y PDGFRβ, las IC₅₀s son de 3.5 μM (3,500 nM) y de 5.9 μM (5,900 nM), respectivamente. Cuando se rastreó contra varios cientos de cinasas en el arreglo de cinasa Ambit®, el compuesto mostró una actividad más baja que el 50 % del control solamente contra CSF-1R, PDGFRα y PDGFRβ, y la actividad sobre los dos PDGFRs fue mucho más baja que su actividad sobre el CSF-1R en los ensayos de inhibición directa. Como se discute en la presente, los compuestos como BLZ945, pero que tienen la estereoquímica (S,S) exhiben actividad contra el PDGFRβ en niveles similares a su alto nivel de actividad sobre el CSF-1R.

Los ratones que tenían glioblastoma multiforme (GBM) detectable en solamente la mitad derecha de sus cerebros se trataron con BLZ945, y entonces se midió la concentración del compuesto en plasma y en las mitades derechas e izquierdas del en diversos puntos del tiempo (15 minutos, 2 horas, 8 horas, 24 horas). Como lo muestra la Figura 2, la concentración en plasma se eleva rápidamente hasta un poco más de 100 μM, y permanece por arriba de 50 μM a las 8 horas, y entonces declina hasta un nivel bajo a las 24 horas. La concentración en el tejido de cerebro sigue un patrón similar: permanece un poco más bajo que el nivel en plasma, pero se eleva bien por arriba de 50 μM en los puntos del tiempo de 15 minutos y de 2 horas. Esto muestra que el BLZ945 cruza la barrera hematoencefálica (BBB), y que se pueden alcanzar en el cerebro concentraciones suficientes para inhibir el crecimiento y/o la sobrevivencia de los macrófagos. También muestra que el compuesto penetra en niveles similares en las mitades del cerebro que contienen tumor y que están libres de tumor, sugiriendo que la penetración puede no depender de una lesión en la barrera hematoencefálica (BBB) causada por la presencia del tumor. Esto demuestra suficientemente la rápida penetración en la barrera hematoencefálica para proporcionar niveles del fármaco terapéuticamente efectivos en el cerebro, bien por encima de los niveles necesarios para inhibir efectivamente los macrófagos en cultivo.

Ejemplo 3: Actividad inhibitora del BLZ945 contra diferentes tipos de células *in vitro*.

Los macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs) se aislaron y se diferenciaron como se describió anteriormente en la literatura, y se trataron entonces con BLZ945 67 nM. El BLZ945 provocó una clara inhibición de la fosforilación del CSF-1R en seguida de la estimulación del CSF-1 (Figura 3A) en cada punto del tiempo (1.5 minutos, 3 minutos, 5 minutos).

También se examinaron los efectos del BLZ945 sobre los macrófagos: Un intervalo de dosis, desde 67 nM hasta 6,700 nM, bloqueó dramáticamente la sobrevivencia de los macrófagos, comparable con los efectos del retiro de CSF-1 (Figura 3B).

Los BMDMs a partir de ratones nulos en *Ink4a/Arf* (los antecedentes genéticos del modelo de GBM), también se probaron en la presencia y en ausencia del BLZ945. La Figura 3C muestra que estos macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs), como aquéllos a partir de los ratones de tipo silvestre, fueron sustancialmente inhibidos por concentraciones de BLZ945 de 67 nM y mayores (Figura 3D). Por consiguiente, el BLZ945 es un inhibidor efectivo de la señalización del CSF-1R, que conduce a un bloqueo completo en la viabilidad de los macrófagos. Las Figuras 3C a 3E demuestran que la proliferación de las células de macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs) a partir de los ratones *Ink4a/Arf*^{-/-} es fuertemente inhibida en concentraciones de BLZ945 de 67 nM y mayores, al igual que las células CRL-2467 (cerebro normal de ratón), mientras que incluso en 6,700 nM, tiene poco o ningún efecto sobre la proliferación de cuatro cultivos de células de glioblastoma de ratón y uno humano.

Con el fin de determinar la falta de un efecto directo del BLZ945 sobre las células tumorales, una línea celular de glioma humano y una serie de células tumorales primarias y neuroesferas se trataron con BLZ945 en concentraciones similares a aquéllas encontradas como efectivas contra el crecimiento de macrófagos. Las células U87-MG, derivadas a partir de un glioblastoma multiforme (GBM) humano, las cuales han mostrado ser dependientes de la señalización del PDGFR en cultivo e *in vivo*, no fueron afectadas por el tratamiento con el BLZ945 en la misma dosis que anteriormente (Figura 3E). De una manera similar, la formación de neuroesferas secundarias a partir de neuroesferas primarias (derivadas a partir de ratón RCAS-PDGF-B-HA/*Nestin-Tv-a;Ink4a/Arf*^{-/-} GBMs) no fue alterada por el tratamiento con el BLZ945 (Figura 3F). Ni el número ni el tamaño de las neuroesferas fueron significativamente afectados por el BLZ945. Finalmente, se examinaron los efectos del BLZ945 sobre múltiples líneas celulares tumorales que se establecieron a partir de neuroesferas secundarias de glioblastoma multiforme (GBM) de ratón y, nuevamente, no hubo diferencias (Figura 3F). Colectivamente, estos experimentos demuestran que los efectos de la inhibición del CSF-1R por el BLZ945 son específicos para los macrófagos, sin consecuencias directas discernibles sobre las células tumorales.

Ejemplo 4: Tratamiento con el inhibidor de CSF-1R, BLZ945, bloquea el progreso del glioma.

Dados los potentes efectos inhibitorios del BLZ945 en los ensayos basados en células de macrófagos, y su capacidad demostrada para cruzar la barrera hematoencefálica, pareció ser recomendable probar este inhibidor en los estudios pre-clínicos en el modelo RCAS-PDGF-B-HA/*Nestin-Tv-a;Ink4a/Arf*^{-/-}. Estos ratones genéticamente diseñados se inyectaron a las 5-6 semanas de edad con células DF-1 infectadas con virus RCAS-PDGF-B-HA para iniciar la formación del glioma como se describe (Hambardzumyan y colaboradores, *Transl. Oncol.*, volumen 2, 89-95 (2009)). A las 2.5 semanas en seguida de la iniciación del tumor, las cohortes de ratones se dosificaron por medio de intubación oral forzada diariamente ya sea con 200 miligramos/kilogramo de BLZ945 en captisol al 20 %, o bien con el vehículo (captisol al 20 %), como un control. Los ratones subsiguientemente se evaluaron para determinar su sobrevivencia sin síntomas. La sobrevivencia media en la cohorte tratada con vehículo fue de 5.71 semanas (40 días), mientras que el 64.4 % de la cohorte tratada con BLZ945 todavía estaba viva en el punto final del estudio de 26 semanas después de la inyección (de 31 a 32 semanas de edad) (Figura 4A, $P < 0.0001$). Este punto final se seleccionó debido a que los ratones del antecedente de *Ink4a/Arf*^{-/-} empiezan a desarrollar tumores espontáneos, en su mayor parte linfomas y sarcomas, alrededor de las 30 semanas de edad, lo cual complicaría la interpretación del fenotipo del glioma en estudios más largos. Los datos de la Figura 4A muestran que ninguno de los ratones de control (vehículo solamente) estuvo sin síntomas a las 8 semanas después de la inyección del virus, mientras que más de la mitad de los ratones tratados estaban sin síntomas en el punto final de las 26 semanas. Nota: 4 ratones tratados se sacrificaron a las 12 semanas para los estudios de histología. De éstos, 3 estaban libres de tumor, y uno tenía un glioma de grado II.

Se determinaron los grados del tumor para los ratones en ambas cohortes de ratones (véase la Figura 4B). Todos los ratones tratados con vehículo en la etapa final tuvieron tumores de alto grado, con lesiones de GBM de Grado IV en 13 de 14 ratones. En contraste, los animales tratados con BLZ945 tuvieron tumores significativamente menos malignos: 80 % fueron ya sea de Grado II o bien estaban libres de tumor; el 20 % restante tenían el tumor de Grado II. En el 56 % de los ratones vivos en el punto final del estudio de 26 semanas, no hubo lesiones detectables (Figura 4B). Cinco los ratones tratados con BLZ945 se sacrificaron como sintomáticos durante el estudio (n=5), y comparándose con el grupo que todavía era asintomático cuando se sacrificaron al final del estudio (n=9). En ambos grupos, todavía hubo una disminución significativa

en el grado del tumor comparándose con los animales tratados con vehículo. Esto muestra un aumento dramático en la supervivencia y una reducción en la malignidad del tumor en este estudio a largo plazo con el tratamiento con BLZ945.

Ejemplo 5: Imágenes de MRI para monitorear los efectos del BLZ945 sobre el crecimiento tumoral.

5 Un estudio de corto plazo, de 7 días, del BLZ945 en los ratones en los que se indujo el tumor, se monitoreó mediante exploraciones regulares de MRI, para medir los cambios de tamaño del tumor durante un corto período de tratamiento cuando el crecimiento tumoral es normalmente rápido. El volumen tumoral en los ratones RCAS-PDGF-B-HA/*Nestin-Tv-a;Ink4a/Arf^{-/-}* se determinó mediante MRI, y los ratones se agregaron al estudio cuando éste fue cuando menos 4.5 milímetros cúbicos o mayor. Los ratones se trataron con BLZ945 o con el control de vehículo durante 7 días, como se describe anteriormente. Las exploraciones de MRI se llevaron a cabo en el día antes de que se iniciara el tratamiento, en el punto medio del tratamiento, y el día anterior al final del período de estudio. Los ratones tratados con vehículo mostraron un incremento dramático y progresivo en el volumen tumoral durante este corto estudio, como se muestra en la Figura 5A, aumentando el volumen tumoral promedio por aproximadamente 5 veces. El tratamiento con el BLZ945 bloqueó el progreso del tumor, como se determinó mediante MRI (Figura 5A), sin aumento alguno en el tamaño del tumor durante el mismo corto período. Los sujetos tratados (línea inferior) mostraron poco o ningún agrandamiento del tumor, mientras que el volumen tumoral aumentó agudamente en los controles tratados con vehículo. La Figura 5B muestra el volumen tumoral para los ratones de control individuales (gráfica superior), y para los ratones tratados (gráfica inferior) durante los primeros 6 días después de iniciarse la dosificación con el BLZ945. Casi todos los animales tratados con BLZ945 muestran poco o ningún aumento en el tamaño del tumor, mientras que todos los animales de control muestran grandes incrementos en el volumen del tumor.

Como se muestra en la Figura 5B, los tumores no tratados aumentaron por aproximadamente el 150 al 850 % en volumen durante este tiempo, mientras que el tamaño del tumor se redujo en 7 de 11 animales tratados, y solamente dos de los animales tratados tuvieron aumentos del volumen tumoral de más del 50 %. Las Figuras 5-2A y 5-2B ilustran los datos del volumen tumoral para todos los 11 animales de prueba y de control, y muestran que el tratamiento detuvo en gran parte los incrementos en el tamaño del tumor, mientras que los tumores no tratados crecieron sustancialmente en el día 6 del tratamiento. Estos resultados indican que la señalización del CSF-1R y la contribución supuesta de los macrófagos dependientes del CSF-1R es crítica para el progreso del glioma en este modelo de ratón, y que el BLZ945 puede impedir el crecimiento de un tumor de cerebro en un modelo de mamífero altamente relevante para el glioblastoma humano.

En una segunda prueba *in vivo* sobre tumores más grandes en el mismo modelo de glioblastoma multiforme (GBM) (cohorte de "tumor grande"), los ratones con los volúmenes tumorales de 48.7 a 132 milímetros cúbicos se trataron con BLZ945, y se monitorearon los cambios en el volumen tumoral mediante MRI durante un lapso de 6 días. El volumen tumoral realmente disminuyó en casi todos los animales de prueba, y 6 de los 18 ratones tratados tuvieron una reducción de cuando menos el 30 % en el tamaño del tumor (Figuras 5D y 5-2C). En esta prueba no se incluyeron animales de control, debido a que no se habría esperado que sobrevivieran hasta el punto final.

Ejemplo 6: Análisis de las capacidades distintivas del cáncer en los tumores tratados con BLZ945.

La identificación de un efecto sorprendente de la inhibición del CSF-1R sobre la gliomagénesis nos condujo a investigar los mecanismos subyacentes para esta respuesta, y a determinar la manera en que el tratamiento con el BLZ945 afectaba a varias de las capacidades distintivas del cáncer. Los análisis se llevaron a cabo en tejidos a partir del estudio de corto plazo (véase el Ejemplo 5), de tal manera que se pudieran comparar los tumores a partir de diferentes grupos de tratamiento hasta el mismo punto final definido. La densidad de las células tumorales se examinó utilizando el marcador de oligodendrocitos Olig2, el cual se ha utilizado anteriormente para identificar las células de glioma. Olig2 se redujo significativamente en el grupo tratado con BLZ945 comparándose con los controles de vehículo, lo cual muestra que el BLZ945 reduce significativamente los números de las células tumorales. (Figura 6A).

El análisis de la proporción de células Olig2+ que estaban proliferando, como se determinó mediante la incorporación de bromo-desoxiuridina (BrdU), reveló una reducción significativa en el grupo de BLZ945 (Figura 6B). Nuevamente, el BLZ945 reduce significativamente la proliferación de las células tumorales.

También se evaluó el nivel de apoptosis en estas células. Las células apoptóticas se contaron como aquéllas que tenían el teñido de caspasa-3 (CC3) citoplásmica disociada y los núcleos condensados. Como se muestra en la Figura 6C, el tratamiento con el inhibidor de CSF-1R provocó un aumento en la apoptosis en el primer punto del tiempo en particular, aunque se observó poco teñido en la cohorte de tumor grande en el día 7.

55 La siguiente Tabla resume los análisis histológicos llevados a cabo sobre las muestras del Ejemplo 5:

Tabla 1. Análisis Histológicos

Parámetro	Vehículo	BLZ945 Día 3	BLZ945 Día 7	BLZ945 Grande Día 3	BLZ945 Grande Día 7
Volumen del tumor (Día -1 vs Día 6)	+498%	--	+0.68%	--	-24.3%
Células DAPI+ totales	--	-72%	-80%	-40%	-65%
Células tumorales (%Olig2+)	--	-27%	-77%	-14%	-73%
Proliferación (%BrdU+Olig2+)	--	-91%	-67%	-98%	-94%
Apoptosis (%CC3+)	--	+17 veces	+6 veces	+9 veces	+2 veces
Vasculatura (CD31 MVD)	--	--	-17%	--	-67%
Macrófagos (%CD68+)	--	+3 veces	+2 veces	+2 veces	+4 veces
Índice fagocítico	--	+2.6 veces	+3.0 veces	+2.2 veces	+4 veces
Capacidad fagocítica	--	+11.5 veces	+5.0 veces	+7.1 veces	+6.0 veces

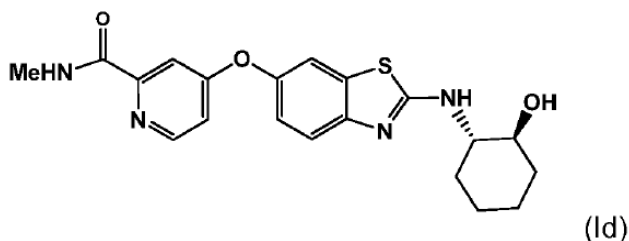
El cambio en el volumen tumoral es el volumen en el punto final (día 6) en relación con el día uno, y los cambios reportados son en relación con el grupo de control (vehículo).

5 Juntos, estos análisis demuestran que la inhibición de la señalización del CSF-1R efectivamente bloquea el crecimiento y la malignidad de los gliomas a través de un efecto combinado sobre la reducción de la proliferación celular tumoral y el aumento de la muerte celular.

10 En resumen, estos datos demuestran que el inhibidor de CSF-1R, BLZ945, es una potente nueva terapia que bloquea el progreso del tumor en un modelo de glioma muy agresivo en los ratones. El compuesto mejoró dramáticamente la supervivencia en un modelo de ratón pre-clínico de gliomagénesis, y redujo agudamente los índices de crecimiento tumoral, y también redujo el tamaño del tumor durante un período de prueba corto y más largo. En la prueba a largo plazo, el BLZ945 parece eliminar los tumores visibles en un número significativo de ratones, y reduce agudamente el grado del tumor en la mayor parte de los ratones tratados.

15 Debido a que se ha demostrado que el aumento en la infiltración de macrófagos se correlaciona con la malignidad en los gliomas humanos, se espera que la potencia del BLZ945 en este modelo de ratón,

aparentemente debido a la dirección terapéutica de los TAM en los sujetos con GBM se traduzca en eficacia contra el glioblastoma en otros mamíferos, incluyendo los seres humanos. Debido a que se han implicado las células mieloides, incluyendo los macrófagos, en el embotamiento de la respuesta quimioterapéutica en los modelos de cáncer de mama, y en la mejora de la respuesta adaptable en seguida de la irradiación en los modelos de xenoinjerto de GBM, éste y los inhibidores de CSF-1R similares pueden ser efectivos en combinación con las terapias dirigidas contra las células de cáncer en los gliomas, una posibilidad que amerita mayor investigación. En particular, el compuesto



ofrece la capacidad para dirigirse al CSF-1R y al PDGFR en concentraciones similares y, por consiguiente, pueden ser incluso más efectivos que el BLZ945. En realidad, el compuesto (Id) inhibe el PDGFR con una IC_{50} sólo aproximadamente 4 veces más alta que su IC_{50} para el CSF-1R. Por consiguiente, se espera que una concentración terapéuticamente efectiva de cualquiera de este compuesto afecte a ambos sitios objetivo, y exhiba una actividad sinérgica sobre los gliomas.

Ejemplo 7

Con el fin de investigar los mecanismos moleculares en donde los TAM tratados con BLZ945 puedan provocar esta sorprendente respuesta anti-tumoral *in vivo*, a pesar de la falta de un agotamiento evidente de los TAM o de cualquier efecto anti-proliferativo directo sobre las células de GBM humanas, se aislaron los TAM $CD11b^{+}Gr-1^{-}$ a partir de ratones tratados con vehículo o con BLZ945, y se llevó a cabo la perfilación de la expresión del microarreglo (véase la Figura 7). El análisis del microarreglo identificó 257 genes como significativamente expresados diferencialmente entre los grupos: 52 genes fueron sobre-regulados, y 205 fueron sub-regulados (Figuras 7B; y también 8A). Entre éstos, los análisis de enriquecimiento del conjunto de genes (GSEA) revelaron que los objetivos de Egr2, un factor de transcripción corriente abajo de la señalización del CSF-1R, eran sub-regulados en los TAM tratados con BLZ945 (Figura 7C). De una manera desproporcionada, los genes asociados con la fase M2 fueron sobre-regulados (Figuras 7D y 7E).

Ejemplo 8. Cambios de expresión genética inducidos por el inhibidor del CFR-1R.

Se empleó la modelación de regresión de Lasso para determinar el número mínimo de genes que discriminaban mejor los dos grupos de tratamiento. Ésta identificó una firma de 5 genes para el tratamiento con el BLZ945, comprendida de adrenomedulina (*Adm*), arginasa-1 (*Arg1*), el factor de coagulación *F13a1*, el receptor de manosa C tipo 1 (*Mrc1/CD206*), y el inhibidor de proteasa *serpinB2* (Figura 8B). Es interesante que cada uno de estos genes se ha asociado con la polarización de macrófagos M2/alternativamente activada, y que 4 de 5 genes son sub-regulados en seguida del tratamiento con el BLZ945. *SerpinB2* (también conocido como *PAI2*), el único gen sobre-regulado en la firma de 5 genes, se correlaciona en general positivamente con un aumento en la supervivencia, en particular en los pacientes con cáncer de mama.

En muchos contextos de tejido, se ha encontrado que los TAM están más polarizados a M2, lo cual se ha vinculado con sus funciones inmunosupresora y pro-tumorigénica. Además, los macrófagos en los gliomas humanos exhiben un fenotipo de tipo M2, determinado por un aumento de los niveles de los receptores eliminadores CD163 y CD204, los cuales están asociados con un tumor de grado más alto. Dado el sorprendente enriquecimiento para los genes de M2 en la firma restringida de 5 genes, se examinó la lista de 257 genes para determinar si hubo marcadores asociados con M2 adicionales alterados en seguida del tratamiento con BLZ945. Esto reveló 10 genes adicionales [*Alox15* (15-lipoxigenasa de araquidonato); *Cdh1* (cadherina); *Cd163* (antígeno CD163); *Fpr2* (receptor peptídico de formilo-2); *Hmox1* (heme-oxigenasa (deciclaje) 1); *il1b* (interleucina 1 beta); y *Stab1* (estabilina 1)], la mayoría de los cuales fueron sub-regulados (Figura 7D, tabla 2). Los genes de polarización M1/ clásicamente activados no fueron sobre-regulados de una manera correspondiente, con la excepción del receptor de interleucina-1-beta (Figura 7E). Estos datos sugieren que, en respuesta a la inhibición del CSF-1R mediante el BLZ945, los TAM pierden su polarización M2 y pueden ganar funciones anti-tumorigénicas.

Esto también sugiere que el monitoreo de estos cambios de la expresión genética como biomarcadores puede proporcionar valiosa información de pronóstico para el tratamiento de los pacientes de glioma con los inhibidores del CSF-1R. Se puede esperar que los sujetos tratados cuyos perfiles de expresión genética cambien en el mismo patrón o en un patrón similar a estos cambios observados, respondan positivamente al tratamiento con el inhibidor de CSF-1R, y aquéllos que no exhiban esos cambios de expresión genética

ES 2 622 527 T3

pueden necesitar recibir un tratamiento alternativo o adicional debido a un pronóstico negativo con el inhibidor de CSF-1R solo.

Tabla 2. Expresión genética diferencial como un resultado del tratamiento con el inhibidor de CSF-1R

Símbolo	Descripción	Veces de Cambio BLZ945-Vehículo	Valor P Nominal
Akap 1	Una proteína de ancla quinasa (PRKA (gravin) 12	-2.85	1.31E-04
Abhd	Dominio abhidrolasa que contiene 15	-2.48	1.36E-06
Acp5	Fosfatasa ácida 5, resistente al tartrato	2.36	2.08E-03
Aoah	Aciloxiacil hidrolasa	-2.43	3.83E-06
Ada	Adenosina desaminasa	-3.00	2.28E-07
Arxes 1	Secuencia 1 expresada en cromosoma X relacionada con adipocitos	-2.23	1.68E-03
Arxes 2	Secuencia 2 expresada en cromosoma X relacionada con adipocitos	-2.96	3.37E-04
Adm * #	Adrenomedulina	-10.85	2.60E-09
Aldh1a2	Aldehído deshidrogenasa familia 1, subfamilia 2	-2.18	8.36E-04
Apbb2	Enlazante a proteína precursor de amiloide beta (A4), familia B, miembro 2	2.27	2.97E-06
Anin	Anilina, proteína enlazante a actina	-2.99	1.38E-04
Asb10	Repetición de anquirina y 10 que contiene caja de SOCS	2.10	1.14E-03
Asb11	Repetición de anquirina y 11 que contiene caja de SOCS	2.19	3.00E-04
Mki67	Antígeno identificado por anticuerpo monoclonal Ki 67	-7.18	2.78E-05
Apob	Apolipoproteína B	-2.92	3.42E-05
Apoc1	Apolipoproteína C-I	3.21	1.56E-06

ES 2 622 527 T3

Apoc4	Apolipoproteína C-IV	3.14	1.91E-04
Alox15 #	Araquidonato 15-lipoxigenasa	4.24	8.85E-03
Arg1 * #	Arginasa, hígado	-8.48	5.07E-03
Aspm	Tipo asp (husillo anormal), microcefalia asociada (Drosófila)	-2.22	1.02E-03
Aurka	Aurora quinasa A	-2.23	1.30E-03
Aurkb	Aurora quinasa B	-2.71	4.19E-06
Birc5	5 que contiene repetición de baculovirus IAP	-6.13	-3.00E-06
Bambi	Inhibidor unido a lamembrana de BMB y activina, homólogo (Xenopus laevis)	2.64	6.53E-05
Bub1	Deshinibida incipiente por homólogos de bencimidazoles 1	-2.72	4.19E-06
Cdh1 #	Caderina 1	-6.43	1.70E-04
Cdh 1	Caderina 2	-2.23	6.25E 04
Camkk1	Proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina quinasa 1, alfa	-2.13	2.69E-08
Calml4	4 tipo calmodulina	-2.06	2.12E-05
Chst2	Carbohidrato sulfotransferasa 2	2.44	5.14E-04
Cbr2	Carbonilo reductasa 2	-4.15	2.93E-07
Cpa3	Carboxipeptidasa A3, mastocito	2.17	6.30E-04
Ctnnd2	Catenina (proteína asociada a caderina), delta 2	-2.94	8.46E-07
Ctsf	Catepsina F	2.10	1.53E-04
Cd163 #	Antígeno CD163	-2.65	3.87E-07
Cd22	Antígeno CD22	2.35	1.09E-05

ES 2 622 527 T3

Cd244	CD244 receptor de células asesinas naturales 2B4	-2.71	1.11E 07
Cd38	Antígeno CD38	-3.72	4.44E-05
Cd5	Antígeno CD5	3.62	2.96E-05
Cd83	Antígeno CD83	2.28	2.53E -05
Cd93	Antígeno CD93	-2.42	2.30E-07
Cks1b	Proteína cinasa 1b CDC28	-2.54	1.71E-06
Cdc20	Homólogo 20 de ciclo de división celular (<i>S. cerevisiae</i>)	-2.75	1.16E-04
Cdc45	Homólogo 45 de ciclo de división celular (<i>S. cerevisiae</i>)	-2.03	9.78E-08
Cdc6	Homólogo 6 de ciclo de división celular (<i>S. cerevisiae</i>)	-3.67	8.12E-08
Cdca5	5 asociado con el ciclo de división celular	-2.24	6.77E-06
Centpe	Centromero proteína E	-4.18	1.96E-05
Centpk	Centromero proteína K	-2.45	1.46E-05
Cep55	Proteína centrosomal 55	-2.40	8.23E-05
Ccr1	Receptor 1 de quimiocina (motivo C-C)	-4.56	6.86E-05

ES 2 622 527 T3

Cxcr7	Receptor 7 de quimiocina (motivo C-X-C)	-2.26	8-65E-03
Cspg5	Proteoglicano de sulfato de condroitina 5	-2.61	1.09E-05
Clu	Clusterina	-2.34	3.55E-04
F3	Factor de coagulación III	-2.11	4.58E-03
F9	Factor de coagulación IX	2.12	5.92E-04
F13a1+#	Factor de coagulación XIII, subunidad A1	-10.66	1.39E-09
Col11a1	Colágeno, tipo XI, Alfa 1	-3.49	3.09E-04
Col14a1	Colágeno, tipo XIV, Alfa 1	-2.65	1.37E-06
Cfp	Properdina de factor de complemento	-2.64	2.60E-04
Cntn1	Contactina 1	-4.93	2.80E-08
Cpne2	Copina II	-2-20	1.13E-05
Crybb1	Cristalina, beta B1	-2.83	2.44E-05
Clec4n	Familia de dominio de lectina tipo C 4, miembro n	-6.53	4.34E-10
Ccna2	Ciclina A2	-3.90	1.19E-05
Cnnb1	Ciclina B1	-3.55	2.25E-05
Ccnb2	Ciclina B2	-4.53	1.16E-05
Ccnd1	Ciclina D1	-3.01	1.06E-05
Ccnd2	Ciclina D2	-3.34	1.36E-05
Ccne2	Ciclina E2	-5.28	3.67E-08
Ccnf	Ciclina F	-2.30	1.48E-04

ES 2 622 527 T3

Cdk1	Cinasa dependiente de ciclina 1	-2.18	2.75E-05
Cst7	Cistatina F (leucocistatina)	2.63	2.29E-07
Cyp4v3	Citocromo P450, familia 4, subfamilia v, polipéptido 3	2.14	1.15E-05
Cpeb1	Proteína de enlace del elemento de poliadenilación citoplásmico 1	2.86	1.97E-05
Ckap2	Proteína asociada con citoesqueleto	-2.17	1.80E-04
Ddhd1	1 que contiene dominio DDHD	2.06	4.86E-03
Dner	Receptor relacionado con EGF similar a delta/notch	-2.68	2.65E-04
Dck	Cinasa de desoxicitidina	-2.07	2.50E-04
Depdc1a	1a que contiene Dominio DEP	-2.81	9.05E-05
Dhfr	Reductasa de dihidrofolato	-2.40	5.79E-06
Prim1	Primasa de DEP, subunidad p49	-2.76	2.87E-07
D17H6S56E-5	Segmento de ADN, Chr 17, D6S56E 5 humano	-2.01	1.66E-03
Ddit4	Transcripción inducible por daño del ADN 4	-2.43	5.07E-06
Dusp1	Fosfatasa de especificidad doble 1	2.33	3.55E-04
E2f8	Factor de transcripción de E2F 8	-2.71	1.20E05
Ect2	Oncogén de ect2	-3.19	1.65E-06
Emb	Embigina	-2.59	9.66E-05
Eepd1	1 que contiene dominio de la familia de endonucleasa/exonucleasa/fosfatasa	2.70	1.62E-06

ES 2 622 527 T3

Ezh2	Mejorador de homólogo zeste 2 (Drosophila)	-2.54	1.36E-05
Etl4	Mejorador de trap locus 4	2.41	1.24E-05
Eps8	Sustrato de sonda del receptor de factor de crecimiento epidérmico 8	-2.51	4.00E-06
Emp1	Proteína de membrana epitelial 1	-3.19	6.42E-04
Ephx1	Epóxido-hidrolasa 1, microsomal	2.76	1.75E-04
Ero1l	Similar a ERO1 (S. cerevisiae)	-2.64	1.0E-05
Fam20c	Familia con similitud de secuencia 20, miembro C	2.79	3.62E-06
Fabp3	Proteína 3 que se enlaza al ácido graso, músculo y corazón	2.93	4.99E-06
Fabp7	Proteína 7 que se enlaza al ácido graso, cerebro	-6.77	9.66E-06
Fbxo32	Proteína de cuadro-F 32	2.54	1.79E05
Fbn2	Fibrilina 2	-2.13	3.89E-03
Fap	Proteína de activación de fibroblastos	-2.25	1.46E-03
Fpr2#	Receptor de péptido de formilo 2	-2.83	6.68E-05
Fhl1	Cuatro y medio dominios de LIM 1	-2.02	5.40E-03
Gja1	Proteína de unión de hueso, alfa 1	-2.78	1.97E-03
Gpnmb	Glicoproteína (transmembrana) nmb	3.22	3.98E-05
Ggta1	Galactosil-transferasa de glicoproteína alfa 1, 3	-2.40	2.12E-06

ES 2 622 527 T3

Gpm6a	Glicoproteína m6a	-5.35	3.23E-06
Gzma	Granzima A	3.55	4.11E-03
Gadd45a	Detención de crecimiento y alfa 45 inducible por daño de ADN	2.40	2.77E-04
Gap43	Proteína 43 asociada al crecimiento	-2.56	7.42E-05
Gdf3	Factor de diferenciación de crecimiento 3	-3.33	1.40E-07
Gem	Proteína de enlace de GTP (gen sobre-expresado en músculo esquelético)	2.17	7.03E-04
Hspa1a	Proteína de choque por calor 1A	-4.38	1.45E-05
Hspa1b	Proteína de choque por calor 1B	-8.71	1.88E-08
Hsp90aa1	Proteína de choque por calor 90, alfa (citósica), clase A, miembro 1	-2.23	1.01E-03
Hells	Helicasa, específica de linfocitos	-3.59	9.75E-06
Hmox1#	Heme-oxigenasa (deciclaje) 1	-2.90	7.05E-05
Hmgb3	Cuadro 3 de grupo de alta movilidad	-2.42	2.32E-06
Hmgn5	Dominio de enlace de nucleosoma del grupo de alta movilidad 5	-2.58	1.79E-05
Igj	Cadena de unión de inmunoglobulina	3.36	4.53E-03
Ikbke	Inhibidor de cinasa épsilon kappaB	2.38	1.50E-04

ES 2 622 527 T3

Igf1	Factor de crecimiento tipo insulina 1	2.13	8.56E-05
Igfbp2	Proteína que se enlaza al factor de crecimiento tipo insulina 2	-3.54	1.24E-06
Igfbp2	Proteína que se enlaza al factor de crecimiento tipo insulina 3	6.53	1.05E-05
Itgam	Integrina alfa M	-2.25	2.27E-04
Itgax	Integrina alfa X	2.08	1.36E-03
Ifitm1	Proteína transmembrana inducida por interferón 1	-5.18	1.21E-04
Ifitm2	Proteína transmembrana que inducida por interferón 2	-2.82	1.54E-03
Ifitm3	Proteína transmembrana que inducida por interferón 3	-2.06	4.73E-03
Ifitm6	Proteína transmembrana inducida por interferón 6	-4.14	6.14E-04
Il1b#	Interleucina 1 beta	2.06	4.50E-04
Il18bp	Proteína que se enlaza a interleucina 18	3.66	4.53E-04
Il7r	Receptor de interleucina 7	-2.01	4.96E-03
Kpna2	Karioferina (importina) alfa 2	-2.38	1.98E-05
Khdrbs3	Que contiene dominio KH, enlace de ARN, 3 asociada con transducción de señal	-2.10	3.94E-04

ES 2 622 527 T3

Klrb1a	Miembro 1A de la subfamilia B del receptor tipo lectina de célula aniquiladora	4.30	9.00E-05
Kif11	Miembro de familia de cinesina 11	-2.57	9.00E-05
Pbk	Cinasa de enlace de PDZ	-5.63	9.20E-07
Pttg1	Gen que transforma el tumor de pituitaria 1	-2.83	2.73E-06
Plac8	Específico de placenta 8	-2.79	6.64E-03
Pdgfra	Receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas, polipéptido alfa	-3.16	4.84E-06
Pf4	Factor de plaquetas 4	-2.96	1.21E-05
Pdgfc	Factor de crecimiento derivado de plaquetas, polipéptido C	-2.25	2.98E-03
Ptn	Pleiotrofina	-3.21	4.42E-04
Pdpn	Podoplanina	-2.01	3.51E-04
Plk1	Cinasa tipo polo 1 (Drosophila)	-2.68	5.72E-05
Pola1	Polimerasa (dirigida por ADN), alfa 1	-2.37	3.52E-06
Pold2	Polimerasa (dirigida por ADN), delta 2, subunidad reguladora	-2.02	5.72E-06
Pole	Polimerasa (dirigida por ADN), épsilon	-2.27	5.96E-05
Kcnk2	Canal de potasio, subfamilia K, miembro 2	-2.13	8.52E-05
Prickle1	Homólogo de prickle 1 (Drosophila)	2.32	1.75E-04
P4ha2	Procolágeno-prolina, 4-dioxigenasa de 2-oxoglutarato (4-hidroxilasa de prolina), polipéptido alfa II	-3.54	1.25E-06
Pmepa1	Proteína transmembrana de próstata, 1 inducido por andrógeno	-2.35	5.85E-04

ES 2 622 527 T3

Psmb7	Subunidad de proteasoma (prosome, macropaína), beta tipo 7	-2.17	4.27E-03
Prc1	Regulador de proteína de citoquinesis 1	-3.06	1.26E-04
Ptprz1	Fosfatasa de proteína tirosina, tipo receptor Z, polipéptido 1	-3.66	4.43E-05
P2ry12	Receptor P2Y purinérgico, 12 acoplado con proteína G	-2.55	1.86E-04
Rab34	RAB34, miembro de la familia de oncogenes RAS	2.08	3.95E-05
Racgap1	Proteína activadora de GTPasa Rac 1	-2.56	2.92E-05
Rad51ap1	Proteína 1 asociada con RAD51	-2.61	1.26E-07
Rad51	Homólogo de RAD51 (<i>S. cerevisiae</i>)	-2.90	3.33E-06
Ranbp1	Proteína que se enlaza a RAN 1	-2.01	6.62E-07
Rfc4	Factor de replicación C (activador 1) 4	-2.17	4.24E-05
Rbp1	Proteína 1 que se enlaza a retinol, celular	-4.22	1.88E-05
Rrm1	Reductasa de ribonucleótido M1	-2.14	1.79E-05
Rrm2	Reductasa de ribonucleótido M2	-8.23	1.04E-07
2310016C08 Rik	Gen RIKEN ADNc 2310016C08	-2.14	1.12E-04
2810417H13 Rik	Gen RIKEN ADNc 2810417H13	-3.96	2.33E-07
4930583H14 Rik	Gen RIKEN ADNc 4930583H14	-2.37	1.25E-05
Rbm3	Proteína 3 de motivo que se enlaza al ARN	-2.20	2.23E-09
Slfn4	Esclafeno 4	-3.35	3.42E-03
Stil	Locus que interrumpe Scl/tal1	-3.15	2.15E-06
Serpib2*#	Inhibidor de peptidasa de serina (o cisteína),	6.20	1.12E-02

ES 2 622 527 T3

	clado B, miembro 2		
Serpinb6b	Inhibidor de peptidasa de serina (o cisteína), clado B, miembro 6b	2.03	1.22E-03
Smyd2	2 que contiene el dominio SET y MYND	-2.25	6.90E-04
Sh3bgr	Proteína rica en ácido glutámico del dominio que se enlaza a SH3	3.33	6.84E-07
Sh3bgrl	Tipo proteína rica en ácido glutámico del dominio que se enlaza a SH3	-2.02	4.68E-04
Schbp1	Proteína 1 que se enlaza al dominio SH2 Shc	-4.72	1.74E-06
Slamf8	Miembro 8 de la familia SLAM	2.81	5.20E-03
Snrpa1	Polipéptido de ribonucleo-proteína nuclear pequeño A'	-2.04	1.48E-06
Slc2a5	Familia portadora de soluto 2 (transportador de glucosa facilitado), miembro 5	-3.46	8.15E-07
Slc39a4	Familia portadora de soluto 39 (transportador de zinc), miembro 4	2.44	7.83E-05
Slc6a1	Familia portadora de soluto 6 (transportador de neurotransmisor, GABA), miembro 1	-2.09	5.66E-04
Sparcl1	Tipo SPARC 1	-3.23	1.06E-03
Spon1	Espondina 1, (f-espondina) proteína de matriz extracelular	-2.50	9.32E-05
Sox2	Gen 2 que contiene al cuadro SRY	-2.50	5.13E-03
Stab1#	Estabilina 1	-2.64	3.92E-05
Stmn1	Estatmina 1	-2.52	5.52E-05
Smc2	Mantenimiento estructural de cromosomas 2	-2.87	7.80E-05

ES 2 622 527 T3

Smc4	Mantenimiento estructural de cromosomas 4	-3.20	2.26E-04
St14	Supresión de tumorigenicidad 14 (carcinoma de colon)	2.47	4.21E-06
Tiparp	Polimerasa de poli-(ADP-ribosa) inducible por TCDD	-2.06	1.25E-03
Tnc	Tenascina C	-2.56	2.48E-03
Tk1	Cinasa de timidina 1	-3.39	1.24E-07
Tipin	Proteína que interactúa sin tiempo	-2.50	6.24E-06
Tfpi2	Inhibidor de senda de factor de tejido 2	-2.60	3.99E-03
Timp1	Inhibidor de tejido de metaloproteinasas 1	-2.07	1.64E-04
Top2a	Topoisomerasa (ADN) II alfa	-2.11	2.13E-05
Topbp1	Proteína 1 que se enlaza a topoisomerasa (ADN) II	-2.37	9.96E-06
Tpx2	TPX2, homólogo de proteína asociada con microtúbulos (<i>Xenopus laevis</i>)	-2.52	1.16E-05
Tcf19	Factor de transcripción 19	-2.32	1.67E-06
Tgfb1	Factor de crecimiento transformante, inducido por beta	-3.23	1.68E-06
Tgm2	Transglutaminasa 2, polipéptido C	-2.94	2.86E-03
Tmem119	Proteína transmembrana 119	-3.12	1.71E-06
Tmem163	Proteína transmembrana 163	2.20	5.42E-03
Trps1	Síndrome tricorrinofalangeal I (humano)	-2.97	1.68E-07

Trim59	59 que contiene motivo tripartita	-2.78	3.02E-04
Ttk	Cinasa de proteína Ttk	-2.63	3.35E-05
Tubb2c	Tubulina, beta 2C	-2.13	3.84E-06
Ube2c	Enzima E2C conjugada con ubiquitina	-3.98	1.12E-04
Uhrf1	Tipo ubiquitina, que contiene dominios de dedo PHD y RING, 1	-2.96	3.73E-07
Ung	Glicosilasa de ADN de uracilo	-2.50	5.81E-07
Wdhd1	Repetición de WD y proteína 1 de enlace de ADN de cuadro-HMG	-2.01	2.52E-04
Zwilch	Zwilch, asociado con cineto-núcleo, homólogo (Drosophila)	-4.32	3.61E-06

* Componente de la firma de regresión de Lasso de respuesta al BLZ945.

Genes asociados con el macrófago M2 relevante.

En la Tabla, los genes sub-regulados reciben un número de "veces de cambio" negativo, mientras que los genes sobre-regulados tienen valores positivos. Los valores p nominales son de la prueba t de dos colas de Student.

5

En adición, las firmas genéticas generadas a partir de los TAM tratados con BLZ945 en los ratones, parecen estar asociadas con una supervivencia diferencial en los pacientes con GBM. Se utilizaron una máquina de vector de soporte (SVM) y la firma de Lasso para analizar los datos del GBM del The Cancer Gene Atlas (TCGA) [El Atlas de Genes de Cáncer], y una segunda serie combinada de conjuntos de datos de glioblastoma multiforme (GBM), y para segregar a los pacientes en los clasificadores ya sea de "BLZ945" o de "Vehículo". Estos análisis revelaron un aumento en la supervivencia media en el intervalo de 10 meses en los pacientes pro-neurales del TCGA utilizando la firma de Lasso (Figuras 8C y 8D) a 31.5 meses en los conjuntos de datos combinados con la firma de SVM (Figuras 8E y 8F). Es interesante que este aumento en la supervivencia no fue evidente en otros subtipos de GBM, y no era dependiente del enriquecimiento de los pacientes pro-neurales G-CIMP+.

10

15

Tabla 3. Datos de Supervivencia para la Máquina de Vector de Soporte (SVM) y modelos Lasso en las diferentes poblaciones de GBM

Grupo	BLZ945	Vehículo	Super- vivencia media	Valor P
SVM combinado neural	49	16	5.42	1.59E-01
SVM combinado proneural	46	62	31.54	6.86E-04

ES 2 622 527 T3

Grupo	BLZ945	Vehículo	Super- vivencia media	Valor P
SVM combinado mesenquimal	37	102	-2.25	8.92E-01
SVM combinado clásico	11	48	0.40	6.67E-01
SVM TCGA proneural	45	88	7.64	7.27E-03
SVM TCGA proneural GCIMP	13	8	-40.60	2.01E-01
SVM TCGA proneural no GCIMP	22	44	-0.76	2.64E-01
SVM TCGA GCIMP	14	8	-35.60	2.03E-01
SVM TCGA no GCIMP	83	157	-1.06	7.27E-01
SVM TCGA neural	23	30	2.84	7.73E-01
SVM TCGA mesenquimal	53	99	0.30	7.62E-01
SVM TCGA clásico	31	66	-3.14	7.71E-01
Lasso combinado neural	51	14	7.01	6.50E-02
Lasso combinado proneural	79	29	6.51	4.15E-02
Lasso combinado mesenquimal	21	118	1.88	5.55E-01
Lasso combinado clásico	28	31	0.33	9.68E-01
Lasso TCGA proneural	84	49	9.98	5.41E-06
Lasso TCGA proneural GCIMP	20	1	NA	NA
Lasso TCGA proneural no GCIMP	40	26	10.84	1.40E-02
Lasso TCGA GCIMP	20	2	-16.13	7.21E-01

Grupo	BLZ945	Vehículo	Super- vivencia media	Valor P
Lasso TCGA no GCIMP	100	140	0.10	4.14E-01
Lasso TCGA neural	31	22	-5.19	2.77E.02
Lasso TCGA mesenquimal	23	129	0.40	8.35E-01
Lasso TCGA clásico	49	48	-1.42	6.34E-01

El análisis de las proporciones de riesgo asociadas demostró la ventaja de supervivencia específica del proneural tanto en TCGA como en los conjuntos de datos combinados (Figura 8G). La especificidad proneural es consistente con las firmas de TAM que se han generado originalmente a partir del modelo de gliomagénesis PDG, el cual representa más estrechamente el GBM proneural. Esto sugiere que estas firmas genéticas pueden proporcionar una guía de pronóstico útil para los sujetos que se sometían al tratamiento con productos quimioterapéuticos, en particular los pacientes con GBM tratados con los inhibidores del CSF-1R. Debido a que el GBM proneural no responde a las agresivas quimioterapia y radioterapia comparándose con los otros subtipos, el hallazgo de un valor de pronóstico asociado con estas firmas puede tener un importante potencial de traducción para este grupo de pacientes. Basándose en la correlación observada, se espera que los pacientes que reciban quimioterapia y que exhiban una firma genética cuando menos aproximadamente el 80 % similar a cualquiera de las firmas genéticas de Lasso o SVM, responderán positivamente a ese producto quimioterapéutico. En particular, se espera que esta correlación sea útil con los sujetos tratados con un inhibidor de CSF-1R, en particular los compuestos de la fórmula (I) como se describen en la presente.

Tabla 4. Proporciones de riesgo e intervalos de confianza del 95 % asociados para el modelo de regresión de Lasso en diferentes grupos de pacientes con G-CIMP y sin G-CIMP. G-CIMP corresponde al Fenotipo Metilador de Isla CpG de Glioma. Los valores P se obtuvieron empleando la prueba de Wald.

Estrato	Población de pacientes	Modelo	Razón de riesgo	CI 95%	Valor P
'BLZ945' Lasso	No GCIMP proneural*	Univariado	0.4921	(0.2766- 0.8756)	0.0063
'BLZ945' Lasso	Todo proneural	Univariado	0.3937	(0.2601- 0.5961)	9.729e-06
G-CIMP	Todo proneural	Univariado	0.3289	(0.1481- 0.7304)	0.01367
G-CIMP	Todo proneural	Multivariado*	0.4601	(0.1972- 1.0733)	0.00783
'BLZ945' Lasso	Todo proneural	Multivariado*	0.4295	(0.2304- 0.8007)	0.07244

* Conjunto de pacientes proneurales con datos de metilación que definitivamente no son positivos para G-CIMP (67/133 en total de pacientes TCGA proneurales).

** Modelo de riesgo proporcional cox multivariado usando ambos estratos de clasificación G-CIMP y 'BLZ945'.

Tabla 5. Proporciones de riesgo para el modelo de regresión de Lasso en diferentes conjuntos de datos de pacientes. Los valores P se obtuvieron utilizando la prueba de Wald. Solamente las proporciones de riesgo de los subtipos pro-neurales son estadísticamente significativas.

Grupo	Razón de riesgo	CI 95%	Valor P
TCGA-proneural	0.29	(0.17-0.50)	6.32E-06
TCGA-clásico	1.28	(0.73-2.26)	3.89E-01
TCGA-mesenquimal	0.93	(0.49-1.72)	8.07E-01
TCGA-neural	1.93	(0.83-4.46)	1.25E-01
Proneural combinado	0.44	(0.25-0.79)	5.97E-03
Clásico combinado	1.01	(0.47-2.17)	9.79E-01
Mesenquimal combinado	1.02	(0.54-1.94)	9.43E-01
Neural combinado	0.46	(0.22-1.01)	5.23E-02

5 Métodos y materiales usados

Ratones

10 Todos los estudios con animales fueron aprobados por el Institutional Animal Care and Use Committee [Comité de Cuidado y Uso Institucional de Animales] del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. El modelo de ratón Nestin-Tv-a;Ink4a/Arf/- (antecedentes de raza mixta) ha sido anteriormente descrito (véase E. Tchougounova y colaboradores, Oncogene 26, 6289 (2007)). Los ratones C57BL/6 de tipo silvestre (WT) y los ratones de β -actina-GFP (C57BL/6) se adquirieron en Charles River Laboratories y en Jackson Laboratories, respectivamente, y también se criaron dentro de nuestra instalación de animales.

Inyecciones intracraneales

15 La iniciación de los tumores con RCAS-PDGF-B-HA en ratones adultos se ha descrito anteriormente (A. H. Shih y colaboradores, Cancer Res 64, 4783 (2004)). Dicho de una manera breve, los ratones se anestesiaron completamente con 10 miligramos/mililitro de quetamina/1 miligramos/mililitro de xilazina, y se inyectaron subcutáneamente con 50 microlitros del anestésico local de Bupivacaína al 0.25 % en el sitio quirúrgico. Los ratones se inyectaron intracranealmente con 1 microlitro que contenía 2×10^5 células DF-1:RCAS-PDGF-B-HA de entre 5 y 6 semanas de edad utilizando un aparato estereotáctico fijo (Stoelting). Las inyecciones se hicieron en la corteza frontal derecha, aproximadamente 1.5 milímetros lateral y 1 milímetro caudal desde la bregma, y a una profundidad de 2 milímetros.

25 Con el fin de investigar la expresión específica del tipo de células de CSF-1 y CSF-1R en las poblaciones de células clasificadas mediante citometría de flujo, se iniciaron tumores en los ratones con RCAS-PDGF-B-HA-SV40-eGFP (RCAS-PDGF-GFP) como se describió anteriormente (E. I. Fomchenko y colaboradores, PLoS ONE 6, e20605 (2011)). Las crías Nestin-Tv-a;Ink4a/Arf/- se inyectaron con 1 microlitro de células DF-1:RCAS-PDGF-B-GFP en el día 2 post-natal, en la corteza izquierda entre el ojo y la oreja.

Inhibidor BLZ945 y tratamiento

30 El inhibidor de CSF-1R, BLZ945, se formuló en captisol al 20 % en una concentración de 12.5 miligramos/mililitro. El control de vehículo, captisol al 20 %, se procesó de la misma manera. Para los estudios de BLZ945, los ratones se dosificaron con 200 miligramos/kilogramo de BLZ945 o vehículo (captisol

al 20 %) mediante intubación oral forzada una vez al día.

Con el fin de determinar si el fármaco era capaz de cruzar la barrera hematoencefálica, los ratones portadores de tumor se trataron con una sola dosis de BLZ945 y se sacrificaron en diferentes puntos del tiempo después del tratamiento. El plasma, y los hemisferios izquierdo (contralateral) y derecho (portador de tumor) del cerebro se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido para el subsiguiente análisis de las concentraciones de BLZ945 en el tejido. Para los estudios de supervivencia a largo plazo, la dosificación se inició a los 17 días/2.5 semanas después de la inyección de RCAS-PDGF-B-HA. Para los estudios de punto del tiempo fijo, los ratones se sometieron a exploraciones de MRI a las 4-5 semanas después de la inyección de RCAS-PDGF-B-HA, como se describió anteriormente (Transl Oncol 2, 89 (2009)).

Con el fin de determinar el volumen del tumor, las regiones de interés (ROI) se circunscribieron en imágenes ponderadas T2, y su área correspondiente en milímetros cuadrados se multiplicó por la altura de la rebanada de 0.7 milímetros. El volumen total del tumor es la suma del volumen ROI en cada rebanada, y el volumen para la primera y última rebanadas en donde el tumor parece ir a la mitad para aproximarse al volumen de un trapecioide. Cuando el volumen del tumor estuvo en el intervalo de 4.5 a 40 milímetros cúbicos, los animales se asignaron aleatoriamente a los grupos de tratamiento. Una tercera cohorte de ratones con tumores mayores de 40 milímetros cúbicos, también se trató con BLZ945 (denotados como BLZ945 Grandes). No se incluyó una cohorte tratada con vehículo del mismo tamaño para esta cohorte que tenía la carga tumoral inicial más grande, debido a que estos ratones no habrían sido capaces de sobrevivir al punto final del estudio.

Sacrificio de ratones y cosecha de tejidos

Los ratones se sometieron a eutanasia en los puntos del tiempo definidos, como se describe en las leyendas de la figura, o cuando llegaron a ser sintomáticos por sus tumores, lo cual incluyó signos de mal emparejamiento, letargia, pérdida de peso, jorobamiento, macrocefalea, o ataques.

Con el fin de aislar los tejidos para la congelación instantánea en nitrógeno líquido, los ratones se eutanizaron mediante asfixia con dióxido de carbono, o se anestesiaron completamente con avertina (2,2,2-tribromo-etanol, Sigma), y se dislocaron cervicalmente antes de la cosecha del tejido. Para la citometría de flujo, los ratones se anestesiaron completamente con avertina, y se perfundieron transcárdialmente con 20 mililitros de PBS. Entonces se aisló el cerebro y el tumor se macrodisecionó a partir del tejido normal circundante. Para el análisis de proliferación, los ratones se inyectaron intraperitonealmente con 100 miligramos/ gramo de bromo-desoxiuridina (BrdU; Sigma) 2 horas antes del sacrificio. Para aislar los tejidos para la histología congelada, los ratones se anestesiaron completamente con avertina, se perfundieron transcárdialmente con 10 mililitros de PBS, seguido por 10 mililitros de para-formaldehído al 4 % en PBS (PFA). El cerebro se fijó posteriormente en PFA durante la noche a 4°C, mientras que los otros tejidos se crioconservaron en sacarosa al 30 % a 4°C. Después de la fijación posterior, el cerebro se transfirió entonces a sacarosa al 30 %, y se incubó a 4°C hasta que el cerebro se equilibró completamente y se sumergió hasta el fondo del tubo (típicamente de 2 a 3 días). Entonces todos los tejidos se empotraron en OCT (Tissue-Tek), y se utilizaron secciones de tejido criostáticas de 10 micras para todos los análisis subsiguientes.

Histología, inmunohistoquímica, y análisis:

Para la calificación de la malignidad del tumor, se llevó a cabo el teñido con hematoxilina y eosina (H&E), y los tejidos fueron calificados ciegamente por un neuropatólogo independiente.

Para la inmunofluorescencia, se descongelaron las secciones congeladas de 10 micras de grosor, y se secaron a temperatura ambiente, y luego se lavaron en PBS. Para el protocolo de teñido estándar, las secciones de tejido se bloquearon en PNB al 0.5 % en PBS durante cuando menos 1 hora a temperatura ambiente, o durante toda la noche a 4°C, seguido por incubación en el anticuerpo primario en PNB al 0.25 % durante 2 horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. La información del anticuerpo primario y las diluciones se enlistan en la Tabla 6. Luego las secciones se lavaron en PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con fluoróforo apropiado (Molecular Probes) en una dilución de 1:500 en PNB al 0.25 % durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar en PBS, las secciones de tejido se contra-tiñeron con DAPI (5 miligramos/mililitro del suministro diluido a 1:5,000 en PBS) durante 5 minutos antes de montarse con el medio de montaje ProLong Gold Antifade (Invitrogen).

Para el análisis de angiogénesis y proliferación, las secciones de tejido se sometieron primero a la recuperación del antígeno basada en el regulador de citrato sumergiendo en una solución desenmascarante de antígeno (0.94 % en volumen/volumen en agua destilada; Vector Laboratories), y pasando por microondas durante 10 minutos a la mitad de la potencia, seguido por enfriamiento hasta la temperatura ambiente durante cuando menos 30 minutos. Para el análisis de angiogénesis, los tejidos se lavaron luego en PBS, y se bloquearon con reactivo bloqueador de Ig de ratón (Vector Laboratories) de acuerdo con las instrucciones del fabricante durante 1 hora a temperatura ambiente. Para el análisis de proliferación, después de la recuperación del antígeno, las secciones de tejido se incubaron con HCl 2M durante 15 minutos a temperatura

ambiente para desnaturalizar el ADN, y entonces en regulador de borato de sodio 0.1 neutralizante (pH de 8.5) durante 5 minutos. Después de los lavados con PBS, se llevó a cabo el resto del teñido de acuerdo con el protocolo convencional.

5 Para el teñido para el análisis de fagocitosis, se descongelaron las secciones congeladas de 10 micras de grosor, y se secaron a temperatura ambiente, y luego se lavaron en PBS. Las secciones de tejido se bloquearon en PNB al 0.5 % en PBS durante cuando menos 1 hora a temperatura ambiente, seguido por incubación en el anticuerpo primario anti-caspasa-3 disociada de conejo diluido a 1:500 en PNB al 0.5 % durante la noche a 4°C. Al día siguiente, las rebanadas se lavaron 6 veces durante 5 minutos en PBS antes de la incubación con el anticuerpo secundario Alexa568 de cabra anti-conejo (1:500 en PNB al 0.5 %) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las secciones de tejido se lavaron entonces 6 veces durante 5 minutos en PBS y se bloquearon durante la noche a 4°C en un nuevo regulador de suero de burro al 5 %, albúmina de suero bovino al 3 %, y PNB al 0.5 % en PBS. Al día siguiente, las rebanadas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con el siguiente conjunto de anticuerpos primarios: anti-Olig2 de conejo (1:200), y anti-CD11b de rata (1:200) diluidos en suero de burro al 5 %, albúmina de suero bovino al 3 %, y PNB al 0.5 % en PBS. Las rebanadas se lavaron 6 veces durante 5 minutos en suero regulado con fosfato antes de la incubación con los anticuerpos secundarios de burro anti-conejo Alexa647 (1:500), y de burro anti-rata Alexa488 (1:500) en PNB al 0.5 % durante 1 hora a temperatura ambiente. Las secciones de tejido se lavaron entonces 4 veces durante 5 minutos en PBS antes de teñirse con DAPI (5 miligramos/ mililitro del suministro diluido a 1:5,000 en PBS) durante 5 minutos, se lavaron dos veces más en PBS durante 5 minutos, y se montaron con el medio de montaje ProLong Gold Antifade (Invitrogen). También se llevó a cabo un co-teñido para CSF-1R (primer anticuerpo primario), e Iba1 (segundo anticuerpo primario) en serie de la misma manera, con la adición de la recuperación del antígeno basada en el regulador de citrato al principio.

Las secciones de tejido se visualizaron bajo un microscopio Carl Zeiss Axioimager Z1 equipado con un Apotome. El análisis de teñido de inmunofluorescencia, número de células, proliferación, apoptosis, y estudios de co-localización se llevaron a cabo utilizando el software de análisis TissueQuest (TissueGnostics) como se describió anteriormente (Journal Immunol Methods 237, 39 (2000)).

Se generaron vistas de secciones de tejido de los gliomas teñidos para el análisis de angiogénesis mediante el software de adquisición TissueGnostics, cosiendo entre sí imágenes 200x individuales. Todos los parámetros de la angiogénesis se cuantificaron utilizando MetaMorph (Molecular Devices), como se describió anteriormente (V. Gocheva y colaboradores, Biol Chem 391, 937 (2010)).

Para el análisis de fagocitosis, se adquirieron 15 campos de visión aleatoriamente seleccionados de adentro del tumor utilizando el objetivo de inmersión en aceite 63x (amplificación total 630x), y el Apotome para asegurar que las células estuvieran en la misma sección óptica. Las células positivas se contaron manualmente utilizando el Volocity (PerkinElmer), y se discriminaron mediante la presencia de un núcleo DAPI+. Las células apoptóticas se contaron como aquellas que tenían el teñido de caspasa-3 citoplásmica disociada (CC3)+ y los núcleos condensados. Se consideraba que una célula había sido tragada por un macrófago cuando estaba rodeada por un anillo de CD11b+ contiguo que encerrara cuando menos a dos tercios del borde de la célula. Los números de ratones analizados se especifican en las leyendas de la figura.

Aislamiento de proteína y Western blot

40 Los ratones se trataron con BLZ945 o con vehículo, y se sacrificaron 1 hora después de la dosis final, y se cosecharon los tumores. Las muestras se fraccionaron bioquímicamente como se describe anteriormente. Las fracciones de membrana sinaptosomal se lisaron en regulador de lisis NP-40 (NP-40 al 0.5 %, Tris-HCl 50 mM [pH de 7.5], NaCl 50 mM, cóctel inhibidor de proteasa Mini completo 1x (Roche), cóctel inhibidor de fosfatasa PhosSTOP 1x (Roche)), y la proteína se cuantificó utilizando el ensayo BCA (Pierce). Los lisados de proteína se cargaron (90 micro-gramos/pista) sobre geles de SDS-PAGE, y se transfirieron a las membranas de PVDF para la inmunotransferencia.

Las membranas se sondearon con anticuerpos contra fosfo-CSF-1R Y721 (1:1000; Cell Signaling Technology), CSF-1R (1:1000; Santa Cruz Biotechnology), o GAPDH (1:1000; Cell Signaling Technology), y se detectaron utilizando anticuerpos anti-conejo conjugados con HRP (Jackson Immunoresearch), utilizando detección de quimiluminiscencia (Millipore). Las bandas de los Western blots se cuantificaron en el intervalo dinámico utilizando el módulo de análisis de gel en el software ImageJ.

Los macrófagos primarios derivados de médula ósea (BMDMs) se cultivaron en ausencia de CSF-1 durante 12 horas antes de la estimulación con CSF-1 (10 nanogramos/mililitro) para los puntos del tiempo indicados en la Figura S2, en la presencia o en ausencia de BLZ945 67 nM. Los lisados de proteína entera se aislaron con regulador de lisis NP40 y se detectaron mediante Western blot como se describe anteriormente.

Preparación de suspensiones celulares individuales y citometría de flujo

Para la investigación de las poblaciones de macrófagos de cerebro mediante análisis de citometría de flujo o clasificación, el tumor se digirió hasta una sola suspensión celular mediante su incubación con 5 mililitros de

5 solución de digestión de papaína (0.94 miligramos/mililitro de papaína [Worthington], EDTA 0.48 mM, 0.18 miligramos/mililitro de NAcety-L-cisteína [Sigma], 0.06 miligramos/ mililitro de ADNsa I [Sigma], se diluyó en Solución de Sal Balanceada de Earl, y se le permitió activarse a temperatura ambiente durante cuando menos 30 minutos). En seguida de la digestión, la enzima se inactivó mediante la adición de 2 mililitros de 0.71 miligramos/mililitro de ovomucoide (Worthington). La suspensión celular se pasó entonces a través de una malla de 40 micras para remover el tejido no digerido, se lavó con regulador FACS (albúmina de suero bovino (BSA) libre de IgG al 1 % en PBS [Jackson Immunoresearch]), y se centrifugó a una baja velocidad de 750 revoluciones por minuto (Sorvall Legend RT), para remover los desechos y obtener el aglomerado celular. Debido a que muchos epítomos de células inmunitarias son sensibles a la papaína, para la investigación de la infiltración de células inmunitarias mediante el análisis de citometría de flujo, los tumores se digirieron hasta una sola suspensión celular mediante su incubación durante 10 minutos a 37°C con 5 mililitros de 1.5 miligramos/mililitro de colagenasa III (Worthington), y 0.06 miligramos/mililitro de ADNsa I en Solución de Sal Balanceada de Hanks 1x (HBSS) con calcio y magnesio.

10 La suspensión celular se lavó entonces con PBS y se pasó a través de una malla de 40 micras para remover el tejido no digerido. Para remover el desecho de mielina, el aglomerado celular se volvió a suspender en 15 mililitros de Percoll al 25 % a temperatura ambiente, preparado a partir del suministro isotónico de Percoll (90 % de Percoll [Sigma], 10 % de HBSS 10x), y entonces se centrifugó durante 15 minutos a 1,500 revoluciones por minuto (rpm) (Sorvall Legend RT) con acelerador y freno ajustados en 1. El aglomerado celular se lavó entonces con HBSS 1x antes de volverse a suspender en el regulador FACS. Después del recuento, las células se incubaron con 1 microlitro de Fc Block por cada millón de células durante cuando menos 15 minutos a 4°C. Las células entonces se tiñeron con los anticuerpos apropiados durante 10 minutos a 4°C, se lavaron con regulador FACS, y se volvieron a suspender en el regulador FACS que contenía DAPI (5 miligramos/mililitro diluidos a 1:5000) para la exclusión de células vivas/muertas. Los anticuerpos utilizados para la citometría de flujo se enlistan en la Tabla 6.

25 Tabla 6. Lista de anticuerpos y fuentes.

Anticuerpo	Clon	Vendedor	Fluoróforos	Dilución
CD45	30-F11	BD Pharmingen	FITC, APC, PE-Cy7	1:100-1:200
CD3e	145-2C11	BD Pharmingen	PE-Cy7	1:250
Gr-1	RB6-8C5	BD Pharmingen	FITC	1:200
CD4	GK1.5	BD Pharmingen	PE	1:1000
CD11b	M1/70	BD Pharmingen	A488, APC, PE	1:200
Ly6G	1A8	BD Pharmingen	PE-Cy7	1:2000
F4/80	Cl:A3-1	Serotec	PE	1:50
CD8a	53-6.7	Biolegend	A488	1:1000
CD19	6D5	Biolegend	PE	1:2000

Anticuerpo	Clon	Vendedor	Fluoróforos	Dilución
NK1.1	PK136	Biolegend	APC	1:1000
CD206	MR5D3	Biolegend	A488	1:50

5 Para el análisis, las muestras se ejecutaron en un BD LSR II (Becton Dickstein), y toda la compensación y compuerta subsiguientes se llevaron a cabo en el software de análisis FlowJo (TreeStar). Para la clasificación, las muestras se ejecutaron en un clasificador de células BD FACSAria (Becton Dickstein), y las células se recolectaron en el regulador FACS. Las células entonces se centrifugaron y se volvieron a suspender en 500 microlitros de Trizol (Invitrogen) antes de la congelación instantánea en nitrógeno líquido y del almacenamiento a -80°C.

Derivación de cultivos de glioma primario de ratón, neuroesferas y líneas celulares de glioma

10 Los tumores macrodisecionados se digirieron hasta una sola suspensión celular mediante incubación durante 8 a 12 minutos a 37°C como se describe anteriormente. La suspensión celular se lavó con el Medio Basal Neural Stem Cell (NSC) (Stem Cell Technologies), y se centrifugó a baja velocidad (750 revoluciones por minuto (rpm), Sorvall Legend RT), para remover los desechos. Con el fin de derivar los cultivos de glioma primario de ratón, el aglomerado celular se volvió a suspender en DMEM que contenía suero bovino fetal al 10 % (Gibco). Estos cultivos primarios se utilizaron en el primer paso (P2-P3), y contenían una mezcla de tipos diferentes de células encontradas en los gliomas, incluyendo células tumorales, macrófagos, y astrocitos, como se determinaron mediante el teñido de inmunofluorescencia. Los cultivos de glioma primario se hicieron crecer durante 24 horas sobre portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina (BD Biocoat). Las células se fijaron entonces con PFA al 4 % en regulador de fosfato 0.1 M durante la noche a 4°C, se permeabilizaron con Triton-X al 0.1 % durante 5 minutos, y se bloquearon con PNB al 0.5 % durante cuando menos una hora. La presencia de macrófagos, células tumorales y astrocitos se examinó mediante teñido inmunofluorescente de CD11b (1:200), Nestin (1:500), y GFAP (1:1000), respectivamente, (Tabla 7).

Tabla 7. Lista de anticuerpos utilizados para el teñido.

Anticuerpo	Clon	Vendedor	Dilución
CD31 de cabra anti-ratón	---	R&D Systems	1:100
Actina de músculo liso de ratón anti-humano	1A4	DakoCytomation	1:100
Conejo anti-caspasa disociada 3 (Asp175) (CC3)	---	Cell Signaling Technology	1:500
CSF-1R de conejo anti-humano	C-20	Santa Cruz	1:200
Conejo anti-Iba1	---	Wako	1:1000
Conejo anti-proteína fluorescente verde (GFP)	---	Molecular Probes	1:200

Anticuerpo	Clon	Vendedor	Dilución
Conejo anti-Olig2	---	Millipore/Chemicon	1:200
Nestina de ratón anti-rata	---	BD Pharmingen	1:500
CD11b de rata anti-ratón	M1/70	BD Pharmingen	1:200
Rata anti-BrdU	BU1/75 (ICR1)	Serotec	1:200
CD68 de rata anti-ratón	FA-11	Serotec	1:1000
Pollo anti-GFAP	---	Abcam	1:1000

5 Para la formación de neuroesferas, el aglomerado celular se volvió a suspender en un medio de neuroesferas consistente en Medio Basal NSC de ratón, suplementos de proliferación de NSC, 10 nanogramos/mililitro de EGF, 20 nanogramos/mililitro de FGF básico, y 1 miligramo/mililitro de Heparina (Stem Cell Technologies). Se agregó medio fresco cada 72 horas durante 2 semanas. Las neuroesferas primarias se recolectaron, se desaglomeraron mecánicamente hasta una sola suspensión celular, y se propagaron pasándolas en serie. Para generar las líneas celulares de glioma, las neuroesferas secundarias se disociaron hasta suspensiones celulares individuales, y se cultivaron en DMEM+ con suero fetal de becerro (FBS) al 10 % como una monocapa. Se derivaron múltiples líneas celulares de glioma a partir de ratones independientes, denotadas como GBM1-4 en la presente. Las células de glioma se infectaron con una construcción de pBabe-H2B-mCherry como se describe anteriormente (O. Florey y colaboradores, Nat Cell Biol 13, 1335 (2011)).

10 Aislamiento de macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs)

15 Para el aislamiento de médula ósea, seguido por la derivación de macrófagos, C57BL/6 WT, C57BL/6 β -actina-GFP o Nestin-Tv-a; los ratones *Ink4a/Arf*^{-/-} se anestesiaron con Avertin (Sigma), y entonces se sacrificaron por medio de dislocación cervical. Los fémures y las tibias se cosecharon bajo condiciones estériles a partir de ambas piernas y se inundaron. La médula se pasó a través de un cernidor de 40 micras, y se cultivó en bolsas de Teflon® de 30 mililitros (PermaLife PL-30) con 10 nanogramos/mililitro de CSF-1 de ratón recombinante (R&D Systems). Las células de médula ósea se cultivaron en bolsas de Teflon® durante 7 días, con medio que contenía CSF-1 fresco, reemplazando el medio viejo cada tercer día, con el objeto de inducir la diferenciación de los macrófagos.

20 Se adquirieron líneas celulares adicionales de glioma U-87 MG (HTB-14) y líneas celulares de microglía CRL-2467 en ATCC. La línea celular U-87 MG se cultivó en DMEM+ suero bovino fetal (FBS) al 10 %. La línea celular CRL-2467 se cultivó en DMEM+ suero bovino fetal (FBS) al 10 % con 30 nanogramos/mililitro de CSF-1 de ratón recombinante.

25 Experimentos del medio acondicionado con células de glioma (GCM). El medio que se había acondicionado mediante las líneas celulares tumorales de glioma en el medio sin suero durante 24 horas, se pasó a través de filtros de 0.22 micras para remover el desecho celular, y es referido en la presente como el medio acondicionado con células de glioma (GCM). El medio acondicionado con células de glioma (GCM) se utilizó para estimular los macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs) C57BL/6 WT o β -actina-GFP+ diferenciados. Los macrófagos de control recibieron el medio fresco que contenía suero bovino fetal (FBS) al 10 % y 10 nanogramos/mililitro de CSF-1 de ratón recombinante. Cuando fue indicado, los macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs) diferenciados se cultivaron en el medio acondicionado con células de glioma (GCM) que contenía cualquiera de DMSO como el vehículo, o bien BLZ945 67 nM, BLZ945 670 nM, o en el medio regular que contenía 10 nanogramos/mililitro de CSF-1 de ratón recombinante, y 10 nanogramos/mililitro de IL-4 (R&D Systems) durante 24 horas o 48 horas antes del análisis experimental.

35 Análisis de expresión de *Mrc1*/CD206 mediante citometría de flujo

Para los cultivos de glioma primario ratón (que contenían una población mixta de células tumorales, los TAM, los astrocitos etc.), se cultivaron 1×10^6 células en DMEM + FBS al 10 % en la presencia de BLZ945 o DMSO como el vehículo. Para los macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs), se cultivaron 1×10^6 células en DMEM complementado con CSF-1 de ratón recombinante o medio acondicionado con células de glioma (GCM) en la presencia de BLZ945 o DMSO como el vehículo. Después de 48 horas, las células se rasparon y se lavaron con regulador FACS. Las células se contaron y se incubaron con 1 microlitro de Fc Block (BD Pharmingen) por 10^6 células durante cuando menos 15 minutos a 4°C. Las células entonces se tiñeron con anticuerpos CD45 y CD11b durante 10 minutos a 4°C, y se lavaron con regulador FACS. Las células se fijaron y se permeabilizaron utilizando el kit BD Cytofix/Cytoperm^{MR} (BD Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Subsiguientemente, las células se tiñeron con anticuerpo anti-CD206. Para el análisis, las muestras se ejecutaron en un BD LSR II (Becton Dickstein), y se llevó a cabo toda la compensación y compuerta subsiguiente con el software de análisis FlowJo (TreeStar).

Análisis del ciclo celular:

Los macrófagos de control o previamente estimulados con el medio acondicionado con células de glioma (GCM) derivados a partir de ratones β -actina-GFP+ se co-cultivaron en una proporción de 1:1 con 1×10^5 células de glioma positivas para mCherry agotadas de suero (a partir de las líneas celulares derivadas anteriormente) durante 48 horas en la presencia de BLZ945 670 nM o DMSO como el vehículo. En seguida de la recolección de las células co-cultivadas tripsinizadas, los pozos se enjuagaron en medio adicional, y este volumen se recolectó para asegurar la cosecha de todos los macrófagos, los cuales se adhirieron estrechamente a los platos de cultivo celular. Las muestras se lavaron entonces una vez con regulador FACS, seguido por incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente en el regulador de permeabilización (PIPES 10 mM, NaCl 0.1 M, MgCl₂ 2 mM, Triton X-100 al 0.1 %, pH de 6.8) que contenía 0.1 miligramos de DAPI (Invitrogen). Después de la adquisición en un citómetro de flujo LSR II (BD), utilizando un dispositivo de láser UV (de 350 a 360 nanómetros), se analizó el estado del ciclo celular de las células tumorales de glioma utilizando el programa Flow Jo Dean-Jett-Fox para el análisis del ciclo celular.

Ensayos de proliferación

La velocidad del crecimiento celular se determinó utilizando el kit de proliferación celular MTT (Roche). Dicho de una manera breve, las células se emplacaron por triplicado en placas de 96 pozos (1×10^3 células/pozo para las líneas celulares de glioma y 5×10^3 células/pozo para las células de macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs) y CRL-2467), en la presencia o en ausencia de 6.7 a 6700 nM de BLZ945. El medio se cambió cada 48 horas. Las células de macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs) y CRL-2467 se complementaron con 10 nanogramos/mililitro y 30 nanogramos/ mililitro de CSF-1 de ratón recombinante, respectivamente, a menos que se indique de otra manera. Se agregaron 10 microlitros de reactivo marcador MTT a cada pozo, y entonces se incubaron durante 4 horas a 37°C, seguido por la adición de 100 microlitros de reactivo de solubilización MTT durante la noche. La mezcla se volvió a suspender suavemente, y se midió la absorbencia a 595 nanómetros y a 750 nanómetros en un lector de placas SpectraMax 340pc (Molecular Devices).

Ensayo de formación de neuroesferas secundarias

Las neuroesferas primarias se desaglomeraron hasta una sola suspensión celular y se emplacaron 5×10^3 células en una placa de 6 pozos en el medio de neuroesferas, en la presencia de BLZ945 o DMSO como el vehículo. El medio se cambió cada 48 horas. La formación de neuroesferas secundarias se ensayó contando el número de neuroesferas obtenidas después de 2 semanas.

Aislamiento de ARN, síntesis de ADNc, y PCR cuantitativa en tiempo real

El ARN se aisló con Trizol, se trató con DNase, y se utilizaron 0.5 microgramos de ARN para la síntesis del ADNc. Se utilizaron sondas Taqman (Applied Biosystems) para Cd11b (Mm0043 4455_m1), Cd68 (Mm03047343_m1), Csf-1 (Mm00432688_m1), Csf-1r (Mm00432689_m1), Il34 (Mm00712774_m1), Mrc1 (Mm004851 48_m1), y Tv-a (a la medida), para la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). Los ensayos se ejecutaron por triplicado, y la expresión se normalizó con ubiquitina C (Mm012012 37_m1) para cada muestra.

Microarreglos y perfilación de expresión genética

Todas las muestras se prepararon y se procesaron mediante la instalación del núcleo genómico en MSKCC. El ARN se aisló utilizando Trizol, y la calidad se evaluó ejecutándose en un Bioanalizador Agilent. 75 nanogramos del ARN total se transcribieron inversamente y se marcaron utilizando el Kit de Expresión Genechip 3' IVT (Affymetrix). El ADNc resultante se hibridó en los chips Affymetrix MOE 430A 2.0. Los datos de expresión brutos se analizaron utilizando GCOS 1.4 (Affymetrix). Los datos se normalizaron a una intensidad objetivo de 500 para tomar en cuenta las diferencias en la intensidad global del chip.

Análisis de microarreglos:

Todos los análisis bioinformáticos se realizaron en R utilizando la Suite de paquetes Bioconductor. Se generaron los valores de expresión Promedio de Multi-Arreglo Robusto (RMA) utilizando el paquete 'affy', y se utilizó el cuantil normalizado (R. A. Irizarry y colaboradores, *Nucleic Acids Res* 31, e15 (2003); L. Gautier y colaboradores, *Bioinformatics* 20, 307 (2004). El paquete "lima" (G. K. Smyth, *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* 3, Artículo 3 (2004)), para identificar los genes diferencialmente expresados entre las muestras tratadas con vehículo y con BLZ945. La expresión diferencial se consideró significativa en un valor de veces de cambio de +/-2 con un índice de descubrimiento falso del 10 %. Se utilizó el análisis de enriquecimiento del conjunto de genes (GSEA) como se describió anteriormente (15). Para el siguiente análisis y la comparación con los conjuntos de datos humanos, los valores de expresión de ratón se centraron en la media a través de todas las muestras.

Método de regresión de Lasso para la identificación de la firma genética

Los datos de expresión de ratón se normalizaron y se centraron en la media como se describe anteriormente. Se utilizaron los genes diferencialmente expresados para el análisis adicional. Se introdujo un modelo de regresión de Lasso para diferenciar entre las muestras tratadas con vehículo y con BLZ945, utilizando el paquete 'glmnet' (J. Friedman y colaboradores, *Journal of Statistical Software* 33, 1 (2010)). El parámetro de regularización para la regresión de Lasso se seleccionó mediante validación cruzada 4 veces.

Conjuntos de datos de pacientes

Los datos de expresión del TCGA se descargaron desde el portal de datos del TCGA, y todos los datos clínicos se descargaron desde el portal de datos <<http://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/tcgaHome2.jsp>>. Los datos clínicos y de expresión para el conjunto de datos Rembrandt se descargaron desde <<https://caintegrator.nci.nih.gov/rembrandt/>>. Los conjuntos de datos Freije (GSE4412), Murat (GSE7696), y Phillips (GSE4271) se descargaron a partir del NCBI <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>>. Para los conjuntos de datos Freije, solamente se consideraron las muestras que se ejecutaron en la plataforma HGU133A, debido a que las muestras de la plataforma HGU133B contenían un traslape mínimo con los conjuntos de datos restantes. Cada conjunto de datos se importó por separado utilizando el paquete 'Affy', y se generaron los valores de expresión de RMA. Todos los conjuntos de datos fueron de cuantil normalizado, y cada gen se centró en la media a través de todos los pacientes.

Subtipificación de pacientes no del TCGA

Con el fin de investigar las diferencias de sobrevivencia específica de los subtipos en todos los conjuntos de datos públicamente disponibles, se utilizó un clasificador de subtipos descrito anteriormente (R. G. Verhaak y colaboradores, *Cancer Cell* 17, 98 (2010)) para introducir una máquina de vector de soporte (SVM). Se utilizaron los 840 genes utilizados por Verhaak y colaboradores para el análisis ClacNc para subclasificar el conjunto de datos. Subsiguientemente, los conjuntos de datos se subclasificaron para los genes que estaban presentes a través de todos los conjuntos de datos de los pacientes descritos anteriormente. Los 776 genes restantes se utilizaron para introducir una SVM de múltiples clases sobre las muestras de núcleos a partir del conjunto de datos del TCGA. La SVM se completó utilizando una función kernel de base radial Gaussiana utilizando el paquete 'kernlab' (A. Karatzoglou y colaboradores, *J. Statistical Software*, 11, 9 (2004)). Entonces esta SVM se utilizó para predecir el subtipo del resto de los pacientes del TCGA y conjuntos de datos públicos.

Clasificación de pacientes

Se introdujo una SVM en los datos de expresión de ratón con el fin de clasificar a los pacientes en la clasificación de "Vehículo" o en la clasificación de "BLZ945". Los datos de expresión de pacientes se subclasificaron para los genes comunes a través de todos los conjuntos de datos y los genes que tienen homólogos de ratón conocidos. De una manera similar, los datos de expresión de ratón se subclasificaron para los genes con homólogos humanos que eran comunes a través de todas las muestras de pacientes. Subsiguientemente, los datos de ratón se subclasificaron para los genes diferencialmente expresados identificados utilizando el paquete 'limma'. Los datos humanos se subclasificaron para los homólogos humanos de estos genes diferencialmente expresados. Esto condujo a una reducción de características desde 257 genes diferencialmente expresados hasta 206 genes diferencialmente expresados con los homólogos humanos conocidos a través de todos los conjuntos de datos de pacientes. Entonces se utilizó el paquete 'kernlab' para introducir una SVM en los datos de expresión de ratón utilizando una función kernel de vainilla. Entonces se utilizó esta SVM para predecir a los pacientes para ya sea el clasificador de "Vehículo" o bien el clasificador de "BLZ945".

Se empleó un planteamiento similar con el fin de clasificar a los pacientes con un modelo de regresión de Lasso. La subclasificación de los datos de pacientes y de ratón fue idéntica a aquella descrita anteriormente. En lugar de utilizar el paquete 'kernlab', el modelo de regresión de Lasso se introdujo utilizando el paquete 'glmnet'. Este modelo se utilizó entonces para predecir la clasificación de pacientes ya sea en el clasificador de "Vehículo" o bien en el clasificador de "BLZ945". El estado de paciente G-CIMP se determinó mediante la

agrupación jerárquica de los datos de metilación de los pacientes (H. Noushmehr y colaboradores, Cancer Cell 17, 510 (2010)) como se describe a continuación.

Estratificación de los pacientes por estado de G-CIMP

- 5 Experimentalmente, parece ser que la ventaja de supervivencia ofrecida por la firma de tratamiento con “BLZ945” no se debió a un enriquecimiento de los pacientes con el Fenotipo Metilador de Isla CpG de Glioma (GCIMP), los cuales han demostrado anteriormente que están asociados con una mayor supervivencia global (Noushmehr). De los 453 glioblastomas multiformes (GBMs) analizados a partir del conjunto de datos del TCGA, 263 también tuvieron datos de metilación genómica, y se clasificaron en los grupos de metilación como se describe anteriormente. De los 21 pacientes con el G-CIMP, 20 (95 %) se clasificaron en la clasificación de “BLZ945”, lo cual muestra un fuerte enriquecimiento de las muestras de BLZ945 en los pacientes con el G-CIMP. A pesar de este enriquecimiento, el análisis de supervivencia de los pacientes pro-neurales que se sabía que eran negativos para GCIMP (67/133 en total de pacientes pro-neurales) reveló que el grupo de la clasificación de “BLZ945” mostró un aumento en la supervivencia de aproximadamente 10.8 meses ($P = 0.014$).
- 10
- 15 Más aún, los modelos de riesgo proporcional cox demostraron que el aumento en la supervivencia mostrado por la clasificación de “BLZ945” no era dependiente de los pacientes con el G-CIMP. La proporción de riesgo asociada con la firma de BLZ945 fue significativa en los pacientes con y sin G-CIMP. También, la proporción de riesgo para el estrato de G-CIMP no fue significativa cuando la firma de BLZ945 también se consideraba en un modelo mixto. Por consiguiente, aunque los pacientes con el G-CIMP se enriquecen claramente para las muestras de clasificación “BLZ945” simulada, el beneficio de supervivencia ofrecido por esta clasificación no es dependiente del estado del G-CIMP.
- 20

Análisis de supervivencia:

- El análisis de supervivencia se realizó utilizando el paquete de ‘supervivencia’ en R (T. Therneau, en el paquete R versión 2.36-12. (2012)). Las proporciones de riesgo se determinaron utilizando la función ‘coxph’ del paquete de ‘supervivencia’. Los pacientes se estratificaron basándose en la probabilidad del modelo de clasificación de regresión de Lasso, el estado de G-CIMP, o ambos, como se indica. Los valores P se generaron utilizando la prueba de Wald.
- 25

Gráficas para análisis de pacientes

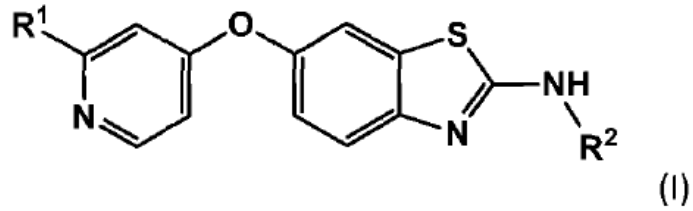
- Todas las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, los mapas de calor, y las gráficas de volcán se generaron en R versión 2.14.1 utilizando el paquete ‘gplots’ (G. R. Warnes y colaboradores, paquete R versión 2.10.1, (2011)). Las gráficas forestales de proporción de riesgo se generaron en GraphPad Prism Pro5.
- 30

Presentación de datos y análisis estadístico

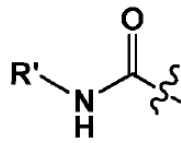
- Los datos se presentan como promedios con su respectivo error estándar (SEM) o como gráficas de dispersión estadística utilizando GraphPad Prism Pro5. Los datos numéricos se analizaron mediante la prueba t de Student de dos colas no emparejadas, a menos que se observe de otra manera. Para las curvas de supervivencia, los valores P se obtuvieron utilizando la prueba Log Rank (Mantel-Cox), y se utilizó la prueba exacta de Fisher para la calificación histológica del tumor. $P = 0.05$ se consideró como estadísticamente significativo.
- 35

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula (I):



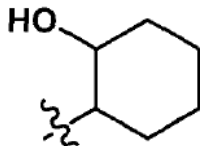
en donde R¹ es



5

en donde R' es Me o Et; y

R² es

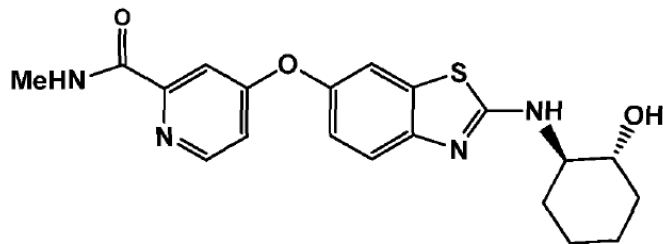


;

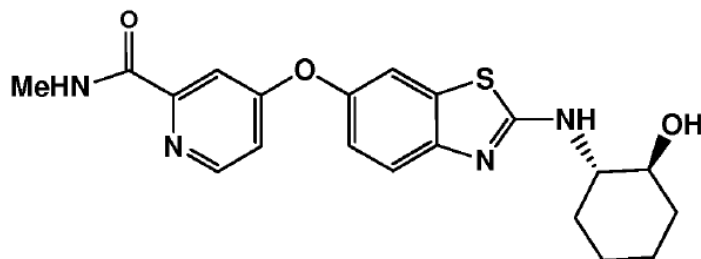
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

10 para uso en el tratamiento de un tumor de cerebro en un sujeto mamífero.

2. Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto de Fórmula (I) es:



15 3. Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto de Fórmula (I) es:



4. Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el tumor de cerebro es un glioma.
5. Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el glioma es glioblastoma multiforme.
6. Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el tumor de cerebro es una metástasis de cerebro, astrocitoma (incluyendo glioblastoma), oligodendroglioma, ependimomas, o un glioma mixto.
7. Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, cuando el compuesto se formula para su uso con un agente coterapéutico
8. Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el agente coterapéutico se selecciona de un agente anti-angiogénico, bevacizumab con o sin irinotecano, nitrosoureas tales como Carmustina (BCNU), platinas, tales como cis-platino (cisplatina), agentes alquilantes, tales como temozolomida, inhibidores de cinasa de tirosina (gefitinib o erlotinib), Ucráina, y cannabinoides.

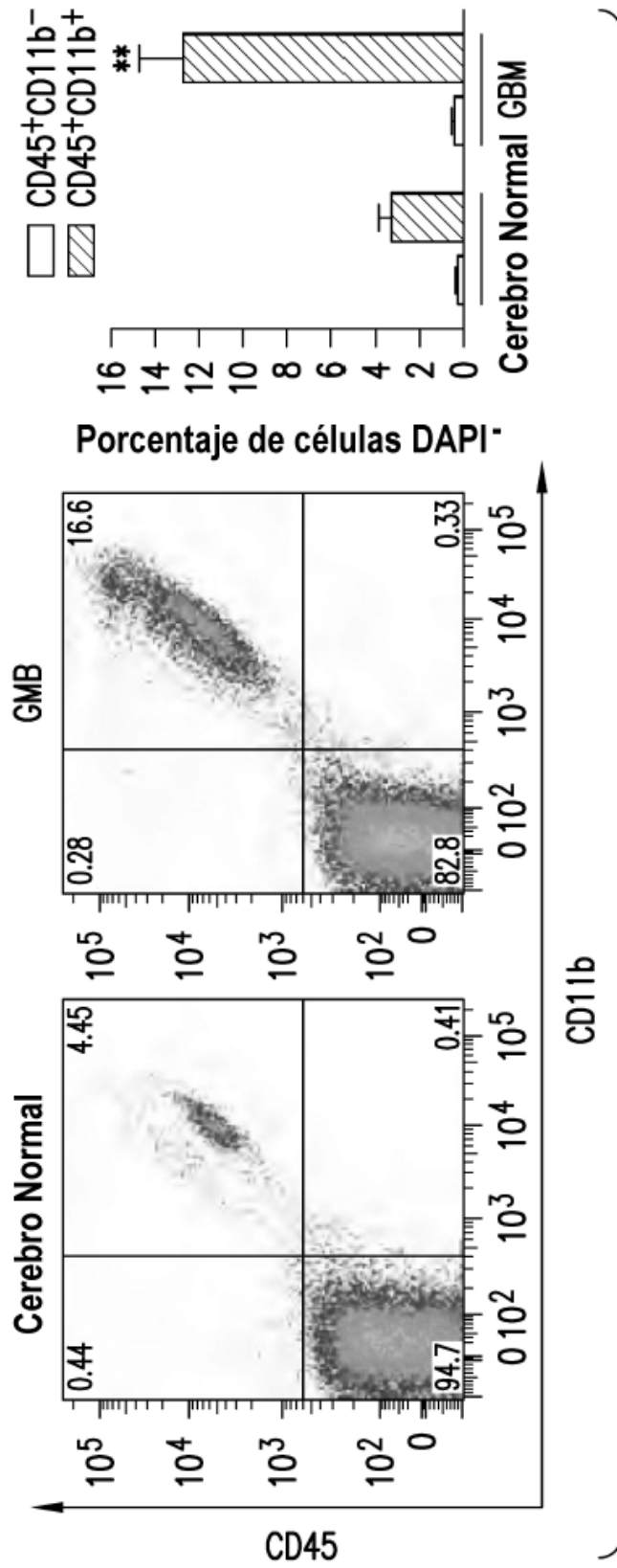


FIG.1A

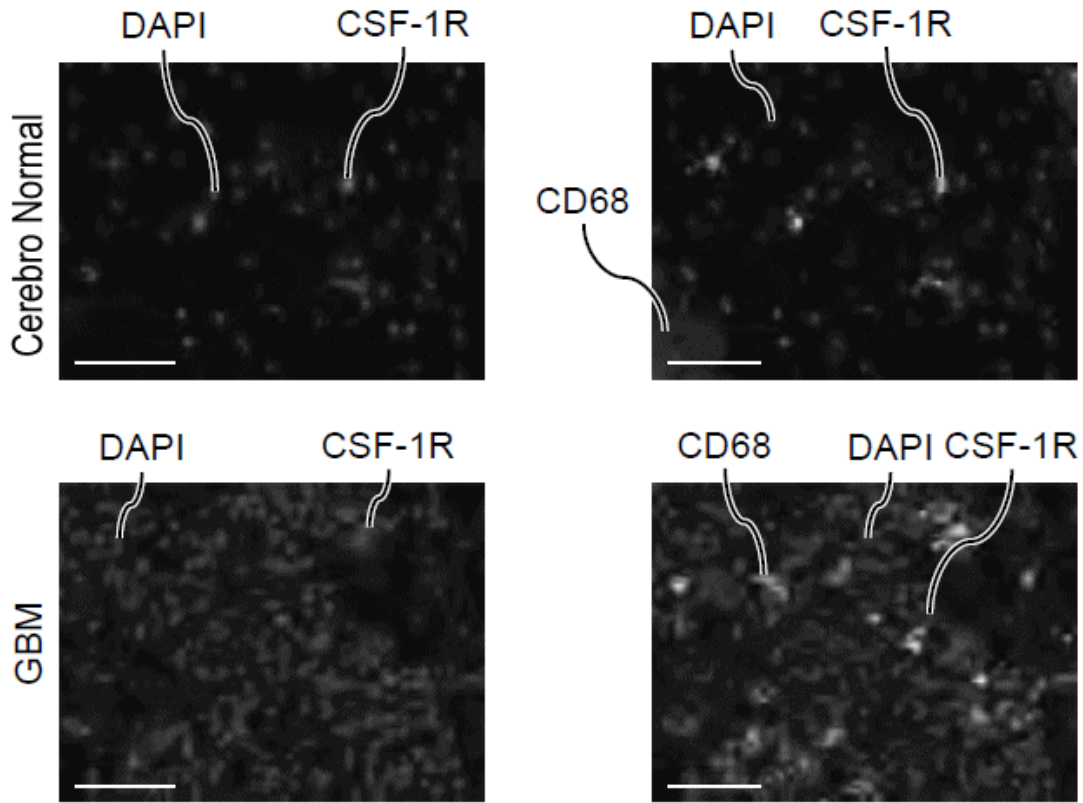


FIG.1 B

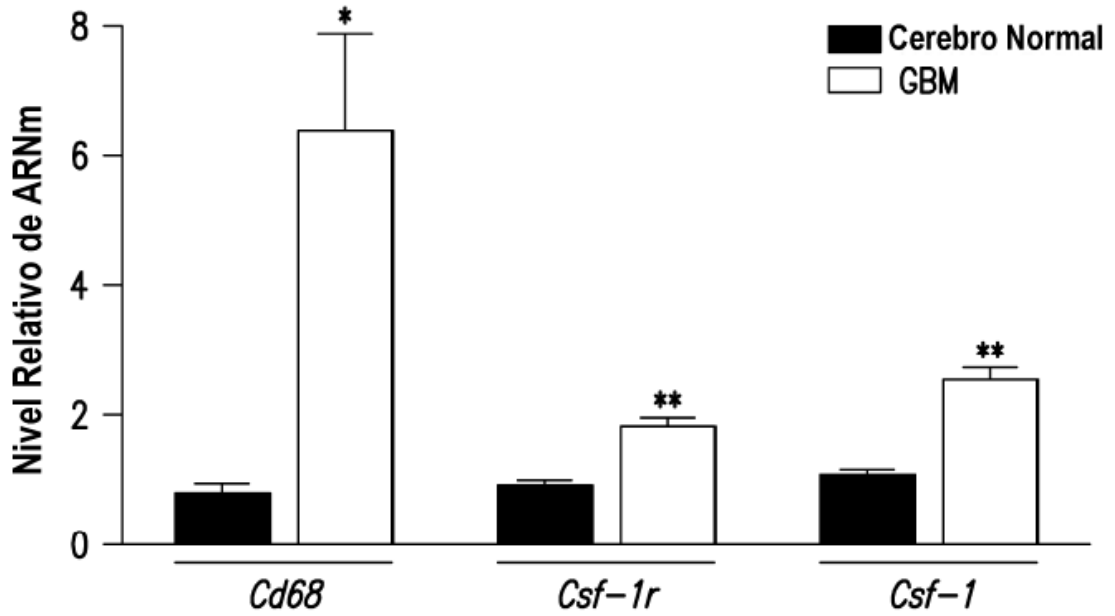


FIG.1 C

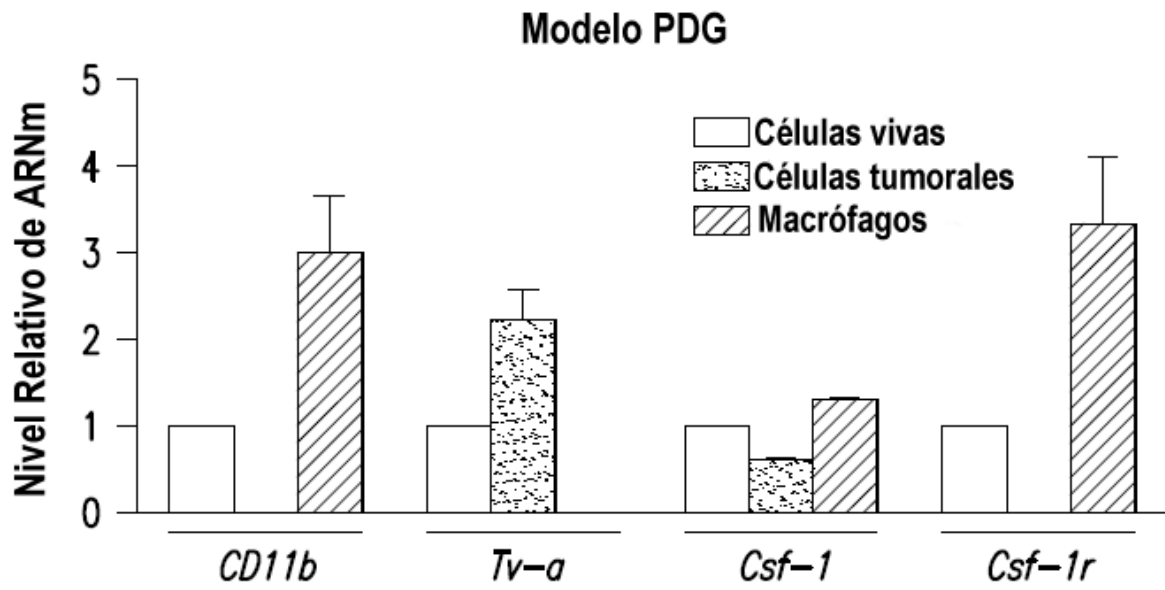


FIG.1D

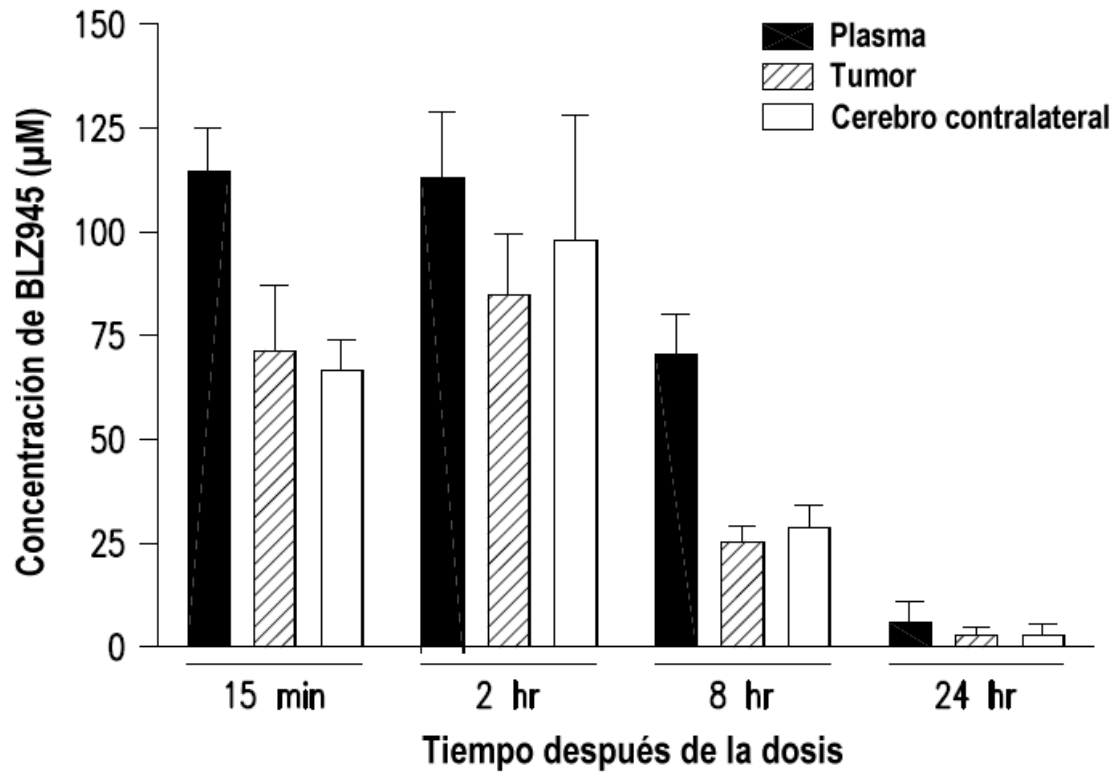


FIG.2

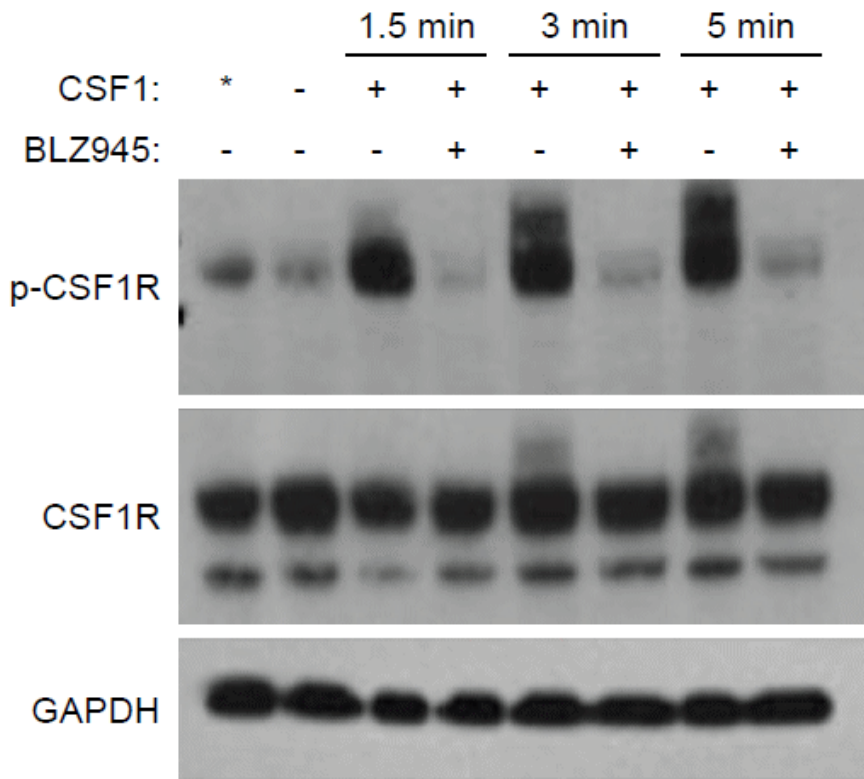


FIG.3A

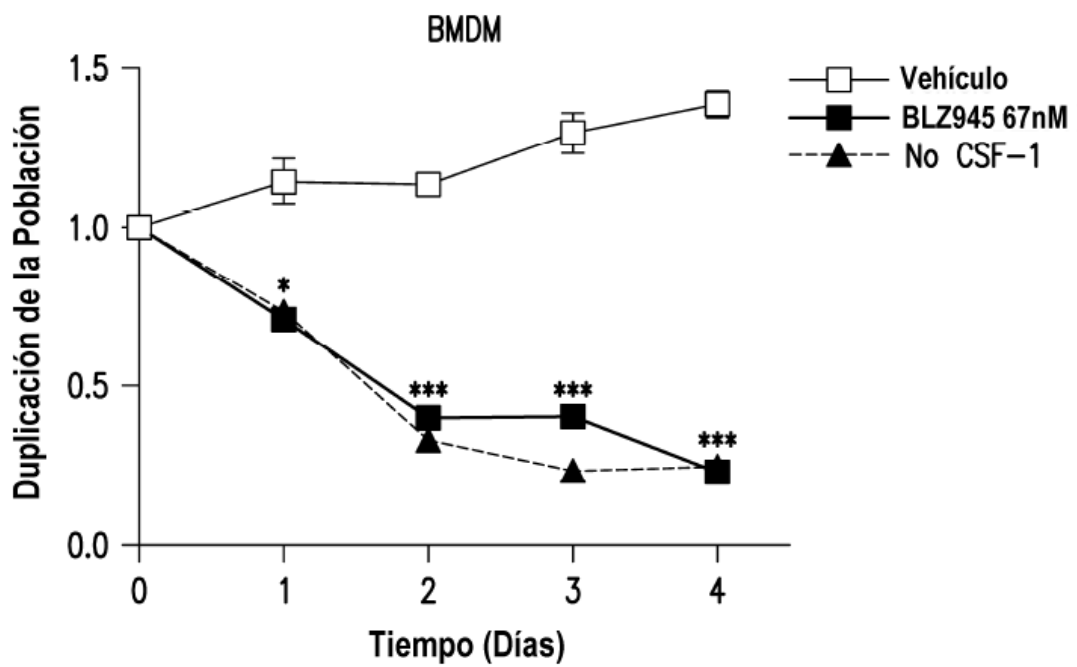


FIG.3B

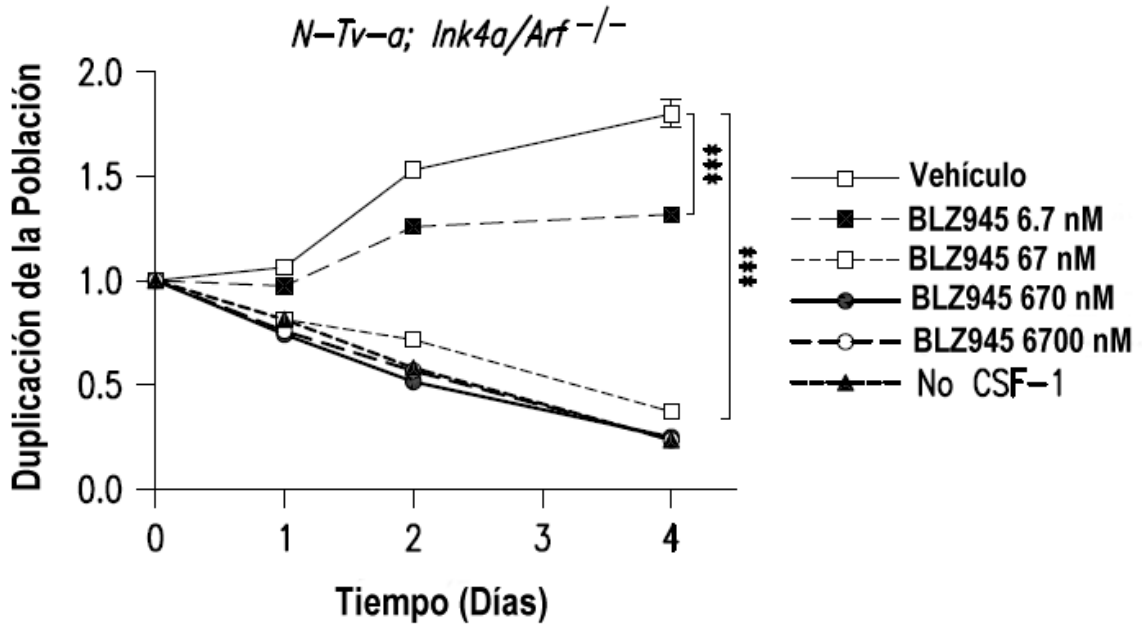


FIG.3C

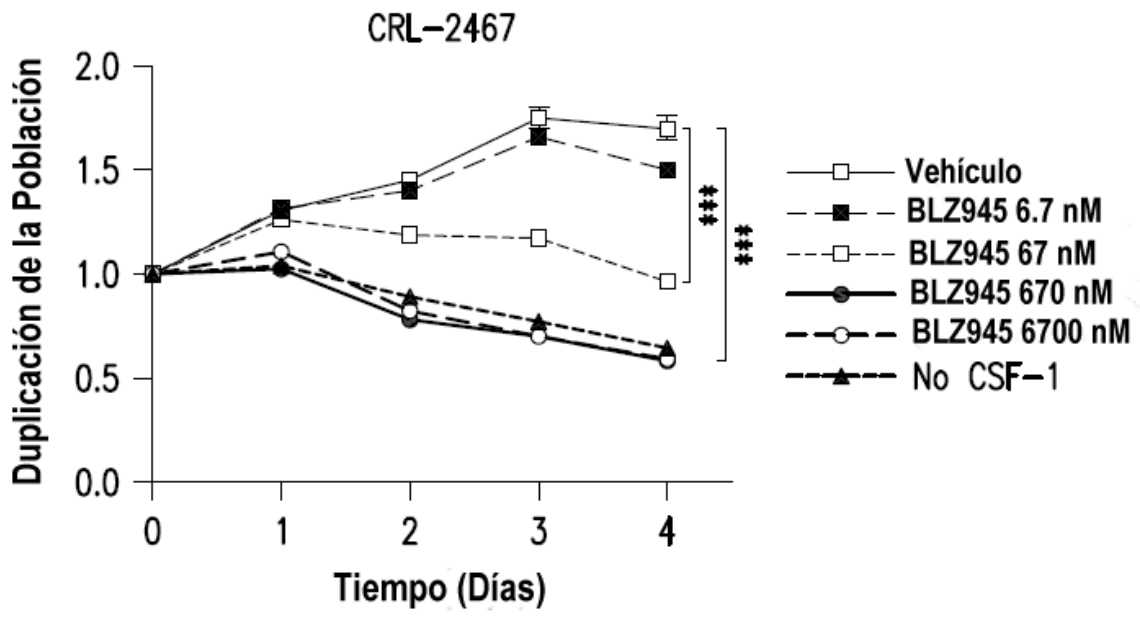


FIG.3D

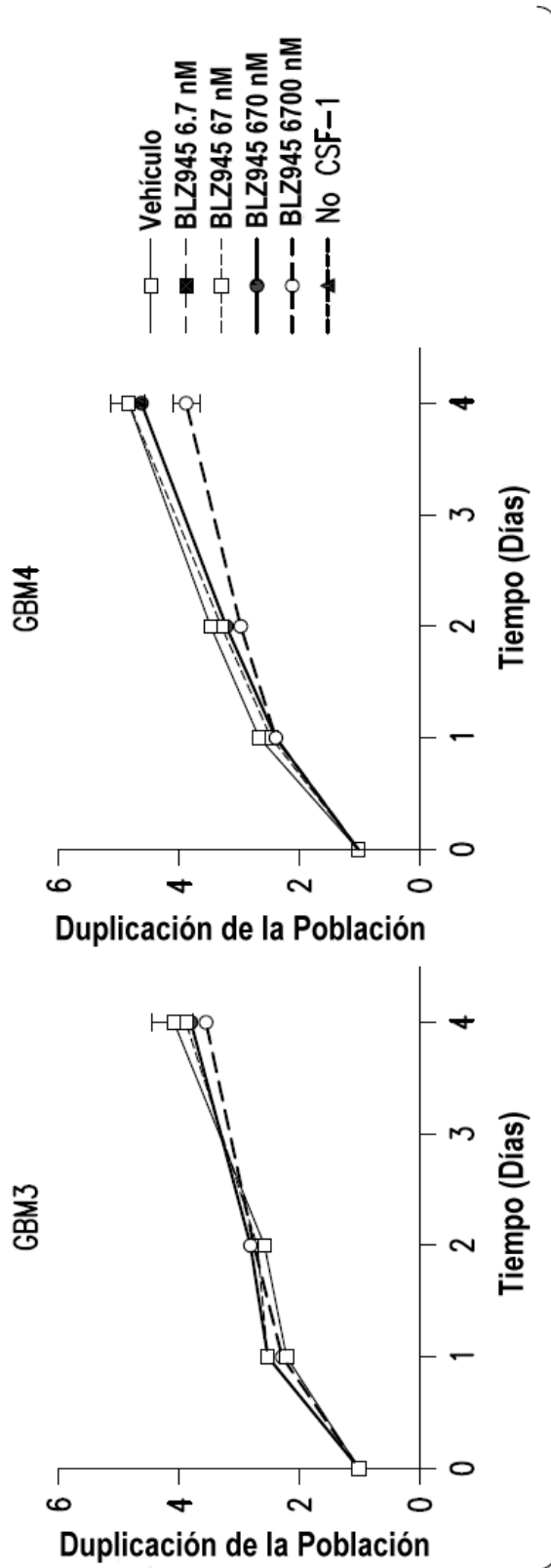


FIG.3E

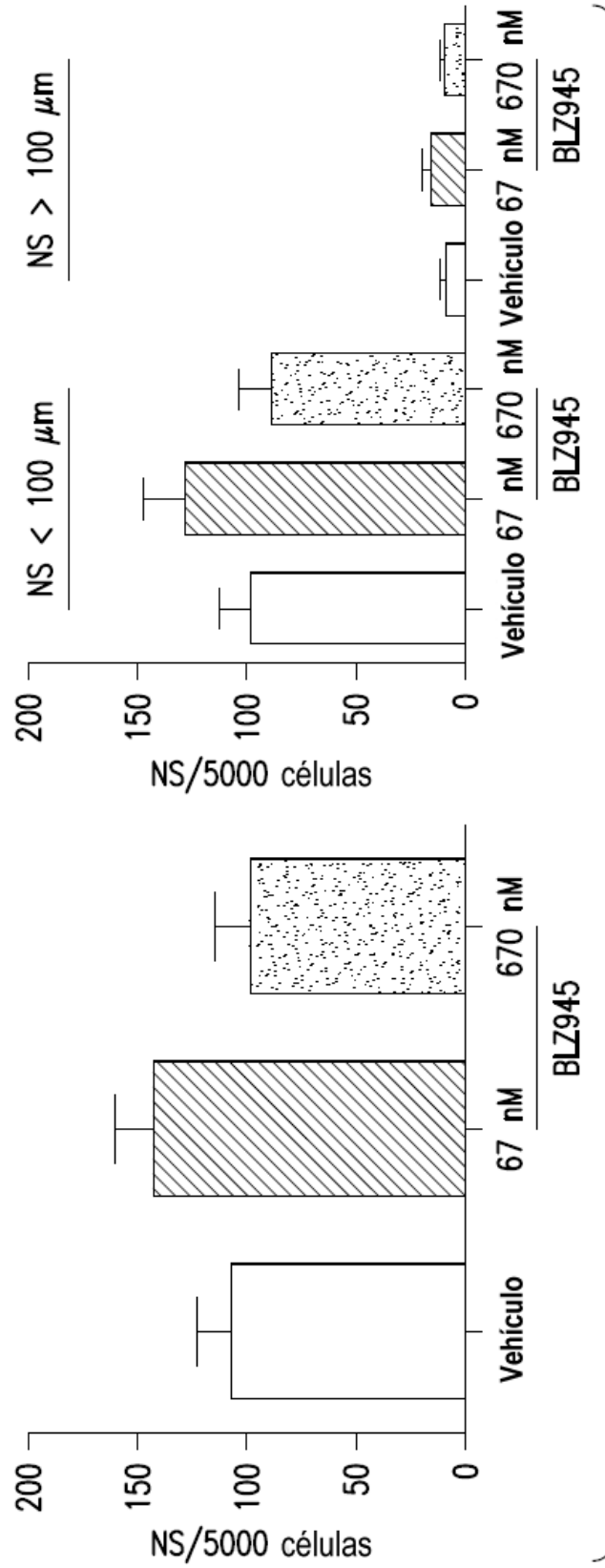


FIG.3F

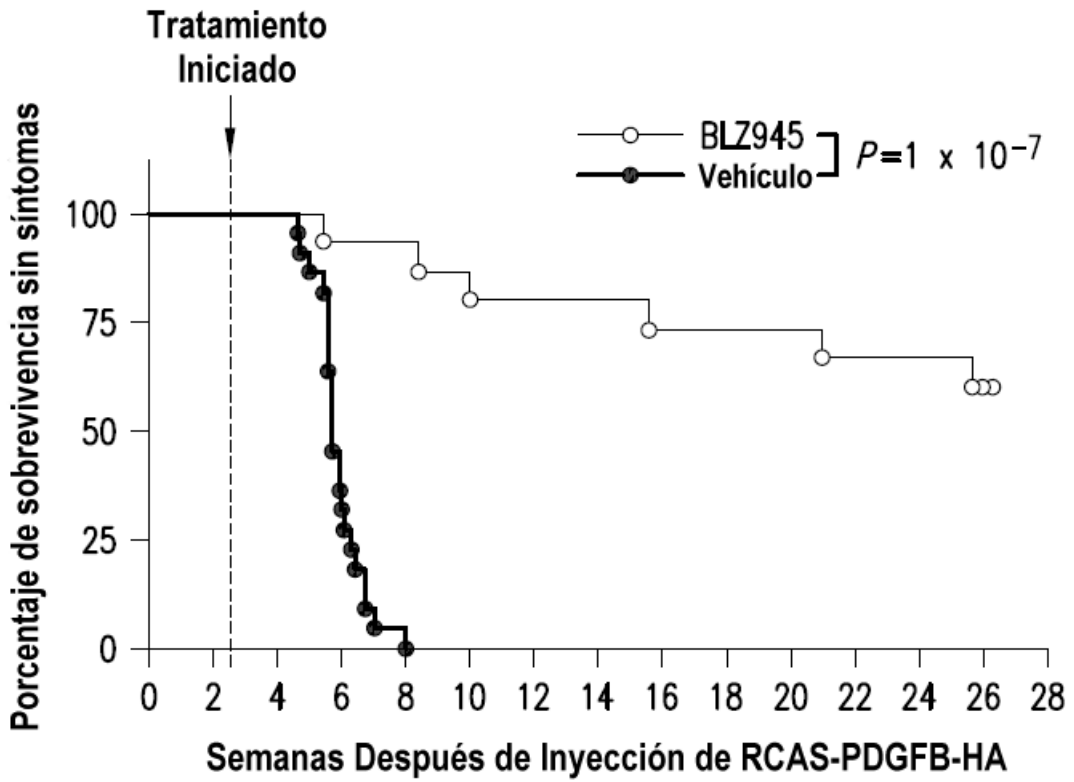


FIG.4A

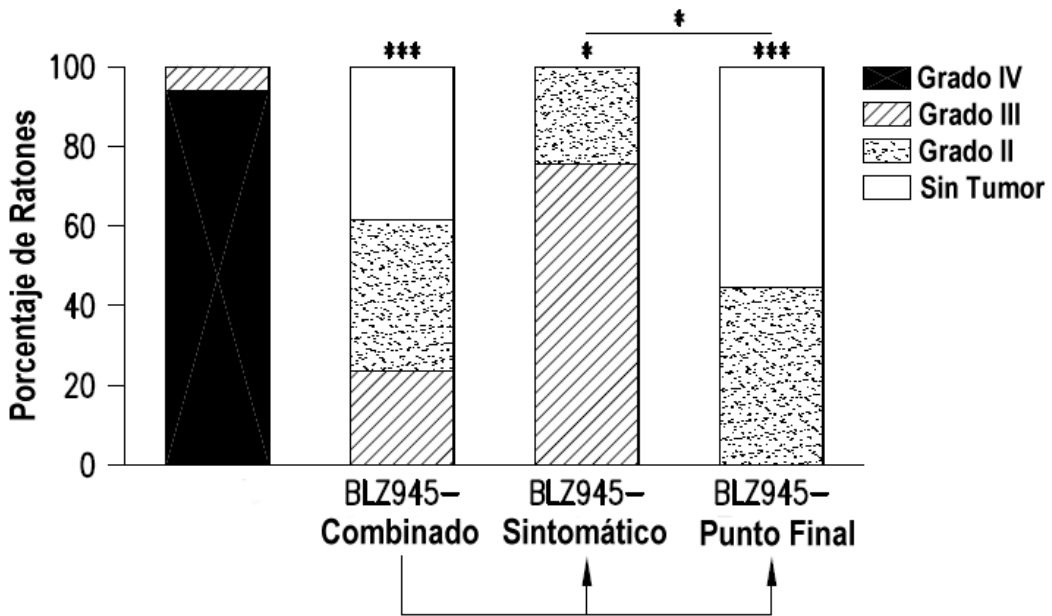


FIG.4B

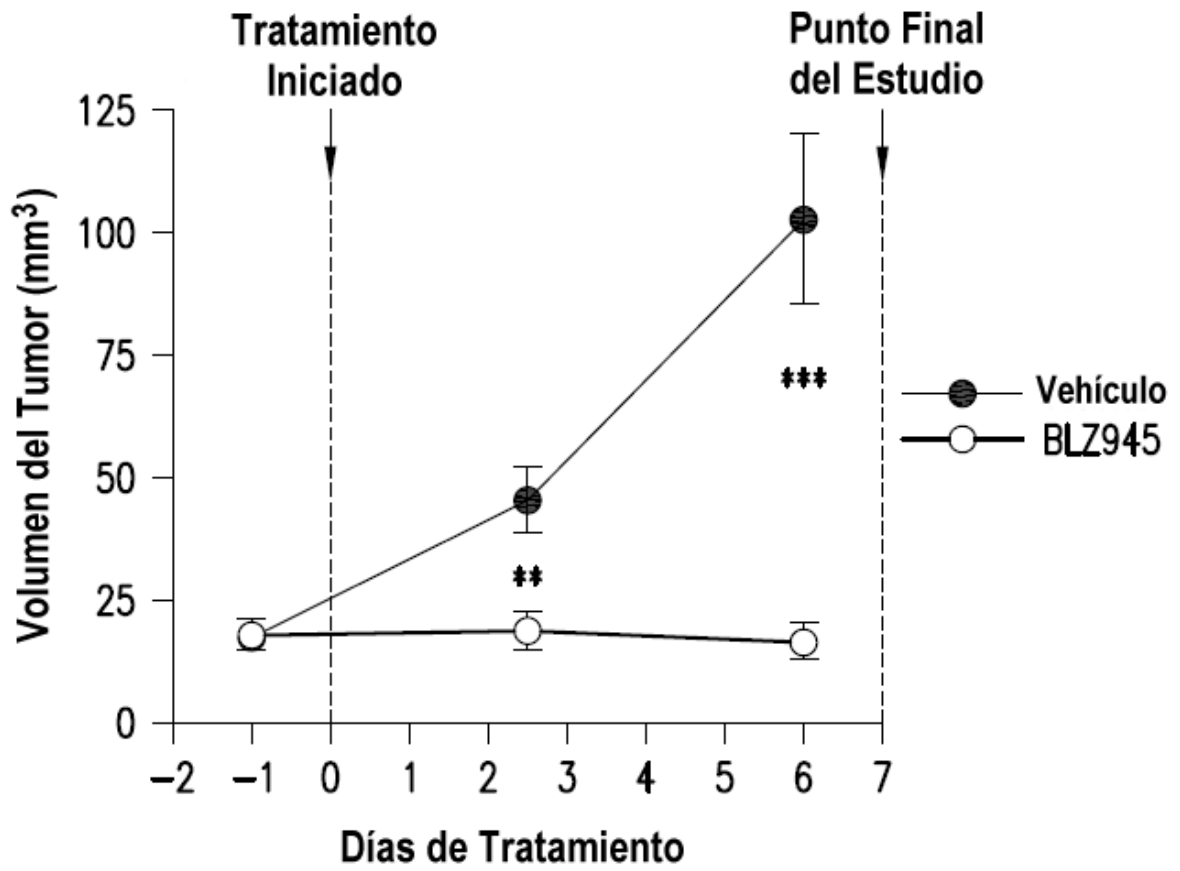


FIG.5A

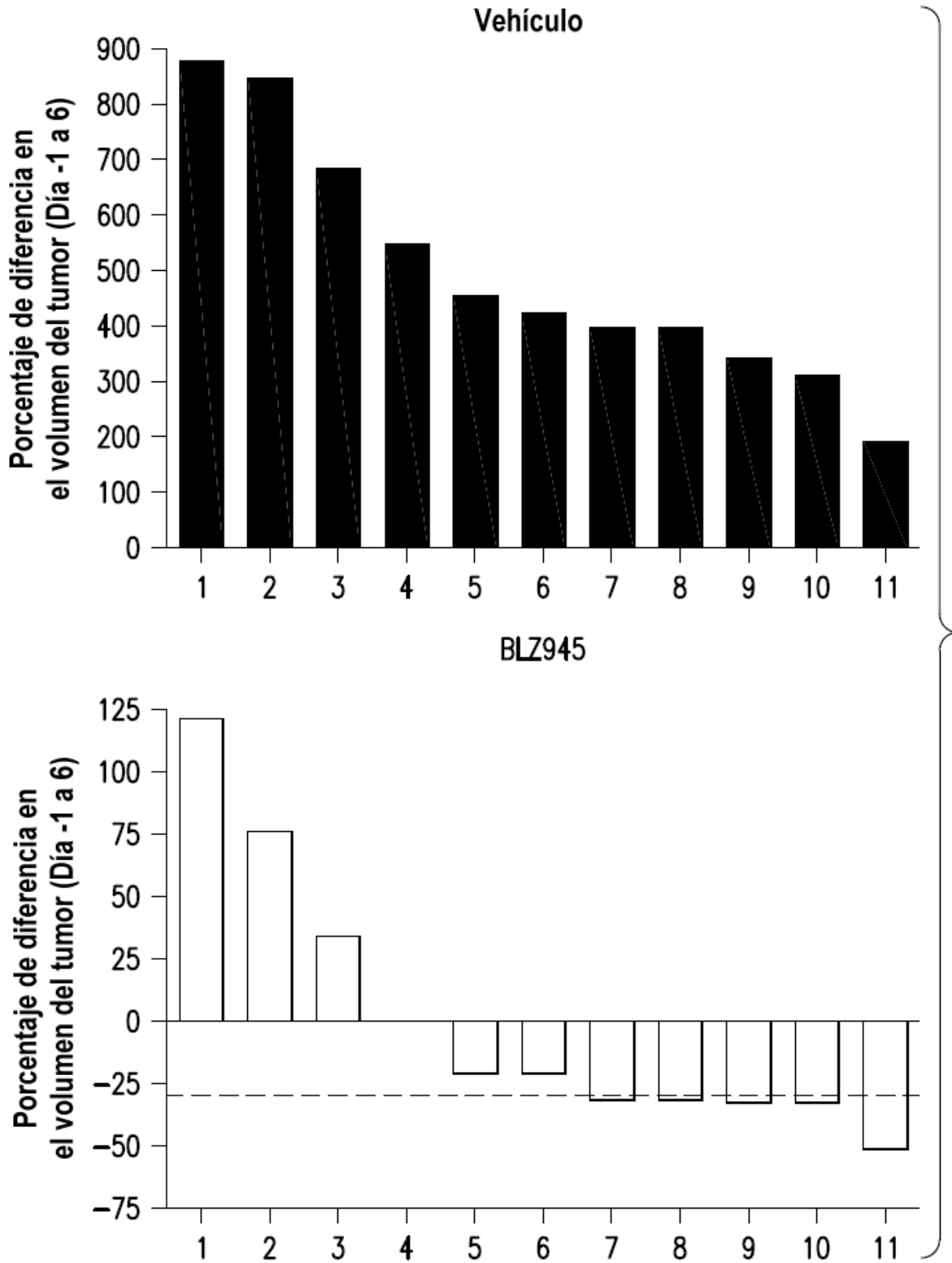


FIG.5B

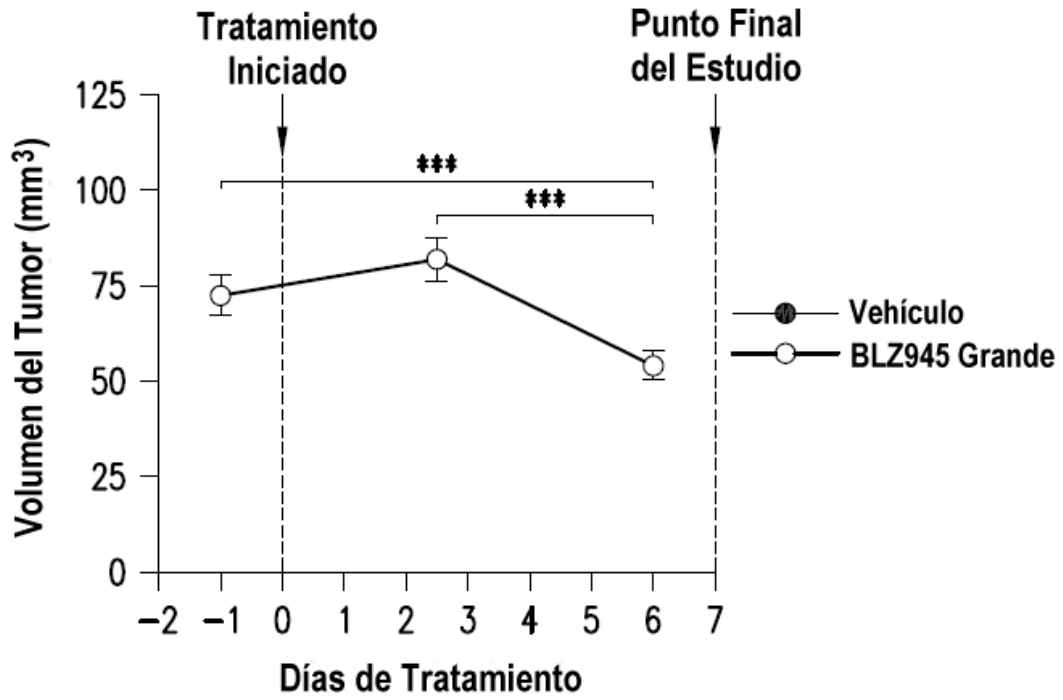


FIG.5C

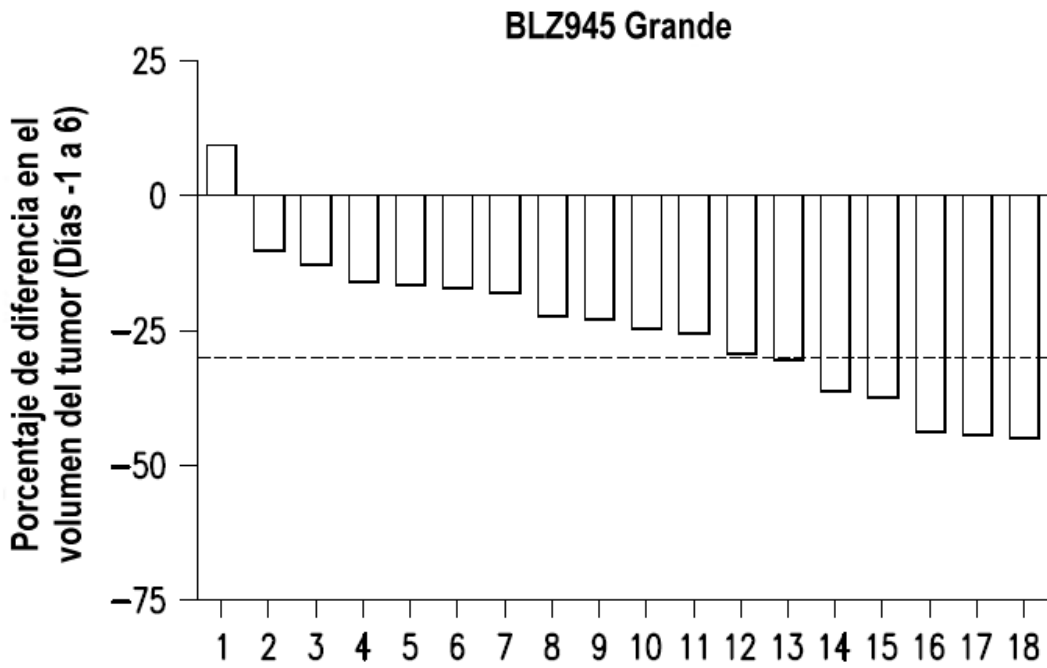


FIG.5D

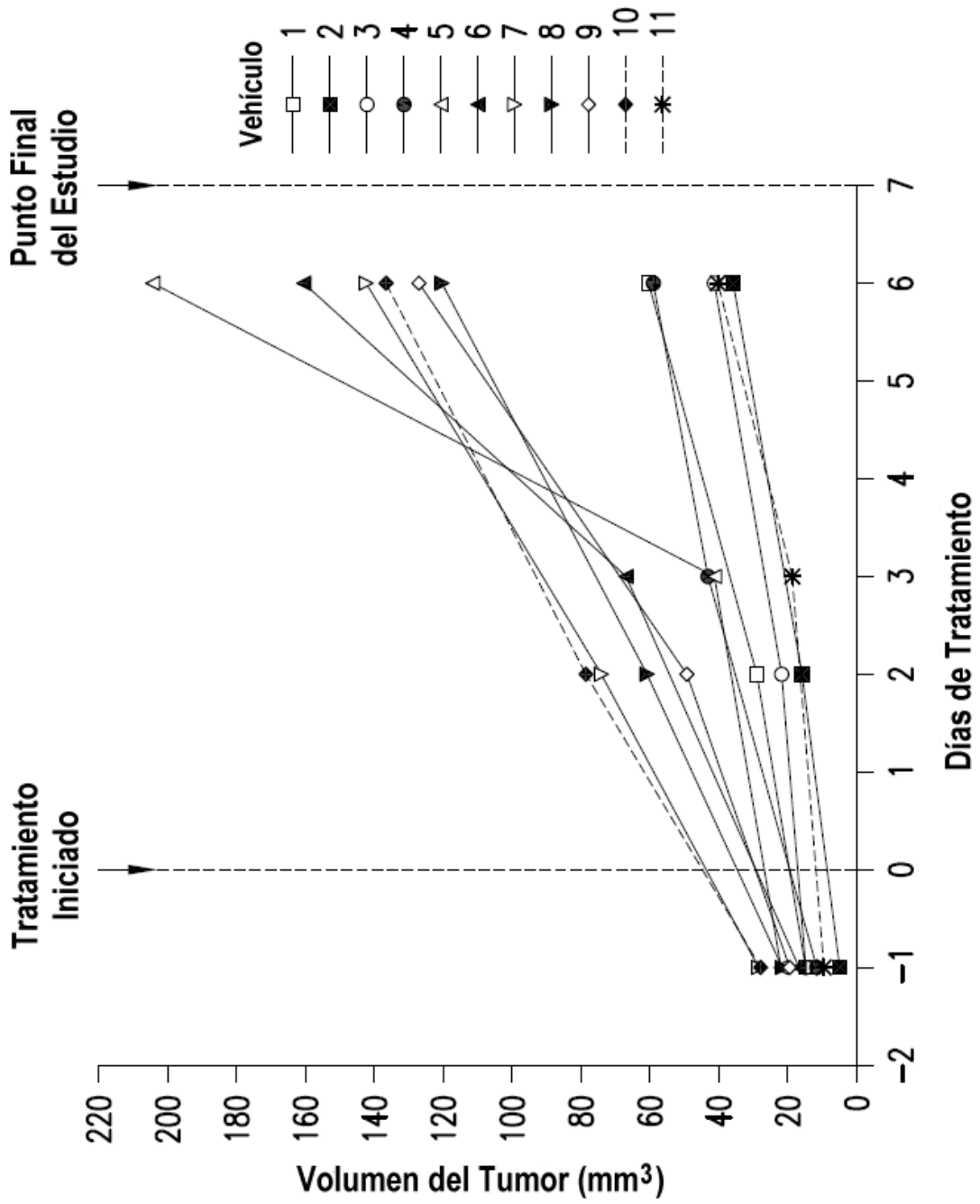


FIG.5-2A

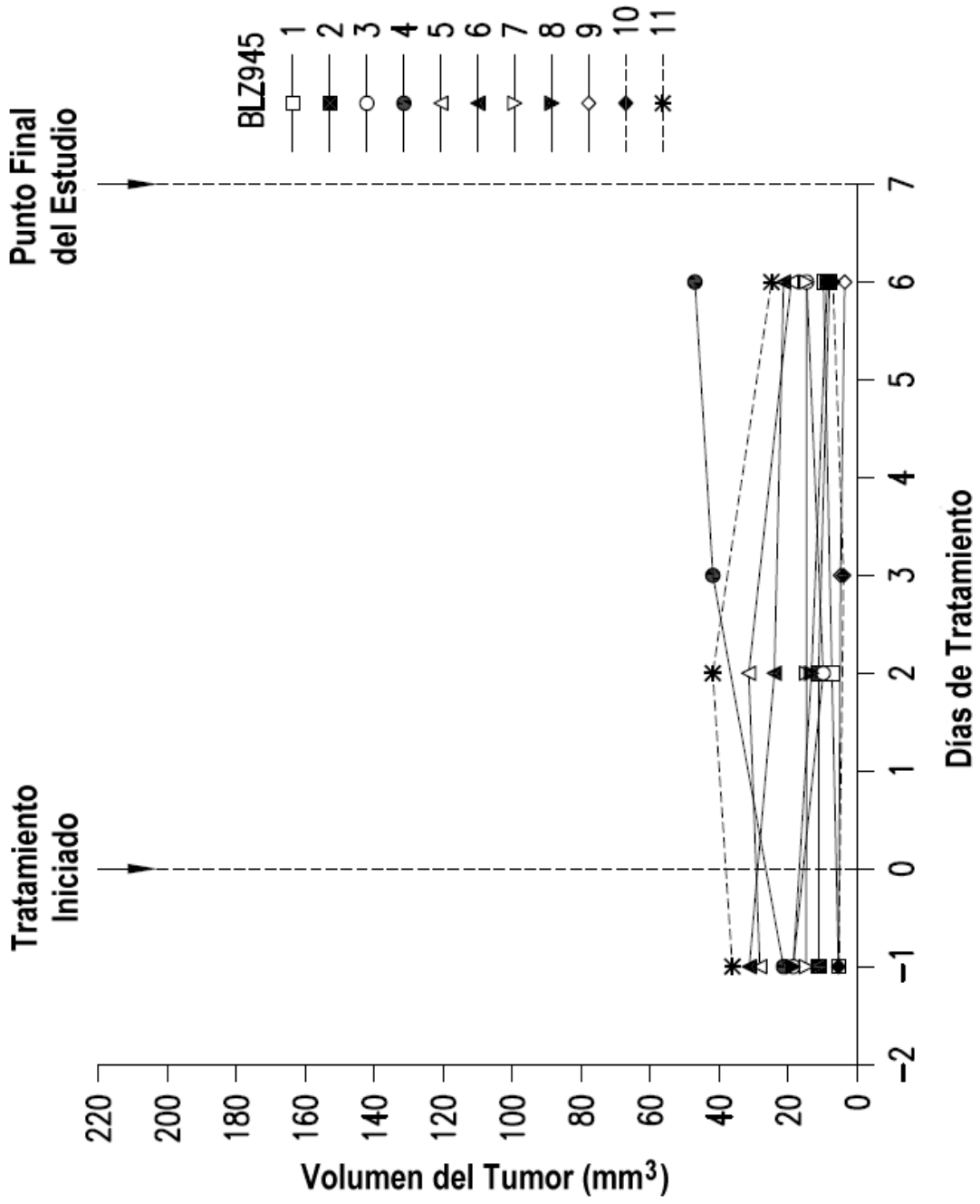


FIG.5-2B

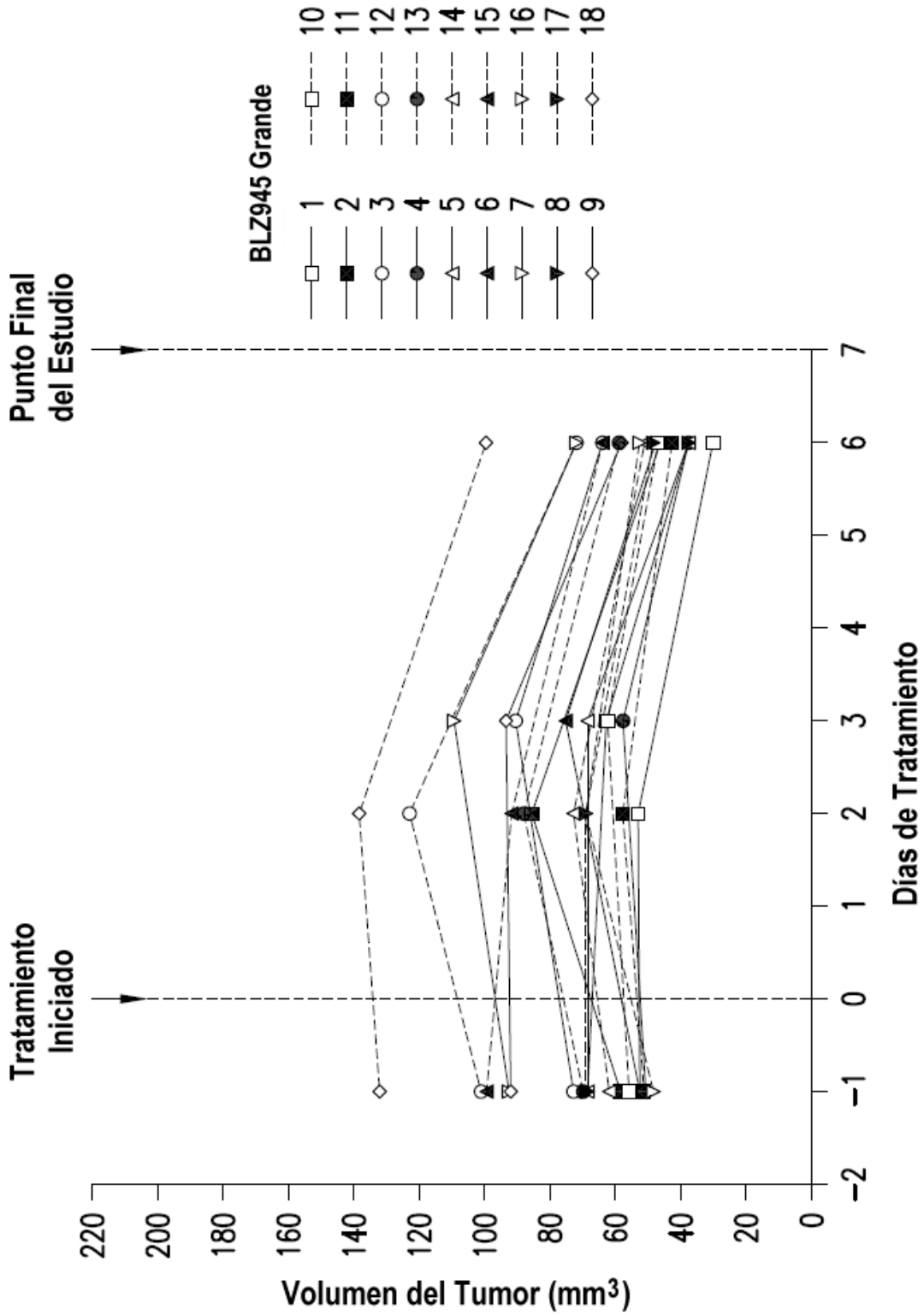


FIG.5-2C

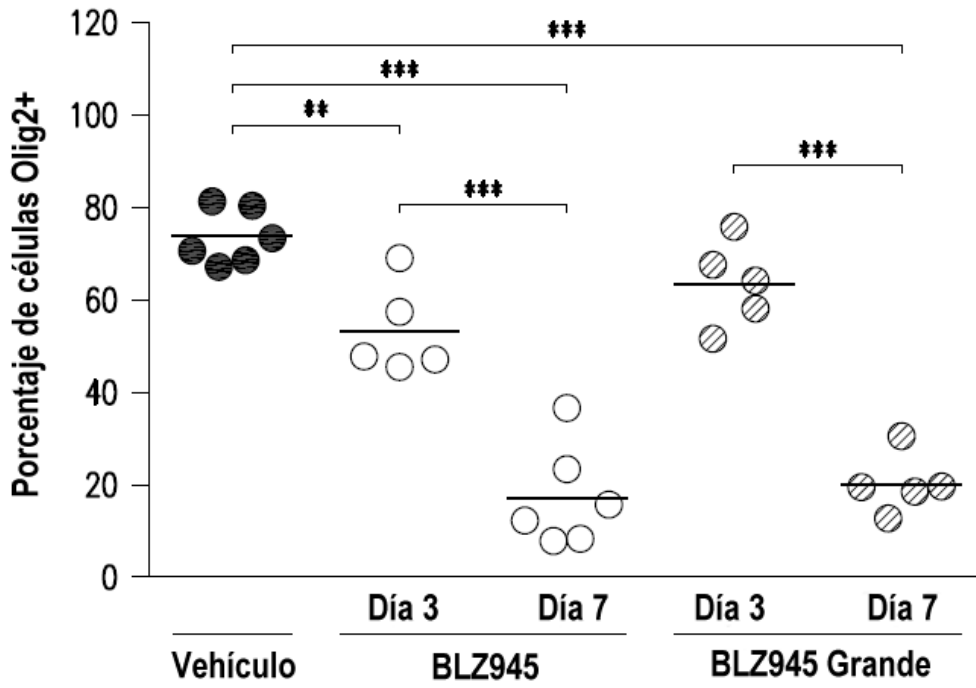


FIG. 6A

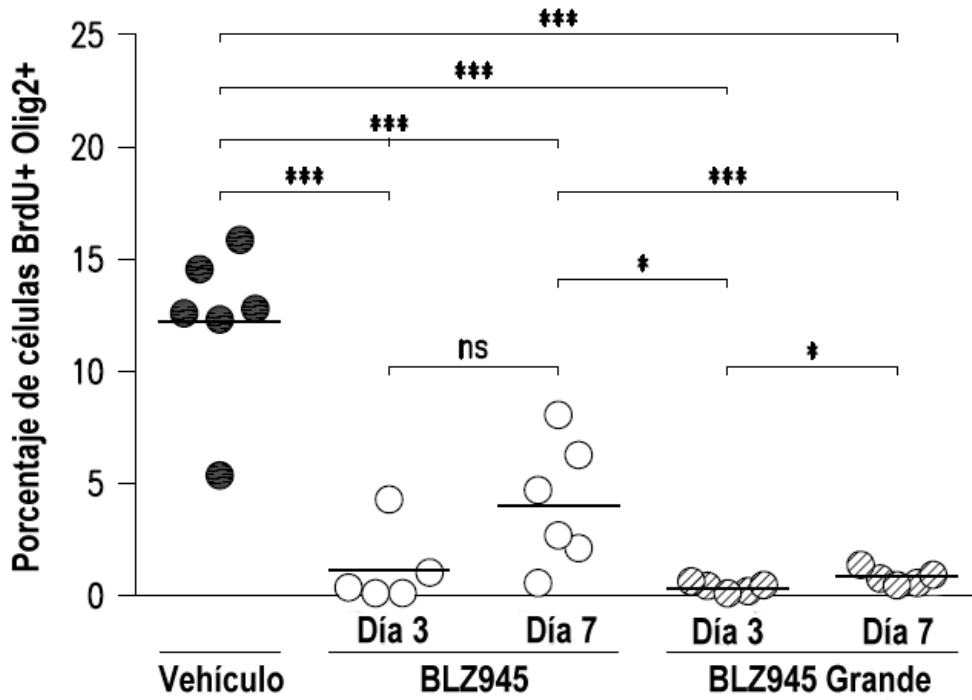


FIG. 6B

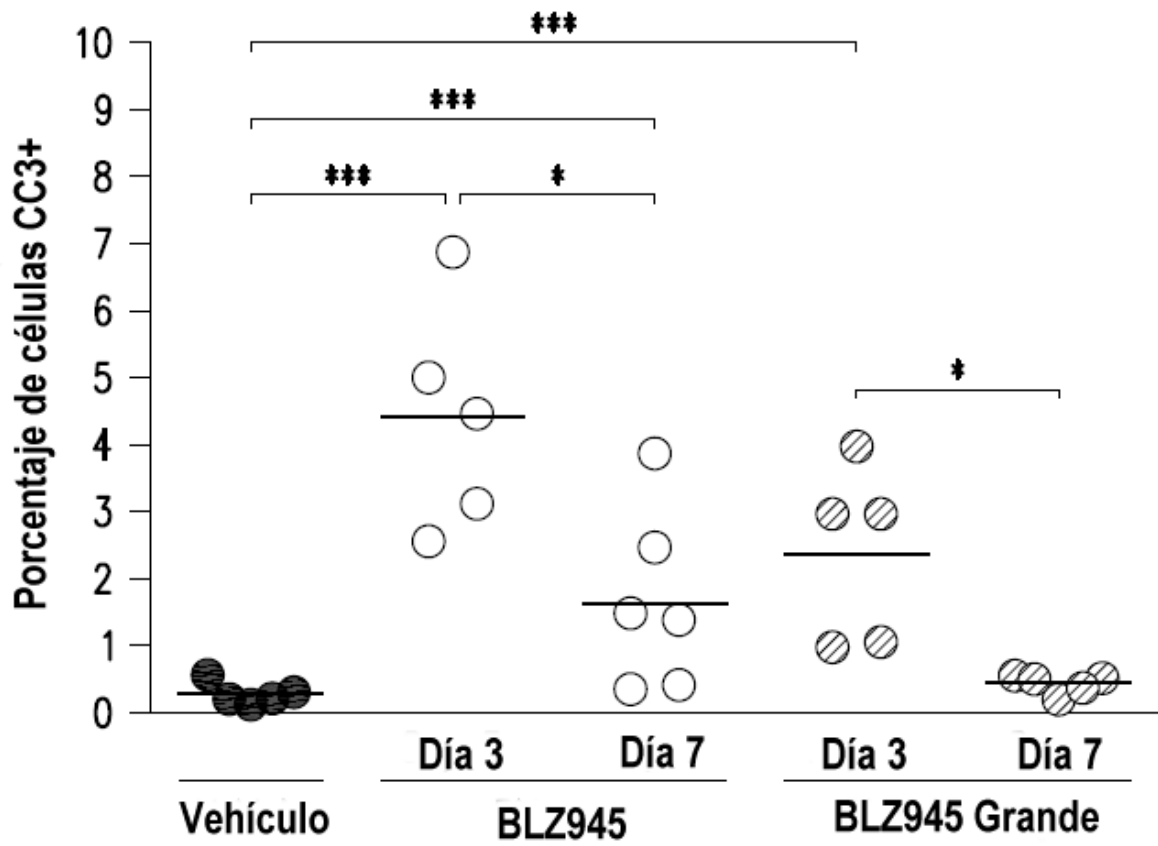


FIG.6C

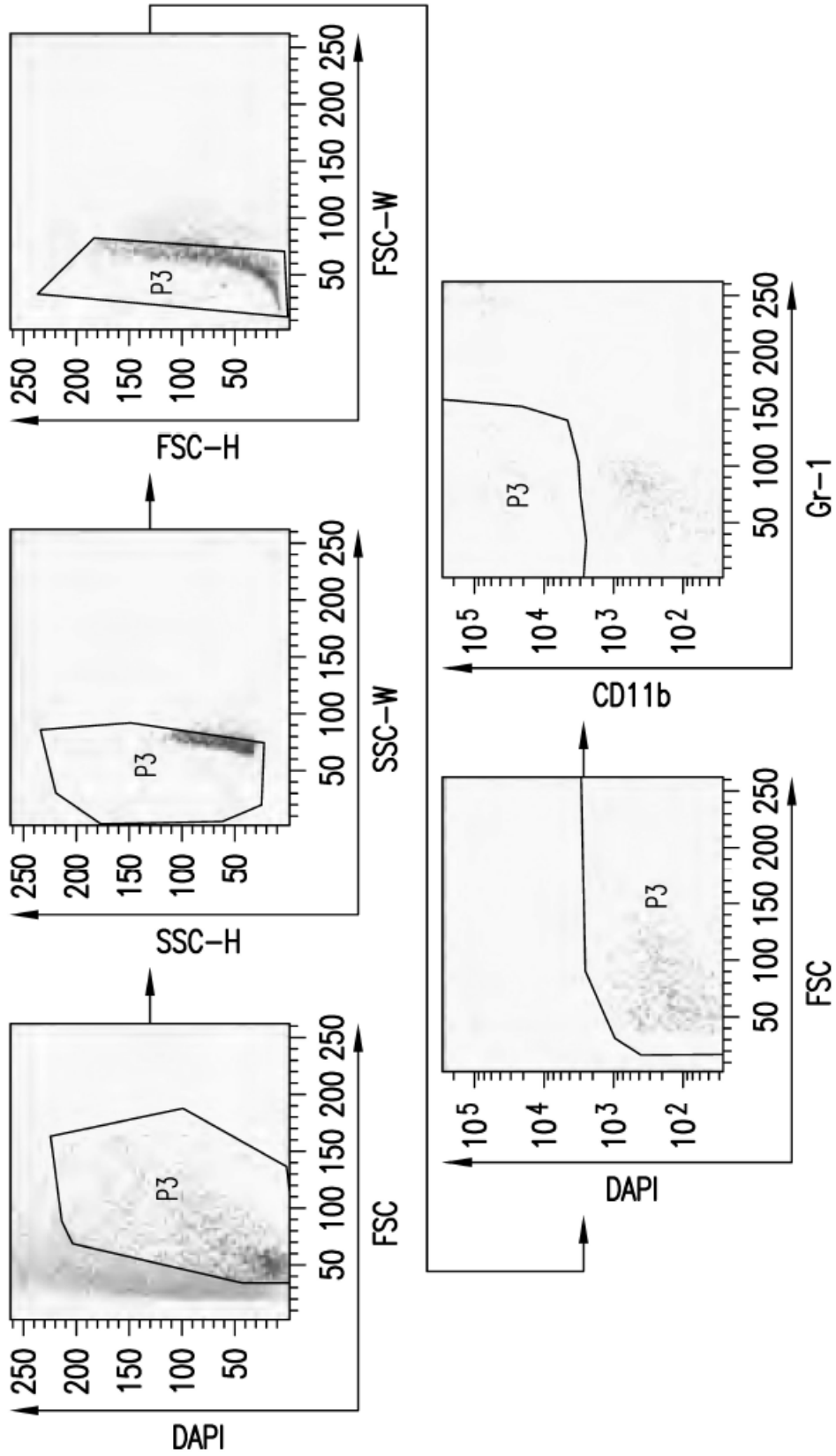


FIG.7A

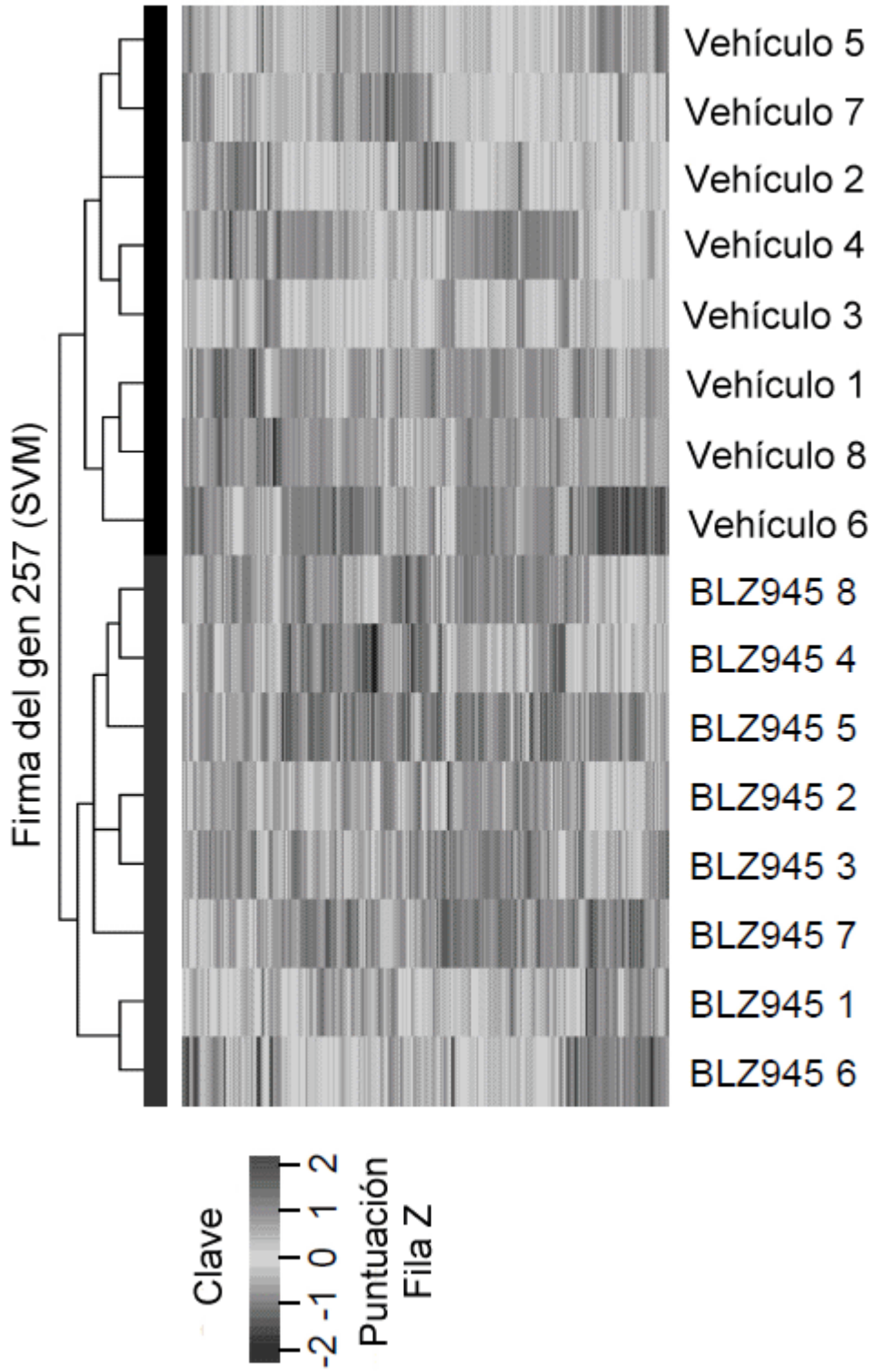


FIG.7B

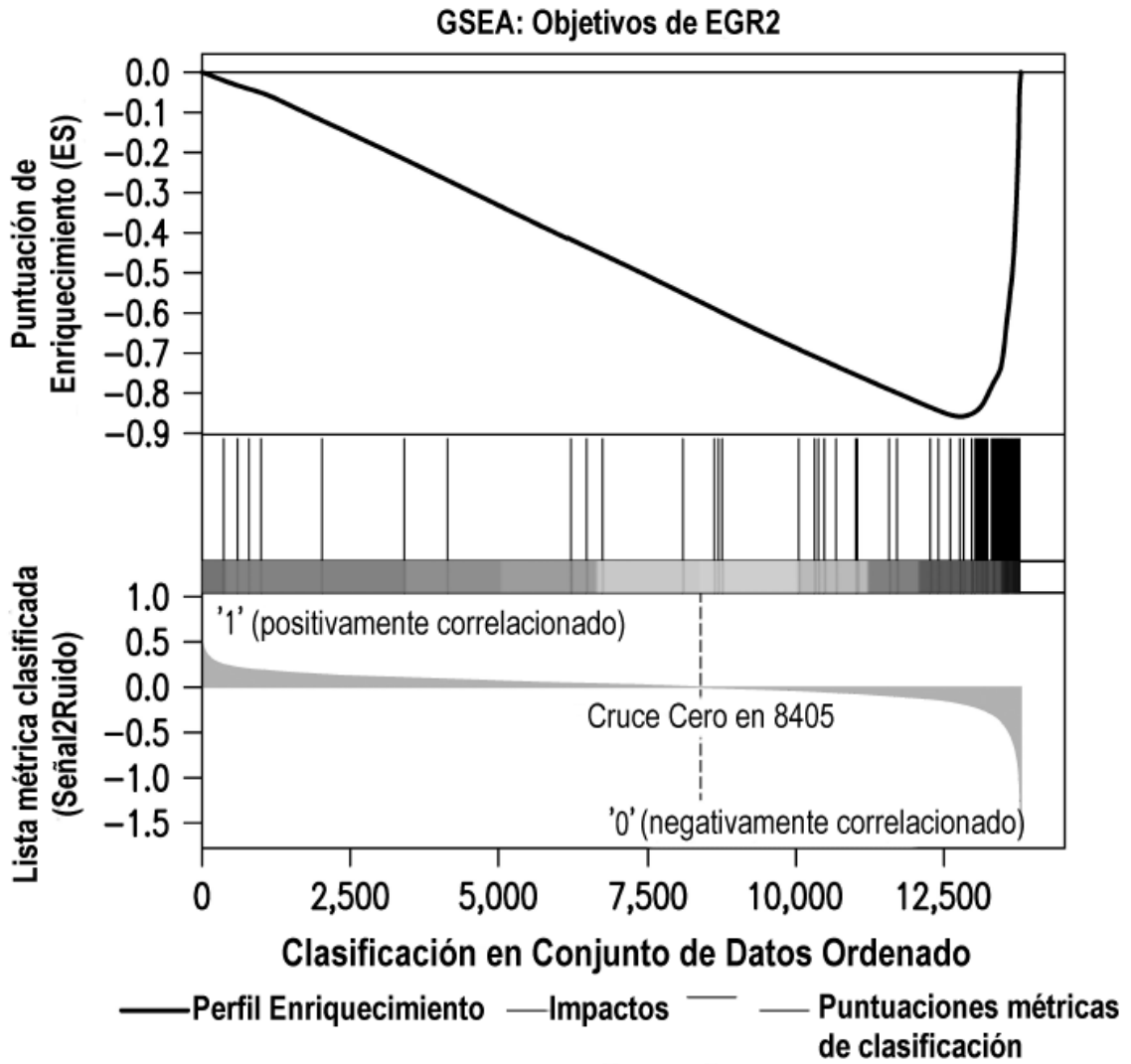


FIG.7C

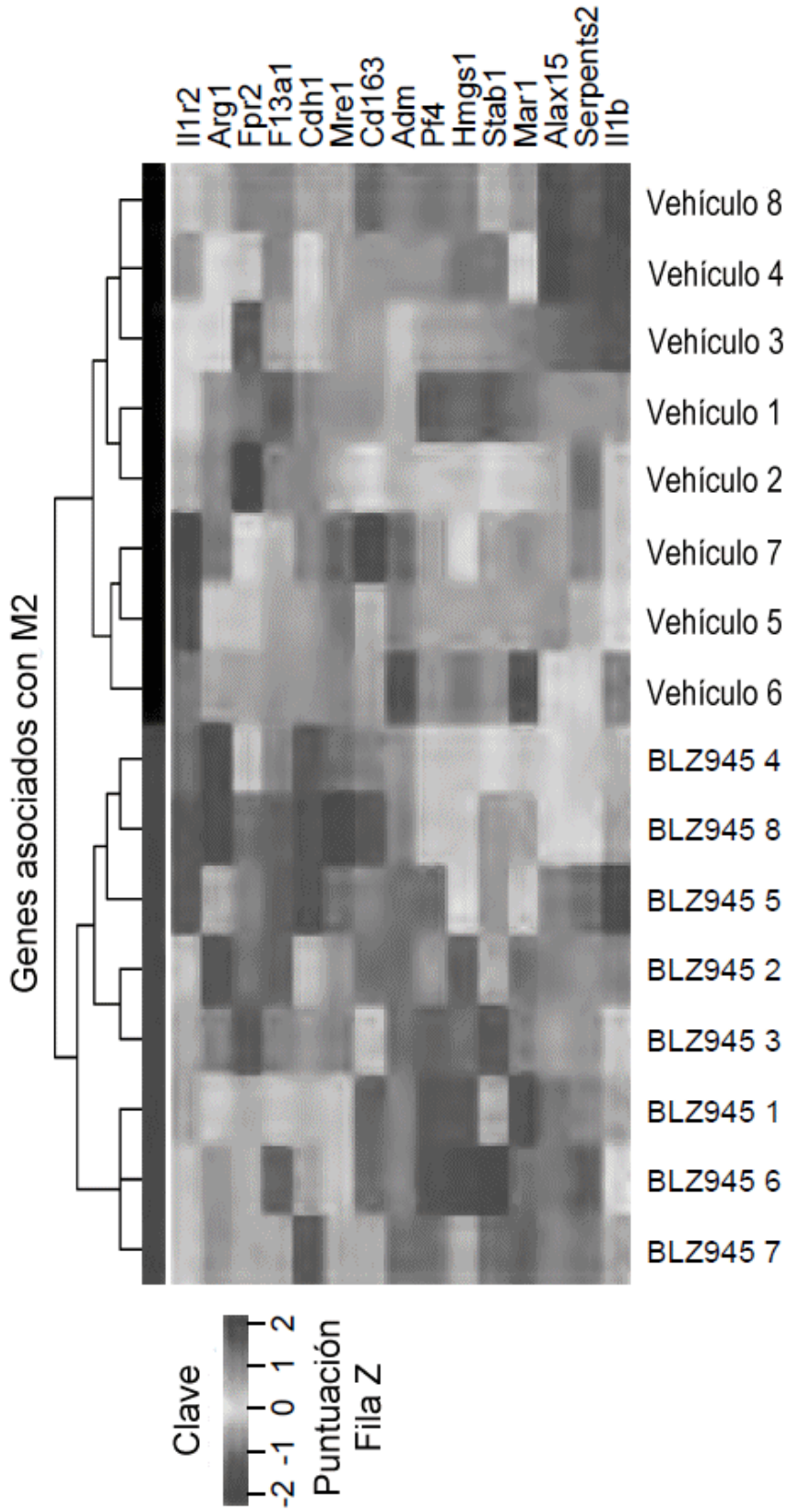


FIG.7D

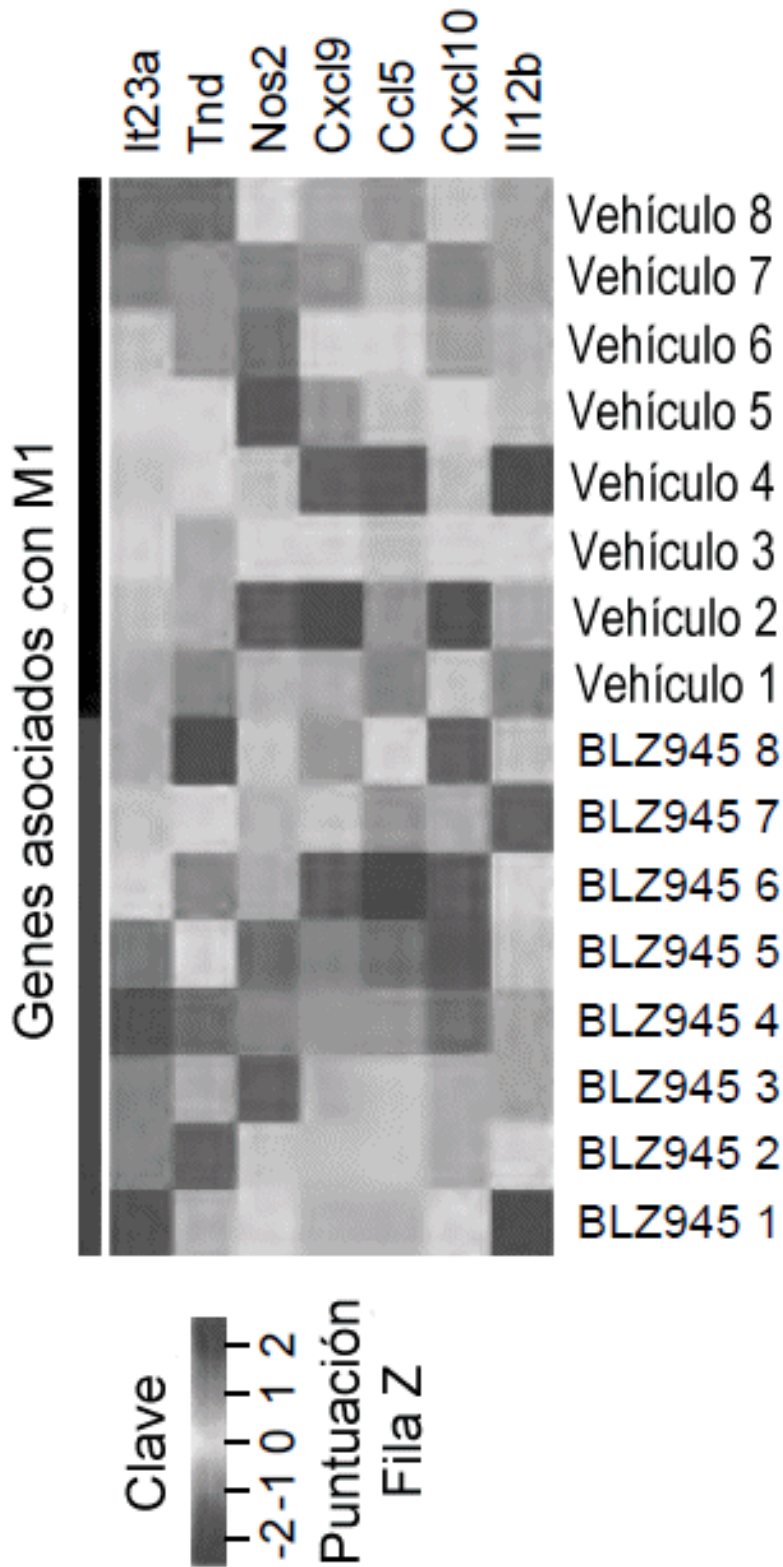


FIG.7E

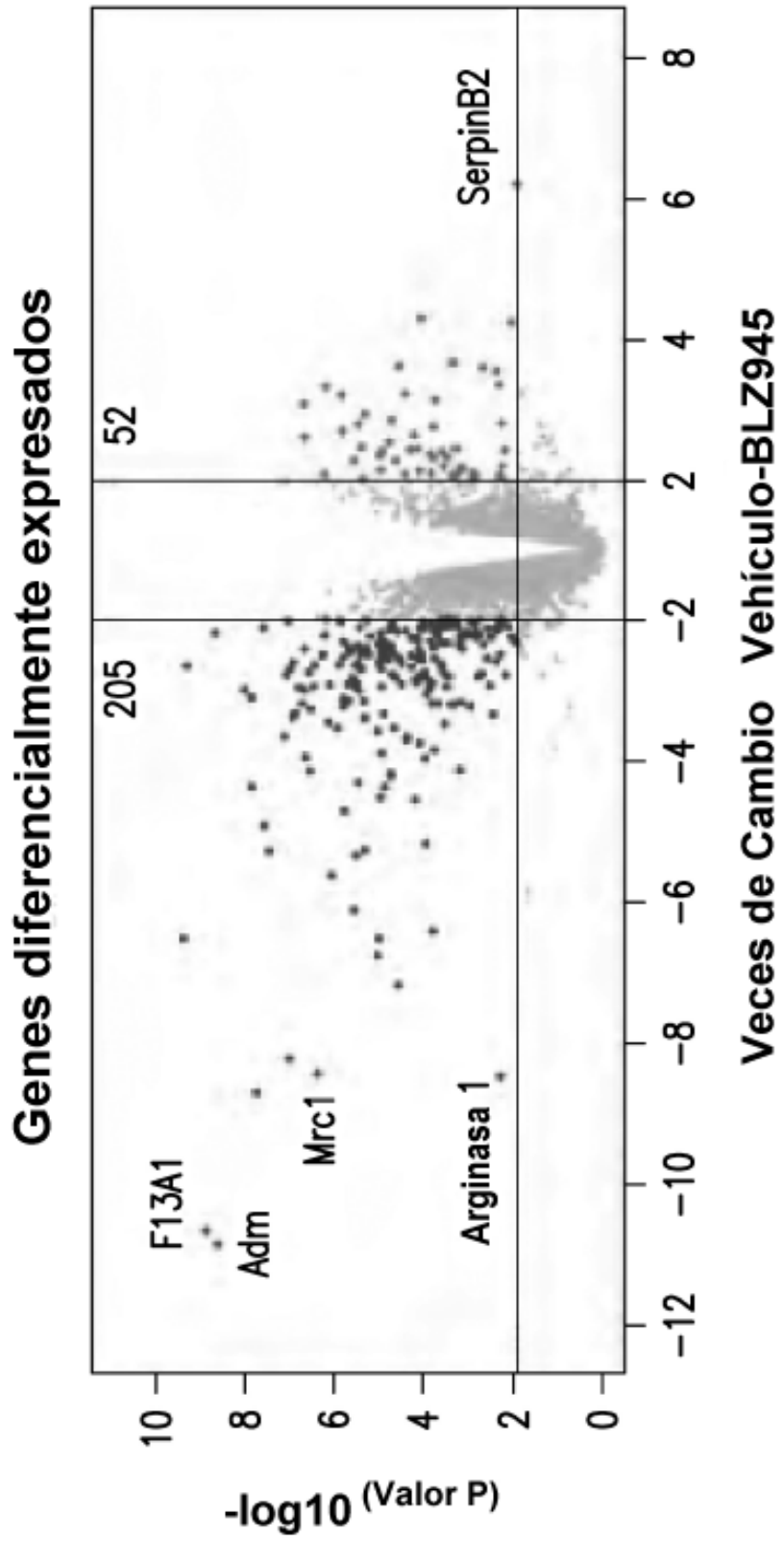


FIG.8A

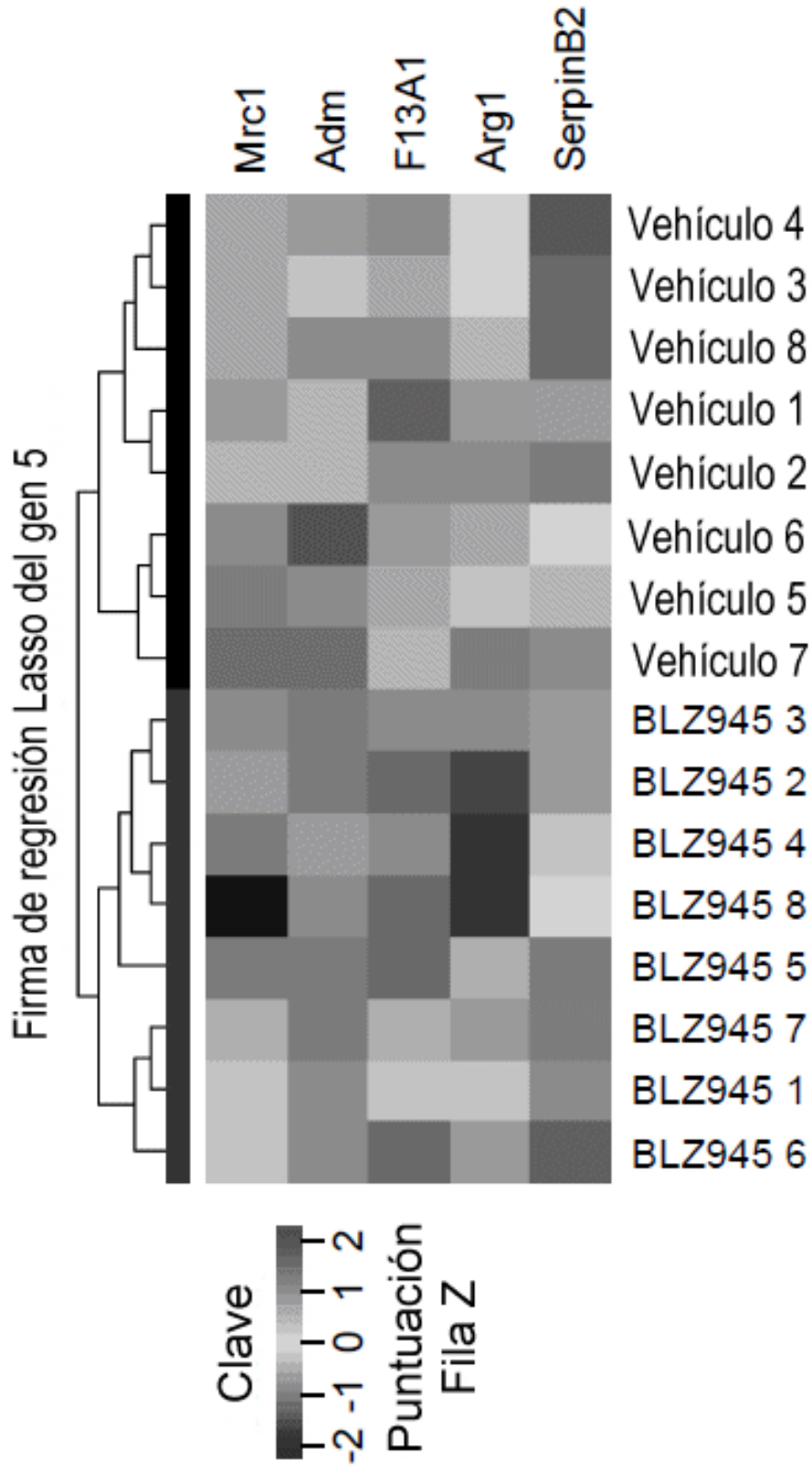


FIG. 8B

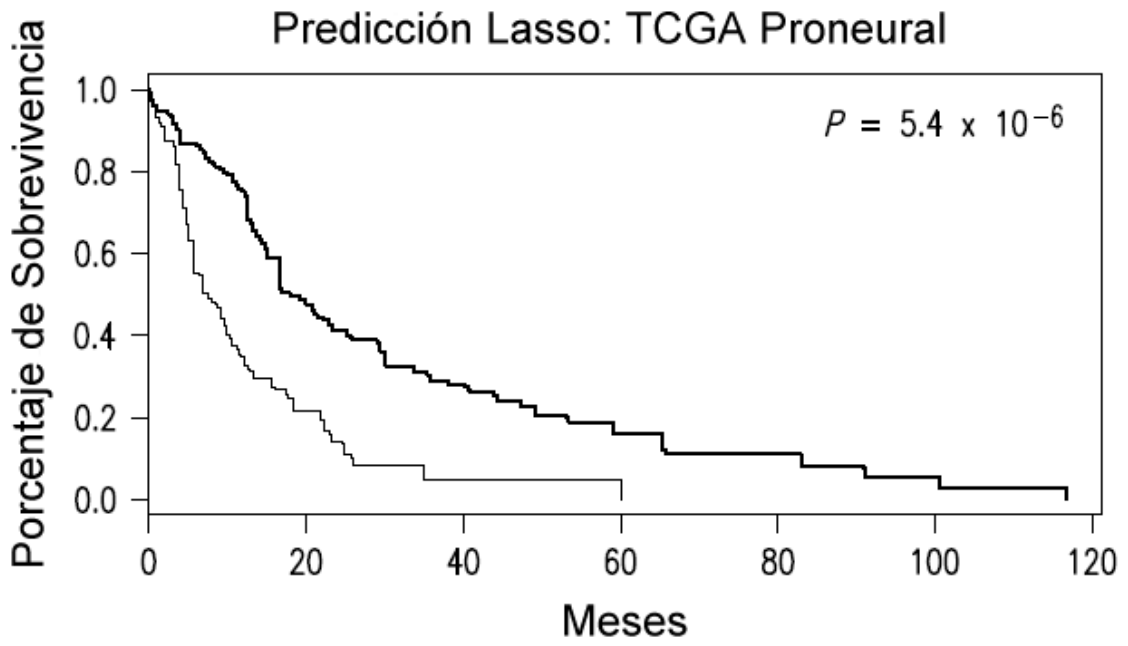


FIG.8C

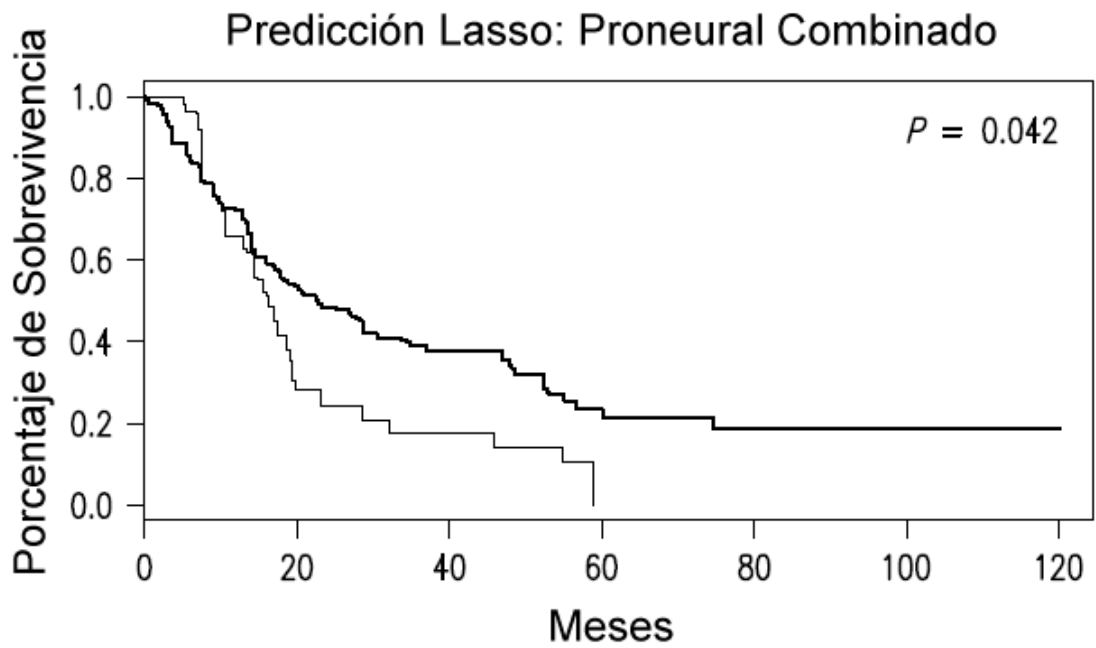


FIG.8D

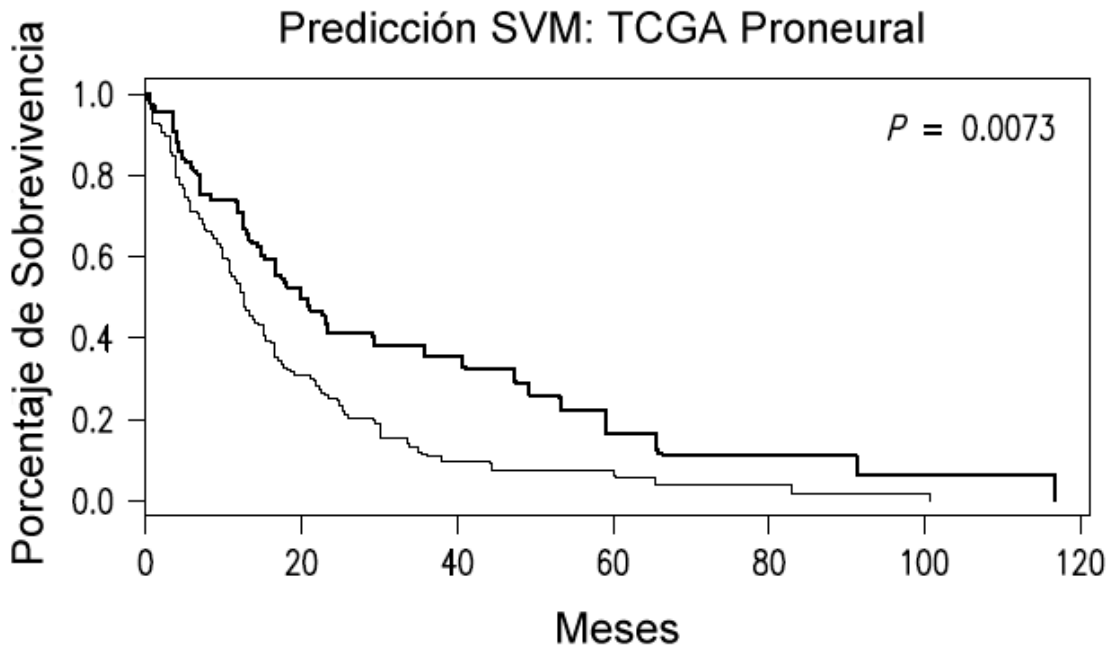


FIG.8E

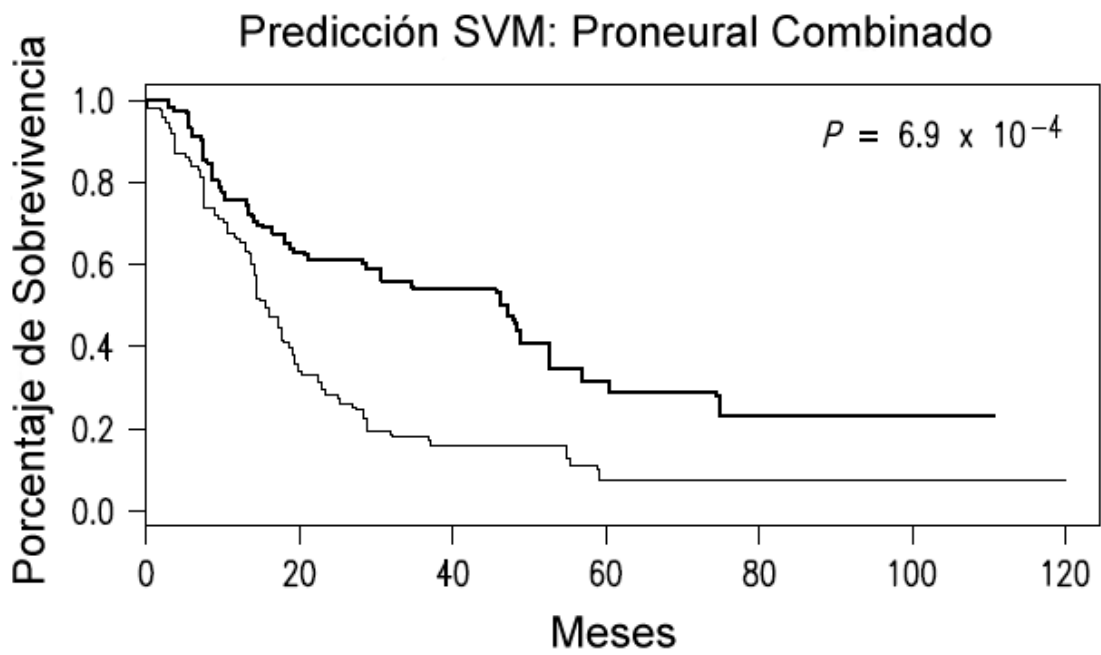


FIG.8F

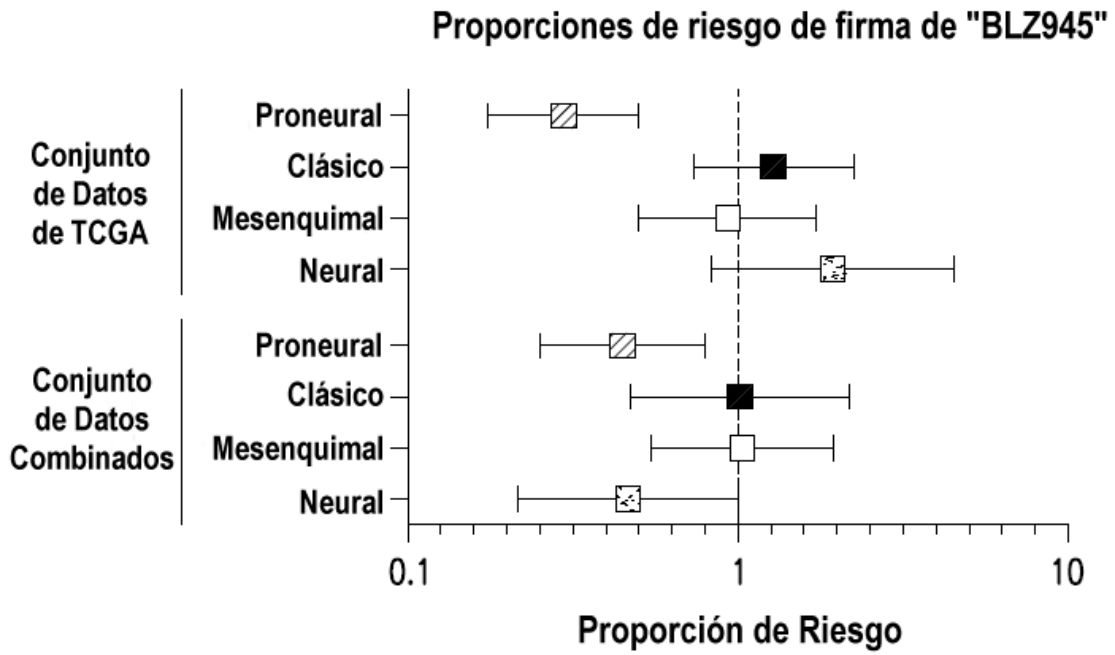


FIG.8G