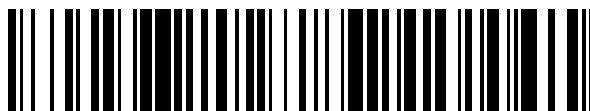


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 093**

51 Int. Cl.:

A61K 31/47 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.09.2012 PCT/US2012/056281**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2013 WO13043840**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2012 E 12770368 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2758057**

54 Título: **Procedimiento para el tratamiento de la osteoporosis**

30 Prioridad:

22.09.2011 US 201161538039 P

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

25.10.2017

73 Titular/es:

**EXELIXIS, INC. (100.0%)
210 East Grand Avenue
South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**AFTAB, DANA, T. y
CLARY, DOUGLAS**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 639 093 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

Procedimiento para el tratamiento de la osteoporosis

5 **Campo de la invención**

[0001] Esta descripción se refiere al tratamiento de la osteoporosis usando N-(4-{{6,7-bis(metiloxi)quinolin-4-il}oxi}fenil)-N'-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida.

10 **Antecedentes de la invención**

[0002] La osteoporosis es una enfermedad caracterizada por una baja masa ósea y un deterioro de la microarquitectura del tejido óseo que conduce a una mayor fragilidad ósea y un aumento consiguiente del riesgo de fractura. La enfermedad hace que los huesos se vuelvan frágiles y quebradizos y afecta tanto a hombres como a mujeres. Los huesos osteoporóticos aumentan el riesgo de fractura después de un traumatismo mínimo. A nivel mundial se estima que hay 35 millones de mujeres y 14 millones de hombres con osteoporosis o baja masa ósea. En los Estados Unidos, uno de cada cuatro adultos mayores de 50 son propensos a sufrir una fractura osteoporótica. La osteoporosis y las fracturas resultantes representan una enorme carga para la salud pública, en parte debido a que esta enfermedad golpea en silencio, en el momento en que un paciente es diagnosticado con una fractura osteoporótica, el daño a los huesos ya se ha producido.

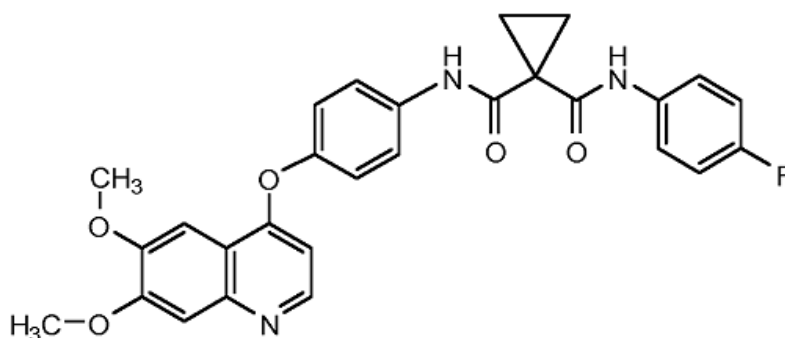
[0003] El hueso sufre continuamente un proceso llamado remodelación. La pérdida de hueso tiene lugar en la osteoporosis debido a que el proceso normal de remodelación, o recambio óseo, elimina más hueso del que reemplaza. La remodelación ósea implica dos etapas distintas: la resorción ósea (descomposición) y la formación de hueso. El calcio se almacena en el hueso. Cuando se necesita en el cuerpo, las células óseas llamadas osteoclastos se adhieren a la superficie del hueso y lo descomponen, dejando cavidades en el hueso. Las células formadoras de huesos llamadas osteoblastos llenan a continuación las cavidades con una matriz orgánica llamada osteoide. El osteoide entonces mineraliza espontáneamente con fosfato de calcio para volver a formar el hueso duro. Los osteoblastos que permanecen incrustados en la matriz se denominan osteocitos.

[0004] Durante el envejecimiento y como resultado de otras afecciones que pueden conducir a un aumento del riesgo de pérdida de masa ósea, tales como durante el tratamiento del cáncer de próstata o mama o como resultado de la desnutrición, la tasa de recambio óseo aumenta en ambos sexos, y a nivel de los tejidos, la formación de hueso osteoblástica es más lenta que la resorción ósea osteoclástica, debido a la disminución en el número y actividad de las células osteoblásticas individuales (Marie y Kassem, 2011). La resorción ósea lleva menos tiempo que la formación de hueso. La resorción ósea en un sitio de hueso particular tarda aproximadamente dos semanas; la formación lleva tres meses o más. Como resultado, hay un déficit de hueso en los llamados espacios de remodelación. Normalmente, esto es de poca importancia, pero si el ciclo de remodelación está fuera de equilibrio, el recambio óseo puede dar lugar a una pérdida ósea importante. Se cree que un recambio óseo elevado aumenta el riesgo de fractura.

[0005] Como resultado, sigue existiendo la necesidad de procedimientos para tratar la osteoporosis.

Descripción resumida de la invención

[0006] Estas y otras necesidades se satisfacen por la presente invención que está dirigida al Compuesto 1:

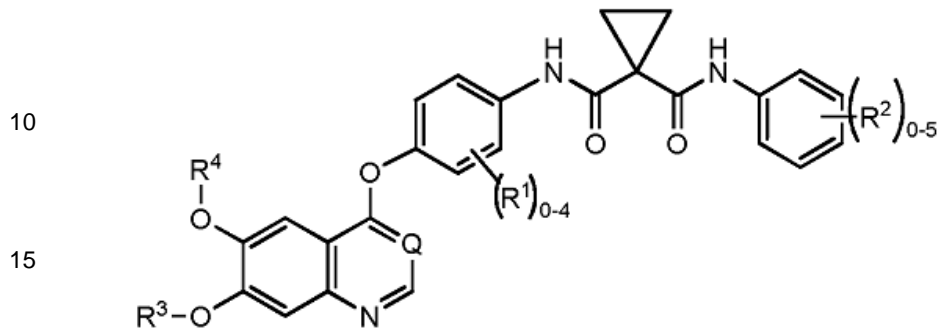


Compuesto 1

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso tal como se define en las reivindicaciones adjuntas, en el que el Compuesto 1 se administra de entre 0,01 y 25 mg una vez al día.

[0007] De manera más general, la presente descripción proporciona un procedimiento para tratar la osteoporosis. El procedimiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto a un paciente en necesidad de dicho tratamiento.

5 **[0008]** En una realización de éste y otros aspectos de la descripción, el compuesto es un compuesto de Fórmula I



20 **Fórmula I**

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que:

25 R^1 es halo;

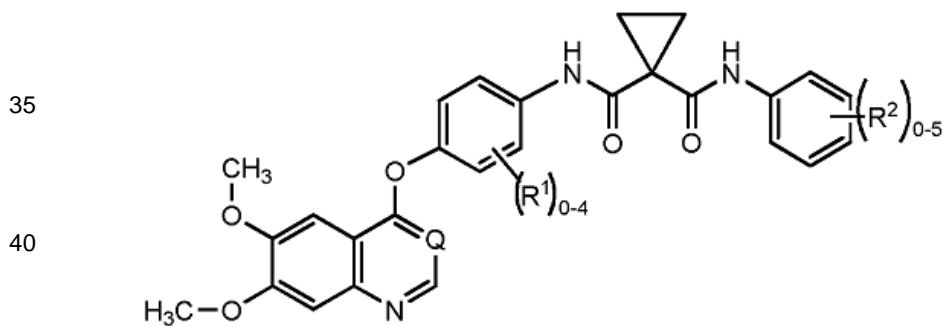
R^2 es halo;

R^3 es alquilo (C1-C6);

R^4 es alquilo (C1-C6); y

Q es CH o N.

30 **[0009]** En otra realización, el compuesto de fórmula I es un compuesto de Fórmula Ia



45 **Fórmula Ia**

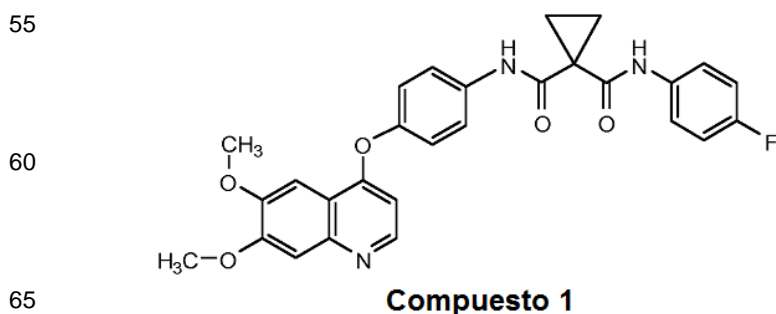
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que:

50 R^1 es halo;

R^2 es halo; y

Q es CH o N.

[0010] En otra realización, el compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El compuesto 1 se conoce como N-(4-{{[6,7-bis(metiloxi)quinolin-4-il]oxi}fenil)-N'-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida y como cabozantinib.

5 **[0011]** En otra realización, el compuesto de Fórmula I, la, o el Compuesto 1 se administran como una composición farmacéutica que comprende un aditivo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable en una dosis suficiente para mejorar los efectos del recambio óseo anormal.

10 **[0012]** En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para el tratamiento de osteoporosis en pacientes con un mayor riesgo de perder masa ósea. Los pacientes con un mayor riesgo de perder masa ósea incluyen pacientes que son mujeres posmenopáusicas y hombres de edad avanzada, o que tienen o que actualmente están en tratamiento para el cáncer, tal como el cáncer de próstata o de mama o de pacientes con desnutrición. El procedimiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I, la, o el Compuesto 1 a un paciente en necesidad de dicho tratamiento.

15 **[0013]** En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para prevenir la osteoporosis, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I, la, o el Compuesto 1 a un paciente en necesidad de dicho tratamiento.

20 **[0014]** En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para aumentar la densidad mineral ósea de pacientes con osteoporosis, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I, la, o el Compuesto 1 a un paciente en necesidad de dicho tratamiento.

25 **[0015]** En estos y otros aspectos, la capacidad del compuesto de Fórmula I para tratar, mejorar, o reducir la gravedad de la osteoporosis se puede determinar cualitativa y cuantitativamente usando varios marcadores circulantes o varias tecnologías de formación de imágenes. Los marcadores que pueden ser útiles para la monitorización individual de pacientes osteoporóticos tratados con agentes contra la resorción incluyen fosfatasa alcalina total en suero, fosfatasa alcalina específica del hueso en suero, osteocalcina en suero, propéptido C-terminal de procolágeno de tipo 1 C1NP en suero o propéptido N-terminal de procolágeno de tipo I (P1NP) en suero [para monitorizar la formación de hueso], hidroxiprolina urinaria, piridinolina total urinaria (PYD), desoxipiridinolina libre urinaria (DPD), telopéptidos N-terminales reticulados de colágeno tipo 1 (NTx) urinarios, telopéptidos C-terminales reticulados de colágeno tipo 1 (CTX) urinarios o en suero, sialoproteína ósea (BSP), y fosfatasa ácida 5b resistente a tartrato (TRACP-5b) [para monitorizar la resorción ósea].

35 **[0016]** Las tecnologías de imágenes que pueden ser útiles en la evaluación de la capacidad de un compuesto de Fórmula I, la, o el Compuesto 1 para tratar, mejorar, o reducir la gravedad de la osteoporosis incluyen imágenes de resonancia magnética, tomografía de emisión de positrones, tomografía computarizada (CT) y absorciometría de rayos X.

40 **[0017]** En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento de pronóstico para la osteoporosis en un sujeto, que comprende:

(a) medir el nivel de P1NP, CTx o TRACP 5b en una muestra del sujeto;
 (b) comparar el nivel de P1NP, CTx o TRACP 5b medido en la etapa (a) con un nivel estándar de P1NP, CTx o TRACP 5b para determinar si la muestra del sujeto tiene niveles aberrantes de P1NP, CTx o TRACP 5b;
 (c) seleccionar un régimen de tratamiento con el Compuesto de Fórmula I, la, o 1 basado en los niveles aberrantes de P1NP, CTx o TRACP 5b o administrar el compuesto de Fórmula I, la, o 1 de acuerdo con el régimen de tratamiento, de manera que la osteoporosis se inhibe en el sujeto.

50 **[0018]** En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para estimular la diferenciación y/o actividad de los osteoblastos en un paciente en necesidad de dicho tratamiento, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I, la, o el Compuesto 1.

55 **[0019]** En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para estimular la formación de hueso en un paciente en necesidad de dicho tratamiento, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I, la, o el Compuesto 1.

60 **[0020]** En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para inhibir la diferenciación de osteoclastos en un paciente en necesidad de dicho tratamiento, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I, la, o el Compuesto 1.

[0021] En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para modular el recambio óseo hacia la formación de hueso en un paciente en necesidad de dicho tratamiento, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I, la, o el Compuesto 1.

65 **[0022]** En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para el tratamiento de osteoporosis en pacientes

ovariectomizadas, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I, Ia, o el Compuesto 1.

- 5 **[0023]** En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para modular el recambio óseo hacia la formación de hueso en pacientes ovariectomizadas, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I, Ia, o el Compuesto 1.

Breve resumen de las figuras

10 **[0024]**

La Figura 1 representa el efecto del compuesto 1 sobre la diferenciación de osteoclastos medida en el día 7 como la actividad de TRACP 5b (U/L) secretada en el medio de cultivo.

La Figura 2 representa el efecto del compuesto 1 sobre la actividad de resorción de los osteoclastos humanos en el día 7 como valores de CTX/TRACP 5b.

- 15 La figura 3 representa el efecto del Compuesto 1 sobre la diferenciación de osteoblastos en el día 8 como la actividad de ALP celular/mg de proteína.

La figura 4 representa el efecto del compuesto 1 sobre la actividad de formación de hueso de osteoblastos de ratón en el día 11 como PINP secretado en el medio de cultivo.

- 20 La figura 5 representa el efecto del Compuesto 1 sobre la actividad de formación de hueso de osteoblastos de ratón en el día 13 como la deposición de calcio en el día 13.

La Figura 6 representa el diseño de un estudio de los efectos a corto plazo del Compuesto 1 sobre los marcadores de recambio óseo en una ovariectomía de rata (modelo OVX).

25 Descripción detallada de la invención

Abreviaturas y definiciones

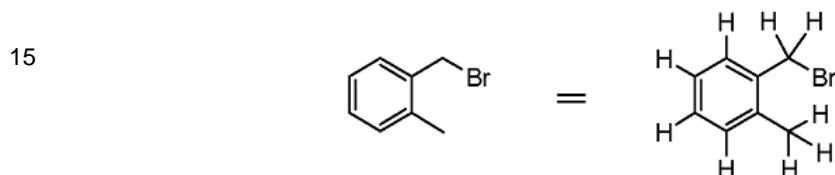
[0025] Las siguientes abreviaturas y términos tienen los significados indicados a lo largo de la memoria:

Abreviatura	Significado
Ac	acetilo
Br	ancho
°C	grados Celsius
c-	ciclo
CBZ	CarboBenZoxi =benciloxicarbonilo
d	doblete
dd	doblete de doblete
dt	doblete de triplete
DCM	diclorometano
DME	1,2-dimetoxietano
DMF	N, N-dimetilformamida
DMSO	Dimetil sulfóxido
Dppf	1,1'-bis(difenilfosfano)ferroceno
EI	ionización por impacto de electrones
G	gramo(s)
h	hora(s)
HPLC	cromatografía líquida de alta presión
L	litro(s)
M	molar o molaridad
m	multiplete
Mg	miligramo(s)
MHz	megaherzio (frecuencia)
Min	minuto(s)
ml	mililitro(s)
μl	microlitro(s)
μM	miromol(es) o micromolar
mM	milimolar
Mmol	milimol(es)
Mol	mol(es)
MS	Análisis por espectro de masas
N	normal o normalidad
nM	nanomolar
RMN	espectroscopía de resonancia

	magnética nuclear
q	cuarteto
RT	temperatura ambiente
s	singlete
t o tr	triplete
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
TLC	cromatografía en capa fina

[0026] El símbolo "-" significa un enlace simple, "=" significa un doble enlace.

[0027] Cuando las estructuras químicas se representan o describen, a menos que se indique explícitamente lo contrario, todos los átomos de carbono se supone que tienen sustitución de hidrógeno para ajustarse a una valencia de cuatro. Por ejemplo, en la estructura en el lado izquierdo del siguiente esquema, hay nueve hidrógenos implícitos. Los nueve hidrógenos se representan en la estructura de la derecha. A veces, un átomo particular en una estructura se describe en fórmula textual como que tiene un hidrógeno o hidrógenos como sustitución (hidrógeno expresamente definido), por ejemplo, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$. Se entiende por un experto en la técnica que las técnicas descriptivas mencionadas anteriormente son habituales en las técnicas químicas para proporcionar brevedad y simplicidad a la descripción de estructuras por lo demás complejas.

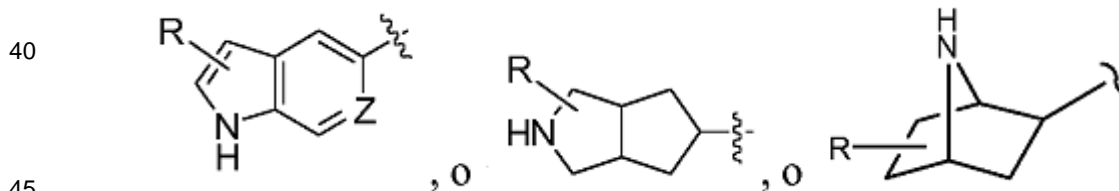


[0028] Si un grupo "R" se representa como "flotante" en un sistema de anillo, como por ejemplo en la fórmula:



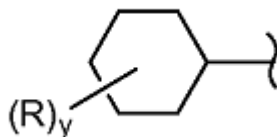
entonces, a menos que se defina lo contrario, un sustituyente "R" puede residir en cualquier átomo del sistema de anillo, asumiendo la sustitución de un hidrógeno representado, implícito o expresamente definido de uno de los átomos en el anillo, siempre que se forme una estructura estable.

[0029] Si un grupo "R" se representa como flotante en un sistema de anillos condensados, como por ejemplo en las fórmulas:



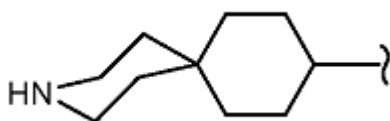
entonces, a menos que se defina lo contrario, un sustituyente "R" puede residir en cualquier átomo del sistema de anillos condensados, asumiendo la sustitución de un hidrógeno representado (por ejemplo el $-\text{NH}-$ en la fórmula anterior), el hidrógeno implícito (por ejemplo como en la fórmula anterior, donde no se muestran los hidrógenos pero se entiende que están presentes), o hidrógeno expresamente definido (por ejemplo, cuando en la fórmula anterior, "Z" es igual a $=\text{CH}-$) de uno de los átomos en el anillo, siempre que se forme una estructura estable. En el ejemplo representado, el grupo "R" puede residir en el anillo de 5 miembros o en el anillo de 6 miembros del sistema de anillos condensados. Cuando un grupo "R" se representa como existente en un sistema de anillos que contiene carbonos saturados, como por ejemplo en la fórmula:

5



10 en la que, en este ejemplo, "y" puede ser más de uno, suponiendo que cada uno sustituye un hidrógeno actualmente
representado, implícito o definido expresamente en el anillo; entonces, a menos que se defina lo contrario, cuando la
estructura resultante es estable, dos "R" pueden residir en el mismo carbono. Un ejemplo simple es cuando R es un
grupo metilo; no puede existir un dimetilo geminal en un carbono del anillo representado (un carbono "anular"). En otro
ejemplo, dos R en el mismo carbono, incluyendo ese carbono, pueden formar un anillo, creando de este modo una
15 estructura de anillo espirocíclico (un grupo "espirociclico") con el anillo representado como por ejemplo en la fórmula:

20



25

[0030] "Halógeno" o "halo" se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo.

30 **[0031]** "Rendimiento" para cada una de las reacciones descritas en el presente documento se expresa como un
porcentaje del rendimiento teórico.

35 **[0032]** "Paciente" para los fines de la presente descripción incluye seres humanos y otros animales, particularmente
mamíferos, y otros organismos. Así, los procedimientos son aplicables tanto a la terapia humana como a aplicaciones
veterinarias. En otra realización, el paciente es un mamífero, y en otra realización el paciente es humano.

40 **[0033]** Una "sal farmacéuticamente aceptable" de un compuesto significa una sal que es farmacéuticamente aceptable
y que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto original. Se entiende que las sales farmacéuticamente
aceptables no son tóxicas. Información adicional sobre sales farmacéuticamente aceptables adecuadas se pueden
encontrar en Remington Pharmaceutical Sciences, 17ª ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985 o SM Berge,
et al., "Pharmaceutical Salts," J. Pharm. Sci, 1977; 66: 1-19.

45 **[0034]** Los ejemplos de sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con ácidos
inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares;
así como ácidos orgánicos, tales como ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido
ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico,
ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido málico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido 3-
45 (4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etanodisulfónico,
ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 4-clorobencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico,
ácido 4-toluenosulfónico, ácido alcanforsulfónico, ácido glucoheptónico, 4,4'-metilendis-(ácido
3-hidroxi-2-eno-1-carboxílico), ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido butilacético terciario, ácido lauril
sulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico,
ácido p-toluenosulfónico, y ácido salicílico y similares.

50 **[0035]** "Profármaco" se refiere a compuestos que se transforman (habitualmente rápidamente) in vivo para producir el
compuesto parental de las fórmulas anteriores, por ejemplo, mediante hidrólisis en sangre. Los ejemplos más
comunes incluyen, pero no se limitan a, formas de éster y amida de un compuesto que tiene una forma activa que
contiene un resto de ácido carboxílico. Los ejemplos de ésteres farmacéuticamente aceptables de los compuestos de
esta descripción incluyen, pero no se limitan a, ésteres de alquilo (por ejemplo, con entre aproximadamente uno y
55 aproximadamente seis carbonos), el grupo alquilo es una cadena lineal o ramificada. Los ésteres aceptables también
incluyen ésteres de cicloalquilo y ésteres de arilalquilo, tales como, pero no limitados a, bencilo. Los ejemplos de
amidás farmacéuticamente aceptables de los compuestos de esta descripción incluyen, pero no se limitan a, amidás
primarias, y alquilamidás secundarias y terciarias (por ejemplo, con entre aproximadamente uno y aproximadamente
seis carbonos). Las amidás y ésteres de los compuestos de la presente descripción se pueden preparar de acuerdo
60 con procedimientos convencionales. Una descripción a fondo de profármacos se proporciona en T. Higuchi y V. Stella,
"Pro-drugs as Novel Delivery Systems," Vol 14 de la ACS Symposium Series, y en Bioreversible Carriers in Drug
Design, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association y Pergamon Press, 1987.

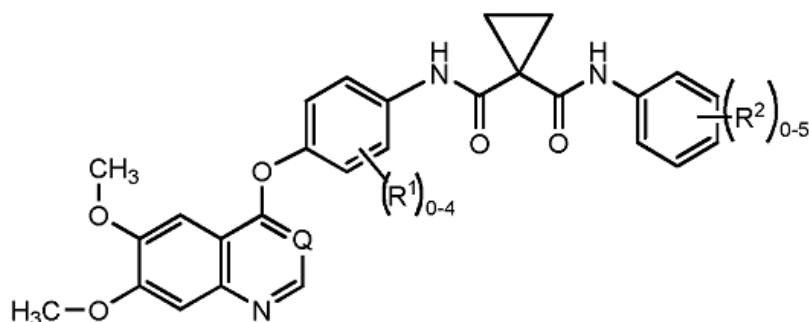
65 **[0036]** "Cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad de un compuesto de la descripción, que cuando se
administra a un paciente, mejora un síntoma de la enfermedad. Una cantidad terapéuticamente eficaz pretende incluir

una cantidad de un compuesto solo o en combinación con otros principios activos eficaces para tratar, mejorar, o reducir la gravedad de la osteoporosis. La cantidad de un compuesto de la descripción que constituye una "cantidad terapéuticamente eficaz" variará dependiendo del compuesto, el estado de enfermedad y su gravedad, la edad del paciente a tratar, y similares. La cantidad terapéuticamente eficaz puede determinarse por un experto en la técnica teniendo en cuenta sus conocimientos y esta descripción, pero generalmente estará en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 1000 mg por día, y más específicamente en el intervalo de 1 a 100 mg por día.

[0037] "Tratar" o "tratamiento" de una enfermedad, trastorno, o síndrome, tal como se usa en el presente documento, incluye (i) prevenir que se produzca la enfermedad, trastorno, o síndrome en un ser humano, es decir, hacer que los síntomas clínicos de la enfermedad, trastorno, o síndrome no se desarrollen en un animal que puede estar expuesto o predispuesto a la enfermedad, trastorno o síndrome, pero que todavía no experimenta o muestra síntomas de la enfermedad, trastorno o síndrome; (ii) inhibir la enfermedad, trastorno, o síndrome, es decir, detener su desarrollo; y (iii) aliviar la enfermedad, trastorno, o síndrome, es decir, provocar la regresión de la enfermedad, trastorno, o síndrome. Como se sabe en la técnica, los ajustes para la administración sistémica frente a la administración localizada, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la interacción de fármacos y la gravedad de la afección pueden ser necesarios, y serán determinables con experiencia de rutina.

Realizaciones

[0038] En una realización de la descripción, el compuesto de fórmula I es el compuesto de Fórmula Ia:



Fórmula Ia

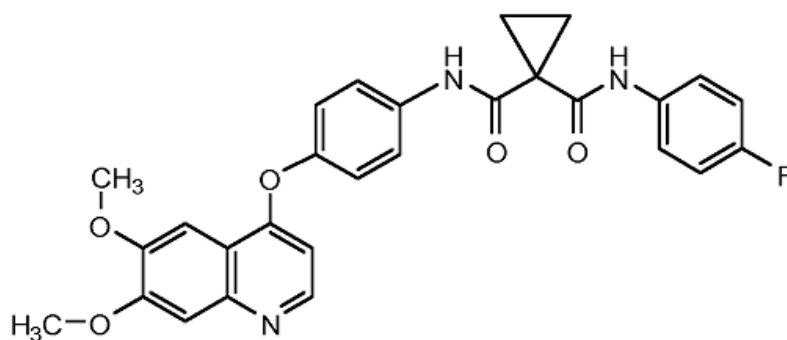
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que:

R¹ es halo;

R² es halo; y

Q es CH o N.

[0039] En otra realización, el compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1:



Compuesto 1

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0040] Como se indicó anteriormente, el Compuesto 1 se denomina en el presente documento como N-(4-([6,7-bis(metiloxi)quinolin-4-il]oxi)fenil)-N'-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxamida. El documento WO 2005/030140 da a conocer el compuesto 1 y describe cómo se produce (Ejemplo 12, 37, 38, y 48) y también da a conocer la actividad terapéutica de este compuesto para inhibir, regular y/o modular la transducción de señales de quinasas, (ensayos, Tabla 4, entrada 289). El ejemplo 48 está en el párrafo [0353] en el documento WO 2005/030140.

[0041] En otras realizaciones, el compuesto de Fórmula I, Ia, o el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente

aceptable de los mismos, se administran como una composición farmacéutica, en la que la composición farmacéutica comprende adicionalmente un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

5 [0042] El compuesto de Fórmula I, Fórmula Ia y el Compuesto 1, tal como se describen en el presente documento, incluyen tanto los compuestos citados como los isómeros individuales y mezclas de isómeros. En cada caso, el compuesto de Fórmula I incluye las sales farmacéuticamente aceptables, hidratos y/o solvatos de los compuestos citados y cualquier isómero individual o mezcla de isómeros de los mismos.

10 [0043] En otras realizaciones, el compuesto de Fórmula I, Ia, o el Compuesto 1 puede ser la sal (L)-malato. La sal de malato del compuesto de fórmula I y del compuesto 1 se describe en los documentos PCT/US2010/021194 y 61/325095.

[0044] En otras realizaciones, el compuesto de fórmula I puede ser la sal de (D)-malato.

15 [0045] En otras realizaciones, el compuesto de Fórmula Ia puede ser la sal de malato.

[0046] En otras realizaciones, el compuesto de Fórmula Ia puede ser la sal de (L)-malato.

20 [0047] En otras realizaciones, el Compuesto 1 puede ser la sal de (D)-malato.

[0048] En otras realizaciones, el Compuesto 1 puede ser la sal de malato.

[0049] En otras realizaciones, el Compuesto 1 puede ser la sal de (D)-malato.

25 [0050] En otra realización, la sal de malato está en la forma N-1 cristalina de la sal de (L)-malato y/o la sal de (D)-malato del Compuesto 1, tal como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos de No. de Ser. 61/325095. También véase el documento WO 2008/083319 para las propiedades de los enantiómeros cristalinos, incluyendo las formas cristalinas N-1 y/o N-2 de la sal de malato del compuesto 1. Los procedimientos de preparación y caracterización de tales formas se describen completamente en el documento PCT/US10/21194.

30 [0051] En otra realización, la descripción se refiere a un procedimiento para mejorar los síntomas de la osteoporosis, que comprende administrar a un paciente en necesidad de dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I en cualquiera de las realizaciones descritas en este documento.

35 [0052] En otra realización, la descripción se refiere a un procedimiento para mejorar los síntomas de la osteoporosis, que comprende administrar a un paciente en necesidad de dicho tratamiento de un compuesto de Fórmula I en cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento en una dosis diaria que es inferior o igual a 100 mg. En una realización específica, el Compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1. En ésta y en las siguientes realizaciones, la dosis es una cantidad que es mayor que 0 mg.

40 [0053] En otra realización, la descripción se refiere a un procedimiento para mejorar los síntomas de la osteoporosis, que comprende administrar a un paciente en necesidad de dicho tratamiento de un compuesto de Fórmula I en cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento en una dosis diaria que es inferior o igual a 90 mg. En una realización específica, el Compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1.

45 [0054] En otra realización, la descripción se refiere a un procedimiento para mejorar los síntomas de la osteoporosis, que comprende administrar a un paciente en necesidad de dicho tratamiento de un compuesto de Fórmula I en cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento en una dosis diaria que es inferior o igual a 80 mg. En una realización específica, el Compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1.

50 [0055] En otra realización, la descripción se refiere a un procedimiento para mejorar los síntomas de la osteoporosis, que comprende administrar a un paciente en necesidad de dicho tratamiento de un compuesto de Fórmula I en cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento en una dosis diaria que es inferior o igual a 70 mg. En una realización específica, el Compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1.

55 [0056] En otra realización, la descripción se refiere a un procedimiento para mejorar los síntomas de la osteoporosis, que comprende administrar a un paciente en necesidad de dicho tratamiento de un compuesto de Fórmula I en cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento en una dosis diaria que es inferior o igual a 60 mg. En una realización específica, el Compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1.

60 [0057] En otra realización, la descripción se refiere a un procedimiento para mejorar los síntomas de la osteoporosis, que comprende administrar a un paciente en necesidad de dicho tratamiento de un compuesto de Fórmula I en cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento en una dosis diaria que es inferior o igual a 50 mg. En una realización específica, el Compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1.

65 [0058] En otra realización, la descripción se refiere a un procedimiento para mejorar los síntomas de la osteoporosis,

que comprende administrar a un paciente en necesidad de dicho tratamiento de un compuesto de Fórmula I en cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento en una dosis diaria que es inferior o igual a 40 mg. En una realización específica, el Compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1.

- 5 **[0059]** En otra realización, la descripción se refiere a un procedimiento para mejorar los síntomas de la osteoporosis, que comprende administrar a un paciente en necesidad de dicho tratamiento de un compuesto de Fórmula I en cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento en una dosis diaria que es inferior o igual a 30 mg. En una realización específica, el Compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1.
- 10 **[0060]** En otra realización, la descripción se refiere a un procedimiento para mejorar los síntomas de la osteoporosis, que comprende administrar a un paciente en necesidad de dicho tratamiento de un compuesto de Fórmula I en cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento en una dosis diaria que es inferior o igual a 20 mg. En una realización específica, el Compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1.
- 15 **[0061]** En otra realización, la descripción se refiere a un procedimiento para mejorar los síntomas de la osteoporosis, que comprende administrar a un paciente en necesidad de dicho tratamiento de un compuesto de Fórmula I en cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento en una dosis diaria que es inferior o igual a 10 mg. En una realización específica, el Compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1.
- 20 **[0062]** En otra realización, la descripción se refiere a un procedimiento para mejorar los síntomas de la osteoporosis, que comprende administrar a un paciente en necesidad de dicho tratamiento de un compuesto de Fórmula I en cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento en una dosis diaria que es inferior o igual a 5 mg. En una realización específica, el Compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1.
- 25 **[0063]** En otra realización, la descripción se refiere a un procedimiento para mejorar los síntomas de la osteoporosis, que comprende administrar a un paciente en necesidad de dicho tratamiento de un compuesto de Fórmula I en cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento en una dosis diaria que es 0,01 mg a 25 mg. En una realización específica, el Compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1.
- 30 **[0064]** En otra realización, la descripción se refiere a un procedimiento para mejorar los síntomas de la osteoporosis, que comprende administrar a un paciente en necesidad de dicho tratamiento de un compuesto de Fórmula I en cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento en una dosis diaria que es 0,1 mg a 15 mg. En una realización específica, el Compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1.
- 35 **[0065]** En otra realización, la descripción se refiere a un procedimiento para mejorar los síntomas de la osteoporosis, que comprende administrar a un paciente en necesidad de dicho tratamiento de un compuesto de Fórmula I en cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento en una dosis diaria que es 1 mg a 10 mg. En una realización específica, el Compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1.
- 40 **[0066]** En otra realización, la descripción se refiere a un procedimiento para reducir la gravedad de la osteoporosis en pacientes que han sido tratados o que se someten a tratamiento para el cáncer de mama o cáncer de próstata que comprende administrar a un paciente en necesidad de dicho tratamiento un compuesto de Fórmula I en cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento en una dosis diaria que es inferior o igual a 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, o 5 mg. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de mama, 45 cáncer de próstata, cáncer de hueso y/o tumores óseos. En una realización específica, el Compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1. En una realización específica, el Compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1 y la dosis está entre 0,01 y 25 mg.
- 50 **[0067]** En otra realización, la descripción se refiere a un procedimiento para mejorar la deposición anormal de hueso no estructurado acompañado por el aumento de las fracturas del esqueleto, la compresión de la médula espinal, y el dolor óseo grave de la osteoporosis, que comprende administrar a un paciente en necesidad de dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I en cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento en una dosis diaria que es inferior o igual a 1100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, o 5 mg. En una realización específica, el Compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1 y la 55 dosis está entre 0,01 y 25 mg.
- 60 **[0068]** Tal como se indica anteriormente, la capacidad del compuesto de Fórmula I para tratar, mejorar, o reducir la gravedad de la osteoporosis se puede determinar cualitativa y cuantitativamente usando diversos marcadores circulantes o urinarios. En algunas realizaciones, los marcadores útiles para la monitorización individual de los 65 pacientes osteoporóticos tratados con agentes contra la resorción se pueden seleccionar entre fosfatasa alcalina total en suero, fosfatasa alcalina específica del hueso en suero, osteocalcina en suero, procolágeno de tipo 1 en suero (C-terminal/N-terminal): C1NP o P1NP [para monitorizar la formación de hueso], hidroxiprolina urinaria, piridinolina total urinaria (PYD), desoxipiridinolina libre urinaria (DPD), telopéptidos N-terminales reticulados de colágeno tipo 1 (NTx) urinarios, telopéptidos C-terminales reticulados de colágeno tipo 1 (CTX) urinarios o en suero, sialoproteína ósea (BSP), y fosfatasa ácida 5b resistente a tartrato (TRACP-5b) [para monitorizar la resorción ósea].

[0069] En una realización particular, el marcador es CTx. CTx es la porción de colágeno de tipo 1 que se escinde por los osteoclastos durante la resorción ósea, y por lo tanto sus niveles en suero se considera que son proporcionales a la actividad osteoclástica en el momento que se extrae la muestra de sangre. En consecuencia, CTx en suero se usa ampliamente para controlar los efectos de los bisfosfonatos en el hueso (Marx et al, 2007). El subestudio del recambio óseo de la prueba de Evaluación de la reducción de la fractura de denosumab en Osteoporosis cada 6 meses (FREEDOM) incluyó 160 mujeres asignadas al azar a inyecciones subcutáneas de denosumab (60 mg) o de placebo cada 6 meses durante 3 años. Un mes después de la inyección, los niveles séricos de CTx en todos los sujetos tratados con denosumab disminuyeron a niveles por debajo del intervalo de referencia premenopáusico. Además, hubo una correlación significativa entre la reducción de CTx y el aumento de la densidad mineral ósea en los sujetos tratados con denosumab (Eastell et al, 2011). Además de estos efectos sobre CTx, en un estudio de Fase 1, una inyección subcutánea de denosumab suprimió los NTx urinarios de una manera dependiente de la dosis en hasta un 81% en las mujeres posmenopáusicas durante el tiempo de 6 meses (Bekker et al, 2004).

[0070] En otra realización, el marcador es TRACP-5b

[0071] En pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración metastásico, la administración del Compuesto 1 se asoció con una disminución en plasma de CTx independientemente de si los sujetos fueron tratados previamente con bisfosfonatos (Hussain et al, 2011). Se observaron efectos similares con el Compuesto 1 en pacientes sin metástasis óseas conocidas (Gordon et al, 2011), donde el uso previo de bisfosfonatos era presumiblemente para tratar pacientes con osteoporosis. La capacidad del compuesto 1 para reducir los niveles de CTX en plasma en los pacientes, independientemente del tratamiento previo con bisfosfonatos e independientemente de la presencia de lesiones óseas metastásicas sugiere un efecto potente en el bloqueo del recambio óseo anormal.

[0072] Por lo tanto, en otra realización, la descripción se refiere a un procedimiento para disminuir los CTx en plasma en un paciente que sufre de osteoporosis, que comprende administrar a un paciente en necesidad de dicho tratamiento un compuesto de Fórmula I en cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento en una dosis diaria que es inferior o igual a 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, o 5 mg una vez al día. En una realización específica, el Compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1 y la dosis está entre 0,01 y 25 mg.

[0073] En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento de pronóstico para la osteoporosis en un sujeto, que comprende:

- (a) medir el nivel de P1NP, CTx o TRACP 5b en una muestra del sujeto;
- (b) comparar el nivel de P1NP, CTx o TRACP 5b medida en la etapa (a) con un nivel estándar de P1NP, CTx o TRACP 5b para determinar si la muestra del sujeto tiene niveles aberrantes de P1NP, CTx o TRACP 5b;
- (c) seleccionar un régimen de tratamiento con el Compuesto de Fórmula I, la, o 1 basado en los niveles aberrantes de P1NP, CTx o TRACP 5b o administrar el compuesto de Fórmula I, la, o 1 de acuerdo con el régimen de tratamiento, de manera que la osteoporosis es inhibida en el sujeto.

[0074] En otra realización, la descripción proporciona un procedimiento para estimular la diferenciación y/o actividad de osteoblastos en un paciente en necesidad de dicho tratamiento, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I, la, o el Compuesto 1 en cualquiera de las realizaciones descritas en este documento en una dosis diaria que es inferior o igual a 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, o 5 mg una vez al día. En una realización específica, el Compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1 y la dosis está entre 0,01 y 25 mg una vez al día.

[0075] En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para estimular la formación de hueso en un paciente en necesidad de dicho tratamiento, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I, la, o el Compuesto 1 en cualquiera de las realizaciones descritas en este documento en una dosis diaria que es inferior o igual a 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 o 5 mg una vez al día. En una realización específica, el Compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1 y la dosis está entre 0,01 y 25 mg una vez al día.

[0076] En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para inhibir la diferenciación de osteoclastos en un paciente en necesidad de dicho tratamiento, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I, la, o el Compuesto 1 en cualquiera de las realizaciones descritas en este documento en una dosis diaria que es inferior o igual a 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 o 5 mg una vez al día. En una realización específica, el Compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1 y la dosis está entre 0,01 y 25 mg una vez al día.

[0077] En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para modular el recambio óseo hacia la formación de hueso en un paciente en necesidad de dicho tratamiento, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I, la, o el Compuesto 1 en cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento en una dosis diaria que es inferior o igual a 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, o 5 mg una vez al día. En una realización específica, el Compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1 y la dosis está entre 0,01 y 25 mg una vez al día.

[0078] En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para el tratamiento de la osteoporosis en pacientes ovariectomizadas, que comprende administrar a la paciente una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I, Ia, o el Compuesto 1 en cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento en una dosis diaria que es inferior o igual a 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, o 5 mg una vez al día. En una realización específica, el Compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1 y la dosis está entre 0,01 y 25 mg una vez al día.

[0079] En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para modular el recambio óseo hacia la formación de hueso en pacientes ovariectomizadas, que comprende administrar a la paciente una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I, Ia, o el Compuesto 1 en cualquiera de las realizaciones descritas en este documento en una dosis diaria que es inferior o igual a 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, o 5 mg una vez al día. En una realización específica, el Compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1 y la dosis está entre 0,01 y 25 mg una vez al día.

[0080] En otra realización, la descripción proporciona un procedimiento para tratar la osteoporosis en un paciente que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I, Ia, o el Compuesto 1 en cualquiera de las realizaciones descritas en este documento en una dosis diaria que es inferior o igual a 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, o 5 mg una vez al día. En una realización, el tratamiento da lugar a la estimulación de la diferenciación de osteoblastos. En otra realización, el tratamiento da lugar a la estimulación de la formación de hueso. En otra realización, el tratamiento da lugar a la inhibición de la diferenciación y/o actividad de los osteoclastos. En otra realización, el tratamiento da lugar a una modulación del recambio hacia la formación de hueso. En éstas y otras realizaciones, el compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1 y la dosis está entre 0,01 y 25 mg una vez al día.

Administración

[0081] La administración del compuesto de Fórmula I, Fórmula Ia, o el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en forma pura o en una composición farmacéutica apropiada, puede llevarse a cabo a través de cualquiera de los modos aceptados de administración o agentes para servir en utilidades similares. De este modo, la administración puede ser, por ejemplo, por vía oral, nasal, parenteral (intravenosa, intramuscular, o subcutánea), tópica, transdérmica, intravaginal, intravesical, intracisternal, o rectal, en forma de polvo sólido, semisólido, liofilizado, o formas de dosificación líquidas, tales como, por ejemplo, comprimidos, supositorios, píldoras, dosis de gelatina elástica blandas y duras (que puede ser en cápsulas o comprimidos), polvos, soluciones, suspensiones, o aerosoles, o similares, específicamente en formas de dosificación unitaria adecuadas para la administración simple de dosis precisas.

[0082] Las composiciones incluirán un portador o excipiente farmacéutico convencional y un compuesto de Fórmula I como el/un agente activo, y, además, pueden incluir portadores y adyuvantes, etc.

[0083] Los adyuvantes incluyen agentes conservantes, humectantes, de suspensión, edulcorantes, aromatizantes, perfumantes, emulsionantes, y dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos se puede asegurar mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, cloruro de sodio, y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede ser provocada por el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

[0084] Si se desea, una composición farmacéutica del compuesto de Fórmula I también puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH, antioxidantes, y similares, tales como, por ejemplo, ácido cítrico, monolaurato de sorbitano, oleato de trietanolamina, hidroxitolueno butilado, etc.

[0085] La elección de la composición depende de varios factores, tales como el modo de administración del fármaco (por ejemplo, para la administración oral, las composiciones en forma de comprimidos, píldoras o cápsulas) y la biodisponibilidad de la sustancia fármaco. Recientemente, las composiciones farmacéuticas han sido desarrolladas especialmente para fármacos que muestran una mala biodisponibilidad basándose en el principio de que la biodisponibilidad puede aumentarse aumentando el área superficial, es decir, disminuyendo el tamaño de partícula. Por ejemplo, la patente de los Estados Unidos. No. 4.107.288 describe una composición farmacéutica que tiene partículas en el intervalo de tamaño de 10 a 1.000 nm en que el material activo está soportado en una matriz reticulada de macromoléculas. La patente de Estados Unidos. No. 5.145.684 describe la producción de una composición farmacéutica en la que la sustancia fármaco se pulveriza en nanopartículas (tamaño promedio de partícula de 400 nm) en presencia de un modificador de superficie y, a continuación, se dispersa en un medio líquido para dar una composición farmacéutica que presenta una biodisponibilidad notablemente alta.

[0086] Las composiciones adecuadas para inyección parenteral pueden comprender soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones estériles, acuosas o no acuosas, fisiológicamente aceptables, y polvos estériles para reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles. Los ejemplos de portadores, diluyentes, disolventes

o vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (propilenglicol, polietilenglicol, glicerol, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (tales como aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

[0087] Una vía específica de administración es la oral, utilizando un régimen de dosificación diaria conveniente que puede ajustarse de acuerdo con el grado de gravedad del estado de la enfermedad a tratar.

[0088] Las formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos, y gránulos. En tales formas de dosificación sólidas, el compuesto activo se mezcla con al menos un excipiente (o portador) inerte habitual, tal como citrato de sodio o fosfato dicálcico o (a) cargas o extendedores, como por ejemplo, almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, (b) aglutinantes, como por ejemplo, derivados de celulosa, almidón, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma de acacia, (c) humectantes, como por ejemplo, glicerol, (d) agentes disgregantes, como por ejemplo, agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, croscarmelosa sódica, silicatos complejos y carbonato de sodio, (e) retardadores de la solución, como por ejemplo parafina, (f) aceleradores de la absorción, como por ejemplo, compuestos de amonio cuaternario, (g) agentes humectantes, como por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, estearato de magnesio y similares, (h) adsorbentes, como por ejemplo, caolín y bentonita, y (i) lubricantes, como por ejemplo, talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio, o mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos, y píldoras, las formas de dosificación también pueden comprender agentes tamponantes.

[0089] Las formas de dosificación sólidas como se describen anteriormente se pueden preparar con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros bien conocidos en la técnica. Pueden contener agentes de opacificación, y también pueden ser de una composición tal que liberen el compuesto o compuestos activos en una cierta parte del tracto intestinal de una manera retardada. Ejemplos de composiciones embebidas que pueden usarse son sustancias poliméricas y ceras. Los compuestos activos también pueden estar en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes mencionados anteriormente.

[0090] Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes, y elixires farmacéuticamente aceptables. Tales formas de dosificación se preparan, por ejemplo, disolviendo, dispersando, etc., el compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y adyuvantes farmacéuticos opcionales en un portador, tales como, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol y similares; agentes solubilizantes y emulsionantes, como por ejemplo, alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida; aceites, en particular, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de germen de maíz, aceite de oliva, aceite de ricino y aceite de sésamo, glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán; o mezclas de estas sustancias, y similares, para formar de este modo una solución o suspensión.

[0091] Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión, como por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, o mezclas de estas sustancias, y similares.

[0092] Las composiciones para administración rectal son, por ejemplo, supositorios que pueden prepararse mezclando el compuesto de Fórmula I con, por ejemplo, excipientes o portadores no irritantes adecuados, tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera de supositorio, que son sólidos a temperaturas ordinarias, pero líquidos a la temperatura corporal y por lo tanto, se funden mientras están en una cavidad corporal adecuada y liberan el componente activo de los mismos.

[0093] Las formas de dosificación para la administración tópica del compuesto de Fórmula I incluyen pomadas, polvos, pulverizaciones, e inhalantes. El componente activo se mezcla en condiciones estériles con un portador fisiológicamente aceptable y cualquier conservante, tampón, o propelente que puedan ser necesarios. Las composiciones oftálmicas, pomadas oculares, polvos y soluciones también se contemplan dentro del alcance de esta descripción.

[0094] Los gases comprimidos pueden utilizarse para dispersar el compuesto de Fórmula I en forma de aerosol. Los gases inertes adecuados para este propósito son nitrógeno, dióxido de carbono, etc.

[0095] Generalmente, dependiendo del modo pretendido de administración, las composiciones farmacéuticamente aceptables contendrán aproximadamente del 1% a aproximadamente el 99% en peso de un compuesto o compuestos de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y del 99% al 1% en peso de un excipiente farmacéutico adecuado. En un ejemplo, la composición estará entre aproximadamente el 5% y aproximadamente el 75% en peso de un compuesto o compuestos de fórmula I, fórmula Ia, o el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, siendo el resto excipientes farmacéuticos adecuados.

[0096] Los procedimientos reales para preparar tales formas de dosificación son conocidos, o serán evidentes, para los expertos en esta técnica; por ejemplo, véase Remington Pharmaceutical Sciences, 18a Ed., (Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990). La composición a administrar contendrá, en cualquier caso, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para el tratamiento de un estado de la enfermedad de acuerdo con las enseñanzas de esta descripción.

[0097] Los compuestos de esta descripción, o sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz que variará dependiendo de una variedad de factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de acción del compuesto, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el modo y tiempo de administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad de los estados de la enfermedad particulares, y el huésped sometido a terapia. El compuesto de Fórmula I, Fórmula Ia, o el Compuesto 1, se puede administrar a un paciente a niveles de dosificación en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1000 mg por día, y desde aproximadamente 1 a aproximadamente 150 mg por día. Para un adulto humano normal que tiene un peso corporal de aproximadamente 70 kilogramos, una dosificación en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal por día es un ejemplo. La dosificación específica usada, sin embargo, puede variar. Por ejemplo, la dosificación puede depender de un número de factores incluyendo los requisitos del paciente, la gravedad de la afección a tratar, y la actividad farmacológica del compuesto que se utiliza. La determinación de las dosificaciones óptimas para un paciente particular es bien conocida para un experto en la técnica.

[0098] En otras realizaciones, el compuesto de fórmula I, fórmula Ia, o el Compuesto 1, se puede administrar al paciente simultáneamente con otros tratamientos contra el cáncer. Tales tratamientos incluyen otros agentes quimioterapéuticos del cáncer, la terapia de reemplazo hormonal, la terapia de radiación, o inmunoterapia, entre otros. La elección de otra terapia dependerá de un número de factores incluyendo la estabilidad metabólica y la duración de acción del compuesto, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el modo y tiempo de administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad de los estados de la enfermedad particulares, y el huésped sometido a terapia.

[0099] En una realización, el compuesto de Fórmula I, Fórmula Ia, o el Compuesto 1 se administra por vía oral como una cápsula. En otra realización, el Compuesto 1 se administra por vía oral como una cápsula. La cápsula puede contener 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, o 5 mg o menos de Compuesto 1. En una realización, la dosis está entre 0,01 y 25 mg.

[0100] En otra realización, el compuesto de fórmula I, fórmula Ia, o el Compuesto 1 se administra por vía oral como un comprimido.

[0101] En otra realización, el Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del Compuesto 1 se administra por vía oral como un comprimido conforme a lo dispuesto en la tabla siguiente.

Ingrediente	(% p/p)
Compuesto 1	31,68
Celulosa microcristalina	38,85
Lactosa anhidra1	9,42
Hidroxipropil Celulosa	3,00
Croscarmelosa de sodio	3,00
Total intragranular	95,95
Dióxido de silicio, coloidal	0,30
Croscarmelosa de sodio	3,00
Estearato de magnesio	0,75
Total	100,00

[0102] En otra realización, el Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del Compuesto 1 se administra por vía oral como un comprimido conforme a lo dispuesto en la tabla siguiente.

Ingrediente	(% p/p)
Compuesto 1	25,00-33,3
Celulosa microcristalina	c.s.
Hidroxipropil Celulosa	3
Poloxámero	0-3
Croscarmelosa de sodio	6,00
Dióxido de silicio, coloidal	0,5
Estearato de magnesio	0,5-1,0
Total	100

[0103] En otra realización, el Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del Compuesto 1 se administra por vía oral como un comprimido conforme a lo dispuesto en la tabla siguiente.

Ingrediente	(% p/p)
Compuesto 1	100,0
Celulosa microcristalina PH-102	155,4
Lactosa anhidra 60M	77,7
Hidroxipropil Celulosa, EXF	12,0
Croscarmelosa de sodio	24
Dióxido de silicio coloidal	1,2
Estearato de magnesio (no bovino)	3,0
Opadry amarillo	16,0
Total	416

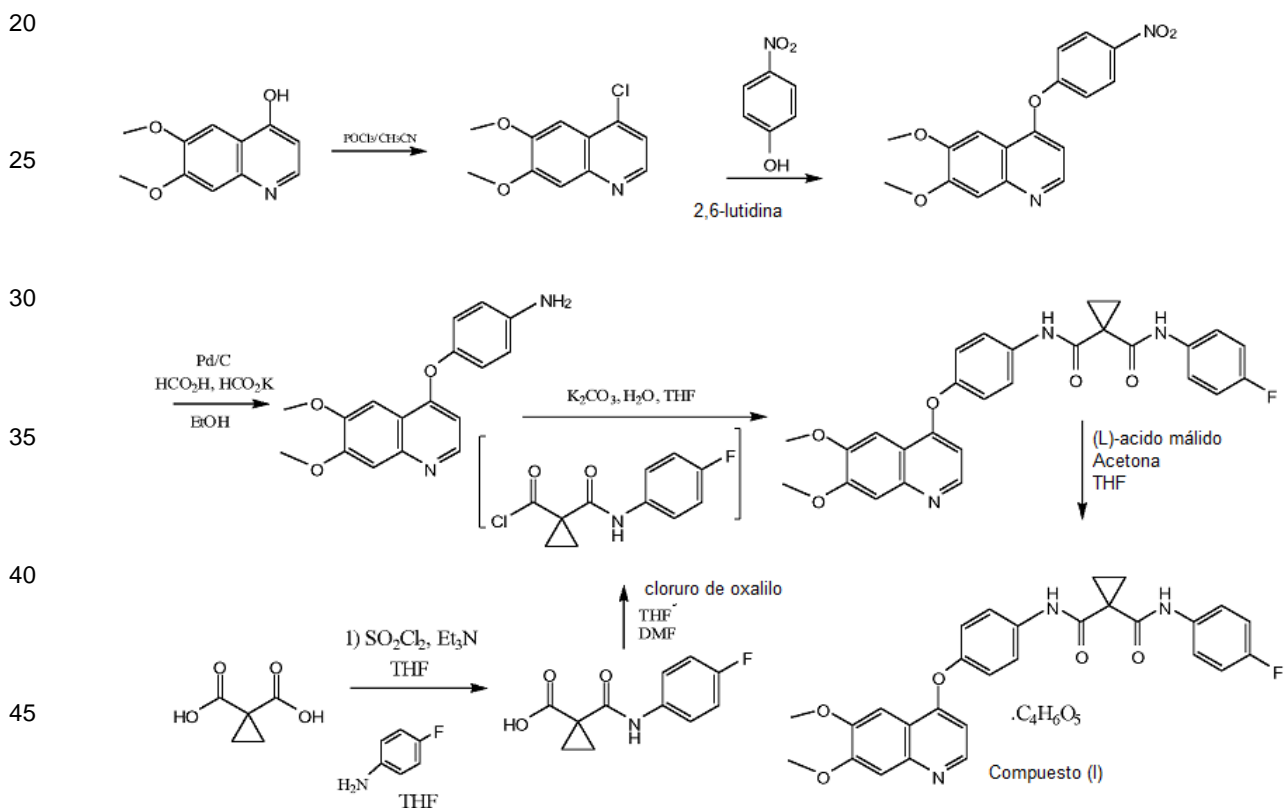
5 [0104] Las formulaciones de comprimidos descritas anteriormente pueden adaptarse para proporcionar una dosis oral de 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, o 5 mg o menos de Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del Compuesto 1. En una realización, la dosis está entre 0,01 y 25 mg.

Preparación del compuesto 1

10 [0105] Preparación de N-(4-([6,7-bis(metiloxi)quinolin-4-il]oxi)fenil)-N'-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida y la sal (L)-malato de la misma.

15 [0106] La ruta sintética usada para la preparación de N-(4-([6,7-bis(metiloxi)quinolin-4-il]oxi)fenil)-N'-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida y la sal (L)-malato de la misma se representa en el Esquema 1:

Esquema 1



Preparación de 4-cloro-6,7-dimetoxi-quinolina

[0107] En un reactor se cargó secuencialmente 6,7-dimetoxi-quinolina-4-ol (10,0 kg) y acetonitrilo (64,0 l). La mezcla resultante se calentó a aproximadamente 65°C y se añadió oxiclورو de fósforo (POCl₃, 50,0 kg). Después de la adición de POCl₃, la temperatura de la mezcla de reacción se elevó a aproximadamente 80°C. La reacción se

consideró completa (aproximadamente 9,0 horas) cuando permanecía menos del 2 por ciento del material de partida (en el análisis en el proceso mediante cromatografía líquida de alto rendimiento [HPLC]). La mezcla de reacción se enfrió hasta aproximadamente 10°C y después se inactivó en una solución enfriada de diclorometano (DCM, 238,0 kg), 30% de NH₄OH (135,0 kg), y hielo (440,0 kg). La mezcla resultante se calentó hasta aproximadamente 14°C, y las

5

Preparación de 6,7-dimetil-4-(4-nitro-fenoxi)-quinolina

[0108] En un reactor se cargó secuencialmente 4-cloro-6,7-dimetoxi-quinolina (8,0 kg), 4-nitrofenol (7,0 kg), 4-dimetilaminopiridina (0,9 kg), y 2,6-lutidina (40,0 kg). El contenido del reactor se calentó hasta aproximadamente 147°C. Cuando la reacción fue completa (menos de 5 por ciento de material restante determinado por análisis en proceso mediante HPLC, aproximadamente 20 horas de partida), el contenido del reactor se dejó enfriar hasta aproximadamente 25°C. Se añadió metanol (26,0 kg), seguido por carbonato de potasio (3,0 kg) disuelto en agua (50,0 kg). El contenido del reactor se agitó durante aproximadamente 2 horas. El precipitado sólido resultante se filtró, se lavó con agua (67,0 kg), y se secó a 25°C durante aproximadamente 12 horas para proporcionar el compuesto del título (4,0 kg).

15

20

Preparación de 4-(6,7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenilamina

[0109] Se añadió una solución que contenía formiato de potasio (5,0 kg), ácido fórmico (3,0 kg), y agua (16,0 kg) a una mezcla de 6,7-dimetoxi-4-(4-nitro-fenoxi)-quinolina (4,0 kg), 10 por ciento de paladio sobre carbono (50 por ciento de agua en húmedo, 0,4 kg) en tetrahidrofurano (THF, 40,0 kg) que se había calentado hasta aproximadamente 60°C. La adición se llevó a cabo de tal manera que la temperatura de la mezcla de reacción se mantuvo aproximadamente a 60°C. Cuando la reacción se consideró completa determinado usando análisis en proceso mediante HPLC (menos de 2 por ciento del material de partida restante, habitualmente de 15 horas), se filtró el contenido del reactor. El filtrado se concentró por destilación al vacío a aproximadamente 35°C hasta la mitad de su volumen original, que dio como resultado la precipitación del producto. El producto se recuperó por filtración, se lavó con agua (12,0 kg) y se secó bajo vacío a aproximadamente 50°C para proporcionar el compuesto del título (3,0 kg; 97 por ciento del área bajo la curva (AUC)).

25

30

Preparación de ácido 1-(4-fluoro-fenilcarbamoil)ciclopropancarboxílico

[0110] Se añadió trietilamina (8,0 kg) a una solución enfriada (aproximadamente 4°C) de ácido ciclopropano-1,1-dicarboxílico disponible comercialmente (2,1, 10,0 kg) en THF (63,0 kg) a una velocidad tal que la temperatura del lote no excedía los 10°C. La solución se agitó durante aproximadamente 30 minutos, y después se añadió cloruro de tionilo (9,0 kg), manteniendo la temperatura del lote por debajo de 10°C. Cuando la adición fue completa, se añadió una solución de 4-fluoroanilina (9,0 kg) en THF (25,0 kg) a una velocidad tal que la temperatura del lote no excedía los 10°C. La mezcla se agitó durante aproximadamente 4 horas y después se diluyó con acetato de isopropilo (87,0 kg). Esta solución se lavó secuencialmente con hidróxido de sodio acuoso (2,0 kg disueltos en 50,0 l de agua), agua (40,0 L), y cloruro de sodio acuoso (10,0 kg disueltos en 40,0 l de agua). La solución orgánica se concentra por destilación al vacío seguido de la adición de heptano, que dio como resultado la precipitación de un sólido. El sólido se recuperó por centrifugación y después se secó a aproximadamente 35°C bajo vacío para proporcionar el compuesto del título. (10,0 kg).

40

45

Preparación de cloruro de 1-(4-fluoro-fenilcarbamoil)-ciclopropancarbonilo

[0111] Se añadió cloruro de oxalilo (1,0 kg) a una solución de ácido 1-(4-fluoro-fenilcarbamoil)ciclopropancarboxílico (2,0 kg) en una mezcla de THF (11 kg) y N,N-dimetilformamida (DMF; 0,02 kg) a una velocidad tal que la temperatura del lote no excedía los 30°C. Esta solución se usó en la siguiente etapa sin más procesamiento.

50

55

Preparación de N-(4-[[6,7-bis(metiloxi)quinolin-4-il]oxi]fenil)-N'-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida

[0112] La solución de la etapa anterior que contenía cloruro de 1-(4-fluoro-fenilcarbamoil)-ciclopropancarbonilo se añadió a una mezcla de 4-(6,7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenilamina (3,0 kg) y carbonato de potasio (4,0 kg) en THF (27,0 kg) y agua (13,0 kg) a una velocidad tal que la temperatura del lote no excedía los 30°C. Cuando la reacción fue completa (habitualmente en 10 minutos), se añadió agua (74,0 kg). La mezcla se agitó a 15-30°C durante aproximadamente 10 horas, lo que dio lugar a la precipitación del producto. El producto se recuperó por filtración, se lavó con una solución prefabricada de THF (11,0 kg) y agua (24,0 kg), y se secó a aproximadamente 65°C bajo vacío durante aproximadamente 12 horas para proporcionar el compuesto del título (base libre, 5,0 kg). RMN ¹H (400 MHz, d₆-DMSO): δ 10,2 (s, 1H), 10,05 (s, 1H), 8,4 (s, 1H), 7,8 (m, 2H), 7,65 (m, 2H), 7,5 (s, 1H), 7,35 (s, 1H), 7,25 (m, 2H), 7,15 (m, 2H), 6,4 (s, 1H), 4,0 (d, 6H), 1,5 (s, 4H). LC/MS: M +H = 502.

60

65

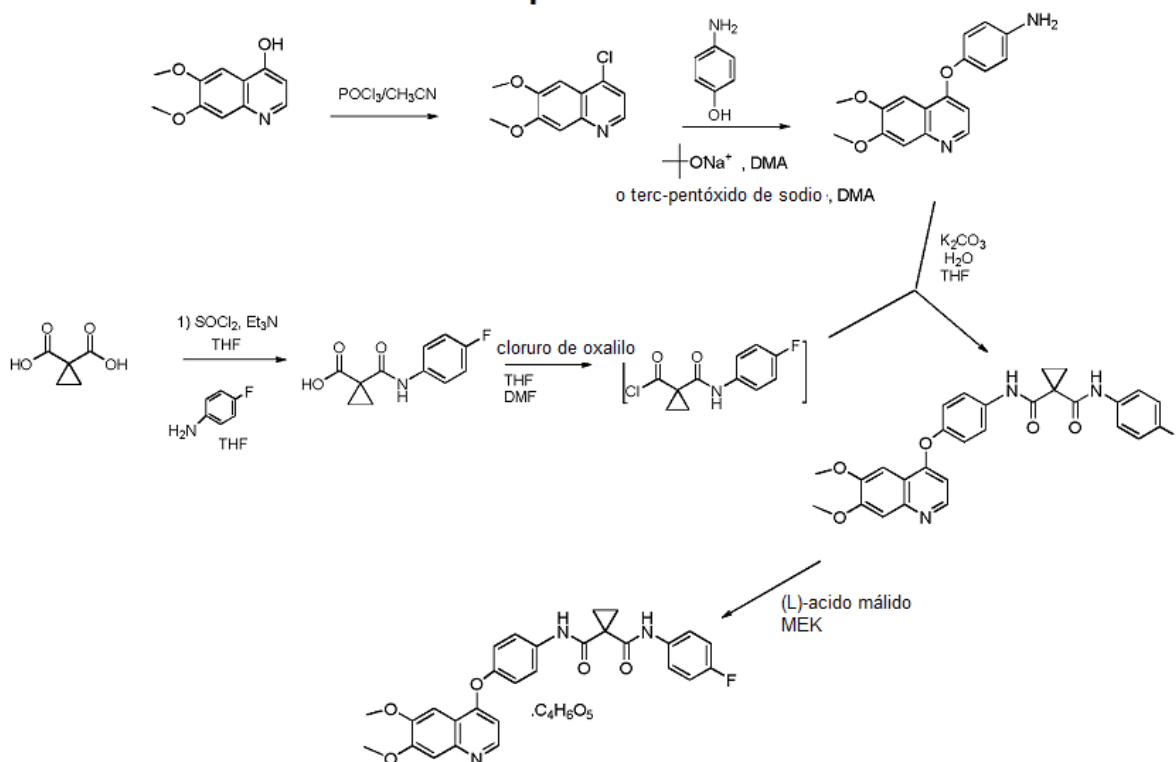
Preparación de N-(4-{[6,7-bis(metilo)quinolin-4-il]oxi}fenil)-N'-(4-fluorofenil) ciclopropano-1,1-dicarboxamida, sal de (L)-malato

[0113] Se añadió una solución de ácido L-málico (2,0 kg) en agua (2,0 kg) a una solución de base libre de (4-fluoro-fenil)-amida de la [4-(6,7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenil]-amida del ácido ciclopropan-1,1-dicarboxílico (15,5,0 kg) en etanol, manteniendo una temperatura de lote de aproximadamente 25°C. a continuación, se añadieron carbono (0,5 kg) y tior sílice (0,1 kg) y la mezcla resultante se calentó hasta aproximadamente 78°C, momento en que se añadió agua (6,0 kg). Se filtró entonces la mezcla de reacción, seguido de la adición de isopropanol (38,0 kg), y se dejó enfriar hasta aproximadamente 25°C. El producto se recuperó por filtración y se lavó con isopropanol (20,0 kg), y se secó a aproximadamente 65°C para proporcionar el compuesto del título (5,0 kg).

Preparación alternativa de N-(4-{[6,7-bis(metilo)quinolin-4-il]oxi}fenil)-N'-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxamida y la sal (L)-malato de la misma.

[0114] Una ruta sintética alternativa que se puede utilizar para la preparación de N-(4-{[6,7-bis(metilo)quinolin-4-il]oxi}fenil)-N'-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxamida y la sal (L)-malato de la misma se representa en el Esquema 2.

Esquema 2



Preparación de 4-cloro-6,7-dimetoxi-quinolina

[0115] En un reactor se cargó secuencialmente 6,7-dimetoxi-quinolina-4-ol (47,0 kg) y acetonitrilo (318,8 kg). La mezcla resultante se calentó hasta aproximadamente 60°C y se añadió oxiclورو de fósforo (POCl₃, 130,6 kg). Después de la adición de POCl₃, la temperatura de la mezcla de reacción se elevó hasta aproximadamente 77°C. La reacción se consideró completa (aproximadamente 13 horas) cuando permanecía menos del 3% del material de partida (análisis en el proceso mediante de cromatografía líquida de alto rendimiento [HPLC]). La mezcla de reacción se enfrió hasta aproximadamente 2-7°C y después se inactivó en una solución enfriada de diclorometano (DCM, 482,8 kg), NH₄OH al 26% (251,3 kg), y agua (900 l). La mezcla resultante se calentó hasta aproximadamente 20-25°C, y las fases se separaron. La fase orgánica se filtró a través de un lecho de AW Hyflo super-cel NF (Celite; 5,4 kg) y el lecho del filtro se lavó con DCM (118,9 kg). La fase orgánica combinada se lavó con solución acuosa saturada de cloruro sódico (282,9 kg) y se mezcló con agua (120 L). Las fases se separaron y la fase orgánica se concentró por destilación al vacío con la eliminación del disolvente (aproximadamente 95 l de volumen residual). Se cargó DCM (686,5 kg) en el reactor que contenía la fase orgánica y se concentró por destilación al vacío con la eliminación del disolvente (aproximadamente 90 l de volumen residual). A continuación, se cargó metil t-butil éter (MTBE, 226,0 kg) y la temperatura de la mezcla se ajustó hasta -20 a -25°C y se mantuvo durante 2,5 horas dando como resultado un precipitado sólido que a continuación se filtró y lavó con n-heptano (92,0 kg) y se secó sobre un filtro a aproximadamente 25°C bajo nitrógeno para producir el compuesto del título. (35,6 kg).

Preparación de 4-(6,7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenilamina

[0116] Se cargó 4-aminofenol (24,4 kg) disuelto en N,N-dimetilacetamida (DMA, 184,3 kg) a un reactor que contenía 4-cloro-6,7-dimetoxiquinolona (35,3 kg), t-butoxido de sodio (21,4 kg) y DMA (167,2 kg) a 20-25°C. A continuación se calentó esta mezcla hasta 100-105°C durante aproximadamente 13 horas. Después de que la reacción se consideró completa tal como se determina usando análisis en proceso HPLC (permanece menso del 2 por ciento del material de partida), el contenido del reactor se enfrió a 15-20°C y se cargó agua (preenfriada, 2-7°C, 587 l) a una velocidad para mantener la temperatura de 15-30°C. El precipitado sólido resultante se filtró, se lavó con una mezcla de agua (47 l) y DMA (89,1 kg) y finalmente con agua (214 L). La torta de filtración se secó a aproximadamente 25°C en el filtro para producir 4-(6,7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenilamina crudo (59,4 kg húmedo, 41,6 kg seco calculada basado en LOD). La 4-(6,7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenilamina cruda se puso en reflujo (aproximadamente 75°C) en una mezcla de tetrahidrofurano (THF, 211,4 kg) y DMA (108,8 kg) durante aproximadamente 1 hora a 0-5°C y se envejeció durante aproximadamente 1 hora, después de lo cual el sólido se filtró, se lavó con THF (147,6 kg) y se secó sobre un filtro al vacío a aproximadamente 25°C para producir 4-(6,7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenilamina (34,0 kg).

Preparación alternativa de 4-(6,7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenilamina

[0117] Se cargaron 4-cloro-6,7-dimetoxiquinolona (34,8 kg) y 4-aminofenol (30,8 kg) y terc-pentóxido de sodio (1,8 equivalentes) 88,7 kg, 35 por ciento en peso en THF) en un reactor, seguido por N,N-dimetilacetamida (DMA, 293,3 kg). A continuación se calentó esta mezcla hasta 105-115°C durante aproximadamente 9 horas. Después de que la reacción se consideró completa tal como se determina usando análisis en proceso mediante HPLC (permanecía menos de 2 por ciento del material de partida), el contenido del reactor se enfrió a 15-25°C y se añadió durante un período de dos horas mientras que el agua (315 kg) mantenía la temperatura entre 20-30°C. La mezcla de reacción se agitó durante una hora adicional a 20-25°C. El producto bruto se recogió por filtración y se lavó con una mezcla de 88 kg de agua y 82,1 kg de DMA, seguido por 175 kg de agua. El producto se secó en un secador de filtro durante 53 horas. El LOD mostró menos de 1 por ciento p/p.

[0118] En un procedimiento alternativo, se usaron 1,6 equivalentes de terc-pentóxido de sodio y la temperatura de reacción se aumentó de 110-120°C. Además, el enfriamiento de temperatura aumentó a 35-40°C y la temperatura de inicio de la adición de agua se ajustó a 35-40°C, con una exotermia permitida hasta 45°C.

Preparación de ácido 1-(4-fluoro-fenilcarbamoil)ciclopropancarboxílico

[0119] Se añadió trietilamina (19,5 kg) a una solución enfriada (aproximadamente 5°C) de ácido ciclopropan-1,1 dicarboxílico (24,7 kg) en THF (89,6 kg) a una velocidad tal que la temperatura del lote no excedía los 5°C. La solución se agitó durante aproximadamente 1,3 horas, y después se añadió cloruro de tionilo (23,1 kg), manteniendo la temperatura del lote por debajo de 10°C. Cuando la adición fue completa, la solución se agitó durante aproximadamente 4 horas manteniendo la temperatura por debajo de 10°C. A continuación, se añadió una solución de 4-fluoroanilina (18,0 kg) en THF (33,1 kg) a una velocidad tal que la temperatura de la carga no excedía los 10°C. La mezcla se agitó durante aproximadamente 10 horas, después de lo cual la reacción se consideró completa. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de isopropilo (218,1 kg). Esta solución se lavó secuencialmente con hidróxido de sodio acuoso (10,4 kg, 50 por ciento disuelto en 119 l de agua) diluido adicionalmente con agua (415 l), después con agua (100 l) y finalmente con cloruro de sodio acuoso (20,0 kg disueltos en 100 l de agua). La solución orgánica se concentró por destilación a vacío (100 l de volumen residual) por debajo de 40°C seguido de la adición de n-heptano (171,4 kg), lo que dio como resultado la precipitación de un sólido. El sólido se recuperó por filtración y se lavó con n-heptano (102,4 kg), lo que dio lugar a ácido 1-(4-fluoro-fenilcarbamoil)ciclopropancarboxílico (29,0 kg) crudo húmedo. El ácido 1-(4-fluoro-fenilcarbamoil)ciclopropancarboxílico crudo se disolvió en metanol (139,7 kg) a aproximadamente 25°C seguido de la adición de agua (320 l), dando lugar a una suspensión que se recuperó por filtración, se lavó secuencialmente con agua (20 l) y n-heptano (103,1 kg) y después se secó en el filtro a aproximadamente 25°C en atmósfera de nitrógeno para proporcionar el compuesto del título (25,4 kg).

Preparación de cloruro de 1-(4-fluoro-fenilcarbamoil)-ciclopropancarbonilo

[0120] Se añadió cloruro de oxalilo (12,6 kg) a una solución de ácido 1-(4-fluoro-fenilcarbamoil)-ciclopropancarboxílico (22,8 kg) en una mezcla de THF (96,1 kg) y N,N-dimetilformamida (DMF; 0,23 kg) a una velocidad tal que la temperatura del lote no supere los 25°C. Esta solución se usó en la siguiente etapa sin más procesamiento.

Preparación alternativa de cloruro de 1-(4-fluoro-fenilcarbamoil)-ciclopropancarbonilo

[0121] Se cargó un reactor con ácido 1-(4-fluoro-fenilcarbamoil)-ciclopropancarboxílico (35 kg), 344 g de DMF, y THF 175 kg. La mezcla de reacción se ajustó a 12-17°C y a continuación a la mezcla de reacción se cargó 19,9 kg de cloruro de oxalilo durante un período de 1 hora. La mezcla de reacción se dejó agitando a 12-17°C durante 3 a 8 horas. Esta solución se usó en la siguiente etapa sin más procesamiento.

Preparación de [4-(6,7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenil]-amida (4-fluoro-fenil)-amida del ácido ciclopropan-1,1-dicarboxílico

5 [0122] Se añadió la solución de la etapa anterior que contenía cloruro de 1-(4-fluoro-fenilcarbamoil)-ciclopropancarbonilo a una mezcla del compuesto 4-(6,7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenilamina (23,5 kg) y carbonato de potasio (31,9 kg) en THF (245,7 kg) y agua (116 l) a una velocidad tal que la temperatura de la carga no exceda de 30°C. Cuando la reacción fue completa (en aproximadamente 20 minutos), se añadió agua (653 l). La mezcla se agitó a 20-25°C durante aproximadamente 10 horas, lo que resultó en la precipitación del producto. El producto se recuperó por filtración, se lavó con una solución prefabricada de THF (68,6 kg) y agua (256 L), y se secó primero en un filtro bajo nitrógeno a aproximadamente 25°C y después a aproximadamente 45°C bajo vacío para proporcionar el compuesto del título (41,0 kg, 38,1 kg, calculado sobre la base de LOD).

15 **Preparación alternativa de [4-(6,7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenil]-amida (4-fluoro-fenil)-amida del ácido ciclopropan-1,1-dicarboxílico**

20 [0123] Se cargó un reactor con 4-(6,7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenilamina (35,7 kg, 1 equivalente), seguido por 412,9 kg de THF. A la mezcla de reacción se cargó una solución de 48,3 K₂CO₃ en 169 kg de agua. La solución de cloruro de ácido descrita en la Preparación alternativa de cloruro de 1-(4-fluoro-fenilcarbamoil)-ciclopropancarbonilo anterior fue transferida al reactor que contenía 4-(6,7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenilamina mientras se mantenía la temperatura entre 20-30°C durante un mínimo de dos horas. La mezcla de reacción se agitó a 20-25°C durante un mínimo de tres horas. A continuación, la temperatura de reacción se ajustó a 30-25°C y la mezcla se agitó. La agitación se detuvo y se dejó que las fases de la mezcla se separaran. La fase acuosa inferior se extrajo y se descartó. A la fase orgánica superior remanente se añadieron 804 kg de agua. La reacción se dejó en agitación a 15-25°C durante un mínimo de 16 horas.

30 [0124] El producto precipitó. El producto se filtró y se lavó con una mezcla de 179 kg de agua y 157,9 kg de THF en dos porciones. El producto crudo se secó bajo vacío durante al menos dos horas. A continuación, el producto seco se recogió en 285,1 kg de THF. La suspensión resultante se transfirió al recipiente de reacción y se agitó hasta que la suspensión se convirtió en una solución clara (disuelta), que requería calentamiento a 30-35°C durante aproximadamente 30 minutos. Se añadió entonces 456 kg de agua a la solución, así como 20 kg de etanol SDAG-1 (etanol desnaturalizado con metanol durante dos horas. La mezcla se agitó a 15-25°C durante al menos 16 horas. El producto se filtró y se lavó con una mezcla de 143 kg de agua y 126,7 THF en dos porciones. El producto se secó en un punto de ajuste de temperatura máxima de 40°C.

35 [0125] En un procedimiento alternativo, la temperatura de reacción durante la formación de cloruro de ácido se ajustó a 10-15°C. La temperatura de recristalización se cambió de 15-25°C a 45-50°C durante 1 hora y después se enfrió a 15-25°C durante 2 horas.

40 **Preparación de [4-(6,7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenil]-amida (4-fluoro-fenil)-amida del ácido ciclopropan-1,1-dicarboxílico, la sal de malato**

45 [0126] Se cargaron [4-(6,7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenil]-amida (4-fluoro-fenil)-amida del ácido ciclopropan-1,1-dicarboxílico (1-5; 13,3 kg), ácido L-málico (4,96 kg), metil etil cetona (MEK; 188,6 kg) y agua (37,3 kg) en un reactor y la mezcla se calentó a reflujo (aproximadamente 74°C) durante aproximadamente 2 horas. La temperatura del reactor se redujo a 50 - 55°C y el contenido del reactor se filtró. Estos pasos secuenciales descritos anteriormente se repitieron dos veces más a partir de cantidades similares de material de partida (13,3 kg), ácido L-málico (4,96 kg), MEK (198,6 kg) y agua (37,2 kg). El filtrado combinado se secó azeotrópicamente a presión atmosférica usando MEK (1133,2 kg) (volumen residual aproximado 711 l; KF ≤ 0,5% p/p) aproximadamente a 74°C. La temperatura del contenido del reactor se redujo a 20 - 25°C y se mantuvo durante aproximadamente 4 horas dando lugar a un precipitado sólido que se filtró, se lavó con MEK (448 kg) y se secó bajo vacío a 50°C para proporcionar el compuesto del título (45,5 kg).

55 **Preparación alternativa de [4-(6,7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenil]-amida (4-fluoro-fenil)-amida del ácido ciclopropan-1,1-dicarboxílico, la sal de (L)-malato**

60 [0127] Se cargaron [4-(6,7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenil]-amida (4-fluoro-fenil)-amida de ácido ciclopropano-1,1-dicarboxílico (47,9 kg), ácido L-málico (17,2), 658,2 kg de metil etil cetona, y 129,1 kg de agua (37,3 kg) en un reactor y la mezcla se calentó 50-55°C durante aproximadamente 1-3 horas, y a continuación 55-60°C para una adición de 4-5 horas. La mezcla se clarificó por filtración a través de un cartucho de 1 µm. La temperatura del reactor se ajustó a 20-25°C y se destiló al vacío con un vacío a 150-200 mm Hg con una temperatura máxima de la camisa de 55°C al intervalo de volumen de 558 a 731 L.

65 [0128] La destilación al vacío se llevó a cabo dos veces más con la carga de 380 kg y 380,2 kg de metil etil cetona, respectivamente. Después de la tercera destilación, el volumen del lote se ajustó a 18 v/p de [4-(6,7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenil]-amida (4-fluoro-fenil)-amida del ácido ciclopropano-1,1-dicarboxílico mediante

la carga de 159,9 kg de metil etil cetona para dar un volumen total de 880 L. Una adición a destilación al vacío se llevó a cabo mediante el ajuste de 245,7 metil etil cetona. La mezcla de reacción se dejó con agitación moderada a 20-25°C durante al menos 24 horas. El producto se filtró y se lavó con 415,1 kg de metil etil cetona en tres porciones. El producto se secó bajo un vacío con el punto de ajuste de temperatura de la camisa a 45°C.

[0129] En un procedimiento alternativo, el orden de adición se cambió de modo que se añadió una solución de 17,7 kg de ácido L-málico disuelto en 129,9 kg de agua a [4-(6,7-dimetoxi quinolina-4-iloxi)]-fenil]amida (4-fluoro-fenil)-amida del ácido ciclopropan-1,1-dicarboxílico (48,7 kg) en etil metil cetona (673,3 kg).

Ejemplo 1

Ensayo de un compuesto 1 en ensayos in vitro de diferenciación y actividad de osteoclastos y osteoblastos

[0130] El objetivo de este estudio fue investigar los efectos de 7 concentraciones del compuesto 1 sobre la diferenciación y la actividad de los osteoclastos humanos y osteoblastos de ratón in vitro. Las siguientes concentraciones fueron probadas: 0,004, 0,012, 0,037, 0,11, 0,33, 1,0 y 3,0 μM . El estudio se realizó utilizando células precursoras de osteoclastos CD34+ derivadas de médula ósea humana que se cultivaron en trozos de hueso bovino, y células osteoprogenitoras KS483 de ratón que fueron inducidas a diferenciarse en osteoblastos que forman el hueso.

[0131] El estudio se realizó en cuatro partes. En la primera parte, las células precursoras de osteoclastos CD34+ derivadas de médula ósea humana se cultivaron en trozos de hueso bovino durante 7 días, después de lo cual los osteoclastos formados se cuantificaron midiendo la actividad de la fosfatasa ácida 5b resistente al tartrato (TRACP 5b) en el medio de cultivo. Este ensayo demuestra los efectos del Compuesto 1 sobre la diferenciación de osteoclastos. La osteoprotegerina (OPG) se incluyó como inhibidor de referencia de la diferenciación de los osteoclastos para demostrar que el sistema de cultivo funciona como se espera.

[0132] En la segunda parte, el medio de cultivo de los osteoclastos humanos se sustituye por medio nuevo en el día 7, y los osteoclastos maduros formados se cultivaron durante 3 días adicionales, lo que les permite reabsorber hueso. El compuesto 1 se añadió al medio de cultivo en el día 7. Este ensayo demuestra los efectos del Compuesto 1 sobre la actividad de resorción ósea de los osteoclastos maduros. Los telopéptidos reticulados C-terminales de colágeno de tipo I (CTX) se midieron en el medio de cultivo recogido en el día 10 para cuantificar la resorción ósea durante los días 7-10. TRACP 5b se midió en el día 7 para cuantificar el número de osteoclastos antes de añadir el compuesto 1. Los valores de CTX fueron divididos por los valores de TRACP 5b, lo que resulta en un índice de resorción que indica la actividad de los osteoclastos promedio. El inhibidor de cisteína proteasa E64 se incluyó como inhibidor de referencia de la actividad de los osteoclastos para demostrar que el sistema de cultivo funciona como se espera.

[0133] En la tercera parte, las células osteoprogenitoras de ratón KS483 se cultivaron durante 8 días, después de lo cual los osteoblastos maduros formados se cuantificaron midiendo la cantidad de actividad intracelular de la fosfatasa alcalina (ALP). Este ensayo demuestra los efectos del Compuesto 1 sobre la diferenciación de los osteoblastos. 17 β -estradiol se incluyó en el estudio como compuesto de referencia que estimula la diferenciación de osteoblastos para demostrar que el sistema de cultivo funciona como se espera.

[0134] En la cuarta parte del estudio, las células osteoprogenitoras de ratón KS483 se cultivaron durante 13 días, durante los cuales el propéptido N-terminal de procolágeno de tipo I (PINP) secretado en el medio de cultivo se determinó en el día 11 para demostrar los efectos sobre la formación de la matriz ósea orgánica, y la cantidad de calcio depositado en la matriz ósea formada se determinó en el día 13 para demostrar los efectos sobre la formación de la matriz ósea inorgánica. Este ensayo de actividad de osteoblastos demuestra los efectos del Compuesto 1 sobre la actividad de formación de hueso de los osteoblastos. 17 β -estradiol se incluyó en el estudio como compuesto de referencia que estimula la diferenciación y la actividad de los osteoblastos para demostrar que el sistema de cultivo funciona como se espera.

[0135] El compuesto 1 mostró una inhibición dependiente de la dosis de la diferenciación de osteoclastos que fue significativa con concentraciones de 0,11, 0,33, 1,0 y 3,0 μM . El análisis microscópico mostró que las concentraciones de 0,11 y 0,33 μM no afectaron el número de células mononucleares positivas Hoechst y TRACP, lo que sugiere la inhibición específica de la diferenciación de osteoclastos. Sin embargo, las concentraciones de 1,0 y 3,0 μM disminuyeron el número de células mononucleares positivas Hoechst y TRACP, lo que sugiere que los efectos inhibidores observados con estas concentraciones son al menos en parte citotóxicos. No se observaron efectos en el ensayo de actividad de los osteoclastos.

[0136] El compuesto 1 mostró una estimulación dependiente de la dosis de la diferenciación y actividad de los osteoblastos. Las concentraciones del compuesto 1 0,012, 0,037, 0,11, 0,33 y 1,0 μM aumentaron y la concentración de 3,0 μM disminuyeron los valores de fosfatasa alcalina en el ensayo de diferenciación de osteoblastos. En el ensayo de actividad de osteoblastos, las concentraciones de 0,012 y 0,037 μM aumentaron los valores de PINP, y las concentraciones de 0,004, 0,012, 0,037 y 0,11 μM aumentaron los valores de calcio. Las concentraciones de 0,33, 1,0 y 3,0 μM disminuyeron los valores de calcio y PINP. Estos resultados demuestran que las concentraciones 0,004,

0,012, 0,037 y 0,11 μM del Compuesto 1 tienen efectos beneficiosos sobre las células óseas, activando la formación de hueso osteoblástico y que no tienen efectos o inhiben la formación de osteoclastos de resorción ósea.

Descripción del estudio

5
 [0137] El objetivo de este estudio fue investigar los efectos del Compuesto 1 seleccionado por el Sponsor en la diferenciación y la actividad de los osteoclastos humanos y osteoblastos de ratón *in vitro*. Los efectos sobre los osteoclastos se estudiaron usando un modelo en el que las células precursoras de osteoclastos humanos derivadas de médula ósea se cultivan sobre trozos de hueso bovino durante 7 días en condiciones que favorecen la diferenciación de los osteoclastos, y se les permitió diferenciarse en osteoclastos de resorción ósea. Después de la terminación de la diferenciación de osteoclastos en el día 7, el medio de cultivo se extrajo y se añadió en los pocillos nuevo medio de cultivo que favorece la actividad de los osteoclastos. Los osteoclastos maduros se cultivaron a continuación durante 3 días adicionales, lo que les permite reabsorber hueso. En el ensayo de diferenciación de los osteoclastos, se añadieron los compuestos de prueba y un inhibidor de la osteoprotegerina de referencia (OPG) en cultivos en el día 0. En el ensayo de actividad de los osteoclastos, se añadieron los compuestos de prueba y un inhibidor de referencia E64 en cultivos en el día 7. Las siete concentraciones en 8 réplicas se probaron en ambos ensayos. La actividad de la fosfatasa ácida 5b resistente al tartrato (TRACP 5b) se midió del medio de cultivo recogido en el día 7 como un índice del número de osteoclastos formados en cada pocillo durante el período de diferenciación. Los telopéptidos reticulados C-terminales de colágeno tipo I (CTX) se midieron del medio de cultivo recogido en el día 10 para cuantificar la resorción ósea durante los días 7-10.

[0138] Los efectos sobre los osteoblastos se estudiaron usando células osteoprogenitoras KS483 de ratón que pueden ser inducidas a diferenciarse en osteoblastos que forman el hueso. 17β -estradiol (E2) se incluyó en el estudio como compuesto de referencia que estimula la diferenciación y la actividad de los osteoblastos, para demostrar que los sistemas de cultivo pueden detectar la estimulación de la diferenciación y actividad de los osteoblastos. En el ensayo de diferenciación de osteoblastos, las células se cultivaron durante 8 días, después de lo cual los osteoblastos maduros formados se cuantificaron midiendo la cantidad de actividad intracelular de la fosfatasa alcalina (ALP). En el ensayo de actividad de los osteoblastos, las células osteoprogenitoras se cultivaron durante 13 días, durante los cuales se determinó el propéptido N-terminal de procolágeno de tipo I (PINP) secretado en el medio de cultivo en el día 11 para demostrar los efectos sobre la formación de la matriz ósea orgánica, y se determinó la cantidad de calcio depositado en la matriz ósea formada en el día 13 para demostrar los efectos sobre la formación de la matriz ósea inorgánica.

[0139] Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos que contenían un grupo de línea de base que incluía vehículo, un grupo de control que incluía el compuesto de referencia, y los grupos que incluían el compuesto de ensayo. Los compuestos de referencia se incluyen para demostrar que los sistemas de ensayo funcionan como se esperaba. En los cultivos de osteoclastos, el estudio fue aprobado si los resultados del grupo de control fueron significativamente más bajos que los resultados del grupo de línea de base. En cultivos de osteoblastos, el estudio fue aprobado si los resultados del grupo de control fueron significativamente más altos que los resultados del grupo de línea de base.

Compuesto 1

[0140] El compuesto 1 se obtiene a partir del Sponsor como un compuesto sólido. El compuesto se suspendió en DMSO a una concentración de 10 mM para obtener una solución madre. La solución madre fresca se fabricó antes de las pruebas, que se almacenó en seco y en oscuridad a temperatura ambiente. Para largo plazo (más de 5 días), la solución madre se almacenó a -70°C . Las diluciones apropiadas se prepararon a partir de la solución madre para obtener las concentraciones de ensayo deseadas; 0,004 μM , 0,012 μM , 0,037 μM , 0,11 μM , 0,33 μM , 1 μM y 3 μM .

Compuestos de referencia

[0141] La osteoprotegerina (OPG, 5 nM, número de catálogo 450-14, obtenida de PeproTech EC Ltd, Londres, Reino Unido) se usó como inhibidor de referencia de la diferenciación de osteoclastos y el inhibidor de cisteína proteasa E64 (1 μM , número de catálogo E-3132, obtenida de Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.) como inhibidor de referencia de la actividad de resorción de los osteoclastos.

[0142] 17β -estradiol (E2; 10 nM, número de catálogo E1024, obtenido de Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.) se utilizó como un estimulador de referencia de la diferenciación y actividad de los osteoblastos.

Procedimiento

Cultivos de osteoclastos

[0143] El procedimiento de cultivo de osteoclastos en trozos de hueso fue descrito originalmente por Boyde y compañeros de trabajo (1984) y por Chambers y compañeros de trabajo (1984). Originalmente, se determinó el número de osteoclastos mediante el cálculo del número de células multinucleares positivas en fosfatasa ácida

(TRACP) resistente a tartrato bajo un microscopio. Más tarde, se demostró que la actividad de TRACP 5b secretada refleja el número de osteoclastos en cultivos de osteoclastos de ratón (Alatalo et al. 2000). Mientras que la actividad TRACP 5b secretada se correlaciona fuertemente con el número de osteoclastos, TRACP 5b no fue secretada por las células precursoras de los osteoclastos mononucleares positivas en TRACP antes de haberse diferenciado en osteoclastos multinucleares maduros. Por lo tanto, la TRACP 5b secretada es un marcador fiable del número de osteoclastos multinucleares maduros.

[0144] La tasa de resorción ósea en los cultivos se determinó originalmente mediante el recuento del número de cavidades de resorción en cada trozo de hueso o de dentina usando un microscopio con los objetivos de contraste de fase. Más tarde, las cavidades se visualizaron utilizando lectina de aglutinina de germen de trigo que se une específicamente al área reabsorbida en el hueso, por lo que es posible cuantificar el área reabsorbida total usando un microscopio y un sistema de análisis de imagen asistido por ordenador. Estos procedimientos tienen dos desventajas: consumen mucho tiempo y no pueden detectar las diferencias en la profundidad de las cavidades de resorción, lo que puede causar que los resultados sean falsos. Más tarde, se demostró que telopéptidos reticulados C-terminales de colágeno tipo I (CTX) cuantifican los productos de degradación de colágeno de hueso liberados en el medio de cultivo (Bagger et al. 1999). Este procedimiento es rápido y sensible, y es un parámetro fiable del volumen total reabsorbido (incluyendo la profundidad de las cavidades).

[0145] Se desarrolló un sistema de cultivo de osteoclastos humanos para usar en este estudio donde las células precursoras de osteoclastos CD34+ derivadas de médula ósea humana (Poietics® Human Osteoclast Precursors, Lonza, Walkersville, EE.UU.) se cultivan en trozos de hueso bovino en presencia de factores de crecimiento apropiados, incluyendo M-CSF y ligando RANK (Rissanen et al. 2009). En primer lugar, se deja que las células se diferencien en osteoclastos de resorción ósea maduros, y se deja que los osteoclastos formados reabsorban hueso. Los compuestos de ensayo y de referencia se añaden a los cultivos de células en el comienzo del periodo de diferenciación y/o resorción, y se determinan sus efectos sobre la actividad de resorción y/o diferenciación de los osteoclastos.

[0146] La TRACP 5b secretada se determina del medio de cultivo después del periodo de diferenciación utilizando un procedimiento disponible comercialmente (BoneTRAPO, IDS Ltd, Boldon, Reino Unido). La TRACP 5b secretada describe con precisión el número de osteoclastos formados en cada pocillo durante el período de diferenciación. CTX se determina a partir del medio de cultivo después del periodo de resorción utilizando un procedimiento disponible comercialmente (CrossLaps® para cultivos, IDS Ltd, Boldon, Reino Unido). CTX describe con precisión la cantidad de productos de degradación de colágeno del hueso liberados en el medio de cultivo en cada pocillo durante el periodo de resorción. Un índice de resorción que demuestra la actividad promedio de los osteoclastos (Rissanen et al. 2009) se calcula dividiendo el volumen de resorción obtenido (valor CrossLaps®) por el número de osteoclastos (valor BoneTRAPO).

Cultivos de osteoblastos

[0147] Los osteoblastos son células formadoras de hueso que surgen a partir de células madre mesenquimales. Durante el desarrollo de los osteoblastos, se han definido tres períodos distintos: 1) la proliferación celular y la secreción de matriz extracelular (ECM); 2) la maduración de ECM; 3) la mineralización de ECM. Durante estos períodos, se ha caracterizado una expresión secuencial de marcadores de fenotipo de osteoblastos. La fosfatasa alcalina (ALP) se asocia con el fenotipo de células óseas y se expresa activamente durante la maduración de los osteoblastos. El propéptido N-terminal del procolágeno tipo I (PINP) es un marcador de la síntesis de colágeno de tipo I y la producción de ECM y una medida relevante para la evaluación de los fármacos candidatos nuevos para osteoporosis en estudios preclínicos (Rissanen et al. 2008). Con el inicio de la mineralización, grandes cantidades de calcio e hidroxapatita se depositan en la matriz orgánica madura para formar nódulos parecidos a huesos. A raíz de estos marcadores, es posible estudiar todas las etapas de la diferenciación y la actividad de los osteoblastos en un sistema de cultivo.

[0148] Se establecieron varios sistemas modelo para estudiar los osteoblastos. El aislamiento de células con el fenotipo osteoblástico de calvaria fue el primer intento. Sin embargo, estas células representan sólo la etapa de madurez de los osteoblastos porque sólo una pequeña fracción de las células de calvaria son precursoras de osteoblastos (Bellows et al. 1989). Alternativamente, las células de médula ósea mesenquimales o líneas de células progenitoras pueden ser estimuladas para diferenciarse en células osteoblásticas. Las células KS483, clonadas a partir de calvaria de ratón, son precursores de osteoblastos sensibles a estrógeno que son capaces de diferenciarse en osteoblastos que forman el hueso y formar nódulos óseos mineralizados in vitro (Dang et al. 2002).

[0149] Se estableció un sistema de cultivo que se puede utilizar como modelo in vitro para estudiar los efectos de los compuestos anabólicos y similares a los estrógenos sobre la diferenciación y actividad de los osteoblastos. En este sistema de cultivo, proliferan primero las células KS483 de ratón y entonces se diferencian en osteoblastos capaces de formar nódulos óseos mineralizados en presencia de ácido ascórbico y β -glicerofosfato (Fagerlund et al. 2009). Los compuestos de ensayo y de referencia se añaden a los cultivos de células de forma concomitante con el cambio de medio, y se determinan sus efectos sobre la diferenciación y actividad de los osteoblastos. Se determina la ALP celular, un marcador de la diferenciación de osteoblastos, a partir de los lisados celulares tal como se describió

anteriormente (Lowry et al. 1954). El PINP secretado, un marcador de formación de la matriz ósea orgánica, se determina a partir del medio de cultivo usando un procedimiento disponible en el mercado (Rat/Mouse PINP EIA, IDS Ltd, Boldon, Reino Unido). La deposición de calcio, un índice de la formación de la matriz ósea inorgánica, se mide usando un ensayo de calcio disponible en el mercado (Roche Diagnostics).

5

Procedimientos

Ensayo de diferenciación de los osteoclastos

10 **[0150]** En este estudio, se suspendieron células madre CD34+ derivadas de médula ósea humana (10.000 células/pocillo) en medio de cultivo y se dejaron adherir a trozos de hueso bovino en placas de cultivo tisular de 96 pocillos. El medio de cultivo (que contiene FBS al 10%, OCP BulletKit® Lonza, Walkersville, EE.UU.) fue suplementado con cantidades apropiadas de factores de crecimiento importantes que favorecen la diferenciación y la actividad de osteoclastos, incluyendo M-CSF (33 ng/ml, OCP BulletKit® Lonza, Walkersville, EE.UU.) y ligando RANK (66 ng/ml, OCP BulletKit® Lonza, Walkersville, EE.UU.) en 200 µl de medio. Las células se incubaron en un incubador de CO₂ en atmósfera humidificada de 95% de aire y 5% de dióxido de carbono a 37°C durante 7 días. Se añadieron los compuestos de ensayo y el compuesto de referencia OPG en el día 0. Los sobrenadantes recogidos en el día 7 se almacenaron a -70°C hasta el análisis de TRACP 5b. La TRACP 5b se midió del medio de cultivo (20 µl/muestra) usando el contador VICTOR2™ Multilabel (PerkinElmer, Waltham, MA, EE.UU.). Las células se fijaron con paraformaldehído al 3% y se tiñeron para la actividad de TRACP (kit de fosfatasa ácida de leucocitos; Sigma Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.) y Hoechst 33258 (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.).

[0151] Se incluyeron los siguientes grupos (cada grupo contiene 8 réplicas):

Placa 1:

- 25 1) grupo de línea de base con vehículo (DMSO)
 2) grupo de control con 5 nM de OPG
 3) 0,004 µM del Compuesto 1
 4) 0,012 µM del Compuesto 1
 5) 0,037 µM del Compuesto 1
 30 6) 0,11 µM del Compuesto 1
 7) 0,33 µM del Compuesto 1
 8) 1,0 µM del Compuesto 1
 9) 3,0 µM del Compuesto 1

35 Ensayo de actividad de los osteoclastos

[0152] En este estudio, células madre CD34+ derivadas de la médula ósea humana (10.000 células/pocillo) se suspendieron en medio de cultivo y dejaron que se adherieran a porciones de hueso bovino en placas de cultivo tisular de 96 pocillos. El medio de cultivo (que contiene FBS al 10%, OCP BulletKit® Lonza, Walkersville, EE.UU.) se suplementó con cantidades apropiadas de factores de crecimiento importantes que favorecen la diferenciación y la actividad de osteoclastos, incluyendo M-CSF (33 ng/ml, OCP BulletKit® Lonza, Walkersville, EE.UU.) y ligando RANK (66 ng/ml, OCP BulletKit® Lonza, Walkersville, EE.UU.) en 200 µl de medio. Las células se incubaron en un incubador de CO₂ en atmósfera humidificada del 95% de aire y 5% de dióxido de carbono a 37°C. Después de la terminación de la diferenciación de osteoclastos en el día 7, todo el medio de cultivo se extrajo y se añadieron 200 µl nuevos de medio de cultivo que favorecían la actividad de osteoclastos en los pocillos.

45

[0153] Los osteoclastos maduros se cultivaron durante 3 días adicionales, lo que les permite reabsorber hueso. Los compuestos de prueba y el compuesto de referencia E64 se añadieron en el día 7, después de la finalización del período de diferenciación de los osteoclastos. Los sobrenadantes recogidos en el día 7 y el día 10 fueron almacenados a -70°C hasta el análisis de TRACP 5b y CTX. TRACP 5b se midió del medio de cultivo (20 µl/muestra) recogido en el día 7 y CTX del medio de cultivo (50 µl/muestra) recogido en el día 10 usando el contador VICTOR2™ Multilabel (PerkinElmer, Waltham, MA, Estados Unidos).

50

[0154] Se incluyeron los siguientes grupos (cada grupo contiene 8 réplicas):

Placa 1:

- 55 1) grupo de línea de base con vehículo (DMSO)
 2) grupo de control con 1 µM de E64
 3) 0,004 µM del Compuesto 1
 4) 0,012 µM del Compuesto 1
 60 5) 0,037 µM del Compuesto 1
 6) 0,11 µM del Compuesto 1
 7) 0,33 µM del Compuesto 1
 8) 1,0 µM del Compuesto 1
 9) 3,0 µM del Compuesto 1

Ensayo de diferenciación de los osteoblastos

[0155] Se cultivaron células de ratón KS483 en matraces de cultivo de tejidos T-75 en α MEM suplementado con suero bovino fetal privado de carbón vegetal al 10% hasta 80-90% de confluencia. Las células se incubaron en un incubador de CO₂ en atmósfera humidificada de 95% de aire y 5% de dióxido de carbono a 37°C. Después de alcanzar el 80-90% de confluencia, se prepararon subcultivos. Las células se extrajeron de los matraces con el tratamiento con tripsina y se contaron. Para la inducción de la maduración de los osteoblastos y la formación de hueso, las células osteoblásticas inmaduras se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas con colágeno de tipo I. Las células se cultivaron durante 8 días con un suplemento de ácido ascórbico (50 μ g/ml), y la mitad del medio se cambió cada 3-4 días. El compuesto de ensayo y la sustancia de control (E2) se añadieron en el comienzo del periodo de cultivo y cuando se cambió el medio. Los cultivos se detuvieron en día 8 mediante la extracción de los medios de cultivo de los pocillos, y se prepararon lisados celulares. La actividad de ALP celular y el contenido total de proteínas (ensayo de proteínas, Bio-Rad Laboratories Inc, CA, EE.UU.) se cuantificaron utilizando el contador VICTOR2™ Multilabel (PerkinElmer, Waltham, MA, EE.UU.).

[0156] Se incluyeron los siguientes grupos (cada grupo contiene 8 réplicas):

Placa 1:

- 1) grupo de línea de base con vehículo (DMSO)
- 2) grupo de control con 10 nM de E2
- 3) 0,004 μ M del Compuesto 1
- 4) 0,012 μ M del Compuesto 1
- 5) 0,037 μ M del Compuesto 1
- 6) 0,11 μ M del Compuesto 1
- 7) 0,33 μ M del Compuesto 1
- 8) 1,0 μ M del Compuesto 1
- 9) 3,0 μ M del Compuesto 1

Ensayo de actividad de los osteoblastos

[0157] Se cultivaron células de ratón KS483 se cultivaron en matraces de cultivo de tejidos T-75 en α MEM suplementado con suero bovino fetal privado de carbón vegetal al 10% hasta 80-90% de confluencia. Las células se incubaron en un incubador de CO₂ en atmósfera humidificada de 95% de aire y 5% de dióxido de carbono a 37°C. Después de alcanzar el 80-90% de confluencia, se prepararon subcultivos. Las células se extrajeron de los matraces con el tratamiento con tripsina y se contaron. Para la inducción de la maduración de los osteoblastos y la formación de hueso, las células osteoblásticas inmaduras se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas de colágeno de tipo I. Las células se cultivaron durante 13 días con un suplemento de ácido ascórbico (50 μ g/ml) y β -glicerofosfato (5 mM), y la mitad del medio se cambió cada 3-4 días. El compuesto de ensayo y la sustancia de control (E2) se añadieron en el comienzo del periodo de cultivo y cuando se cambió el medio. El PINP secretado se midió del medio de cultivo en el día 11 como un marcador de la formación de la matriz ósea orgánica. Los cultivos se detuvieron en el día 13 mediante la extracción de los medios de cultivo de los pocillos y la adición de ácido clorhídrico. El calcio depositado en la matriz ósea formado se cuantificó mediante el uso del contador VICTOR2® Multilabel (PerkinElmer, Waltham, MA, EE.UU.).

[0158] Se incluyeron los siguientes grupos (cada grupo contiene 8 réplicas):

Placa 1:

- 1) grupo de línea de base con vehículo (DMSO)
- 2) grupo de control con 10 nM de E2
- 3) 0,004 μ M del Compuesto 1
- 4) 0,012 μ M del Compuesto 1
- 5) 0,037 μ M del Compuesto 1
- 6) 0,11 μ M del Compuesto 1
- 7) 0,33 μ M del Compuesto 1
- 8) 1,0 μ M del Compuesto 1
- 9) 3,0 μ M del Compuesto 1

Análisis estadístico

[0159] Todos los datos relevantes se presentan como figuras y/o tablas [media, desviación estándar (SD) y la significación estadística] con unidades. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico Origen (Origin Corporation, Northampton, MA, EE.UU.). Se utilizó el análisis de una vía de la varianza (ANOVA) para estudiar si los valores obtenidos entre los diferentes grupos (línea de base frente a compuestos inhibidores de referencia y de prueba) eran estadísticamente diferentes (con $p < 0,05$). Si el ANOVA de una vía revelaba diferencias estadísticamente significativas, se utilizó la prueba t para comparaciones estadísticas entre grupos.

Resultados

[0160] El efecto del compuesto 1 sobre la diferenciación de osteoclastos se midió en el día 7 tal como se representa en la Figura 1. Los resultados se muestran como la actividad de TRACP 5b (U/L) secretada en el medio de cultivo. En ésta y en otras figuras, BL significa línea de base (no hay compuestos añadidos); C significa control (5,0 nM de OPG). Los resultados se compararon con la BL utilizando ANOVA de una vía (p menor de 0,001 entre todos los grupos). Tres asteriscos (***) indican un efecto inhibidor estadísticamente significativo con un valor de p de menos de 0,001. Dos asteriscos (**) indican un efecto estadísticamente significativo con un valor de p de menos de 0,01. Un asterisco (*) indica un valor de p de menos de 0,05. Los asteriscos con paréntesis en la figura ([**]) indican una diferencia significativa opuesta al nivel de línea de base.

[0161] Los resultados se resumen adicionalmente en la Tabla 1. Como en la Figura, tres asteriscos (***) indican un efecto inhibidor estadísticamente significativo con un valor de p de menos de 0,001. Como en las figuras, y en ésta y otras tablas, tres asteriscos (***) indican un efecto inhibidor estadísticamente significativo con un valor de p de menos de 0,001; dos asteriscos (**) indican un efecto estadísticamente significativo con un valor de p de menos de 0,01; un asterisco (*) indica un valor de p de menos de 0,05. Los asteriscos con paréntesis en la figura ([**]) indican una diferencia significativa opuesta al nivel de línea de base.

Tabla 1

Ensayo de diferenciación de osteoclastos. Actividad de TRACP 5b en el día 7							
Concentración del compuesto 1 (μM)	0,004	0,012	0,037	0,11	0,33	1,0	3,0
Porcentaje de actividad (%) en comparación con BL	85	80	74	45(***)	15(***)	4(***)	0(***)

[0162] El efecto del compuesto 1 sobre la actividad de resorción de los osteoclastos humanos se representa en la Figura 2. Los resultados se muestran como valores de CTX/TRACP 5b valores. Los valores de CTX se determinaron al final del período de resorción en el día 10, y los valores de TRACP al comienzo del período de la resorción en el día 7. Los resultados se resumen adicionalmente en la Tabla 2.

Tabla 2

Ensayo de diferenciación de osteoclastos. Actividad de CTX en el día 10 y TRACP 5b en el día 7							
Concentración del compuesto 1 (μM)	0,004	0,012	0,037	0,11	0,33	1,0	3,0
Porcentaje de actividad (%) en comparación con BL	84	104	115	107	102(***)	111(***)	85(***)

[0163] El efecto del compuesto 1 sobre la diferenciación de osteoblastos en el día 8 se representa en la Figura 3. Los resultados se muestran como la actividad de ALP celular/mg de proteína. Los resultados se resumen adicionalmente en la Tabla 3.

Tabla 3

Ensayo de diferenciación de osteoblastos. Actividad de ALP en el día 8							
Concentración del compuesto 1 (μM)	0,004	0,012	0,037	0,11	0,33	1,0	3,0
Porcentaje de actividad (%) en comparación con BL	109	113	134(***)	181(***)	166(***)	117(*)	57([**])

[0164] El efecto del Compuesto 1 sobre la actividad de formación de hueso de osteoblastos de ratón se representa en la Figura 4. Los resultados se muestran como PINP secretado en el medio de cultivo en el día 11. Los resultados se resumen adicionalmente en la Tabla 4.

5

Tabla 4

Ensayo de diferenciación de osteoblastos. Actividad de PINP en el día 11							
Concentración del compuesto 1 (μM)	0,004	0,012	0,037	0,11	0,33	1,0	3,0
Porcentaje de actividad (%) en comparación con BL	117	122(***)	135(***)	101	73(**)	42([***)	21([***)

[0165] El efecto del Compuesto 1 sobre la actividad de formación de hueso de osteoblastos de ratón se representa en la Figura 5. Los resultados se muestran como la deposición de calcio en el día 13. Los resultados se muestran como PINP secretado en el medio de cultivo en el día 11. Los resultados se resumen adicionalmente en la tabla 4.

10

Tabla 5

Ensayo de diferenciación de osteoblastos. Deposición de calcio en el día 13							
Concentración del compuesto 1 (μM)	0,004	0,012	0,037	0,11	0,33	1,0	3,0
Porcentaje de actividad (%) en comparación con BL	145(***)	167(***)	180(***)	144(*)	59(**)	12([***)	4([***)

15 Conclusión

[0166] Los inhibidores de referencia OPG y E64 inhibieron significativamente la diferenciación y actividad de osteoclastos, respectivamente, y el estimulador de referencia 17β -estradiol estimuló significativamente la diferenciación y la actividad de osteoblastos describiendo que los ensayos se llevaron a cabo con éxito y los resultados obtenidos son fiables. El compuesto 1 mostró una inhibición dependiente de la dosis de la diferenciación de osteoclastos que fue significativa con concentraciones de 0,11, 0,33, 1,0 y 3,0 μM . El análisis microscópico mostró que las concentraciones de 0,11 y 0,33 μM del Compuesto 1 no afectaron el número de células mononucleares positivas Hoechst y TRACP, lo que sugiere la inhibición específica de la diferenciación de osteoclastos. Sin embargo, las concentraciones de 1,0 y 3,0 μM disminuyeron el número de células mononucleares positivas Hoechst y TRACP, lo que sugiere que los efectos inhibidores observados con estas concentraciones son al menos en parte citotóxicos.

20

25

[0167] El compuesto 1 no tuvo efectos sobre la actividad de resorción de los osteoclastos con las concentraciones ensayadas. El compuesto 1 mostró una estimulación dependiente de la dosis de la diferenciación de osteoblastos con concentraciones de 0,012, 0,037, 0,11, 0,33 y 1,0 μM y efectos inhibidores con una concentración de 3,0 μM . El compuesto 1 mostró una estimulación dependiente de la dosis de la actividad de formación de hueso de los osteoblastos con concentraciones de 0,004, 0,012, 0,037 y 0,11 μM y efectos inhibidores con concentraciones de 0,33, 1,0 y 3,0 μM . Como conclusión, las concentraciones de 0,004, 0,012, 0,037 y 0,11 μM del Compuesto 1 mostraron efectos beneficiosos sobre las células óseas, activando la formación de hueso osteoblástico y que no tiene efectos o inhiben la formación de osteoclastos de resorción ósea.

30

35

Referencias

[0168]

Alatalo SL, Halleen JM, Hentunen TA, Mönkkönen J, Väänänen HK (2000) Rapid screening method for osteoclast differentiation in vitro that measures tartrate-resistant acid phosphatase 5b activity secreted into the culture medium. Clin Chem 46:1751-1754.

40

Bagger YZ, Foged NT, Andersen L, Lou H, Qvist P (1999) CrossLaps for culture: An improved enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring bone resorption in vitro. J Bone Miner Res 14, Suppl. 1, S370.

45

Bellows CG, Aubin JE (1989) Determination of the number of osteoprogenitors in isolated fetal rat calvarial cells in vitro. Develop Biol 113:8-13.

Boyd A, Ali NN, Jones SJ (1984) Resorption of dentine by isolated osteoclasts in vitro. *Br Dent J* 156:216-220.
Chambers TJ, Revell PA, Fuller K, Athanasou NA (1984) Resorption of bone by isolated rabbit osteoclasts. *J Cell Sci* 66:383-399.

Dang ZC, Van Bezooijen RL, Karperien M, Papapoulos SE, Löwik CWGM (2002) Exposure of KS483 cells to estrogen enhances osteogenesis and inhibits adipogenesis. *J Bone Miner Res* 17:394-405.

Fagerlund KM, Rissanen JP, Suutari T, Chan A, Halleen JM (2009) Validation of an in vitro osteoblast culture model using estrogen responsive KS483 mouse osteoblast precursor cell line. *J Bone Miner Res* 24 (Suppl 1). Disponible en <http://www.asbmr.org/Meetings/AnnualMeeting/AbstractDetail.aspx?aid=9815c5a5-00eb4952-b1aa-838899f5e151>.
Accedido el 1 de octubre de 2009.

Lowry OH, Roberts NR, Wu ML, Hixon WS, Crawford EJ (1954) The quantitative histochemistry of brain. II. Enzyme measurements. *J Biol Chem* 207:19-37.

Rissanen JP, Suominen MI, Peng Z, Morko J, Rasi S, Risteli J, Halleen JM (2008) Short-term changes in serum PINP predict long-term changes in trabecular bone in the rat ovariectomy model. *Calcif Tissue Int* 82:155-161.

Rissanen JP, Ylipahkala H, Fagerlund KM, Long C, Väänänen HK, Halleen JM (2009) Improved methods for testing antiresorptive compounds in human osteoclast cultures. *J Bone Miner Metab* 27:105-109.

Ejemplo 2

Efectos a corto plazo del Compuesto 1 sobre los marcadores de recambio óseo en el modelo de ovariectomía de rata (OVX)

[0169] El objetivo de este estudio fue investigar los efectos a corto plazo del compuesto I sobre marcadores séricos bioquímicos del metabolismo óseo en un estudio de prevención en un modelo de ovariectomía de rata (OVX) para la osteoporosis postmenopáusica. Se usó 17 β -estradiol (E2) como compuesto de referencia. Los siguientes cinco grupos experimentales fueron incluidos en el estudio:

- 1) ratas de control operadas simuladamente que recibieron vehículo (5 ml/kg/d p.o.)
- 2) ratas de control OVX que recibieron vehículo (5 ml/kg/d p.o.)
- 3) ratas de control OVX que recibieron 17 β -estradiol (4 μ g/kg/d s.c.)
- 4) ratas de control OVX que recibieron compuesto de ensayo compuesto 1 (1 mg/kg/d p.o.)
- 5) ratas de control OVX que recibieron compuesto de ensayo compuesto 1 (3 mg/kg/d p.o.)

[0170] Cada grupo contenía ocho ratas hembra (Sprague-Dawley) que tenían tres meses de edad en el comienzo de la fase en vida del estudio. Antes del inicio de la fase en vida, los animales se pesaron, se recogieron sus muestras de sangre, y los animales fueron asignados al azar a los grupos de estudio por estratificación de acuerdo con el peso corporal y los niveles séricos de propéptido N-terminal de procolágeno de tipo I (PINP). Al comienzo de la fase en vida, los animales se pesaron y fueron operados. El tratamiento se inició un día después de las operaciones y continuó una vez al día durante dos semanas. Se utilizó agua estéril como vehículo en los grupos 1 y 2. Se determinó el peso corporal después de una semana de tratamiento y las dosis de tratamiento se ajustaron en consecuencia. Después de dos semanas de tratamiento, los animales se pesaron, se recogieron sus muestras de sangre, los animales fueron sacrificados, y se determinó su peso uterino relativo. Para el análisis de los efectos a corto plazo de los tratamientos, se determinaron los niveles de cuatro biomarcadores del metabolismo óseo en muestras de suero recogidas antes del comienzo y al final de la fase en vida. Estos biomarcadores incluyen PINP como marcador de la formación de hueso, fragmento medio N-terminal de la osteocalcina (OC) como marcador general de recambio óseo, telopéptidos reticulados C-terminales de colágeno de tipo I (CTX) como marcador de la resorción ósea, e isoforma 5b de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRACP 5b) como marcador de número de osteoclastos. Los niveles en suero en el día -7 se usaron como niveles de referencia y los niveles séricos en el día 14 como los niveles afectados por las operaciones y tratamientos.

[0171] La ovariectomía quirúrgica aumentó el peso corporal, disminuyó el peso uterino relativo, aumentó los niveles séricos de CTX, OC y PINP, y disminuyó la actividad de TRACP 5b en suero en ratas hembra después de dos semanas después de la cirugía. Estos resultados de biomarcadores del metabolismo óseo indican que la ovariectomía aumentó la resorción ósea, aumentó el recambio óseo y la formación de hueso, y disminuyó el número total de osteoclastos. Estas conclusiones implican que la ovariectomía quirúrgica acelera la tasa de recambio óseo en ratas hembras.

[0172] Los efectos a corto plazo de 17 β -estradiol se estudiaron mediante la comparación de los animales OVX tratados con 17 β -estradiol a la dosis subcutánea de 4 μ g/kg/d con animales OVX tratados con vehículo. El tratamiento con 17 β -estradiol tenía los siguientes efectos sobre el peso corporal, el peso uterino relativo y biomarcadores del metabolismo óseo en ratas OVX:

- El tratamiento con 17 β -estradiol impidió la ganancia inducida por OVX en el peso corporal y la reducción inducida por OVX en el peso uterino relativo.
- El tratamiento con 17 β -estradiol impidió el aumento inducido por OVX en los niveles en suero de CTX, OC y PINP.
- El tratamiento con 17 β -estradiol no afectó a la reducción inducida por OVX en la actividad de TRACP 5b en suero.

[0173] Los resultados de biomarcadores del metabolismo óseo indican que el tratamiento con 17 β -estradiol a la dosis

subcutánea de 4 µg/kg/d impidió la mejora inducida por OVX en la resorción ósea y el aumento inducido por OVX en el recambio óseo y la formación de hueso, pero no afectó a la reducción inducida por OVX en el número total de osteoclastos en ratas OVX después de dos semanas de tratamiento. Estas conclusiones implican que el tratamiento con 17 β-estradiol a la dosis subcutánea de 4 µg/kg/d impidió la aceleración inducida por OVX en la tasa de recambio óseo en ratas hembra.

[0174] Los efectos a corto plazo del Compuesto 1 se estudiaron mediante la comparación de los animales OVX tratadas con el Compuesto 1 a las dosis orales de 1 y 3 mg/kg/d con animales OVX tratados con vehículo. El tratamiento con compuesto 1 tenía los siguientes efectos sobre el peso corporal, el peso uterino relativo y los biomarcadores del metabolismo óseo en ratas OVX:

- El tratamiento con Compuesto 1 a la dosis oral de 1 mg/kg/d impidió parcialmente la ganancia inducida por OVX en el peso corporal.

- El tratamiento con el Compuesto 1 a las dosis orales de 1 y 3 mg/kg/d no afectó a la reducción inducida por OVX en el peso uterino relativo.

- El tratamiento con el Compuesto 1 a la dosis oral de 3 mg/kg/d mejoró el aumento inducido por OVX en los niveles de PINP en suero y la reducción inducida por OVX en la actividad de TRACP 5b en suero.

- El tratamiento con el Compuesto 1 a las dosis orales de 1 y 3 mg/kg/d no afectó al aumento inducido por OVX en los niveles de CTX y OC en suero.

[0175] Los resultados de biomarcadores del metabolismo óseo indican que el tratamiento con el Compuesto 1 a la dosis oral de 3 mg/kg/d mejoró el aumento inducido por OVX en la formación de hueso y la reducción inducida por OVX en el número total de osteoclastos, pero no afectó el aumento inducido por OVX en la resorción ósea y recambio óseo en ratas OVX después de dos semanas de tratamiento. La formación de hueso mejorada en asociación con el número total reducido de los osteoclastos y los niveles inalterados de la resorción ósea implican que el tratamiento con el Compuesto 1 a la dosis oral de 3 mg/kg/d desplazó el recambio óseo estimulado por OVX hacia la formación de hueso en ratas hembras.

Descripción

[0176] La osteoporosis humana es una enfermedad esquelética sistémica caracterizada por una baja masa ósea y deterioro de la microarquitectura ósea, que conduce a la fragilidad ósea y mayor riesgo de fractura (Raisz et al. 2008). La naturaleza crónica de la osteoporosis hace que sea cada vez más caro para la sociedad. Como se estima que la esperanza de vida aumenta, también se estima que la frecuencia de osteoporosis aumentará causando una carga adicional a nuestro sistema de salud. Aunque terapias eficaces ya están disponibles para el tratamiento de la osteoporosis, nuevas terapias son necesarias con una mejor ventana terapéutica, es decir, una relación eficacia/seguridad mejorada. Los estudios de eficacia preclínicos con modelos animales para la osteoporosis proporcionan información de primera mano sobre los efectos de nuevas terapias potenciales antes de proceder con ellos para ensayos clínicos (Rissanen y Halleen 2010). Las autoridades reguladoras de la administración de fármacos han aprobado ratas gonadectomizadas que sufren de osteopenia para ser utilizadas como modelo animal pequeño predictivo en la prueba de la eficacia preclínica de nuevas terapias potenciales para el tratamiento de osteoporosis.

[0177] El objetivo de este estudio fue investigar los efectos a corto plazo del Compuesto 1 en los marcadores bioquímicos séricos del metabolismo óseo en un estudio de prevención en un modelo de ovariectomía de ratas (OVX) para la osteoporosis postmenopáusicas. Se usó 17β-estradiol (E2) como compuesto de referencia (Lindsay y Cosman 2008). Los siguientes cinco grupos experimentales fueron incluidos en el estudio:

1) ratas de control operadas simuladamente que recibieron vehículo (5 ml/kg/d p.o.)

2) ratas de control OVX que recibieron vehículo (5 ml/kg/d p.o.)

3) ratas de control OVX que recibieron 17 β-estradiol (4 µg/kg/d s.c.)

4) ratas OVX que recibieron compuesto 1 (1 mg/kg/d p.o.)

5) ratas OVX que recibieron compuesto 1 (3 mg/kg/d p.o.)

[0178] Cada grupo contenía ocho ratas hembra (Sprague-Dawley) que tenían tres meses de edad en el comienzo de la fase en vida del estudio. El diseño experimental del estudio se presenta en la figura 1. Los animales fueron asignados al azar a los grupos de estudio por estratificación de acuerdo con el peso corporal y se midieron los niveles séricos de propéptido N-terminal de procolágeno de tipo I (PINP) una semana antes del inicio de la fase en vida (en el día -7). Al comienzo de la fase en vida (en el día 0), los animales se pesaron, los animales en los grupos 2-5 se ovariectomizaron y los animales en el grupo 1 se operaron de forma simulada. El tratamiento se inició un día después de las operaciones y continuó una vez al día durante dos semanas (hasta el día 13). Se utilizó agua estéril como vehículo en los grupos 1 y 2. Se determinó el peso corporal al inicio de la fase en vida (en el día 0), después de una semana de tratamiento de la fase en vida (en el día 7) y al final de la fase en vida (en el día 14). Las dosis de tratamiento se ajustaron según el último peso corporal obtenido. Después de dos semanas de tratamiento (en el día 14), los animales se pesaron, se recogieron sus muestras de sangre, los animales fueron sacrificados, y se determinó su peso uterino relativo. Para el análisis de los efectos a corto plazo de los tratamientos, se determinaron los niveles de cuatro biomarcadores del metabolismo óseo en muestras de suero recogidas antes del comienzo (en el día -7) y al final (en el día 14) de la fase en vida. Estos marcadores bioquímicos en suero incluyen PINP, fragmento medio N-terminal de la osteocalcina (OC),

telopéptidos reticulados C-terminales de colágeno de tipo I (CTX) e isoforma 5b de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRACP 5b). Los niveles en suero obtenidos en el día -7 se usaron como niveles de referencia y los niveles séricos obtenidos en el día 14 como los niveles afectados por las operaciones quirúrgicas y tratamientos.

5 Materiales y equipamiento

Compuesto 1

[0179] El compuesto sólido 1 se almacenó a temperatura ambiente en un ambiente seco durante todo el estudio. Se prepararon suspensiones de dosificación nuevas del Compuesto 1 sobre una base diaria. Se formularon alícuotas diarias del compuesto sólido en agua estéril (Baxter, Deerfield, IL, EE.UU.) que incluía una pequeña cantidad de cloruro de hidrógeno (HCl; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) de la siguiente manera.

[0180] **Para el Grupo Experimental 4.** Se dispersaron 4,5-5,8 mg del Compuesto 1 en 22,5-29,0 ml de agua estéril que da lugar a una suspensión de dosificación que contenía 0,2 mg/ml del Compuesto 1. Las características de la formulación se mejoraron mediante la adición de 7,5-9,7 μ l de HCl 1N en la suspensión de dosificación.

[0181] **Para el Grupo Experimental 5.** Se dispersaron 10,4-17,4 mg del Compuesto 1 en 17,333-29,0 ml de agua estéril que da lugar a una suspensión de dosificación que contenía 0,6 mg/ml del Compuesto 1. Las características de la formulación se mejoraron mediante la adición de 17,3-29,0 μ l de HCl 1N en la suspensión de dosificación.

[0182] Cada parte alícuota diaria del compuesto sólido se mezcló con agua estéril mediante agitación con vórtex breve. La dispersión del compuesto fue facilitado por sonicación en baño de agua (Finnsonic Ultrasonic Cleaner Modelo m03; Finnsonic, Lahti, Finlandia) durante un minuto seguido por agitación con vórtex durante cinco segundos. Este procedimiento de sonicación y agitación con vórtex se repitió hasta 3 - 5 veces. Las características de la formulación se mejoraron mediante la adición de una pequeña cantidad de HCl en cada suspensión de dosificación. La dispersión del compuesto se facilitó adicionalmente mediante la repetición del procedimiento de sonicación y agitación con vórtex hasta 1-2 veces.

[0183] Se utilizaron suspensiones de dosificación homogéneas finas para tratar a los animales en los grupos experimentales 4 y 5 dentro de una hora después de la formulación del compuesto. El tratamiento de los animales comenzó un día después de su operación quirúrgica OVX (en el día 1) y continuó una vez al día durante dos semanas (hasta el día 13).

[0184] Las suspensiones de dosificación se administraron por vía oral a un volumen de 5 ml/kg, lo que da lugar a una dosis de compuesto 1 oral de 1 mg/kg/d en el grupo experimental 4 y una dosis de compuesto 1 oral de 3 mg/kg/d en el grupo experimental 5. Las suspensiones de dosificación se mezclaron con frecuencia durante la administración con el fin de tratar a los animales con suspensiones de dosificación lo más homogéneas posibles. El sobrante de suspensiones de dosificación diarias se dispuso correctamente después de cada día de administración y el resto del Compuesto 1 sólido se almacenó después de la fase en vida.

Compuesto de referencia 17 β -estradiol

[0185] Se usó 17 β -estradiol (E2; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) como compuesto de referencia en el estudio. El compuesto de referencia se manipuló de acuerdo con las instrucciones detalladas proporcionadas por el proveedor. La solución madre de 17 β -estradiol se preparó de benzoato de bencilo (Sigma-Aldrich) en un vial de vidrio, teniendo cuidado de que el

[0186] 17 β -estradiol se disolviera completamente, de la siguiente manera:

[0187] **Para el Grupo Experimental 3.** Se disolvieron 1,6 mg de 17 β -estradiol en 80,0 ml de benzoato de bencilo, dando como resultado una solución madre que contiene 20 μ g/ml de 17 β -estradiol. La solución madre se almacenó en su vial de vidrio a 4°C en la oscuridad hasta su uso diario durante dos semanas. A partir de la solución madre, se preparó una solución de dosificación nueva sobre una base diaria, de la siguiente manera:

[0188] **Para el Grupo Experimental 3.** 1 ml de la solución madre se diluyó en 4 ml de aceite de ricino (aceite de ricino; lote # 319108624; Cat. 4702,1; Carl Roth, Karlsruhe, Alemania), se mezcló a fondo, y se mantuvo en la oscuridad. La solución de dosificación nueva contenía 4 μ g/ml de 17 β -estradiol y exhibió 20% de benzoato de bencilo y 80% de aceite de ricino como su composición vehículo. La solución se utiliza para tratar a los animales en el grupo experimental 3. Su tratamiento se inició un día después de su operación quirúrgica OVX (en el día 1) y continuó una vez al día durante dos semanas (hasta el día 13). La solución de dosificación se administró por vía subcutánea en un volumen de 1 ml/kg, lo que resulta en una dosis subcutánea de 17 β -estradiol de 4 μ g/kg/d. El sobrante de la solución de dosificación diaria se dispuso correctamente después de cada administración diaria y el resto de la solución madre después de la fase en vida.

Vehículo

[0189] Dos grupos que recibieron vehículo compuesto de ensayo se incluyeron en el estudio, a saber los grupos experimentales 1 y 2. La solución de vehículo fue agua estéril y se almacenó a 4°C hasta su uso diario durante dos semanas. El tratamiento de animales en los grupos 1 y 2 se inició un día después de sus operaciones quirúrgicas (en el día 1) y continuó una vez al día durante dos semanas (hasta el día 13). La solución de vehículo se administró por vía oral a un volumen de 5 ml/kg, lo que resulta en una dosis oral de vehículo de 5 ml/kg/d. El sobrante de vehículo se dispuso correctamente después de la fase en vida.

Descripción de los procedimientos utilizados

[0190] Los marcadores bioquímicos del metabolismo óseo son herramientas útiles para el seguimiento de la terapia de la osteoporosis y para la predicción del riesgo de fractura y de los cambios a largo plazo en la densidad mineral ósea (Cremers et al. 2008). En este estudio, las muestras de suero se usaron para medir los niveles de cuatro marcadores bioquímicos del metabolismo óseo (Rissanen et al 2008a, Rissanen et al 2008b); a saber PINP utilizado como un marcador de la formación de hueso (Rat/Mouse PINP EIA; Immunodiagnostic Systems Ltd, Boldon, Reino Unido), OC utilizado como un marcador general de recambio óseo (Rat-MID osteocalcin EIA; Immunodiagnostic Systems Ltd), CTX utilizado como un marcador de la resorción ósea (RatLaps [CTX-I] EIA; Immunodiagnostic Systems Ltd), y TRACP 5b utilizado como un marcador del número de osteoclastos (Ratrap [TRACP 5b] ELISA; Immunodiagnostic Systems Ltd). OC se utilizó como marcador general de recambio óseo, ya que es secretada en la circulación durante la formación de hueso y la resorción ósea (Cremers et al. 2008). Los niveles séricos de estos cuatro marcadores bioquímicos se determinaron en muestras recolectadas antes del inicio de la fase en vida del estudio (en el día 7) y al final de la fase en vida (en el día 14). Los niveles obtenidos en el día 7 se usaron como niveles de línea de base y los niveles obtenidos en el día 14 como los niveles afectados por las operaciones quirúrgicas y tratamientos. Los ensayos se realizaron según las instrucciones proporcionadas por el proveedor y sus resultados se cuantificaron utilizando el contador VICTOR2™ Multilabel (PerkinElmer, Waltham, MA, EE.UU.). Se recogió la sangre para las muestras de suero de la vena lateral de la cola después de un ayuno durante la noche con el fin de evitar la variabilidad diurna. Los niveles de PINP y TRACP 5b se midieron en muestras de suero diluidas en las proporciones de 1:5 y 1:4, respectivamente, y los niveles de OC y CTX se determinaron en el suero sin ninguna dilución de la muestra. Las mediciones de muestras, cuyos resultados estaban por debajo o por encima de los límites de detección de los ensayos se habrían repetido, pero estos resultados no fueron obtenidos en este estudio. Las mediciones de muestras cuyos valores fueron sustancialmente diferentes del valor medio de su grupo experimental se habrían repetido también, incluidos los valores con una diferencia de más de 2,5 veces la desviación estándar (SD) del grupo. Sin embargo, estos tipos de valores no fueron obtenidos en este estudio.

Procedimiento

Fase en vida del estudio

[0191] La fase en vida incluyó alojamiento y la manipulación de los animales, operaciones quirúrgicas OVX y simuladas, la dosificación, la determinación del peso del cuerpo y el peso uterino relativo, sacrificio, y recogida de muestras de sangre. Las operaciones quirúrgicas OVX y simuladas se realizaron bajo anestesia y la analgesia utilizando un enfoque dorsal (Peng et al. 1994, Wronski et al. 1986). En la operación OVX, los ovarios se extrajeron junto con oviductos y una pequeña porción del útero. La anestesia se realizó con inyecciones de medetomidina (0,6 mg/kg s.c.; CP-Pharma Handelsgesellschaft, Burghdorf, Alemania), queetamina (30 mg/kg s.c.; Ketaminol; Intervetn International, Boxmeer, Países Bajos) y atipamezol (2 mg/kg s.c.; Revertor; CP-Pharma Handelsgesellschaft). La analgesia postoperatoria se realizó utilizando buprenorfina (25-37,5 µg/kg s.c.; Temgesic; Schering-Plough, Kenilworth, NJ, EE.UU.) administrada antes de las operaciones quirúrgicas y en la mañana siguiente. Carprofeno (5 mg/kg s.c.) iba a ser utilizado como analgésico durante el estudio cuando fuera necesario, pero no fue necesario. Al final de la fase en vida (en el día 14), los animales se sacrificaron mediante asfixia utilizando una mezcla de CO₂-O₂ bajo anestesia y por dislocación cervical posterior. Los siguientes cinco grupos experimentales fueron incluidos en el estudio:

- 1) ratas de control con operación simulada que recibieron vehículo (5 ml/kg/d p.o.)
- 2) ratas de control OVX que recibieron vehículo (5 ml/kg/d p.o.)
- 3) ratas de control OVX que recibieron 17 β-estradiol (4 micras g/kg/d s.c.)
- 4) ratas OVX que recibieron compuesto de ensayo cabozantinib (1 mg/kg/d p.o.)
- 5) ratas OVX que recibieron compuesto de ensayo cabozantinib (3 mg/kg/d p.o.)

[0192] Cada grupo contenía ocho ratas hembra Sprague-Dawley que tenían tres meses de edad en el comienzo de la fase en vida. El diseño experimental del estudio se presenta en la Figura 1. La salud de los animales se controló dos veces al día durante la semana y una vez al día durante los fines de semana durante toda la fase en vida. A los animales se les permitió aclimatarse al medio de la instalación para animales durante once días antes del inicio de la fase en vida. Los animales se pesaron y sus muestras de sangre se recogieron de la vena lateral de la cola una semana antes del inicio de la fase de la vida (en el día -7). Los animales fueron asignados al azar a los grupos de estudio de la estratificación en función de su peso corporal y los niveles séricos de PINP.

[0193] Los animales en mal estado de salud no se asignaron a los grupos, pero estos animales no se observaron en este estudio. Los animales fueron identificados por las marcas de la cola y dos animales del mismo grupo experimental fueron alojados en cada jaula en condiciones controladas de temperatura y luz y con acceso ilimitado a agua corriente y una comida de rata estándar (Teklad Dieta Global 2016; Harlan Laboratories, Madison, WI, Estados Unidos). Al comienzo de la fase en la vida (en el día 0), los animales se pesaron, los animales de los grupos 2-5 fueron ovariectomizados, y los animales en el grupo 1 fueron operados de forma simulada. Las operaciones quirúrgicas se realizaron bajo anestesia y analgesia. El tratamiento se inició un día después de las operaciones y continuó una vez al día durante dos semanas (hasta el día 13). Se utilizó agua estéril como vehículo en los grupos 1 y 2. El peso corporal se determinó al comienzo de la fase en vida (en el día 0), una semana después del inicio de la fase en vida (en el día 7), y al final de la fase en vida (en el día 14). Las dosis de tratamiento se ajustaron según el último peso corporal obtenido. Después de dos semanas de tratamiento (en el día 14), los animales se pesaron, se recogieron sus muestras de sangre, los animales fueron sacrificados, y se determinó su peso uterino relativo.

Recogida y procesamiento de muestras de estudio

[0194] Se recogieron muestras de estudio, se manipularon y almacenaron como se describe a continuación. Todas las condiciones que pueden haber afectado la integridad de las muestras y/o integridad de los datos primarios obtenidos usando las muestras se controlaron durante todo el estudio. Todas las muestras fueron marcadas conteniendo al menos la siguiente información: número de estudio, número de grupo de tratamiento, número de animal, y el nombre de la muestra.

Muestras de sangre

[0195] Se recogió sangre con un volumen de 0,6 ml para muestras de suero antes del inicio de la fase en vida del estudio (en el día -7) y al final de la fase en la vida (en el día 14). La recogida de sangre se realizó de la vena lateral de la cola después de un ayuno durante la noche, y se evitó la hemólisis durante el procesamiento de recogida de sangre y suero. La sangre se recogió en tubos de gel de suero incluyendo sílice de aluminio como activador de la coagulación (Multivette 600; Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Alemania). Después de la recogida de cada muestra, su tubo se mezcló suavemente y se dejó que la sangre se coagulara durante 30-60 minutos. Después de la coagulación, la muestra se centrifugó a 2500 g durante 10 minutos. El suero resultante se separó y se transfirió a un tubo de muestra limpio. Se obtuvieron alícuotas con volúmenes de 30, 50, 50 y 60 μ l de cada muestra para ser utilizadas para las mediciones de los niveles de PINP, OC, CTX y TRACP 5b en suero, respectivamente. Estas alícuotas y el suero remanente se congelaron y almacenaron a -70°C.

Análisis experimentales

[0196] El diseño experimental del estudio se representa en la Figura 6. Los análisis experimentales de hueso llevados a cabo en el estudio incluyeron mediciones de los niveles séricos de biomarcadores del metabolismo óseo. Estos análisis se realizaron por Pharmatest.

Análisis de hueso

[0197] Los análisis de hueso realizados en el estudio incluyeron el seguimiento de los niveles séricos de biomarcadores del metabolismo óseo. Estos marcadores bioquímicos del metabolismo óseo incluyen PINP utilizado como un marcador de la formación de hueso, OC utilizada como un marcador general de recambio óseo, CTX utilizados como un marcador de la resorción ósea, y TRACP 5b utilizada como un marcador del número de osteoclastos. Sus niveles se determinaron en muestras de suero recogidas antes del comienzo de la fase en vida del estudio (en el día -7) y al final de la fase en vida (en el día 14). Los niveles obtenidos en el día -7 se usaron como niveles de la línea de base y los niveles obtenidos en el día 14 como los niveles afectados por las operaciones quirúrgicas y tratamientos. El material de estudio sobrante de los estudios experimentales está disponible para análisis adicionales y/o puede ser entregado al sponsor para otros análisis a petición del sponsor. Este material ha incluido el resto de las muestras de suero recogidas durante el estudio y almacenadas a -70°C.

Análisis estadístico

[0198] Todos los datos relevantes se presentan como figuras y una tabla (media, SD y la significación estadística) y como un apéndice (datos individuales) con unidades. Los valores dentro de un grupo que muestran una diferencia de más de dos veces SD del valor medio del grupo y con una causa de procedimiento para la desviación serían considerados como valores atípicos y retirados del análisis. Tales valores no se obtuvieron en este estudio.

[0199] Los análisis estadísticos se realizaron con el software estadístico SPSS para Windows versión 19 (SPSS; Chicago, IL, EE.UU.) como pruebas bilaterales. Un valor de p menor que 0,05 fue considerado como estadísticamente significativo. El uso de transformaciones y pruebas no paramétricas se decidió después de examinar supuestos de modelos estadísticos, es decir, la normalidad de la distribución de datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y homogeneidad de las varianzas por el test de Levene. En un caso de violación de estas suposiciones, se aplicó transformación logarítmica o de otro tipo adecuado (es decir, la raíz cuadrada y recíprocas). Si los supuestos de los

modelos estadísticos se cumplieron como tal o después de las transformaciones, se evaluaron las diferencias entre grupos usando análisis paramétrico de una vía de la varianza (ANOVA). Si el ANOVA de una vía reveló diferencias estadísticamente significativas, se utilizó la prueba de Dunnett para comparaciones estadísticas entre los grupos. Si las suposiciones de los modelos estadísticos no se cumplieron, incluso después de las transformaciones, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para evaluar las diferencias entre los grupos. Si la prueba de Kruskal-Wallis reveló diferencias estadísticamente significativas, se utilizó la prueba de Mann-Whitney para las comparaciones estadísticas entre los grupos.

Mediciones de seguimiento

[0200] Las mediciones de seguimiento realizadas en el estudio incluyeron la determinación del peso corporal y mediciones de los niveles séricos de biomarcadores del metabolismo óseo. Los análisis estadísticos de los datos se realizaron usando un cambio relativo en cada animal. Para calcular el cambio relativo en la primera semana de la fase en vida del estudio, un valor obtenido una semana después del inicio de la fase en vida (el día 7) fue dividido por un valor obtenido al inicio de la fase en vida (en el día 0). Para el cálculo del cambio relativo en la fase en vida, un valor obtenido al final de la fase en vida (en el día 14) fue dividido por un valor obtenido al comienzo de la fase en vida (en el día 0) o antes del inicio de la fase en vida (en el día -7).

Mediciones de punto final

[0201] Las mediciones de punto final realizadas en el estudio incluyeron la determinación del peso uterino relativo y la determinación del peso corporal y mediciones de los niveles séricos de PINP utilizados para la aleatorización de los animales a grupos de estudio. Los análisis estadísticos de los datos se realizaron con los valores obtenidos al final de la fase en vida del estudio (el día 14) y una semana antes del inicio de la fase en vida (en el día -7) como tal.

Comparaciones entre grupos

[0202] Se realizaron las siguientes comparaciones estadísticas entre los grupos:

- Los efectos a corto plazo de la ovariectomía se estudiaron mediante la comparación de los animales de control OVX tratados con vehículo (grupo 2) con los animales de control con operación simulada tratados con vehículo (grupo 1).
- Los efectos a corto plazo de los tratamientos se estudiaron mediante la comparación de los animales OVX tratados con los compuestos de ensayo y de referencia (grupos 3-5) con los animales de control OVX tratados con vehículo (grupo 2).

Resultados

[0203] En este estudio, las ratas hembra Sprague-Dawley fueron ovariectomizadas y operadas de forma simulada a la edad de tres meses. Su tratamiento se inició un día después de las operaciones quirúrgicas, y los efectos del tratamiento fueron seguidos durante dos semanas (fase en vida). El compuesto 1 (1 - 3 mg/kg/d p.o.) se utilizó como compuesto de ensayo, 17 β -estradiol (E2; 4 μ g/kg/d s.c.) como compuesto de referencia y agua estéril como vehículo (5 ml/kg/d p.o.). Los efectos de la ovariectomía se estudiaron mediante la comparación de los animales de control OVX tratados con vehículo (grupo 2) con los animales de control con operación simulada tratados con vehículo (grupo 1). Los efectos de E2 se estudiaron mediante la comparación de los animales de control OVX tratados con E2 (grupo 3) con los animales de control OVX tratados con vehículo (grupo 2). Los efectos de tratamiento con el compuesto 1 se estudiaron mediante la comparación de los animales OVX tratados con cabozantinib (grupos 4-5) con los animales de control OVX tratados con vehículo (grupo 2).

[0204] Las tablas 5a y 5b resumen los resultados. Una flecha hacia arriba (\uparrow) indica un aumento estadísticamente significativo y una flecha hacia abajo (\downarrow) una disminución estadísticamente significativa. Un asterisco (*) indica una significación estadística con un valor de $p < 0,05$, dos asteriscos (**) con un valor de $p < 0,01$, y tres asteriscos (***) con un valor de $p < 0,001$. NS = no significativo.

[0205] De acuerdo con la Tabla 5b, los resultados demuestran que la ovariectomía quirúrgica aumentó el peso corporal, disminuyó el peso uterino relativo, aumentó los niveles de CTX, OC y PINP en suero, y disminuyó la actividad de TRACP 5b en suero en ratas hembra dos semanas después de la ovariectomía.

Tabla 5a

Efectos a corto plazo del compuesto 1 sobre el peso corporal en el modelo OVX de rata				
MÉTODO/PARÁMETRO	OVX	E2 4 µg/kg/d s.c	cabozantinib (mg/kg/d p.o.)	
			1	3
PESO CORPORAL				
Peso corporal, cambio Durante la primera semana	↑**	↓**	↓*	NS
Durante la fase en vida	↑**	↓**	↓*	NS
PESO UTERINO RELATIVO				
peso uterino relativo en el día 14	↓**	↑**	NS	NS

Tabla 5a

5

Efectos a corto plazo del compuesto 1 sobre los biomarcadores del metabolismo óseo en el modelo OVX de rata				
MÉTODO/PARÁMETRO	OVX	E2 4 µg/kg/d s.c	cabozantinib (mg/kg/d p.o.)	
			1	3
MARCADORES BIOQUÍMICOS DE METABOLISMO ÓSEO				
Niveles de PINP en suero, cambio Durante la fase en vida	↑**	↓**	NS	↑*
Niveles de OC en suero, cambio Durante la fase en vida	↑*	↓***	NS	NS
Niveles de CTX en suero, cambio Durante la fase en vida	↑*	↓***	NS	NS
Actividad de TRACP 5b en suero, cambio Durante la fase en vida	↓***	NS	NS	↓*

10

[0206] Los resultados de los biomarcadores indican que la ovariectomía quirúrgica mejoró la resorción ósea, aumentó el recambio óseo y la formación de hueso, y disminuyó el número total de osteoclastos. Las conclusiones implican que la ovariectomía aceleró la tasa de recambio óseo en ratas hembras. Los resultados que describen los efectos a corto plazo de la ovariectomía están en línea con los resultados publicados en la literatura que demuestran que el presente estudio se puede utilizar para evaluar la eficacia preclínica de terapias en ratas OVX (Rissanen et al. 2008a, Rissanen et al. 2008b).

15

[0207] Tal como se ha indicado, los resultados de biomarcadores del metabolismo óseo indican que el tratamiento con el Compuesto 1 a la dosis oral de 3 mg/kg/d mejoró el aumento inducido por OVX en la formación de hueso y la reducción inducida por OVX en el número total de osteoclastos, pero no afectó el aumento inducido por OVX en la resorción ósea y recambio óseo en ratas OVX después de dos semanas de tratamiento. La formación de hueso mejorada en asociación con el número total reducido de los osteoclastos y los niveles inalterados de la resorción ósea implican que el tratamiento con el Compuesto 1 a la dosis oral de 3 mg/kg/d desplazó el recambio óseo estimulado por OVX hacia la formación de hueso en ratas hembras.

20

Referencias

25

[0208] Lindsay R and Cosman F (2008) The pharmacology of estrogens in osteoporosis. In: Bilezikian JP, Raisz LG and Martin TJ (eds.) Principles of bone biology. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 1769-75.

30

Raisz LG, Bilezikian JP and Martin TJ (2008) Pathophysiology of osteoporosis. In: Bilezikian JP, Raisz LG and Martin TJ (eds.) Principles of bone biology. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 1635-47.

Rissanen JP and Halleen JM (2010) Models and screening assays for drug discovery in osteoporosis. Expert Opin Drug Discov. 5: 1163-74.

Cremers S, Garnero P and Seibel MJ (2008) Biochemical markers of bone metabolism. In: Bilezikian JP, Raisz LG and Martin TJ (eds.) Principles of bone biology. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 1857-81.

Rissanen JP, Suominen MI, Peng Z and Halleen JM (2008a) Secreted tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a marker of osteoclast number in human osteoclast cultures and the rat ovariectomy model. Calcif Tissue Int. 82: 108-15.

Rissanen JP, Suominen MI, Peng Z, Morko J, Rasi S, Risteli J and Halleen JM (2008b) Short-term changes in serum PINP predict long-term changes in trabecular bone in the rat ovariectomy model. *Calcif Tissue Int.* 82: 155-61.

Peng Z, Tuukkanen J, Zhang H, Jämsä T and Väänänen HK (1994) The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. *Bone.* 15: 523-32.

5 Wronski TJ, Walsh CC and Ignaszewski LA (1986) Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Bone.* 7: 119-23

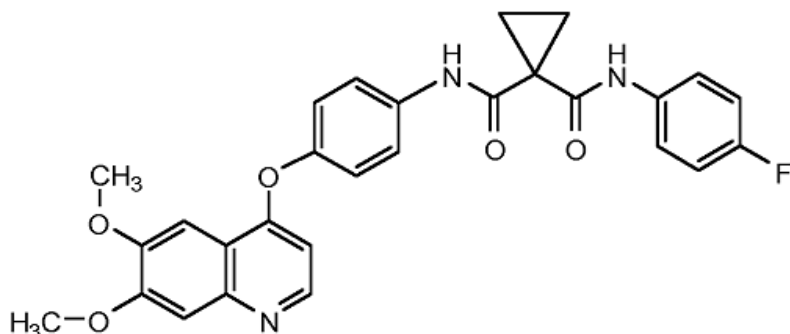
REIVINDICACIONES

1. Compuesto 1

5

10

15



20

Compuesto 1

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para utilizar en el tratamiento de la osteoporosis, en el que el compuesto 1 se administra entre 0,01 y 25 mg una vez diaria.

25

2. Compuesto para utilizar, según la reivindicación 1, en el que el compuesto 1 está en forma de la sal de malato.

3. Compuesto para utilizar, según la reivindicación 2, en el que el compuesto 1 está en forma de la sal de (L)-malato o (D)-malato.

30

4. Compuesto para utilizar, según la reivindicación 3, en el que el compuesto 1 está en forma de la sal de (L)-malato.

5. Compuesto para utilizar, según las reivindicaciones 1-4, en el que el compuesto 1 está en la forma cristalina N-1 de la sal de (L)-malato y/o la sal de (D)-malato.

35

6. Compuesto para utilizar, según las reivindicaciones 1-4, en el que el compuesto 1 está en la forma cristalina N-2 de la sal de (L)-malato y/o la sal de (D)-malato.

7. Compuesto para utilizar, según las reivindicaciones 1-6, en el que el compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra como una composición farmacéutica comprendiendo adicionalmente un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

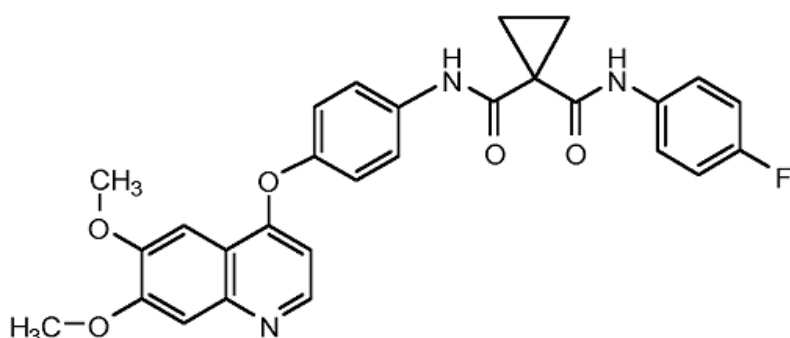
40

8. Compuesto 1:

45

50

55



Compuesto 1

60

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para utilizar en el tratamiento de la osteoporosis en pacientes que tienen o actualmente están en tratamiento para el cáncer, en el que el compuesto 1 se administra entre 0,01 y 25 mg una vez diaria.

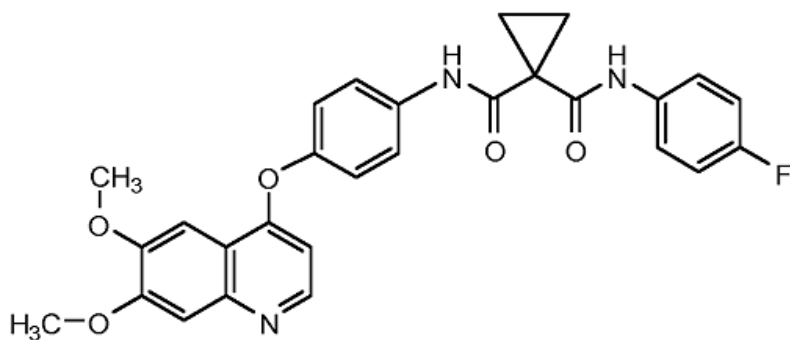
65

9. Compuesto 1:

5

10

15

**Compuesto 1**

20 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para utilizar en mejorar la deposición anormal de hueso no estructurado acompañado por el aumento de las fracturas del esqueleto, la compresión de la médula espinal y el dolor óseo severo de la osteoporosis, en el que el compuesto 1 se administra entre 0,01 y 25 mg una vez diaria.

25 10. Compuesto para utilizar, según la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en el que el compuesto 1 está en forma de la sal de malato.

11. Compuesto para utilizar, según la reivindicación 10, en el que el compuesto 1 está en forma de la sal de (L)-malato o (D)-malato.

30 12. Compuesto para utilizar, según la reivindicación 11, en el que el compuesto 1 está en forma de la sal de (L)-malato.

Figura 1

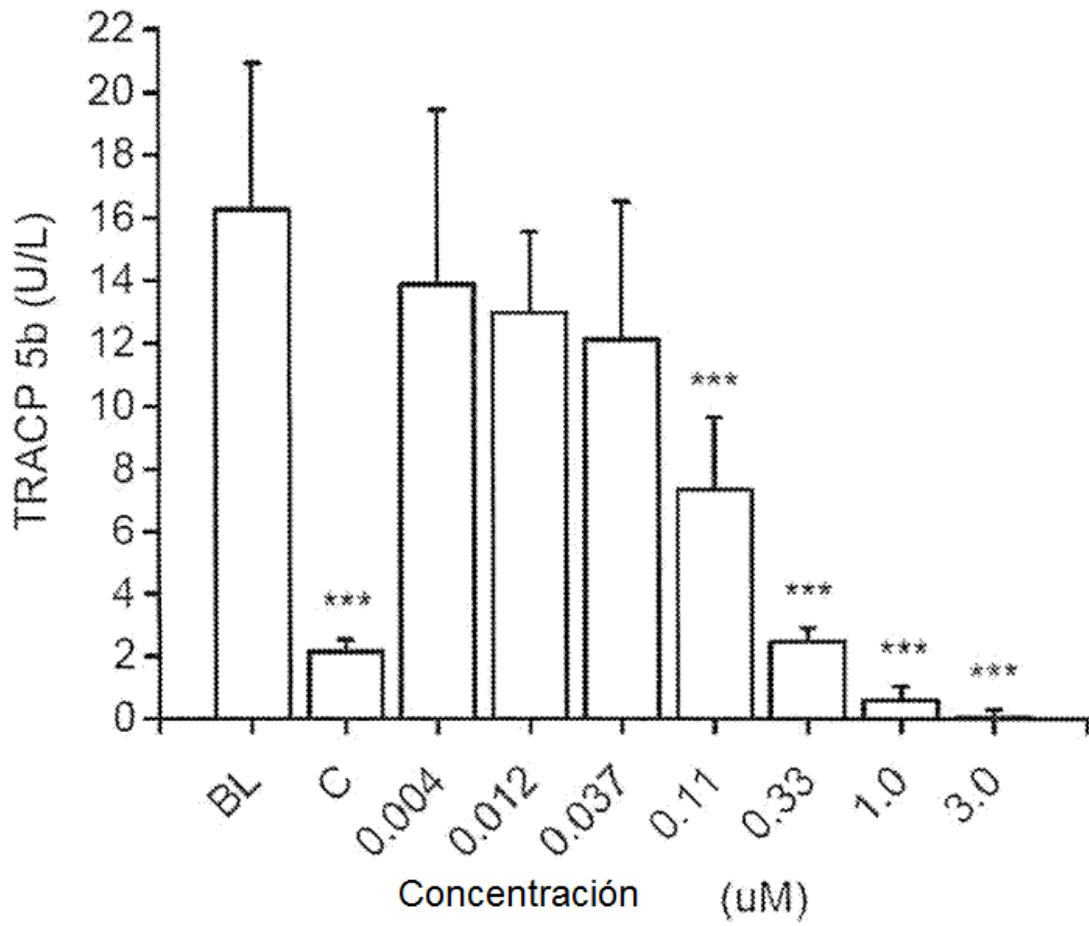


Figura 2

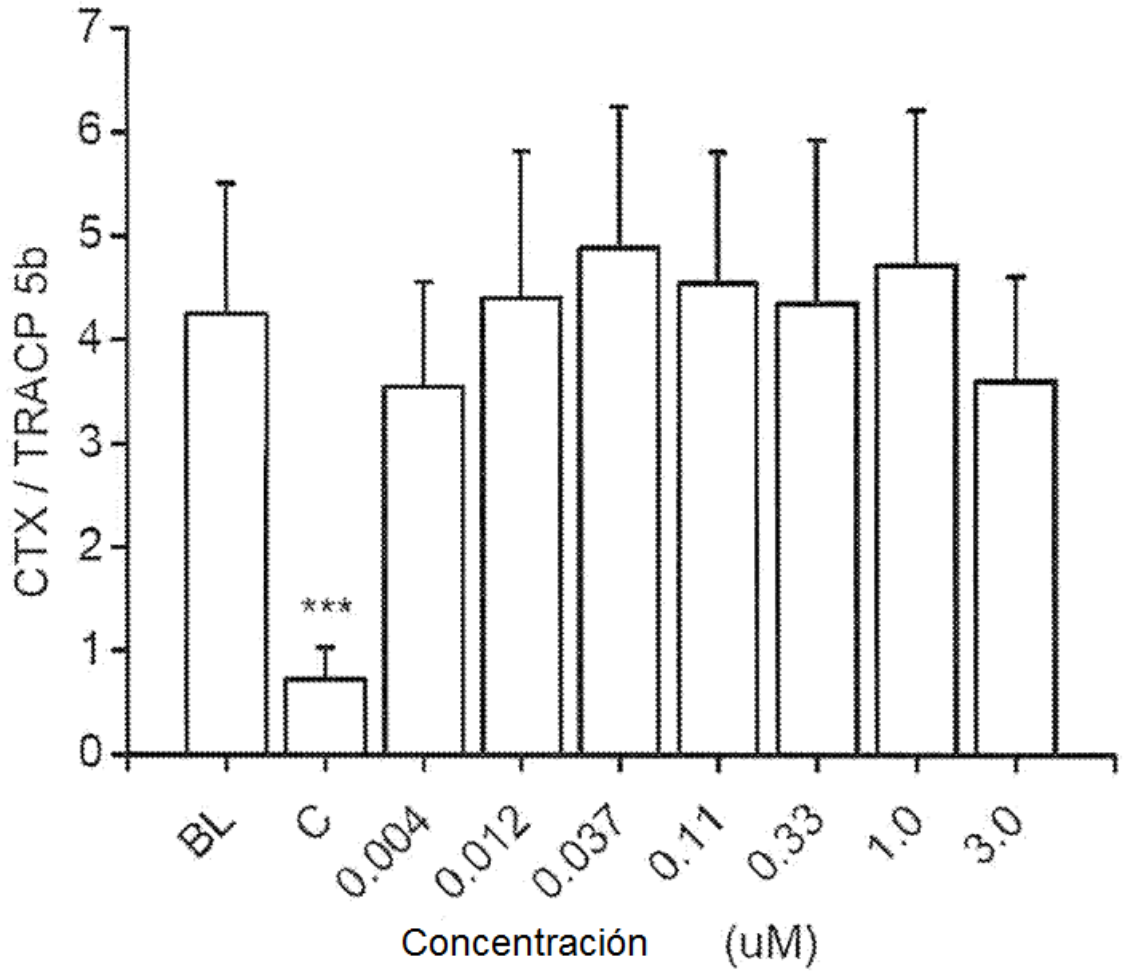


Figura 3

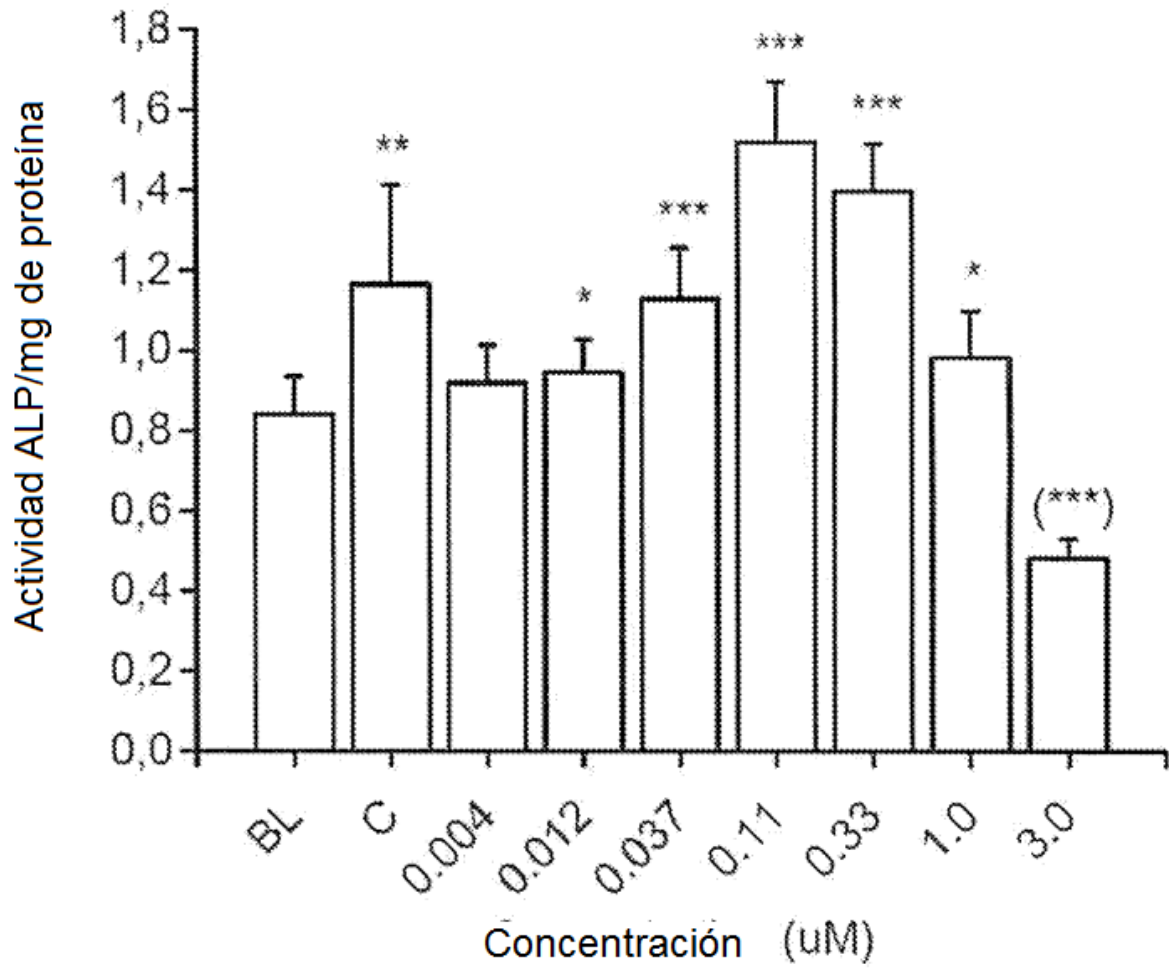


Figura 4

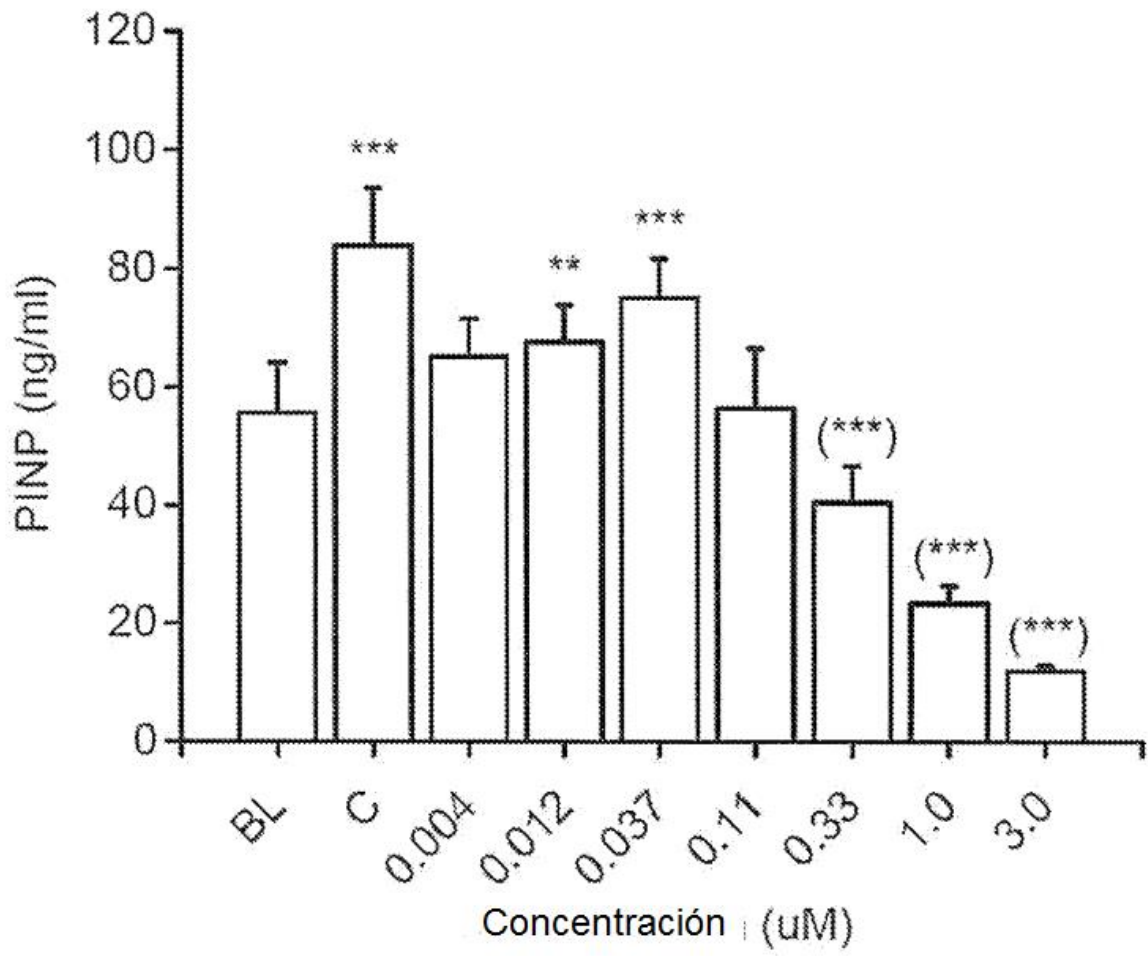


Figura 5

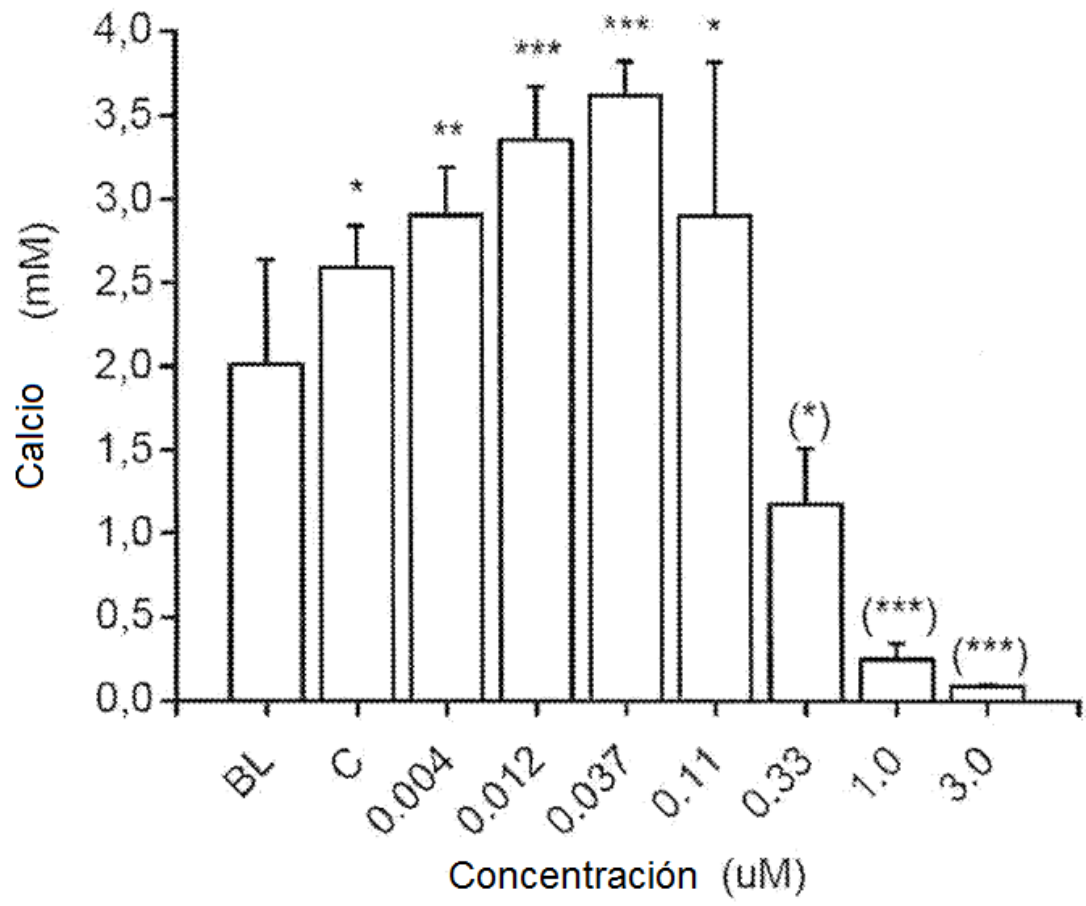


Figura 6

Día de estudio	Animales (n = 40)			
Día -7	Peso corporal y recogida de sangre			
	Asignación al azar a grupos de estudio por estratificación según el peso corporal y los niveles séricos de PINP			
Día de estudio durante la fase en vida	Simulado (n = 8)	OVX (n =32, 8 por grupo de estudio)		
	Vehículo	Vehículo	E2 (4 µg/kg/d s.c.)	cabozantinib (mg/kg/d p.o.)
				1 3
Día 0	Peso corporal y operaciones quirúrgicas simuladas y OVX			
Diario a lo largo de la fase en vida (hasta el día 13)	Tratamientos con cabozantinib, 17 β-estradiol y vehículo			
Día 7	Peso corporal y ajuste de la dosis de tratamiento según el peso corporal			
Día 14	Peso corporal, recogida de sangre y peso uterino relativo			
Análisis experimental	Día de estudio			
	Día -7	Día 0	Día 7	Día 14
Peso corporal	X	X	X	X
Peso uterino relativo				X
biomarcadores del metabolismo óseo, incluyendo PINP, OC, CTX y TRACP 5b	X			X