

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 720**

51 Int. Cl.:

C07D 241/20 (2006.01)
C07D 401/12 (2006.01)
C07D 403/12 (2006.01)
A61K 31/4965 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.01.2014 PCT/US2014/010778**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **17.07.2014 WO14110200**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2014 E 14737648 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 3007689**

54 Título: **Inhibidores de quinasa no selectivos**

30 Prioridad:

10.01.2013 US 201361751217 P
11.10.2013 US 201361889887 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.07.2018

73 Titular/es:

PULMOKINE, INC. (50.0%)
7 University Place, Room B127
Rensselaer, NY 12144, US y
GILEAD SCIENCES, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

ZISMAN, LAWRENCE S.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 675 720 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de quinasa no selectivos

Campo de la invención

5 La presente descripción se refiere a un compuesto y composiciones y su uso y el tratamiento y prevención de condiciones pulmonares.

Antecedentes de la invención

La siguiente discusión de los antecedentes se proporciona meramente para ayudar al lector en el entendimiento de la invención y no necesariamente describe o constituye una técnica anterior.

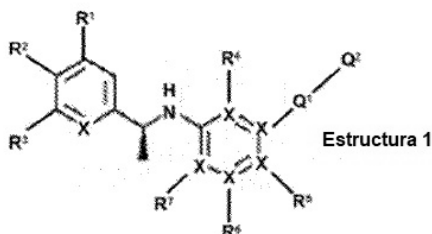
10 Los receptores de tirosina quinasa (RTKs) son polipéptidos transmembrana que regulan la regeneración, remodelado, desarrollo y diferenciación de células y tejidos. Véase, por ejemplo, Mustonen *et al.*, *J. Cell Biology* 129, 895-898 (1995); van der Geer *et al.* *Ann Rev. Cell Biol.* 10, 251-337 (1994). Además de activar los RTKs, los factores de crecimiento y citoquinas de ligando polipéptido son capaces de inducir cambios de conformación en los dominios externos de RTK que da por resultado la dimerización del receptor. Lymboussaki, *Dissertation, Univ. Of Helsinki, Mol./Cancer Bio Lab and Dept. of Pathology, Haartman Institute* (1999); Ullrich *et al.*, *Cell* 61, 203-212 (1990). La unión similar de receptor de RTK-ligando, además, imparte la trans-fosforilación del receptor en residuos de tirosina
15 específicos y la posterior activación de los dominios catalíticos de la quinasa, permitiendo así la fosforilación del sustrato y la activación de cascadas de señalización asociadas. *Id.*

20 La actividad aberrante de RTK, sin embargo, está asociada con una variedad de enfermedades y la distribución sistémica de ciertos inhibidores de RTK ha mostrado eficacia para enfermedades específicas. Los ensayos *in vivo* para este fin, que incluye el sistema de modelo murino con monocrotalina (MCT), se han empleado para confirmar si los inhibidores de RTK putativos funcionarían como agentes terapéuticos. Con respecto a la eficacia del candidato de fármaco preclínico, sin embargo, el modelo MCT se ha criticado puesto que como tal un sistema falla al confirmar ciertos fenotipos de enfermedad humana, por ejemplo, el desarrollo de lesiones neoíntimas y/o plexiformes que son comórbidas sintomáticamente con dichas enfermedades. Por tanto, este modelo es un sistema imperfecto, que
25 puede confundir las indicaciones etiológicas y patológicas de la enfermedad humana. Por consiguiente, son necesarios sistemas de modelo nuevos o complementarios para el desarrollo de fármacos rigurosos y eficientes.

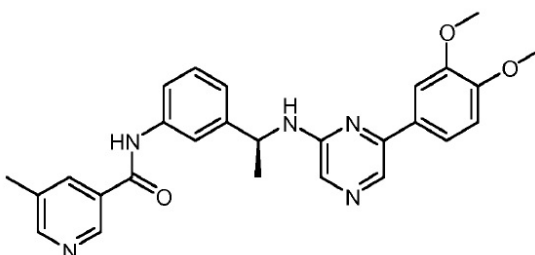
30 En concierto con el desarrollo y administración de inhibidores de RTK de primera generación, por ejemplo, imatinib, los RTK han desarrollado resistencia al inhibidor adquiriendo ciertas mutaciones. Véase, por ejemplo, Shah *et al.*, *Science*, 305, 395-402 (2004). Por ejemplo, en pacientes enfermos refractarios a ciertos inhibidores de quinasa, por ejemplo, imatinib, se ha mostrado que el "residuo guardián" del bolsillo hidrófobo posee frecuentemente mutaciones. Véase Pao *et al.*, *PLoS Med.* 2(3):e73 (2005). Dichas mutaciones se han identificado con respecto a ABL, es decir, en el residuo T315, y en posiciones análogas en KIT, PDGFR α , EGFR y otras quinasa. *Id.* Por tanto, se necesitan nuevos inhibidores de RTK con eficacia superior – desarrollados en sistemas de modelo que se parecen
35 fenotípicamente a la patología de enfermedad humana – para evitar y tratar enfermedades que poseen actividad aberrante de RTK.

El documento WO 2003/099706 describe piridinas y pirazinas útiles como inhibidores de quinasa. El documento WO 2008/058341 describe métodos de síntesis de piridinas sustituidas.

40 El documento WO 2014/110198 es un documento no publicado hasta después de la fecha de presentación de esta memoria pero que describe compuestos de Estructura 1 para el uso como inhibidores de quinasa en el tratamiento de la enfermedad.

**Compendio**

La presente invención proporciona un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usar en el tratamiento de un trastorno pulmonar, en donde el compuesto es de la fórmula:



Se han encontrado varios compuestos útiles en el tratamiento de ciertas enfermedades tales como, por ejemplo, cáncer. Por ejemplo, Gleevec® (mesilato de imatinib o “imatinib”) es un compuesto que ha mostrado eficacia en el tratamiento de leucemia mieloide crónica (LMC) y tumores del estroma gastrointestinal (TEGI). Otros fármacos experimentales incluyen sorafenib y PNU-166196 para el respectivo tratamiento de carcinoma de células renales y leucemia. Aunque se han hecho avances significativos en el desarrollo de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de ciertos cánceres; se necesitan nuevos compuestos, composiciones, métodos de tratamiento y sistemas de modelo para desarrollar fármacos para prevenir y/o tratar cáncer y otras enfermedades, por ejemplo, enfermedad pulmonar-vascular tal como hipertensión arterial pulmonar (HAP). En particular, las receptor tirosina quinasa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés) son una diana terapéutica atractiva para HAP. La ruta de señalización de PDGF se activa en la HAP idiopática humana (iHAP) y en modelos animales de la enfermedad. Por ejemplo, la expresión de mRNA de PDGFA, PDGFB, PDGFR α y PDGFR β se aumenta en las pequeñas arterias pulmonares de pacientes con iHAP en comparación con sujetos de control, y el análisis de electroinmunotransferencia (Western blot) muestra un aumento significativo en la expresión de proteínas de PDGFR β en pulmones con HAP.

La migración de CMLAPs se inhibe mediante imatinib, un inhibidor de PDGFR α . El imatinib también disminuye PSVD y mejoró la supervivencia en el modelo MCT de rata de HAP. En varios casos de informes de pacientes con HAP refractario, se ha observado una respuesta favorable al imatinib. Véase Ghofrani *et al.*, “Imatinib in pulmonary arterial hypertension patients with inadequate response to established therapy”. *Am J Respir Crit Care Med*. Vol. 182:1171-7 (2010). El ensayo IMPRES, que examinó el efecto del imatinib en pacientes con HAP severo, mostró una mejora en la distancia de paseo de seis minutos y en la hemodinámica cardiopulmonar. Sin embargo, el imatinib administrado de forma oral puede asociarse con efectos secundarios sistémicos que incluyen distrés gastrointestinal y supresión de médula ósea. Véase Paniagua *et al.* “Imatinib for the treatment of rheumatic diseases”. *Nat Clin Pract Rheumatol*; Vol. 3:190-1 (2007). Para mejorar la ventana terapéutica, es decir, aumentar la eficacia y disminuir los efectos secundarios sistémicos, los actuales inventores emplearon la distribución por inhalación de inhibidores quinasa para HAP.

El imatinib, además, se desarrolló usando un sistema de modelo MCT murino *in vivo*, que es un sistema imperfecto que afecta a la evaluación preclínica de la eficacia del candidato a fármaco al menos porque es poco fiable con respecto a la expresión de ciertos fenotipos de enfermedad humana, por ejemplo, el desarrollo de lesiones neointimas y/o plexiformes asociadas con HAP. Cool *et al.*, “Pathogenesis and evolution of plexiform lesions in pulmonary hypertension associated with scleroderma and human immunodeficiency virus infection”. *Hum Pathol*. 28:434-442 (1997). Por lo tanto, examinar los efectos de los inhibidores de quinasa en modelos más agresivos que presentan fenotipos de enfermedad humana es esencial para reflejar de forma más exacta la patología de la enfermedad humana y, por consiguiente, el desarrollo de la siguiente generación de compuestos y composiciones para tratar de forma efectiva la enfermedad humana.

Los actuales inventores han empleado dicho modelo, mientras comparan adicionalmente los actuales compuestos y terapias con imatinib. Como se detalla más a continuación, los actuales inventores realizaron estudios de eficacia usando un sistema de modelo murino con monocrotalina (MCT) más neumonectomía (PN) (MCT+ PN). Este modelo da lesiones neointimas y/o plexiformes características de la enfermedad humana, por ejemplo, HAP. Para este fin, por ejemplo, la firma patológica de HAP consiste en lesiones concéntricas y plexiformes en las arteriolas pulmonares pre-capilares pequeñas. Véase Cool *et al.* (1997); y Tuder *et al.*, “Plexiform lesion in severe pulmonary hypertension: association with glomeruloid lesion.” *Am J Pathol* 159:382-383 (2001). Las lesiones concéntricas surgen de la proliferación de células neointimas, que ocluyen el lumen de los vasos. Se ha presentado que estas lesiones neointimas obstructivas concéntricas están compuestas de miofibroblastos y/o células endoteliales. Véase, por ejemplo, Yi *et al.*, *Am J Respir Crit Care Med* 162:1577-86 (2000).

Además, los infiltrados perivasculares, que consisten en células T, células B y macrófagos, se han encontrado en la HAP plexogénica. Véase Sakagami, “*In vivo*, *in vitro* and *ex vivo* models to assess pulmonary absorption and disposition of inhaled therapeutics for systemic delivery.” *Adv Drug Deliv Rev* 58:1030-1060 (2006). Las lesiones plexiformes, además, se caracterizan por canales vasculares desorganizados que se tiñen por marcadores celulares endoteliales, y dichas lesiones en muestras de pulmón de pacientes con HAP idiopática y/o primaria consisten en una expansión monoclonal de células endoteliales. Lee *et al.*, “Monoclonal endothelial cell proliferation is present in primary but not secondary pulmonary hypertension”. *J Clin Invest* 101:927-934 (1998). Como tal, la HAP de este tipo

es esencialmente un “cáncer” de las células endoteliales arteriolares pulmonares (véase *id.*), al menos porque en las etapas inicial o tempranas de la enfermedad, una pérdida apoptótica aguda de células endoteliales normales puede dar por resultado el surgimiento y expansión clonal de células endoteliales resistentes a la apoptosis. Lee *et al.* (1998). El proceso neoplásico asociado con HAP se prepara no solo para el tratamiento del inhibidor quinasa de HAP, sino también para el desarrollo de nuevos compuestos, composiciones y métodos, por medio de determinaciones del modelo MCT+PN, con eficacia superior, potencia y un espectro más amplio de inhibición en comparación con los inhibidores de quinasa generados anteriormente que usan sistemas de modelo inferiores, que pueden poseer una estrecha selectividad para la inhibición de RTK, para el tratamiento de la enfermedad neoplásica. El modelado de homología fármaco-quinasa asegura que dichos inhibidores, que incluyen, por ejemplo, derivados no selectivos e irreversibles de los mismos, se dirijan a dominios de quinasa vulnerables para la óptima eficacia, como se describe adicionalmente a continuación.

El compuesto para usar según la invención puede administrarse de forma oral, intravenosa, subcutánea, transdérmica, intraperitoneal o por inhalación. En casos ilustrativos, el receptor de quinasa es un receptor de tirosina quinasa (RTK), y en donde el RTK es un receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR). En casos ilustrativos, el PDGFR es un receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas-alfa (PDGFR- α) o un receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas-beta (PDGFR- β) o ambos. En casos ilustrativos, el PDGFR es un homodímero o heterodímero seleccionado de PDGFR- $\alpha\alpha$, PDGFR- $\beta\beta$ y PDGFR- $\alpha\beta$, o cualquier combinación de los mismos. En casos ilustrativos, la inhibición del PDGFR es efectiva en el tratamiento de trastorno pulmonar, donde el trastorno pulmonar es hipertensión arterial pulmonar (HAP), HAP asociada con lesiones plexiformes y/o neoíntimas, HAP asociada con fibrosis pulmonar y/o vasodegeneración progresiva, proliferación anormal de fibroblastos y/o miofibroblastos, o trastornos vasculares pulmonares asociados con la proliferación anormal de células endoteliales o cualquier combinación de los mismos.

En casos ilustrativos, la inhibición es una inhibición combinada tanto del PDGFR- α como del PDGFR- β . En casos ilustrativos, la inhibición evita la activación tanto del PDGFR- α como del PDGFR- β modulando las interacciones de sustratos similares. En casos ilustrativos, el sustrato similar se selecciona de PDGFAA, PDGFBB y PDGFAB o cualquier combinación de los mismos. En casos ilustrativos, el trastorno pulmonar se selecciona de hipertensión arterial pulmonar (HAP), HAP asociada con lesiones plexiformes y/o neoíntimas, HAP asociada con fibrosis pulmonar y/o vasodegeneración progresiva, proliferación anormal de fibroblastos y/o miofibroblastos, y trastornos vasculares pulmonares asociados con la proliferación anormal de células endoteliales.

En casos ilustrativos, la HAP seleccionada de HAP primaria, HAP idiopática, HAP hereditaria, HAP refractaria, BMPR2, ALK1, endogлина asociada con telangiectasia hemorrágica hereditaria, endogлина no asociada con telangiectasia hemorrágica hereditaria, HAP inducida por fármacos, y HAP inducida por toxinas, HAP asociada con esclerosis sistémica, enfermedad mixta del tejido conectivo, VIH, hepatitis y/o hipertensión portal.

En casos ilustrativos, la HAP es secundaria a la hipertensión pulmonar, enfermedad cardiaca congénita, hipoxia, anemia hemolítica crónica, hipertensión pulmonar persistente del recién nacido, enfermedad veno-oclusiva pulmonar (EVOP), hemangiomas capilar pulmonar (HCP), hipertensión pulmonar con enfermedad cardiaca izquierda, disfunción sistólica, disfunción diastólica, enfermedad valvular, enfermedad pulmonar, enfermedad pulmonar intersticial, fibrosis pulmonar, esquistosomiasis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), respiración desordenada durante el sueño, trastornos de hipoventilación alveolar, exposición crónica a las alturas, anomalías del desarrollo, hipertensión pulmonar tromboembólica crónica (HPTEC), hipertensión pulmonar con mecanismos multifactoriales poco claros, trastornos hematológicos, trastornos mieloproliferativos, esplenectomía, trastornos sistémicos, sarcoidosis, histiocitosis pulmonar de células de Langerhans, linfangioleiomiomatosis, neurofibromatosis, vasculitis, trastornos metabólicos, enfermedad del almacenamiento del glucógeno, enfermedad de Gaucher, trastornos de tiroides, obstrucción tumoral, mediastinitis fibrosante y/o fallo renal crónico en la diálisis.

En casos ilustrativos, el trastorno pulmonar está asociado con anormal: presión sistólica ventricular derecha (PSVD); presión pulmonar; gasto cardiaco; hipertrofia ventricular derecha (VD) y/o hipertrofia arterial pulmonar (AP). En casos ilustrativos, el compuesto de Estructura 1 posee una CI_{50} de menos de 300 nM para el receptor de quinasa. En casos ilustrativos, el receptor de quinasa es receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas-alfa (PDGFR- α) o receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas-beta (PDGFR- β) o ambos, y donde el trastorno pulmonar es hipertensión arterial pulmonar. En casos ilustrativos, la inhibición se da a través de una interacción no covalente. En casos ilustrativos, la inhibición se da a través de una interacción covalente.

Se describe un método de tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar (HAP) en un sujeto, que incluye: modular el estado de fosforilación de uno o más objetivos corriente abajo del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas-alfa (PDGFR- α) o del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas-beta (PDGFR- β) o ambos, donde el objetivo corriente abajo es cualquier sustrato fosforilado como resultado de la activación de PDGFR- α y/o PDGFR- β , administrando al sujeto el compuesto de la invención para usar como se indica anteriormente o, una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto, o cualquier mezcla de los mismos, donde el objetivo corriente abajo se selecciona del grupo que consiste en AKT, PDGFR, STAT3, ERK1 y ERK2, o cualquier otro objetivo corriente abajo del PDGFR- α y/o el PDGFR- β .

En casos ilustrativos, el compuesto para usar según la invención se administra de forma oral, intravenosa, subcutánea, transdérmica, intraperitoneal o por inhalación. En casos ilustrativos, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en cáncer, cáncer metastático, VIH, hepatitis, HAP, HAP primaria, HAP idiopática, HAP hereditaria, HAP refractaria, BMPR2, ALK1, endogлина asociada con telangiectasia hemorrágica hereditaria, endogлина no asociada con telangiectasia hemorrágica hereditaria, HAP inducida por fármacos y HAP inducida por toxinas, HAP asociada con esclerosis sistémica, y enfermedad mixta del tejido conectivo, hipertensión pulmonar, enfermedad cardíaca congénita, hipoxia, anemia hemolítica crónica, hipertensión pulmonar persistente del recién nacido, enfermedad veno-oclusiva pulmonar (EVOP), hemangiomas capilar pulmonar (HCP), hipertensión pulmonar por enfermedad cardíaca izquierda, disfunción sistólica, disfunción diastólica, enfermedad valvular, enfermedad pulmonar, enfermedad pulmonar intersticial, fibrosis pulmonar, esquistosomiasis, EPOC, respiración desordenada durante el sueño, trastornos de hipoventilación alveolar, exposición crónica a las alturas, anomalías del desarrollo, hipertensión pulmonar tromboembólica crónica (HPTEC), hipertensión pulmonar con mecanismos multifactoriales poco claros, trastornos hematológicos, trastornos mieloproliferativos, esplenectomía, trastornos sistémicos, sarcoidosis, histiocitosis pulmonar de las células de Langerhans, linfangoiomiomatosis, neurofibromatosis, trastornos metabólicos, enfermedad del almacenamiento del glucógeno, enfermedad de Gaucher, trastornos de tiroides, obstrucción tumoral, mediastinitis fibrosante y fallo renal crónico en la diálisis.

En casos ilustrativos, la sal es una sal de cloruro, hidrocloreuro, sulfato, fosfato, mesilato, bismesilato, tosilato, lactato, tartrato, malato, bis-acetato, citrato o bishidrocloreuro. En casos ilustrativos, la inhibición se da a través de una interacción no covalente. En algunos casos, la inhibición se da a través de una interacción covalente. El compuesto para el uso posee una CI_{50} de menos de 300 nM para el receptor de quinasa. En casos ilustrativos, los métodos de tratamiento dan por resultado uno o más de capacidad de ejercicio mejorado, clase funcional mejorada, menor falta de aire, hospitalización disminuida, necesidad disminuida de trasplante de pulmón, necesidad disminuida de septostomía auricular, y longevidad o supervivencia total aumentada. En algunos casos, la capacidad de ejercicio mejorada es una distancia aumentada de paseo de 6 minutos. En casos adecuados, la clase funcional mejorada es una mejora de clase IV a clase III, II o I, o una mejora de clase III a clase II o I, o una mejora de clase II a clase I.

La FIG. 1A muestra que la CI_{50} de Imatinib frente a PDGFR α es 71 nM, mientras que la FIG. 1B muestra una CI_{50} para PK10453 frente a PDGFR α de 35 nM. La FIG. 1C, además, muestra que la CI_{50} de Imatinib para PDGFR β es 607 nM, mientras la FIG. 1D muestra una CI_{50} para PK10453 frente a PDGFR β de 10,1 nM.

La FIG. 2A muestra que la estimulación de PDGFAA de pAKT(S473) en FPHs se bloqueó mediante PK10453 (■) e Imatinib (▲) con una CI_{50} comparable entre 0,3-0,6 μ M. La FIG. 2B muestra que la estimulación de PDGFAA de pAKT (T308) en FPHs se bloqueó por PK10453 (■) e Imatinib (▲) con una CI_{50} comparable entre 0,3-0,6 μ M. La FIG. 2C muestra que la estimulación de PDGFBB de pAKT(Ser473) se bloqueó por PK10453 (■) con una CI_{50} de 0,13 μ M en comparación con 1,8 μ M para Imatinib (▲). La FIG. 2D muestra que la estimulación de PDGFBB de pAKT (Thr308) se bloqueó por PK10453 (■) con una CI_{50} de 0,43 μ M en comparación con 3,25 μ M para Imatinib (▲). La FIG. 2E muestra ejemplos de ICWs para la fosforilación de AKT estimulada por PDGFAA y PDGFBB, PK10453 frente a Imatinib. La señal a 800 nm está codificada por color verde y representa la señal específica de la fosfo-proteína; la señal a 700 nm está codificada por color rojo y representa la señal de AKT total. Como se muestra, las señales a 800 y 700 nm están superpuestas (§ $p < 0,01$; * $p < 0,001$).

La FIG. 3 representa imágenes de fluorescencia de secciones de pulmón de rata congeladas (lóbulos superior, medio e inferior derechos) después de 2 min de inhalación de PK10453 (Estructura 2) y trazador IR780. La adquisición de la imagen se dio a 800 nm (verde), que es la λ de detección de IR780, mientras que la adquisición de la imagen a 700 nm (rojo) representa la autofluorescencia del tejido. Se muestran los intervalos de la regla digital (1 cm).

La FIG. 4A es un gráfico farmacocinético (PK) que tiene que ver con PK10453 administrado de forma IV y concentraciones asociadas en los pulmones y plasma como una función del tiempo. La FIG. 4B es un gráfico de PK que tiene que ver con PK10453 administrado por INH y niveles asociados en los pulmones y plasma por tiempo.

La FIG. 5A es un gráfico que muestra el efecto de PK10453 en la presión sistólica VD en el modelo MCT, donde C (n=3), V (n=2), D2 (n=6), D4 (n=6) y D8 (n=5) respectivamente representan los tiempos de control, vehículo, exposición de 2 min, exposición de 4 min y exposición de 8 min, durante dos semanas, tres veces al día. Los asteriscos (*) indican $p < 0,001$ y los símbolos de sección (§) indican $p < 0,05$. La FIG. 5B es un gráfico que muestra el efecto de PK10453 en la hipertrofia VD en el modelo MCT, donde los tratamientos de inhalación se iniciaron tres semanas después de la administración de MCT. C, D2, D4 y D8 respectivamente representan los controles, tiempos de exposición de 2, 4 y 8 min, durante dos semanas tres veces al día. Los asteriscos (*) indican $p < 0,001$. La FIG. 5C es un gráfico que muestra el efecto de PK10453 en la presión sistólica VD (PSVD) en el modelo MCT de rata: comparación de PK10453 con imatinib; # $p < 0,01$. La FIG. 5D muestra la relación Lumen/Media en el modelo MCT de PK10453, Imatinib y vehículo: vehículo (V, n=4): $0,55 \pm 0,1$; PK10453 (D8, n=12): $0,94 \pm 0,08$; Imatinib (I8, n=5): $0,99 \pm 0,07$; § $p < 0,05$; # $p < 0,01$.

La FIG. 6A es un gráfico que muestra la presión sistólica de la arteria pulmonar medida en el tiempo en sujetos ambulatorios que usan el sistema de modelo MCT+PN con PK10453. V (n=5) y D4 (n=6) representan respectivamente el vehículo y la exposición de 4 min a PK10453 (Estructura 2) tres veces al día. Los asteriscos (*)

indican $p < 0,001$ y los símbolos de sección (§) indican $p < 0,01$. La FIG. 6B es un gráfico que muestra la presión sistólica de la arteria pulmonar medida en el tiempo en sujetos ambulatorios que usan el sistema de modelo MCT+PN con Imatinib. V= vehículo; I=Imatinib ($p=NS$).

5 La FIG. 7A muestra que la presión sistólica VD: V (n=9) SVD, $75,7 \pm 7,1$ mm de Hg, grupo D4 (n=10) SVD $40,4 \pm 2,7$ mm de Hg, D8 (n=8) SVD $43 \pm 3,0$ mm de Hg ($p < 0,001$ V frente a D4 y V frente a D8). La FIG. 7B muestra que la hipertrofia VD se disminuyó por tratamiento con PK10453 (Estructura 2); relación (VD/SIV)/VI: V (n=11); D4 (n=13); D8 (n=7); $*p < 0,001$, $\S p < 0,05$. La FIG. 7C muestra el modelo MCT+PN de rata, la relación de área de lumen/área de media fue mayor en los grupos tratados D8 (n=5) en comparación con PK10453 D4 (n=6) y vehículo (n=6); $*p < 0,0001$ D8 frente a V, D8 frente a D4. La FIG. 7D muestra análisis de oclusión, que se realizaron en las mismas muestras animales usadas para el análisis de relación de lumen/media. El análisis de oclusión mostró una disminución significativa en las lesiones de Grado 2 (oclusivo en $>50\%$) en el grupo D8 ($\#p < 0,01$).

La FIG. 8A muestra una imagen microscópica de lesiones neoíntimas. La FIG. 8B muestra una imagen de sujetos tratados con PK10453. La FIG. 8C muestra una mancha de fosfoPDGFR β (pPDGFR β), de animal tratado con vehículo, mientras que la FIG. 8D muestra una mancha de pPDGFR β para animales tratados con PK10453 (D8).

15 La FIG. 9 es un gráfico que muestra el área de lumen: área de media, que se aumenta en los grupos tratados D4 (n=6) y D8 (n=5) en comparación con el vehículo (n=6) por medio del modelo MCT+PN. El símbolo (§) es $p=0,032$ (D4 frente a V), el símbolo (‡) es $p=0,028$ (D8 frente a D4), y el asterisco (*) indica $p=0,00014$ (D8 frente a V).

20 La FIG. 10A muestra que pSTAT3 está localizado en los núcleos de células endoteliales y células perivasculares con el tratamiento de vehículo. La FIG. 10B muestra la señal nuclear de pSTAT3 del pulmón de un sujeto tratado con Estructura 2.

La FIG. 11A muestra las lesiones de Grado 0 caracterizadas por proliferación temprana de células endoteliales intraluminales y la presencia de células musculares lisas vasculares en la media usando colorante α CML. La FIG. 11B muestra una lesión de Grado 1-2 con células tipo miofibroblastos intraluminales extensas, algunas células endoteliales y fibrosis parcial de la capa media usando colorante α CML. La FIG. 11C muestra lesiones de Grado 2 avanzadas caracterizadas por células tipo miofibroblastos intraluminales extensas, proliferación endotelial, y sustitución fibrótica completa de la capa media usando colorante α CML. La FIG. 11D muestra lesiones de Grado 0 caracterizadas por la proliferación temprana de células endoteliales intraluminales y la presencia de células musculares lisas vasculares en la media usando colorante tricromo. La FIG. 11E muestra una lesión de Grado 1-2 con células tipo miofibroblastos intraluminales extensas, algunas células endoteliales, y fibrosis parcial de la capa media usando un colorante tricromo. La FIG. 11F muestra lesiones de Grado 2 avanzadas caracterizadas por células tipo miofibroblastos intraluminales extensas, proliferación endotelial, y sustitución fibrótica completa de la capa media usando un colorante tricromo. La FIG. 11G muestra lesiones de Grado 0 caracterizadas por la proliferación temprana de células endoteliales intraluminales y la presencia de células musculares lisas vasculares en la media usando colorante vWF. La FIG. 11H muestra una lesión de Grado 1-2 con células tipo miofibroblastos intraluminales extensas, algunas células endoteliales, y fibrosis parcial de la capa media usando colorante vWF. La FIG. 11I muestra lesiones de Grado 2 avanzadas caracterizadas por células tipo miofibroblastos intraluminales extensas, proliferación endotelial, y sustitución fibrótica completa de la capa media usando colorante vWF.

40 La FIG. 12A muestra señalización de PDGFAA 40X en una arteriola pulmonar. La FIG. 12B muestra señalización de PDGFBB 40X en una arteriola pulmonar. La FIG. 12C muestra señalización PDGFR α total 40X en una arteriola pulmonar. La FIG. 12D muestra señalización PDGFR β total 40X en una arteriola pulmonar. La FIG. 12E muestra señalización fosfoPDGFR α (pPDGFR α) 40X en una arteriola pulmonar. La FIG. 12F muestra señalización fosfoPDGFR β (pPDGFR β) 40X en una arteriola pulmonar.

45 La FIG. 13A muestra la inmunohistoquímica 20X para la señal pPDGFR α en la media. La FIG. 13B muestra la inmunohistoquímica 40X para la señal pPDGFR α en la media. La flecha apunta a un positivo de célula muscular lisa para pPDGFR α . La FIG. 13C muestra la imagen 20X que, en contraste con lo anterior, tenía muy poca señal en la media para pPDGFR β . La FIG. 13D muestra la imagen 40X que, en contraste con lo anterior, tenía muy poca señal en la media para pPDGFR β . La señal para pPDGFR β se nota en células peri-vasculares (izquierda superior – FIG. 13C y 13D), y células endoteliales.

50 La FIG. 14A muestra pAKT (Thr308) y AKT total, con el tratamiento con vehículo. La FIG. 14B muestra pAKT (Thr308) y AKT total con tratamiento con PK10453. La FIG. 14C muestra pAKT (Ser473) y AKT total, con tratamiento con vehículo. La FIG. 14D muestra pAKT (Ser473) y AKT total con tratamiento con PK10453. La FIG. 14E muestra que la relación de pAKT(Thr308)/AKT en extractos de pulmón no fue significativamente diferente entre los grupos (V=vehículo; D4=4 minutos de exposición 3X/día durante 2 semanas, D8=8 minutos de exposición 3X/día durante dos semanas, $p=NS$). La FIG. 14F representa la relación pAKT(Ser473)/AKT en extractos de pulmón para el grupo D8 frente al vehículo (V, n=5; D4, n=4; D8, n=5) $\S p < 0,05$ D8 frente a V.

La FIG. 15A es un gráfico de los sujetos tratados con vehículo. La FIG. 15B es un gráfico de los sujetos tratados con PK10453 (Estructura 2). La FIG. 15C muestra un gráfico del tratamiento con PK10453, que disminuyó pSTAT3/STAT3 en los pulmones de los sujetos que usan el modelo MCT+PN (n=4), donde V representa el vehículo,

D4 representa tiempos de exposición de 4 min tres veces al día, y D8 representa tiempos de exposición de 8 min durante dos semanas tres veces al día; 3x/día durante dos semanas de PK10453. Los asteriscos (*) p=0,009 y los símbolos de sección (§) indican p=0,024.

5 La FIG. 16A muestra los resultados de los experimentos que usan lumogramas de inmunoensayo Nanopro™ para pERK1/2 en sujetos tratados con vehículo. La FIG. 16B muestra los resultados de experimentos que usan lumogramas de inmunoensayo Nanopro™ para pERK1/2 en sujetos tratados con PK10453. La FIG. 16C muestra los resultados de experimentos que usan lumogramas de inmunoensayo Nanopro™ para ERK1/2 total y sujetos tratados con vehículo. La FIG. 16D muestra los resultados de experimentos que usan lumogramas de inmunoensayo Nanopro™ para ERK1/2 total en sujetos tratados con PK10453, donde PK10453 disminuyó la ppERK1/ERK1. La FIG. 16E muestra ppERK1/ERK1 en sujetos como se indica. La FIG. 16F muestra pERK2/ERK2 como se indica. La FIG. 16G muestra ppERK2/ERK2 como se indica en los pulmones. La FIG. 16H muestra pERK2/ERK2 como se indica en los pulmones. El n=4 para cada grupo, mientras V representa el vehículo, D4 representa tiempos de exposición de 4 min, tres veces al día, y D8 representa tiempos de exposición de 8 min de PK10453 (Estructura 2) durante dos semanas tres veces al día. Los asteriscos (*) p<0,0005; § p=0,045.

15 La FIG. 17A muestra los efectos de imatinib, PK10453 (Estructura 2) y PK10571 (Estructura 2a) en la fosforilación estimulada por PDGFAA de ERK1. La FIG. 17B muestra los efectos de imatinib, PK10453 (Estructura 2) y PK10571 (Estructura 2a) en la fosforilación estimulada por PDGFBB de ERK1. La FIG. 17C muestra los efectos de imatinib, PK10453 (Estructura 2) y PK10571 (Estructura 2a) en la fosforilación estimulada por PDGFAA de ERK2. La FIG. 17D muestra los efectos de imatinib, PK10453 (Estructura 2) y PK10571 (Estructura 2a) en la fosforilación estimulada por PDGFBB de ERK2.

25 La FIG. 18A muestra las concentraciones CI₅₀ de PK10467 (Estructura 3), PK10571 (Estructura 2a) e imatinib para la fosforilación de AKT estimulada por PDGFBB en fibroblastos de pulmón humano fetal. La FIG. 18B muestra las concentraciones CI₅₀ de PK10453 (Estructura 2) y PK10571 (Estructura 2a) para la fosforilación de AKT estimulada por PDGFBB en fibroblastos de pulmón humano fetal. La FIG. 18C muestra las concentraciones CI₅₀ de PK10468 (Estructura 4), PK10569 (Estructura 5) e imatinib para la fosforilación de AKT estimulada por PDGFBB en fibroblastos de pulmón humano fetal. La FIG. 18D muestra las estructuras químicas de la Estructura 2, Estructura 2a, Estructura 3, Estructura 4 y Estructura 5.

30 La FIG. 19 es una representación gráfica del peso corporal del sujeto en sujetos administrados con vehículo y tratados con PK10453 (Estructura 2), donde los cuadrados indican los tratados con vehículo (n=10), los triángulos indican el grupo D4 con PK10453 (n=10) y los diamantes indican el grupo D8 con PK10453 (n=6).

La FIG. 20 es un gráfico que representa los datos del transmisor de telemetría PAC40 procedentes de transmisores implantados en la aorta abdominal para monitorizar la presión sanguínea sistémica durante siete días en sujetos expuestos a MCT ambulatoria tratados con vehículo (n=3) o PK10453 (n=3).

35 La presente descripción se refiere a, un compuesto que funciona como un inhibidor de quinasa. Asimismo, se describen en esta memoria métodos para usar el compuesto en la prevención y tratamiento de condiciones de enfermedad. La presente descripción se refiere además a formulaciones farmacéuticas del compuesto, que poseen indicaciones profilácticas y/o terapéuticas para sujetos que necesitan inhibidores de quinasa, por ejemplo, pacientes aquejados con enfermedad vascular, trastornos proliferativos, cánceres y enfermedades o condiciones relacionadas, como se detalla más a continuación. Las definiciones de ciertos términos como se usan en esta memoria se proporcionan a continuación. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en esta memoria tienen generalmente el mismo significado que se entiende normalmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

Además, como se usa en esta memoria, las siguientes abreviaturas tienen ciertos significados como se detalla a continuación.

45 Como se usa en esta memoria, “aproximadamente” se entenderá por personas expertas en la técnica y variará en algún grado dependiendo del contexto en que se use. Si hay usos del término que no están claros para personas expertas en la técnica, dado el contexto en que se usa, “aproximadamente” significará hasta más o menos 10% del valor enumerado.

50 Como se usa en esta memoria, los siguientes compuestos PK y designaciones de estructuras se usan de forma intercambiable a lo largo de la solicitud: PK10453 = Estructura 2; PK10571 = Estructura 2a; PK10467 = Estructura 3; PK10468 = Estructura 4; y PK10569 = Estructura 5.

55 Como se usa en esta memoria, la “administración” de un agente o fármaco, por ejemplo, uno o más compuestos inhibidores de quinasa, a un sujeto o sujetos incluye cualquier ruta de introducción o distribución a un sujeto de un compuesto para realizar su función prevista. La administración puede realizarse mediante cualquier ruta adecuada, que incluye de forma oral, intranasal, por inhalación, parenteral (intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea), rectal o tópica. La administración incluye la auto-administración y la administración por otro. Se va a apreciar también que los diversos modos de tratamiento o prevención de condiciones médicas como se describen se

pretende que signifiquen “sustancial”, que incluye el tratamiento o prevención total aunque también menos que el total, y donde se alcanza algún resultado biológicamente o médicamente relevante.

5 Como se usan en esta memoria, los términos “comparable” o “que corresponde” en el contexto de la comparación de dos o más muestras, respuestas al tratamiento, o fármacos, se refieren al mismo tipo de muestra, respuesta, tratamiento y fármaco usado respectivamente en la comparación. Por ejemplo, el estado o nivel de fosforilación de AKT (pAKT) en una muestra puede compararse al estado o nivel de fosforilación en otra muestra. En algunos casos, las muestras comparables pueden obtenerse del mismo individuo en momentos diferentes. En otros casos, las muestras comparables pueden obtenerse de diferentes individuos, por ejemplo, un paciente y un individuo sano. En general, las muestras comparables se normalizan por un factor común por propósitos de control.

10 Como se usa en esta memoria, el término “composición” se refiere a un producto con ingredientes especificados en las cantidades especificadas, además de cualquier producto que resulte, directamente o indirectamente, de la combinación de los ingredientes especificados en las cantidades especificadas.

15 Como se usan en esta memoria, los términos “fármaco”, “compuesto”, “agente activo”, “agente”, “activos”, “composición farmacéutica”, “formulación farmacéutica” y “agente farmacológicamente activo” se usan de forma intercambiable y se refieren a cualquier compuesto químico, complejo o composición, cargada o sin cargar, que es adecuada para la administración y que tiene un efecto biológico beneficioso, adecuadamente un efecto terapéutico en el tratamiento de una enfermedad o condición fisiológica anormal, aunque el efecto puede ser también profiláctico por naturaleza. Los términos también abarcan derivados farmacéuticamente aceptables, farmacológicamente activos de esos agentes activos mencionados específicamente en esta memoria, que incluyen aunque no están limitados a sales, ésteres y amidas. Cuando se usan los términos “agente activo”, “agente farmacológicamente activo” e “IFA” (ingrediente farmacéutico activo), entonces, o cuando un agente activo particular se identifica específicamente, se va a entender que los solicitantes pretenden incluir el agente activo per se además de sales, ésteres y amidas farmacéuticamente aceptables, farmacológicamente activas.

25 Como se usa en esta memoria, los términos “cantidad efectiva” o “cantidad farmacéuticamente efectiva” o “cantidad terapéuticamente efectiva” de una composición, es una cantidad suficiente para alcanzar un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado, por ejemplo, una cantidad que de por resultado la prevención de, o una disminución en, los síntomas asociados con una enfermedad que se está tratando. La cantidad de una composición de la invención administrada al sujeto dependerá del tipo y gravedad de la enfermedad y en las características del individuo, tal como salud general, edad, sexo, peso corporal y tolerancia a los fármacos. También dependerá del grado, gravedad y tipo de enfermedad. El experto será capaz de determinar dosis apropiadas dependiendo de estos y otros factores. Las composiciones de la presente invención pueden administrarse también en combinación con uno o más compuestos terapéuticos adicionales.

35 Como se usa en esta memoria, los términos “irreversible” o “de forma irreversible” cuando se refieren a un inhibidor de quinasa significa un inhibidor de la actividad de una quinasa, tirosina quinasa y/o RTK, que es está unido o asociado de forma covalente, es decir, de forma permanente, a dicha quinasa.

40 Como se usa en esta memoria, el término “enfermedad neoplásica” se refiere a cánceres de cualquier clase y origen y etapas precursoras de los mismos. Por consiguiente, el término “enfermedad neoplásica” incluye el objeto identificado por los términos “neoplasia”, “neoplasma”, “cáncer”, “pre-cáncer” o “tumor”. Una enfermedad neoplásica se manifiesta generalmente por división celular anormal que da por resultado un nivel anormal de una población celular particular. Asimismo, porque la expansión monoclonal de células endoteliales puede denominarse “neoplasma” de las células endoteliales arteriolares pulmonares, la HAP también está incluida en los términos precedentes. La división celular anormal que subyace en una enfermedad neoplásica, además, es típicamente inherente en las células y no una respuesta fisiológica normal a la infección o inflamación. En algunos casos, las enfermedades neoplásicas que usan para la diagnosis métodos proporcionados en esta memoria incluyen carcinoma.

50 Como se usa en esta memoria, el término “no selectivo”, cuando se refiere a un inhibidor de quinasa o inhibidor del receptor quinasa, significa un inhibidor de la actividad de una quinasa, tirosina quinasa, dominio y/o RTK, que no únicamente específica para una única quinasa, receptor, tirosina quinasa, RTK o dominio, es decir, un objetivo similar, sino que en el contexto de la inhibición de una única quinasa, receptor, tirosina quinasa, RTK, dominio, etc., por ejemplo, para PDGFR, el inhibidor no es específico con respecto a las afinidades y/o concentraciones CI_{50} para la quinasa, receptor, tirosina quinasa, RTK, dominio, etc. Por ejemplo, PK10453 (Estructura 2) tiene como objetivo a PDGFR, de forma no selectiva, inhibiendo las isoformas tanto PDGFR- β como PDGFR- α , aunque sin embargo puede poseer aún una CI_{50} menor para la isoforma del receptor, por ejemplo, PDGFR- β .

55 Como se usa en esta memoria, el término “sal farmacéuticamente aceptable” incluye una sal con una base inorgánica, base orgánica, ácido inorgánico, ácido orgánico o aminoácido básico o ácido. Como sales de bases inorgánicas, la invención incluye, por ejemplo, metales alcalinos tales como sodio o potasio; metales alcalinotérreos tales como calcio y magnesio o aluminio; y amoniaco. Como sales de bases orgánicas, la invención incluye, por ejemplo, trimetilamina, trietilamina, piridina, picolina, etanolamina, dietanolamina y trietanolamina. Como sales de ácidos inorgánicos, la actual invención incluye, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido nítrico, ácido

sulfúrico y ácido fosfórico. Como sales de ácidos orgánicos, la actual invención incluye, por ejemplo, ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico y ácido p-toluensulfónico. Como sales de aminoácidos básicos, la actual invención incluye, por ejemplo, arginina, lisina y ornitina. Los aminoácidos ácidos incluyen, por ejemplo, ácido aspártico y ácido glutámico.

Como se usa en esta memoria, el término "nivel de referencia" se refiere a un nivel de una sustancia que puede ser de interés para propósitos comparativos. En algunos casos, un nivel de referencia puede ser una dosis de composición específica como un promedio del nivel de dosis de muestras tomadas de un sujeto de control. En otros casos, el nivel de referencia puede ser el nivel en el mismo sujeto en un momento diferente, por ejemplo, un curso de tiempo de administración, tal como un nivel a 2, 4, 6, 8 y 10 minutos (min), etc.

Como se usan en esta memoria, los términos "que trata" o "tratamiento" o "alivio" se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en donde el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) la condición o trastorno patológico objetivo. Un sujeto se "trata" con éxito para un trastorno si, después de recibir un agente terapéutico según los métodos de la presente invención, el sujeto muestra una reducción observable y/o medible en o ausencia de uno o más signos y síntomas de una enfermedad o condición particular.

Resumen

Síntesis del compuesto

El compuesto para usar según la invención se sintetiza fácilmente usando los procedimientos descritos en las siguientes secciones y como se describe en el documento WO 2008/058341. Los compuestos para el uso se preparan típicamente a partir de materiales de partida tales como dihaloheterociclo. La primera etapa es una sustitución aromática nucleófila para generar un intermedio monoamino-monohalo. La sustitución aromática nucleófila se lleva a cabo típicamente por adición de una amina primaria o secundaria al heterociclo di-halogenado en un disolvente tal como etanol, isopropanol, terc-butanol, dioxano, THF, DMF, etoxietanol, tolueno o xileno. La reacción se da típicamente a temperatura elevada en presencia de amina en exceso o una base no nucleófila tal como trietilamina o diisopropiltilamina, o una base inorgánica tal como carbonato de potasio o carbonato de sodio.

De forma alternativa, el sustituyente amino puede introducirse a través de una reacción de aminación catalizada por un metal de transición. Los catalizadores típicos para dichas transformaciones incluyen Pd(OAc)₂/P(t-Bu)₃, Pd₂(dba)₃/BINAP y Pd(OAc)₂/BINAP. Estas reacciones se llevan a cabo típicamente en disolventes tales como tolueno o dioxano, en presencia de bases tales como carbonato de cesio o terc-butóxido sódico o de potasio a temperaturas que oscilan de temperatura ambiente a reflujo. Véase, por ejemplo, Hartwig y Angew, *Chem. Int. Ed.* 37, 2046 (1998). Las aminas empleadas en la primera etapa de la síntesis de estos compuestos se obtienen comercialmente o se preparan usando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Las α-alkuilbencilaminas, además, pueden prepararse a través de la reducción de oximas. Los reductores típicos incluyen hidruro de litio y aluminio, gas hidrógeno en presencia de catalizador de paladio en carbón, Zn en presencia de ácido clorhídrico, borohidruro sódico en presencia de un ácido de Lewis tal como TiCb, ZrCU, NiCl₂ y MoO₃, o borohidruro sódico con resina de intercambio iónico Amberlyst H1 5 y LiCl. Las α-alkuilbencilaminas pueden prepararse además mediante aminación reductora de las correspondientes cetonas. Un método clásico para dicha transformación es la reacción de Leuckart-Wallach, aunque también se usan condiciones catalíticas (HCO₂NH₄, [(CH₃)₅C₅RhCl₂]₂) u otros procedimientos, por ejemplo, NH₄OAc, Na(CN)BH₃). Las α-alkuilbencilaminas pueden prepararse también a partir de los correspondientes alcoholes de α-alkuilbencilo. Dichos métodos incluyen la derivación del hidroxilo como un mesilato o tosillato y el desplazamiento con un nitrógeno nucleófilo, tal como ftalimida o azida que se convierte a la amina primaria usando métodos sintéticos convencionales; o, el desplazamiento del hidroxilo con un nitrógeno nucleófilo adecuado bajo condiciones tipo Mitsunobu. Los alcoholes de α-alkuilbencilo pueden prepararse por reducción de las correspondientes cetonas con un agente reductor tal como borohidruro sódico en un disolvente tal como metanol. De forma alternativa, los alcoholes de α-alkuilbencilo pueden obtenerse a través de la adición de una especie de alquilmetal (tal como un reactivo de Grignard) a un derivado de benzaldehído, que se realiza típicamente a temperatura ambiente o por debajo en disolventes tales como tetrahidrofurano. Las α-alkuilbencilaminas de alta pureza óptica pueden prepararse a partir de alcoholes de α-alkuilbencilo quirales usando los métodos esbozados anteriormente. Los alcoholes de α-alkuilbencilo quirales pueden obtenerse a través de la reducción quiral de las cetonas correspondientes.

El intermedio monoamino-monohalo formado a partir del dihaloheterociclo y la amina descrita anteriormente, puede entonces funcionalizarse más. Por ejemplo, donde el sustituyente amina porta un grupo funcional adicional, este grupo funcional puede derivarse o funcionalizarse usando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un grupo amino primario libre podría funcionalizarse más a una funcionalidad amida, sulfonamida o urea, o podría alquilarse para generar un derivado de amina secundaria o terciaria. Métodos preferibles para la formación de una amida incluyen acoplar la amina con un ácido carboxílico que usa reactivos de acoplamiento tales como diciclohexilcarbodiimida, 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida, diisopropilcarbodiimida o carbonildiimidazol en disolventes tales como diclorometano, tetrahidrofurano o 1,4-dioxano. De forma alternativa, el componente ácido puede activarse por conversión a un cloruro de ácido (usando cloruro de tionilo, cloruro de oxalilo, bis(triclorometil)carbonato o cloruro cianúrico) o a especies anhídridas mixtas (usando, por ejemplo, cloroformiato de

t-butilo o cloroformiato de isopropilo) o a intermedios de éster activo (tales como ésteres de N-hidroxisuccinimidilo, pentafluorofenilo o p-nitrofenilo) antes de la reacción de amina.

5 El intermedio monoamino-monocloro puede entonces hacerse reaccionar en una reacción de acoplamiento cruzado mediada por paladio con una pareja de acoplamiento funcionalizada de forma adecuada para sustituir el átomo de halógeno con un resto alternativo. Las parejas de acoplamiento típicas son ácidos o ésteres organoborónicos. Véase, por ejemplo, Miyauro y Suzuki, *Chem. Rev.* 952457 (1995); Stille, *Chem., Int. Ed. Engl* 25, 508 (1986); Kumada *et al.*, *Org. Synth. Coll.* Vol. 6, 407 (1998); y: Negishi, J. *Organomet. Chem.* 653, 34 (2002) para el acoplamiento de Suzuki, organoestannatos, acoplamiento de Stille, reactivos de Grignard, acoplamiento de Kumada, especies de organozinc y acoplamiento de Negishi, respectivamente. El acoplamiento de Suzuki es el método de acoplamiento preferido y se realiza típicamente en un disolvente tal como DME, THF, DMF, etanol, propanol, tolueno o 1,4-dioxano en presencia de una base tal como carbonato de potasio, hidróxido de litio, carbonato de cesio, hidróxido sódico, fluoruro de potasio o fosfato de potasio. La reacción puede realizarse a temperaturas elevadas y el catalizador de paladio empleado puede seleccionarse de Pd(PPh₃)₄, Pd(OAc)₂, [PdCl₂(dppf)], Pd₂(dba)₃/P(t-Bu)₃.

15 El intermedio monoamino-monocloro puede someterse también a una segunda reacción de sustitución aromática nucleófila usando condiciones similares a las esbozadas anteriormente. Los expertos en la técnica apreciarán que el orden de las reacciones descritas para las síntesis anteriores pueda cambiarse en ciertas circunstancias y que ciertas funcionalidades pueden necesitar derivarse, es decir, protegerse, en ciertos ejemplos para que las reacciones descritas anteriormente procedan con rendimiento y eficiencia razonables. Los tipos de funcionalidad protectora se conocen bien por los expertos en la técnica. Los productos formados a partir de las secuencias de reacción descritas anteriormente pueden derivarse adicionalmente usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. El grupo saliente puede ser cualquier tipo conocido adecuado tal como los descritos en March, "Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure". 4^a Ed. págs. 352-7, John Wiley & Sons, NY (1992). En algunos casos, el grupo saliente es un halógeno, por ejemplo, cloro.

Quinasas

25 Las proteína quinasas son una familia de enzimas que catalizan la fosforilación de residuos específicos en proteínas. Dichas enzimas se categorizan generalmente en tres grupos, aquellas que fosforilan preferentemente residuos de serina y/o treonina, aquellas que fosforilan preferentemente residuos de tirosina, y aquellas que fosforilan tanto residuos de tirosina como de Ser/Thr. Las proteína quinasas son por lo tanto elementos clave en las rutas de transducción de señales responsables de transducir las señales extracelulares, incluyendo la acción de citoquinas en sus receptores, a los núcleos, desencadenando diversos sucesos biológicos. Los muchos papeles de las proteína quinasas en la fisiología normal de la célula incluyen control del ciclo celular que incluye proliferación, diferenciación, metabolismo, apoptosis, movilidad celular, mitogénesis, transcripción, traducción y otros procesos de señalización.

35 La quinasa del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) es un tipo de RTK. La secuencia de PDGFR puede encontrarse en GenBank, número de acceso NM-002609 (ARNm) y NP-002600 (proteína) y se ha descrito, al menos, en Matsui, *et al.*, "Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF receptor genes" *Science* 243 (4892):800-804 (1989); Claesson-Welsh, L. *et al.*, "cDNA cloning and expression of a human platelet-derived growth factor (PDGF) receptor specific for B-chain-containing PDGF molecules" *Mol. Cell. Biol.* 8(8):3476-3486 (1988); y Gronwald, *et al.* *PNAS.* 85(10):3435-3439 (1988).

40 Además, el ligando de unión similar a PDGFR, PDGF, es un fuerte factor mitogénico para las células de origen mesenquimal tales como fibroblastos, células musculares lisas, y células gliales. PDGF es un heterodímero de proteína de 32 kDa compuesto normalmente por dos cadenas polipeptídicas, A y B, unidas por enlaces disulfuro. Además del heterodímero AB de PDGF, existen dos formas homodiméricas de PDGF (AA y BB). Durante la coagulación sanguínea y adhesión plaquetaria, el PDGF se libera de los gránulos a los sitios de vasos sanguíneos dañados, sugiriendo que PDGF puede tener un papel en la reparación de los vasos sanguíneos. El PDGF puede estimular la migración de células musculares lisas arteriales desde la capa media a la íntima de la arteria donde pueden proliferar las células musculares. La proliferación celular inducida por todas las isoformas de PDGF está mediada por la unión de ligandos al receptor de PDGF. El receptor de PDGF pertenece a la familia tirosina quinasa de clase III y consiste en dos subtipos de receptor, denominados tipo A (o tipo alfa), y tipo B (o tipo beta), como se detalla anteriormente. Otros miembros de la familia de receptores de PDGF incluyen CSF-IR, cKIT y FLT3. Las dos isoformas del receptor de PDGF pueden distinguirse por sus especificidades de unión al ligando marcadamente diferentes. El receptor de PDGFβ se une solo a la cadena B (isoformas BB y AB), mientras el receptor de PDGFα puede unirse a todas las formas de PDGF (isoformas que contienen la cadena A y/o B). Con la importancia de los procesos relacionados con PDGF para la proliferación de células endoteliales y músculo liso vascular, hay un intervalo de procesos patogénicos para los que son útiles los inhibidores de PDGFRβ quinasa, por ejemplo, la prevención y tratamiento de la enfermedad.

55 La expresión de PDGF se ha mostrado en un número de tumores sólidos diferentes, desde glioblastomas a carcinomas de próstata. En estos diversos tipos de tumores, el papel biológico de la señalización de PDGF puede variar desde la estimulación autocrina del crecimiento de células cancerígenas a interacciones paracrinas más sutiles que implican el estroma adyacente y la angiogénesis. Por lo tanto, la inhibición de la actividad de PDGFR quinasa con moléculas pequeñas puede interferir con el crecimiento tumoral, angiogénesis, enfermedades con

etiologías neoplásicas, enfermedades inmunológicas e inflamatorias, enfermedades hiperproliferativas que incluyen cáncer y enfermedades que implican neo-angiogénesis, enfermedades renales y de riñón, enfermedades de remodelado óseo, enfermedades metabólicas, enfermedades vasculares y enfermedades vasculares pulmonares tales como, por ejemplo HAP. Otras enfermedades mediadas por PDGF, y que implican por tanto a sus receptores similares, incluyen, por ejemplo, restenosis, incluyendo la restenosis coronaria después de angioplastia, aterectomía u otros métodos invasivos de eliminación de placa, y restenosis de la arteria renal o periférica después de los mismos procedimientos; fenómenos proliferativos vasculares y fibrosis asociada con otras formas de lesión aguda tales como fibrosis pulmonar asociada con el síndrome de distrés respiratorio adulto, fibrosis renal asociada con nefritis, estenosis coronaria asociada con la enfermedad de Kawasaki y estrechamientos vasculares asociados con otras arteritis tales como la enfermedad de Takayasha; prevención de los estrechamientos en los injertos de venas; prevención de estrechamientos debido a la migración acelerada de células musculares lisas y la proliferación en órganos trasplantados, y otros procesos fibróticos, tales como escleroderma y miofibrosis e inhibición de la proliferación de células tumorales.

El c-Kit es otro receptor de tirosina quinasa que pertenece a la familia de receptores de PDGF y se expresa normalmente en el progenitor hematopoyético, mastocitos y células germinales. La expresión de c-kit se ha implicado en un número de cánceres incluyendo la leucemia de mastocitos, tumores de células germinales, carcinoma de pulmón de células pequeñas, TEGI, leucemia mielógena aguda (LMA), neuroblastoma, melanoma, carcinoma de ovario, carcinoma de mama. Smolich *et al.*, *Blood*, 97(5) 1413-21.

Las proteína quinasas 1 y 2 reguladas por señal extracelular (ERK1/2) son miembros de la superfamilia de proteína activada por mitógenos (PAM) quinasa que pueden mediar en la proliferación celular y la apoptosis. La cascada de señalización Ras-Raf-MEK-ERK que controla la proliferación celular se ha estudiado bien aunque los mecanismos implicados en la muerte celular mediada por ERK1/2 se desconocen en gran medida. ERK1/2 transloca al núcleo, aunque puede también permanecer en el citosol. La retención citosólica de ERK1/2 deniega el acceso a los sustratos del factor de transcripción que son responsables de la respuesta mitogénica. Además, el ERK1/2 citosólico, además de inhibir las señales de supervivencia y proliferativa en el núcleo, potencia la actividad catalítica de algunas proteínas proapoptóticas tales como DAP quinasa en el citoplasma. Los estudios que definen adicionalmente la función de ERK1/2 citosólica y sus sustratos citosólicos que mejoran la muerte celular serán esenciales para aprovechar esta ruta para desarrollar tratamientos efectivos para el cáncer y enfermedades inflamatorias crónicas.

STAT3 es un miembro de la familia de proteínas STAT, cuya función típica es en respuesta a las citoquinas y factores de crecimiento. Los miembros de la familia STAT se fosforilan mediante las quinasas asociadas al receptor, y entonces forman homo- o heterodímeros que translocan al núcleo celular donde actúan como activadores de la transcripción. STAT3 se activa mediante la fosforilación en respuesta a varias citoquinas y factores de crecimiento que incluyen IFNs, EGF, ILS, IL6, HGF, LIF y BMP2. Esta proteína media la expresión de una variedad de genes en respuesta a los estímulos celulares, y por consiguiente juega un papel clave en muchos procesos celulares tales como el crecimiento celular y la apoptosis. Se ha mostrado que la pequeña GTPasa Rac1 se une y regula la actividad de esta proteína, mientras que se ha mostrado que PIAS3 inhibe STAT3.

AKT (también conocida como PKB) está implicada en la regulación del metabolismo, supervivencia celular, motilidad, transcripción y progresión del ciclo celular. AKT pertenece a la subfamilia AGC de la superfamilia de proteína quinasas, que consiste en más de 500 miembros en los seres humanos. La subfamilia AKT comprende tres isoformas en los mamíferos, Akt1, Akt2 y Akt3, que son productos de distintos genes y comparten una estructura conservada que incluye tres dominios funcionales: un dominio con homología a la pleckstrina (HP) N-terminal, un dominio quinasa central y un dominio regulador C-terminal que contiene el sitio de fosforilación de motivo hidrófobo (MH) [FxxF(S/T)Y].

45 Inhibidores de quinasa

Se describe un compuesto y métodos de inhibición de una quinasa, por ejemplo, una tirosina quinasa, tal como una RTK, en un sujeto y/o un método de tratamiento de una condición biológica mediada por, o asociada con, una quinasa, por ejemplo, una tirosina quinasa, tal como una RTK, en un sujeto. En algunos casos, la quinasa es Cdc2 quinasa, AKT, c-Kit, c-ABL, ERK1/2, STAT3, p60src, VEGFR3, PDGFR α , PDGFR β , FGFR3, PDGFR- $\alpha\alpha$, PDGFR- $\beta\beta$, PDGFR- $\alpha\beta$, FLT-3, Fyn, Lck, Tie-2, GSK-3, Cdk2, Cdk4, MEK1, NEK-2, CHK2, CK1 ϵ , Raf, CHK1, Rsk2, FMS (CSF-IR), KDR, EphA2, EphA3, EphA8, FLT1, FLT4, HCK, PTKS, RET, SYK, DDR1, DDR2 y PAR-1. Asimismo, la quinasa es una tirosina quinasa, tal como, por ejemplo, Cdc2 quinasa, c-Kit, c-ABL, p60src, VEGFR3, PDGFR α , PDGFR β , FGFR3, PDGFR- $\alpha\alpha$, PDGFR- $\beta\beta$, PDGFR- $\alpha\beta$, FLT-3, Fyn, Lck y/o Tie-2, en algunos casos. Los métodos incluyen administrar al sujeto un compuesto de Estructura I, un tautómero del compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero, o mezclas de los mismos.

Anteriormente, se muestran varios compuestos sustituidos con indolilo para inhibir una o más quinasas, como se describe en los documentos WO 01/29025, WO01/62251 y WO 01/62252. Asimismo, se han descrito recientemente varios compuestos de benzimidazolilo en el documento WO 01/28993. Dichos compuestos se presentan por ser capaces de inhibir, modular y/o regular la señal de transducción de las tirosina quinasas tanto de tipo receptor como

no receptor. Algunos de los compuestos descritos contienen un fragmento de quinolona unido al grupo indolilo o benzimidazolilo. También se ha presentado la síntesis de derivados de 4-hidroxiquinolona y 4-hidroxiquinolina. Por ejemplo, Ukrainets *et al.* han descrito la síntesis de 3-(benzimidazol-2-il)-4-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolina. Ukrainets *et al.*, *Tet. Lett.* 42, 7747-48 (1995) también ha descrito la síntesis, actividad anticonvulsiva y anti-tiroidea de otras 4-hidroxiquinolonas y análogos tales como 1H-2-oxo-3-(2-benzimidazolil)-4-hidroxiquinolina. Ukrainets *et al.*, *Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinii*, 1, 105-108 (1993). Otros compuestos, además, tales como por ejemplo, 4-amino-5-fluoro-3-[5-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]quinolin-2-(1H)-ona se ha descrito como una benzimidazol-quinolinona biodisponible oralmente que muestra la inhibición de receptor de tirosina quinasas que conducen a la proliferación de células tanto endoteliales como tumorales. El efecto inhibitorio se mostró en nueve tirosina quinasas, FGFR1, FGFR3, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR β , c-Kit, p60src y FLT-3, como se describe en el documento WO 2005/047244. Sin embargo, este compuesto no inhibe significativamente las quinasas de la familia EGFR o las quinasas del receptor de insulina a dosis farmacéuticamente aceptables.

Además, 4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il)pirimidin-2-ilamino]fenil]-benzamida (imatinib), como se describe en el documento US 2006/0154936, inhibe las PDGFR α y β quinasas, Ab1, DDR y c-KIT, como se describe en el documento US 2011/0190313. El párrafo [0117] del documento US 2011/0190313, sin embargo, indica que aunque el imatinib parecía seguro y bien tolerado durante un periodo de 6 meses, el parámetro de eficacia principal (6MWD) no mejoró en pacientes tratados aleatoriamente con imatinib en comparación con el placebo, a pesar de la significativa mejora en los objetivos secundarios. Por lo tanto existe una necesidad continua de compuestos que inhiban quinasas, por ejemplo, tirosina quinasas, tales como RTKs, al menos por limitaciones anteriores, fenotipos de enfermedad resistente, y la necesidad de inhibición de quinasas, por ejemplo, RTK, más efectiva, como se detalla adicionalmente a continuación. Véase el documento US 2008/0268460.

Además, las pequeñas moléculas que se presentaron en Frey *et al.* (1998) se mostró que inhiben de forma irreversible al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) interactuando de forma covalente con el receptor, mientras alquilan un residuo de cisteína en el bolsillo de unión de ATP de la molécula. De hecho, Leproult *et al.*, "Cysteine Mapping in Conformationally Distinct Kinase Nucleotide Binding Sites: Application to the Design of Selective Covalent Inhibitors". *J. Med. Chem.* 54, 1347-1355 (2011), describe que una aproximación al diseño de inhibidores irreversibles es explotar la nucleofilicidad de un grupo tiol de cisteína presente en la proteína objetivo por medio de análisis sistemático de los residuos de cisteína presentes en el sitio de unión de nucleótidos de quinasas. Dicha aproximación puede facilitar la inhibición irreversible incluso cuando se toma en consideración la diferentes conformaciones quinasa y por lo tanto mejoran la dosis y la toxicidad. Véase *id.*

El mapeo de cisteína en Leproult *et al.* (2011) demuestra que las quinasas son objetivos potenciales para los inhibidores covalentes selectivos. Se muestra un ejemplo del inhibidor de quinasa imatinib al que se añade un grupo cloroacetamida en la posición para del anillo benceno. Se mostró la formación del aducto del inhibidor peptídico para los receptores tanto Kit como PDGFU. *Id.* Sin embargo, otros compuestos fallaron al mostrar aductos covalentes similares. Se muestra la cloroacetamida como un ejemplo de un electrófilo que puede formar un enlace covalente con un residuo de cisteína. El término general "carga útil" se usa para indicar una trampa electrófila para formar un enlace covalente entre el inhibidor y la proteína quinasa que es objetivo. La cloroacetamida como un electrófilo puede ser demasiado reactiva para tener utilidad clínica y puede tener toxicidad por esta razón. Leproult *et al.* (2011) sugiere sin embargo que la posición menos que óptima del electrófilo podría explicar por que un enlace covalente no puede formarse con otras cargas útiles menos reactivas.

La presente descripción proporciona, entre otros, distintos posicionamientos de carga útil en los inhibidores del receptor de RTK. En algunos casos, los electrófilos distintos de los descritos por Leproult *et al.* (2011), se emplearon por la eficacia aumentada. Véase Barf *et al.* (2012) y Oballa *et al.* "A generally applicable method for assessing the electrophilicity and reactivity of diverse nitrile-containing compounds", *Bioorg Med Chem Lett* 17:998-1002 (2007) (que describe electrófilos que contienen nitrilo). Además, Diller *et al.*, *J Med Chem* 46:4638-4647 (2003) presentó un modelo de homología del receptor de PDGFR β basado en VEGFR2 (55% de homología).

El acoplamiento molecular se empleó previamente por los inventores con respecto a un aspecto de la presente invención usando modelos de homología de RTK, en base a estructuras homólogas, por ejemplo, homología del receptor de PDGFR α y PDGFR β a c-Kit es 59% y 63%, respectivamente. En algunos casos, la introducción de varios electrófilos en una variedad de posiciones con respecto a una estructura del inhibidor de RTK, por ejemplo, inhibidor de PDGFR, proporcionó las bases para análisis bioquímicos adicionales. Para este fin, la orientación espacial de las cargas útiles del inhibidor, respecto a los residuos de cisteína objetivos, pueden analizarse para calcular la energía libre de unión y K_i estimada. En algunos casos, los compuestos con la menor energía libre de unión y mayor proximidad de la carga útil a un residuo de cisteína dan inhibidores de RTK no selectivos irreversibles.

Por consiguiente, la presente descripción proporciona el compuesto para usar según la invención, el enantiómero o estereoisómero del compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto, tautómero, enantiómero o estereoisómero del compuesto, o cualquier mezcla de los mismos, que interactúan de forma covalente con un receptor de tirosina quinasa (RTK), tal como, por ejemplo, PDGFR o c-Kit o ambos. En algunos casos, el PDGFR se selecciona del grupo que consiste en PDGFR- α , PDGFR- β , PDGFR- $\alpha\alpha$, PDGFR- $\beta\beta$ y PDGFR- $\alpha\beta$ como se demuestra por medio del modelado de homología.

Composiciones farmacéuticas

En un aspecto, la presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen el compuesto para usar según la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones para el uso de la presente invención pueden contener otros agentes terapéuticos como se describe a continuación, y pueden formularse, por ejemplo, empleando vehículos o diluyentes sólidos o líquidos convencionales, además de aditivos farmacéuticos de un tipo apropiado al modo de administración deseado, por ejemplo, excipientes, aglutinantes, conservantes, estabilizadores, aromas, etc., según técnicas tales como aquellas bien conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica.

Las composiciones farmacéuticas se formulan típicamente para ser compatibles con su ruta prevista de administración. Ejemplos de rutas de administración incluyen administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, intradérmica, intraperitoneal o subcutánea), oral, por inhalación, transdérmica (tópica), intraocular, iontoforética y transmucosa. Las disoluciones o suspensiones usadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijados, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminatetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tal como cloruro sódico o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. El preparado parenteral puede estar encerrado en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiple hechos de vidrio o plástico. Por conveniencia del paciente o del médico que lo trata, la formulación de dosificación puede proporcionarse en un kit que contiene todo el equipo necesario para un ciclo de tratamiento.

El compuesto para usar según la invención se administra por cualquier medio adecuado, por ejemplo, de forma oral, tal como en forma de comprimidos, cápsulas, gránulos o polvos; de forma sublingual; de forma bucal; de forma parenteral, tal como mediante técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intra(trans)dérmica o intracisternal, por ejemplo, como disoluciones o suspensiones acuosas o no acuosas, estériles inyectables, de forma nasal tal como por inhalación pulverizado o insuflado, de forma tópica, tal como en forma de una crema o pomada, de forma ocular en forma de una disolución o suspensión, de forma vaginal en forma de pesarios, tampones o cremas, o de forma rectal tal como en forma de supositorios, en formulaciones de dosis unitaria que contienen vehículos o diluyentes no tóxicos, farmacéuticamente aceptables. Los compuestos pueden, por ejemplo, administrarse en una forma adecuada para la liberación inmediata o liberación extendida. La liberación inmediata o liberación extendida puede alcanzarse mediante el uso de composiciones farmacéuticas adecuadas que comprenden los actuales compuestos, o, para la liberación extendida, mediante el uso de dispositivos tales como implantes subcutáneos o bombas osmóticas.

Para la administración al tracto respiratorio, por ejemplo, inhalación, que incluye administración intranasal, el compuesto activo puede administrarse por cualquiera de los métodos y formulaciones empleados en la técnica para la administración al tracto respiratorio. Por consiguiente, el compuesto activo puede administrarse en forma de, por ejemplo, una disolución, suspensión o como un polvo seco. Los agentes según este aspecto de la presente invención pueden administrarse también directamente a las vías aéreas en forma de un aerosol. Para el uso como aerosoles, los compuestos de la presente invención en disolución o suspensión pueden envasarse en un recipiente de aerosol presurizado junto con propelentes adecuados, por ejemplo, propelentes hidrocarbonados como propano, butano o isobutano con adyuvantes convencionales. Los materiales de la presente invención pueden administrarse también en una forma no presurizada tal como en un nebulizador o atomizador.

Los aerosoles de inhalación impulsados por propelente que pueden usarse según la invención pueden contener también otros ingredientes tales como co-disolventes, estabilizantes, tensioactivos, antioxidantes, lubricantes y ajustadores de pH. Los aerosoles de inhalación impulsados por propelente según la invención que pueden usarse según la invención pueden administrarse usando inhaladores conocidos en la técnica, por ejemplo, inhaladores de dosis medida. Como otra alternativa, los agentes de la presente invención pueden administrarse a las vías aéreas en forma de una formulación tensioactiva para el pulmón. La formulación tensioactiva para el pulmón puede incluir formulaciones tensioactivas para el pulmón exógenas (por ejemplo, Infasurf[®] (Forest Laboratories), Survanta[®] (Ross Products) y Curosurf[®] (DEY, California, EE.UU.) o formulaciones tensioactivas para el pulmón sintéticas (por ejemplo, Exosurf[®] (GlaxoWellcome Inc.) y ALEC). Estas formulaciones tensioactivas se administran por medio de instilación de las vías aéreas (es decir, después del entubado) o de forma intratraqueal.

Como una alternativa adicional, el compuesto para usar según la presente invención puede administrarse a las vías aéreas en forma de un polvo inhalable. La formulación en polvo puede incluir excipientes fisiológicamente aceptables tales como monosacáridos (por ejemplo, glucosa o arabinosa), disacáridos (por ejemplo, lactosa, sacarosa y maltosa), oligo- y polisacáridos (por ejemplo, dextrano), polialcoholes (por ejemplo, sorbitol, manitol, xilitol), sales (por ejemplo cloruro sódico, carbonato de calcio) o mezclas de estos excipientes los unos con los otros. Preferiblemente, se usan mono- o disacáridos, mientras que se prefiere el uso de lactosa o glucosa, particularmente, aunque no exclusivamente, en forma de hidrato.

En los polvos inhalables para usar según la invención los excipientes tienen un tamaño de partícula promedio máximo de hasta 250 μm , preferiblemente entre 10 y 150 μm , lo más preferiblemente entre 15 y 80 μm . A veces puede parecer apropiado añadir fracciones de excipiente más finas con un tamaño de partícula promedio de 1 a 9 μm a los excipientes mencionados anteriormente. Estos excipientes más finos se seleccionan también del grupo de posibles excipientes enumerados anteriormente. Finalmente, para preparar los polvos inhalables para usar según la invención, las formulaciones micronizadas, preferiblemente con un tamaño de partícula promedio de 0,5 a 10 μm se añade a la mezcla de excipientes. Los procesos para producir los polvos inhalables para usar según la invención moliendo y micronizando y finalmente mezclando los ingredientes se conocen a partir de la técnica anterior.

En las formulaciones previstas para la administración al tracto respiratorio, que incluyen formulaciones intranasales, el compuesto activo se configura típicamente para tener un pequeño tamaño de partícula, por ejemplo, aproximadamente 5 micras o menos, por medio de técnicas de micronización y similares. Las formulaciones de liberación sostenida del compuesto activo se emplean en algunos casos. El compuesto activo, en algunos casos, se administra por inhalación oral como un polvo de flujo libre por medio de un inhalador.

La composición farmacéutica para el uso de la presente descripción puede incluir además compuestos terapéuticamente activos adicionales (agentes secundarios), como se anota en esta memoria y/o se conoce en la técnica, que se emplean típicamente para tratar una o más condiciones patológicas en concierto con las composiciones que comprenden el compuesto para usar según la presente descripción. La combinación de agentes terapéuticos actúa de forma sinérgica para efectuar el tratamiento o prevención de las diversas enfermedades, trastornos y/o condiciones descritas en esta memoria. Dichos agentes secundarios, incluyen, aunque no están limitados a, prostanoides, antagonistas de endotelina, inhibidores de quinasa citoplasmática, inhibidores del receptor de quinasa, antagonistas del receptor de endotelina, por ejemplo, ambrisentano, bosentano y sitaxsentano, inhibidores de PDE5 (PDE-V), por ejemplo, sildenafilo, tadalafilo y vardenafilo, bloqueantes del canal de calcio, por ejemplo, amlodipina, felodipina, varepamilo, diltiazem y mentol, prostaciclina, treprostinilo, iloprost, beraprost, óxido nítrico, oxígeno, heparina, warfarina, diuréticos, digoxina, ciclosporinas, por ejemplo, ciclosporina A, CTLA4-Ig, anticuerpos tales como ICAM-3, receptor de anti-IL-2 (Anti-Tac), anti-CD45RB, anti-CD2, anti-CD3 (OKT-3), anti-CD4, anti-CD80, anti-CD86, agentes que bloquean la interacción entre CD40 y gp39, tal como anticuerpos específicos para CD40 y/o gp39, es decir, CD 154, proteínas de fusión construidas a partir de CD40 y gp39 (CD40 1 g y CD8gp39), inhibidores, tales como inhibidores de la translocación nuclear, de función NF-kappa B, tal como desoxiespergualina (DSG), inhibidores de la biosíntesis del colesterol tal como inhibidores de HMG CoA reductasa (lovastatina y simvastatina), fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAIDs) tales como ibuprofeno, aspirina, acetaminofeno, leflunomida, desoxiespergualina, inhibidores de ciclooxigenasa tales como celecoxib, esteroides tales como prednisona o dexametasona, compuestos de oro, beta-agonistas tales como salbutamol, LABAs tal como salmeterol, antagonistas de leucotrieno tales como montelukast, agentes antiproliferativos tales como metotrexato, FK506 (tacrolimus, Prograf), micofenolato de mofetilo, fármacos citotóxicos tales como azatioprina, VP-16, etopósido, fludarabina, doxorubina, adriamicina, amsacrina, camptotecina, citarabina, gemcitabina, fluorodesoxiuridina, melfalano y ciclofosfamida, antimetabolitos tales como metotrexato, inhibidores de topoisomerasa tales como camptotecina, alquilantes de ADN tales como cisplatina, inhibidores de quinasa tales como sorafenib, venenos del microtúbulo tales como paclitaxel, inhibidores de TNF- α tales como tenidap, anticuerpos anti-TNF o receptor de TNF soluble, hidroxurea y rapamicina (sirolimus o Rapamune) o derivados de los mismos.

El compuesto para usar según la invención puede prepararse además como sales que son farmacéuticamente aceptables, pero se apreciará que las sales no farmacéuticamente aceptables también caen en el alcance de la presente descripción al menos en el grado en que dichas sales son útiles como intermedios en la preparación de sales farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, aunque no están limitadas a, sulfatos, fosfatos, mesilatos, bismesilatos, tosilatos, lactatos, tartratos, malatos, bis-acetatos, citratos, sales de bishidrocloruro, sales de cationes farmacéuticamente aceptables tales como sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, amonio y alquilamonio; sales de adición de ácido de ácidos inorgánicos farmacéuticamente aceptables tales como ácidos clorhídrico, ortofosfórico, sulfúrico, fosfórico, nítrico, carbónico, bórico, sulfámico y bromhídrico; o sales de ácidos orgánicos farmacéuticamente aceptables tales como ácidos acético, propiónico, butírico, tartárico, maleico, hidroximaleico, fumárico, cítrico, láctico, mícico, glucónico, benzoico, succínico, oxálico, fenilacético, metanosulfónico, trihalometanosulfónico, toluensulfónico, bencenosulfónico, isetiónico, salicílico, sulfanílico, aspártico, glutámico, edético, esteárico, palmítico, oleico, láurico, pantoténico, tánico, ascórbico, valérico y orótico. Las sales de grupos amina pueden comprender también sales de amonio cuaternarias en que el átomo de nitrógeno amino porta un grupo orgánico adecuado tal como un resto alquilo, alquenilo, alquinilo o aralquilo. Las sales pueden estar formadas por medios convencionales, tales como haciendo reaccionar la forma base libre del compuesto con uno o más equivalentes del ácido apropiado en un disolvente o medio en que la sal es insoluble, o en un disolvente tal como agua que se elimina al vacío o por secado por congelación o por intercambio de los aniones de una sal existente por otro anión en una resina de intercambio iónico adecuada. En algunos casos, la sal es una sal de sulfato, fosfato, mesilato, bismesilato, tosilato, lactato, tartrato, malato, bis-acetato, citrato o bishidrocloruro.

El compuesto para usar según la presente descripción puede administrarse en una cantidad terapéuticamente efectiva. Dicha administración confiere que el compuesto provocará una respuesta asociada con, por ejemplo, células, tejidos, fluidos, de un sujeto que está solicitado por el médico. En el tratamiento o prevención de condiciones

mediadas por, o asociadas con, la inhibición de quinasa, por ejemplo, inhibición de RTK, se administra un nivel de dosis apropiado. En algunos casos, de aproximadamente 0,01 a 500 mg/kg del peso corporal del sujeto por día se administra en una única dosis o dosis múltiples. De acuerdo con esto, los niveles de dosis son de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 250 mg/kg por día en algunos casos, mientras en otros casos se administra al sujeto de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100 mg/kg por día. Los niveles de dosis adecuados incluyen, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 a 250 mg/kg por día, de aproximadamente 0,05 a 100 mg/kg por día, o de aproximadamente 0,1 a 50 mg/kg por día. En este intervalo, en algunos casos, la dosis es de aproximadamente 0,05 a 0,5, 0,5 a 5 o 5 a 50 mg/kg por día. Para la administración oral, las composiciones se proporcionan en forma de comprimidos que contienen 1,0 a 1000 mg de ingrediente activo, que incluyen, aunque no están limitados a 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 750, 800, 900 y 1000 mg del ingrediente activo. La dosis puede seleccionarse, por ejemplo, a cualquier dosis en cualquiera de estos intervalos, para la eficacia terapéutica y/o ajuste sintomático de la dosis al sujeto que se trata. En algunos casos, los compuestos de la presente descripción se administran por inhalación como se describe en, por ejemplo, los documentos US 8257741, US 8263128, WO 2010/132827, WO 2010/102066, WO 2012/040502, WO 2012/031129 y/o WO 2010/102065, de 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 1 a 4 o 1 a 3 veces al día, o una o dos veces por día. En algunos casos, los compuestos de la presente descripción se administran de 1 a 5 veces al día.

En algunos casos, la dosis unitaria es suficiente para proporcionar uno o más de: (a) una C_{max} de aproximadamente 1 a 5000 ng/mL del compuesto en el plasma de un sujeto o una C_{max} de aproximadamente 1 a 5000 ng/mL del compuesto en la sangre del sujeto cuando se administra al sujeto; y (b) aproximadamente 1 a 5000 ng/mL del compuesto en el plasma de un sujeto 24 h después de la administración o aproximadamente 1 a 5000 ng/mL del compuesto en la sangre del sujeto 24 h después de la administración al sujeto.

La cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto para usar según la invención, el tautómero del compuesto, enantiómero o estereoisómero del compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto, o cualquier mezcla de los mismos, no está asociada con efectos secundarios adversos, en algunos casos. Dichos efectos secundarios adversos incluyen, aunque no están limitados a, función pulmonar disminuida, presión sanguínea sistémica aumentada o disminuida, inmunocomprometido, supresión de médula ósea, anemia, hipoxia, en el sujeto en comparación con el sujeto antes de la administración.

Prevención y tratamiento de la enfermedad

Se describe el compuesto para usar según la invención, un tautómero del compuesto, enantiómero o estereoisómero del compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto, o cualquier mezcla de los mismos para tratar una o más enfermedades.

Se describe el compuesto, composiciones y métodos de inhibición de quinasa, por ejemplo, tirosina quinasa, y métodos de tratamiento de condiciones biológicas mediadas por, o asociadas con, dichas quinasa. Por ejemplo, la presente descripción proporciona métodos de inhibición de una o más quinasa, tales como, por ejemplo, ciclo de división celular 2 quinasa (Cdc2 quinasa), c-Kit, c-ABL, p60src, AKT, VEGFR3, PDGFR α , PDGFR β , PDGFR- $\alpha\alpha$, PDGFR- $\beta\beta$, PDGFR- $\alpha\beta$, FGFR3, FLT-3, FYN oncogén quinasa relacionada con SRC, FGR, YES (Fyn), tirosina quinasa de proteína específica de linfocitos (Lck), tirosina quinasa con dominios de homología Ig y EGF (Tie-2), FMS (CSF-IR), KDR, EphA2, EphA3, EphA8, FLT1, FLT4, HCK, PTK5, RET, SYK, DDR1, DDR2, glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3), quinasa dependiente de ciclina 2 (Cdk2), quinasa dependiente de ciclina 4 (Cdk4), MEK1, NEK-2, CHK2, CK1 ϵ , Raf, quinasa de control 1 (CHK1), quinasa S6 ribosómica 2 (Rsk2) y PAR-1. En particular, los compuestos, composiciones y métodos de inhibición de las tirosina quinasa, tales como, por ejemplo, ciclo de división celular 2 quinasa (Cdc2 quinasa), ERK1/2, STAT3, AKT, c-Kit, c-ABL, p60src, VEGFR3, PDGFR α , PDGFR β , PDGFR- $\alpha\alpha$, PDGFR- $\beta\beta$, PDGFR- $\alpha\beta$, FGFR3, FLT-3, oncogén FYN quinasa relacionada con SRC, FGR, YES (Fyn), tirosina quinasa de proteína específica de linfocitos (Lck), tirosina quinasa con dominios de homología Ig y EGF (Tie-2), FMS (CSF-IR), KDR, EphA2, EphA3, EphA8, FLT1, FLT4, HCK, PTK5, RET, SYK, DDR1 y DDR2. En algunos casos, la tirosina quinasa es un receptor de tirosina quinasa (RTK), tal como, por ejemplo, PDGFR, PDGFR- $\alpha\alpha$, PDGFR- $\beta\beta$, PDGFR- $\alpha\beta$ o c-Kit, o combinaciones de los mismos, se proporcionan.

También se describen el compuesto, composiciones y métodos de tratamiento de condiciones biológicas mediadas por, o asociados con, quinasa, por ejemplo, tirosina quinasa, que incluyen Cdc2 quinasa, c-Kit, AKT, c-ABL, ERK1/2, STAT3, p60src, VEGFR3, PDGFR α , PDGFR β , FGFR3, PDGFR- $\alpha\alpha$, PDGFR- $\beta\beta$, PDGFR- $\alpha\beta$, FLT-3, Fyn, Lck, Tie-2, GSK-3, Cdk2, Cdk4, MEK1, NEK-2, CHK2, CK1 ϵ , Raf, CHK1, Rsk2, FMS (CSF-IR), KDR, EphA2, EphA3, EphA8, FLT1, FLT4, HCK, PTK5, RET, SYK, DDR1, DDR2 y PAR-1. En particular, se describe el compuesto, composiciones y métodos de tratamiento de condiciones biológicas mediadas por, o asociadas con, tirosina quinasa, que incluyen, aunque no están limitadas a, Cdc2 quinasa, AKT, c-Kit, c-ABL, p60src, VEGFR3, PDGFR α , PDGFR β , PDGFR- $\alpha\alpha$, PDGFR- $\beta\beta$, PDGFR- $\alpha\beta$, FGFR3, FLT-3, Fyn, Lck, Tie-2, FMS (CSF-IR), KDR, EphA2, EphA3, EphA8, FLT1, FLT4, HCK, PTK5, RET, SYK, DDR1 y DDR2. En algunos casos, la enfermedad o condición mediada por, o asociada con, una o más quinasa está mediada por un RTK, tal como, por ejemplo, PDGFR, PDGFR- $\alpha\alpha$, PDGFR- $\beta\beta$, PDGFR- $\alpha\beta$ o c-Kit, o combinaciones de los mismos.

La enfermedad o condición mediada por, o asociada con, una o más quinasa de la presente descripción, incluye, aunque no está limitada a, HAP, HAP primaria, HAP idiopática, HAP hereditaria, HAP refractaria, BMPR2, ALK1,

5 endogлина asociada con telangiectasia hemorrágica hereditaria, endogлина no asociada con telangiectasia hemorrágica hereditaria, HAP inducida por fármacos, y HAP inducida por toxinas, HAP asociada con o secundaria a una o más de esclerosis sistémica, enfermedad mixta del tejido conectivo, cáncer, cáncer refractario, cáncer metastático, neoplasia, hipoplasia, hiperplasia, displasia, metaplasia, prosoplasia, desmoplasia, enfermedad angiógena, trastornos de función pulmonar, trastornos de la función cardiovascular, infección por VIH, hepatitis, hipertensión portal, hipertensión pulmonar, enfermedad cardíaca congénita, hipoxia, anemia hemolítica crónica, hipertensión pulmonar persistente del recién nacido, enfermedad veno-oclusiva pulmonar (EVOP), hemangiomas capilar pulmonar (HCP), hipertensión pulmonar con enfermedad cardíaca izquierda, disfunción sistólica, disfunción diastólica, enfermedad valvular, enfermedad pulmonar, enfermedad pulmonar intersticial, fibrosis pulmonar, esquistosomiasis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), respiración desordenada durante el sueño, trastornos de hipoventilación alveolar, exposición crónica a las alturas, anomalías de desarrollo, hipertensión pulmonar tromboembólica crónica (HPTEC), hipertensión pulmonar con mecanismos multifactoriales poco claros, trastornos hematológicos, trastornos mieloproliferativos, esplenectomía, trastornos sistémicos, sarcoidosis, histiocitosis pulmonar de células de Langerhans, linfangiomiomatosis, neurofibromatosis, vasculitis, trastornos metabólicos, enfermedad del almacenamiento de glucógeno, enfermedad de Gaucher, trastornos de tiroides, obstrucción tumoral, mediastinitis fibrosa, y fallo renal crónico en diálisis; y enfermedades tales como hipertensión pulmonar, enfermedad cardíaca congénita, hipoxia, anemia hemolítica crónica, hipertensión pulmonar persistente del recién nacido, enfermedad veno-oclusiva pulmonar (EVOP), hemangiomas capilar pulmonar (HCP), hipertensión pulmonar con enfermedad cardíaca izquierda, disfunción sistólica, disfunción diastólica, enfermedad valvular, enfermedad pulmonar, enfermedad pulmonar intersticial, fibrosis pulmonar, esquistosomiasis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), respiración desordenada durante el sueño, trastornos de hipoventilación alveolar, exposición crónica a las alturas, anomalías de desarrollo, hipertensión pulmonar tromboembólica crónica (HPTEC), hipertensión pulmonar con mecanismos multifactoriales poco claros, trastornos hematológicos, trastornos mieloproliferativos, esplenectomía, trastornos sistémicos, sarcoidosis, histiocitosis pulmonar de células de Langerhans, linfangiomiomatosis, neurofibromatosis, vasculitis, trastornos metabólicos, enfermedad del almacenamiento de glucógeno, enfermedad de Gaucher, trastornos de tiroides, obstrucción tumoral, mediastinitis fibrosa, enfermedades inmunológicas e inflamatorias, enfermedades hiperproliferativas, enfermedades renales y de riñón, enfermedades de remodelado óseo, enfermedades metabólicas, enfermedades vasculares y fallo renal crónico en la diálisis.

30 Se describe un método para tratar la hipertensión arterial pulmonar (HAP) en un sujeto o una condición biológica asociada con HAP en un sujeto administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto para usar según la invención, un tautómero del compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero, o una mezcla de los mismos, en donde un compuesto es como se describe en esta memoria. En algunos casos, la enfermedad o condición mediada por, o asociada con, una o más quininas de la presente descripción se selecciona del grupo que consiste en HAP, HAP primaria, HAP idiopática, HAP hereditaria, HAP refractaria, HAP inducida por fármacos, HAP inducida por toxinas, y HAP con enfermedades secundarias.

40 La hipertensión arterial pulmonar (HAP) es una enfermedad que amenaza la vida caracterizada por una elevación marcada y sostenida de la presión arterial pulmonar. La enfermedad da por resultado el fallo ventricular derecho (VD) y la muerte. Las aproximaciones terapéuticas actuales para el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar crónica proporcionan principalmente alivio sintomático, además de alguna mejora de pronóstico. Aunque se postula por todos los tratamientos, la evidencia de efectos anti-proliferativos directos de la mayoría de las aproximaciones está perdida. Además, el uso de la mayoría de los agentes aplicados actualmente está obstaculizado o por efectos secundarios indeseados o por rutas de administración de fármacos inconvenientes. Los cambios patológicos de las arterias pulmonares hipertensoras incluyen lesión endotelial, proliferación e hiper-contracción de las células musculares lisas vasculares (CMLs), y la proliferación de fibroblastos. El estado del paciente de HAP, además, puede evaluarse de acuerdo con la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (modificada después de la Clasificación Funcional de la Asociación de NY) como se sabe en la técnica.

50 En algunos casos, el compuesto para usar según la invención va a tratar o evitar la HAP en pacientes que fallaron en la terapia anterior, especialmente después de recibir al menos un prostanóide, antagonista de endotelina o inhibidor de PDE V. En otros casos, los compuestos tratan o evitan la HAP en pacientes que están más gravemente afectados, en particular en pacientes con estado funcional de Clase II a Clase IV, o de forma más grave de estado funcional de Clase III o IV. En casos adicionales, los compuestos tratan o evitan la HAP en pacientes que albergan mutaciones BMPR2.

55 Se describen métodos de prevención o tratamiento de sujetos aquejados con hipertensión pulmonar idiopática o primaria, hipertensión familiar, hipertensión pulmonar secundaria a, aunque no limitada a, enfermedad del tejido conectivo, defectos cardíacos congénitos (desviaciones), fibrosis pulmonar, hipertensión portal, infección con VIH, enfermedad de célula falciforme, fármacos y toxinas, por ejemplo, anorexígenos, cocaína, hipoxia crónica, enfermedad obstructiva pulmonar crónica, apnea del sueño y esquistosomiasis, hipertensión pulmonar asociada con significativa implicación venosa o capilar (enfermedad veno-oclusiva pulmonar, hemangiomas capilar pulmonar), hipertensión pulmonar secundaria que está fuera de proporción al grado de disfunción ventricular izquierda y/o

hipertensión pulmonar persistente en niños recién nacidos, especialmente en sujetos que han fallado en la terapia HAP anterior.

5 Se describe el compuesto para usar según la invención, un tautómero del compuesto, enantiómero o estereoisómero del compuesto o, una mezcla farmacéutica o cualquier mezcla de los mismos para tratar una o más enfermedades asociadas con hiperproliferación, neoplasia, hipoplasia, hiperplasia, displasia, metaplasia, prosoplasia, desmoplasia, angiogénesis, inflamación, función pulmonar y función cardiovascular.

10 Las enfermedades hiperproliferativas, inmunológicas e inflamatorias, metabólicas y vasculares, se conocen en la técnica, y dichas enfermedades, como se describe en la Patente Provisional de EE.UU. núm. 61/751.217, que se incorpora aquí por referencia en su totalidad, son objetivos terapéuticos para los compuestos y agentes descritos en esta memoria.

15 Se describe un método para evitar o reducir la presión pulmonar elevada en un sujeto, administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto para usar según la invención, un tautómero del compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero, o una mezcla de los mismos. En algunos casos, el compuesto trata o evita una condición biológica asociada con HAP, tal como, por ejemplo, anormal: presión sistólica ventricular derecha (PSVD); presión pulmonar; rendimiento cardíaco; hipertrofia ventricular derecha (VD); e hipertrofia AP.

20 En algunos casos, el compuesto para usar según la invención reduce la presión pulmonar asociada con un aumento en una o más de las funciones ventriculares derechas (VD), presión sistólica de la arteria pulmonar (AP), y/o rendimiento cardíaco en el sujeto en comparación con el sujeto antes de la administración. En algunos casos, la reducción en la presión pulmonar se asocia con una disminución en una o más de hipertrofia VD, hipertrofia AP, PSVD, presión AP sostenida y el riesgo de ictus en el sujeto en comparación con el sujeto antes de la administración. En algunos casos, la disminución es al menos una disminución de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95%. En algunos casos, a disminución es al menos una disminución del 40%.

25 Una reducción en la presión pulmonar, en algunos casos, no está asociada con la disminución de la función pulmonar y/o presión sanguínea sistémica aumentada en el sujeto en comparación con el sujeto antes de la administración. Los métodos para medir la función pulmonar y la presión sanguínea se conocen en la técnica. Se describe un método para tratar la hipertensión arterial pulmonar (HAP) en un sujeto, que comprende: modular el estado de fosforilación ("EF") de uno o más objetivos corriente abajo del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas-alfa o receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas-beta o ambos, en donde el objetivo corriente abajo es cualquier sustrato fosforilado como resultado de la activación de PDGFR- α y/o PDGFR- β , administrando al sujeto el compuesto para usar según la invención, un tautómero, enantiómero o estereoisómero del compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto, tautómero, enantiómero o estereoisómero, o cualquier mezcla de los mismos, en donde el objetivo corriente abajo se selecciona del grupo que consiste en AKT, PDGFR, STAT3, ERK1 y ERK2, o cualquier otro objetivo corriente abajo del PDGFR-u y/o el PDGFR- β , y en donde el compuesto de Estructura 1 se describe en esta memoria. Los perfiles del estado de fosforilación para proteínas, quinasas/receptores, pueden verificarse usando técnicas conocidas en la técnica, tal como, por ejemplo, ensayos de Z-lite quinasa, Invitrogen Select Screen®, y otros ensayos de quinasas conocidos en la técnica.

35 En casos adecuados, la modulación de la actividad del receptor de quinasa es una inhibición de la actividad del receptor de quinasa. PDGFR, es decir, PDGFR- α , PDGFR- β , PDGFR- $\alpha\alpha$, PDGFR- $\beta\beta$ y PDGFR- $\alpha\beta$ y/o c-Kit son ejemplos de RTKs que se inhiben en algunos casos de la presente invención. En algunos casos, la inhibición es al menos una inhibición de 0,001, 0,01, 0,1, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95%. En algunos casos, la modulación de PSR es una modulación de uno o más de AKT, STAT3, ERK1, ERK2, PDGF y DPGFR, es decir, PDGFR- $\alpha\alpha$, PDGFR- $\beta\beta$ y PDGFR- $\alpha\beta$. En algunos casos, la modulación de EF es una disminución del STAT3 fosforilado a STAT3 total en el sujeto en comparación con el EF en el sujeto antes de la administración. En algunos casos, la disminución es al menos una disminución de 0,001, 0,01, 0,1, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95%. En algunos casos, la modulación del EF es una disminución del ERK1 difosforilado al ERK1 total en el sujeto en comparación con el EF en el sujeto antes de la administración. En algunos casos, la disminución es al menos una disminución del 0,001, 0,01, 0,1, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95%. En otros casos, la modulación del EF es una disminución de ERK2 difosforilado al ERK2 total en el sujeto en comparación con el EF en el sujeto antes de la administración. En algunos casos, la disminución es al menos una disminución del 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 50, 60, 70, 80, 85, 90 o 95%.

40 En algunos casos, la modulación del EF es una disminución del ERK1 monofosforilado al ERK1 total en el sujeto en comparación con el EF en el sujeto antes de la administración. En algunos casos, la disminución es al menos una disminución de 0,001, 0,01, 0,1, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95%. En algunos casos, la modulación del EF es una disminución del PDGFR fosforilado al PDGFR total en el sujeto en comparación con el EF en el sujeto antes de la administración. En algunos casos, la disminución es al menos una disminución de 0,001, 0,01, 0,1, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95%. En algunos casos, la modulación del EF es una disminución de AKT fosforilado a AKT total en el sujeto en comparación

con el EF en el sujeto antes de la administración. En algunos casos, la disminución es al menos una disminución de 0,001, 0,01, 0,1, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95%.

Ejemplos

5 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deberían estar contruidos como limitantes de ninguna forma. Lo siguiente es una descripción de los materiales y métodos usados a lo largo de los ejemplos, que ilustra que rutas de señalización de RTK están activas en las condiciones de enfermedad humanas, por ejemplo, HAP y en modelos animales de la enfermedad.

10 Materiales. PK10453, (S)-N-(3-(1-((6-(4-hidroxi-3-metoxifenil)pirazin-2-il)amino)etil)fenil)-5-metilnicotinamida, es decir, Estructura 2, se sintetizó por Organix, Inc. (Woburn, MA). Las células del músculo liso AP humano y los medios de cultivo celular se obtuvieron de Cell Applications, Inc. PDGFBB, ácido para-toluensulfónico, hidróxido de amonio e IR780 se obtuvieron de Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri). El mesilato de imatinib se obtuvo de LC Laboratories (Woburn, MA). Los fibroblastos de pulmón fetal humano (FPHs) se obtuvieron de Cell Applications, Inc., San Diego. El medio DMEM se obtuvo de Mediatech (Manassas, VA.). PDGFAA, PDGFBB, y Glutamax se obtuvieron de Life Technologies (Grand Island, NY). El ácido para-toluensulfónico, hidróxido de amonio, IR780 y monocrotalina (C2401 Lote 031M1921V y lote SLBB7802V) se obtuvieron de Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri). Los anticuerpos de anti-fosfo-AKT (Ser 473), anti-fosfo-AKT (Thr308), pan-AKT (mAb de ratón CST2920, y mAb de conejo CST2965), anti-fosfo-ERK1/2, anti-fosfo-STAT3 y STAT3 total se obtuvieron de Cell Signaling Technologies (Waltham, MA). El anticuerpo anti-ERK1/2 total se obtuvo de Protein Simple (CA). Los anticuerpos del factor anti-von-Willebrand, actina, fosfo-PDGFR α (Y754) y PDGFBB se obtuvieron de AbCam (Cambridge, MA). Los anticuerpos contra PDGFAA (sc-128), PDGFR-alfa (sc-338), PDGFR-beta (sc-432) y p-PDGFR-beta (Tyr 1021) (sc-12909) se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology (CA). El IgG anti-ratón de cabra 680LT, IgG anti-conejo de cabra IRDye 800 W, y el tampón de bloqueo Odyssey se obtuvieron de Licor (Lincoln, NE).

25 Ensayo de quinasa in vitro. Se realizó un ensayo de Z-lyte quinasa para determinar la inhibición de la fosforilación mediada por PDGFRalfa y PDGFRbeta mediante PK10453 (Estructura 2). Se modelaron curvas de valoración de diez puntos para calcular la CI_{50} (Invitrogen Select Screen®).

30 Ensayo de proliferación de CMLAP. Las células de músculo liso de la arteria pulmonar humana (CMLAP) se obtuvieron de Cell Applications (San Diego, CA) y se hicieron crecer al 50% de confluencia en un formato de 96 pocillos. Las células se cambiaron a medio libre de suero 24 horas antes de la estimulación con PDGFBB 50 ng/ml y concentraciones variables de PK10453 (Estructura 2). Después de 24 horas de tratamiento, se realizó un ensayo de proliferación celular Cyquant NF (Invitrogen®) y la señal fluorescente se midió con un lector de placa Cytofluor. Los datos se basan en un promedio de 8 réplicas en cada concentración.

35 Western en cultivo celular (ICW). Para comparar los perfiles inhibidores de PK10453 (Estructura 2) e imatinib para la fosforilación de AKT estimulada por PDGFBB y PDGFAA, se realizaron ICWs, con modificaciones, según el método de Chen *et al.*, "A cell-based immunocytochemical assay for monitoring kinase signaling pathways and drug efficacy" *Analytical biochemistry*; Vol. 338:136-42 (2005). Los FPHs se mantuvieron en un subcultivo a no más de 6 pasos en DMEM con FBS al 5% y Glutamax 4 mM a 37°C, 5% de CO₂. Los FPHs se pusieron en un plato y se cultivaron al 70-80% de confluencia en placas de 96 pocillos después se dejaron sin suero durante 48 horas. Las células se trataron con fármaco (PK10453 o imatinib) a las concentraciones indicadas durante 30 min después se expusieron a 10 ng/ml de PDGF AA o BB durante 7,5 min. Las células se fijaron en formaldehído al 3,7%, se lavaron con Tritón X-100 al 0,1%, y se trataron con Tampón de bloqueo Odyssey durante 90 min. Las proteínas se incubaron toda la noche en mAb de conejo diluido 1:100 a AKT fosforilado (Ser 473 o Thr 308) y 1:100 de mAb de ratón a Akt-pan-4040D total. Los anticuerpos se detectaron usando anticuerpos conjugados de IgG anti-ratón de cabra IRDye 680LT e IgG de α -conejo de cabra IRDye 800W. Después de lavar, la señal se cuantificó usando un Sistema de formación de imágenes infrarrojas Odyssey (LI-COR). La señal de fosfoproteína (800 nm) se normalizó a la señal de proteína total (700 nm) conseguida de cada pocillo y se promediaron y presentaron duplicados experimentales en la misma placa.

45 Animales. Se usaron ratas Sprague Dawley macho (peso de 320-330 gramos; Taconic Inc.) para este estudio. Los animales se alojaron en jaulas de rata estándar con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, y se proporcionaron comida de rata estándar y agua *ad libitum*. Los animales se cuidaron y se usaron de acuerdo con las guías NIH. Todos los protocolos animales fueron aprobados por el Centro Médico Bassett y Pulmokine IACUC.

55 Formulación y distribución del aerosol. Se disolvió PK10453 (Estructura 2) a una concentración de 20 mg/ml en ácido fosfórico 1M. La nebulización se realizó con un nebulizador PARI con una presión de aire de 12,5 psi. Las gotas de aerosol se neutralizaron mediante vapor de amoníaco que se pasó en la corriente de aire de aerosol. Las partículas se secaron entonces fluyendo a través de un anillo anular de cartuchos de perlas de sílice para alcanzar la cámara de exposición. La cámara de exposición de 6 puertos era un sistema de exposición solo de punta diseñado sobre pedido del cliente y construido por Powerscope Inc. (Minneapolis, MN). El caudal al vacío en cada puerto se controló de forma separada mediante un flujómetro. El tamaño de partícula del aerosol se midió en el puerto de salida de la columna de secado con un impactor de cascada Anderson (Mark II). El diámetro aerodinámico medio de masa (DAMM) fue 2 μ m y la desviación estándar geométrica (DEG) asociada fue 1,6. Se disolvió mesilato de

imatinib en agua a 20 mg/ml y se distribuyó por un nebulizador PARI después se secó por el paso a través de un anillo anular de cartuchos de perlas de sílice antes de la inhalación.

5 Estimación de dosis inhalada. Los filtros expuestos a PK10453 (Estructura 2) durante o bien 4 u 8 min (n=6 en cada grupo) por medio de la cámara de exposición Powerscope se colocaron en viales de vidrio amarillo. Se añadieron doce mililitros de metanol:acetonitrilo 1:3 (v/v) a cada vial que contenía un filtro durante aproximadamente 1 h, con mezcla periódica, seguido por sonicación durante 60 segundos. Se diluyó entonces una alícuota de 100 veces añadiendo 10 µL de extracto de filtro desconocido a 990 µL de metanol:acetonitrilo 1:3 (v/v). Las muestras se agitaron con vórtice durante 30 segundos, y después se combinaron una alícuota diluida de 100 µL con 100 µL de 10 172 ng/mL de un patrón interno no relacionado químicamente (PK18855) en metanol:agua 1:1, se mezclaron en vórtice y se transfirieron a viales auto-muestreadores para el análisis de LC-MS/MS. Los extractos de los filtros se compararon con una curva de calibrado preparada en metanol al 100% (PharmOptima®, Inc.). La concentración en aerosol de PK10453 (Estructura 2) en µ/litro de aire se calculó en base al total promedio µ de PK10453 (Estructura 2) en los filtros para los tiempos de exposición de 4 y 8 min, y el caudal pasó cada filtro (0,8 L/min). La dosis inhalada se calculó con la concentración promedio de PK10453/cm² de papel filtro (promedio de exposiciones de 4 y 15 8 min), la ventilación por min promedio se midió por pletismografía (0,15 L/min), y una fracción de deposición estimada de 0,1. La dosis de 8 min de imatinib se basó en el análisis gravimétrico.

20 Formación de imagen. La distribución espacial de PK10453 inhalado (Estructura 2) en el pulmón se evaluó mediante formación de imágenes fluorescentes. Un trazador fluorescente en el IR cercano, IR-780, se añadió a la disolución de fármaco en el nebulizador para asegurar que las partículas de aerosol secas contenían tanto el fármaco como el trazador IR. Después de dos min de exposición, a los animales se le aplicó anestesia general sometidos a intubación por medio de traqueotomía, y los pulmones se extirparon. Se infundió OCT/PBS por medio de la arteria pulmonar, el pulmón se insufló con aire, y los pulmones se congelaron en la fase vapor de nitrógeno líquido. Una serie de secciones de aproximadamente 2 mm de pulmón se formaron por imágenes en un Formador de imágenes Licor Odyssey.

25 Estudios farmacocinéticos. Se administró PK10453 (Estructura 2) de forma intravenosa o por inhalación a los animales, que se sacrificaron en los tiempos 0, 10, 20 y 60 min (n=3 en cada punto temporal). Se tomaron muestras de sangre por punción cardiaca, y los pulmones se extirparon. Los pulmones se homogeneizaron y se extrajo el PK10453 (Estructura 2) con una mezcla 1:3 de acetonitrilo:metanol. De forma similar, se extrajo plasma con una 30 mezcla 1:3 de acetonitrilo:metanol. El fármaco se ensayó por LC MS/MS (PharmOptima Inc., Portage MI). Se ajustaron las curvas exponenciales de primer orden a los datos con Excel. Se determinó el ABC con el método trapezoidal de integración.

35 Estudio de eficacia en el modelo MCT de rata – Estudio de respuesta a la dosis de PK10453 (Estructura 2) en el modelo MCT de rata. Las ratas Sprague Dawley macho recibieron 60 mg/kg de IPMCT de MCT, y después de 3 semanas, se administraron PK10453 (Estructura 2) o vehículo de control por inhalación. Se estudiaron cuatro grupos: vehículo de control (4 min de exposición) y tres grupos de tratamiento de PK10453 (Estructura 2) con tiempos de exposición de 2 min (D2), 4 min (D4) u 8 min (D8) tres veces al día. Estos regímenes se administraron durante dos semanas. El vehículo consistió en ácido tosílico 1 M en forma de aerosol neutralizado con vapor de amoníaco como se describe anteriormente. El pH de una disolución preparada disolviendo partículas de aerosol capturadas en agua se midió para cada dosis y estuvo constante en el intervalo de 5,5-6,0. Al final del estudio, se 40 midió la presión sistólica VD, y las cámaras cardíacas se diseccionaron y se pesaron.

45 Estudio de eficacia en el modelo MCT de rata – PK10453 (Estructura 2) frente a imatinib en el modelo MCT de rata. Se dio a ratas Sprague Dawley macho 60 mg/kg de IP de MCT. Tres semanas más tarde se administraron vehículo (ácido tosílico 1M), PK10453 (Estructura 2 a 20 mg/ml de base libre en ácido tosílico 1M), o mesilato de imatinib (20 mg/ml en disolución nebulizadora) a grupos designados para exposiciones de inhalación de 8 min, tres veces al día, durante dos semanas. Al final del estudio se midió la presión PSVD; el pulmón y el corazón se fijaron en formalina. Para la medida de PSVD los animales se sedaron con isoflurano, se intubaron por medio de una traqueotomía, y se ventilaron con un ventilador regulado en presión TOPOVENT (presión inspiratoria pico 18 cm de H₂O, PEEP 5 cm). Después de la esternotomía, se insertó un catéter de alta fidelidad Scisense por medio de la bóveda de VD.

50 Estudio de eficacia en el modelo MCT+PN de rata. Se realizó la neumonectomía y la implantación de un monitor de telemetría TRM53P en la arteria pulmonar (Telemetry Research, Nueva Zelanda y ADInstruments, Colorado) en las ratas. Dos semanas después del MCT, se administró PK10453 (Estructura 2) tres veces al día durante 1 semana. La dosificación se comenzó 2 semanas después de MCT en vez de 3 semanas, porque en este modelo más agresivo los animales desarrollaron HAP más rápidamente y desarrollaron distrés más pronto que en los animales tratados solo con MCT (no se muestran los datos). Los dos grupos se sometieron a exposiciones de 4 min o bien de vehículo de control o PK10453 (Estructura 2). El muestreo de la presión AP se realizó 5 min antes de la dosis de cada mañana en animales ambulatorios en aire ambiental (presión atmosférica estimada de 716 mm de Hg en base a la elevación de la instalación animal). En el protocolo 4 (imatinib frente a vehículo), los animales recibieron transmisores DSI PAC40 seguido por 50 mg/kg de IP de monocrotalina (Lote SLBB7802V). Una dosis menor de MCT se usó para este estudio, porque los intentos de usar 60 mg/kg de este lote de MCT dieron por resultado la 55 necesidad de realizar la eutanasia temprana en una alta proporción de animales debido a la pérdida de peso y la 60

taquipnea. Dos semanas después de la inyección de MCT IP, se administró vehículo (mesilato 3 mg/ml) o mesilato de imatinib (20 mg/ml en disolución nebulizadora) durante exposiciones de 8 min tres veces al día durante 9 días. Los datos de telemetría se obtuvieron durante 10 min al día antes de la dosis de cada mañana para este protocolo.

5 Medida de los bucles de VP. En una cohorte separada de animales, el modelo MCT+PN se desarrolló como se describe anteriormente, y se administró entonces PK10453 (Estructura 2) durante 4 u 8 min tres veces al día al grupo tratado con fármaco. El grupo de vehículo de control experimentó exposiciones de 4 min tres veces al día. Los bucles de volumen de presión (VP) se obtuvieron con un sistema de admitancia (Scisense, Inc.) después de 14 días de tratamiento, mientras que las ratas estaban bajo anestesia general con isoflurano y FiO₂ al 100%. Además, o en la alternativa, las presiones de VD se obtuvieron en cada grupo después de 14 días de tratamiento. En un subconjunto de cada grupo, se obtuvieron los bucles de volumen de presión (VP) con un sistema de admitancia (catéter de alta fidelidad FTE1918B, Scisense, Inc.) después de 14 días de tratamiento. Después de la inducción de la anestesia general y la intubación por medio de traqueotomía, las ratas se pusieron en un ventilador controlado por presión (TOPOVENT). La anestesia general consistió en isoflurano y FiO₂ al 100% con presión inspiratoria pico ajustada a 18 cm, y PEEP de 5 cm de H₂O. Se realizó una toracotomía izquierda con un catéter de admitancia en el VD por medio del tracto de salida del VD.

20 Estudio de la presión sanguínea sistémica. El efecto de PK10453 (Estructura 2) en la PS sistémica se estudió en ratas tratadas con MCT ambulatorias con transmisores DSI PAC40 implantados en la aorta descendente. Tres semanas después de la administración de 60 mg/kg de IP de MCT, los animales inhalan PK10453 (Estructura 2) o vehículo 3X/d con exposición de 4 min durante 7 días. La presión sanguínea se grabó antes de la dosis de cada mañana.

25 Pletismografía. La pletismografía se realizó con un pletismógrafo de cámara dual EMKA y software IOX. Los parámetros medidos incluyeron la frecuencia de respiración, el volumen corriente, ventilación por minuto, flujo inspiratorio y espiratorio pico y resistencia de la vía aérea (SRaw). Los animales se aclimataron al pletismógrafo durante tres días antes de la primera adquisición de datos. Las medidas se hicieron antes de la primera dosis de fármaco y al final del estudio.

30 Histología y análisis morfométrico. Al final del estudio, el corazón y los pulmones se quitaron de los animales ventilados con anestesia general. Se infundió solución salina heparinizada a presión a través de la arteria pulmonar principal. El lóbulo superior derecho se sujetó inmediatamente y se colocó en nitrógeno líquido para el análisis por ensayo de electroinmunotransferencia (Western blot) y NanoPro 100. El corazón se quitó y la pared libre del VD, el septo interventricular y la pared libre del VI se diseccionaron y se pesaron. Se infundió formalina tamponada (10%) a presión tanto a través de la arteria pulmonar como de la tráquea. El análisis morfométrico se realizó en tejido fijado con formalina teñido de H&E seccionado a 8 µm. El área de media y el área de lumen de las arteriolas pulmonares se midieron con software Image J por un técnico ciego al grupo de tratamiento. Las medidas se hicieron en 20 arteriolas pulmonares por sección. Se determinó la relación del área del lumen al área de media total. Esta relación normaliza la variación en el área total de la arteriola pulmonar. Además, se realizó el análisis oclusivo en el estudio de monocrotalina más neumonectomía (específicamente el estudio de eficacia 5) según el método de Homma *et al.*, "Involvement of RhoA/Rho kinase signaling in protection against monocrotaline-induced pulmonary hypertension in pneumonectomized rats by dehydroepiandrosterone". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. Vol. 295:L71-8 (2008). Brevemente, se asignó con el grado 0 a las arteriolas pre-capilares por la no evidencia de lesiones neointimas, grado 1 para menos del 50% de oclusión luminal, y grado 2 para más del 50% de oclusión. Se realizaron tinciones tricómicas de Masson en las secciones del pulmón del modelo MCT+PN.

40 Inmunoensayo NanoPro. Se midieron las diferencias relativas en las isoformas ERK1/2 y STAT fosforiladas con un sistema de inmunoensayo NanoPro 100® (Protein Simple/Cell Biosciences, CA). Véase Fan *et al.*, "Nanofluidic proteomic assay for serial analysis of oncoprotein activation in clinical specimens". *Nat Med* 15:566-571 (2009).

45 Inmunohistoquímica. Se realizó una recuperación de antígeno con tampón citrato (pH 6,0) o tampón Tris-EDTA (pH 9,0). La inmunohistoquímica se realizó para los siguientes objetivos: CD20 (un marcador de célula B), CD3 (un marcador de célula T), Factor de von Willebrand (vWF), STAT3 total, fosfoSTAT3 (Tyr705), PDGFR-alfa total, PDGFR-beta total, y fosfoPDGFR-beta. Los péptidos competidores estaban disponibles para PDGFR-alfa y fosfo-PDGFR-beta. La detección de señal se realizó con un kit de EXPOSE HRP/DAB (Abeam®).

50 Análisis estadístico. Los datos se presentan como media ± EEM a menos que se anote otra cosa. Se usó el Modelo lineal general con la corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones de grupo (SPSS 14.0). La significancia se ajustó al nivel p=0,05.

Ejemplo 1 – Caracterización de PK10453 (Estructura 2)

55 Las FIGs. 1A-1D muestran gráficos que representan las concentraciones CI₅₀ para Imatinib y PK10453 (Estructura 2). Un ensayo quinasa *in vitro* demostró que la CI₅₀ para PK10453 a ATP K_m fue 35 nM para PDGFR-α y 10,1 nM para el PDGFR-β. Para imatinib la CI₅₀ a ATP K_m fue 71 nM para DPGFR-α y 607 nM para PDGFR-beta. Las FIGs. 2A-2E muestran gráficos de e imágenes de ensayos de Western en cultivo celular (ICW) que demuestran la menor CI₅₀ de PK10453 (Estructura 2) frente a la fosforilación estimulada por PDGFAA y PDGFBB de AKT en Ser473 y

Thr308 en comparación con Imatinib en fibroblastos de pulmón fetal humano. La CI_{50} de PK10453 para la fosforilación de AKT estimulada por PDGFBB en Ser473 fue 0,13 μM en comparación con 1,8 μM para imatinib ($p < 0,01$). La CI_{50} de PK10453 para la fosforilación de AKT estimulada por PDGFBB en Thr308 fue 0,43 μM frente a 3,25 μM para imatinib ($p < 0,001$). Las concentraciones CI_{50} de PK10453 e imatinib para la fosforilación de AKT estimulada por PDGFAA no fueron significativamente diferentes.

Dosis inhalada estimada – PK10453 (Estructura 2) e imatinib. La concentración promedio de PK10453 fue $62,4 \pm 3,3 \mu g/cm^2$ de papel de filtro para la exposición de 4 min, y $137 \pm 7,0 \mu g/cm^2$ para la exposición de 8 min, que dio por resultado una concentración en aerosol de 91,65 $\mu g/L$ de aire para la exposición de 4 min y 100,6 $\mu g/L$ de aire para la exposición de 8 min. La concentración en aerosol de imatinib basada en el análisis gravimétrico fue 167 $\mu g/L$. la dosis inhalada promedio (8 min), asumiendo una fracción de deposición de 0,1 y un peso de rata de 300 g, fue aproximadamente 20 $\mu g/kg$ para PK10453 y 40 $\mu g/kg$ para imatinib, como se muestra en la Tabla 1. La dosis inhalada estimada se calculó a partir de la concentración medida de PK10453 (Estructura 2) y el análisis gravimétrico de imatinib en el aerosol, la ventilación por minuto medida (VM), la fracción de deposición estimada de 0,1 y el peso de la rata de 300 g.

Tabla 1

IFA	Conc. de aerosol $\mu g/L$	Exposición Min	VM L/min	VM* Tiempo de exposición	Fracción de deposición total	Fracción de deposición en el pulmón	Total inhalado μg	Total depositado μg	Depositado en el pulmón μg	Depositado en el pulmón $\mu g/kg$
PK10453	98,13	8,00	0,15	1,20	0,10	0,80	115,36	11,54	8,92	23,07
Imatinib	167,4	8,00	0,15	1,20	0,10	0,80	200,88	20,09	12,05	40,18

Distribución en el pulmón y farmacocinéticas de PK10453 inhalado (Estructura 2). Las imágenes fluorescentes de las secciones de pulmón después de la inhalación de PK10453 con trazador IR780 se muestran en la FIG. 3, donde la intensidad de la fluorescencia se muestra que está bien distribuida por todos los pulmones. La red de líneas más oscuras surge del tejido conectivo y por lo tanto no representa las vías aéreas afectadas por la enfermedad. La distribución espacial de imatinib fue similar (no se muestran los datos).

Para el estudio farmacocinético, la concentración de PK10453 (Estructura 2) en el pulmón cuando se administra por inhalación se comparó con la concentración alcanzada con la administración IV. Como se describe en Morén "Aerosols in medicine: principles, diagnosis, and therapy". Amsterdam; Nueva York: Elsevier. (1993) y Phalen *et al.*, "Inhalation exposure methodology". *Environ Health Perspect* 56:23-34 (1984)), es posible estimar la ventaja farmacocinética de la inhalación respecto a la administración intravenosa, R_d , comparando el ABC de un gráfico de la concentración de fármaco como una función del tiempo después de la administración respiratoria e IV:

$$R_d = [(ABC_{pulmón}/ABC_{plasma})_{respiratorio}] / [(ABC_{pulmón}/ABC_{plasma})_{IV}]$$

Los datos farmacocinéticos se modelaron a una curva exponencial de primer orden, y el ABC se calculó a partir de las curvas (véase Tabla 2). Las FIGs. 4A y 4B muestran el nivel del fármaco en el pulmón y el plasma como una función del tiempo después de la administración por inhalación (INH) o intravenosa (IV) de PK10453 (Estructura 2). Los datos indican una ventaja de 45 veces del PK10453 inhalado en comparación con el administrado IV ($R_d=44,6$).

Tabla 2

$Y=AEXP(-bX)$	A (ng/g pulmón)	b (min ⁻¹)	R ²
Pulmón (INH)	2468	0,03	0,89
Plasma (INH)	132,7	0,37	0,93
Pulmón (IV)	440	0,06	0,96
Plasma (IV)	1269	0,37	0,92

	ABC
Pulmón (INH)	1001,82
Plasma (INH)	85,47
Pulmón (IV)	211,89
Plasma (IV)	817,25
R_d	44,58

Ejemplo 2 – Eficacia del modelo MCT

Las FIGs. 5A-5D representan el efecto de PK10453 (Estructura 2) en la presión sistólica (PS) del ventrículo derecho (VD) e hipertrofia del VD en los sistemas de modelo MCT y MCT+PN. Los valores de la PSVD se muestran en la FIG. 5A. En el grupo de vehículo (n=6), PSVD fue 80,4±2,6 mm de Hg. Para los grupos de tratamiento, D2 (n=6), 51,4±6,5; D4 (n=6), 44,4±3,8; y D8 (n=5), 37,1±4,5 mm de Hg (p<0,001). La PSVD del grupo de control normal fue 28,5±2,6 mm de Hg (n=3). En el grupo D4, hubo una reducción del 44% en la PSVD, y en el grupo D8, hubo una reducción del 54% en la PSVD en comparación con el grupo tratado con vehículo. Hubo también una reducción significativa en el grado de hipertrofia del VD como se mide por la relación de peso (VD/SIV)/VI. Véase la FIG. 5B. Los datos están representados por esta relación porque el septo se comparte por el VD y el VI. Sin embargo, el uso de la relación VD/(SIV+VI) también mostró resultados similares.

Además, hubo 6 animales en el grupo de vehículo aunque no se obtuvieron presiones sistólicas finales del VD exactas debido al sangrado en 2 animales. Por lo tanto la presión sistólica del VD se basa en n=4 en el grupo de vehículo y fue 57,9±7,6 mm de Hg. En el grupo de PK10453 (Estructura 2) (n=12) la presión sistólica del VD fue 36,3±2,6 mm de Hg, y en el grupo de imatinib (n=6) fue 31,8±1,8 mm de Hg (p=0,001 de vehículo frente a PK10453; p=0,002 de vehículo frente a imatinib, FIG. 5C). El volumen sistólico final fue mayor en el grupo de vehículo (158±12,6 µl) frente a PK10453 (99,5±10 µl) e imatinib (81±4,3 µl) (p=0,05 de vehículo frente a PK10453; p=0,014 de vehículo frente a imatinib; p=NS de PK10453 frente a imatinib). No hubo diferencias significativas entre los grupos para los siguientes parámetros: volumen diastólico final, fracción de eyección, rendimiento cardiaco, trabajo losíptico. La relación de lumen a media se mejoró tanto con PK10453 como con imatinib en comparación con el vehículo en el modelo MCT (Vehículo (V, n=4): 0,55±0,1; PK10453 (D8, n=12): 0,94±0,08; Imatinib (18, n=5): 0,99±0,07; p<0,01 D8 frente a V, p<0,05 18 frente a V, FIG. 5D).

Ejemplo 3 – Estudios de eficacia en el modelo MCT+PN de rata

Estudios de telemetría. Se describen los resultados del estudio de telemetría en el modelo MCT+PN de rata. En el día 0 antes del comienzo del tratamiento, la presión sistólica AP en los grupos de vehículo fue 41,0±11,7 mm de Hg, y en el grupo de PK10453 (Estructura 2), fue 43,1±3,5 mm de Hg (p=NS). Después de cinco días de tratamiento, la presión sistólica AP fue 69,4±12,9 mm de Hg en el grupo de vehículo y fue significativamente menor a 47,3±3,0 mm de Hg en el grupo de PK10453 (p<0,01). En el día 8 del tratamiento, la presión sistólica AP en el grupo de vehículo fue 83,5±8,5, aunque significativamente menor a 47,3±4,9 mm de Hg en el grupo de PK10453 (p<0,001).

Las FIGs. 6A y 6B muestran gráficos para estudios de telemetría en el modelo de MCT+PN de rata. En un estudio de telemetría de PK10453 (Estructura 2) separada, el día 1 antes de comenzar el tratamiento, la presión sistólica AP en el grupo de vehículo fue 47,4±10,2 mm de Hg, y en el grupo de PK10453, fue 43,1±3,5 mm de Hg (p=NS). Después de cinco días de tratamiento, la presión sistólica AP fue 67,4±11,4 mm de Hg en el grupo de vehículo y fue significativamente menor a 47,2±3,0 mm de Hg en el grupo de PK10453 (p=0,03). En el día 9 de tratamiento, la presión sistólica AP en el grupo de vehículo fue 92,8±9,1 mm de Hg, aunque significativamente menor a 50,5±7 mm de Hg en el grupo de PK10453 (p=0,03). Para el estudio de telemetría de imatinib (estudio 4), en el día 1, la presión sistólica AP en el grupo de vehículo fue 51,4±8,9 mm de Hg, y en el grupo de imatinib 41,5±3,5 mm de Hg. En el día 9 de tratamiento la presión sistólica AP en el grupo de vehículo fue 80,4±14,2 mm de Hg, y en el grupo de imatinib fue 75,1±7 mm de Hg (p=NS). Véase la FIG. 6.

Medida de presión del VD y bucles de VP en el modelo MCT+PN; estudio de respuesta a la dosis de PK10453 (Estructura 2). En una cohorte separada de animales, el modelo MCT+PN se desarrolló como se describe. Las FIGs. 7A-7D representan gráficos relacionados con los análisis hemodinámico y morfométrico en el modelo MCT+PN de rata. La presión del VD se obtuvo después de 14 días de exposición al vehículo, y el tratamiento con PK10453 con exposiciones de 4 min (D4) y 8 min (D8) tres veces al día. En el grupo de vehículo (n=9), la presión sistólica del VD fue 75,7±7,1 mm de Hg, en el grupo D4 (n=10) la presión sistólica de VD fue 40,4±2,7 mm de Hg, y en el grupo de MCT+PN D8 la presión sistólica del VD fue 43±3,0 mm de Hg (p<0,001 de V frente a D4 y V frente a D8; FIG. 7A). Los bucles de VP se obtuvieron en un subconjunto de animales de cada grupo (Vehículo n=3; D4 n=5, D8 n=4).

Ejemplo 4 – Eficacia del modelo MCT+PNMCT+PN

Estudio de bucle VP. La presión sistólica final (PSF) del VD fue menor y la fracción de eyección (FE) del VD fue mayor en los grupos de tratamiento tanto D4 como D8 en comparación con el vehículo de control. El rendimiento cardiaco en el grupo D8 se aumentó en comparación con el grupo de vehículo. Véase la Tabla 3. Los animales del estudio experimentaron neumonectomía izquierda seguido 7 días más tarde por 60 mg/kg de IP de MCT. Dos semanas después de la administración de MCT, se dieron PK10453 (Estructura 2) o el vehículo por inhalación tres veces al día durante dos semanas. Los bucles de VP se consiguieron al final de este periodo. Con respecto a la Tabla 3: V=vehículo; D4= inhalación de PK10453 de 4 min; D8= inhalación de PK10453 de 8 min; n=4 en cada grupo; *p<0,001; **p<0,01; §p<0,05 frente a V.

Tabla 3

Grupo	Sel.	FC (bpm)	PSF (mm Hg)	PDF (mm Hg)	VSF (μ l)	VDF (μ l)	VS (μ l)	RC (ml/min)	FE	SW
V	Media	290	83,21	10,31	484,17	621,32	137,15	39,03	25,43	10123
	EEM	25	3,49	1,24	148,32	139,49	14,19	0,62	8,36	2698
D4	Media	288	43,20*	2,62§	144,14	408,95	264,81	77,59	65,4**	9818
	EEM	21	6,08	0,30	25,89	34,94	12,66	2,59	3,47	769
D8	Media	315	38,44*	4,87	155,40	488,68	333,28**	105,1**	67,1**	5481
	EEM	41	1,43	1,86	22,69	52,00	49,81	15,51	4,59	1829

5 Efecto de PK10453 (Estructura 2) en la hipertrofia del VD. El tratamiento con PK10453 dio por resultado una disminución significativa en la hipertrofia de VD en el modelo MCT+PNMCT+PN de rata. Véase la FIG. 7B. La relación (VD+SIV)/VI en el grupo de vehículo (n=11) fue $0,88\pm 0,05$, en el grupo de PK10453 D4 (n=13) fue $0,62\pm 0,04$, y en el grupo de PK10453 D8 (n=7) fue $0,68\pm 0,05$ ($p<0,001$ D4 frente a V; $p=0,012$ D8 frente a V).

10 Análisis de la histología y morfología de la arteriola pulmonar. La relación de área de lumen a área de la media (L/M) fue significativamente mayor en grupo D8 tratado con PK10453 (Estructura 2) en comparación con los grupos D4 y de vehículo: D8 (n=5) L/M $0,72\pm 0,05$, D4 (n=6) L/M $0,33\pm 0,06$, y el vehículo de control V (n=6): $0,26\pm 0,04$ ($p<0,0001$ D8 frente a V o D8 frente a D4). Véase la FIG. 7C. El análisis de oclusión se realizó en las mismas muestras animales usadas para las medidas de relación lumen/media. El análisis de oclusión demostró una reducción significativa en las lesiones de oclusión de Grado 2 en el grupo de tratamiento D8 de PK10453 (V (n=6) $41,5\pm 7,1\%$, D4 (n=6) $28,5\pm 4,2\%$; D8 $11,4\pm 4,1\%$; $p<0,01$ D8 frente a V; véase la FIG. 7D. Las FIGs. 8A-D ilustran el efecto de PK10453 (Estructura 2) en lesiones neointimas en el modelo MCT+PN de rata por medio de imágenes microscópicas 40X de hipertrofia de la arteriola pulmonar y proliferación celular intraluminal de especímenes tratados con PK10453. La FIG. 8A muestra una tinción de H&E de una lesión oclusiva (Grado 2) en un animal tratado con vehículo (modelo MCT+PN); se hace la comparación con un vaso de Grado 0 de un animal tratado con PK10453 (D8). Véase la FIG. 8B. Un ejemplo de una lesión de Grado 2 teñida para fosfo-PDGFRbeta se muestra en la FIG. 8C en comparación con una lesión de Grado 0 de un animal tratado con PK10453 (D8) (modelo MCT+PN) en la FIG. 8D. La tinción para fosfoPDGFRbeta mostró una señal intensa en un patrón de adoquinado en lesiones de Grado 2.

25 Ejemplos adicionales de hipertrofia de la arteriola pulmonar y lesiones proliferativas celulares intraluminales se muestran como se describe, mientras el análisis cuantitativo está representado en la FIG. 9. Las FIGs. 10A y 10B representan una evaluación inmunohistoquímica de las muestras MCT+PN. La relación de área de lumen a área de media (L/M) fue significativamente mayor en los grupos tratados con PK10453 en comparación con el vehículo, donde la mayor dosis, D8 (n=4) L/M $1,17\pm 0,07$, la menor dosis, D4 L/M $0,75\pm 0,14$, y el vehículo de control V (n=6): $0,36\pm 0,09$ ($p=0,032$ D4 frente a V; $p=0,00014$ D8 frente a V; $p=0,028$ D8 frente a D4). El marcador de célula endotelial, vWF, mostró la señal predominantemente en las arteriolas pulmonares. El anticuerpo tirosina705 fosfoSTAT3 mostró la localización de pSTAT3 a los núcleos de células endoteliales y células perivasculares. Véase las FIGs. 10A; y la FIG. 10B (con tratamiento de PK10453).

30 Tinción tricrómica e inmunohistoquímica para alfa-actina de CML, y vWf. El marcador de células endoteliales, vWF, mostró señal predominantemente en las arteriolas pulmonares. Se realizaron una inmunohistoquímica para CMLs vasculares (α -actina de CML), marcadores de células endoteliales (vWF) y tinciones tricrómicas de arteriolas pulmonares en el MCT+PN de rata para caracterizar adicionalmente las lesiones de Grado 0, 1 y 2. Las lesiones de Grado 0 se caracterizaron por la proliferación neointima (intraluminal) temprana de células endoteliales (CEs) con conservación de CMLs vasculares en la media; las lesiones de Grado 1-2, por proliferación/invasión neointima (intraluminal) de células tipo miofibroblastos mezcladas (MFs) y CEs con pérdida parcial de células musculares lisas vasculares en la capa media; y las lesiones de Grado 2 avanzadas, por proliferación intraluminal MF/CE extensa con pérdida completa de células de MLV en la capa media y sustitución fibrótica de la media. Las FIGs. 11A-11I se refieren a animales tratados con vehículo (modelo MCT+PN) a 40X para α -actina de CML teñida inmunohistoquímicamente, tinciones tricrómica y de vWF, que mostraron una población mixta de células endoteliales y de miofibroblastos que comprende las lesiones neointima y proliferativas en arteriolas pulmonares en lesiones de Grado 0, 1 y 2: las lesiones de Grado 0 se caracterizaron por la proliferación temprana de células endoteliales intraluminales, y la presencia de células musculares lisas vasculares en la media (FIG. 11A, tinción de α CML; FIG. 11D, tricromo; FIG. 11G, vWF). Las lesiones de grado 1-2 tenían células tipo miofibroblastos intraluminales extensas, algunas células endoteliales, y fibrosis parcial de la capa media (FIG. 11B, α CML; FIG. 11E, tricromo; FIG. 11H, vWF). Las lesiones de Grado 2 avanzadas se caracterizaron por la proliferación de células tipo miofibroblastos intraluminales extensas y endoteliales y la completa sustitución fibrótica de la capa media (FIG. 11C, α CML; FIG.

11F, tricromo; FIG. 11I vWF). La flecha larga apunta al espacio intraluminal con lesiones proliferativas, y la flecha corta apunta a la capa media de las arteriolas pulmonares.

Ejemplo 5 – Inmunohistoquímica para la señalización de PDGF

5 En las arteriolas pulmonares pre-capilares la señalización a través de la ruta de PDGFR- β fue dominante. La señal para el ligando de PDGFAA y PDGFR- α estuvieron presentes pero fueron cualitativamente menores que la señal para PDGFBB y PDGFR- β . El PDGFR- β fosforilado (pPDGFR- β) tenía una apariencia de adoquinado en las células neoíntimas y en las células perivasculares y era más fuerte que la señal para el fosfo-PDGFR- α (PDGFR- α) en las arteriolas pulmonares precapilares. La señal mínima para pPDGFR- β o alfa se detectó en las capas medias de las arteriolas pulmonares pre-capilares. Las FIGs. 12A-12F muestran la señalización de PDGFR 40X en el modelo MCT+PN de rata. Las FIGs. 12A-12F muestran PDGFAA en una arteriola pulmonar (A); PDGFBB (B); PDGFR α total (C); PDGFR β total (D); fosfoPDGFR α (pPDGFR α ; E); y pPDGFR β (F). La intensidad de la señal fue mayor para PDGFBB, PDGFR β , y especialmente pPDGFR β en comparación con PDGFAA, PDGFR α y pPDGFR α . La señal de pPDGFR β fue intensa en un patrón de adoquinado en lesiones proliferativas neoíntima y perivasculares. La intensidad de la señal fue relativamente baja en la capa media del vaso. Las flechas apuntan a lúmenes de vasos con lesiones proliferativas (las diapositivas son del tratamiento de vehículo). En los vasos mayores (>50 μ m), la señal para pPDGFR- α estaba presente en células de MLV medias. En contraste, la señal de la capa media de pPDGFR β fue baja. Las FIGs. 13A-13D muestran una comparación de pPDGFR α y pPDGFR β en arteriolas pulmonares mayores que usa el sistema de modelo MCT+PN de rata.

Ejemplo 6 – Inmunoensayos NanoPro™ y electroinmunotransferencias (Western blot)

20 Los inmunoensayos NanoPro™ para pAKT/AKT se muestran en las FIGs. 14A-F y para pSTAT3/STAT3 se muestran en las FIGs. 15A-15C. Hubo una reducción significativa en la relación de pSTAT3/STAT3 en los grupos tanto D4 como D8 en comparación con el vehículo. Las FIGs. 16A-16H muestran los resultados de experimentos que usan los lumogramas del Inmunoensayo NanoPro™ para fosfoERK1/2 (pERK1/2) y ERK1/2 total en el modelo MCT+PN. Las FIGs. 16A-16H muestran los efectos de PK10453 (Estructura 2) inhalado en ppERK1/ERK1, pERK1/ERK1, ppERK2/ERK2 y pERK2/ERK2 en homogeneizados de pulmón. Hubo reducciones significativas en ppERK1/ERK1 y pERK1/ERK1 en los grupos D4 y D8, respectivamente, en comparación con el vehículo.

Ejemplo 7 – PDGFAA estimula PDGFR- α , mientras que PDGFBB se une y activa PDGFR- β .

30 Las FIGs. 17A-17D son representaciones gráficas que muestran el efecto de imatinib, PK10453 (Estructura 2) y PK10571 (Estructura 2a) en la fosforilación estimulada por PDGFAA frente a PDGFBB de ERK1 y ERK2 en fibroblastos de pulmón fetal humano. La relación de ERK1 difosforilado a ERK1 total (ppERK1/ERK1) se aumentó con la estimulación de PDGFAA o PDGFBB, y disminuyó significativamente a la concentración de 1 μ M y 10 μ M de imatinib, PK10453 y PK10571. La relación de ERK2 difosforilado a ERK2 total (ppERK2/ERK2) se aumentó con la estimulación de PDGFAA o PDGFBB (10 ng/ml), y disminuyó significativamente a la concentración de 1 μ M y 10 μ M de imatinib, PK10453 y PK10571. Después de la estimulación de PDGF BB, la relación de ERK1 difosforilado a ERK1 total (ppERK1/ERK1) y ERK2 difosforilado a ERK2 total (ppERK2/ERK2) se disminuyó de forma más efectiva a 1 μ M de PK10453 y PK10571 en comparación con imatinib. Por consiguiente, PK10453 y PK10571 son inhibidores más potentes de la fosforilación de ERK1 y ERK2 estimulados por PDGF BB en comparación con imatinib.

40 En particular, y con referencia a la FIG. 17A-17D como se anota anteriormente, la estimulación de PDGFAA y PDGFBB (10 ng/ml) de los fibroblastos de pulmón fetal humano aumentó ppERK1/ERK1 y ppERK2/ERK en comparación con controles solo medio libre de suero (LS). Imatinib, PK10453 (Estructura 2) y PK10571 (Estructura 2a) fueron igualmente efectivos a 1 μ M en la disminución de la formación de ppERK1 y ppERK2 estimulada por PDGF AA (FIG. 17A y 17C). Sin embargo, PK10453 y PK10571 fueron más efectivos a 1 μ M y 10 μ M en la disminución de ppERK1 y ppERK2 estimulada por PDGF BB (FIG. 17B y 17D). Estos datos demuestran que PK10453 y PK10571 son más efectivos en el bloqueo de la señal de transducción a través del receptor beta de PDGF en comparación con el imatinib. Los datos mostrados son media \pm EEM. El efecto diferencial de PK10453 y PK10571 fue más destacado en el bloqueo de la fosforilación de ERK1 frente a ERK2. A 1 μ M el imatinib no tuvo efecto en la inhibición de la formación de ppERK1 mientras que PK10453 y PK10571 a 1 μ M fueron efectivos en la disminución de la formación de ppERK1 estimulada por PDGFBB. PK10453= estructura 2; PK10571= estructura 2a. Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas alfa = PDGFR-alfa= PDGFR- α = receptor de PDGF alfa= receptor alfa de PDGF. Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas beta= PDGFR-beta= PDGFR- β = receptor de PDGF beta = receptor beta de PDGF.

Ejemplo 8 – PK10453 (Estructura 2), PK10467 (Estructura 3), PK10468 (Estructura 4), PK10569 (Estructura 5) y PK10571 (Estructura 2a) poseen menores concentraciones CI_{50} en comparación con imatinib para inhibir la fosforilación de AKT estimulada por PDGFBB en los fibroblastos.

55 Los fibroblastos de pulmón humano fetal cultivados en cultivo celular se usan como un modelo de proliferación de fibroblastos que se da en la hipertensión arterial pulmonar, fibrosis pulmonar, y trastornos relacionados. Las FIGs. 18A-18D son representaciones gráficas de compuestos PK: PK10453 (Estructura 2), PK10467 (Estructura 3), PK10468 (Estructura 4), PK10569 (Estructura 5) y PK10571 (Estructura 2a), que muestran que todos los

compuestos PK poseían menores concentraciones CI_{50} en comparación con imatinib para inhibir la fosforilación de AKT estimulada por PDGFβ en fibroblastos de pulmón humano fetal. Estos datos resaltan que PK10453, PK10467, PK10468, PK10569 y PK10571 son inhibidores más potentes de la señal de transducción mediada a través del receptor beta de PDGF en comparación con imatinib. Estos datos muestran la importancia de la inhibición efectiva de la señalización del receptor beta de PDGF además de la señalización del receptor alfa de PDGF como un tratamiento para la hipertensión arterial pulmonar, fibrosis pulmonar, y trastornos relacionados que puede alcanzarse con PK10453, PK10467, PK10468, PK10569 y PK10571. Como se usa anteriormente y a lo largo de esta solicitud, los compuestos PK y designaciones de estructura se usan de forma intercambiable, como sigue: PK10453 = Estructura 2; PK10571 = Estructura 2a; PK10467 = Estructura 3; PK10468 = Estructura 4; y PK10569 = Estructura 5.

- 5
- 10 Ejemplo 9 – Pesos corporales, PS sistémica y estudios de pletismografía

En comparación con el vehículo, había una tendencia a una velocidad más lenta de disminución en el peso corporal en los grupos tratados frente a vehículo. Véase la FIG. 19. En el día siete del tratamiento, la PS sistólica fue 111 ± 21 mm de Hg en el grupo de vehículo de MCT (n=3) en comparación con 131 ± 10 mm de Hg en el grupo PK10453 de MCT (n=3), como se muestra en la FIG. 20. Se midió la pletismografía de dos cámaras en el día 1 y el día 15 de la administración de PK10453/vehículo en el modelo MCT+PNMCT+PN de rata. Los resultados se muestran en la Tabla 4. El tratamiento con PK10453 se asoció con una disminución más lenta en la ventilación por minuto (VM), y una mejora significativa en el flujo inspiratorio pico (FIP) y el flujo espiratorio pico (FEP) en el grupo de exposición de 4 min (D4) en comparación con el vehículo.

- 15

Tabla 4

Grupo de fármaco	Día 1							Día 15					
	FIP	FEP	VC (ml)	VM (ml/min)	f	SRaw	FIP	FEP	VC	VM	f	SRaw	
V (n=6)	Media	8,81	9,68	0,86	193,66	244,79	40,37	4,97	5,86	0,52	107,59	214,43	38,93
	EEM	0,79	0,98	0,14	20,66	28,02	4,11	0,39	0,44	0,07	9,58	13,83	6,53
D4 (n=5)	Media	9,82	11,04	1,00	223,24	224,68	39,73	7,82*	9,33*	0,85	176,12§	217,12	33,09
	EEM	0,70	0,56	0,07	11,99	9,87	3,33	0,34	0,67	0,12	14,53	18,64	4,80
D8 (n=5)	Media	8,54	9,43	0,74	174,68	259,13	36,01	6,06	6,64	0,63	128,49	232,11	49,26
	EEM	0,72	1,01	0,15	22,32	26,42	3,82	0,84	0,99	0,16	19,47	30,71	7,11

Abreviaturas: FIP: flujo inspiratorio pico; FEP: flujo espiratorio pico; VC: volumen corriente; VM: ventilación por minuto; f: frecuencia de respiración (respiraciones por minuto); SRaw: resistencia de las vías aéreas *p<0,01 D4 frente a V; §p=0,02 D4 frente a V.

- 20 Ejemplo 10 – Discusión y casos aplicados

La ruta de señalización de PDGF se ha encontrado que está activa en la hipertensión arterial pulmonar humana (HAP) y en modelos animales de la enfermedad. Este estudio probó la hipótesis de que un nuevo inhibidor de receptor de PDGF inhalado no selectivo, PK10453 (Estructura 2), podría disminuir la hipertensión pulmonar tanto en el modelo de monocrotalina (MCT) de rata como en el modelo de MCT más neumonectomía (+PN) de rata de HAP. El PK10453 distribuido por inhalación, para exposiciones de cuatro (D4) y ocho (D8) min tres veces al día durante dos semanas, disminuyó la presión sistólica ventricular derecha (PSVD) en los modelos tanto MCT de rata como MCT+PN de rata: grupo MCT de vehículo (n=6) la PSVD fue $80,4 \pm 2,6$ mm de Hg; en el grupo MCT D4 (n=6), $44,4 \pm 5,8$ mm de Hg; y en el grupo MCT D8 (n=5), $37,1 \pm 4,5$ mm de Hg (p<0,001 frente a vehículo); en el grupo MCT+PN de vehículo (n=9) la PSVD fue $75,7 \pm 7,1$ mm de Hg; en el grupo MCT+PN D4 (n=10), $40,4 \pm 2,7$ mm de Hg, y en el grupo MCT+PN D8 (n=8), $43,0 \pm 3,0$ mm de Hg (p<0,001). En el modelo MCT+PN de rata, la telemetría continua que monitoriza las presiones de la arteria pulmonar también demostró que PK10453 prevenía la progresión de HAP. El imatinib dado por inhalación fue igualmente efectivo en el modelo MCT, pero no fue efectivo en el modelo MCT+PN.

- 25
- 30

La inmunohistoquímica demostró la activación aumentada del receptor de PDGFβ en comparación con el receptor de PDGFα en lesiones neointimas y perivasculares encontradas en el modelo MCT+PN. Se mostró que el imatinib es selectivo para el receptor de PDGFα mientras que PK10453 tenía una menor CI_{50} para la inhibición de actividad quinasa de los receptores tanto de PDGFα como de PDGFβ en comparación con imatinib. PK10453 disminuyó la relación de AKT (Ser473) fosforilado a AKT total, STAT3 (Y705) fosforilado a STAT3 total, la relación de ERK1

- 35

difosforilado a ERK1 total y la relación de ERK1 monofosforilado a ERK1 total en extractos de pulmón de animales MCT+PN. En resumen, PK10453, cuando se distribuyó por inhalación, disminuyó significativamente la progresión de HAP en los modelos MCT y MCT+PN de rata. La inhibición no selectiva de los receptores tanto de PDGF α como PDGF β tiene por lo tanto una ventaja terapéutica sobre la inhibición selectiva de PDGFR α al menos en HAP y enfermedades relacionadas.

Por consiguiente, y por primera vez, se ha mostrado que un nuevo inhibidor del receptor de PDGF no selectivo, PK10453 (Estructura 2), cuando se administra por inhalación, disminuyó la gravedad de HAP en dos modelos animales de la enfermedad: el MCT de rata, y el modelo MCT+PN de rata. Por tanto, porque PK10453 es altamente potente frente a los receptores tanto de PDGFR α como PDGFR β , mientras que imatinib es selectivo para el receptor PDGFR α , PK10453 posee sorprendentemente una eficacia superior. Tanto PK10453 como imatinib fueron efectivos en el modelo MCT de rata, pero solo PK10453 disminuyó la hipertensión pulmonar en el modelo MCT+PN de rata cuando se administró por inhalación. Una razón para este efecto diferencial puede deberse a la hiper-activación de la señalización a través del receptor PDGFR β en lesiones neointimas de la arteriola pulmonar precapilar en comparación con el receptor PDGFR α en el modelo MCT+PN de rata.

Por consiguiente, los actuales datos demuestran que un nuevo inhibidor del receptor de PDGF, no selectivo, PK10453 (Estructura 2) cuando se distribuye por inhalación previno la progresión de HAP en los modelos tanto MCT de rata como MCT+PN de rata. Digno de mención, este es el primer estudio en presentar la eficacia de la inhibición del receptor de PDGF en el modelo MCT+PN de rata. Una reducción sostenida en la presión AP se encontró también en animales con HAP (MCT+PN) ambulatorios tratados con PK10453.

Simultáneo con una reducción significativa de presión sistólica AP y VD en estos modelos, se demostraron una reducción en la hipertrofia del VD y una mejora en la relación de lumen a media de arteriolas pulmonares. Los bucles de volumen de presión presentaron una mejora en la fracción de eyección del VD, un rendimiento cardíaco superior, y una tendencia hacia un volumen sistólico menor en animales tratados con PK10453 en comparación con los animales de control. En extractos de pulmón de animales tratados con PK10453, hubo una reducción significativa en las relaciones pAKT(Ser473)/AKT, pSTAT3/STAT3, pPERK1/ERK1 y pERK1/ERK1.

Porque HAP es una enfermedad esencialmente localizada en el pulmón, se probó la hipótesis de que la administración directa del fármaco al sitio objetivo por medio de inhalación ofrecería la ventaja de mayores concentraciones locales (mayor eficacia) y menores concentraciones sistémicas de fármaco (menores efectos secundarios). Los estudios farmacocinéticos demostraron una ventaja de 45 veces de distribución por inhalación en comparación con la administración intravenosa de PK10453 (Estructura 2). Mientras PK10453 disminuyó la presión sistólica del VD al 50% en el modelo MCT de rata, no tuvo un efecto adverso en la PS sistémica. Adicionalmente, el PK10453 inhalado no afectó de forma adversa a la función pulmonar durante un tratamiento de 2 semanas.

En el modelo MCT de rata el presente inventor comparó la PK10453 inhalada con imatinib inhalado y encontró que ambos eran igualmente efectivos. Estos resultados son consecuentes con informes anteriores de que el inhibidor del receptor de PDGF imatinib, cuando se distribuyó de forma sistémica, disminuyó la hipertensión pulmonar en el modelo MCT de rata. Véase Schermuly *et al.*, "Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition". *J Clin Invest* 115:2811-21 (2005). Sin embargo, en el modelo MCT+PN de rata mientras que el PK10453 inhalado era efectivo en la disminución de las presiones pulmonares, el imatinib inhalado no lo era. El modelo MCT+PN de rata es un modelo más agresivo de HAP en comparación con el modelo solo MCT, y puede reflejar de forma más exacta la patología de la enfermedad humana. White *et al.*, "Plexiform-like lesions and increased tissue factor expression in a rat model of severe pulmonary arterial hypertension", *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 293:L583-90 (2007). La medida *in vitro* de CI₅₀ para la inhibición de receptores de PDGF- α y - β mostró que PK10453 era más potente que imatinib frente a ambas isoformas, y que el imatinib es solo un modesto inhibidor de la isoforma PDGFR β . La inmunohistoquímica demostró que las lesiones neointimas en el modelo MCT+PN de rata tienen altos niveles de fosfoPDGFR β , con menos pPDGFR α . Estos descubrimientos explican por qué la inhibición no selectiva tanto de PDGFR β como de PDGFR α proporcionaron una ventaja terapéutica sobre la inhibición selectiva de PDGFR α .

Los actuales datos son consecuentes con Panzhinskiy *et al.*, "Hypoxia induces unique proliferative response in adventitial fibroblasts by activating PDGFbeta receptor m-JNK1 signaling". *Cardiovasc Res*; 95:356-65 (2012), para el modelo de ternera neonatal de hipertensión pulmonar inducida por la altitud. En ese modelo la proliferación perivascular extensa de fibroblastos adventiciales se demostró junto con la activación de pPDGR β . Estas lesiones son similares al patrón observado en el modelo MCT+PN de rata para los actuales estudios. Estos descubrimientos son también consecuentes con los presentados para la HAP humana. Perros *et al.*, "Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension". *Am J Respir Crit Care Med*; 178:81-8 (2008), que describe la distribución de PDGFA, PDGFB, PDGFR α , PDGFR β y pPDGFR β en las lesiones de las arterias pulmonares de pacientes con HAP. Se encontró la expresión de PDGFR α principalmente en la capa media muscular de las arteriolas pulmonares hipertrofiadas, mientras PDGFR β y pPDGFR β fueron dominantes en las células endoteliales de lesiones plexiformes.

La selectividad de imatinib por PDGFR α no se ha enfatizado anteriormente en los estudios de HAP. La inhibición mediante imatinib de la fosforilación de PDGFR α estimulada por PDGFAA se presentó que era 0,1 pM, mientras la

inhibición de la fosforilación de PDGFR β estimulada por DPGFBB a 0,38 μ M. Véase, por ejemplo, Deininger *et al.*, "The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia". *Blood*; 105:2640-53 (2005). Aquí, sin embargo, se determinó que, a [ATP]Km(app), imatinib era 10 veces más selectivo para PDGFR α en comparación con el receptor β (CI₅₀ contra PDGFR α 71 nM frente a 607 nM para PDGFR β). La mayoría de estudios basados en células relacionadas con HAP que examinan la ruta de PDGFR emplearon altas dosis de imatinib (5-10 μ M) y por consiguiente descartan la distinción entre la inhibición del receptor PDGFR α y β .

Wu *et al.*, "Comprehensive dissection of PDGF-PDGFR signaling pathways in PDGFR genetically defined cells". *PLoS One*; 3:e3794 (2008), examinó la señalización de PDGFR en fibroblastos embrionarios de ratón (FERs) definidos genéticamente. Los FERs se trataron por ingeniería genética para expresar solo PDGFR α , PDGFR β , ambos receptores o ninguno. La señalización a través del receptor PDGFR α y el receptor PDGFR β se encontró que tenían rutas tanto compartidas como distintas. Treinta y tres conjuntos de genes se activaron claramente mediante PDGFR α y β mediante PDGFR β . Los heterodímeros PDGFR α/β activaron componentes de la señalización de NF κ B e IL-6. Las rutas de flujo de calcio se regularon tanto por PDGFR α como por PDGFR β . La señalización implicada con la angiogénesis se reguló solamente por medio de la ruta de PDGFR β . Este descubrimiento coincide con el aumento selectivo en fosfoPDGFR β encontrado con las lesiones neointimas de las arteriolas pulmonares pre-capilares usando el modelo MCT+PN.

Se ha encontrado que PDGFBB induce la fosforilación de AKT en Ser473 en las células musculares lisas de la arteria pulmonar y los fibroblastos, aunque no las células endoteliales arteriales pulmonares. Véase Ogawa *et al.*, "PDGF enhances store-operated Ca²⁺ entry by upregulating STIM1/Orai1 via activation of Akt/mTOR in human pulmonary arterial smooth muscle cells". *Am J Physiol Cell Physiol*; 302:C405-11 (2012). La fosforilación aumentada de AKT (Ser473) se encontró también en células con un fenotipo de músculo liso procedentes de endarterectomías de pacientes con hipertensión arterial pulmonar tromboembólica crónica. Véase Ogawa *et al.*, "Inhibition of mTOR attenuates store-operated Ca²⁺ entry in cells from endarterectomized tissues of patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 297:L666-76 (2009). La estimulación de PDGFBB aumentó la entrada de calcio operada por almacenamiento por medio de la ruta AKT/mTOR en estas células. Véase *id.*

En las células de músculo liso de la arteria pulmonar de las ratas de control y tratadas con monocrotalina, sin embargo, el imatinib (0,1 μ M) disminuyó la fosforilación de AKT Ser473 estimulada por suero de ternera fetal, pero no tuvo efecto en la fosforilación de AKT en Thr30825. A esta concentración es probable que el imatinib estuviera actuando por medio del receptor de PDGF α . Wu *et al.* (2008) encontró que STI-571 (imatinib) a 5 μ M bloqueó la fosforilación de AKT estimulada por PDGFBB (SER473) en líneas celulares tanto nulas de PDGFR β como nulas de PDGFR α . La presente invención incluyó un ICW para examinar la estimulación de PDGFAA y PDGFBB de la fosforilación de AKT (Ser473) y AKT (Thr308) en fibroblastos de pulmón humano fetal. La inhibición por imatinib se comparó con la inhibición de PK10453 de la fosforilación de AKT estimulada por PDGFAA o PDGFBB, y se encontró que PK10453 era más potente.

Los inmunoensayos proteómicos nano-fluídicos, además, se emplearon para cuantificar las especies fosforiladas de AKT, STAT3 y ERK1/2 en extractos de pulmón de animales MCT+PN. Se encontró una reducción significativa de fosfo-AKT (Ser473), fosfo-STAT3 y ppERK1/ERK y pERK1/ERK1 en los grupos tratados con PK10453 cuando se comparó con el vehículo. Schermuly *et al.* (2008) demostraron una reducción en pERK1/2 mediante imatinib en el modelo MCT de rata de la HAP. Jasmin *et al.*, "Short-term administration of a cell-permeable caveolin-1 peptide prevents the development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy". *Circulation*; 114:912-20 (2006), han mostrado la activación de STAT3 en el modelo MCT de rata, y Masri *et al.*, "Hyperproliferative apoptosis-resistant endothelial cells in idiopathic pulmonary arterial hypertension". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 293:L548-54 (2007), encontraron que STAT3 se activó en la HAP idiopática humana. Los inmunoensayos proteómicos nanofluídicos de la presente invención se usaron anteriormente para examinar los efectos del imatinib en pSTAT3 y pERK1/2 en leucemia mielógena crónica (LMC). Véase Fan *et al.*, "Nanofluidic proteomic assay for serial analysis of oncoprotein activation in clinical specimens". *Nature medicine*; 15:566-71 (2009). Este ensayo tiene utilidad en la distinción de isoformas monofosforiladas e isoformas difosforiladas de las proteínas. Por ejemplo, los pacientes con LMC que respondieron al imatinib tenían una reducción distinta en los niveles de ERK214 monofosforilado. Aquí, la isoforma ERK1 y tanto la forma difosforilada de ERK1 y la forma monofosforilada de ERK1 predominaron en los pulmones de las ratas neumectomizadas MCT. El tratamiento con PK10453 disminuyó significativamente ppERK1/ERK y pERK1/ERK1.

Los análisis de oclusión se realizaron de acuerdo con el método de Homma *et al.*, "Involvement of RhoA/Rho kinase signaling in protection against monocrotaline-induced pulmonary hypertension in pneumectomized rats by dehydroepiandrosterone". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 295:L71-8 (2008). En el modelo MCT+PN de rata, la mayor dosis de PK10453 inhalada estaba asociada con menos lesiones oclusivas de Grado 2. Estas lesiones se caracterizaron entonces mediante inmunohistoquímica con marcadores para células de músculo liso vascular, y células endoteliales, y se realizaron tinciones tricrómicas para diferenciar las lesiones musculares de las fibróticas. Se determinó que las lesiones de grado 1-2 proliferativas neointimas contenían miofibroblastos y células endoteliales. En las lesiones de grado 2 avanzadas había sustitución fibrótica de la media del vaso. El origen de los miofibroblastos en estas lesiones no está totalmente claro. Podrían originarse a partir de la infiltración de fibroblastos

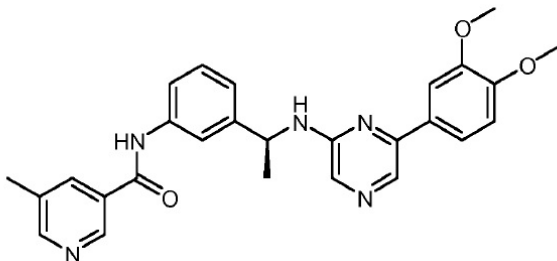
peri-vasculares o pericitos, a partir de células madre circulantes, células progenitoras residentes, o como consecuencia de la transición endotelial-mesenquimal. Véase Yeager *et al.*, "Progenitor cells in pulmonary vascular remodeling". *Pulm Circ*; 1:3-16 (2011). Aunque estas lesiones se detectaron, es razonable proponer que la lesión tipo 1 es una lesión en etapas tempranas que puede progresar a tipo 2 y tipo 3. En este modelo, las células endoteliales intraluminales proliferan, de transición a un fenotipo de miofibroblasto (y/o el lumen se infiltra por células perivasculares/miofibroblastos) y progresivamente ocluyen el lumen del vaso.

Sakao *et al.*, "Reversible or irreversible remodeling in pulmonary arterial hypertension", *Am J Respir Cell Mol Biol*; 43:629-34 (2010), han resaltado la importancia de distinguir la regresión de la muscularización vascular (remodelado inverso) de la proliferación de células endoteliales potencialmente irreversible en HAP. Los datos presentados aquí muestran que la señalización a través de la ruta de PDGFR α juega un papel importante en el remodelado vascular de las arteriolas pulmonares más grandes en HAP, mientras la ruta de PDGFR β es más importante en las lesiones neointimas proliferativas de las arteriolas pulmonares pre-capilares. Marcar como objetivo la ruta de PDGFR β con un inhibidor de PDGFR que bloquee potencialmente esta isoforma (de forma más potente que el imatinib) puede influir en la progresión de estas lesiones. Si dichas lesiones se tratan por lo tanto antes de la sustitución fibrótica total y la regresión de los vasos puede existir la reversibilidad de estas lesiones.

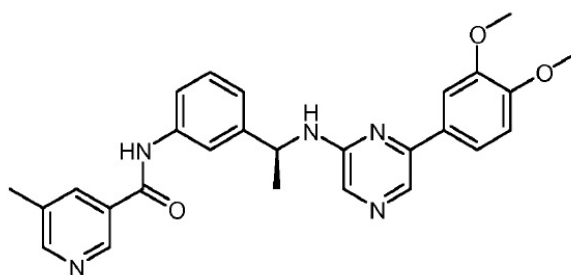
En conclusión, un inhibidor del receptor de PDGF no selectivo, inhalado, PK10453 (Estructura 2), fue efectivo en los modelos de rata tanto MCT como MCT+PN de HAP. El tratamiento con PK10453 se asoció con una reducción significativa en las presiones arteriales pulmonares en animales ambulatorios, una mejora en la función ventricular derecha, y una reducción en la hipertrofia del VD. El análisis histológico demostró una mejora en la relación de lumen a media de la arteriola pulmonar en animales tratados con PK10453 y una disminución en el estado de fosforilación de AKT (Ser473), STAT3 y ERK1. No hubo un efecto significativo de PK10453 (Estructura 2) en la presión sanguínea sistémica, y ningún efecto adverso de PK10453 en la función pulmonar. En contraste con imatinib, PK10453 no es selectivo para el receptor PDGFR α , pero sin embargo es altamente potente contra las isoformas tanto PDGFR α como β . Porque la ruta de PDGFR β está más altamente activada que el receptor PDGFR α en las lesiones plexiformes de HAP, un inhibidor de PDGFR no selectivo, por ejemplo, PK10453, posee por consiguiente eficacia frente a HAP y enfermedades relacionadas y rutas de la enfermedad.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usar en el tratamiento de un trastorno pulmonar, en donde el compuesto es de la fórmula:



- 5 2. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usar según la reivindicación 1, en donde el trastorno pulmonar está asociado con la inflamación.
3. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usar según la reivindicación 1, en donde el trastorno pulmonar está asociado con la función cardiovascular.
- 10 4. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usar según la reivindicación 1, en donde el trastorno pulmonar es hipertensión pulmonar.
5. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usar según la reivindicación 1, en donde el trastorno pulmonar es hipertensión arterial pulmonar.
6. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usar según la reivindicación 1, en donde el trastorno pulmonar es hipertensión pulmonar asociada con enfermedad pulmonar intersticial.
- 15 7. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usar según la reivindicación 1, en donde el trastorno pulmonar es fibrosis pulmonar.
8. El compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usar según la reivindicación 1, en donde el compuesto inhibe un receptor de tirosina quinasa.
- 20 9. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usar según la reivindicación 8, en donde la inhibición del receptor de tirosina quinasa da por resultado la activación disminuida de AKT.
10. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usar según la reivindicación 8, en donde el receptor de tirosina quinasa es c-Kit.
11. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usar según la reivindicación 8, en donde el receptor de tirosina quinasa es un receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas.
- 25 12. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el compuesto se formula para la administración en una cantidad de 0,01 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal del sujeto.
- 30 13. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el compuesto se formula para proporcionar una C_{max} de 1 a 5000 ng/mL del compuesto en el plasma de un sujeto después de la administración al sujeto.
14. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el compuesto se formula para la administración por inhalación.
15. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el compuesto se formula para la administración oral.
- 35 16. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde el compuesto se formula para la administración como un polvo seco.
17. Un compuesto de la fórmula:



O una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

FIG. 1A

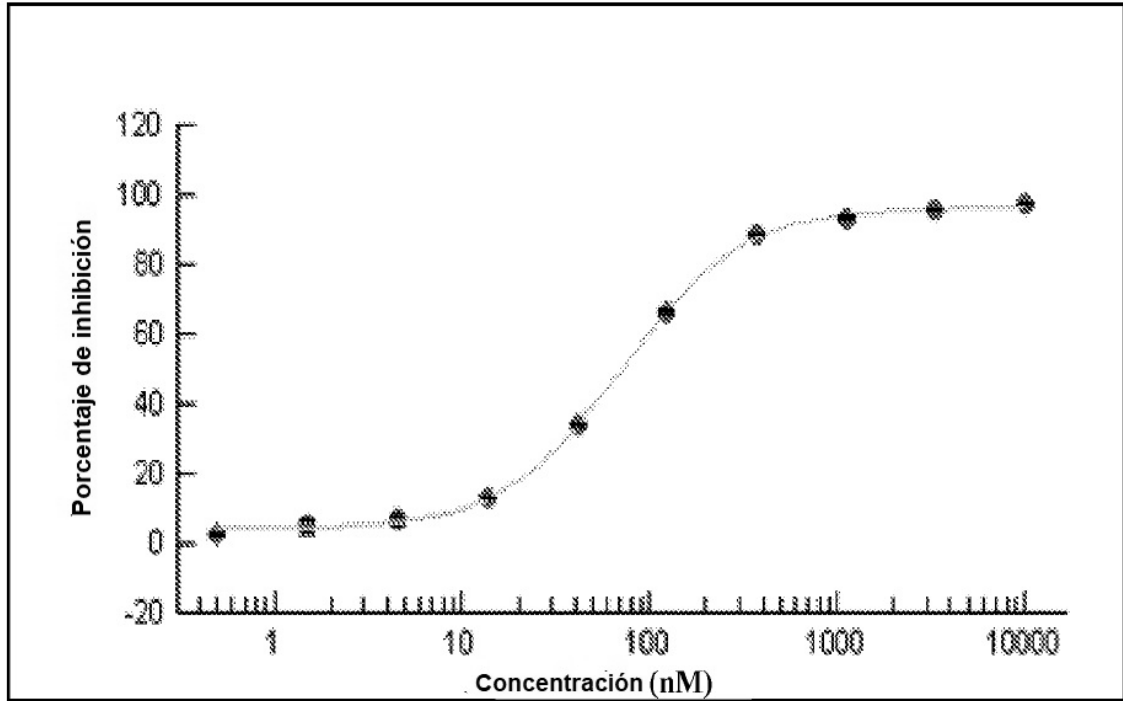


FIG. 1B

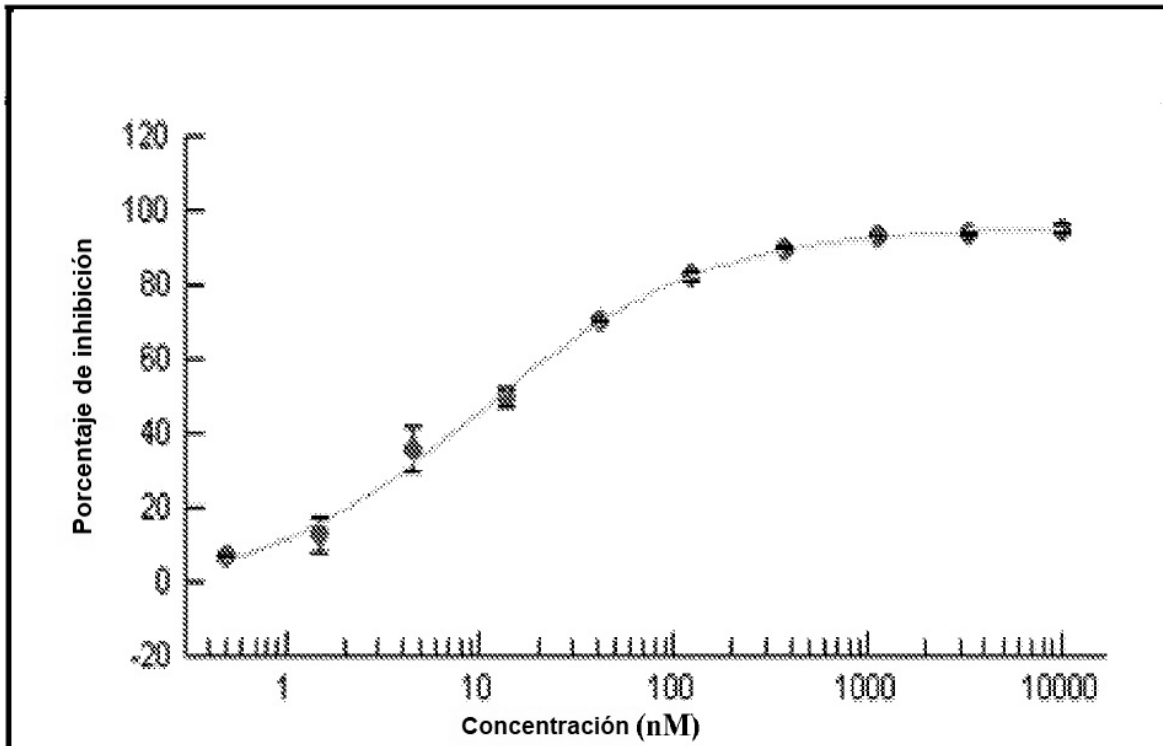


FIG. 1C

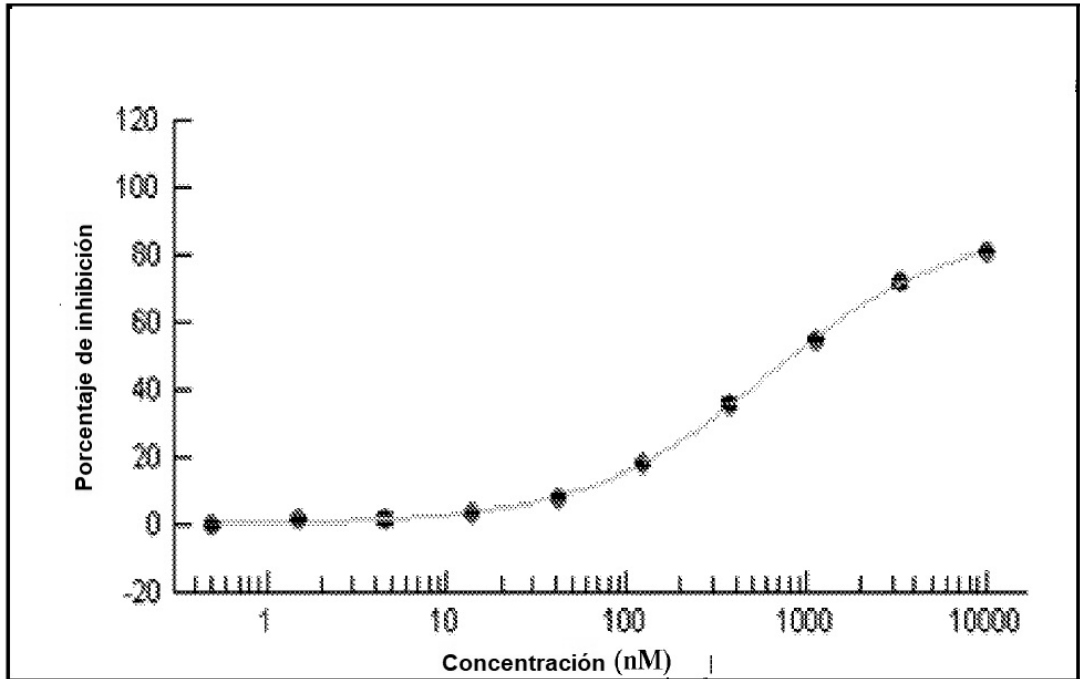
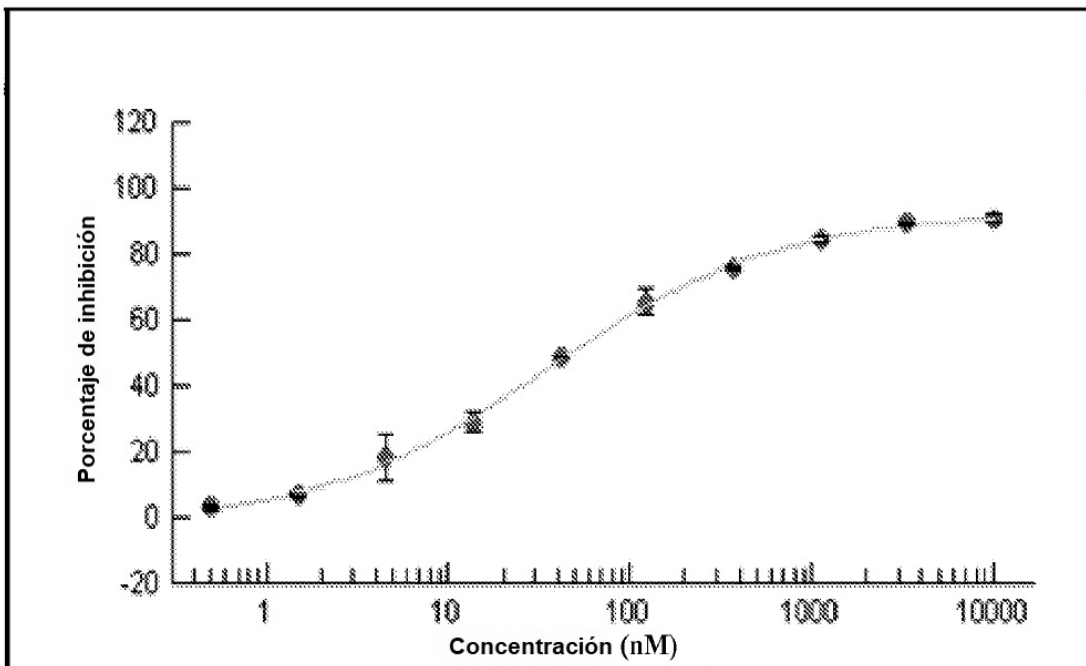


FIG. 1D



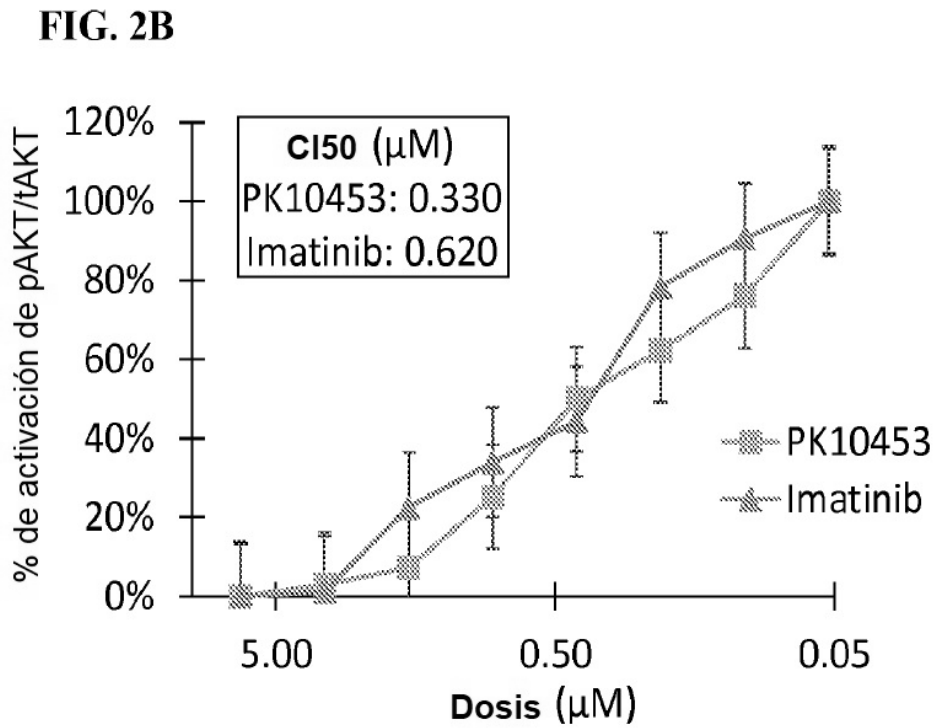
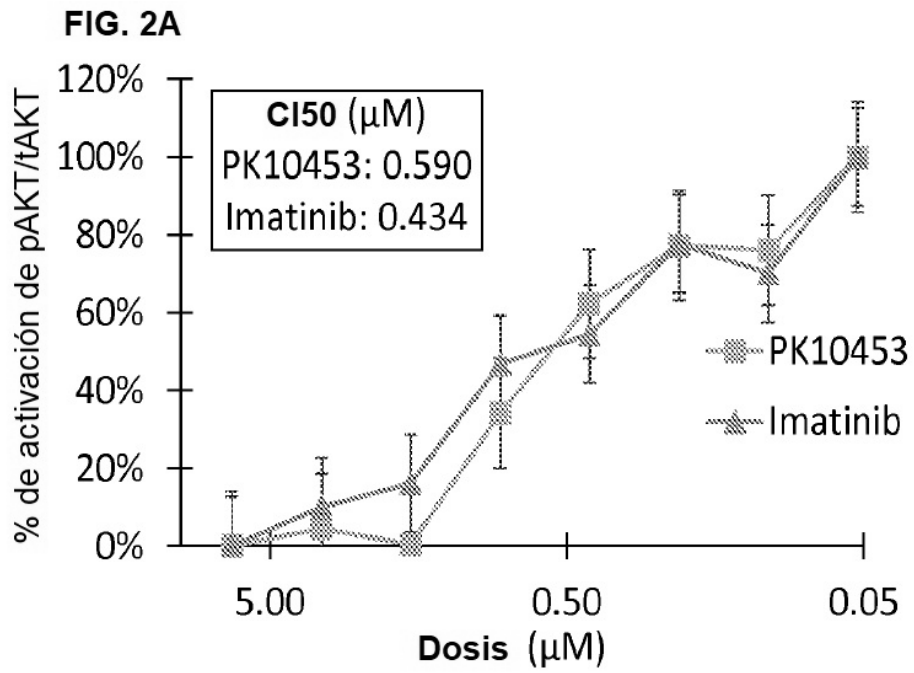


FIG. 2C

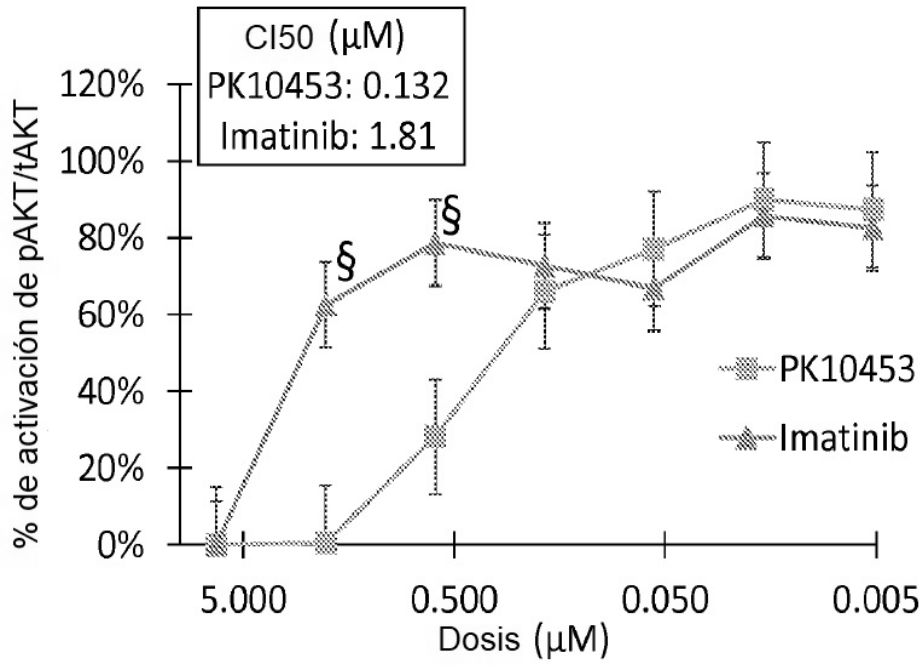


FIG. 2D

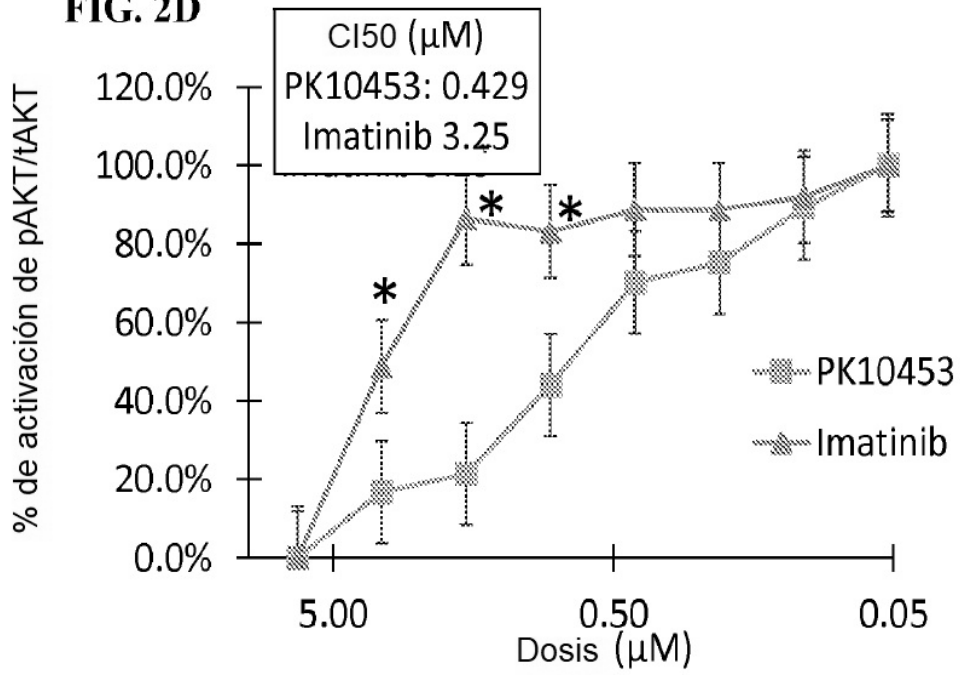


FIG. 2E

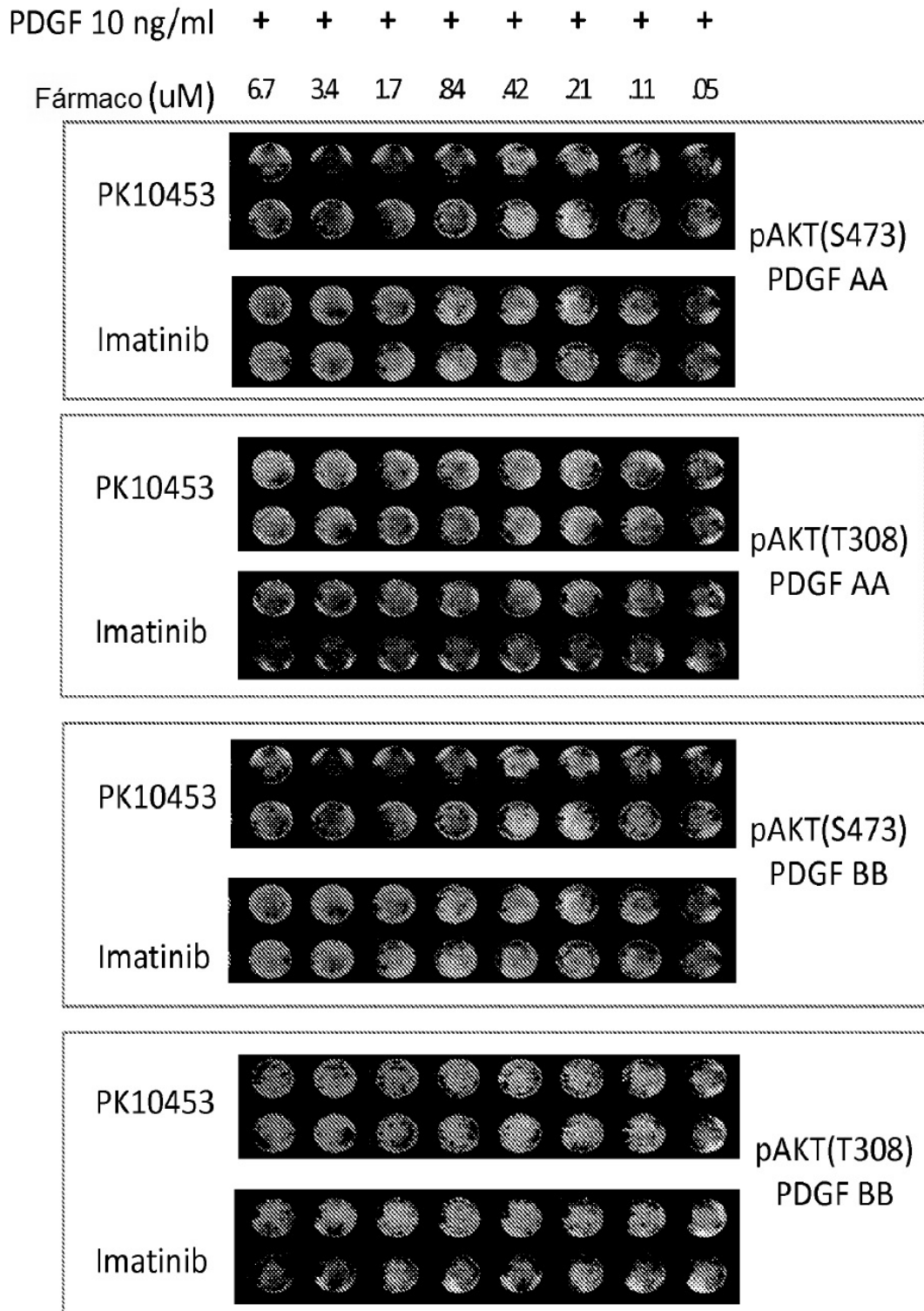
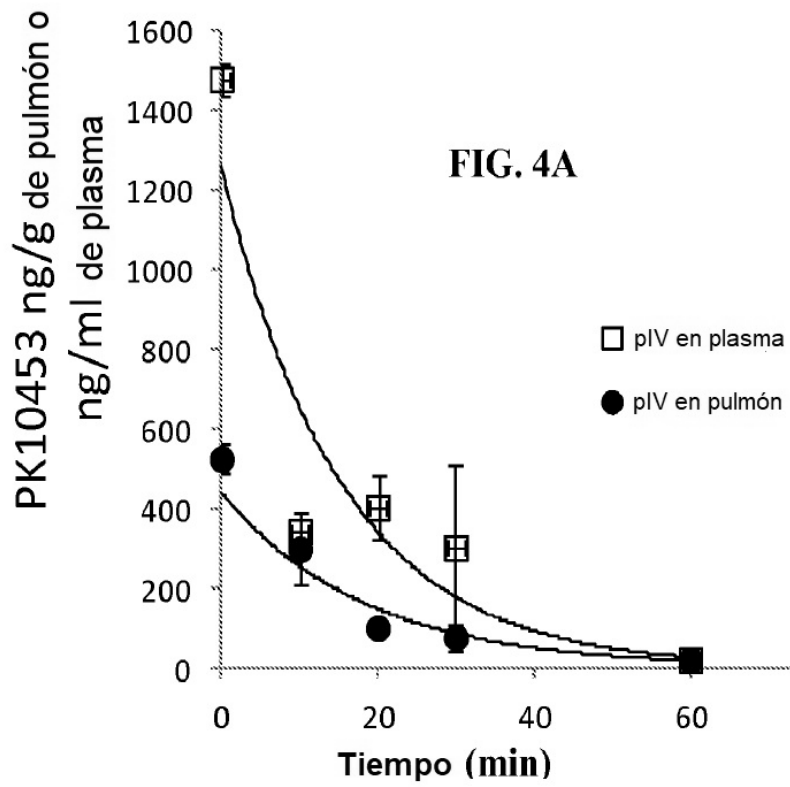
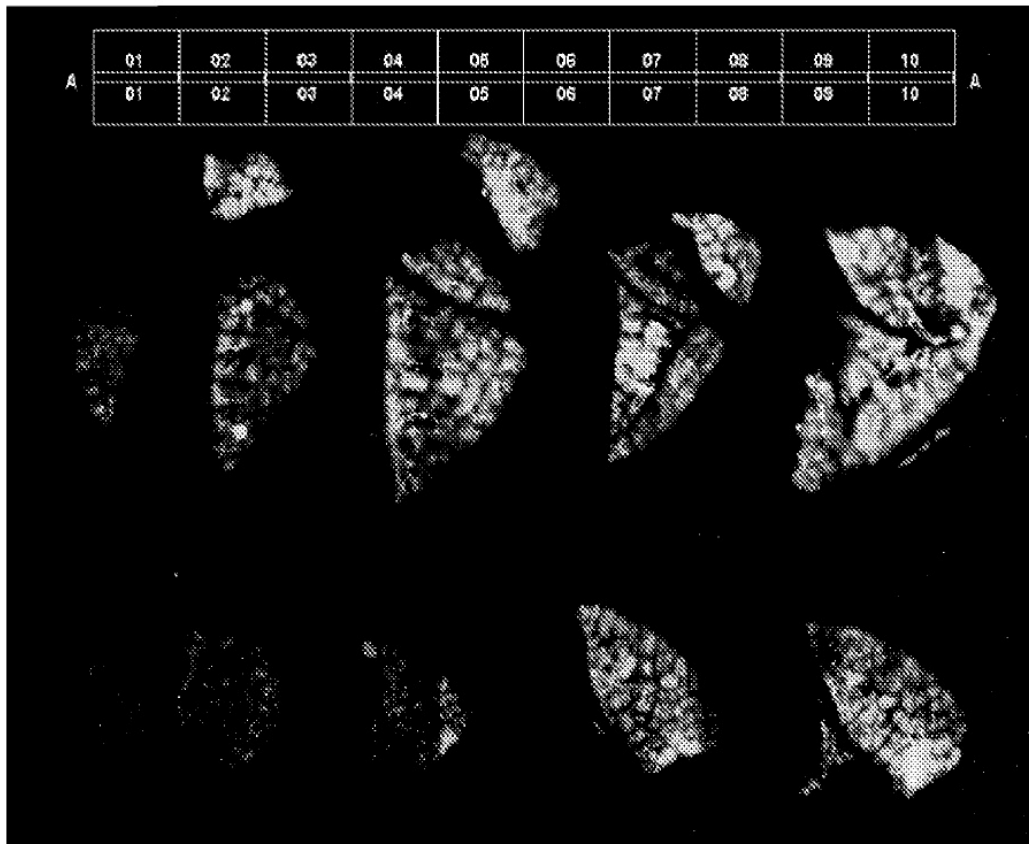


FIG. 3



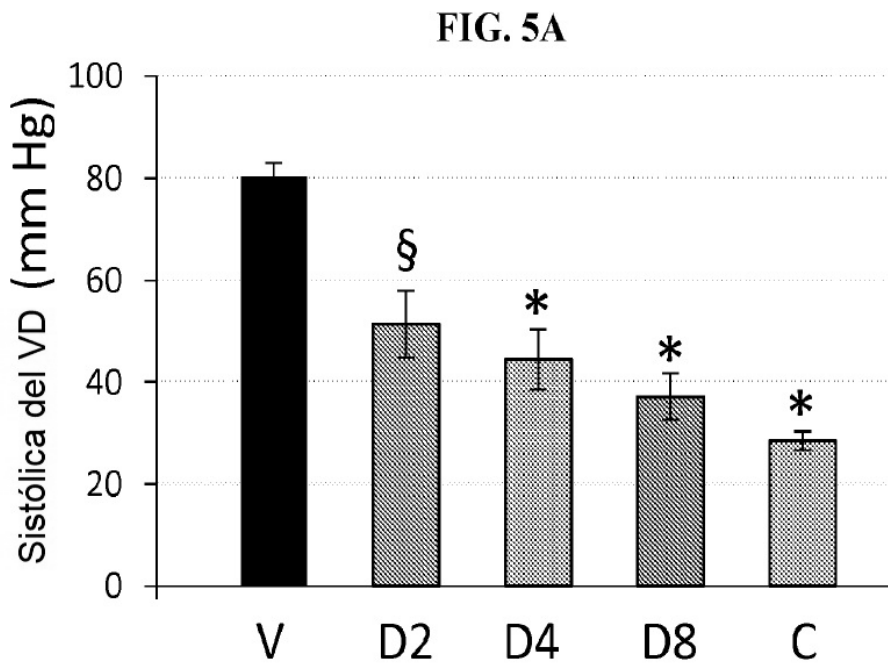
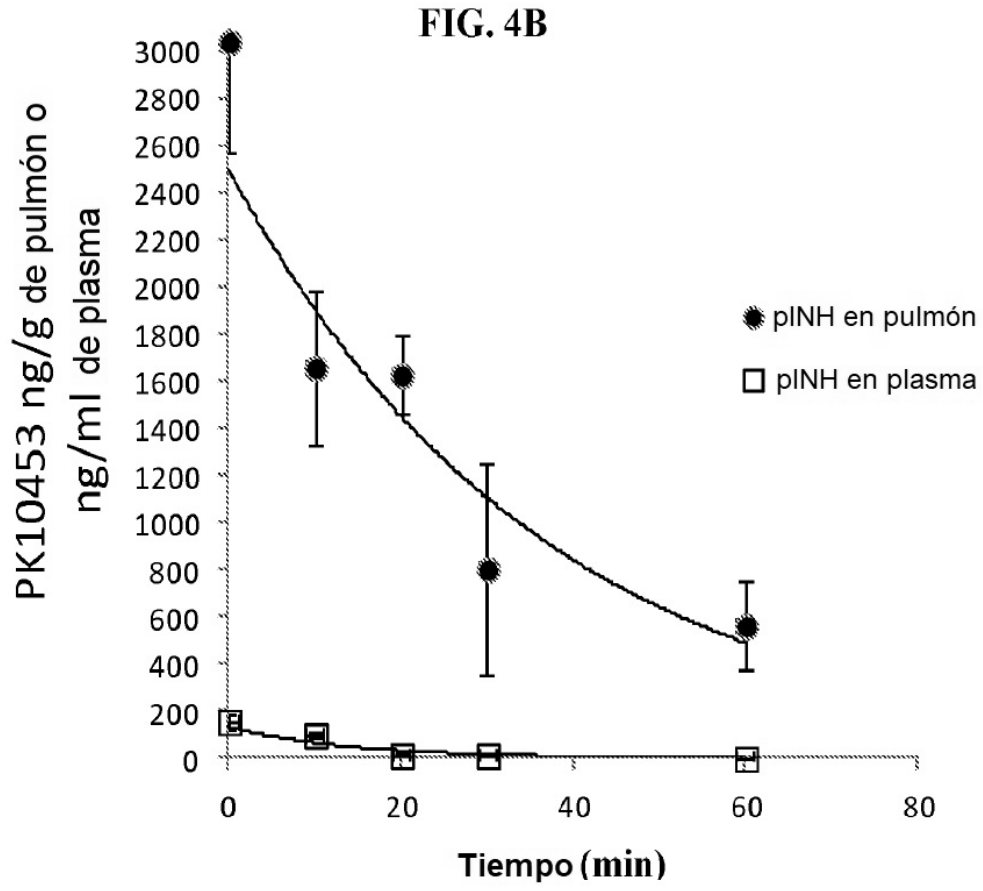


FIG. 5B

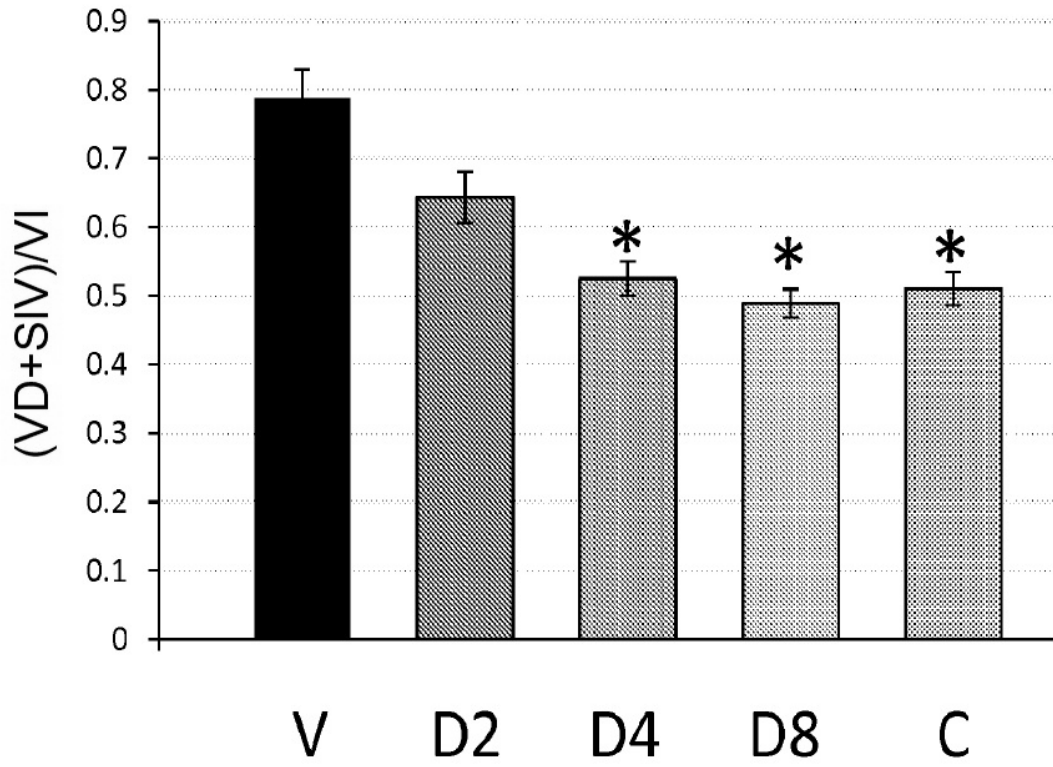
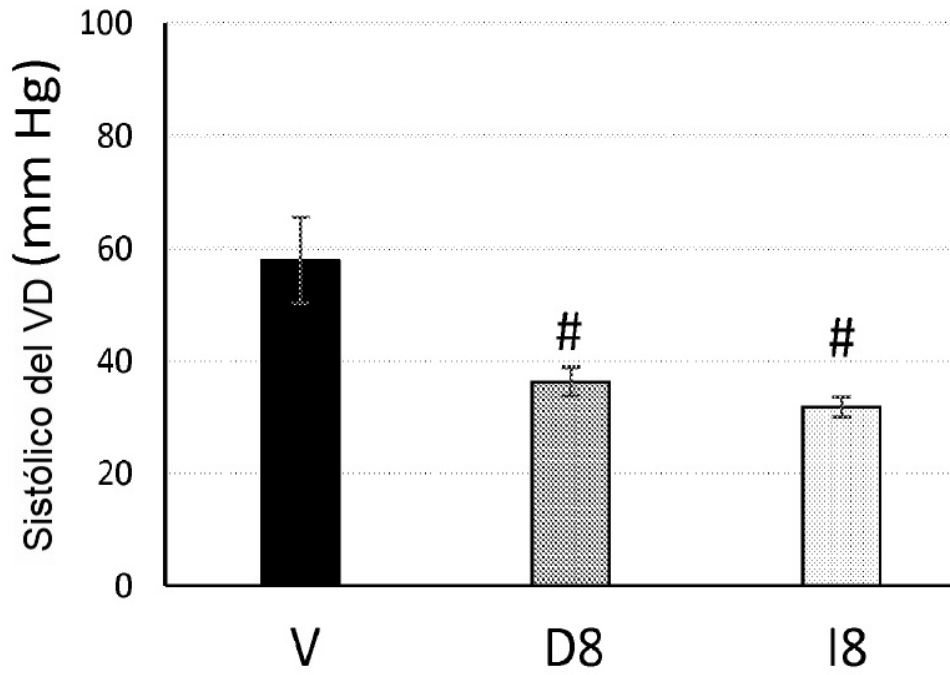
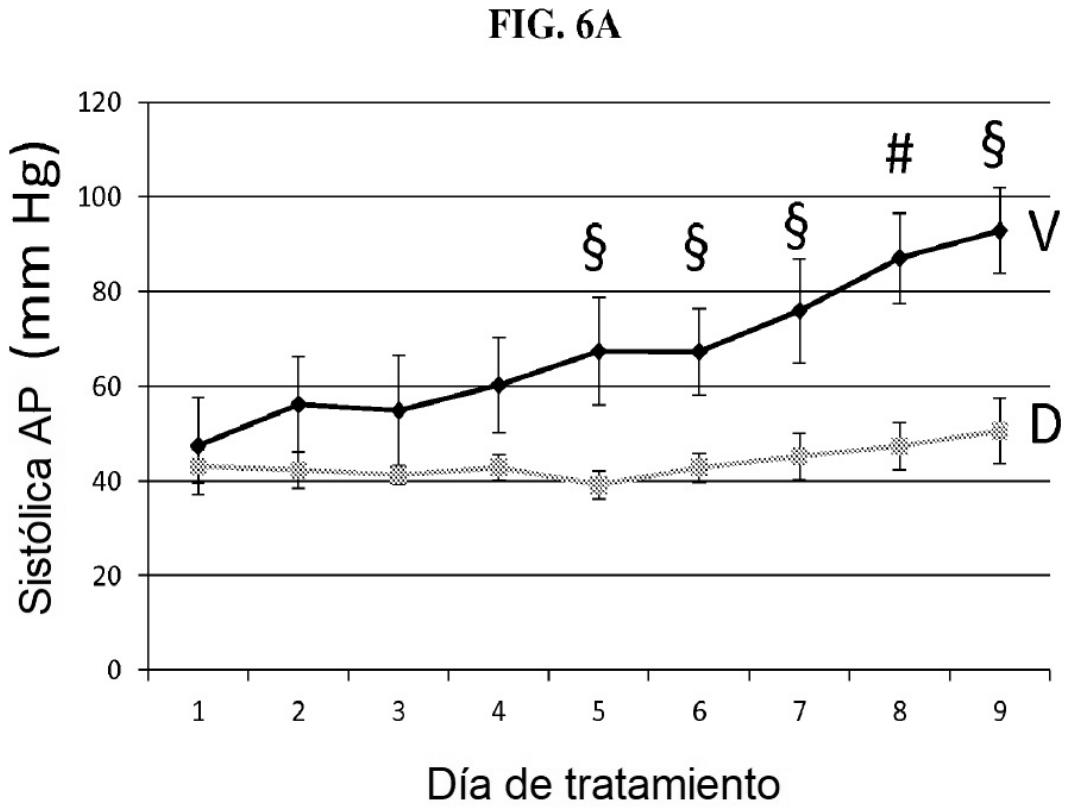
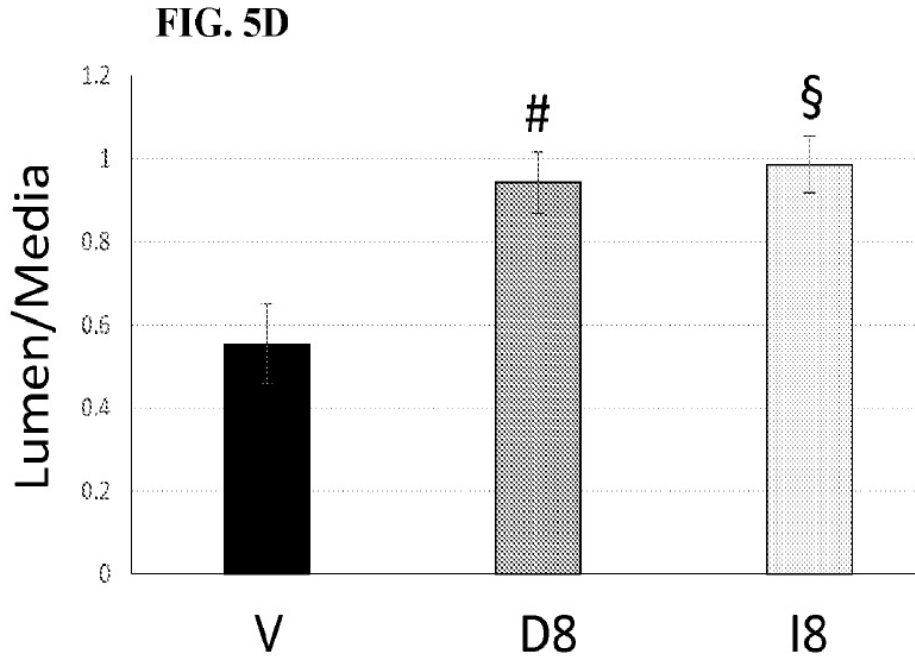
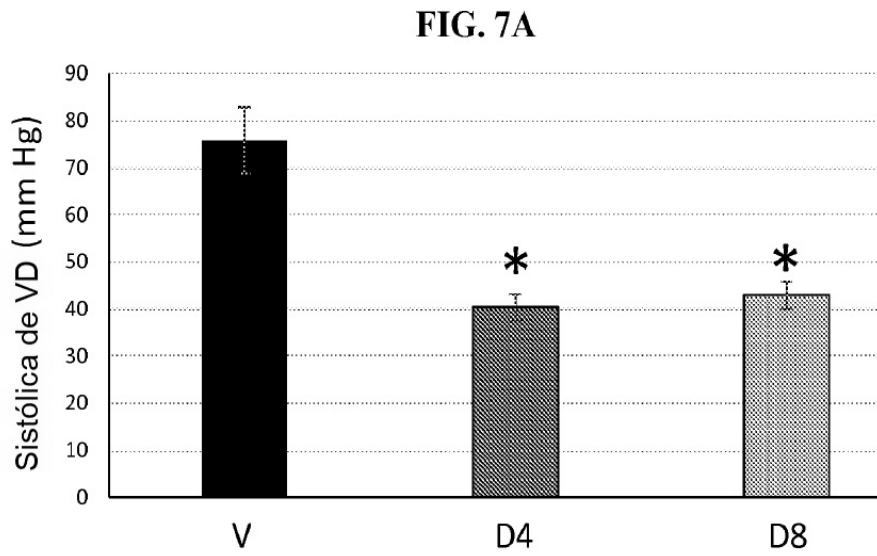
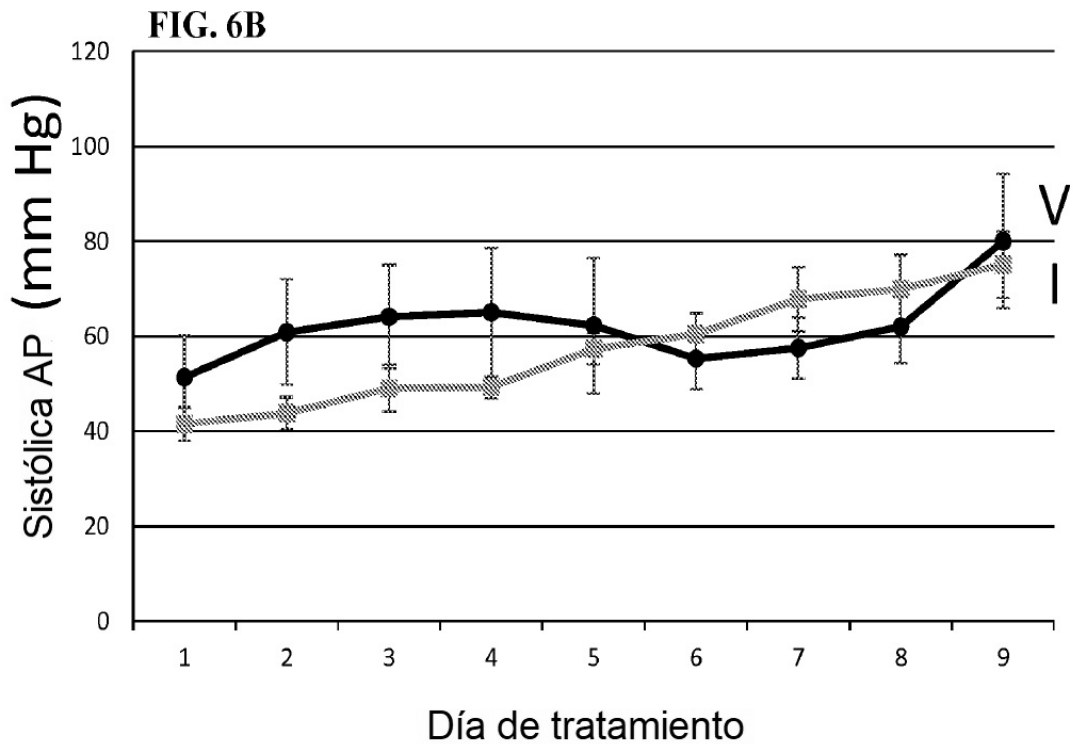
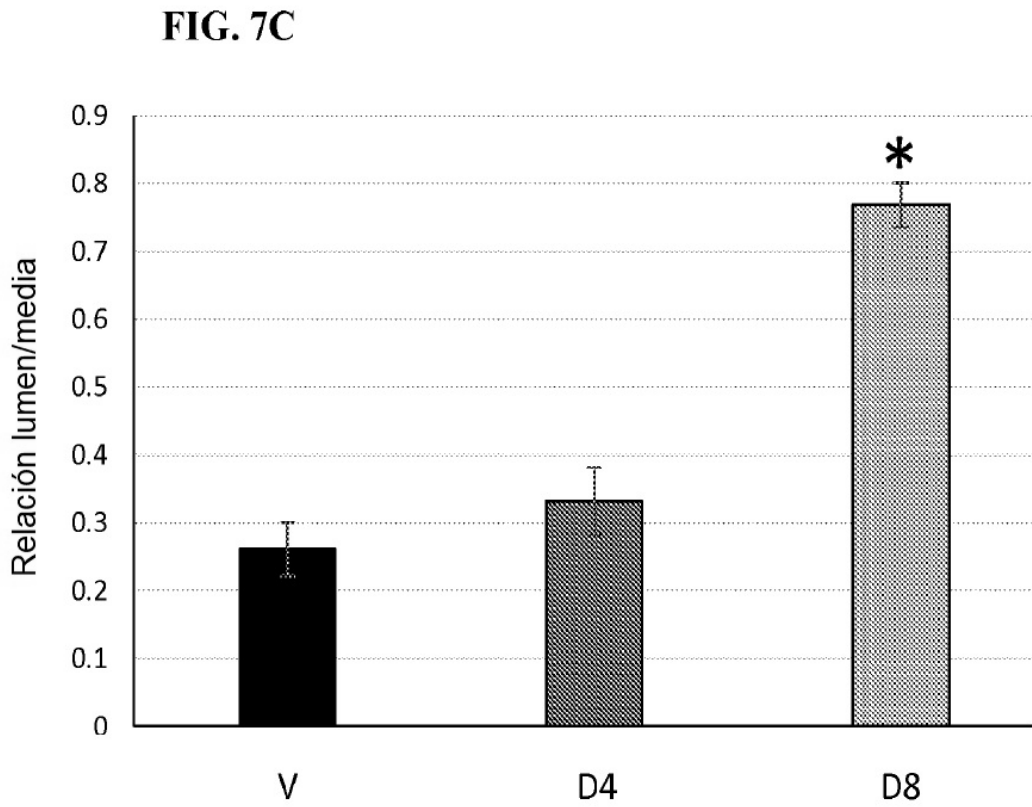
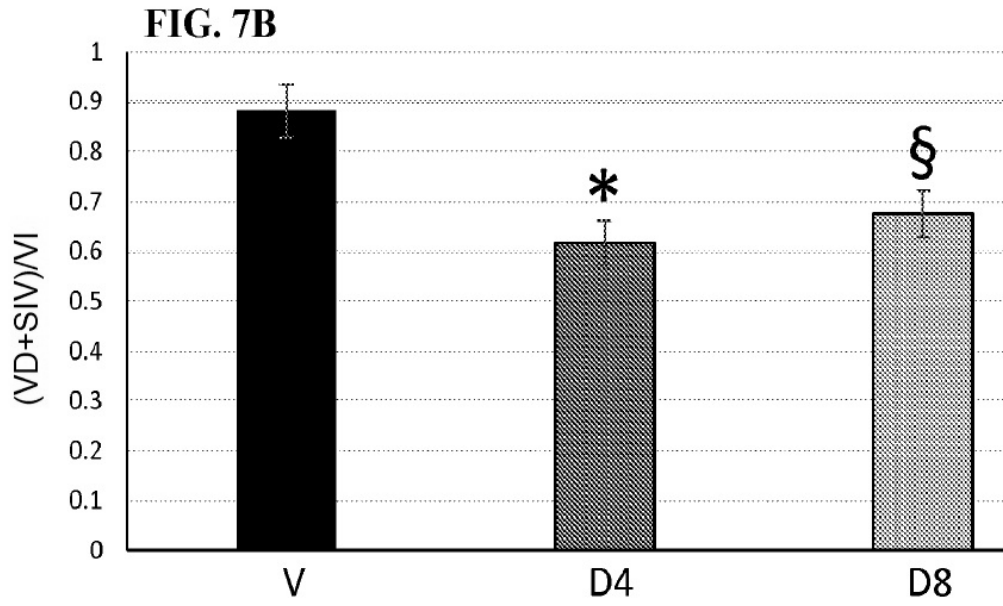


FIG. 5C









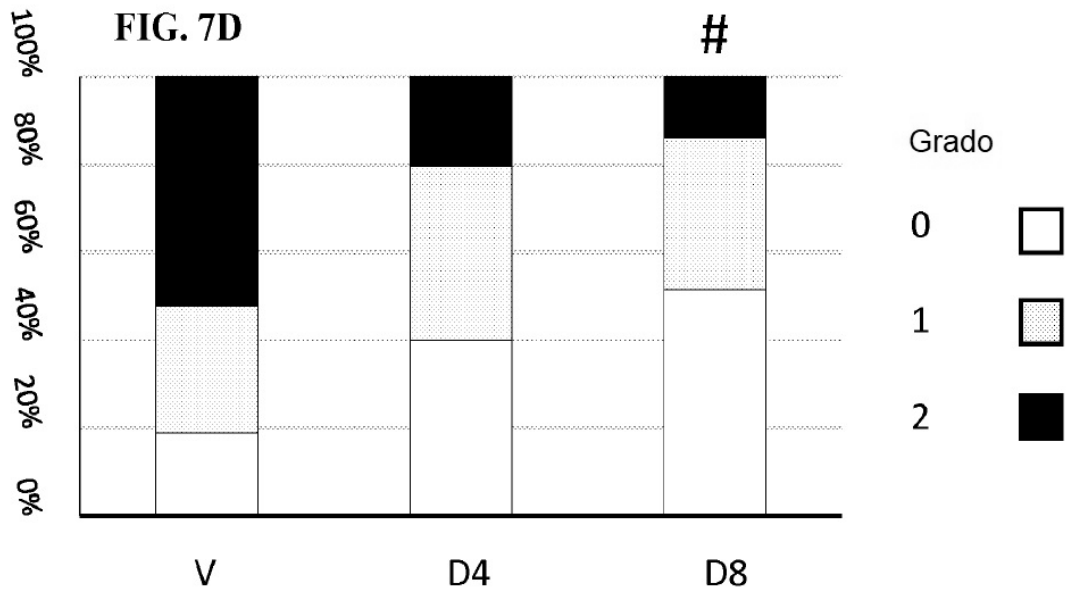


FIG. 8A

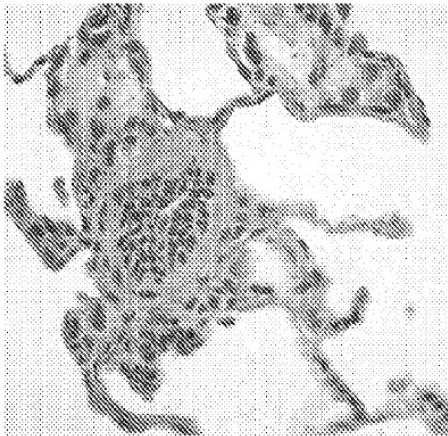


FIG. 8B

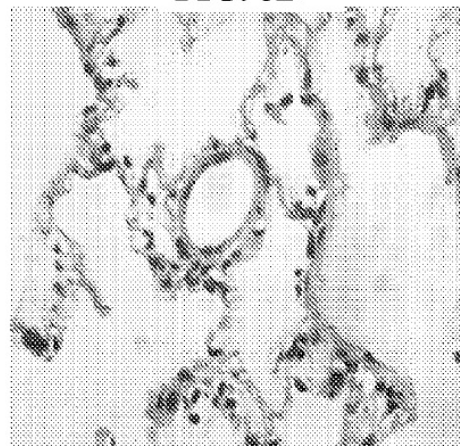


FIG. 8C

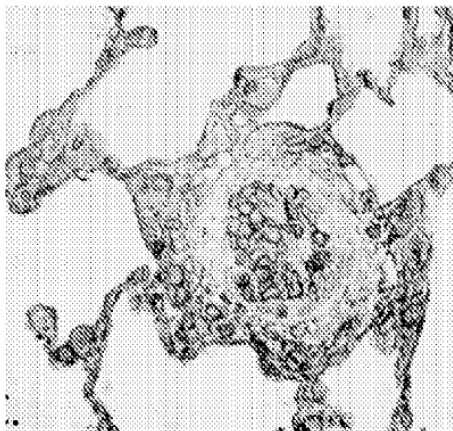


FIG. 8D

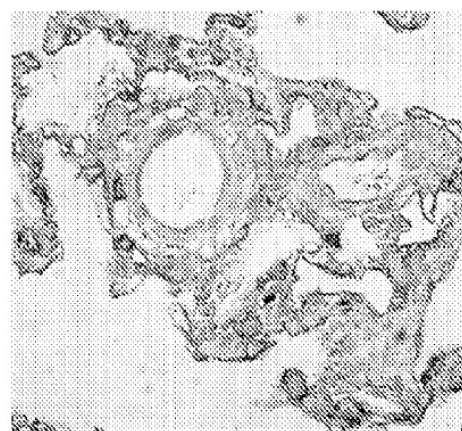


FIG. 9

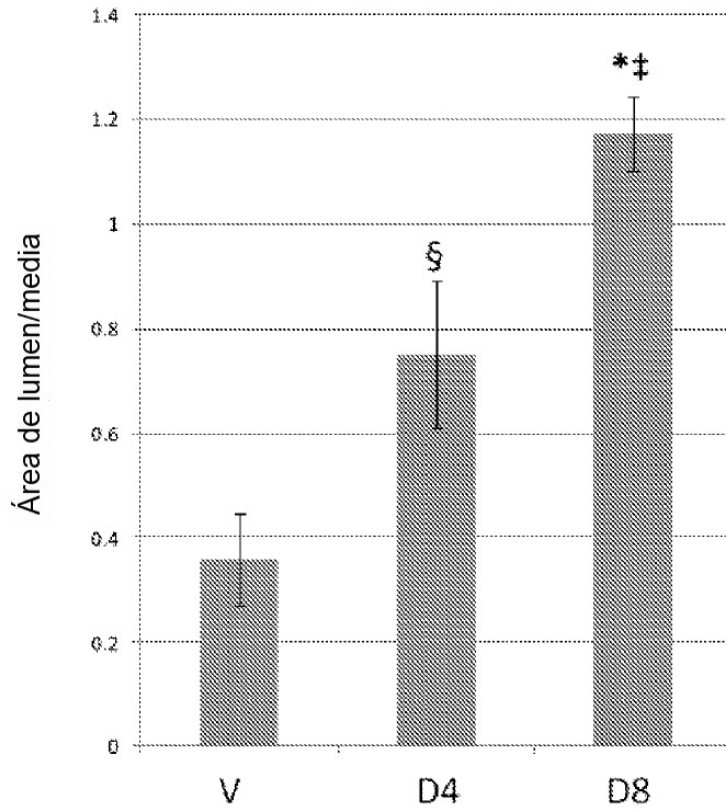


FIG. 10A

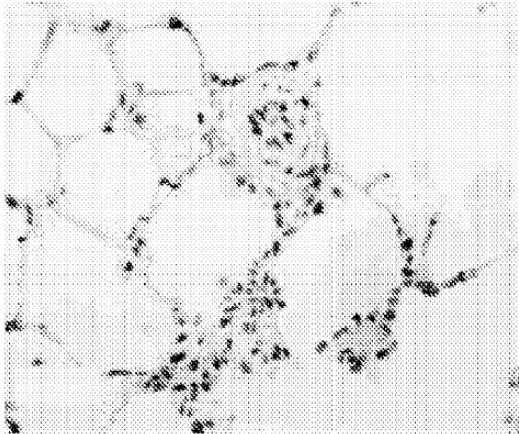


FIG. 10B

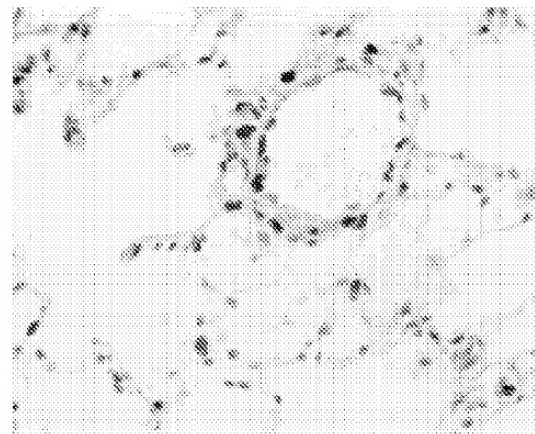


FIG. 11A

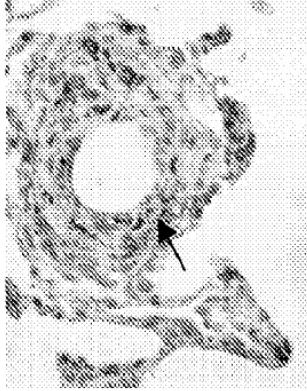


FIG. 11B

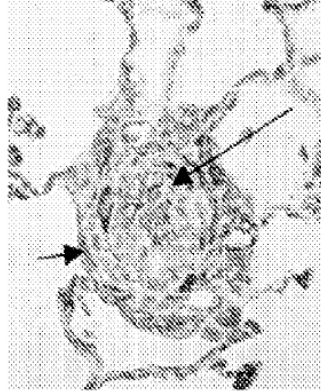


FIG. 11C

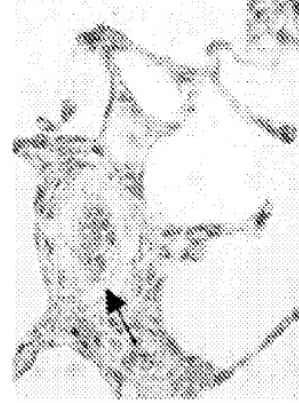


FIG. 11D

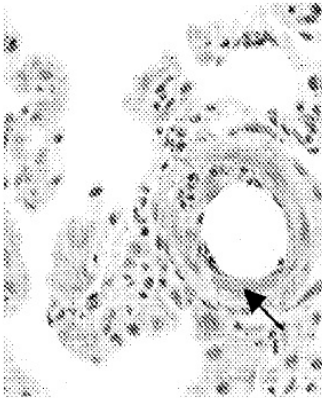


FIG. 11E

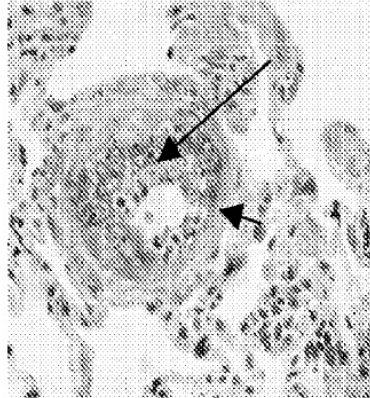


FIG. 11F

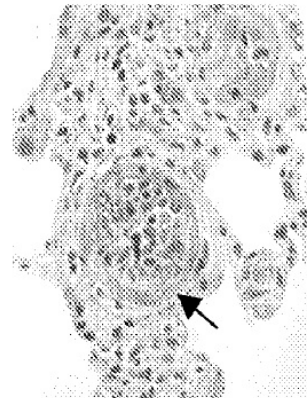


FIG. 11G

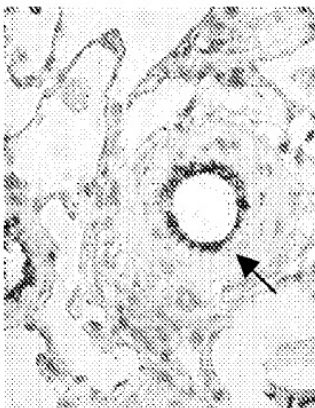


FIG. 11H

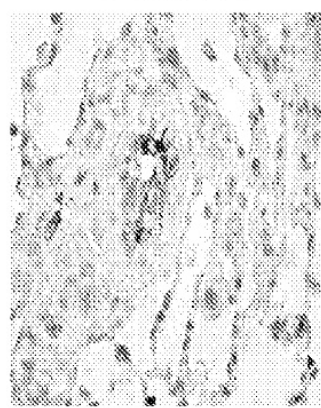


FIG. 11I



FIG. 12A

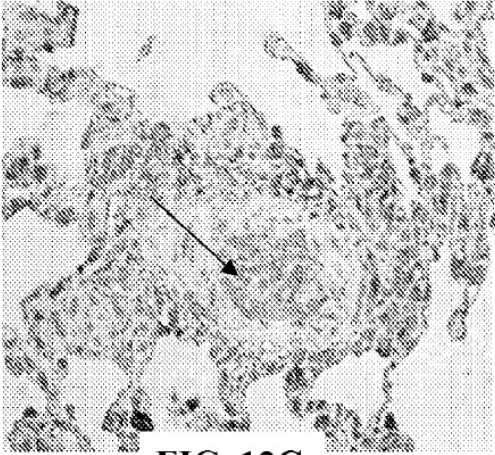


FIG. 12B

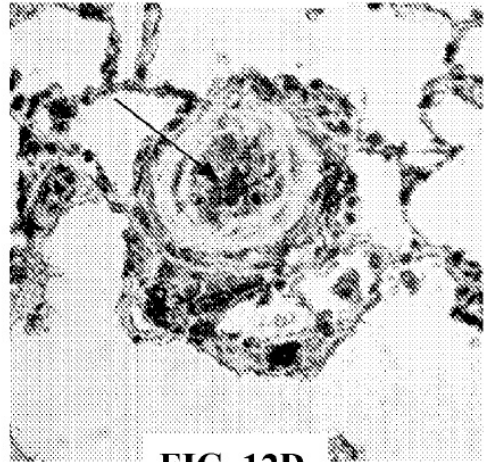


FIG. 12C

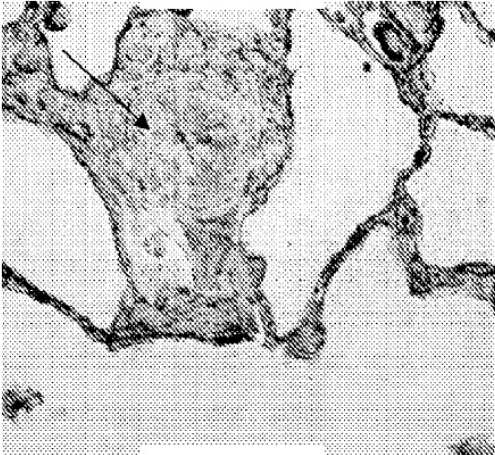


FIG. 12D

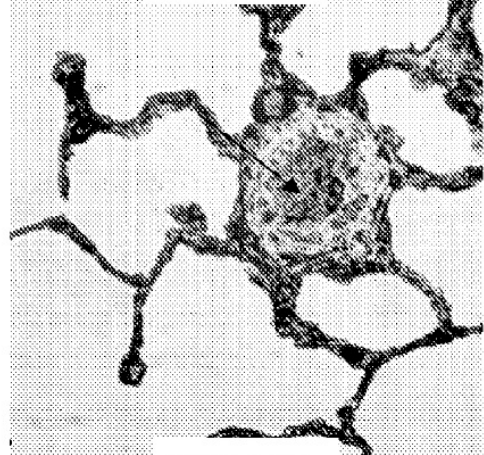


FIG. 12E

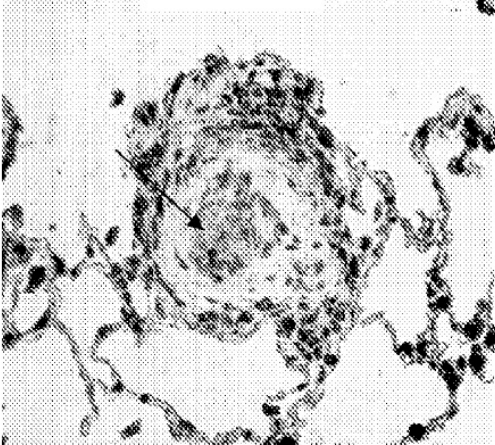


FIG. 12F

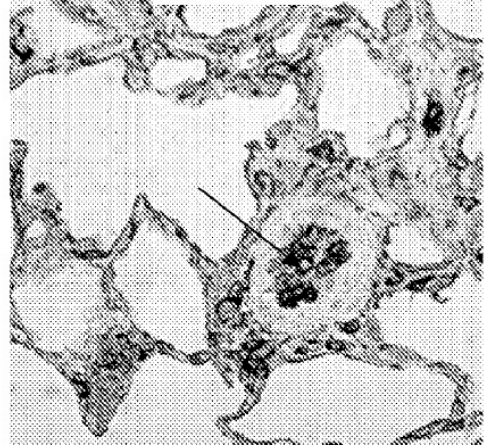


FIG. 13A

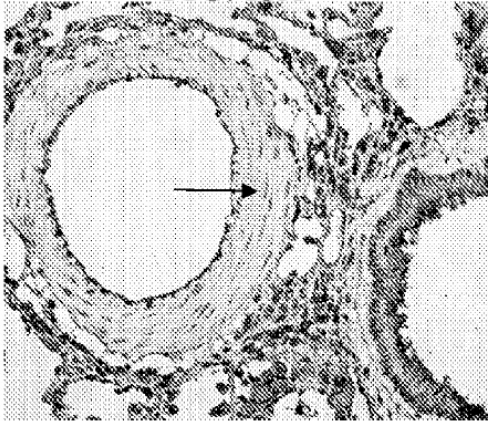


FIG. 13B

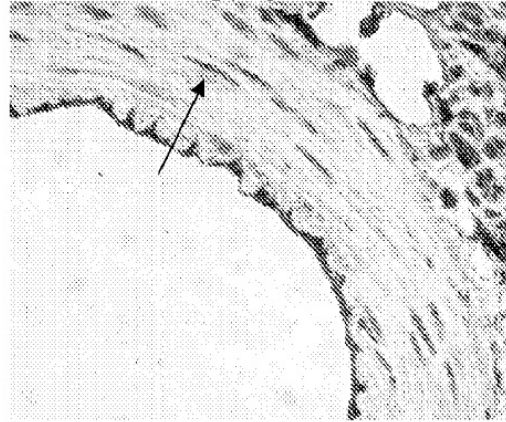


FIG. 13C

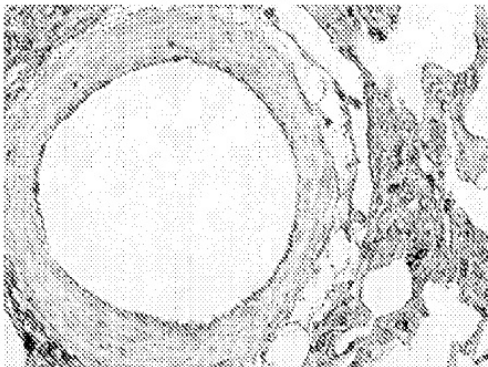


FIG. 13D

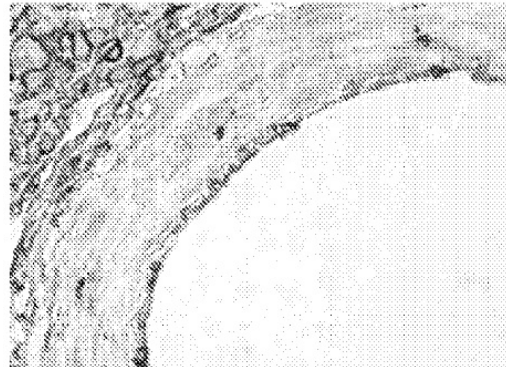
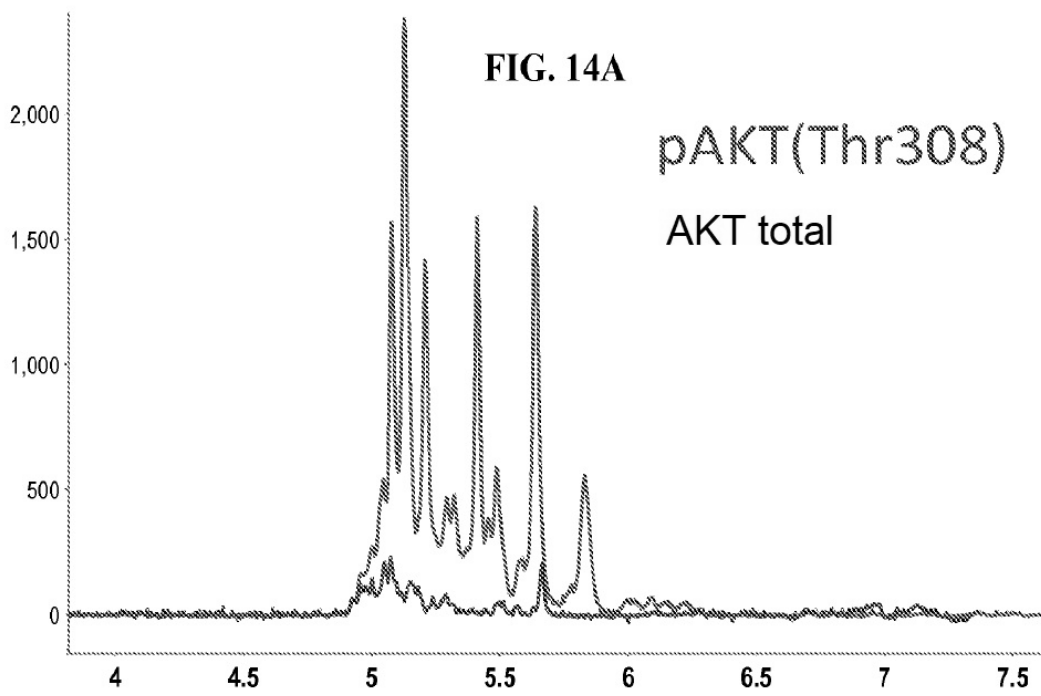


FIG. 14A



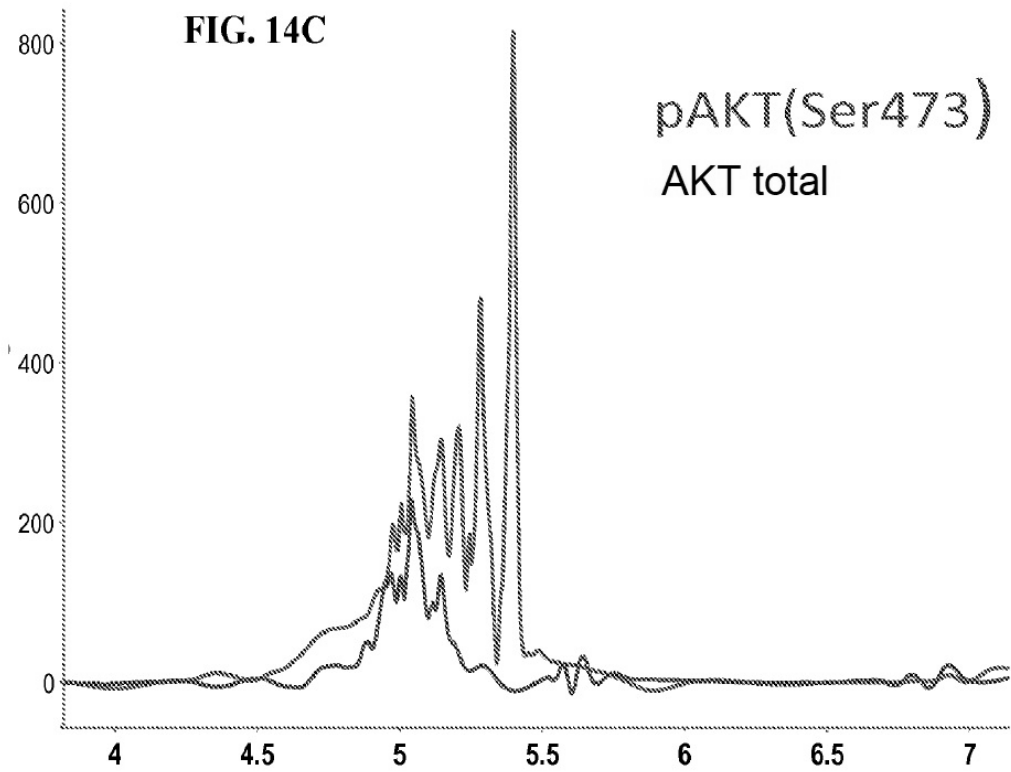
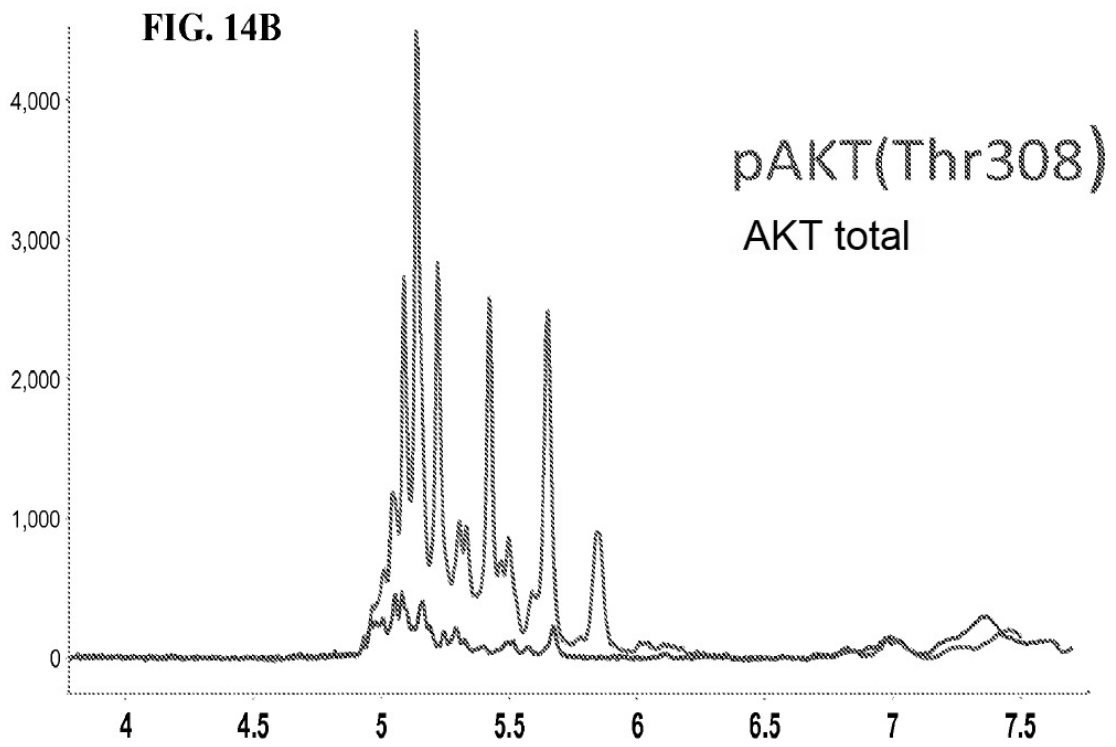


FIG. 14D

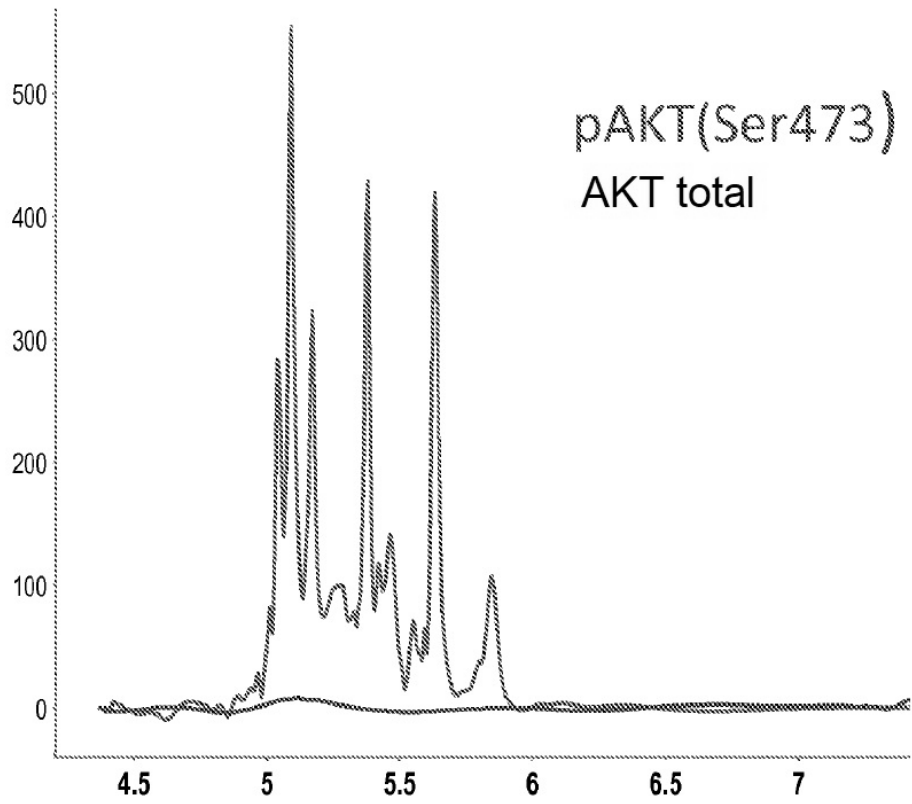


FIG. 14E

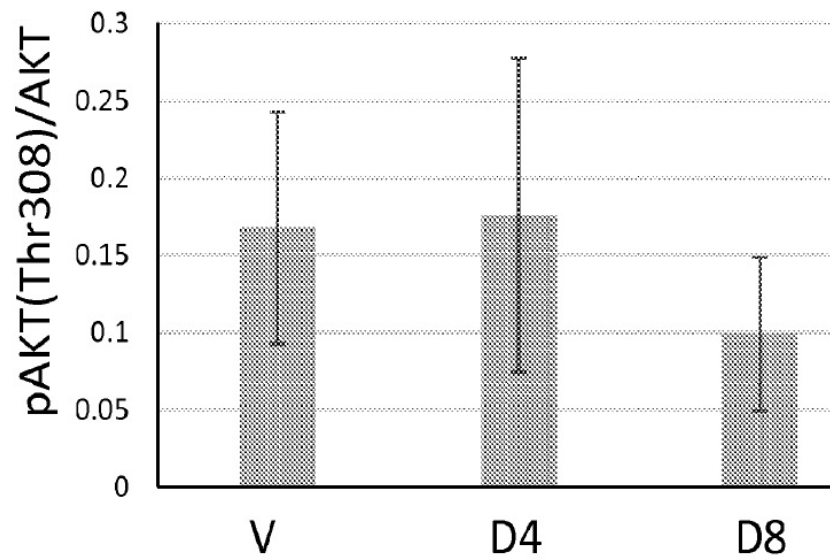


FIG. 14F

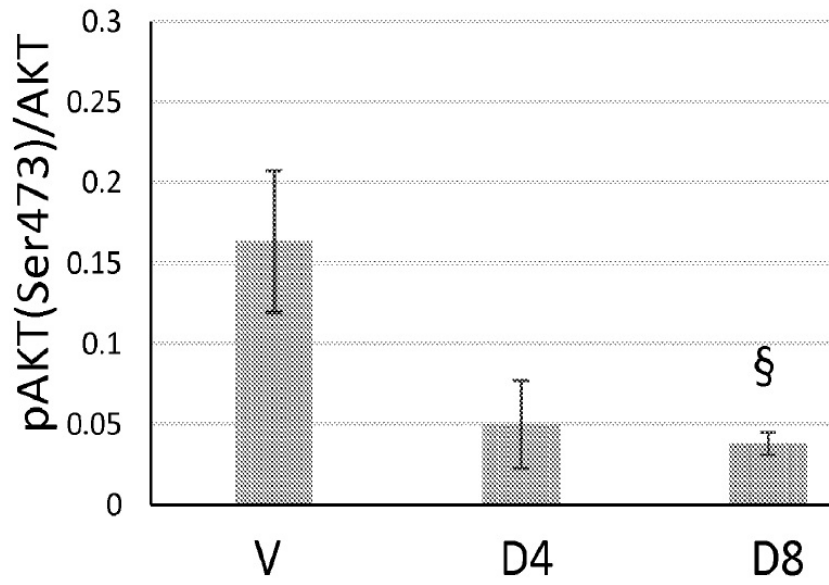
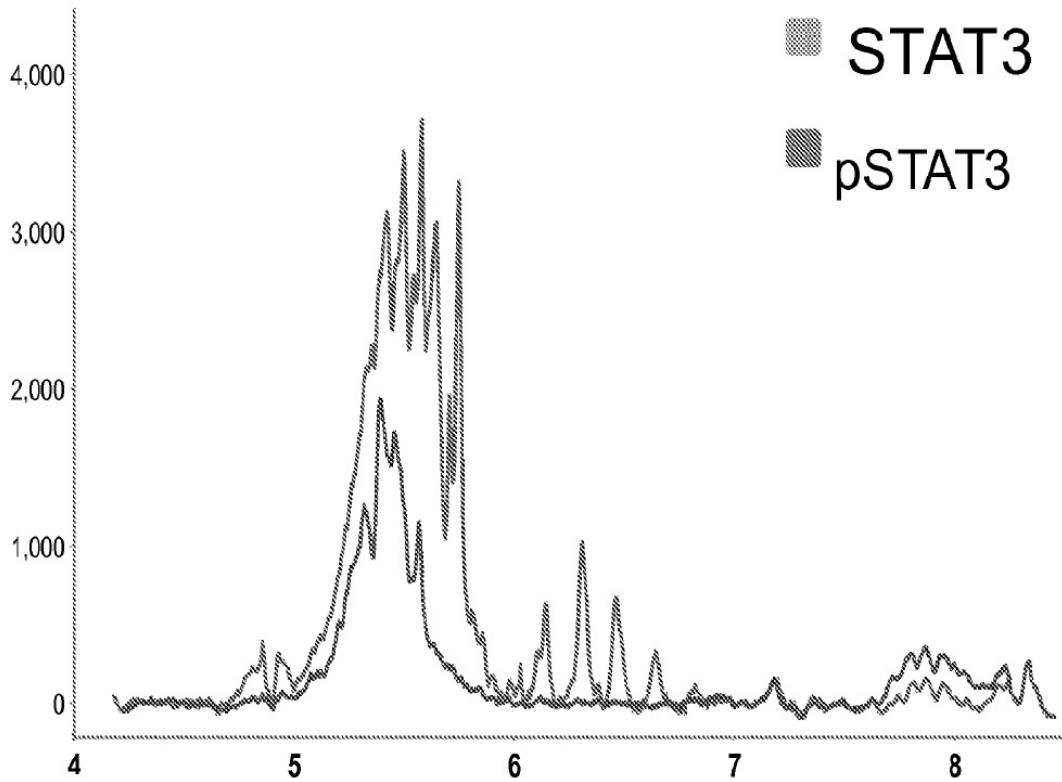
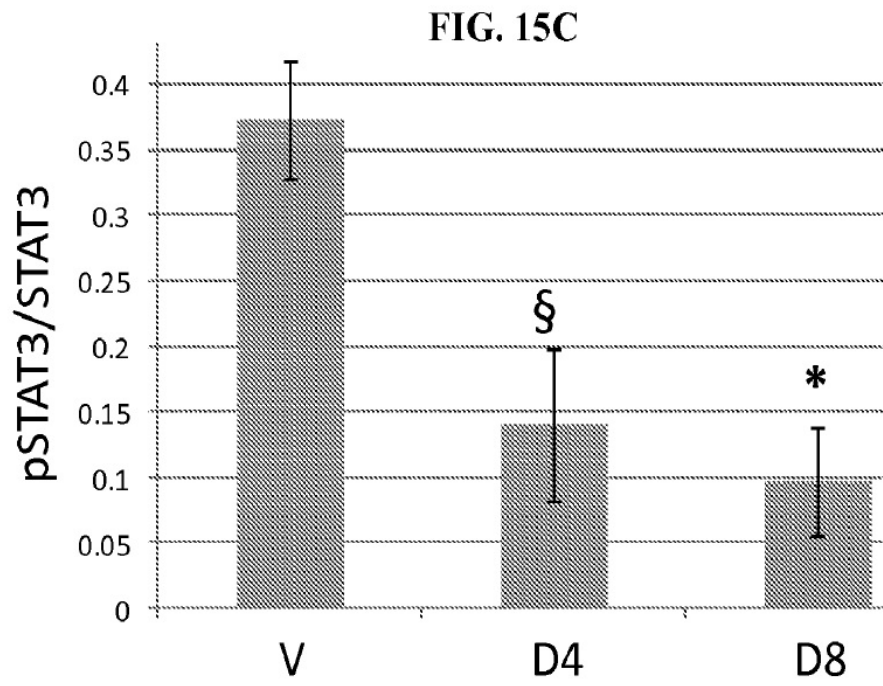
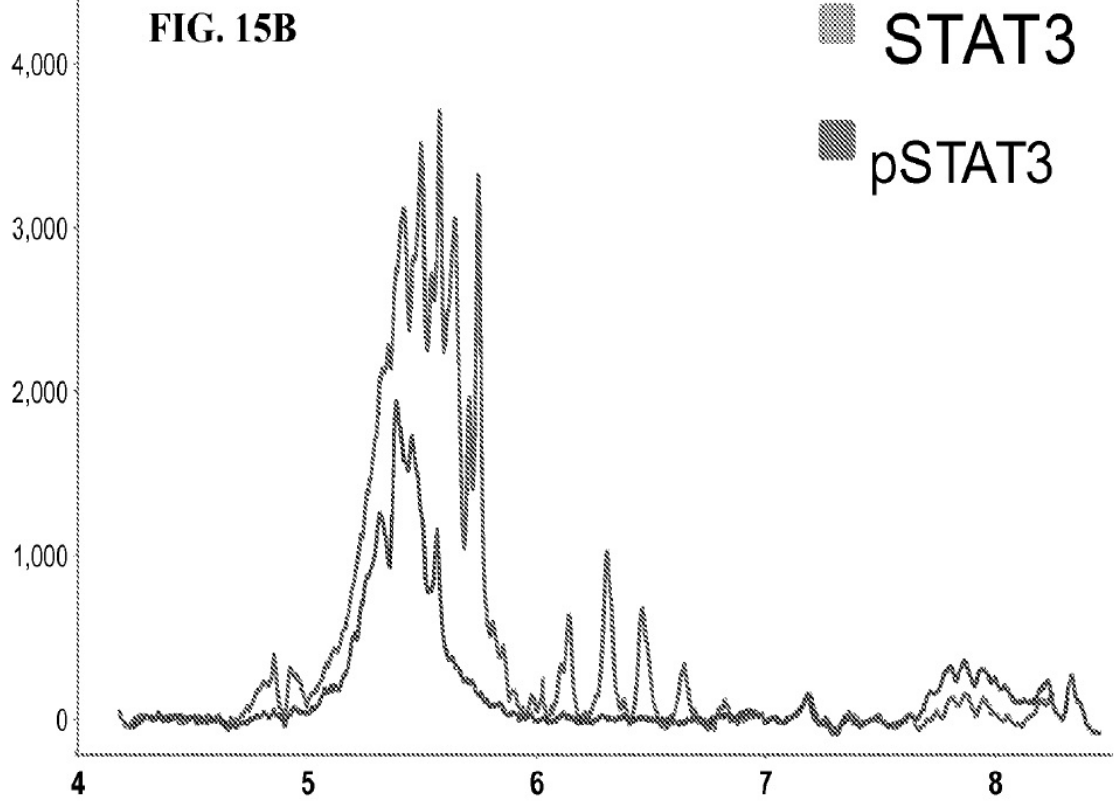
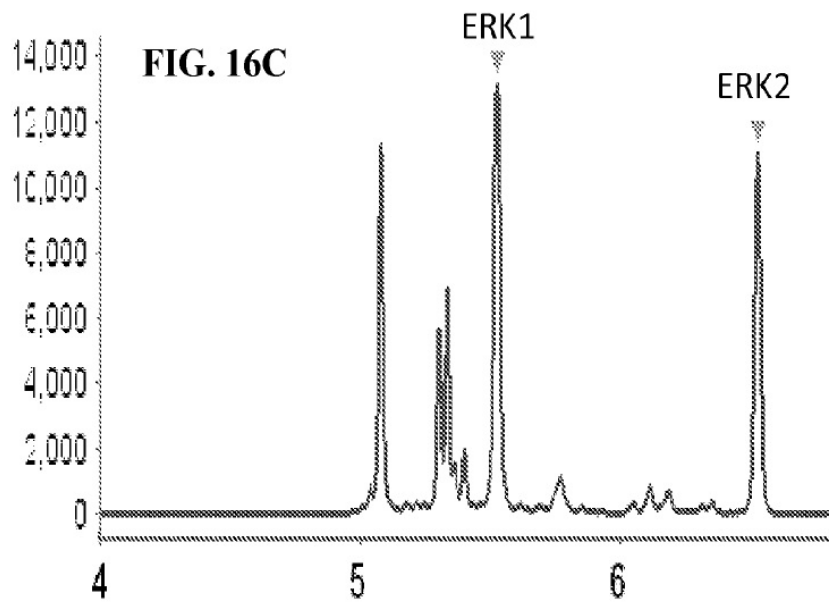
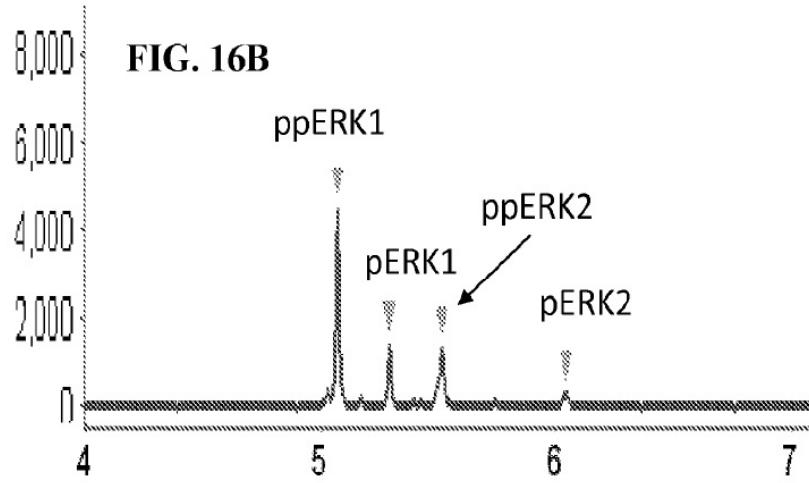
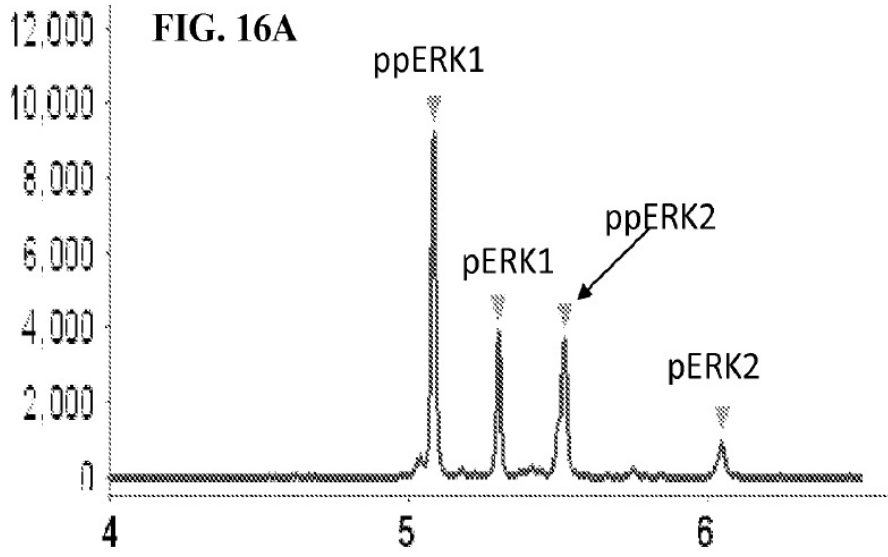
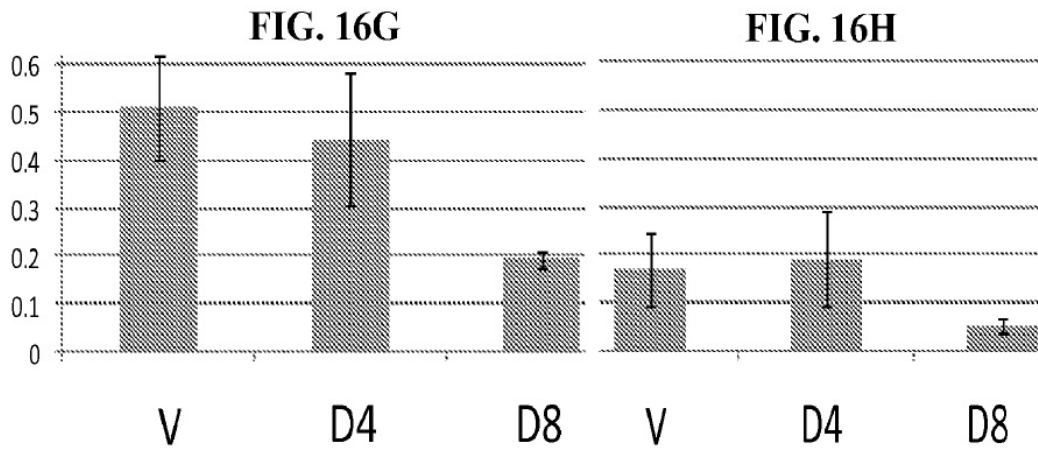
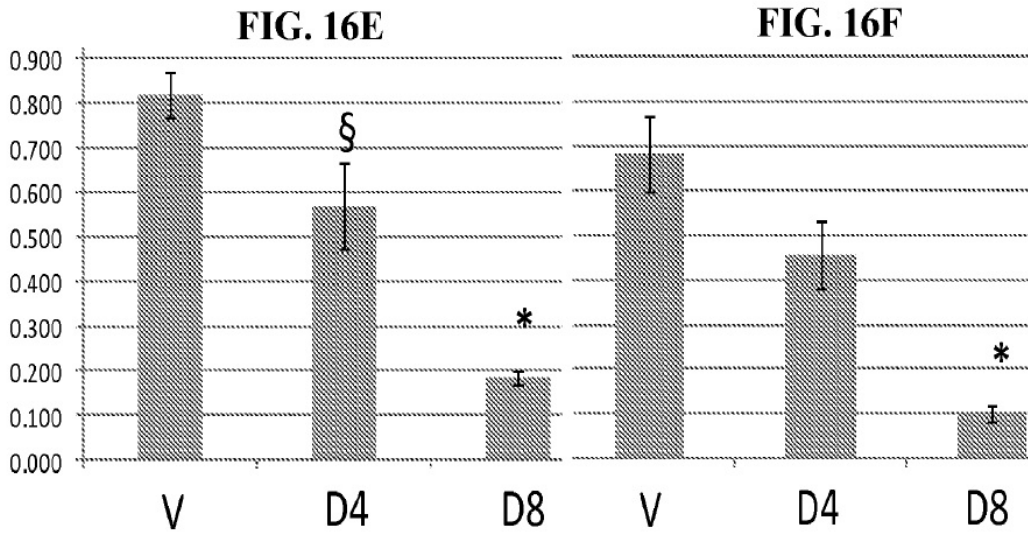
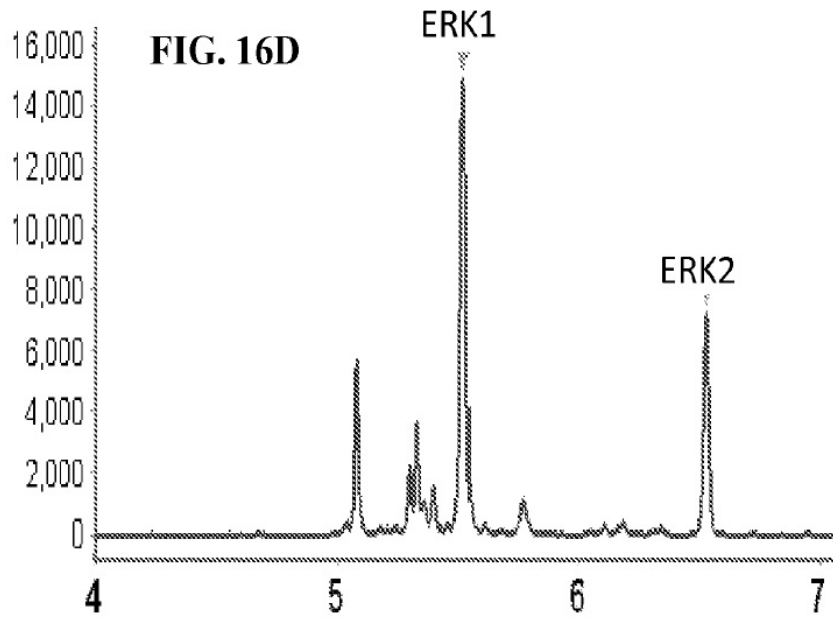


FIG. 15A









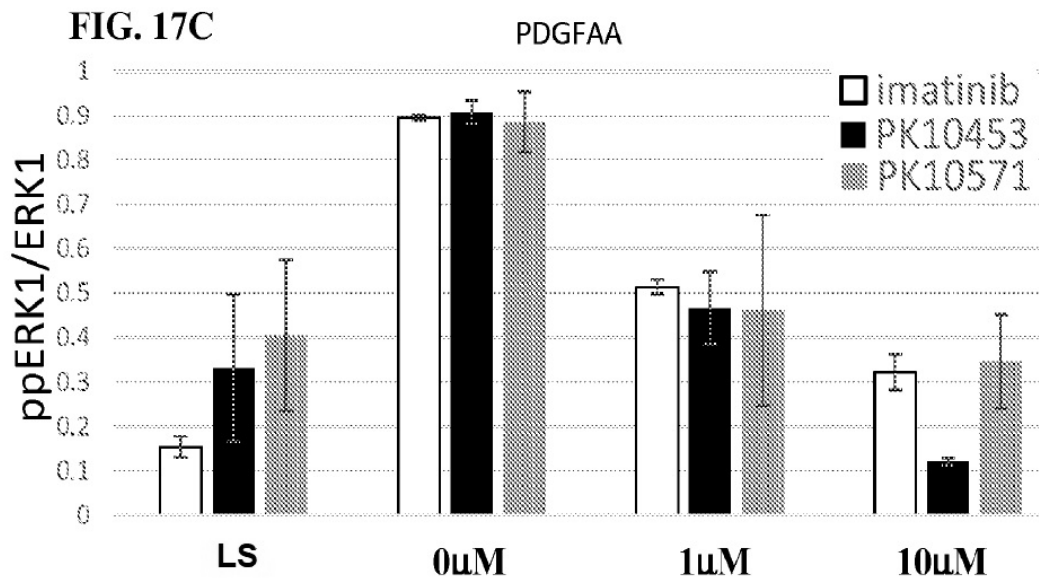
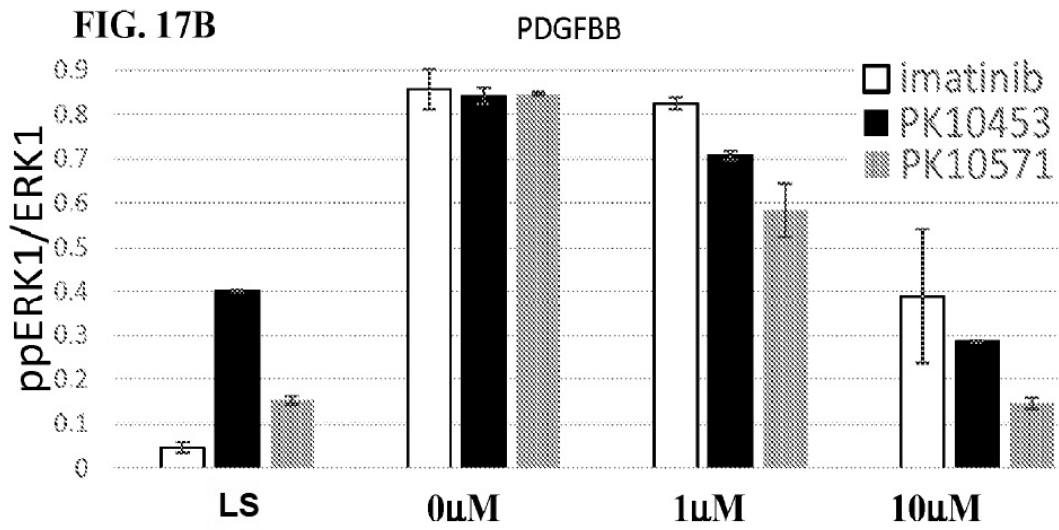
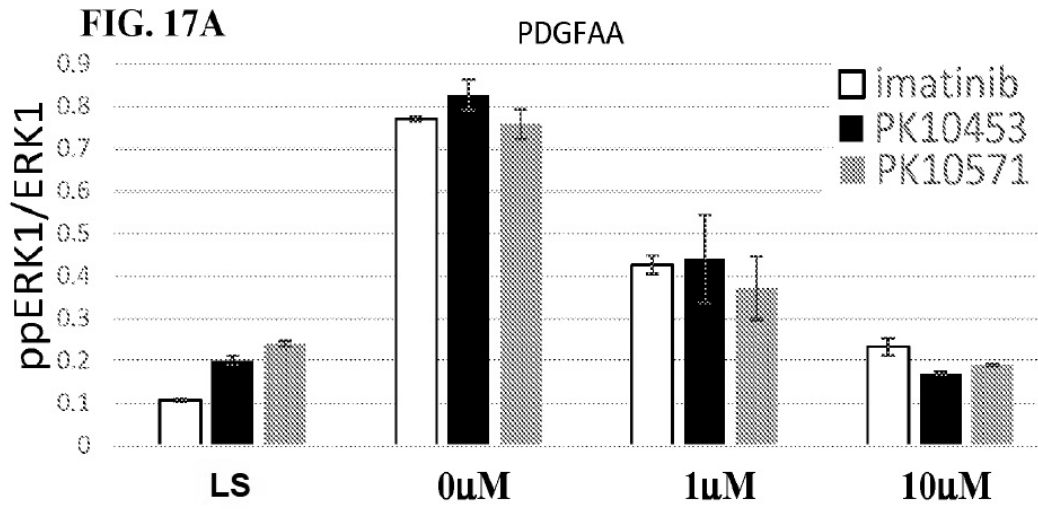


FIG. 17D

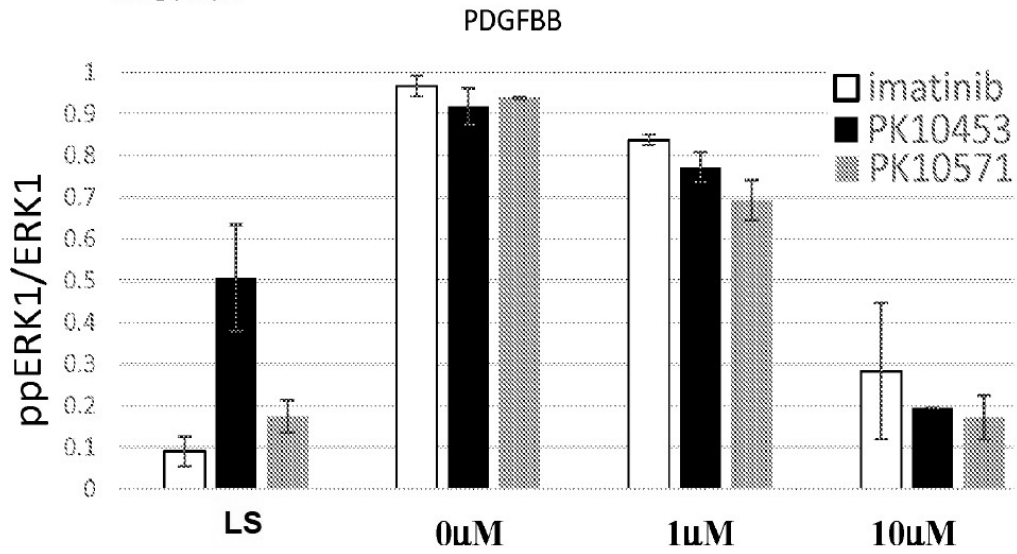


FIG. 18A

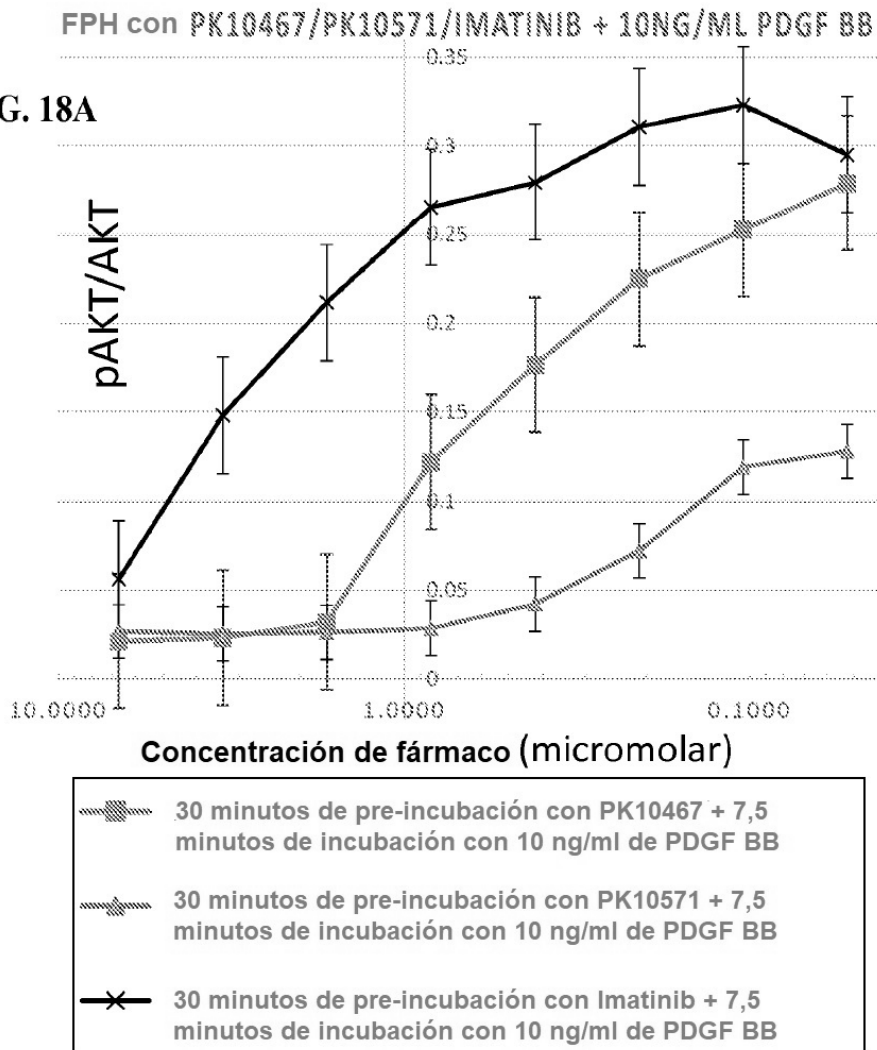
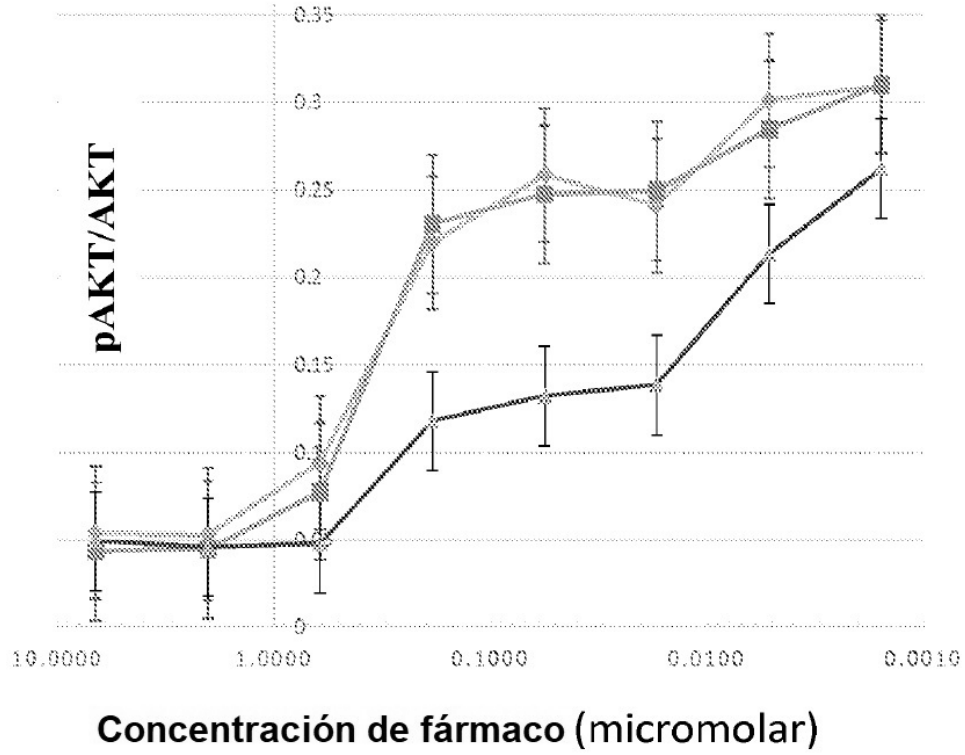


FIG. 18B

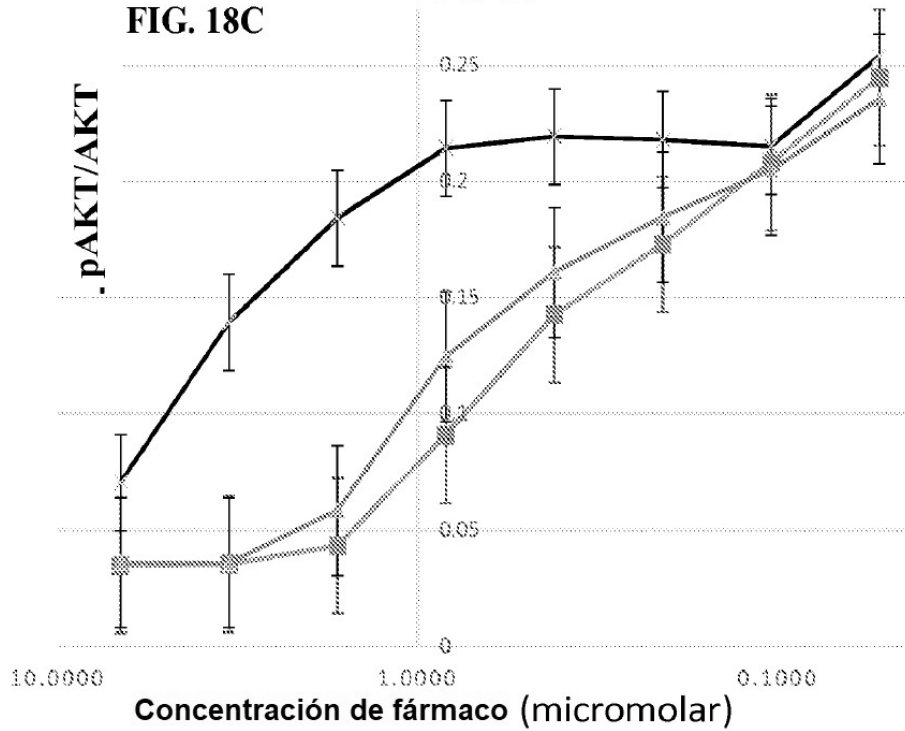
**FPH CON PK10453 O PK10571
+ 10NG/M L PDGF BB**



- ◆ (A) PK10453 30 minutos de pre-incubación+ 10ng/mL PDGF BB
- (B) PK10453 30 minutos de pre-incubación+ 10ng/mL PDGF BB
- ▲ PK10571 30 minutos de pre-incubación+ 10ng/mL PDGF BB

FPH CON PK10453/PK10468/PK10569/IMATINIB + 10NG/ML PDGF BB

FIG. 18C



30 minutos de pre-incubación de PK10468 + incubación con 10 ng/ml de PDGF BB
 30 minutos de pre-incubación de PK10569 + incubación con 10 ng/ml de PDGF BB
 30 minutos de pre-incubación de imatinib + incubación con 10 ng/ml de PDGF BB

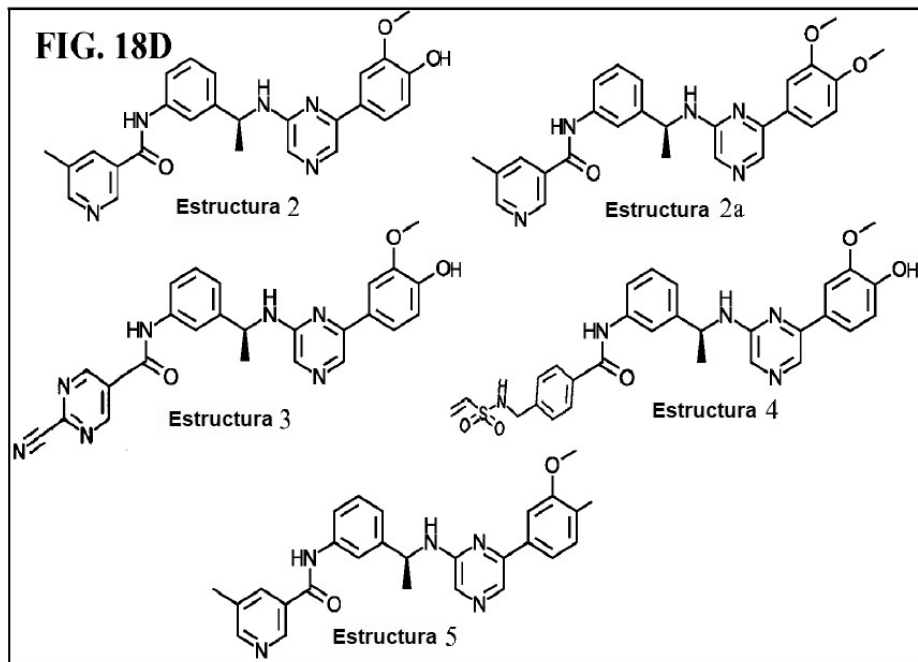


FIG. 19

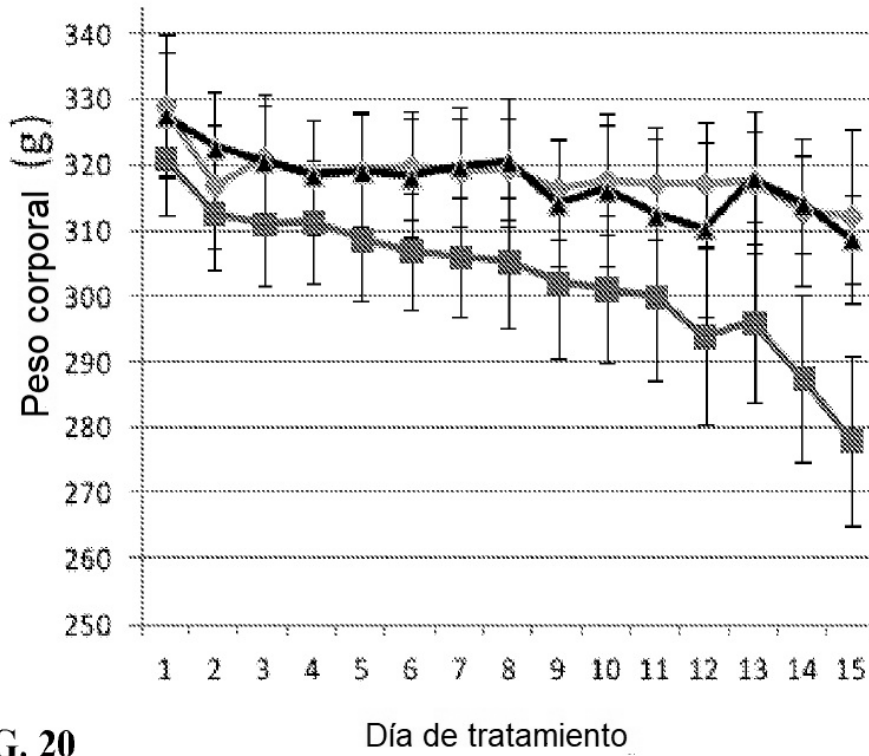


FIG. 20

