

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 649**

51 Int. Cl.:

A61K 31/10	(2006.01)	C07D 213/42	(2006.01)
A61K 31/498	(2006.01)	C07D 239/42	(2006.01)
A61K 31/505	(2006.01)		
A61K 31/34	(2006.01)		
A61K 31/185	(2006.01)		
A61K 31/435	(2006.01)		
A61K 31/495	(2006.01)		
A61P 35/00	(2006.01)		
C07D 239/26	(2006.01)		
A61K 31/4418	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.06.2014 PCT/EA2014/000013**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.11.2015 WO15176730**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2014 E 14892456 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 3146965**

54 Título: **Inhibidores selectivos que interfieren con la interacción del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos y FRS2 para la prevención y el tratamiento de cáncer y otras enfermedades**

30 Prioridad:
22.05.2014 EA 201400495

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.12.2019

73 Titular/es:
LIMITED LIABILITY COMPANY "RUSSIAN PHARMACEUTICAL TECHNOLOGIES" (100.0%) Griboyedov canal nab. 130 Liter A off. 202 St.Petersburg 190121, RU

72 Inventor/es:
TJULANDIN, SERGEY ALEXEEVICH; BYAKHOV, MIKHAIL YUR'EVICH y TSIMAFEYEU, ILYA VALER'EVICH

74 Agente/Representante:
LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 734 649 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 selectivos que interfieren con la interacción del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos y FRS2 para la prevención y el tratamiento de cáncer y otras enfermedades

Descripción

Se sabe que el desarrollo de tumores malignos se basa en la proliferación en exceso de células y también en la formación de vasos sanguíneos en un tumor, a través de los cuales se alimenta (angiogénesis) (J. Folkman *et al.* Nature; 339, 58 (1989). Los nuevos vasos sanguíneos se forman a partir de endotelio ya existente y es un componente importante de muchas enfermedades y trastornos, incluyendo tales como crecimiento y diseminación de tumor, artritis reumatoide, psoriasis, aterosclerosis, retinopatía diabética, fibroplasia retrolental, glaucoma neovascular, hemangioma, rechazo inmunitario de córnea trasplantada y otros tejidos y también inflamaciones crónicas.

La proliferación de células tumorales, así como de células endoteliales puede provocarse por diversos factores que se producen directamente en la naturaleza. Estos factores se unen a receptores en la superficie de células tumorales, endoteliales y otras, lo cual conduce a activación de receptores y a la dirigir la señal al interior de la célula con la división subsiguiente.

Según abundantes datos, los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) a menudo se expresan en células tumores, lo cual conduce a proliferación de células del propio tumor y de endotelios, promoviendo la progresión tumoral. Los FGFR que normalmente activan mutaciones también cambian el avance de la enfermedad y la sensibilidad a la terapia administrada.

La familia de FGFR participa en procesos fisiológicos tales como angiogénesis, migración, proliferación, diferenciación y supervivencia de diversas células.

La familia cuenta con 18 factores, los cuales pueden dividirse condicionalmente en dos grupos: clásicos (FGF1-10, 16-18 y 20) y de tipo hormonal (FGF 19, 21 y 23) [Beenken *et al.* 2009]. El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) se une específicamente con FGFR representado por cinco tipos. Los tipos 1-4 de FGFR son receptores convencionales con actividad tirosina cinasa, es decir la parte intracelular está representada por tirosina cinasa. Los procesos de activación de tirosina cinasa y la transmisión de señales adicional dentro de una célula se basan en los procesos de fosforilación inherentes a todos los receptores como estos. La parte extracelular del FGFR consiste de 3 dominios de tipo inmunoglobulina; los dominios II y III contienen una región de unión a ligando. Debido al corte y empalme alternativo, el dominio III cambia de forma y se encuentra en dos estados - IIIb y IIIc. Esto puede influir en la fuerza de unión con el ligando y la actividad de los agentes terapéuticos dirigidos contra el receptor [Eswarakumar *et al.* 2005; Brooks *et al.* 2012]. Además, hay información sobre actividad proliferativa diferente de células tumorales cuando el FGF se une con diversas subunidades del dominio IIIc - 1 α o 1 β [Tomlinson *et al.* 2010]. FGF se refiere al grupo de proteínas de unión a heparina. Con el fin de transmitir la señal a una célula y activar procesos intracelulares, el FGF debe unirse con un receptor y heparán sulfato (heparina) en la superficie de la célula [Abuharbeid *et al.* 2006]. Esto diferencia al mecanismo de activación del receptor de FGF de otros factores, en particular de VEGF, para el cual no se necesita sulfato de heparina. Los FGF de tipo hormonal tienen baja afinidad por el sulfato de heparina. Cuando el FGF se une a un receptor, se activan las principales rutas intracelulares RAS-RAF-MAPK y PI3K-AKT-mTOR con propagación de señales al interior del núcleo [Turner *et al.* 2010]. El componente principal de la transmisión de señales desde el FGFR hasta cinasas intracelulares es la proteína FRS2 [Ong *et al.* 2000; Kouhara *et al.* 1997]. FRS2 es una "proteína de acoplamiento" que se activa cuando el FGFR se une con el ligando y forma un complejo con Shp2 y Grb2, debido a lo cual la activación de FRS2 desencadena la activación de ambas rutas de señalización RAS-RAF-MAPK y PI3K-AKT-mTOR.

En la actualidad, se han creado un gran número de medicamentos objetivo que bloquean/inhiben la actividad de diversos tipos de FGFR. Incluyen inhibidores de tirosina cinasa, y también anticuerpos monoclonales. Los inhibidores de tirosina cinasa existentes disminuyen la actividad de tirosina cinasa intracelular bloqueando diversas partes activas de la misma o, normalmente, varios receptores. El bloqueo no selectivo está asociado con reducción de eficacia del efecto en células tumorales, células vasculares y también otras estructuras que expresan el tipo relevante del receptor. Se sabe que la eficacia de anticuerpos monoclonales terapéuticos dirigidos contra FGFR puede disminuir considerablemente si el dominio III del receptor de FGF cambia de forma (IIIb y IIIc) [Wesche *et al.* 2011; Tsimafeyeu *et al.* 2012]. Lo mismo ocurre si el FGFR existe en una célula en diversas isoformas [Dienstmann *et al.* 2013]. Los inhibidores de bajo peso molecular existentes de tirosina cinasa no tienen una acción selectiva en un tipo del receptor de FGF, bloquean varios tipos de FGF, y también otros receptores. Por tanto, brivanib, dovatinib inhiben el FGFR y receptores del factor de crecimiento del endotelio vascular [Ayers *et al.* 2007; Sarker *et al.* 2008], ponatinib, BGJ398, AZD4547, JNJ-42756493, BAY 1163877 inhiben varios tipos de FGFR y, aunque en un menor grado, también receptores de factores de crecimiento de endotelio vascular y algunas otras cinasas [Gozgit *et al.* 2012; Arai *et al.* 2014; Gavine *et al.* 2012; Perera *et al.* 2014; Heroult *et al.* 2014]. Además, se muestra que células de un determinado tumor expresan su tipo de FGFR (por ejemplo, cáncer de riñón - FGFR1 [Tsimafeyeu *et al.* 2011], tipo luminal de cáncer de mama - FGFR1 [Tenhagen *et al.* 2012], cáncer de mama triple negativo - FGFR2

[Tannheimer *et al.* 2000], cáncer de estómago - FGFR2 [Xie *et al.* 2013], cáncer de vejiga - FGFR3 [Gust *et al.* 2013], etc.). Como consecuencia, no es necesario el bloqueo simultáneo de varios tipos de FGFR y puede conducir no solo a aumento de la toxicidad, sino también a reducción de la eficacia. Muchos trabajos muestran que los inhibidores de bajo peso molecular existentes de tirosina cinasa en concentraciones nanomoleculares suprimen la actividad de la tirosina cinasa intracelular del FGFR, aunque influyen débilmente en la fosforilación (actividad) de FRS2. En otras palabras, la interacción entre FGFR y FRS2, incluso cuando la actividad de la tirosina cinasa intracelular de FGFR se suprime, parece ser importante, y su ausencia puede ser un factor de resistencia. Por tanto, por ejemplo, no hay información sobre la acción de brivanib sobre FRS2 (Huynh *et al.* 2008); dovitinib influye en la fosforilación de FGFR 1/3 en concentración nanomolecular, y suprime en un menor grado la actividad de FRS2 (Zhang *et al.* 2014); ponatibib, como el inhibidor más selectivo de FGFR, inhibe la fosforilación de FGFR con CI50 dentro de los límites de 3-18 nmol/l, y FRS2, sólo 33-40 nmol/l (Gozgit *et al.* 2012); el inhibidor altamente selectivo AZD4547, que suprime la actividad de FGFR2 con CI50 dentro de los límites de 2 nmol/l, suprime la actividad de FRS2 cuando se usa una concentración de 100 nmol/l (Gavine *et al.* 2012). Esto significa que los inhibidores existentes tienen un efecto inhibidor indirecto débil sobre FRS2, además no producen interferencias con la interacción de FGFR con FRS2. Los documentos WO 2013/144339, WO 2013/129369 y WO 2008/079903 describen inhibidores de FGFR, el documento WO 2012/015723 describe compuestos anticancerosos. Ilya Tsimafeyev *et al.*: "Abstract 1737: Allosteric FGFR2 inhibitor RPT835 impacts on tumoral growth and neovascularization | Cancer Research", 1 de octubre de 2014, páginas 1-3, DOI: 10.1158/1538-7445.AM2014-1737 que se corresponde con los Proceedings: AACR Annual Meeting 2014; 5-9 abril, 2014; San Diego, CA da a conocer el acrónimo del compuesto RPT835 y su actividad pero sin estructura.

Esta invención describe inhibidores, cuyo mecanismo de acción incluye todo lo mencionado anteriormente:

- 1) Interferencia con la interacción de FGFR y FRS2, lo cual dará como resultado la reducción de fosforilación y pérdida de actividad por FRS2, y también de manera posible, pero no necesaria, alteración de la interacción con otros componentes del complejo FRS2.
- 2) Ausencia de influencia sobre la tirosina cinasa intracelular de FGFR y fosforilación del propio receptor.
- 3) Ausencia de efecto sobre la tirosina cinasa intracelular de otros receptores con actividad tirosina cinasa y sobre su fosforilación.
- 4) Sin unión con el centro activo de FGFR y el centro activo de otros receptores.
- 5) Interferencia selectiva con las interacciones de FRS2 principalmente con un tipo de FGFR, o en algunos casos- varios tipos de FGFR.

Además, se espera la ausencia de toxicidad expresada determinada por inhibidor como resultado de la acción selectiva.

Los inhibidores descritos en la invención interfieren con la interacción de FGFR con FRS2, lo cual influye considerablemente en la proteína FRS2, cuya actividad disminuye (ejemplo 1). Lo más importante en el mecanismo de acción de los inhibidores descritos es la ausencia de influencia sobre la actividad del FGFR común, y también de la parte intracelular del receptor representada por tirosina cinasa, y la ausencia de influencia sobre la actividad de otros receptores con actividad tirosina cinasa (ejemplo 2). Esto caracteriza la acción altamente selectiva de los inhibidores y hace hincapié en la importancia de la interacción alterada de FGFR-FRS2 sin necesidad de bloquear la actividad cinasa del receptor y otros mecanismos. Es importante observar que los inhibidores descritos no interaccionan con el centro activo de FGFR y no interfieren con la unión de FGFR con el ligando (ejemplo 3).

La reducción de la actividad de FRS2 (el principal conductor de la señal desde el receptor hasta las células intracelulares), conduce a la supresión de la transducción de señales dentro de la célula. Además, los inhibidores descritos pueden no influir inmediatamente sobre otros componentes de las rutas de señalización RAS-RAF-MAPK y PI3K-AKT-mTOR, lo que caracteriza su acción selectiva sólo en relación con la interacción de FGFR y FRS2 (ejemplos 4, 5). Para algunos tipos de inhibidores descritos, no puede excluirse la acción contra uno o varios componentes de rutas de señalización (ejemplo 6). Sin embargo, esto puede ser tanto una influencia independiente en la estructura componente de la ruta de señalización, como una consecuencia del bloqueo de FGFR-FRS2. Además, los inhibidores descritos pueden interferir con el complejo de FRS2 con Shp2 y/o Grb2, lo que puede conducir a potenciamiento del efecto, pero no es obligatorio, mientras lo principal en limitar la conducción de señales es el bloqueo de la interacción FGFR-FRS2 (ejemplo 7). Los inhibidores descritos pueden inhibir sólo un tipo de FGFR tal como se describe en el ejemplo 8 para FGFR2, o varios (ejemplo 6). En la mayoría de los casos debe excluirse la dependencia de la actividad inhibidora de la isoforma de un tipo determinado de FGFR (ejemplo 9).

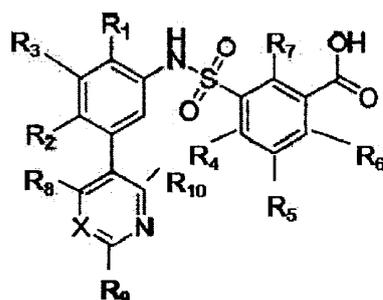
Tal interferencia selectiva con la interacción de FGFR y FRS2 conduce a los deseados efectos terapéuticos de los inhibidores descritos, por ejemplo, supresión de proliferación de migración de células endoteliales, formación de estructuras tubulares de los vasos, crecimiento de vasos maduros (ejemplos 10 y 11), supresión de proliferación de células tumorales (ejemplo 12), ralentización de crecimiento tumoral (ejemplo 13), desarrollo de necrosis en tumor

(ejemplo 14), ralentización del desarrollo de otras enfermedades (ejemplo 15). El efecto selectivo de los inhibidores descritos y la ausencia de efecto sobre otras dianas conduce a la reducción de toxicidad aparente, lo cual es extremadamente importante en el uso de agentes terapéuticos (ejemplo 16).

- 5 El principal objetivo de esta invención es el uso de inhibidores, que interfieren selectivamente con la interacción del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos con FRS2, y también con la interacción con otros componentes del complejo FRS2, con las propiedades descritas anteriormente. Las sustancias objeto de esta invención son inhibidores que interfieren con la interacción de FGFR de los 2 tipos y FRS2, definidos por la fórmula química I.

10

Fórmula I



- 15 R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀ pueden ser similares o diferentes y pueden incluir independientemente grupos -NH₂, -NO₂, -CH₃, -CH₂NH₂, -F, -Cl, -Br, -I, -CF₃, -OCH₃, -C₂H₅, -H, grupos alquilo primarios, secundarios y terciarios, grupo arilo, grupos alquenoilo, grupos alquinoilo, grupos heterocíclicos, grupos heterocíclicilalquilo, grupo alcoxilalquilo, grupos ariloxilalquilo, grupos heterocícliciloxilalquilo.

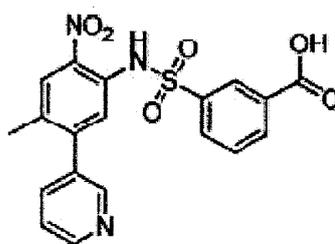
20

X puede presentarse mediante CH o N.

- Como ejemplo del inhibidor que interfiere selectivamente con la interacción del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos con FRS2 representado por la fórmula general I, en esta invención puede presentarse la sustancia química RPT835 demostrada mediante la fórmula II y en relación con ácido 3-(N-(4-metil-2-nitro-5-(piridin-3-il)fenil)sulfamoil)benzoico.

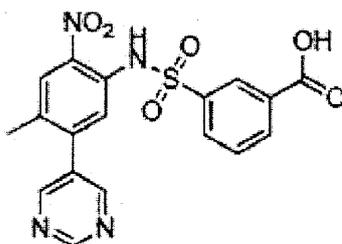
25

Fórmula II



- 30 Además, un inhibidor similar puede referirse a ácido 3-(N-(4-metil-2-nitro-5-(pirimidin-5-il)fenil)sulfamoil)benzoico y presentarse mediante la fórmula III

Fórmula III

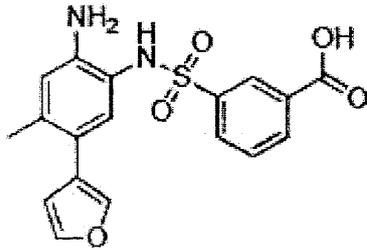


35

o se refiere a ácido 3-(N-(5-(furan-3-il)-4-metil-2-nitrofenil)sulfamoil)benzoico y presentarse mediante la fórmula IV,

40

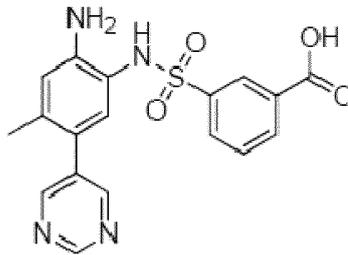
Fórmula IV



puede referirse a ácido 3-(N-(2-amino-4-metil-5-(pirimidin-5-il)fenil)sulfamoil)benzoico y describirse mediante la fórmula V.

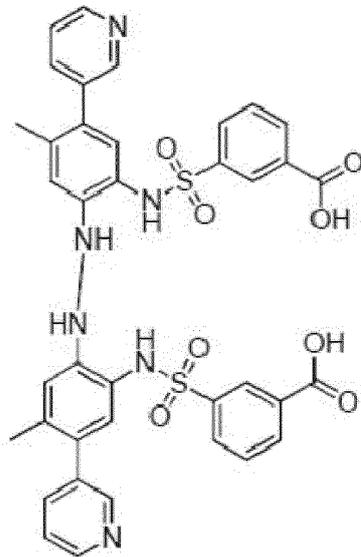
5

Fórmula V



10 Además, el inhibidor descrito puede combinarse con varios componentes seleccionados de las fórmulas I, II, III, IV, V. Por tanto, la fórmula química de tal sustancia combinada puede ser, por ejemplo, así (fórmula VI).

Fórmula VI

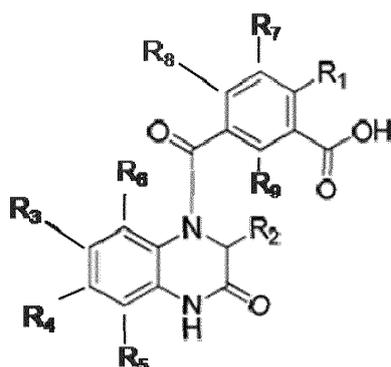


15

Otros inhibidores, que no se encuentran dentro de la invención, que interfieren con la interacción del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos y FRS2 puede seleccionarse de cualquier clase de sustancias descritas mediante las fórmulas VII-XI.

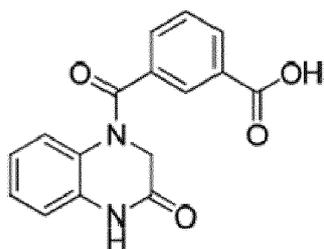
20

Fórmula VII

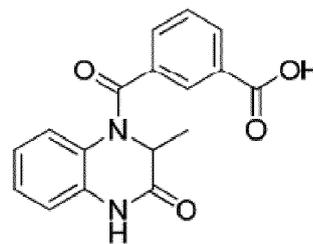


5 R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉ MOFYT pueden ser similares o diferentes y pueden incluir independientemente grupos -NH₂, -CH₂NH₂, -NO₂, -CH₃, -F, -Cl, -Br, -I, -CF₃, -OCH₃, -C₂H₅, -H, grupos alquilo primarios, secundarios y terciarios sustituidos o sin sustituir, grupo arilo sustituido o sin sustituir, grupos alquenoilo sustituidos o sin sustituir, grupos alquinilo sustituidos o sin sustituir, grupos heterocíclicos sustituidos o sin sustituir, grupos heterociclilalquilo sustituidos o sin sustituir, grupo alcoxilalquilo sustituido o sin sustituir, grupos ariloxilalquilo sustituidos o sin sustituir, grupos heterocicliloxilalquilo sustituidos o sin sustituir. Los ejemplos más simples de compuestos químicos que pertenecen a la clase según la fórmula VII pueden ser ácido 3-(3-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalin-1-carbonil)benzoico (fórmula VIII) y ácido 3-(2-metil-3-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalin-1-carbonil)benzoico (fórmula IX).

Fórmula VIII

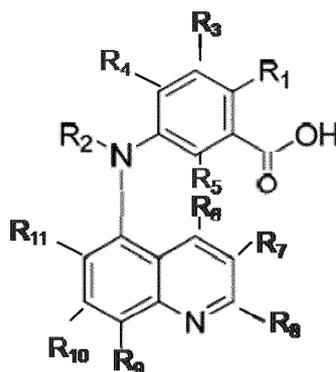


Fórmula IX



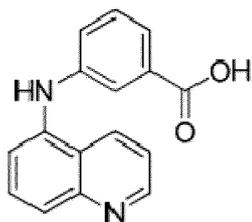
20 El inhibidor que interfiere con la interacción del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos y FRS2 puede seleccionarse también de una clase de sustancias descritas mediante la fórmula X.

Fórmula X



25 R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ MOFYT pueden ser similares o diferentes y pueden incluir independientemente grupos -NH₂, -CH₂NH₂, -NO₂, -CH₃, -F, -Cl, -Br, -I, -CF₃, -OCH₃, -C₂H₅, -H, grupos alquilo primarios, secundarios y terciarios sustituidos o sin sustituir, grupo arilo sustituido o sin sustituir, grupos alquenoilo sustituidos o sin sustituir, grupos alquinilo sustituidos o sin sustituir, grupos heterocíclicos sustituidos o sin sustituir, grupos heterociclilalquilo sustituidos o sin sustituir, grupo alcoxilalquilo sustituido o sin sustituir, grupos ariloxilalquilo sustituidos o sin sustituir, grupos heterocicliloxilalquilo sustituidos o sin sustituir. El ejemplo más simple de la sustancia química que pertenece a esta clase puede ser ácido 3-(quinolin-5-ilamina)benzoico con la fórmula XI

Fórmula XI



5 Además, el inhibidor puede incluir todas las estructuras descritas en las fórmulas I-XI y representar una sustancia combinada.

Las sustancias químicas representadas mediante las fórmulas I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI pueden presentarse mediante una sal, tautómero farmacéuticamente aceptables, sal de tautómero farmacéuticamente aceptable y su combinación.

10

Uso terapéutico de los inhibidores

15 Con el fin de usar los inhibidores descritos en esta invención en la práctica terapéutica es necesario que se administren a un mamífero, preferiblemente un ser humano, en la forma farmacéuticamente aceptable, que incluye inyección intravenosa, y también por los siguientes modos: vía oral, vía intramuscular, vía subcutánea, vía intraperitoneal, vía intracerebrospinal, vía intraarticular, vía intrasinovial, vía intratecal, local o inhalación. Los inhibidores también pueden administrarse por las vías intratumoral, peritumoral, intralesional y perilesional para garantizar el efecto local junto al efecto terapéutico sistemático.

20 Tales modos de administración incluyen portadores farmacéuticamente aceptables, que por su naturaleza no tienen ni acción tóxica ni terapéutica. Las sustancias auxiliares, que se usan para la preparación del medicamento basándose en el inhibidor descrito en la invención, dependiendo de la influencia sobre las características físicas y químicas y farmacocinéticas de las formas de dosificación, pueden dividirse en los siguientes grupos:

- 25
- formadoras
 - estabilizantes

30

 - prolongadoras
 - solubilizantes
 - correctoras

35 Pueden usarse portadores. Ejemplos de tales portadores son sustancias de intercambio iónico, alumbres, estearato de aluminio, lecitina, proteína sérica (tal como proteína plasmática humana), sustancias tampón, tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sal o electrolitos, tales como sulfato de protamina, fosfato de disodio, fosfato de dipotasio, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias con base de celulosa y polietilenglicol.

40

Los portadores para formas locales o a base de gel de los antagonistas incluyen polisacáridos, tales como la sal sódica de carboximetilcelulosa o metilcelulosa, polivinilpirrolidona, poliacrilatos, polímeros de bloque polioxi-etileno-polioxi-propileno, polietilenglicol y alcohol. En todos los casos, se usan para administración formas de dosificación regulares recibidas de almacenes. Tales formas incluyen, por ejemplo, microcápsulas, nanocápsulas, liposomas, tiritas, agentes medicinales de inhalación, aerosoles, comprimidos sublinguales y fármacos con liberación constante de la sustancia.

45

50 Algunos ejemplos adecuados de fármacos con liberación constante de la sustancia incluyen matrices semitransparentes de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el inhibidor; tales matrices tienen una forma determinada, por ejemplo pueden ser películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices con liberación constante son poliéteres, hidrogeles [por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxi-etilo)], descrito por Langer *et al.* (J. Biomed. Mater. Res. 15, 167 (1981) y Langer (Chem. Tech. 12 (1982), o poli(alcohol vinílico), polilactidas (patente estadounidense n.º 3773919), copolímeros de ácido de L-glutamina y gamma-etil-L-glutamato descritos por Sidman *et al.* (Biopolymers 22, 547 (1983), acetato de etilenvinilo no degradable (Langer *et al.* véase anteriormente), copolímeros de degradación de ácidos láctico y glicólico, tales como Lupron Depot™ (microesferas inyectadas que consisten en polímeros de ácidos láctico y glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico. Aunque tales polímeros tal como acetato de etilenvinilo y copolímero de ácidos láctico y glicólico son capaces de liberación

55

5 constante de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos más cortos de tiempo. Con el propósito de estabilización, pueden desarrollarse estrategias razonables basándose en el mecanismo que actúa. Por ejemplo, si se encuentra un mecanismo de agregación expresado en la formación de un enlace S-S intermolecular debido a intercambio tiodisulfuro, la estabilización puede conseguirse mediante modificación de residuos sulfhidrilo, liofilización para retirar disoluciones ácidas, control de humedad, use de aditivos apropiados y desarrollo de disoluciones de matriz poliméricas específicas.

10 Los compuestos con liberación constante del inhibidor también incluyen el encerramiento en liposomas. Pueden obtenerse liposomas que contienen inhibidores mediante los métodos conocidos en esta área, por ejemplo los descritos por Epstein *et al.* (Proc. Nat. Acad. Sci. 82, 3688 (1985); Huag *et al.* (Procc. Nat. Acad. Sci. 77, 4030 (1980); patente estadounidense n.º 4485045 y patente estadounidense n.º 4544545. Los liposomas normalmente tienen un valor pequeño (aproximadamente 200-800 ángstrom) y pertenecen al tipo de capa única, en los que el contenido de lípidos es mayor del 30% en mol de colesterol; la razón seleccionada puede cambiar para la selección de condiciones de terapia óptimas. Los liposomas con un largo periodo de circulación están cubiertos por la patente estadounidense n.º 5013556.

15 Otro modo de usar esta invención es la incorporación del inhibidor en el elemento, que tiene una forma determinada. Tales elementos pueden usarse para la modulación del crecimiento las células endoteliales y la angiogénesis. Además, tales productos pueden usarse para la modulación de invasión tumoral y de metástasis.

20 Es posible la conjugación del inhibidor descrito y otro agente de tratamiento. El inhibidor descrito puede usarse de diversos modos en combinaciones con otros medicamentos adyuvantes y/o terapéuticamente activos para potenciamiento de la acción terapéutica, y también para disminuir la frecuencia de efectos secundarios y acontecimientos indeseables.

25 La dosis requerida del inhibidor descrito durante la prevención y el tratamiento de una enfermedad dependerá del tipo de enfermedad, el grado de su gravedad y el avance, de si el inhibidor se inyecta para el propósito preventivo o terapéutico, de la terapia previa, de la historia clínica del caso del paciente y de su reacción al inhibidor y de las indicaciones del médico responsable. El inhibidor puede administrarse al paciente de diversos modos, simultáneamente o como una series de indicaciones, durante el periodo de tiempo cuando la terapia de inhibidor se considera eficaz según los criterios convencionales de la eficacia puestos en práctica en el momento de la indicación del inhibidor.

30 Los inhibidores descritos en la invención pueden usarse para el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos neoplásicos y no neoplásicos. Los tumores y estados próximos, que responden a tal tratamiento, por ejemplo, incluyen cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico y no microcítico, tumor de tráquea, cáncer de estómago, cáncer esofágico, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer pancreático, tumor de vías biliares y vesiculares, tumor gastrointestinal, cáncer de ovario, cáncer del cuello uterino, cáncer endometrial, hiperplasia endometrial, endometriosis, sarcoma, cáncer de cabeza y cuello, hepatoblastoma, melanoma, cáncer de piel, hemangioma, hemangioma cavernoso, hemangioblastoma, cáncer adrenal, retinoblastoma, astrocitoma, glioblastoma, tumor de la vaina de los nervios, oligodendroglioma, meduloblastoma, neuroblastoma, rabdioblastoma, leiomiomas, carcinoma de células renales, cáncer de vejiga y cáncer urotelial, cáncer de pene, cáncer de próstata, tumor de Wilms, tumores de células germinales, tumor neuroendocrino, tumores de sitio primario desconocido, leucosis y linfomas, proliferación vascular anómala asociada con facomatosis.

35 40 45 Existe una posibilidad de usar los inhibidores descritos para enfermedades no cancerosas, que responden a tratamiento incluyendo enfermedades tales como enfermedades reumáticas, enfermedades cardiovasculares, incluyendo aterosclerosis, enfermedades del sistema respiratorio, enfermedades del sistema digestivo, enfermedades del riñón, incluyendo glomerulonefritis, enfermedades de la piel, incluyendo psoriasis, retinopatías diabética y otras, fibroplasia, glaucoma neovascular, enfermedades endocrinas y enfermedades metabólicas, trasplante de cornea y otros tejidos, inflamaciones crónicas, ascitis, preeclampsia, derrame pericárdico (por ejemplo, conectado con pericarditis) y derrame pleural, enfermedades neurológicas.

50 55 60 Dependiendo del tipo de la enfermedad y su grado de gravedad, la dosis inicial que ha de administrarse a un paciente será de 0,001 mg/kg a 200 mg/kg, o más preferiblemente de 1 mg/kg a 100 mg/kg, o incluso más preferiblemente de 10 mg/kg a 50 mg/kg, y puede introducirse mediante una o varias prescripciones/administraciones separadas o mediante infusión continua. La dosis diaria habitual puede variar aproximadamente desde 1 mg/kg hasta 100 mg/kg y más, dependiendo de los factores anteriormente mencionados. Para prescripción repetida dentro del plazo de varios días y más, dependiendo de las condiciones, el tratamiento se repite hasta que se consigue la supresión deseada del síntoma de enfermedad. Sin embargo, pueden usarse otros modos de dosificación. El éxito del tratamiento se determina mediante métodos y análisis habituales, por ejemplo métodos para visualización del tumor por rayos X.

65 Según el uso de la invención, la eficacia del inhibidor en la prevención o el tratamiento de las enfermedades puede mejorarse mediante la administración del inhibidor en serie o combinado con otra sustancia eficaz para este propósito, tal como por ejemplo como el factor de necrosis tumoral, interferones, interleucinas; anticuerpos

monoclonales, “trampas” de factor de crecimiento y otros inhibidores capaces de neutralizar o inhibir la actividad del factor de crecimiento del endotelio vascular y/o sus receptores y/o el factor de crecimiento de hepatocitos y/o sus receptores y/o factor de crecimiento epidérmico y/o sus receptores y/o factor de crecimiento placentario y/o sus receptores y/o factor de crecimiento insulínico y/o sus receptores y/o factores de crecimiento de fibroblastos y/o sus receptores y/o mTOR y/o otras cinasas intracelulares, o uno o más agentes terapéuticos habituales, tales como por ejemplo compuestos alquilantes, antibióticos, antimetabolitos, antraciclinas, alcaloides de la vinca, epipodofilotoxinas, otros citostáticos. También es posible la combinación de inhibidores descritos en la invención con medicamentos antiinflamatorios, препаратами для лечения medicamentos para patología cardiovascular. Tales sustancias pueden estar presentes en la composición administrada o administrarse por separado. Además, el inhibidor según el método puede administrarse en serie o en combinación con tratamiento radiológico.

Se administran uno o más inhibidores a un paciente con un tumor dosis terapéuticamente eficaces, determinadas por ejemplo en observación de la necrosis tumoral o sus focos metastásicos, si es aplicable. Tal terapia continúa hasta que la mejora adicional deja de observarse, o la exploración clínica muestra que el tumor o sus metástasis desaparecieron. Si la enfermedad avanza, se administran una o varias de las sustancias anteriormente descritas o se usan otros métodos de tratamiento. Dado que la eficacia de las sustancias adicionales variará, es deseable comparar su influencia en el tumor mediante examen convencional. Se lleva a cabo administración repetida del inhibidor y un agente adicional hasta que se consigue el efecto clínico deseado. Alternativamente, el/los inhibidor(es) se introduce(n) combinado(s), si se desea, junto con sustancias adicionales. Se usan escalas de evaluación del efecto terapéutico convencionales para tratar otras enfermedades, por ejemplo enfermedades reumáticas, con inhibidores. Pueden usarse los inhibidores descritos en la invención con medicamentos de terapia concomitante y de apoyo, por ejemplo con eritropoyetina, agentes que estimulan la leucopoyesis o aumentan el número de trombocitos y/o neutrófilos, macrófagos, con apoyo nutricional, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, componentes de la sangre, corticoesteroides, ácido zoledrónico, anticuerpos contra RANKL, fármacos antieméticos, etc.

Se proporcionan a continuación varias pruebas de razonabilidad de usar los inhibidores descritos en la invención como ejemplos. Los ejemplos siguientes se proponen sólo como ilustración y no deben considerarse como algo que restringe esta invención.

Ejemplo 1 (resultados de la investigación): interferencia con la interacción de FGFR2 con FRS2 cuando se añade el inhibidor RPT835.

Para evaluar el efecto del inhibidor RPT835 caracterizado en esta invención mediante la fórmula II, se usaron células de cáncer de estómago KATO III, que expresan FGFR2, para la fosforilación de FRS2. Se añadió FGF-2 en concentración de 1 mg/ml y heparina 10 mg/ml a las células para la estimulación de FGFR. Se añadió RPT835 en diversas concentraciones. Una parte de las células se dejó sin adición del inhibidor, y una parte de las células, sin adición ni de inhibidor ni de agentes estimulantes (grupo de control).

Dos métodos convencionales para la evaluación del nivel de fosforilación de FGFR y FRS2:

- Método de inmunotransferencia de tipo Western usando trabajo manual;
- Electroforesis capilar automática e inmunodetección usando el sistema automático Wes™ (ProteinSimple; SantaClara, CA).

La estimulación de células KATO III con factor de crecimiento de fibroblastos condujo a un potenciamiento significativo de la actividad (fosforilación) de FGFR (4,3 veces), FRS2 α (11,4 veces), p44/42(MAPK, 12 veces) y AKT (4 veces) en comparación con las células sin estimular. La fosforilación de la proteína mTOR y la cinasa p70S6 se observó en menor grado (figura 1).

Cuando se añadió el inhibidor RPT835 a las células, se observó interferencia con la interacción entre FGFR y FRS2, lo que mostró en sí una considerable reducción de la fosforilación de FRS2 (figura 2) sin influencia en la fosforilación de FGFR general (figura 3). Además, la concentración inhibitoria media máxima de (CI50) FRS2 con el uso de inhibidor RPT835 fue menor de 10 nM.

Basándose en los datos obtenidos, puede concluirse que el FGF estimula la ruta de señalización completa desde el receptor de FGF hasta las cinasas intracelulares, incluyendo la interacción de FGFR y FRS2. El inhibidor RPT835 no influye en la actividad de FGFR, pero conduce a interferencia con la interacción de FGFR y FRS2, lo que a su vez afecta a la supresión de la actividad de FRS2 en la concentración nano-molar.

Ejemplo 2 (resultados de la investigación): el inhibidor RPT835 no influye en la actividad tirosina cinasa de FGFR.

El ejemplo previo mostró la ausencia de influencia del inhibidor RPT835 sobre la fosforilación de FGFR. En esta investigación, con el fin de refutar el mecanismo de acción de RPT835 como inhibidor de tirosina cinasa,

был оценен se examinó el nivel de FGFR general y fosfor-FGF antes y después de la adición de RPT835.

Como en el ejemplo 1, se usaron células de cáncer de estómago KATO III que expresaban fuertemente FGFR2. Una parte de células se estimuló con FGF-2 en concentración de 1 mg/ml y heparina 10 mg/ml. La otra parte de las células se dejó sin estimulación. Se añadió el inhibidor RPT835 en dosis de 1, 10, 100, 1000 nM a las células. El grupo de control se dejó sin adición de RPT835.

El nivel de fosforilación de FGFR se evaluó usando el método de inmunotransferencia de tipo Western convencional y electroforesis capilar automática con inmunodetección y el uso del sistema automático Wes™ (ProteinSimple; SantaClara, CA).

El inhibidor RPT835 no tuvo ningún efecto sobre la fosforilación de FGFR2 estimulado por FGF-2 (figura 4), es decir no mostró la actividad inhibitoria sobre tirosina cinasa ni siquiera en la máxima concentración.

Ejemplo 3 (resultado de la investigación): el inhibidor RPT835 no inhibe la unión de FGF-2 con FGFR2

Se llevó a cabo un ensayo de unión de FGF2 ligado a enzimas no radioactivo con el fin de evaluar si RPT835 influye sobre la unión de FGFR2 y el ligando (FGF-2). Se usó la proteína quimérica recombinante FGFR2-Fc, que consistía en el dominio extracelular humano FGFR2 α (IIIc) y fragmento Fc de IgG₁ humana en el ensayo de unión de FGF-2. FGFR2 α contenía los 3 dominios del tipo inmunoglobulina y representaba el dominio IIIc FGFR2 con alta afinidad por FGF-2. Se cubrió una placa de 96 cavidades con proteína FGFR2-Fc, y luego se añadió lo siguiente en las cavidades:

1) sólo FGF-2

2) FGF-2 + heparina

3) inhibidor RPT835 en diversas concentraciones + FGF-2 + heparina

4) una parte de las cavidades se mantuvo sin estimuladores (FGF-2 + heparina) y RPT835 (control negativo).

Tras la incubación, se llevó a cabo un inmunoensayo ligado a enzimas usando los anticuerpos correspondientes y la determinación subsiguiente de DO₆₅₀ (densidad óptica con longitud de onda de 650 nm).

En el primer grupo sin adición del inhibidor y heparina, FGF-2 mostró que se unía bien con la proteína FGFR2-Fc. La unión de FGF2 con el receptor fue dependiente de la dosis. En el segundo grupo, la adición de heparina mejoró la unión de FGF-2 con el receptor. En este caso, con el fin de lograr la misma fuerza de unión, puede usarse FGF-2 en dosis más pequeñas que sin heparina. En el grupo de control negativo, la señal fue negativa (menor que el 1% del control positivo). Los resultados se presentan en la figura 5. Confirman la importancia de este método: FGF-2 se une con FGFR2-Fc en presencia de heparina y sin ella.

La siguiente tarea fue evaluar la influencia del inhibidor RPT835 sobre la unión de FGF-2 y FGFR2-Fc. RPT835 en concentraciones de 1 a 1000 nM no influyó sobre la unión del ligando con el receptor (figura 6A). Con el fin de excluir el efecto inespecífico de RPT835 sobre la unión, se llevó a cabo un inmunoensayo ligado a enzimas más, en el que las cavidades se cubrieron con anticuerpo anti-FGF-2 inmovilizado. Se añadió FGF-2 \pm RPT835 en diferentes concentraciones a las cavidades. RPT835 en concentración de 1 a 1000 nM no influyó sobre la unión de FGF-2 con anticuerpo anti-FGF-2 (figura 6B).

Los resultados resumidos de la investigación prueban que el inhibidor RPT835 proporcionado como ejemplo en esta invención no interfiere con la unión del ligando (es decir FGF-2) con su receptor (es decir con FGFR2).

Ejemplo 4 (resultados de la investigación): interferencia con la interacción de FGFR con FRS2 durante el uso de inhibidores determinados mediante las fórmulas V, IX, XI

Los inhibidores V, IX, XI determinados en esta invención con las correspondientes fórmulas V, IX, XI, también interfieren con la transmisión de la señal desde FGFR hasta FRS2. Por medio de síntesis química se recibieron los compuestos especificados. Se cultivaron células de cáncer de estómago Snu16 que expresaban FGFR2 según el método convencional. Una parte de las células se dejó para control negativo, se añadió FGF-2 a la otra parte (control positivo). Los grupos terapéuticos incluyeron: adición del inhibidor según la fórmula V y estimulación subsiguiente de FGF-2, adición del inhibidor según la fórmula IX y estimulación subsiguiente de FGF-2, adición del inhibidor según la fórmula XI y estimulación subsiguiente de FGF-2. Se usó el método de inmunotransferencia de tipo Western para la evaluación del nivel de fosforilación de diversas cinasas.

Resultados: en células sin estimulación y sin tratamiento, los niveles de fosforilación de FGFR2, FRS2 fueron bajos (ausencia de fosforilación); las células después de la estimulación de FGF-2 tuvieron un alto nivel de actividad de

FGFR2 y FRS2 (14 y 17 veces superior que en el control negativo); en células a las que se les añadieron los inhibidores, el nivel de actividad de FGFR2 no cambió en comparación con el control estimulado por FGF-2, además no se notificó fosforilación de FRS2 (en todos los casos la concentración inhibitoria de CI50 fue menor de 10 nM). Además, se demostró que los inhibidores no inflúan sobre otras cinasas intracelulares, incluyendo Akt, Erk 1/2.

Se contó también el número de células. Las células sin adición de inhibidores y FGF-2 proliferaron débilmente, al contrario de las células a las que se les había añadido FGF-2. Al añadirse los inhibidores, el número de células fue comparable con el grupo de control negativo ($p=0,5$) y ciertamente menores que en el grupo con estimulación de FGF-2 y sin adición de inhibidores ($p<0,0001$).

Por tanto, las sustancias descritas en las fórmulas V, IX, XI son inhibidores selectivos de la interacción entre FGFR2 y FRS2, que influyen en la actividad proliferativa de las células tumorales que expresan FGFR.

Ejemplo 5 (resultados de la investigación): evaluación de la influencia de los inhibidores descritos en la invención sobre diversas cinasas intracelulares

Con el fin de demostrar la acción selectiva de los inhibidores sólo sobre la transmisión de la señal desde FGFR hasta FRS2 sin influencia sobre cinasas intracelulares, se midió el nivel de fosforilación de cinasas intracelulares, en particular p44/42(MAPK), Akt, mTOR, p70S6.

Con el fin de acceder al efecto del inhibidor RPT835, caracterizado en esta invención mediante la fórmula II, sobre la fosforilación de las cinasas enumeradas, se usaron células de cáncer de estómago KATO III, que expresan FGFR2. Se añadió FGF-2 en concentración de 1 mg/ml y heparina 10 mg/ml a las células para la estimulación de FGFR. Se añadió RPT835 en diversas concentraciones. Una parte de las células se dejó sin adición del inhibidor, y una parte de las células sin adición de tanto el inhibidor como de agentes estimulantes (grupos de control).

Con el fin de evaluar el nivel de fosforilación, se usaron 2 métodos convencionales:

- Método de inmunotransferencia de tipo Western usando trabajo manual;
- Electroforesis capilar automática e inmunodetección usando el sistema automático Wes™ (ProteinSimple; SantaClara, CA).

La estimulación de las células KATO III con factor de crecimiento de fibroblastos condujo a un potenciamiento significativo de la actividad (fosforilación) p44/42(MAPK, 12 veces), AKT (4 veces), en comparación con las células sin estimular. Se notificó que la fosforilación de la proteína mTOR y la cinasa p70S6 se producía en un grado menor.

Al añadirse el inhibidor RPT835, la actividad de las cinasas enumeradas no cambió en comparación con las células sólo estimuladas con FGF-2 (sin adición de RPT835). Los niveles de fosforilación se presentan en la figura 7.

Como consecuencia, RPT835 no tiene influencia sobre la fosforilación de otras cinasas intracelulares.

Ejemplo 6 (resultados de la investigación): evaluación de la influencia del inhibidor determinado mediante la fórmula VII sobre FGFR1, FGFR2, FGFR3, VEGFR1 y cinasas intracelulares.

Según el procedimiento descrito anteriormente, se analizaron los niveles de fosforilación de receptores de factor de crecimiento de fibroblastos tipos 1-3, FRS2, y también los niveles de fosforilación de VEGFR1 y las cinasas intracelulares PI3K, p44/42(MAPK), Akt, mTOR mediante el método de inmunotransferencia de tipo Western. En la investigación se usaron células endoteliales HUVEC, carcinoma de células renales humanas tipo Caki-1, células de cáncer de estómago KATO III. Todas las células mencionadas expresaban diversos tipos de los receptores mencionados. Tal como en el ejemplo 5, una parte de las células se estimuló con FGF-2 y/o VEGF-A, una parte de las células se cultivó con el inhibidor descrito mediante la fórmula VIII, una parte de las células se dejó sin estimulación ni tratamiento.

FGF-2 estimuló fuertemente la fosforilación de los tres tipos de FGFR, y también PI3K, Akt y FRS2 en comparación con las células sin estimular ($P<0,0001$ para todas las comparaciones). VEGF-A no tuvo efecto sobre FGFR de los tipos 1-3 y FRS2 ($P>0,3$ para todas las comparaciones), pero aumentó significativamente el nivel de fosforilación de VEGFR1, mTOR, PI3K, MAPK ($P<0,001$ para todas las comparaciones). El inhibidor mediante la fórmula VIII disminuyó significativamente la fosforilación de FRS2 (14 veces, $P=0,001$) y PI3K (10 veces, $P=0,017$) y débilmente - FGFR2 (1,5 veces) y FGFR3 (1,8 veces), VEGFR1 (2,3 veces). El inhibidor no tuvo influencia sobre otras cinasas. Además, el nivel de fosforilación de FGFR1 incluso aumentó (figura 8).

Como consecuencia, esta investigación demuestra una posible influencia de algunos inhibidores que interfieren con la interacción de FGFR2 y FRS2 sobre otras cinasas y receptores. Este efecto no puede negarse, y esto puede asociarse con los mecanismos principales (alteración de la unión de FGFR y FRS2), lo que conduce a una supresión

de la fosforilación por etapas de cinasas subyacentes. El efecto sobre otros receptores (por ejemplo, VEGFR1) no es pronunciado, pero es posible al igual que el cruzado. El aumento del nivel de fosforilación de FGFR1 puede usarse también en el futuro y desde el punto de vista terapéutico durante el uso de los inhibidores descritos en esta invención.

5 *Ejemplo 7 (resultado de la investigación): los inhibidores descritos en la invención pueden interferir con el complejo de FRS2 con Shp2 y/o Grb2*

10 Se sabe que FRS2 interacciona con Shp2 y Grb2, transmitiendo la señal a las cinasas intracelulares a través de estas proteínas. El propósito de esta investigación fue demostrar que los inhibidores descritos en la invención pueden influir sobre la interacción de FRS2 con Shp2 y Grb2, pero este no es el mecanismo de acción que los define: el principal mecanismo es la interferencia con la interacción de FGFR y FRS2.

15 Se sembraron células de cáncer de estómago Snu16 en placas de 96 cavidades con un tamaño de 90 µl/cavidad. Después de 24 horas de incubación en una incubadora humedecida a una temperatura de 37°C, 5% de CO₂ y 95% de aire a las células se les añadió el agente disuelto sometido a prueba descrito mediante la fórmula VI en el volumen de 100 µg/ml, y luego se añadió FGF-como un estimulador.

20 Tras los días de cultivación mediante el método de inmunotransferencia de tipo Western automatizado, se estudió el nivel de fosforilación de las siguientes proteínas: FGFR2, FRS2 α , FRS2 β , Shp2, Grb2 en las células. Tras otras 24 horas del cultivo, se contaron las células.

25 El inhibidor según la fórmula VI no suprimió la fosforilación de FGFR2 (no se encontraron diferencias con el control), sin embargo, suprimió significativamente, 12 veces, la fosforilación de FRS2 α y FRS2 β (CI₅₀<10 nM). Además, se observó cierta supresión de la fosforilación de las proteínas Shp2 y Grb2 (más de 10 veces) en algunas células. Por tanto, las células se dividieron en dos grupos mediante el factor de fosforilación de Shp2 y/o Grb2:

- grupo con supresión de la fosforilación de FRS2 y Shp2 y/o Grb2
- 30 - grupo con supresión de la fosforilación de FRS2 y sin influencia sobre la fosforilación de Shp2 y/o Grb2.

35 Tras el siguiente cultivo, el número de las células se igualó entre los grupos, y también con el control (estimulación de FGF-2, sin cultivo con el inhibidor). Véanse los resultados en la tabla 1. Como se puede observarse en la tabla, el inhibidor suprimió significativamente la proliferación de células tumorales en comparación con el control sin tener en cuenta la fosforilación de Shp2 y/o Grb2.

40 Como consecuencia, el factor definidor que tiene el efecto inhibitor sobre la proliferación de células tumorales es la interferencia con la interacción de FGFR y FRS2. En este caso, el nivel de fosforilación de Shp2 y/o Grb2 puede ser diferente, lo que no influye en la supresión de la actividad proliferativa mediante el inhibidor descrito en la invención.

Ejemplo 8 (resultado de la investigación): interferencia selectiva con la interacción de FGFR2 con FRS2 cuando se añade el inhibidor RPT835

45 El propósito de esta investigación fue la evaluación de la acción específica del inhibidor RPT835 especificado en esta invención con la fórmula II, sobre la interacción de FGF2 y FRS2 y la evaluación de la influencia sobre la interacción de otros tipos de FGFR y FRS2. Para el experimento, se seleccionaron 2 líneas celulares:

- de cáncer de estómago, KATO III, que expresan FGFR2, y
- 50 - de cáncer de mama, MDA MB 134, que expresan FGFR1.

55 El procedimiento de investigación fue el mismo que en los ejemplos anteriores: las células se cultivaron en presencia de RPT835 seguido por estimulación con FGF-2 y heparina. La otra parte de las células se cultivó en presencia de RPT835. Se evaluó la fosforilación de FGFR1 (en células de cáncer de mama) y FGFR2 (en células de cáncer de estómago), y también de FRS2 α (en ambas líneas celulares) y de algunas cinasas intracelulares (en células de cáncer de mama) usando inmunotransferencia de tipo Western manual y automatizada.

60 En células KATO III, el inhibidor RPT835 disminuyó completamente la fosforilación de FRS2 α (sistema FGFR2) al nivel inicial en una dosis de 100 nM. Se observó supresión de la fosforilación de FRS2 α en más del 50% en la concentración de 10 nM (figura 2). En este caso, no se observó ninguna influencia sobre la actividad cinasa del propio receptor (figura 3).

65 En las células de cáncer de mama MDA MB 134, el inhibidor RPT835 no tuvo influencia sobre la fosforilación de FRS2 α (sistema FGFR1), así como para el propio FGFR1, y tampoco sobre las cinasas intracelulares (figura 9). Como puede observarse en la figura, se observó algún aumento insignificante del nivel de fosforilación para algunas

cinastas intracelulares y FGFR1.

Por tanto, este ejemplo confirma la acción selectiva del inhibidor RPT835 y su actividad en el sistema FGFR2. El Inhibidor RPT835 influye sólo sobre la interferencia con la interacción de FGFR2 con FRS2 y no influye sobre la interacción de otros tipos de FGFR con FRS2.

Ejemplo 9 (resultados de la investigación): los inhibidores descritos en esta invención muestran actividad sin tener en cuenta la isoforma de FGFR

Se sabe que la aparición de diversas isoformas de FGFR puede influir sobre la actividad terapéutica de agentes medicinales que bloquean estos receptores. El objetivo de esta investigación fue demostrar que los inhibidores descritos en esta invención muestran actividad en relación con cualquier isoforma dentro de un tipo de FGFR.

La investigación evaluó la influencia del inhibidor RPT835 determinado mediante la fórmula II de esta invención, la intervención con la interacción de FGFR2 representado mediante las dos isoformas más frecuentes IIIb y IIIc con FRS2. Para esto, se escogieron una línea celular humana de osteoblastos embrionarios (hFOB) que expresaban sólo FGFR2 IIIc, y una línea celular humana de cáncer de mama SUM-52 que expresaba FGFR2 IIIb (todas las versiones principales de la isoforma - C1, C2, C3).

Las células se dividieron en los grupos:

1a) hFOB

1b) hFOB, estimulación de FGF-1 (100 ng/ml)

1c) hFOB, cultivo con RPT835 (1 micrómetro) y estimulación de FGF-1 (100 ng/ml)

2a) SUM-52

2b) SUM-52, estimulación de FGF-1 (100 ng/ml)

2c) SUM-52, cultivo con RPT835 (1 micrómetro) y estimulación de FGF-1 (100 ng/ml)

El Inhibidor RPT835 suprimió de manera fiable la proliferación de células de ambas líneas, que expresaban FGFR2 IIIc o FGFR2 IIIb (figura 10). Tampoco hubo diferencias significativas entre estos grupos durante la evaluación del nivel de fosforilación de FRS2 α (el inhibidor suprimió completamente la fosforilación) (figura 11).

Como consecuencia, el inhibidor RPT835 descrito en esta invención, muestra actividad en relación con cualquier isoforma dentro de los límites de un tipo de FGFR.

Ejemplo 10 (resultados de la investigación): actividad antiangiogénica de los inhibidores descritos en esta invención

Se usan dieciocho ratones híbridos de la 1ª generación F1 (C57B1/6 x DBA/2), machos con un peso de 22-30 g en la investigación. Se recibieron los ratones (número de nomenclatura M02.13.00011) de una sucursal del criadero "Stolbovaya". El método descrito anteriormente se usó en el experimento [Passaniti A., 1992]. Los grupos de control y experimental tuvieron al menos 3 ratones. Se prepararon alícuotas (1.000 mcl) de Matrigel (BD Biosciences) que contenían 60 unidades convencionales/ml de heparina, VEGF (200 ng/ml, BD Biosciences) o bFGF (100 ng/ml, BD Biosciences) sobre hielo. Se usó Matrigel que contenía 60 unidades convencionales/ml de heparina como control negativo. Se inyectó Matrigel en los ratones por vía subcutánea en la parte lateral del lomo. Tras la inyección, Matrigel forma rápidamente un implante de tipo gel sólido individual. Un peso del inhibidor se disolvió en DMSO hasta una concentración de 10⁻² M. Las alícuotas se congelaron hasta -20°C y se descongelaron inmediatamente antes de la inyección. No se permitió la congelación de nuevo de la disolución. Los objetos sometidos a prueba y convencionales se administraron por vía intraperitoneal en los días 0, 3 y 6 de la implantación de Matrigel: Bevacizumab en una dosis de 10 mg/kg y RPT835, 15 mg/kg. La descripción de los grupos se representó en la tabla 2. Siete días después de la administración de Matrigel, los ratones se durmieron con dietil éter para retirar el implante. Los implantes se fijaron durante 24-36 horas en formalina neutra al 10% y se encerraron en parafina para investigación histológica adicional.

La inyección por vía subcutánea de 1.000 mcl de Matrigel que no contenía factores de crecimiento no indujo la formación de microvasos ni la migración de células estromales y endoteliales en el implante. Se observó un aumento considerable del número de microvasos, estructuras tubulares y células migradas en general (para todos los indicadores p<0,001) en una inyección de Matrigel que contenía 100 ng/ml de bFGF. Un efecto similar se mostró tras la inyección de 200 ng/ml de VEGF (para todos los indicadores p<0,001).

Se observó una reducción considerable del número de células migradas, estructuras tubulares y microvasos funcionales tras la administración de sustancias que bloqueaban la actividad del estimulador correspondiente. La

administración de bevacizumab bloqueó completamente la angiogénesis en los implantes que contenían VEGF (para todos los parámetros de prueba $p < 0,001$), pero no la angiogénesis inducida por bFGF (para todos los parámetros de prueba $p > 0,05$). El inhibidor RPT835 inhibió eficazmente la angiogénesis estimulada por bFGF. El número de células migradas ($p < 0,001$), estructuras tubulares ($p = 0,016$) y microvasos funcionales ($p < 0,001$) disminuyó más de 2 veces en comparación con el grupo de control. Los resultados de la investigación se proporcionan en las figuras 12 y 13.

Por tanto, la investigación ha establecido que a una triple administración en una dosis de 15 mg/kg, el inhibidor RPT835 bloquea de manera estadísticamente significativa la angiogénesis estimulada por bFGF. Bevacizumab en el mismo modo de funcionamiento fue eficaz contra la angiogénesis estimulada por VEGF, pero no cuando se usó bFGF.

Los datos obtenidos sugieren que RPT835, como ejemplo de inhibidores descritos en esta invención es una sustancia antiangiogénica prometedora con un mecanismo de acción autocontenido.

Ejemplo 11 (resultados de la investigación): comparación de la influencia de los inhibidores descritos en esta invención y el inhibidor típico de tirosina cinasa de FGFR/VEGFR, brivanib, sobre la actividad proliferativa de endotelioцитos.

Se sembraron células endoteliales HUVEC en placas de 96 cavidades y se cultivaron durante 24 horas. Después de esto, se añadió lo siguiente a las células:

1) inhibidor RPT835, o

2) inhibidor descrito mediante la fórmula IX en esta invención, o

3) brivanib - inhibidor multi-cinasa de FGFR/VEGFR, y también a todas las células - FGF-2 en una concentración de 25 ng/ml.

Las células se cultivaron durante 96 horas en general y luego se calcularon.

Los resultados de la proliferación celular se presentan en la figura 14.

Los inhibidores descritos en esta invención (RPT835 e inhibidor mediante la fórmula IX) produjeron un efecto antiproliferativo pronunciado sobre células endoteliales al contrario que el inhibidor típico de tirosina cinasa de FGFR/VEGFR de brivanib.

Ejemplo 12 (resultados de la investigación): influencia del inhibidor RPT835 sobre la proliferación de células tumorales con diversa expresión de FGFR in vitro

La supresión de la actividad proliferativa de células tumorales durante el cultivo con los inhibidores descritos en esta invención ya se ha proporcionado en los ejemplos 4, 7, 9.

Esta investigación usó líneas celulares adicionales: SKOV3 (cáncer de ovario, ATCC n.º HTB-77), HS578T (cáncer de mama, ATCC n.º HTB-126), T47D (cáncer de mama, ATCC n.º HTB-1336), línea modificada de células de cáncer de pulmón no microcítico A549, línea de melanoma metastásico de piel Mel Kor (patente RF n.º 2287578), y estudio adicional de actividad antiangiogénica, línea celular SVEC-4-10 (células endoteliales, ATCC n.º CRL-2181).

Las células se cultivaron en un entorno RPMI-1640 (PANECO) (SKOV3, HS578T, T47D, Mel-Kor) o DMEM (PANECO) (SVEC-4-10) que contenían el 10% de suero bovino fetal (FCS, HyClone), glutamina 2 mM (PANECO), antibióticos (penicilina 100 UI/ml y estreptomycin 100 mg/ml (todo de PANECO)) a 37°C y CO₂ al 5%. Se usaron las células en una monocapa al 70-80% para los experimentos.

Las células se sembraron en baja densidad (30 t de células/ml) en tripletes en una placa de 96 cavidades en un entorno que contenía el 0,1% de suero FCS. Al día siguiente, el inhibidor RPT835 sometido a prueba se añadió en las cavidades en las concentraciones requeridas y después de 6 horas, el factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF 100 ng/ml (BD Bioscience)). El entorno, los antibióticos y los fármacos se cambiaron una vez por cada 3 días. El crecimiento de las células se determinó mediante el "método mitogénico de cristal violeta" modificado durante 7 días después del comienzo del experimento. Las células se aclararon con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 1% sobre PBS y se tiñeron con disolución de cristal violeta al 0,5%, Sigma Chemical Co sobre etanol. El tinte se disolvió en etanol y se midió en un espectrofotómetro a 540-560 nm. La curva de inhibición de la actividad proliferativa celular se perfiló mediante la dependencia del porcentaje de la cantidad celular (eje Y) sobre la concentración de inhibidor RPT835 en la cavidad de la placa (eje X). Se calculó la concentración de las muestras, comenzando desde la que el porcentaje de células supervivientes se volvió inferior al 50% (CI50), en el programa GraphPad Prizm 5. Los experimentos se repitieron al menos 3 veces con tres repeticiones por experimento.

La figura 15 muestra la acción antiproliferativa del compuesto RPT835 sobre cultivos de células tumorales y

endoteliales *in vitro*.

Como puede observarse a partir del diagrama, el inhibidor RPT835 suprimió la actividad antiproliferativa de células tumorales y endoteliales en diversos grados. El grado de inhibición de la proliferación dependió del estado de expresión de FGFR2: cuanto más se expresó el receptor, más eficaz fue el inhibidor RPT835. Por tanto, el efecto inhibitor máximo se observa cuando se usa una línea SVEC-4-10, que expresa fuertemente FGFR2. Un efecto moderado sobre la proliferación se encuentra en células con baja expresión de FGFR2 de SKOV3 y HS578T. El inhibidor RPT835 sometido a prueba no bloqueó la actividad proliferativa de la línea celular de melanoma metastásico Mel Kor y de cáncer de mama T47D, que apenas expresaban FGFR2.

El efecto inhibitor máximo se logró durante el cultivo del inhibidor RPT835 con una línea modificada células de cáncer de pulmón no microcítico A549, que tenía una expresión pronunciada de FGFR2 (CI50=10 nM/l).

Por tanto, en el estudio *in vitro*, el inhibidor RPT835 mostró que producía acción antiproliferativa sobre células tumorales y endoteliales, lo que se correlaciona con la intensidad de expresión de FGFR2. Esto enfatiza la actividad específica del inhibidor.

Ejemplo 13 (resultados de la investigación): inhibición del crecimiento tumoral in vivo dependiendo del nivel de la expresión de FGFR2 usando inhibidor RPT835

Se administró a hembras de ratones inmunodeficientes (desnudos) a la edad de 8 semanas 2×10^6 células tumorales de líneas celulares humanas con diversa expresión de FGFR2:

- línea celular de cáncer de mama triple negativo SUM52PE que expresa fuertemente FGFR2 (adquirida de Asterand, Inc. (Detroit, MI)
- línea celular de cáncer de mama triple negativo HS578T que expresa débilmente FGFR2 (adquirida de ATCC (CRL-125)
- línea celular cáncer de pulmón no microcítico NCI-H226 que no expresa FGFR2 (adquirida de ATCC (CRL-5826)

Después de que se estableciese el crecimiento tumoral (1 mm^3), los ratones se dividieron en grupos de control y con tratamiento según el tipo de tumor.

Grupo de control 1 (N=10): SUM52PE, administración de agua a través de una sonda estomacal, diariamente. Grupo con tratamiento 1 (N=10): SUM52PE, administración de inhibidor RPT835 a través de una sonda estomacal en una dosis de 30 mg/kg, diariamente.

Grupo de control 2 (N=10): HS578T, administración de agua a través de una sonda estomacal, diariamente. Grupo con tratamiento 2 (N=10): HS578T, administración de inhibidor RPT835 a través de una sonda estomacal en una dosis de 30 mg/kg, diariamente.

Grupo de control 3 (N=10): NCI-H226, administración de agua a través de una sonda estomacal, diariamente. Grupo con tratamiento 3 (N=10): NCI-H226, administración de inhibidor RPT835 a través de una sonda estomacal en una dosis de 30 mg/kg, diariamente.

El tamaño del tumor y el peso de los animales se midieron cada 3 días. Los ratones se sacrificaron cuando el tumor alcanzó el tamaño de 2000 mm^3 o en el día 60 del experimento.

El diagrama de crecimiento tumoral en los grupos 1 se presenta en la figura 16, el volumen tumoral está en la tabla 3. Se observó que los ratones a los que se administró inhibidor RPT835 tuvieron una ralentización significativa de crecimiento agresivo del tumor SUM52PE ($P < 0,000$, comenzando desde el 16° día del experimento).

En el 31^{er} día, el tamaño promedio del tumor en grupos varió más de 2 veces y se igualó al del grupo de control $2.712,2 \pm 37 \text{ mm}^3$, en el grupo con tratamiento $- 1.080,7 \pm 49 \text{ mm}^3$. La ralentización del crecimiento tumoral fue del 60,2%. Según las normas de la investigación (volumen tumoral $> 2.000 \text{ mm}^3$), a los ratones del grupo de control se les sacrificó. Se continuó la observación de los ratones del grupo con tratamiento. Se encontró estabilización de la enfermedad (ausencia de crecimiento tumoral durante el periodo de observación subsiguiente) en el grupo, lo que se evaluó como un efecto positivo. Como consecuencia, el inhibidor RPT835 demostró eficacia antitumoral en el experimento *in vivo* en relación con cáncer de mama triple negativo SUM52PE que expresaba fuertemente FGFR2.

El diagrama de crecimiento tumoral en los grupos 2 se presenta en la figura 17.

Tal como puede observarse en la figura, el inhibidor RPT835 también produjo cierta supresión de crecimiento tumoral del cáncer de mama triple negativo HS578T que expresaba débilmente FGFR2. Sin embargo, las diferencias

fueron menos significativas que usando el inhibidor RPT835 en el modelo de cáncer de mama triple negativo con expresión fuerte de FGFR2. Por tanto, el tamaño de tumor promedio en los grupos de control y con tratamiento 2 al 31^{er} día de investigación fue de $703 \pm 89,1 \text{ mm}^3$ y $1.053 \pm 179,8 \text{ mm}^3$, y al 40^o día de $1.104 \pm 162,2 \text{ mm}^3$ y $1.592 \pm 335 \text{ mm}^3$ ($P=0,01$) de manera correspondiente. La ralentización de crecimiento tumoral en el 31^{er} y el 40^o días fue del 33,2% y el 30,6%.

El diagrama de crecimiento tumoral en los grupos 3 se presenta en la figura 18.

En el 31^{er} día del experimento, no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de cáncer de pulmón no microcítico NCI-H226 que no expresaba FGFR2 entre los grupos de control y con tratamiento 3: el volumen tumoral promedio fue de $1.114 \pm 280,6 \text{ mm}^3$ y $1.053 \pm 259,7 \text{ mm}^3$ de manera correspondiente ($P=0,619$). Según los resultados de la investigación *in vivo*, se hicieron como principales conclusiones: 1) el inhibidor RPT835 proporciona una acción antitumoral pronunciada; 2) el grado de ralentización de crecimiento tumoral cuando se usa el inhibidor RPT835 depende del nivel de expresión de FGFR2.

Ejemplo 14 (resultados de la investigación in vivo): el inhibidor RPT835 produce patomorfosis por tratamiento de algunos tumores

Se les inoculó por vía subcutánea a ratones inmunodeficientes (desnudos, la edad de los ratones al inicio del tratamiento es de 8 semanas; criadero "Pushchino") células de FGFR2 de la línea de expresión de cáncer de ovario humano SKOV-3. Cuando se logró el volumen tumoral promedio de 200 mm^3 , los ratones se aleatorizaron en los grupos de control (quimioterapia convencional con paclitaxel y carboplatino) y con tratamiento (inhibidor RPT835). Hubo 10 ratones en cada grupo. Se asignó el inhibidor RPT835 en una dosis de 50 mg/kg, diariamente. Se midió el volumen tumoral dos veces por semana. Cuando el volumen tumoral alcanzó 2.000 mm^3 , se sacrificaron los ratones. Se estudió la patomorfosis del tejido tumoral.

No se encontró patomorfosis en el grupo de control (figura 19). El tejido tumoral no tuvo cambios.

Se observó patomorfosis terapéutica pronunciada tanto macroscópica como microscópica en el grupo con tratamiento cuando se usó inhibidor RPT835 (figura 20). Se encontró necrosis extensa en el tumor (por encima del 75% del tumor está representado por necrosis masiva, las células tumorales vivas permanecieron sólo en la periferia del tumor). También se observó daño temprano de vasos dentro de tejido aún vitalizado. Se observó distrofia en las células tumorales.

Por tanto, se sacó la conclusión de que el inhibidor RPT835 produce patomorfosis por tratamiento de algunos tumores, en particular, cáncer de ovario.

Ejemplo 15 (resultados de la investigación in vivo): eficacia de los inhibidores descritos en esta invención para enfermedades reumáticas.

Se usó el modelo de artritis inducida por colágeno en la investigación. Se indujo artritis en ratones mediante inyecciones intradérmicas de colágeno de tipo II en combinación con adyuvante de Freund. Los ratones se aleatorizaron en 2 grupos de 5 animales en cada uno:

- grupo 1: control, agua a través de una sonda durante 40 días.
- grupo 2: inhibidor descrito mediante la fórmula III en esta invención, 100 mg/kg, a través de una sonda durante 40 días.

En el 41^{er} día, se sacrificaron los ratones, se estudió el tejido.

Se encontró sinovitis, destrucción de cartílago, infiltración periarticular masiva de linfocitos T y B del tejido, neutrófilos en el grupo de control.

Sólo se encontró infiltración insignificante con neutrófilos individuales en el grupo con tratamiento.

Por tanto, los inhibidores descritos en la invención pueden ser eficaces para enfermedades reumáticas y enfermedades de tejido conjuntivo.

Ejemplo 16 (resultados de la investigación in vivo): los inhibidores descritos en esta invención no se siguen por desarrollo de toxicidad pronunciada.

Se evaluó la toxicidad del inhibidor RPT835 en estudios *in vivo* descritos en el ejemplo 13. Según el procedimiento convencional, se evaluaron todos los acontecimientos indeseables, así como la pérdida de peso por animales, cuando se usa el inhibidor en comparación con el grupo de control. No se encontró ni pérdida de peso ni ningún efecto secundario indeseable de la terapia en esta investigación.

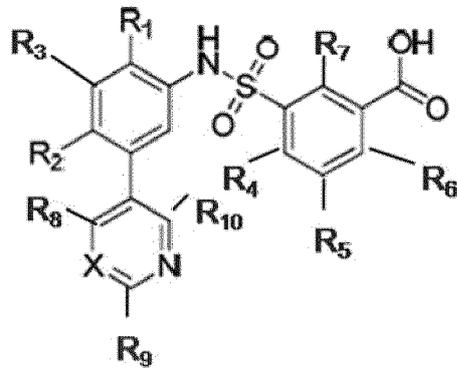
Además, se estudió la toxicidad aguda del inhibidor RPT835 en el siguiente volumen en una investigación separada:

- 5
- Se investigó la toxicidad aguda del medicamento. Los resultados de toxicometría, los datos de las observaciones de los animales de prueba durante 14 días después de la administración aguda y también los datos de necropsia permiten relacionar el medicamento con la clase IV de los de baja toxicidad (H. Hodge *et al.* Clinical Toxicology of Commercial Products. Acute Poisoning. Ed. IV, Baltimore, 1975, 427 p.; K.K. Sidorov, 1977). El estado de los animales después de administración aguda testifica la buena tolerabilidad del medicamento en dosis que exceden las máximas terapéuticas (aproximadamente 4,3 mcg/kg) en decenas y cientos de veces. La mediana de la dosis letal (DL₅₀) estuvo por encima de 2.000,0 mg/kg.
- 10
- Basándose en los resultados de la macro- y microscopía, el medicamento no tiene un efecto irritante sobre la membrana mucosa del tracto gastrointestinal después de una única administración.
- 15
- Según los resultados de la investigación de la acción mutagénica (aberraciones cromosómicas), el medicamento no tiene propiedades mutagénicas.
- 20
- El medicamento no muestra ninguna propiedad alérgica encontrada en la reacción de complejos inmunitarios, anafilaxia general, desgranulación de mastocitos y prueba conjuntival.

Basándose en los resultados de esta investigación, se ha llegado a una conclusión sobre la ausencia de toxicidad pronunciada del uso del inhibidor RPT835 como ejemplo de los inhibidores descritos en esta invención.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de la fórmula general I:



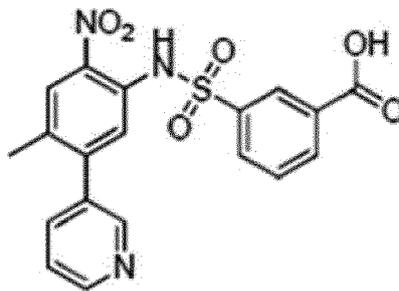
5

I.

10

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10 son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de -NH2, -NO2, -CH3, -CH2NH2-, -F, -Cl, -Br, -I, -CF3, -OCH3, -C2H5, -H, grupos alquilo primarios, secundarios o terciarios, grupos arilo, grupos alquenilo, grupos alquinilo, grupos heterocíclicos, grupos heterociclilalquilo, grupos alcoxialquilo, grupos ariloxialquilo, grupos heterocicliloaxialquilo; X es CH o N.

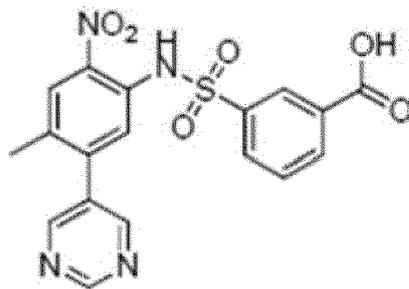
2. Compuesto según la reivindicación 1, que es un compuesto de la fórmula II:



15

II.

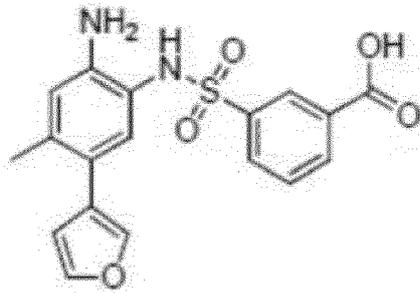
3. Compuesto según la reivindicación 1, que es un compuesto de la fórmula III:



20

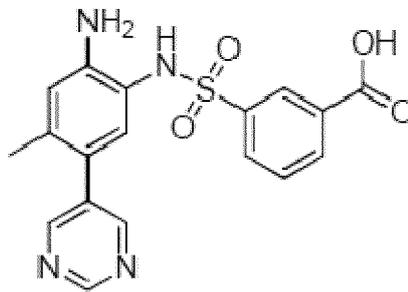
III.

4. Compuesto, que es un compuesto de la fórmula IV:



IV.

5. Compuesto según la reivindicación 1, que es un compuesto de la fórmula V:



5

V.

6. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y al menos un portador farmacéuticamente aceptable.
- 10 7. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, que comprende al menos un agente terapéuticamente activo adicional.
8. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para la prevención o tratamiento de cáncer.

Tablas y figuras

Tabla 1

Diferencias en la proliferación de células de cáncer de estómago Snu16 del grado de supresión de la fosforilación de cinasas intracelulares por el inhibidor determinado mediante la fórmula VI

Grupos	Comparación con grupo		
	Grupo de control	Grupo con supresión de la fosforilación de FRS2 y Shp2 y/o GRb2	Grupo con supresión de la fosforilación de FRS2 y sin influencia sobre la fosforilación de Shp2 y/o GRb2
Grupo de control	-	proliferación pronunciada , P<0.0001	Proliferación pronunciada , P<0.0001
Grupo con supresión de la fosforilación de FRS2 y Shp2 y/o GRb2	supresión , P<0.0001	-	Sin diferencias, P=0.8
Grupo con supresión de la fosforilación de FRS2 y sin influencia sobre la fosforilación de Shp2 y/o GRb2	supresión , P<0.0001	Sin diferencias, P=0.8	-

Tabla 2

Descripción de los grupos de control y de prueba en el experimento para estudiar las propiedades antiangiogénicas del inhibidor RPT835 (fórmula II en esta invención)

N.º	Grupo	Descripción
1	Control negativo	Matrigel sin factores de crecimiento
2	Control positivo 1	Matrigel + bFGF
3	Control positivo 2	Matrigel+ VEGF
4	Bevacizumab 1	Matrigel+ bFGF + Bevacizumab
5	Bevacizumab2	Matrigel+ VEGF+ Bevacizumab
6	Inhibidor RPT835	Matrigel+ bFGF + RPT835

Tabla 3

Tamaño del tumor (mediana, mm3) en grupos de control y con tratamiento 1 de cáncer de mama triple negativo SUM52PE usando el inhibidor RPT835 (fórmula II en esta invención) *in vivo*

Día	Control (Vehículo)	Inhibidor RPT835	Significancia de la diferencia, <i>P</i>
7	48.0	48.0	0.775
10	112.0	112.0	0.316
13	218.5	181.0	0.032
16	375.0	256.0	<0.0001
19	900.0	417.0	<0.0001
22	1,261.0	591.0	<0.0001
25	1,609.5	831.5	<0.0001
28	1,875.0	958.5	<0.0001
31	2,727.0	1,088.0	<0.0001
34	-	1,134	-
37	-	1,174	-
40	-	1,208	0.167*

* comparación entre días 34 y 40

Figura 1

FGF-2 estimula una ruta de señalización en células de cáncer de estómago KATO III implementada mediante FGFR 2

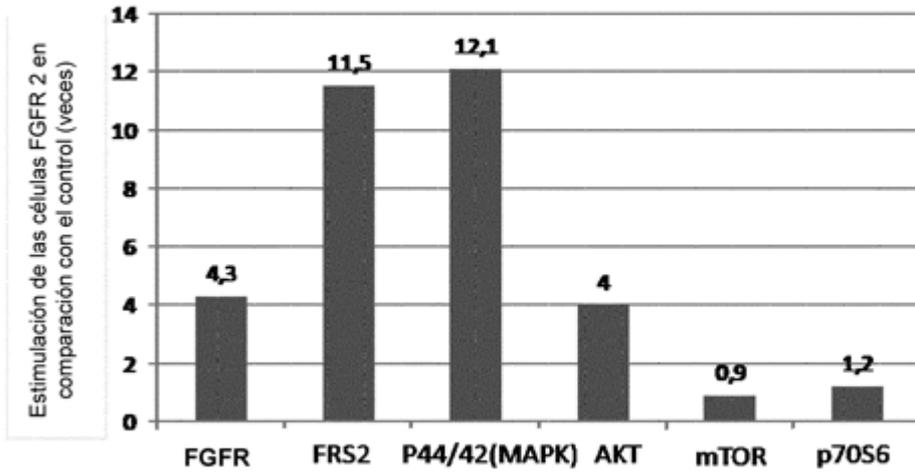


Figura 2

El inhibidor RPT835 (fórmula II en esta invención) conduce a reducción significativa de la fosforilación de FRS2

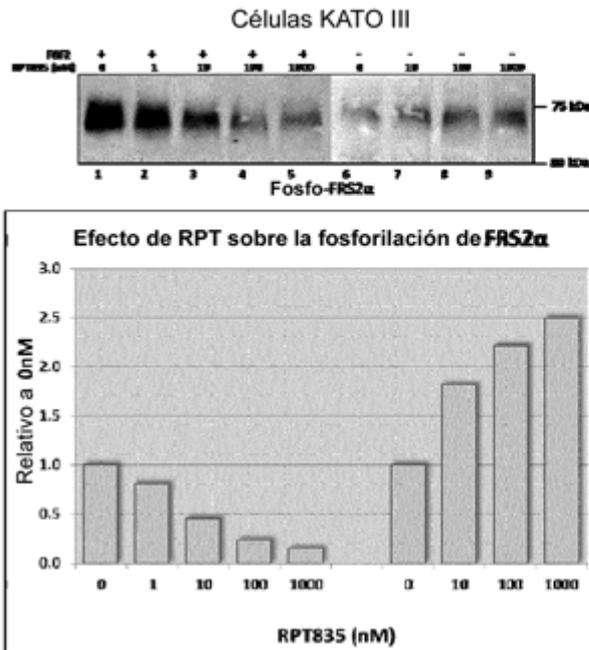


Figura 3

El inhibidor RPT835 (fórmula II en esta invención) no muestra influencia sobre la fosforilación de FGFR general tanto con como sin estimulación de FGF-2

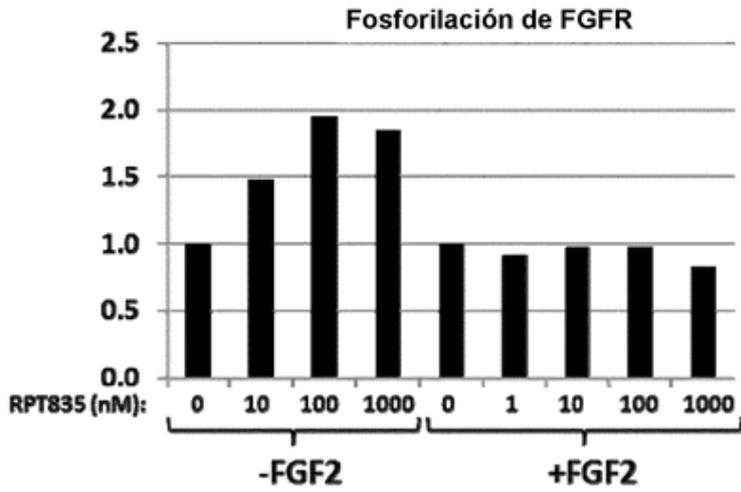


Figura 4

El inhibidor RPT835 (fórmula II en esta invención) no suprime la actividad tirosina cinasa de FGFR2

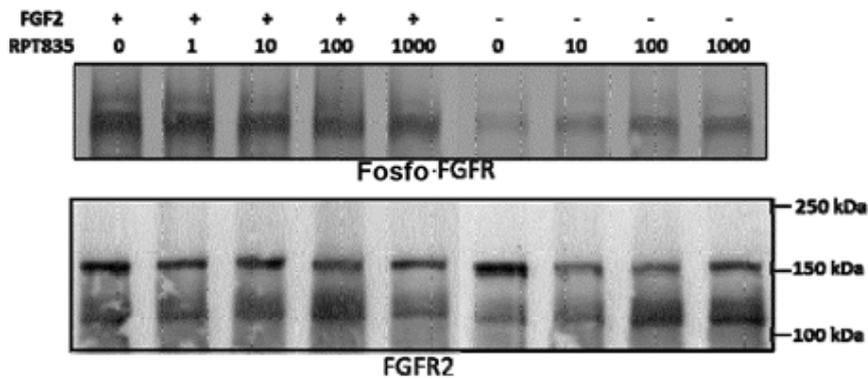


Figura 5

Unión de FGF2 con FGFR2-Fc en presencia de heparina o sin ella

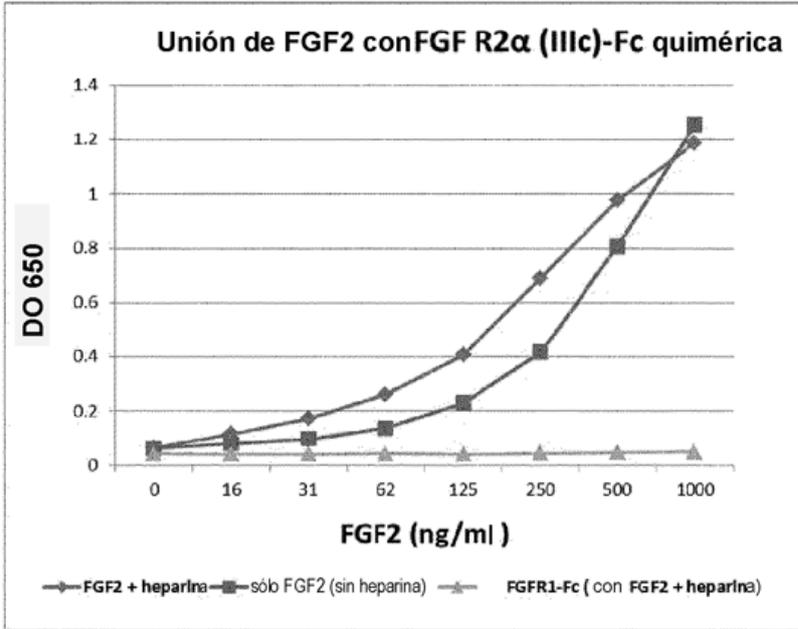


Figura 6

El inhibidor RPT835 (fórmula II en esta invención) no influye en la unión de FGF-2 con FGFR2-Fc o anticuerpo anti-FGF-2

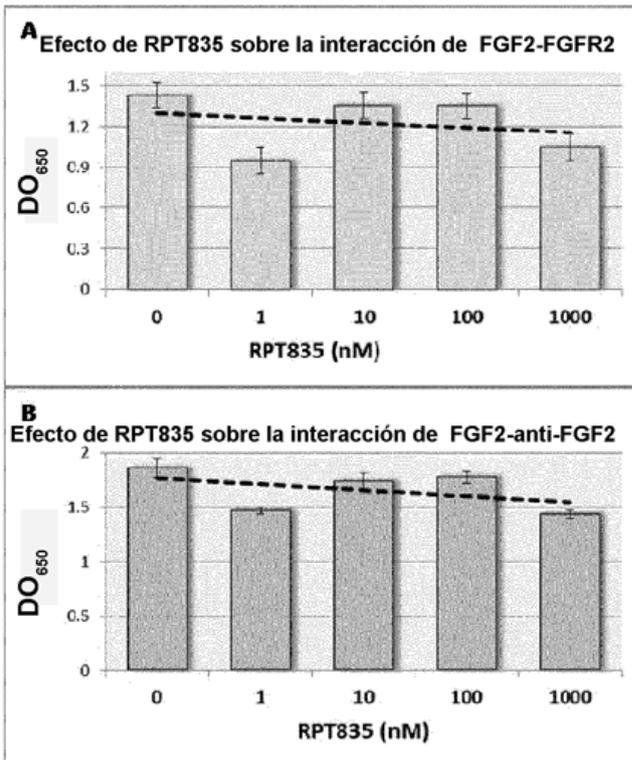
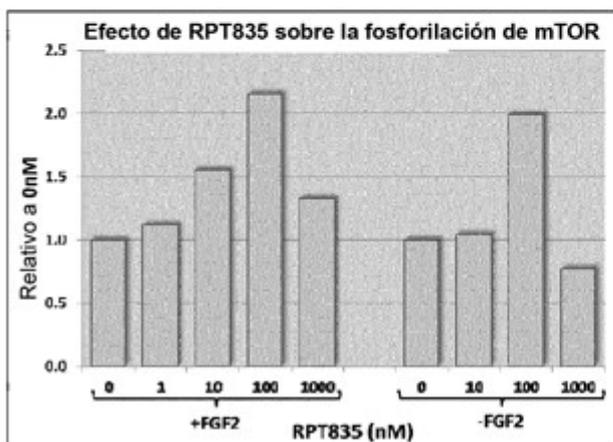
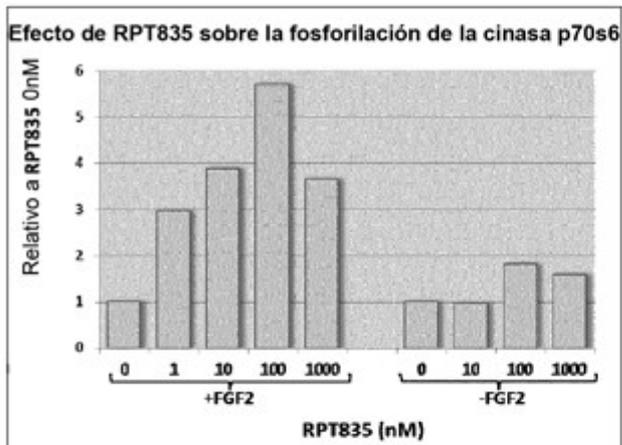
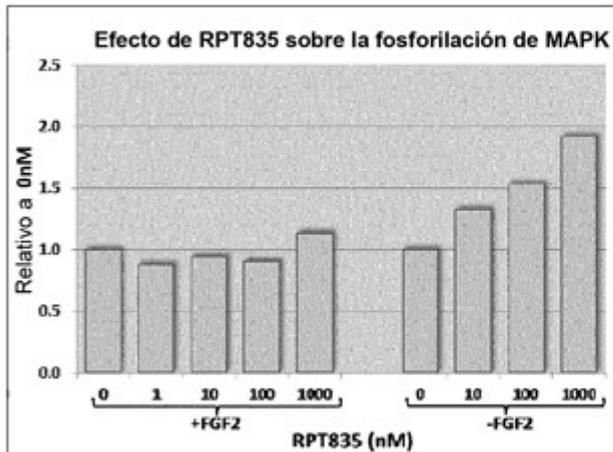


Figura 7

El inhibidor RPT835 (fórmula II en esta invención) no influye en la fosforilación de cinasas intracelulares tales como p44/42(MAPK), Akt, mTOR, p70S6.



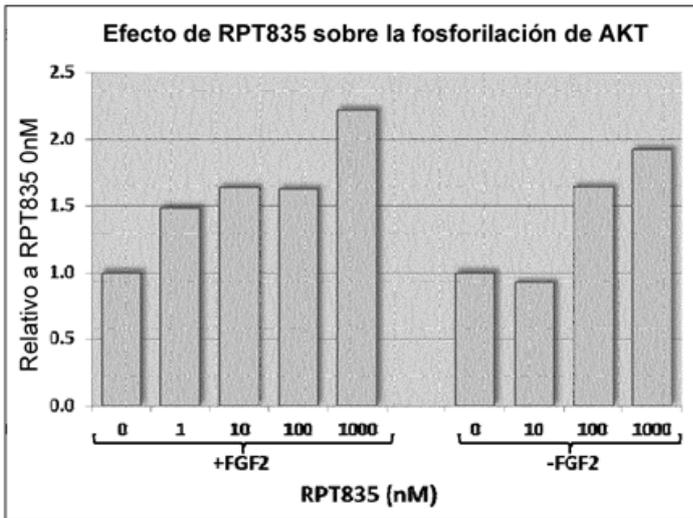


Figura 8

Fosforilación de FGFR1 usando diversas concentraciones del inhibidor descrito mediante la fórmula VIII

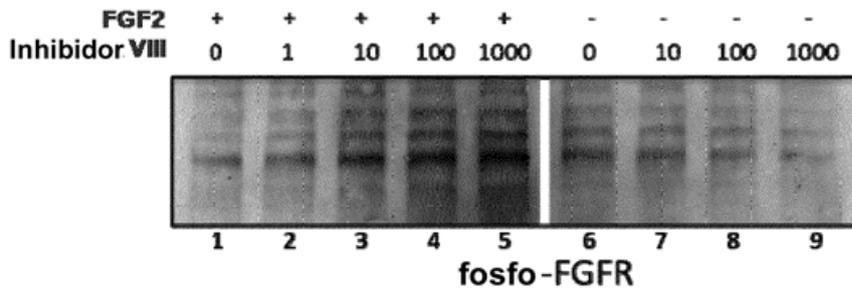
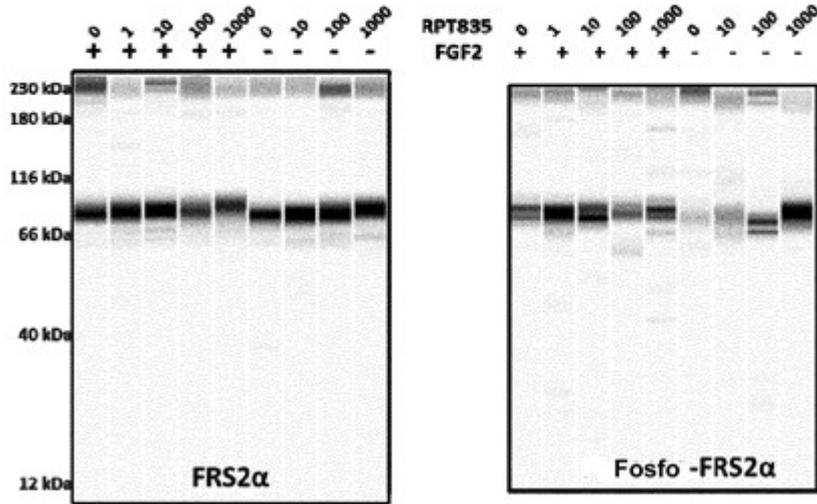


Figura 9

El inhibidor RPT835 (fórmula II en esta invención) no influencia sobre la fosforilación de FRS2 α (A), FGFR1 general, cinasas intracelulares (B) tanto con como sin estimulación de FGF-2

A



B

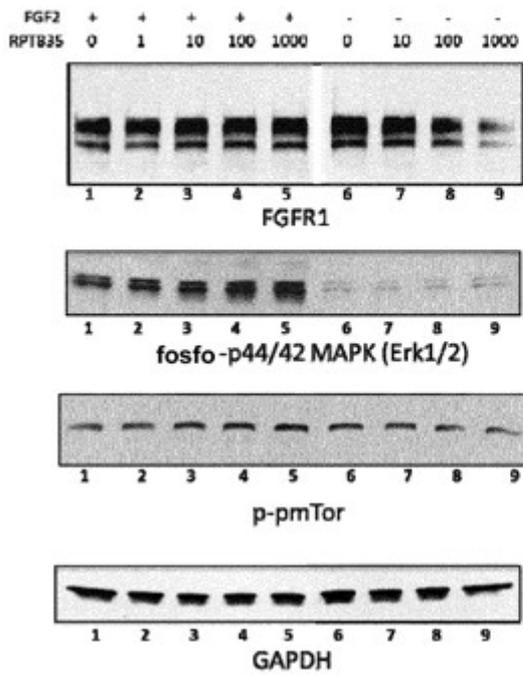


Figura 10

Proliferación de células que expresan FGFR2 III banda IIIc durante el cultivo con el inhibidor RTP835 (fórmula II en esta invención)

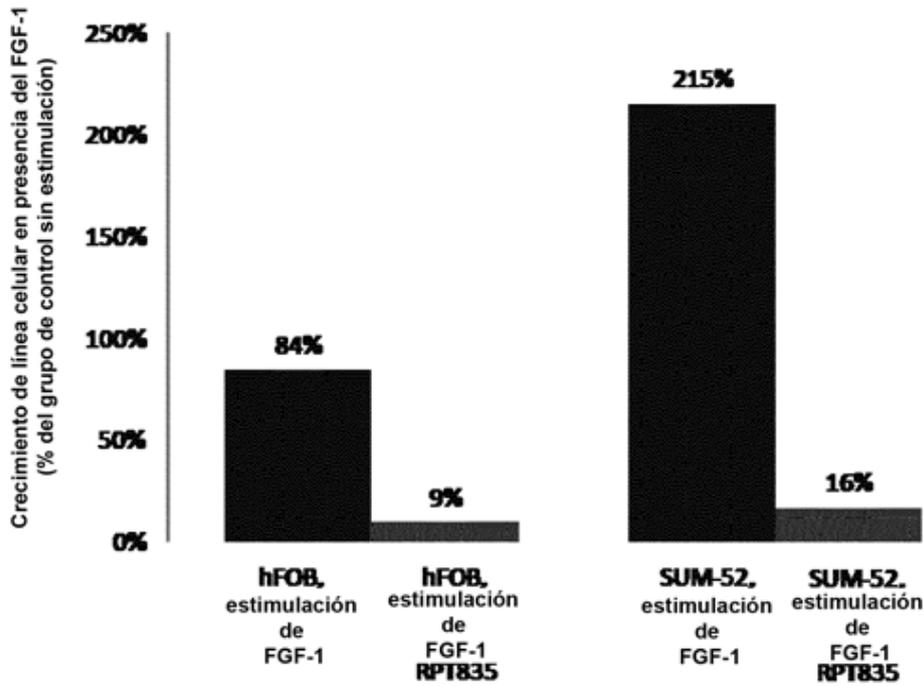


Figura 11

El inhibidor RTP835 (fórmula II en esta invención) conduce a una disminución significativa de la fosforilación de FRS2 α en líneas celulares que expresan FGFR2 IIIb o FGFR2 IIIc (evaluación mediante el método de inmunotransferencia de tipo Western)

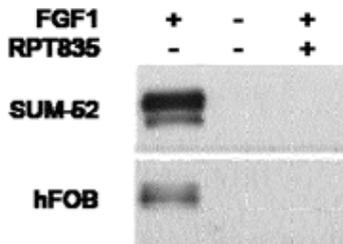


Figura 12

Influencia de Bevacuzimab (10 mg/kg) y el inhibidor RPT835 (fórmula II en esta invención) (15 mg/kg) sobre la actividad angiogénica de implantes de Matrigel. Microfotos de cortes de implantes de Matrigel de diversos grupos de control y de prueba. Tinción con hematoxilina y eosina. Aumento x200.

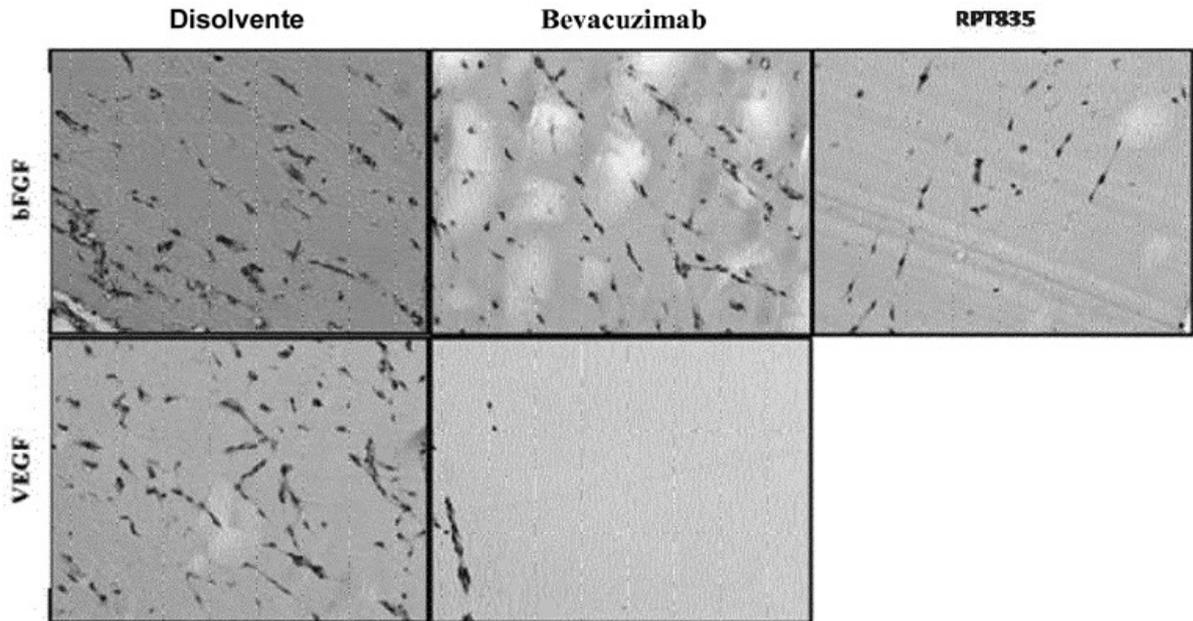


Figura 13

Influencia de Bevacuzimab (10 mg/kg) y el inhibidor RPT835 (fórmula II en esta invención) (15 mg/kg) sobre la actividad angiogénica de implantes de Matrigel: número de células migradas (A), estructuras tubulares (B) y microvasos funcionales (C). * - $p < 0.001$; ** - $p = 0.016$.

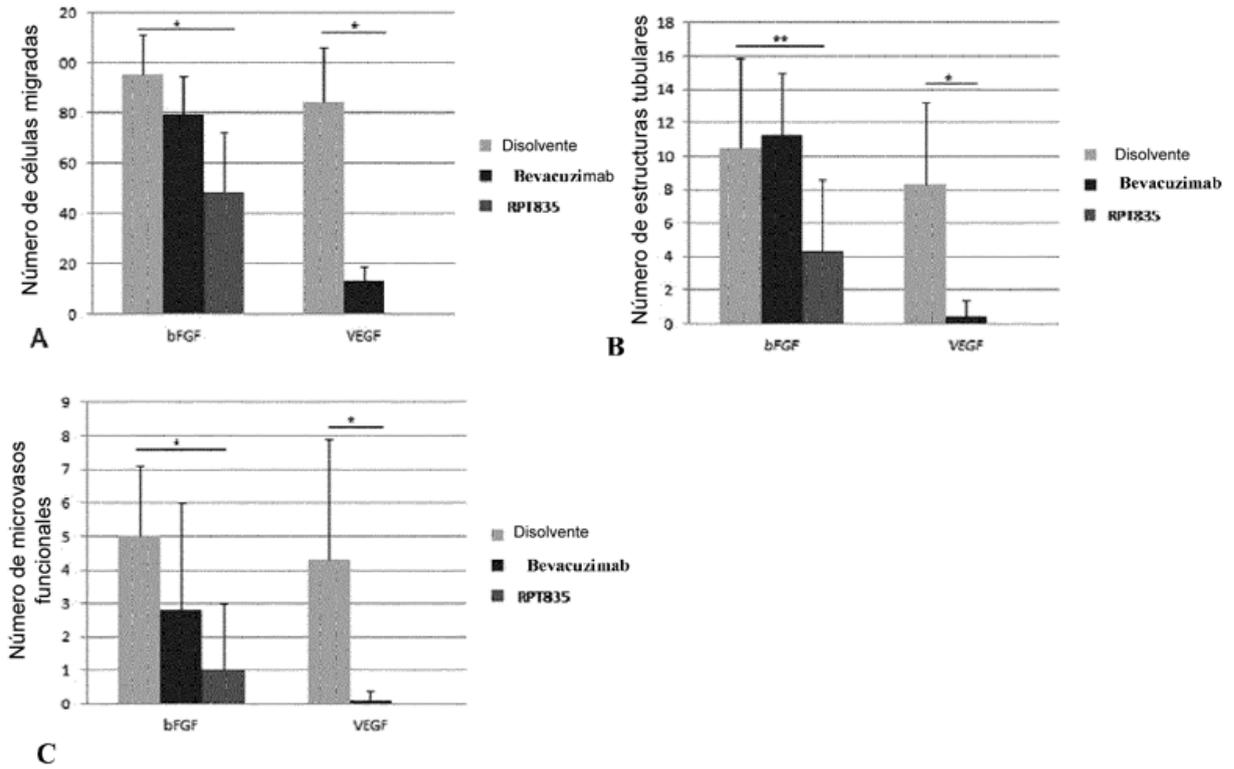
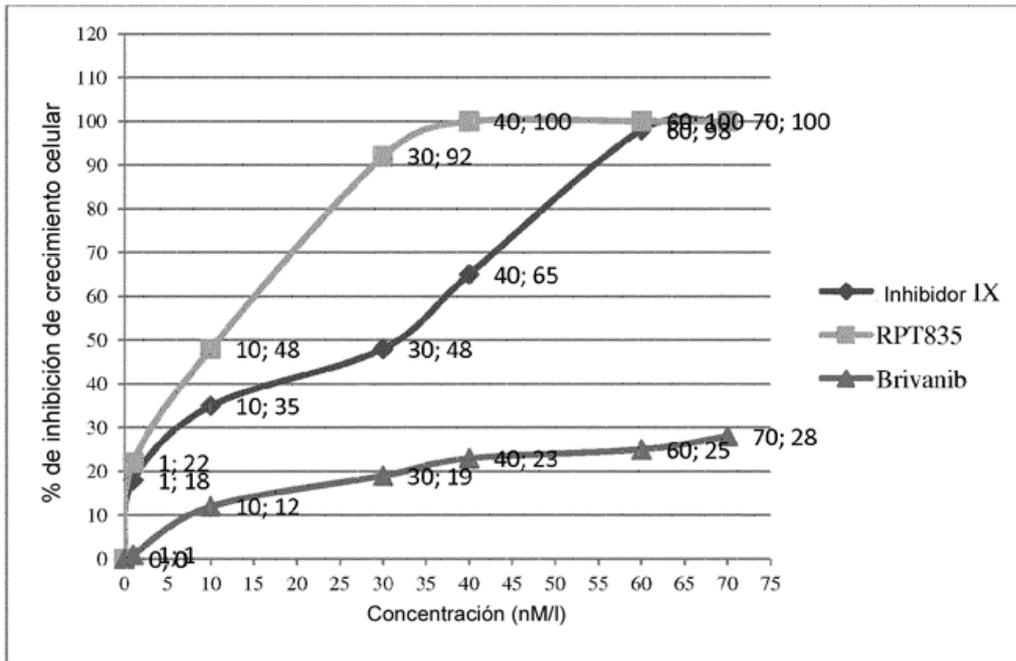


Figura 14

Supresión de la proliferación de células endoteliales HUVEC con inhibidores añadidos descritos en esta invención en comparación con el inhibidor típico de tirosina cinasa - brivanib



Línea celular	Estado de FGFR2	Supresión del crecimiento celular, CI50, nmol/l		
		Inhibidor IX	RPT835	Brivanib
HUVEC	Amplificación	32	11	289

Figura 15

Inhibición de la actividad proliferativa del tumor y células endoteliales con inhibidor RPT835 (fórmula II en esta invención) *in vitro*

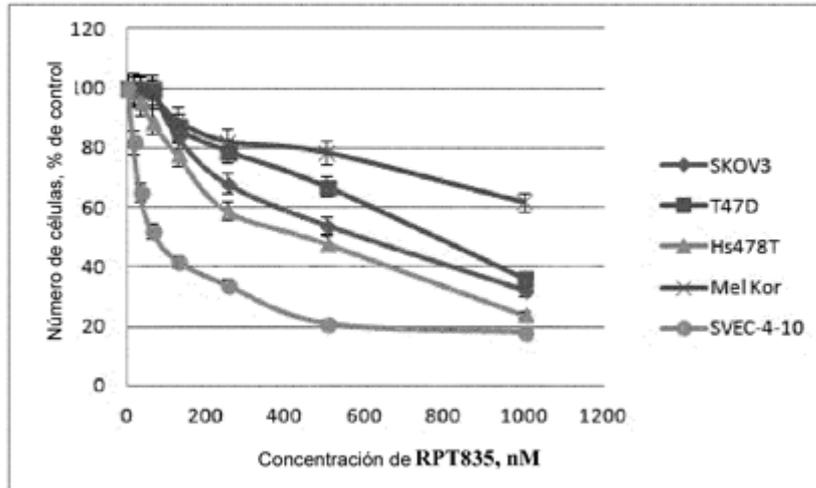


Figura 16

Inhibición de crecimiento tumoral de cáncer de mama triple negativo SUM52PE usando el inhibidor RPT835 (fórmula II en esta invención) *in vivo*

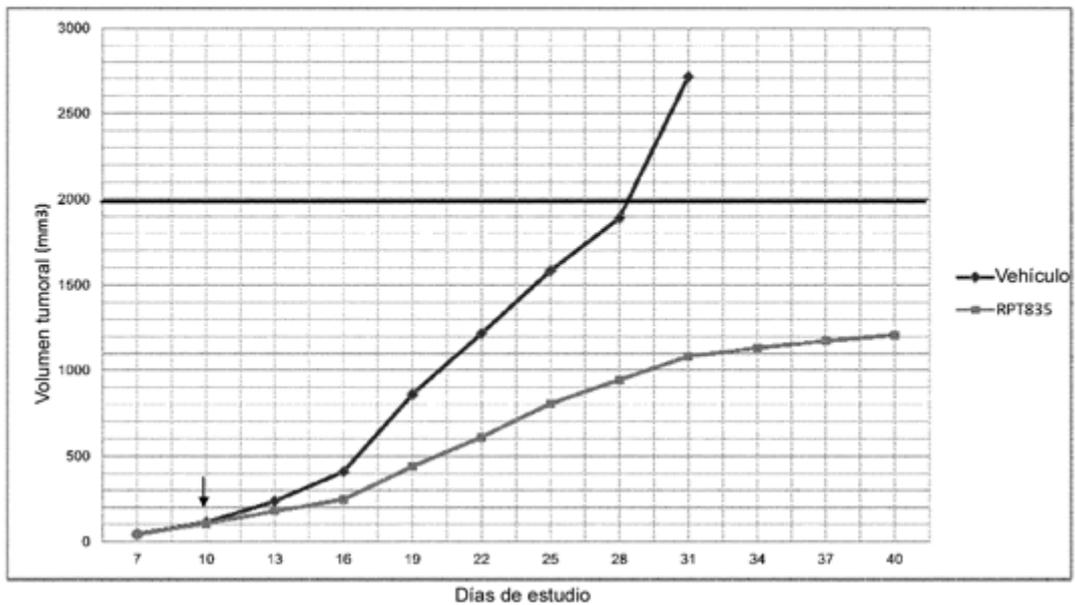
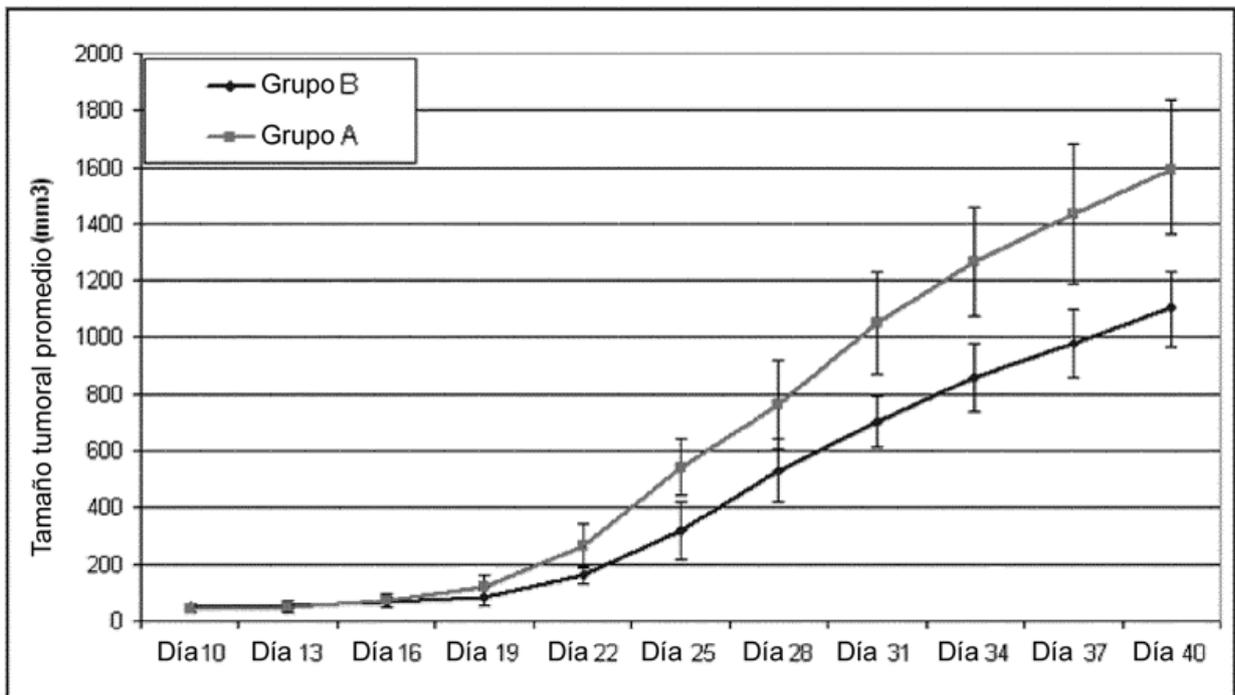


Figura 17

Inhibición de crecimiento tumoral de cáncer de mama triple negativo HS578T usando el inhibidor RPT835 (fórmula II en esta invención) *in vivo*



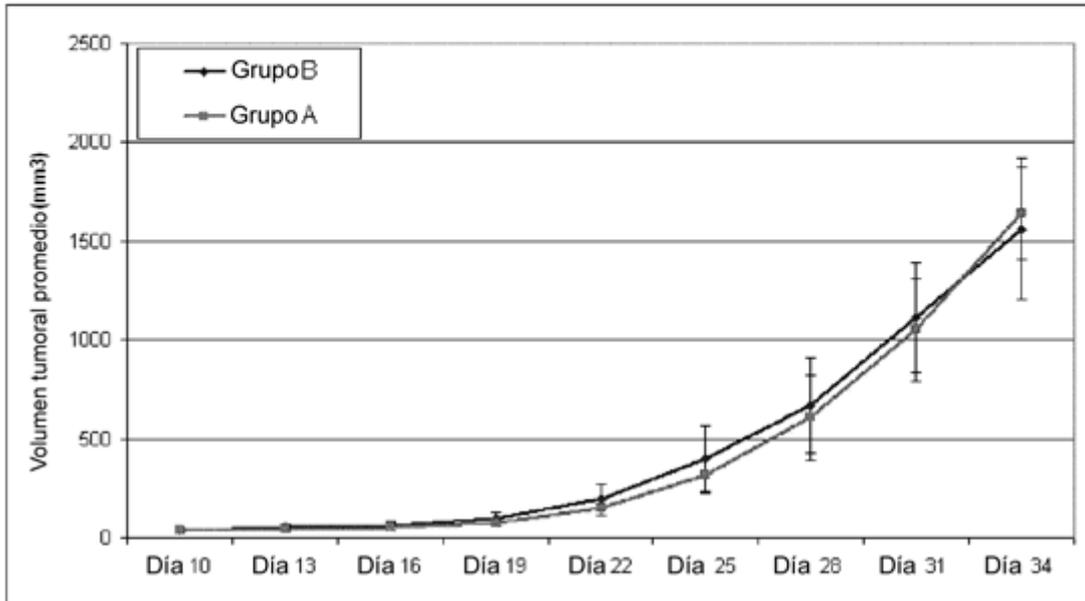
Designaciones:

Grupo A - grupo de control 2

Grupo B - grupo con tratamiento 2

Figura 18

Actividad antitumoral del inhibidor RPT835 (fórmula II en esta invención) *in vivo* en el modelo de cáncer de pulmón no microcítico NCI-H226 que no expresa FGFR2



Designaciones:

Grupo A - grupo de control 3

Grupo B - grupo con tratamiento 3

Figura 19

Ausencia de patomorfosis en el tejido de tumor de ovario SKOV-3 en el grupo de control (quimioterapia convencional)

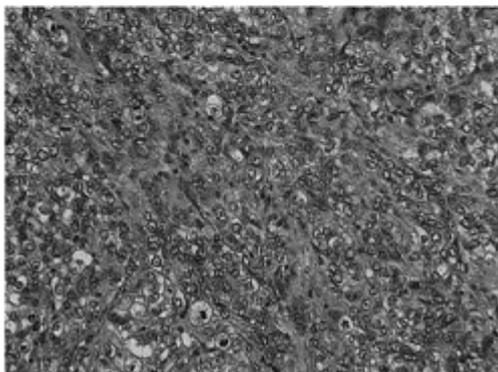
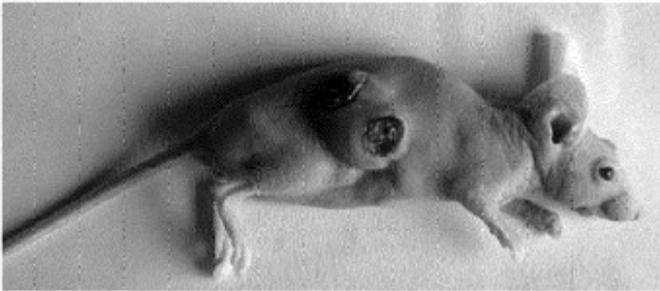


Figura 20

Patomorfosis terapéutica pronunciada en el tejido de tumor de ovario SKOV-3 en el grupo con tratamiento de inhibidor RPT835 (fórmula II en esta invención)

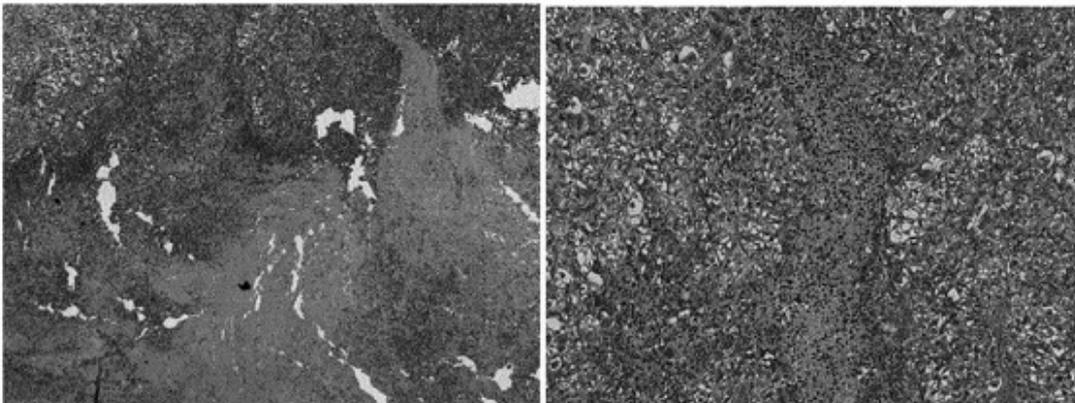
A

Cambios necróticos del tumor (macroscópicos) de un animal de laboratorio



B

Necrosis extensa en el tejido del tumor (más del 75% del tumor está representado por necrosis masiva, las células tumorales vivas permanecieron sólo en la periferia del tumor)



C

Daño de vasos dentro de tejido aún vitalizado. Se observa distrofia en las células tumorales.

