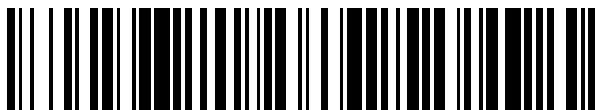


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 842 334**

(51) Int. Cl.:

**A61P 35/02** (2006.01)  
**A61P 31/00** (2006.01)  
**A61K 31/7068** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.10.2008 PCT/US2008/011977**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2009 WO09051848**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2008 E 08839636 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2020 EP 2217229**

---

(54) Título: **Composiciones farmacéuticas para modular una cascada de cinasas y métodos de uso de las mismas**

(30) Prioridad:

**20.10.2007 US 999943 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.07.2021**

(73) Titular/es:

**ATHENEX, INC. (100.0%)**  
Conventus Building, 1001 Main Street, Suite 600  
Buffalo, NY 14203, US

(72) Inventor/es:

**HANGAUER, DAVID, G.**

(74) Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**Observaciones:**

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

**ES 2 842 334 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

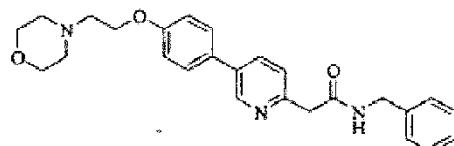
Composiciones farmacéuticas para modular una cascada de cinasas y métodos de uso de las mismas

## CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)-N-bencilacetamida (compuesto (I)) y a sus sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, una sal de mesilato. También se desvelan métodos de uso de dichas composiciones.

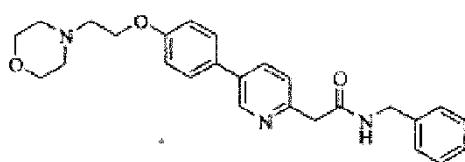
## ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere a una combinación de: (a) una composición farmacéutica que comprende (i) 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)-N-bencilacetamida (compuesto (I)):



o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde el compuesto está presente en una cantidad que varía desde 10 mg hasta 300 mg por dosis, y en donde la composición se formula para administración oral, intravenosa, intramuscular o subcutánea dos o tres veces al día; y (b) gemcitabina; para uso simultáneo o secuencial en el tratamiento de un cáncer o trastorno de proliferación celular.

La invención se refiere a una combinación de: (a) una composición farmacéutica que comprende (i) el compuesto (I):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde el compuesto está presente en una cantidad que varía desde 20 mg hasta 600 mg por dosis, y en donde la composición se formula para administración oral, intravenosa, intramuscular o subcutánea una vez al día; y (b) gemcitabina; para uso simultáneo o secuencial en el tratamiento de un cáncer o trastorno de proliferación celular.

El compuesto (I) se desvela y reivindica específicamente en la patente de EE. UU. Nº US 7.300.931 B2. Esta patente también desvela el uso del compuesto (I) en el tratamiento de trastornos de proliferación celular.

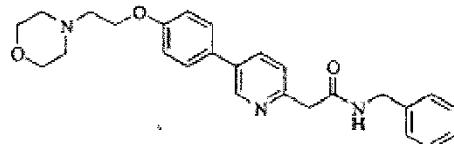
El compuesto (I) y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, son potentes inhibidores de la tirosina cinasas Src que se pueden usar en el tratamiento de o la protección contra afecciones o trastornos que incluyen cáncer, trastorno proliferativo de células, infección microbiana, trastorno hiperproliferativo, edema macular, osteoporosis, trastorno cardiovascular, enfermedad ocular, disfunción del sistema inmunitario, diabetes de tipo II, obesidad, rechazo de trasplante, sordera parcial, accidente cerebrovascular, aterosclerosis, dolor neuropático crónico, hepatitis B y enfermedad autoinmunitaria. El uso del compuesto (I) para el tratamiento de y la protección contra estas afecciones y trastornos se describe en los documentos de patente US 2007/0015752, PCT/US2008/004847 y WO2008/002676.

La presente invención desvela ciertas composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

El documento de patente US 2006/160811A1 desvela composiciones y métodos de tratamiento de trastornos de proliferación celular.

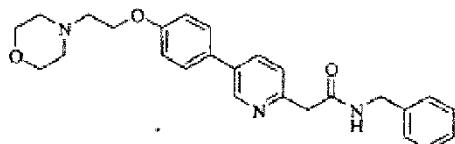
## SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona una combinación de: (a) una composición farmacéutica que comprende (i) 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)-N-bencilacetamida (compuesto (I)):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde el compuesto está presente en una cantidad que varía desde 10 mg hasta 300 mg por dosis, y en donde la composición se formula para administración oral, intravenosa, intramuscular o subcutánea dos o tres veces al día; y (b) gemcitabina; para uso simultáneo o secuencial en el tratamiento de un cáncer o trastorno de proliferación celular. En un aspecto, la cantidad es desde 20 mg hasta 250 mg. En otro aspecto, la cantidad es desde 40 mg hasta 200 mg. En otro aspecto, la cantidad es 40 mg. En otro aspecto, la cantidad es desde 60 mg hasta 160 mg. En un aspecto, la dosis se administra dos veces al día. En otro aspecto, la dosis se administra tres veces al día.

La invención también proporciona una combinación de: (a) una composición farmacéutica que comprende (i) el compuesto (I):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde el compuesto está presente en una cantidad que varía desde 20 mg hasta 600 mg por dosis, y en donde la composición se formula para administración oral, intravenosa, intramuscular o subcutánea una vez al día; y (b) gemcitabina; para uso simultáneo o secuencial en el tratamiento de un cáncer o trastorno de proliferación celular. En un aspecto, la cantidad es desde 40 mg hasta 500 mg. En otro aspecto, la cantidad es desde 80 mg hasta 400 mg. En otro aspecto, la cantidad es 80 mg. En otro aspecto, la cantidad es desde 120 mg hasta 320 mg.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende la sal de mesilato del compuesto (I).

En algunos aspectos, la administración es oral. En otro aspecto, la administración es intravenosa. En otro aspecto, la administración es intramuscular. En otro aspecto, la administración es subcutánea.

20 En un aspecto, el cáncer o trastorno de proliferación celular es cáncer seleccionado de renal, próstata, hígado, pulmón, pancreático, cerebro, mama, colon, leucemia, ovario, epitelial y esofágico. En otro aspecto, el cáncer se selecciona de un tumor maligno avanzado, un tumor sólido y linfoma. En un aspecto, el cáncer o trastorno de proliferación celular es un trastorno de proliferación celular seleccionado de psoriasis, retinopatía diabética y degeneración macular.

25 También se desvela un método de regulación de la actividad del sistema inmunitario que comprende administrar la composición farmacéutica descrita en el presente documento.

30 También se desvela el uso de la composición farmacéutica descrita en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una afección o trastorno seleccionado de cáncer, trastorno proliferativo de células, infección microbiana, trastorno hiperproliferativo, edema macular, osteoporosis, trastorno cardiovascular, enfermedad ocular, disfunción del sistema inmunitario, diabetes de tipo II, obesidad, rechazo de trasplante, sordera parcial, accidente cerebrovascular, aterosclerosis, dolor neuropático crónico, hepatitis B y enfermedad autoinmunitaria. La afección o trastorno puede ser cáncer, por ejemplo, seleccionado de renal, próstata, hígado, pulmón, pancreático, cerebro, mama, colon, leucemia, ovario, epitelial y esofágico, o seleccionado de un tumor maligno avanzado, un tumor sólido y linfoma. La afección o trastorno puede ser un trastorno proliferativo de células, por ejemplo, seleccionado de psoriasis, retinopatía diabética y degeneración macular. La afección o trastorno puede ser una infección microbiana, por ejemplo, bacteriana, fúngica, parasítica o viral. La afección o trastorno puede ser trastorno hiperproliferativo, edema macular, osteoporosis, trastorno cardiovascular, enfermedad ocular, disfunción del sistema inmunitario, diabetes de tipo II, obesidad, rechazo de trasplante, sordera parcial, accidente cerebrovascular, aterosclerosis, dolor neuropático crónico, hepatitis B o enfermedad autoinmunitaria.

35

40 También se desvela el uso de la composición farmacéutica descrita en el presente documento en la fabricación de un medicamento para regular la actividad del sistema inmunitario.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1A es un gráfico que indica el efecto de AZ28 y el compuesto (I) sobre la autofosforilación de Src en células c-Src/NIH-3T3; la Figura 1B es un gráfico que indica el efecto de AZ28 y el compuesto (I) sobre la autofosforilación de Src en células HT-29.

45 La Figura 2A es un gráfico que indica el efecto de AZ28 y el compuesto (I) sobre la fosforilación de FAK en células c-Src/NIH-3T3; la Figura 2B es un gráfico que indica el efecto de AZ28 y el compuesto (I) sobre la fosforilación de FAK en células HT-29.

50 La Figura 3A es un gráfico que indica el efecto de AZ28 y el compuesto (I) sobre la fosforilación de Shc en células c-Src/NIH-3T3; la Figura 3B es un gráfico que indica el efecto de AZ28 y el compuesto (I) sobre la fosforilación de Shc en células HT-29.

- La Figura 4 es un gráfico que indica el efecto de AZ28 y el compuesto (I) sobre la fosforilación de paxilina en células c-Src/NIH-3T3.
- 5 La Figura 5A es un gráfico que indica el efecto de AZ28 y el compuesto (I) sobre la escisión de caspasa-3 en células c-Src/NIH-3T3; la Figura 5B es un gráfico que indica el efecto de AZ28 y el compuesto (I) sobre la escisión de caspasa-3 en células HT-29.
- 10 La Figura 6A es un gráfico que indica el efecto de AZ28 y el compuesto (I) sobre los niveles de fosfotirosina total en células c-Src/NIH-3T3; la Figura 6B es un gráfico que indica el efecto de AZ28 y el compuesto (I) sobre los niveles de fosfotirosina total en células HT-29.
- 15 La Figura 7 es un gráfico que indica el efecto de AZ28 y el compuesto (I) sobre la autofosforilación de PDGFR en células c-Src/NIH-3T3.
- 20 La Figura 8A es un gráfico que indica el efecto de AZ28 y el compuesto (I) sobre la autofosforilación de FAK en células c-Src/NIH-3T3; la Figura 8B es un gráfico que indica el efecto de AZ28 y el compuesto (I) sobre la autofosforilación de FAK en células HT-29.
- 25 Las Figuras 10A, 10B, 10C y 10D son una serie de gráficos que representan la inhibición de la actividad de cinasas Src en células completas. La Figura 10A es un gráfico que representa el efecto del compuesto (I) sobre la autofosforilación de Src en células c-Src/NIH-3T3; la Figura 10B es un gráfico que indica el efecto del compuesto (I) sobre la autofosforilación de Src en células HT-29; la Figura 10C es un gráfico que representa el efecto del compuesto (I) sobre la transfosforilación de Src en células c-Src/NIH-3T3; y la Figura 10D es un gráfico que indica el efecto del compuesto (I) sobre la autofosforilación de Src en células HT-29.
- 30 La Figura 11 es una ilustración que representa la selectividad del compuesto (I) por proteína tirosina cinasas (PTK) en células completas en comparación con dasatinib, un inhibidor de Src competitivo por ATP actualmente en ensayos clínicos.
- 35 La Figura 12 es un gráfico que indica el efecto de dasatinib sobre células de leucemia resistentes a dasatinib e imatinib.
- 40 La Figura 13 es un gráfico que indica el efecto del compuesto (I) sobre células de leucemia resistentes a dasatinib e imatinib.
- 45 La Figura 14 muestra la inhibición de las curvas de crecimiento e IC<sub>50</sub> del compuesto (I) en comparación con dasatinib (BMS354825) en células HT-29.
- La Figura 15 muestra la inhibición de las curvas de crecimiento e IC<sub>50</sub> del compuesto (I) en comparación con dasatinib (BMS354825) en células SKOV-3.
- La Figura 16 muestra la inhibición de las curvas de crecimiento e IC<sub>50</sub> del compuesto (I) en comparación con dasatinib (BMS354825) en células A549.
- La Figura 17 muestra la inhibición de las curvas de crecimiento e IC<sub>50</sub> del compuesto (I) en comparación con dasatinib (BMS354825) en células K562.
- La Figura 18 muestra la inhibición de las curvas de crecimiento e IC<sub>50</sub> del compuesto (I) en comparación con dasatinib (BMS354825) en células MDA-MB-231.
- La Figura 19 muestra la inhibición de las curvas de crecimiento e IC<sub>50</sub> de la combinación de Gemzar® y el compuesto (I) en la línea celular L3.6pl usando el ensayo de BrdU.
- La Figura 20 muestra la inhibición de las curvas de crecimiento e IC<sub>50</sub> de Gemzar® y el compuesto (I) en la línea celular L3.6pl usando el ensayo de BrdU.
- La Figura 21 muestra el peso del tumor del modelo de próstata ortotópica para medir metástasis *in vivo* a diversa concentración del compuesto (I).
- La Figura 22 muestra un estudio de seguimiento IVIS de la segunda semana después del tratamiento con el compuesto (I) a 2,5 mg/dosis dos veces al día, 5,0 mg/dosis dos veces al día y dasatinib 7,5 mg/dosis dos veces al día.
- La Figura 23 es un gráfico de barras de los resultados del cribado para la eficacia anti-VHB y citotoxicidad celular.

La Figura 24 es un gráfico que representa la potencia oral del compuesto (I) en xenoinjertos de ratón. El compuesto (I) demostró mayor potencia oral en ratón HT29 estadificado (una línea de células de cáncer de colon humano) que dasatinib.

5 La Figuras 25A-D son una serie de gráficos que muestran el aumento de peso en cada uno de los ratones C57BL/6 en los diferentes grupos de tratamiento del estudio de supervivencia de glioma GL261intracranegal.

La Figura 26 es un gráfico que muestra los pesos promedio durante un periodo de 40 días para cada uno de los grupos de tratamiento en el estudio de supervivencia de glioma GL261intracranegal.

La Figura 27 es un gráfico que muestra los efectos sinérgicos inhibidores del crecimiento de tamoxifeno y el compuesto (I) sobre las células MCF-7.

## 10 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en la siguiente descripción adjunta. Aunque se puede usar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o prueba de la presente invención, ahora se describen los métodos y materiales preferidos. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción. En la memoria descriptiva, las formas en singular también incluyen el plural, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la técnica a la que pertenece la presente invención. En caso de conflicto, controlará la presente memoria descriptiva.

20 El compuesto (I) es un inhibidor de las tirosina cinasas Src de molécula pequeña sintético, biodisponible por vía oral y altamente selectivo. Es el primero en su clase debido a que el compuesto (I) se dirige al sitio de unión al sustrato peptídico y no al sitio de unión a ATP como todos los otros inhibidores de cinasas Src conocidos. En la definición de su actividad biológica por células tumorales, se ha mostrado que el compuesto (I) inhibe potenteamente la fosforilación catalizada por Src de cinasa de adhesión focal (FAK), Shc, paxilina y autofosforilación de cinasas Src con  $IC_{50}$  de aproximadamente 20 nM. También se ha demostrado que induce la expresión de p53 y estimula la escisión por caspasa-3 y PARP, todos los cuales conducen a la apoptosis de células tumorales.

25 El compuesto (I) es potente contra una amplia variedad de tipos de células tumorales sólidas, así como muchos tipos de leucemia que incluyen los resistentes a imatinib y/o dasatinib. A diferencia de los inhibidores de Src de cinasas que están comercialmente disponibles y actualmente en desarrollo, el compuesto (I) no compite por el sitio de unión a ATP. Es altamente selectivo por que no inhibe PDGFR, EGFR, JAK1, JAK2, Lck y ZAP70. Tiene una potencia 10-100 veces más baja que dasatinib en inhibir Bcr/Abl. Como se ha mostrado que la inhibición de Bcr/Abl por dasatinib y mesilato de imatinib se asocia a cardiotoxicidad, es menos probable que el compuesto (I) sea cardiotóxico.

30 En términos de eficacia *in vivo*, el compuesto (I) es aproximadamente cinco veces más potente que dasatinib contra la proliferación de células tumorales en un modelo de ratón de xenoinjerto HT29 (cáncer de colon humano). En un modelo de ratón ortotópico PC3-MM2 (cáncer prostático humano), el compuesto (I) demostró una fuerte inhibición de tanto el crecimiento tumoral primario, así como las metástasis a los ganglios linfáticos.

35 Debido a que las cinasas participan en la regulación de una amplia variedad de vías de transducción de señales de celulares normales (por ejemplo, crecimiento, diferenciación, supervivencia, adhesión, migración celular, etc.), se cree que las cinasas desempeñan una función en una variedad de enfermedades y trastornos. Así, la modulación de las cascadas de señalización de cinasas puede ser una forma importante de tratamiento o prevención o protección contra dichas enfermedades y trastornos. Dichas enfermedades y trastornos incluyen, por ejemplo, cánceres, osteoporosis, trastornos cardiovasculares, disfunción del sistema inmunitario, diabetes de tipo II, obesidad y rechazo de trasplante.

40 El compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es útil en la modulación de un componente de la cascada de señalización de cinasas. Se conocen varias proteínas cinasas y fosfatases, y son dianas para el desarrollo de terapéuticos. Véanse, por ejemplo, Hidaka y Kobayashi, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 1992, 32:377-397; Davies et al., Biochem. J., 2000, 351:95-105

45 Una familia de cinasas, la proteína tirosina cinasas, se divide en dos grandes familias: tirosina cinasas de receptor, o RTK (por ejemplo, cinasa del receptor de insulina (IRK), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor del factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGFR), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-2 o Flk1/KDR) y receptor del factor de crecimiento nervioso (NGFR)) y tirosina cinasas no receptoras, o NRTK (por ejemplo, la familia Src (Src, Fyn, Yes, Blk, Yrk, Fgr, Hck, Lck y Lyn), Fak, Jak, Abl y Zap70). Véase, por ejemplo, Parang y Sun, Expert Opin. Ther. Patents, 2005, 15:1183-1207,

50 Debido a la función de cinasas Src en una variedad de cánceres, estas cinasas son el objeto de varios estudios que se refieren al desarrollo de inhibidores de Src como terapéuticos para el cáncer, que incluyen el crecimiento de células de cáncer altamente metastásicas. Se buscan los inhibidores de Src como terapéuticos para una variedad de cánceres, que incluyen, por ejemplo, cáncer de colon, lesiones de colon precanceroso, cáncer de ovario, cáncer de mama,

cánceres epiteliales, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer pancreático y otros. Véanse, por ejemplo, Frame, *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, 1602:114-130 y Parang y Sun, *Expert Opin. Ther. Patents*, 2005, 15:1183-1207.

- 5 La inhibición de otras cinasas puede ser útil en el tratamiento y la modulación de otros tipos de enfermedades y trastornos. Por ejemplo, se pueden inhibir o prevenir diversas enfermedades oculares por la administración de inhibidores de la tirosina cinasas de receptor de VEGF. Los inhibidores de la tirosina fosfatasa PTP-1B y/o glucógeno fosforilasa pueden proporcionar tratamientos para diabetes de tipo II u obesidad. Los inhibidores de p56ck pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos del sistema inmunitario. Otras dianas incluyen retrotranscriptasa del VIH, tromboxano sintasa, EGFR TK, p55 fyn, etc.
- 10 El compuesto (I) es un inhibidor de la señalización de Src que se une en el sitio del sustrato peptídico Src. Se ha estudiado la actividad del compuesto (I) en células NIH3T3 transformadas con c-Src (527F, constitutivamente activas y transformantes) y en células de cáncer de colon humano (HT29). Por ejemplo, en estas líneas celulares, se mostró que el compuesto (I) reducía el nivel de fosforilación de sustratos de proteína Src conocidos en un modo dependiente de la dosis y con buena correlación con los efectos inhibidores del crecimiento.
- 15 Sin desear quedar ligado a teoría, se cree que la conformación de algunas cinasas (por ejemplo, Src) fuera de las células con respecto a la conformación dentro de las células es notablemente diferente, debido a que dentro de las células muchas cinasas se incorporan en complejos de señalización multiproteína. Así, debido a que el sitio de unión al sustrato peptídico no está bien formado en una cinasa aislada (como se muestra por estructuras de rayos X de Src), se cree que sería débil la actividad contra cinasa aislada para un inhibidor de unión al sustrato peptídico. La unión a este sitio en un ensayo de cinasa aislada requiere que el inhibidor capture el muy pequeño porcentaje de proteína total en un ensayo de enzimas aisladas que está en la misma conformación que existe dentro de las células. Esto requiere un gran exceso del inhibidor para drenar cantidades significativas de la enzima del ciclo catalítico en el ensayo para que sea detectable.
- 20
- 25 Sin embargo, para ensayos basados en célula, no se necesita un gran exceso de inhibidor debido a que se espera que se forme el sitio de unión al péptido. En ensayos de Src basados en célula, las proteínas de unión al dominio SH2 y SH3 ya han desplazado la conformación de Src de manera que se forme el sitio de unión al sustrato peptídico. Así, bajas concentraciones del inhibidor pueden retirar la enzima del ciclo catalítico puesto que toda la enzima está en la compacta conformación de unión.
- 30 La gran mayoría de los inhibidores de cinasas conocidos son competitivos por ATP y muestran escasa selectividad en un panel de ensayos de cinasa aislada. Sin embargo, se cree que el compuesto (I) es un inhibidor de unión al sustrato peptídico. Así, el tradicional cribado de alto rendimiento del compuesto (I) contra enzimas aisladas, tales como Src, no daría como resultado el descubrimiento del compuesto (I).
- 35 Existe un considerable soporte de bibliografía reciente para dirigir pp60c-src (Src) como enfoque ampliamente útil a la terapia del cáncer sin dar como resultado una grave toxicidad. Por ejemplo, los tumores que muestran señalización de PTK del receptor de EGF potenciada, o expresan en exceso el receptor de Her-2/neu relacionado, tienen Src constitutivamente activado e invasividad tumoral potenciada. La inhibición de Src en estas células induce la parada del crecimiento, desencadena la apoptosis e invierte el fenotipo transformado (Kami et al. (1999) *Oncogene* 18(33): 4654-4662). Se conoce que la actividad de Src anormalmente elevada permite a las células transformadas crecer en un modo independiente del anclaje. Esto se provoca evidentemente por el hecho de que la señalización de la matriz extracelular eleva la actividad de Src en la vía FAK/Src, en un modo coordinado con la señalización mitogénica, y así bloquea un mecanismo apoptótico que normalmente se habría activado. Por consiguiente, la inhibición de FAK/Src en células tumorales puede inducir la apoptosis debido a que se induciría el mecanismo apoptótico que normalmente se habría activado tras la liberación de la matriz extracelular (Hisano, et al., *Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res.* 38:A1925 (1997)). Además, se observó expresión de ARNm de VEGF reducida tras la inhibición de Src y los tumores derivados de estas líneas celulares inhibidas por Src mostraron un desarrollo angiogénico reducido (Ellis et al., *Journal of Biological Chemistry* 273 (2):1052-1057 (1998)).
- 40
- 45
- 50 Por ejemplo, una inactivación del gen Src en ratones condujo a solo un defecto, concretamente los osteoclastos que dejan de formar bordes ondulados y, por consiguiente, no resorben hueso. Sin embargo, en estos ratones se rescató la función de resorción ósea por osteoclastos insertando un gen Src defectuoso en cinasa (Schwartzberg et al., (1997) *Genes & Development* 11: 2835-2844). Esto sugirió que la actividad de cinasas Src se puede inhibir *in vivo* sin desencadenar la única toxicidad conocida debido a que la presencia de la proteína Src es evidentemente suficiente para reclutar y activar otras PTK (que son esenciales para mantener la función de los osteoclastos) en un complejo de señalización esencial de osteoclastos.
- 55 Se ha propuesto que Src es una diana "universal" para la terapia del cáncer puesto que se ha encontrado que está activada en exceso en un número creciente de tumores humanos (Levitzki, *Current Opinion in Cell Biology*, 8, 239-244 (1996); Levitzki, *Anti-Cancer Drug Design*, 11, 175-182 (1996)). Los posibles beneficios de la inhibición de Src para la terapia del cáncer parecen ser cuatro veces la inhibición del crecimiento celular incontrolado provocado por los efectos de bucle de factores de crecimiento autocrinos, inhibición de metástasis debido al desencadenamiento de la apoptosis

tras la liberación de la célula matriz, inhibición de la angiogénesis tumoral por niveles reducidos de VEGF, baja toxicidad.

Se ha informado de células de cáncer de próstata que tienen tanto una expresión en exceso de paxilina como p130cas y están hiperfosforiladas (Tremblay et al., Int. J. Cancer, 68, 164-171, 1996) y así pueden ser una excelente diana para los inhibidores de Src.

En ciertas realizaciones, el tipo de cáncer incluye tumores sólidos y tumores no sólidos. En realizaciones específicas, los tumores sólidos se seleccionan de tumores en el SNC (sistema nervioso central), cáncer de hígado, carcinoma colorrectal, cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer pancreático, carcinoma de vejiga, carcinoma cervical, tumores de cabeza y cuello, cáncer vulvar y neoplasias dermatológicas que incluyen melanoma, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células basales. En otra realización, los tumores no sólidos incluyen trastornos linfoproliferativos que incluyen leucemias y linfomas. En otras realizaciones, un trastorno es enfermedad metastásica.

El compuesto (I) muestra una amplia actividad de tumores sólidos, como se informa en la tabla a continuación.

<u>Línea de células tumorales humanas</u>	<u>IC<sub>50</sub> del compuesto (I) (nM)</u>	<u>IC<sub>50</sub> de dasatinib (nM)</u>
HT29 (Colon)	25	20
SKOV-3 (Ovario)	9,8	3,2
PC3-MM2 (Próstata)	8,9	8,9
L3.6pl (Páncreas)	25 (n=3)	3,9
MDA231 (Mama)	20	6,9
A549 (Pulmón)	9,4	13

También se puede usar el compuesto (I) en el tratamiento de un cáncer o trastorno de proliferación celular en terapia de combinación con uno o más de los tratamientos contra el cáncer, tales como radioterapia, y/o uno o más agentes antineoplásicos seleccionados del grupo que consiste en agentes antiproliferativos, agentes citotóxicos, agentes citostáticos y agentes quimioterapéuticos, y sales y derivados de los mismos. El compuesto (I) se puede

usar en el tratamiento de un cáncer o trastorno de proliferación celular en terapia de combinación con uno cualquiera de los fármacos seleccionados de un grupo que consiste en un alcaloide, un agente alquilante, un antibiótico antitumoral, un antimetabolito, un inhibidor de las tirosina cinasas Bcr-Abl, un análogo nucleosídico, un agente de inversión de multirresistencia a fármacos, un agente de unión a ADN, fármaco de unión a microtúbulos, una toxina y un antagonista de ADN. Los expertos en la técnica reconocerán los agentes quimioterapéuticos clasificados en una o más clases particulares de los agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

El compuesto (I) se puede usar en el tratamiento de un cáncer o trastorno de proliferación celular en terapia de combinación con uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en antimetabolitos (por ejemplo, gemcitabina), inhibidores de la topoisomerasa I y II, agentes alquilantes e inhibidores de microtúbulos (por ejemplo, taxol), así como inhibidores de la tirosina cinasas (por ejemplo, surafenib), inhibidores de cinasas de EGF (por ejemplo, tarceva o erlotinib), complejos de platino (por ejemplo, oxaliplatino); e inhibidores de las cinasas ABL (por ejemplo, Gleevec o imatinib).

Los alcaloides incluyen, pero no se limitan a, docetaxel, etopósido, irinotecán, paclitaxel (Taxol), tenipósido, topotecán, vinblastina, vincristina, vindesina.

Los agentes alquilantes incluyen, pero no se limitan a, busulfano, improsulfano, piposulfano, benzodepa, carbocuona, meturedopa, uredopa, altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida, clorambucilo, clornafazina, ciclofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, mecloretóxido de HCl de amina, melfalán novemebicina, perfosfamida fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo, cardebeína, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, semustina, ranimustina, dacarbazina, manomustina, mitobronitol, mitolactol, pipobromano, temozolomida.

Los antibióticos y sus análogos incluyen, pero no se limitan a, aclacinomicinas, actinomicinas, antramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carubicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicinas, daunorrubicina, 6-diazo-5-oxo-1-norleucina, doxorrubicina, epirrubicina, idarrubicina, menogaril, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, pirarrubicina, plicamicina, porfiromicina, puromicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, zinostatina, zorrubicina.

Los antimetabolitos incluyen, pero no se limitan a, denopterina, edatrexato, mercaptopurina (6-MP), metotrexato, piritrexim, pteropterina, pentostatina (2'-DCF), tomudex, trimetrexato, cladridina, fludarabina, tiamicrina, ancitabina,

azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, doxifluridina, emitefur, floxuridina, fluorouracilo, gemcitabina, tegafur, hidroxiurea y uretano.

Los complejos de platino incluyen, pero no se limitan a, caroplatino, cisplatino, miboplatino, oxaliplatino.

5 Los agentes antimitóticos o agentes de unión a microtúbulos incluyen, pero no se limitan a, vincristina, y vinblastina, y taxol.

10 Cuando se usan en combinación con agentes antiproliferación adicionales, el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede potenciar (por ejemplo, sinergizar) la actividad de estos agentes. Además, dicha sinergia permitiría que el compuesto (I), agentes antiproliferación adicionales, o ambos, se administraran a dosis más bajas, y/o puedan potenciar significativamente las propiedades antiproliferación de los compuestos en cualquier dosis dada. La tabla a continuación proporciona los resultados de los tratamientos de combinación usando el compuesto (I) y agentes antiproliferación adicionales.

Línea celular	IC <sub>50</sub> del fármaco 1 (nM)	IC <sub>50</sub> del compuesto (I) (nM)	Relación IC <sub>50</sub> de fármaco 1:compuesto (I)	IC <sub>50</sub> de la combinación fármaco 1+compuesto (I) (nM)	Resultado
HT29 (Colon)	1.480 (n=2) oxaliplatino	25 (n=5)	59	180 + 1,8 (se usó 100X)	Sinergia, aprox.10X
SKOV-3 (Ovario)	3,9 (n=2) taxol	9,8 (n=1)	0,40	3,9 + 11	Sin interferencia
A549 (Pulmón)	1.735 (n=2) Tarceva	13 (n=3)	134	2.500 + 11 (se usó 233X)	Sin interferencia
L3.6pl (Páncreas)	2,0 (n=2) Gemcitabina	32 (n=4)	1/13	0,09 + 1,15	Sin interferencia. 25X

15 Según la presente invención, se proporciona una combinación según la reivindicación 1 de una composición farmacéutica que comprende (a) el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y (b) gemcitabina, para uso simultáneo o secuencial en el tratamiento de un cáncer o trastorno de proliferación celular. Según la presente invención, se proporciona una combinación según la reivindicación 6 de una composición farmacéutica que comprende (a) el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y (b) gemcitabina, para uso simultáneo o secuencial en el tratamiento de un cáncer o trastorno de proliferación celular.

20 20 Para prevenir o proteger contra cáncer cerebral, el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra antes del desarrollo de cáncer cerebral en un sujeto. Alternativamente, la combinación se puede usar para tratar cáncer cerebral en un sujeto. El compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, usado para tratar o prevenir o proteger contra cáncer cerebral, puede participar en la modulación de una cascada de señalización de cinasas, por ejemplo, un inhibidor de cinasas, un inhibidor no competitivo de ATP, un inhibidor de las tirosina cinasas, un inhibidor de la proteína cinasa fosfatasa o una inhibidor de la proteína-tirosina fosfatasa 1B.

25 30 El término "cáncer cerebral" engloba una variedad de cánceres. Puede haber tumores cerebrales actuales que surgen del propio cerebro, conocidos como cánceres cerebrales primarios de los que hay varios. El término "cáncer cerebral" se refiere a tumores malignos, es decir, tumores que crecen y se diseminan agresivamente, venciendo a las células sanas ocupando su espacio, sangre y nutrientes. Los tumores que no se diseminan agresivamente se denominan tumores benignos. Los tumores benignos, en general, son menos graves que un tumor maligno, pero un tumor benigno puede aún provocar problemas en el cerebro. También pueden ser metástasis al cerebro, que representa la diseminación de otros cánceres, tales como pulmón o mama al cerebro.

35 40 Los tumores cerebrales se clasifican por tanto la célula del cerebro que los constituye como por cómo se ve el tumor bajo el microscopio. Los tumores cerebrales primarios surgen de cualquiera de las células en el cerebro, o de estructuras específicas en el cerebro. Las células de la glía soportan las neuronas del cerebro y los tumores que surgen de estas células se conocen como tumores de la glía. La membrana que rodea el cerebro también puede desarrollar tumores y estos se conocen como meningiomas. Existen otros tipos de tumores, que implican a otras estructuras del cerebro que incluyen ependimoma. Los tumores cerebrales primarios más comunes son los gliomas, meningiomas, adenomas hipofisarios, schwannomas vestibulares y tumores neuroectodérmicos primitivos (meduloblastomas).

45 Las combinaciones de la presente invención se pueden usar en el tratamiento o la prevención o la protección contra glioblastoma, un astrocitoma maligno que crece rápidamente del sistema nervioso central y normalmente de un

hemisferio cerebral. Los sinónimos de glioblastoma incluyen glioblastoma multiforme (GBM), glioblastoma de células gigantes y espongioblastoma multiforme multiforme. El glioblastoma es el tumor cerebral primario maligno más común y ha demostrado ser muy difícil de tratar. Estos tumores son frecuentemente agresivos e infiltran el tejido cerebral circundante. Los glioblastomas surgen de células de la glía, que son células que forman el tejido que rodea y protege otras células nerviosas encontradas dentro del cerebro y la médula espinal. Los glioblastomas están principalmente compuestos de células de la glía en forma de estrella conocidas como astrocitos. El término "glioma" incluye cualquier tipo de tumor cerebral, tal como astrocitomas, oligodendroglomas, ependimomas y papilomas del plejo coroideo. Los astrocitomas vienen en cuatro grados basados en cómo de rápido se están reproduciendo las células y la probabilidad de que infiltren tejido cercano. Los astrocitomas de grados I o II no son malignos y se pueden denominar de escasa malignidad. Los astrocitomas de grados III y IV son malignos y se pueden denominar astrocitomas de gran malignidad. Los astrocitomas de grado II se conocen como astrocitomas anaplásicos. Los astrocitomas de grado IV se conocen como glioblastoma multiforme.

Las combinaciones de la presente invención se pueden usar en el tratamiento o la prevención o la protección contra meduloblastoma. El meduloblastoma es un tumor cerebral primario altamente maligno que se origina en el cerebro o la fosa posterior. Aunque originalmente se consideró que era glioma, ahora se conoce que el meduloblastoma es de la familia de los tumores neuroectodérmicos primitivos (TNEP) craneales.

Los tumores que se originan en el cerebro se denominan infratentoriales debido a que ocurren debajo del tentorio, una membrana gruesa que separa los hemisferios cerebrales del cerebro del cerebro. Otro término para el meduloblastoma es TNEP infratentorial. El meduloblastoma es el TNEP más común que se origina en el cerebro. Todos los tumores TNEP del cerebro son tumores invasivos y que crecen rápidamente que, a diferencia de la mayoría de los tumores cerebrales, diseminan a través del líquido cefalorraquídeo (LCR) y frecuentemente metastatizan hacia diferentes localizaciones en el cerebro y la columna vertebral. El pico de manifestación del meduloblastoma es a la edad de siete años. El setenta por ciento de los meduloblastomas ocurren en individuos más jóvenes de 16 años. El meduloblastoma desmoplásico se encuentra especialmente en la adultez. Este tipo de tumor raramente ocurre más allá de la quinta década de vida.

Las combinaciones de la presente invención se pueden usar en el tratamiento o la prevención o la protección contra neuroblastoma, un cáncer que se forma en el tejido nervioso. Las células de neuroblastoma se parecen normalmente a células nerviosas en desarrollo muy primitivas encontradas en un embrión o feto. El término neuro indica "nervios", mientras que blastoma se refiere a un cáncer que afecta a células inmaduras o en desarrollo. Las neuronas (células nerviosas) son el principal componente del cerebro y la médula espinal y de los nervios que los conectan con el resto del cuerpo. El neuroblastoma empieza normalmente en las glándulas suprarrenales, pero también puede empezar en la médula espinal. El neuroblastoma es el cáncer sólido extracraneal más común en la infancia. En 2007, el neuroblastoma era el cáncer más común en la infancia, con una incidencia anual de aproximadamente 650 nuevos casos por año en los EE. UU. Aproximadamente el 50 por ciento de los casos de neuroblastoma ocurren en niños más jóvenes de dos años. Es un tumor neuroendocrino, que surge de cualquier elemento de la cresta neural del sistema nervioso simpático o SNS. Una rama del sistema nervioso autónomo, el SNS, es una red de nervios que transporta mensajes del cerebro a través del cuerpo y es responsable de la respuesta simpática y la producción de adrenalina o epinefrina.

Las combinaciones de la presente invención se pueden usar en el tratamiento o la prevención o la protección contra neuroepitelioma, los tumores malignos del neuroepitelio. El neuroepitelioma se encuentra lo más comúnmente en niños y adultos jóvenes. Surge casi siempre en la pared torácica, pelvis o extremidad, ya sea en hueso o tejido blando. Los procedimientos usados en el diagnóstico pueden incluir análisis de sangre y de orina, radiografías del hueso afectado y el cuerpo entero y los pulmones, aspirados medulares, TAC y fluoroscopía. Los tratamientos incluyen cirugía, radioterapia y quimioterapia. Los tumores de Ewing son un ejemplo de un tipo de neuroepitelioma periférico.

Se ha mostrado que las cinasas desempeñan una función en los cánceres cerebrales. Los perfiles de expresión génica del glioblastoma multiforme han identificado tirosina cinasas que desempeñan una función en la migración/invasión de glioma. Por ejemplo, PYK2 es un miembro de la familia de adhesión focal de tirosina cinasas no receptoras; está estrechamente implicada en la elevada polimerización de la actina inducida por src en la periferia de células fibroblásticas. Su función en la migración/invasión de glioma es cada vez más clara, ya que la expresión en exceso de PYK2 indujo la migración de células de glioblastoma en cultivo. Los niveles de PYK2 activado se correlacionaron positivamente con el fenotipo de migración en cuatro líneas celulares de glioblastoma (SF767, G112, T98G y U118). El análisis de PYK2 activado en la invasión de GBM reveló *in situ* una fuerte tinción en la infiltración de células GBM (véase, Hoelzinger et al., *Neoplasia*, vol. 7(1)7-16. Así, la modulación de un receptor de cinasa usando el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede ser útil en la protección, prevención o tratamiento de cánceres cerebrales, tales como glioblastoma multiforme.

Alternativamente, las combinaciones de la presente invención se pueden usar para tratar o prevenir o proteger contra cáncer renal en un sujeto. Para prevenir o proteger contra cáncer renal, el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra antes del desarrollo del cáncer renal en un sujeto. Alternativamente, el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se puede usar para tratar cáncer renal en un sujeto.

Se pueden desarrollar varios tipos de cáncer en los riñones. El carcinoma de células renales (CCR), la forma más común, representa aproximadamente el 85 % de todos los casos. La presente invención proporciona un método de tratamiento o prevención del carcinoma de células renales. La invención también proporciona un método para el tratamiento de otros tipos de cáncer de riñón que incluyen, por ejemplo, carcinoma de pelvis renal (cáncer que se

5 forma en el centro del riñón donde se recoge la orina), tumores de Wilms, que son un tipo de cáncer de riñón que normalmente se desarrolla en niños de menos de 5 años, carcinoma de células claras, también denominado de células claras y mesonefroma (un tipo de tumor, normalmente del aparato genital femenino, en el que el interior de las células parecen claras cuando se ven bajo un microscopio), adenocarcinoma renal (un tipo de tumor renal caracterizado por el desarrollo de proyecciones de tipo dedo en al menos algo del tumor) y rabdomiosarcoma renal, un tumor raro y 10 altamente agresivo en la población adulta.

En CCR, las células cancerosas (malignas) se desarrollan en el revestimiento de los túbulos renales y crecen en una masa tumoral. En la mayoría de los casos, se desarrolla un único tumor, aunque se puede desarrollar más de un tumor dentro de uno o ambos riñones. El CCR se caracteriza por una falta de signos de aviso previos, diversas manifestaciones clínicas, resistencia a la radiación y quimioterapia, y respuestas poco frecuentes, pero reproducibles 15 a agentes de inmunoterapia tales como interferón alfa e interleucina (IL)-2. Antiguamente, se creía que los tumores CCR derivaban de la glándula suprarrenal; por tanto, se usó frecuentemente el término hipernefroma.

El tejido de origen para el carcinoma de células renales es el epitelio tubular renal proximal. El cáncer renal ocurre en tanto una forma esporádica (no hereditaria) como hereditaria, y ambas formas se asocian con alteraciones estructurales del brazo corto del cromosoma 3 (3p). Los estudios genéticos de familias de alto riesgo de desarrollar 20 cáncer renal condujeron a la clonación de genes cuya alteración da como resultado la formación de tumores. Estos genes son o supresores tumorales (*VHL*, *TSC*) u oncogenes (*MET*). Se reconocen al menos 4 síndromes hereditarios asociados al carcinoma de células renales: (1) síndrome de von Hippel-Lindau (*VHL*), (2) carcinoma renal papilar hereditario (CRPH), (3) oncocitoma renal familiar (ORF) asociado a síndrome de Birt-Hogg-Dube (SBHD) y (4) carcinoma renal hereditario (CRH).

25 El CCR tiene muy mal pronóstico, principalmente debido a que, en casi el 30 % de todos los pacientes con enfermedad localizada, el 40 % de ellos desarrollan metástasis distantes tras la extirpación del tumor primario. La incidencia ajustada por edad de los carcinomas de células renales ha aumentado un 3 % por año. Según la Sociedad Estadounidense del Cáncer, en 2007 se diagnosticaron aproximadamente 51.500 casos de tumores malignos de riñón en los Estados Unidos con aproximadamente 12.500 muertes; el cáncer de células renal representó el 80 % de esta 30 incidencia y mortalidad. La nefrectomía radical es el principal tratamiento para el CCR localizado. Sin embargo, la radioterapia y los agentes quimioterapéuticos disponibles son ineficaces contra el CCR avanzado y metastásico.

35 La inmunoterapia usando interferón- $\alpha$  y interleucina-2 es eficaz en solo un pequeño porcentaje de pacientes con CCR metastásico y es extremadamente tóxica. Recientemente, se han desarrollado inhibidores de cinasas para el tratamiento de cáncer renal, por ejemplo, Gleevec® y otros nuevos agentes, tales como sorafenib y sunitinib, que tienen efectos antiangiogénicos mediante el direccionamiento de múltiples cinasas de receptor, han mostrado actividad en pacientes que fracasan con la inmunoterapia. Sin embargo, estos tratamientos tampoco están sin limitaciones. Por ejemplo, se ha encontrado que el efecto de Gleevec® se limita a un cierto tipo de tumor y se puede desarrollar resistencia. Por tanto, se recomienda monitorizar los pacientes que toman sunitinib para efectos secundarios 40 cardiovasculares tales como hipertensión. Como tal, existe la necesidad del desarrollo de métodos para el tratamiento y la prevención de cáncer renal.

45 Alternativamente, las combinaciones de la presente invención se pueden usar para tratar o prevenir o proteger contra cáncer de hígado en un sujeto. Para prevenir o proteger contra cáncer de hígado, se administra el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo antes del desarrollo de cáncer de hígado en un sujeto. Alternativamente, se puede usar el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para tratar cáncer de hígado en un sujeto.

50 Se pueden desarrollar varios tipos de cáncer en el hígado. El carcinoma hepatocelular (CHC) representa el 80-90 % de todos los cánceres de hígado. La presente invención proporciona un método de tratamiento o prevención de carcinoma hepatocelular. El CHC empieza en los hepatocitos, el principal tipo de célula del hígado. Aproximadamente 3 de cada 4 cánceres de hígado primario son de este tipo. El CHC puede tener diferentes patrones de crecimiento. Algunos empiezan como un único tumor que se hace más grande. Solo en las últimas etapas de la enfermedad se 55 disemina a otras partes del hígado. El CHC también puede empezar en muchos puntos en todo el hígado y no como un único tumor.

55 Las combinaciones de la presente invención también se pueden usar en el tratamiento de otros tipos de cáncer de hígado que incluyen, por ejemplo, colangiocarcinomas, que empieza en los conductores biliares de la vesícula biliar; los angiosarcomas y los hemangiosarcomas son otras dos formas de cáncer que empiezan en los vasos sanguíneos del hígado. Estos tumores crecen rápidamente. Frecuentemente, para cuando se encuentran, están demasiado extendidos como para ser extirpados y el tratamiento puede no ayudar mucho; el hepatoblastoma es un cáncer que se desarrolla en niños, normalmente se encuentra en niños más jóvenes de 4 años.

Se ha mostrado que las cinasas desempeñan una función en el cáncer de hígado. Por ejemplo, los cambios que se conoce que ocurren en CHC humano son expresión en exceso, amplificación o mutación del protooncogén MET, que codifica la proteína tirosina cinasa receptora Met (véase, Tward et al., PNAS, vol. 104(37)14771-14776). También se ha demostrado que FAK participa en los acontecimientos iniciales de la adhesión mediada por integrina de células de carcinoma circulantes en flujo de fluidos *in vitro* e *in vivo*. Se cree que esta cinasa puede participar en el establecimiento de interacciones de adhesión definidas que permite que las células tumorales adherentes resistan a las fuerzas de cizallamiento (véase, Sengbusch et al., American Journal of Pathology, vol 166(2)585-595). En 2007, el cáncer de hígado fue la tercera causa principal de muertes relacionadas con el cáncer en todo el mundo, y el sexto cáncer más extendido globalmente. Anualmente se diagnostican 600.000 personas con cáncer de hígado en todo el mundo y la incidencia está subiendo. Por consiguiente, existe la necesidad del desarrollo de métodos para el tratamiento, la prevención y la protección contra cáncer de hígado.

Según otra realización, las combinaciones de la presente invención se pueden usar en la prevención o la protección contra leucemia.

La leucemia es un cáncer maligno de la médula ósea y la sangre y se caracteriza por el crecimiento incontrolado de glóbulos sanguíneos. Los tipos comunes de leucemia se dividen en cuatro categorías: mielógena aguda o crónica, que implica a los elementos mieloídes de la médula ósea (glóbulos blancos, glóbulos rojos, megacariocitos) y linfocítica aguda o crónica, que implica a las células del linaje linfóide. El tratamiento de la leucemia depende, en general, del tipo de leucemia. El tratamiento habitual para la leucemia implica normalmente quimioterapia y/o trasplante de médula ósea y/o radioterapia. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. Nº 6.645.972,

La quimioterapia en la leucemia puede implicar una combinación de dos o más fármacos antineoplásicos. Ahora están siendo usados aproximadamente 40 fármacos diferentes en el tratamiento de la leucemia, tanto solos como en combinación. Otros tratamientos para la leucemia también incluyen la inversión de la multirresistencia a fármaco, que implica el uso de agentes que disminuyen los mecanismos que permiten que las células malignas escapen de los efectos perjudiciales del agente quimioterapéutico (y conduzcan a refractariedad o recaídas); y terapia biológica, que implica el uso de anticuerpos monoclonales, en el que se fijan toxinas a anticuerpos que reaccionan con el antígeno complementario llevado por las células malignas; y citocinas (por ejemplo, interferones, interleucinas, factores estimulantes de colonias CSF) que son sustancias químicas que existen de forma natural que estimulan la producción de glóbulos sanguíneos y ayudan a restaurar los hemogramas más rápidamente después del tratamiento. Los ejemplos de estos fármacos incluyen el agente que invierte la multirresistencia a fármacos PSC 833, el anticuerpo monoclonal Rituxan y las siguientes citocinas: eritropoyetina y epoyetina, que estimulan la producción de glóbulos rojos; G-CSF, GM-CSF, filgrastim y sargramostim que estimulan la producción de glóbulos blancos; y trombopoyetina, que estimula la producción de plaquetas.

Se ha encontrado que muchos análogos nucleosídicos poseen actividad antineoplásica. Citarabina, fludarabina, gemcitabina y cladribina son algunos ejemplos de análogos nucleosídicos que son fármacos actualmente importantes en el tratamiento de la leucemia.  $\beta$ -L-OddC ((-)- $\beta$ -Ldioxolano-citidina, Troxatyl®, de Shire BioChem Inc.) también es un análogo nucleosídico que se describió por primera vez como un agente antiviral por Belleau et al. (documento de patente EP 337713) y se mostró tener potente actividad antitumoral (K. L. Grove et al., Cancer Res., 55(14), 3008-11, 1995; K. L. Grove et al., Cancer Res., 56(18), 4187-4191, 1996, K. L. Grove et al., Nucleosides Nucleotides, 16:1229-33, 1997; S. A Kadhim et al., Can. Cancer Res., 57(21), 4803-10, 1997). En estudios clínicos, se ha informado que  $\beta$ -L-OddC tiene una significativa actividad en pacientes con leucemia avanzada (Giles et al., J. Clin. Oncology, Vol 19, Nº 3, 2001).

Los inhibidores de las tirosina cinasas de Bcr-Abl, tales como STI-571 (Gleevec®, mesilato de imatinib, de Novartis Pharmaceuticals Corp.), han mostrado actividad antileucémica significativa y específicamente en leucemia mielógena crónica. STI-571, por ejemplo, se ha convertido en una terapia prometedora en el grupo de pacientes que se dirigen a la inhibición de las tirosina cinasas Bcr-Abl. Sin embargo, a pesar de las significativas respuestas hematológicas y citogénicas, la resistencia a inhibidores de las tirosina cinasas Bcr-Abl ocurre, particularmente en las fases avanzadas de la leucemia mielógena crónica. Se ha demostrado dicha resistencia para los inhibidores de las tirosina cinasas de Bcr-Abl imatinib, dasatinib, AZD0530.

Por consiguiente, existe una gran necesidad del desarrollo adicional de agentes para el tratamiento de pacientes con leucemia que se han tratado previamente con un inhibidor de las tirosina cinasas Bcr-Abl y se han vuelto resistentes al inhibidor de las tirosina cinasas Bcr-Abl. También se desvela en el presente documento un método de tratamiento de leucemia en un hospedador que comprende administrar una cantidad del compuesto (I) a un paciente que se ha tratado previamente con un inhibidor de las tirosina cinasas Bcr-Abl y se ha vuelto resistente al tratamiento con el inhibidor de las tirosina cinasas Bcr-Abl. También se desvela un método de terapia de combinación de leucemia en un hospedador que comprende administrar a un paciente un inhibidor de las tirosina cinasas Bcr-Abl en combinación con una cantidad del compuesto (I), (por ejemplo, un paciente que se ha vuelto resistente al tratamiento con el inhibidor de las tirosina cinasas Bcr-Abl).

El compuesto (I) muestra actividad antileucémica en comparación con los agentes terapéuticos existentes, como se muestra en la tabla a continuación.

Línea celular de leucemia humana	IC <sub>50</sub> del compuesto (I) (nM)	IC <sub>50</sub> de dasatinib (nM)
K562 (LMC)	13 (n=2)	0,37 (n=1-2)
K562R (LMC resistente a Gleevec)	0,64 (n=1-2)	0,81 (n=2)
MOLT-4 (leucemia linfoblástica del adulto)	13 (n=1)	644 (n=1)
CCRF-HSB-2 (leucemia linfoblástica del adulto)	12 (n=1)	Inactivo (n=1)
Jurkat (leucemia de linfocitos T del adulto)	10 (n=1)	8 (n=1)
Ba/F3 (inducida por IL-3)	3,5	Inactivo
Ba/F3 + WT BCR-Abl	85	1
Ba/F3 + BCR-Abl E225K mutante	80	1
Ba/F3 + BCR-Abl T315I mutante	35	>10.000

Se puede usar el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para otros trastornos relacionados con la proliferación celular, tales como psoriasis.

5 Como se describe en el presente documento, se puede usar el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para tratar o proteger contra o prevenir sordera parcial en un sujeto.

Para proteger o prevenir contra sordera parcial, el compuesto se puede administrar antes de la exposición al ruido o exposición a un fármaco que induce sordera parcial. Dichos fármacos pueden incluir fármacos quimioterapéuticos (por ejemplo, fármacos basados en platino que se dirigen a las células ciliadas) y antibióticos de aminoglucósido. El compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede proporcionar un efecto sinérgico con ciertos fármacos para el cáncer. Por ejemplo, se pueden cribar inhibidores prometedores en ensayos de tejido de tumor primario humano, particularmente para buscar sinergia con otros fármacos antineoplásicos conocidos. Además, los inhibidores de las proteínas cinasas pueden reducir la toxicidad de ciertos fármacos para el cáncer (por ejemplo, fármacos basados en platino que son tóxicos para la cóclea y el riñón), permitiendo así una dosis elevada.

15 Alternativamente, se puede usar el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para tratar sordera parcial en un sujeto. El compuesto se puede administrar al sujeto posterior al inicio de la sordera parcial para reducir el nivel de sordera parcial. El compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede estar implicado en la modulación de una cascada de cinasas, por ejemplo, un inhibidor de cinasas, un inhibidor no competitivo de ATP, un inhibidor de las tirosina cinasas, un inhibidor de Src o un modulador de la cinasa de adhesión focal (FAK). Aunque no se desea quedar ligado a teoría, se cree que la administración de los inhibidores de cinasas previene la 20 apoptosis de las células ciliadas de la cóclea, previniendo así la sordera parcial. El compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se puede administrar a un sujeto que padece sordera parcial para prevenir sordera parcial adicional, o para restaurar la audición perdida. En particular, tras la exposición al ruido, se desgarran y estresan las uniones celulares compactas entre las células ciliadas de la cóclea, así como la interacción de células-matríz extracelular. El estrés de estas uniones celulares compactas inicia la apoptosis en las células a través de una 25 compleja vía de señalización en la que las tirosina cinasas actúan de interruptores moleculares, interaccionando con la cinasa de adhesión focal para transducir las señales de interrupciones célula-matríz al núcleo. Se cree que la administración de inhibidores de cinasas previene el inicio de la apoptosis en esta cascada.

30 La identificación de la apoptosis en la cóclea expuesta al ruido ha generado varias posibilidades nuevas para la prevención de la sordera parcial inducida por ruido (SPIR) (Hu, et al.; 2000, Acta. Otolaryngol., 120, 19-24). Por ejemplo, el oído se pueden proteger de la SPIR por la administración de fármacos antioxidantes a la ventana redonda del oído (Hight, et al.; 2003, Hear. Res., 179, 21-32; Hu, et al.; Hear. Res. 113, 198-206). Específicamente, se ha reducido la SPIR por la administración de compuestos antioxidantes autorizados por la FDA (N-L-acetilcisteína (L-NAC) y salicilato) en la chinchilla (Kopke, et al.; 2000, Hear. Res., 149, 138-146). Además, Harris et al. han descrito recientemente la prevención de SPIR con inhibidores de Src-PTK (Harris, et al.; 2005, Hear. Res., 208, 14-25). Así, se 35 supone que la administración de un compuesto de la presente invención que modula la actividad de cinasas es útil para tratar sordera parcial.

40 Los cambios en la fijación celular o el estrés celular pueden actuar en una variedad de señales a través de la activación de integrinas y a través de la fosforilación de PTK, que incluye la familia Src de las tirosina cinasas. Las interacciones de Src se han asociado a las vías de señalización que modifican el citoesqueleto y activan una variedad de cascadas de proteínas cinasas que regulan la supervivencia celular y la transcripción génica (revisado en Giancotti y Ruoslahti; 1999, Science, 285, 1028-1032). En realidad, resultados recientes han indicado que las células ciliadas externas (CCE), que se habían desprendido en la base de la célula tras una intensa exposición al ruido, experimentaron la

muerte de células apoptóticas. Específicamente, se cree que la cascada de señalización de Src PTK participa en tanto el inicio metabólico como mecánicamente inducido de la apoptosis en células sensoriales de la cóclea. En un estudio reciente, los inhibidores de Src proporcionaron protección de un ruido de 4 horas de 4 kHz de banda de octava a 106 dB, que indica que Src-PTK se podría activar en las células ciliadas externas tras la exposición al ruido (Harris, et al.; 2005, Hear. Res., 208, 14-25). Así, el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que modula la actividad de Src, es útil en el tratamiento de sordera parcial.

En el presente documento también se desvela el uso del compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para prevenir o proteger contra o tratar osteoporosis. Para prevenir o proteger contra la osteoporosis, el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se puede administrar antes del desarrollo de la osteoporosis. Alternativamente, el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se puede usar para tratar osteoporosis en un sujeto. El compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se puede administrar al sujeto posterior al inicio de la osteoporosis para reducir el nivel de osteoporosis

Se ha mostrado que la deficiencia de Src está asociada con la osteoporosis en ratones, debido a la pérdida de la función de los osteoclastos (Soriano, et al.; 1991, Cell, 64, 693-702). También se conoce que los ratones que carecen de IRAK-M desarrollan una intensa osteoporosis, que está asociada con la acelerada diferenciación de osteoclastos, un aumento en la semivida de los osteoclastos y su activación (Hongmei, et al.; 2005, J. Exp. Med., 201, 1169-1177).

Los osteoclastos multinucleados se originan a partir de la fusión de fagocitos mononucleares y desempeñan una función importante en el desarrollo de los huesos y la remodelación por la resorción ósea. Los osteoclastos son células multinucleadas terminalmente diferenciadas que degradan matriz mineralizada. En tejido óseo normal, existe un equilibrio entre la formación de hueso por osteoblastos y la resorción ósea por osteoclastos. Cuando se altera el equilibrio de este proceso dinámico y altamente regulado, la resorción ósea puede superar la formación de hueso, dando como resultado una pérdida cuantitativa de hueso. Debido a que los osteoclastos son esenciales para el desarrollo y la remodelación de huesos, el aumento en su número y/o actividad conducen a enfermedades que están asociadas con una pérdida generalizada de hueso (por ejemplo, osteoporosis) y otras con pérdida de hueso localizada (por ejemplo, artritis reumatoide, enfermedad periodontal).

Los osteoclastos y los osteoblastos ordenan ambos a una multitud de vías de señalización celular que implican a las proteínas cinasas. La activación de osteoclastos se inicia por adhesión a hueso, reordenación citoesquelética, formación de la zona de sellado y formación de la membrana ondulada polarizada. Se cree que la proteína tirosina cinasa 2 (PYK2) participa en la transferencia de señales desde la superficie celular hasta el citoesqueleto, ya que se fosforila por tirosina y se activa por la señalización iniciada por adhesión en osteoclastos (Duong, et al.; 1998, J. Clin. Invest., 102, 881-892). Pruebas evidentes han indicado que la reducción de los niveles de proteína PYK2 da como resultado la inhibición de la formación de osteoclastos y la resorción ósea *in vitro* (Duong, et al.; 2001, J. Bio. Chem., 276, 7484-7492). Por tanto, la inhibición de PYK2 u otras proteínas tirosina cinasa podría reducir el nivel de osteoporosis disminuyendo la formación de osteoclastos y la resorción ósea. Así, sin desear quedar ligado a teoría, se supone que la administración del compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo modulará la actividad de cinasas (por ejemplo, PTK) y, por tanto, dará como resultado la inhibición de la formación de los osteoclastos y/o la resorción ósea, tratando así la osteoporosis.

La tirosina cinasa Src destaca como una diana terapéutica prometedora para enfermedad ósea, como se valida por estudios en ratones inactivados en Src y experimentos celulares *in vitro*, que sugieren una función reguladora para Src en tanto osteoclastos (positivos) como osteoblastos (negativos). En los osteoclastos, Src desempeña funciones clave en la motilidad, polarización, supervivencia, activación (formación de bordes ondulados) y adhesión, mediando en diversas vías de transducción de señales, especialmente en la señalización de citocinas e integrinas (Parang y Sun; 2005, Expert Opin. Ther. Patents, 15, 1183-1207). Además, la alteración dirigida del gen *src* en ratones induce la osteopetrosis, un trastorno caracterizado por una reducida resorción ósea, sin mostrar anomalías morfológicas o funcionales obvias en otros tejidos o células (Soriano, et al.; 1991, Cell, 64, 693-702). El fenotipo osteopetrótico de ratones *src*<sup>-/-</sup> es autónomo de la célula y resulta de defectos en los osteoclastos maduros, que normalmente expresan altos niveles de proteína Src (Home, et al.; 1991, Cell, 119, 1003-1013). Limitando la eficacia de la tirosina cinasa Src, que desencadena la actividad de los osteoclastos e inhibe los osteoblastos, se cree que los inhibidores de Src reducen la ruptura ósea y estimulan la formación de hueso. Debido a que los osteoclastos normalmente expresan altos niveles de Src, la inhibición de la actividad de cinasas Src podría ser útil en el tratamiento de la osteoporosis (Missbach, et al.; 1999, Bone, 24, 437-449).

En el presente documento también se desvela el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que se van a usar para tratar, proteger contra o prevenir obesidad en un sujeto.

La obesidad está asociada con la diabetes y elevada resistencia a la insulina en tejidos sensibles a la insulina, tales como músculo esquelético, hígado y tejido adiposo blanco (Klaman, et al.; 2000, Mol. Cell. Biol., 20, 5479-5489). La insulina desempeña una función crítica en la regulación de la homeostasis de la glucosa, el metabolismo de los lípidos y el equilibrio de la energía. La señalización de insulina se inicia uniendo insulina al receptor de insulina (RI), una tirosina cinasa de receptor. La unión de insulina provoca una cascada de acontecimientos de fosforilación, que empieza con la autofosforilación del RI en múltiples restos tirosilo. La autofosforilación potencia la actividad de cinasas del RI y desencadena los acontecimientos de señalización en la dirección 3'. Los efectos estimulantes de las proteínas

5 tirosina cinasa y los efectos inhibidores de las proteínas tirosina fosfatasa definen en gran medida la acción de la insulina. La señalización apropiada de la insulina minimiza grandes fluctuaciones en concentraciones de glucosa en sangre y garantiza la adecuada administración de glucosa a las células. Puesto que la estimulación de la insulina conduce a múltiples acontecimientos de fosforilación de tirosilo, la potenciada actividad de una o más proteínas tirosina fosfatases (PTP) podría conducir a una resistencia a la insulina, que puede conducir a obesidad. De hecho, se ha informado de elevada actividad de PTP en varios estados resistentes a la insulina, que incluyen obesidad (Ahmad, et al.; 1997, *Metabolism*, 46, 1140-1145). Así, sin desear quedar ligado a teoría, la administración del compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo modula la actividad de cinasas (por ejemplo, PTP), tratando así la obesidad en un sujeto.

10 La señalización de la insulina empieza con la activación del RI por la fosforilación de tirosina y culmina en la captación de glucosa en células por el transportador de glucosa, GLUT4 (Saltiel y Kahn; 2001, *Nature*, 414, 799-806). El RI activado debe entonces ser desactivado y volver a un estado basal, un proceso que se cree que implica a la proteína tirosina fosfatasa-1B (PTP-1B) (Ahmad, et al.; 1997, *J. Biol. Chem.*, 270, 20503-20508). La alteración del gen que codifica PTP-1B en ratones da como resultado la sensibilidad a la insulina y la elevada resistencia a la obesidad 15 inducida por la dieta (Elchebly, et al.; 1999, *Science*, 283, 1544-1548; Klamann, et al.; 2000, *Mol. Cell. Biol.*, 20, 5479-5489). La reducida adiposidad en ratones deficientes en PTP-1B fue debida a una marcada reducción en la masa de adipocitos sin una disminución en el número de adipocitos (Klamann, et al.; 2000, *Mol. Cell. Biol.*, 20, 5479-5489). Además, la delgadez en ratones deficientes en PTP-1B fue acompañada por la elevada tasa metabólica basal y el 20 gasto total de energía, sin una marcada alteración de la expresión del desacoplamiento de la expresión de ARNm de proteína. La alteración del gen PTP-1B demostró que la alteración de la actividad de PTP-1B puede modular la señalización de insulina y la obesidad inducida por la dieta *in vivo*. Así, sin desear quedar ligado a teoría, la administración del compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que modula la señalización de insulina (por ejemplo, actividad de PTP-1B), es útil en el tratamiento de obesidad en un sujeto.

25 Se puede usar el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para prevenir o proteger contra o para tratar diabetes en un sujeto.

30 La diabetes mellitus de tipo 2 (T2DM) es un trastorno del metabolismo desregulado de la energía. El metabolismo de la energía está ampliamente controlado por la hormona insulina, un potente agente anabólico que promueve la síntesis y el almacenamiento de proteínas, hidratos de carbono y lípidos, e inhibe su rotura y liberación de nuevo en la circulación. La acción de la insulina se inicia uniendo a su receptor de tirosina cinasa, que da como resultado la 35 autofosforilación y la elevada actividad catalítica de la cinasa (Patti, et al.; 1998, *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 9, 89-109). La fosforilación de tirosina provoca que las proteínas del sustrato del receptor de insulina (IRS) interaccionen con la subunidad reguladora p85 de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), que conduce a la activación de la enzima y su dirección a una localización subcelular específica, dependiendo del tipo de célula. La enzima genera el producto de lípido fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>), que regula la localización y la actividad de numerosas proteínas (Kido, et al.; 2001, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86, 972-979). PI3K tiene una función esencial en 40 la captación y el almacenamiento de glucosa estimulado por insulina, la inhibición de la lipólisis y la regulación de la expresión génica hepática (Saltiel, et al.; 2001, *Nature*, 414, 799-806). La expresión en exceso de formas interferentes dominantes de PI3K puede bloquear la captación de glucosa y la translocación del transportador cuatro de glutamato, GLUT4, a la membrana plasmática (Quon, et al.; 1995, *Mol. Cell. Biol.*, 15, 5403-5411). Así, la administración de un compuesto de la presente invención que modula la actividad de cinasa (por ejemplo PI3K) y, por tanto, da como resultado la elevada captación de glucosa, es útil en el tratamiento de diabetes.

45 PTEN es un regulador importante de la señalización de PI3K en muchos tipos de células, y funciona de supresor tumoral debido al antagonismo de las actividades antiapoptóticas, proliferativas e hipertróficas de la vía de PI3K (Goberdhan, et al.; 2003, *Hum. Mol. Genet.*, 12, R239-R248; Leslie, et al.; 2004, *J. Biochem.*, 382, 1-11). Aunque no se desea quedar ligado a teoría, se cree que PTEN atenúa la vía de PI3K por desfosforilación de la molécula de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, degradando este importante segundo mensajero de los lípidos en PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. En un estudio reciente, la reducción de la proteína PTEN endógena en 50 % usando ARN interferente pequeño (ARNip) potenció el aumento dependiente de la insulina en los niveles de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> y la captación de glucosa (Tang, et al.; 2005, *J. Biol. Chem.*, 280, 22523-22529). Así, sin desear quedar ligado a teoría, se supone que la administración del compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que modula la actividad de PTEN, y, por tanto, da como resultado una elevada captación de glucosa, es útil para tratar diabetes.

55 Los niveles de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> también están controlados por la familia de homología 2 de SRC (SH2) - que contiene proteínas de inositol 5'-fosfatasa (SHIP), SHIP1 y SHIP2 (Lazar y Saltiel; 2006, *Nature Reviews*, 5, 333-342). SHIP2, expresada en músculo esquelético, entre otros tejidos sensibles a la insulina, cataliza la conversión de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> en PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> (Pesesse, et al.; 1997; *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 239, 697-700; Backers, et al.; 2003, *Adv. Enzyme Regul.*, 43, 15-28; Chi, et al.; 2004, *J. Biol. Chem.*, 279, 44987-44995; Sleeman, et al.; 2005, *Nature Med.*, 11, 199-205). La expresión en exceso de SHIP2 redujo notablemente los niveles de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> estimulada por insulina, de acuerdo con la capacidad propuesta de SHIP2 para atenuar la activación de efectores de PI3K en la dirección 3' (Ishihara, et al.; 1999, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 260, 265-272).

En el presente documento también se desvela el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que se va a usar para tratar, proteger contra o prevenir enfermedad ocular en un sujeto, por ejemplo, degeneración macular, retinopatía y edema macular.

5 Puede ocurrir la neovascularización que amenaza la visión de la córnea fisiológicamente avascular. Las retinopatías proliferativas, principalmente la retinopatía diabética y la degeneración macular senil, se caracterizan por una elevada permeabilidad vascular, que conduce a edema retiniano y a acumulación de líquido subrretiniano, y a la proliferación de nuevos vasos que tienen tendencia a la hemorragia. La angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de capilares preexistentes, es una parte integral de tanto el desarrollo normal como los numerosos procesos patológicos. VEGF, un mediador central de la cascada de angiogénesis compleja y un potente factor de permeabilidad, 10 es una diana atractiva para novedosos terapéuticos. VEGF es el ligando para dos receptores de tirosina cinasa unidos a membrana, VEGFR-1 y VEGFR-2. La unión del ligando desencadena la dimerización y la transfosforilación de VEGFR con posterior activación de un dominio de tirosina cinasa intracelular. El eje de señalización intracelular resultante da como resultado la proliferación celular endotelial vascular, la migración y la supervivencia. Así, sin desear quedarse ligado a teoría, se supone que la administración de un compuesto de la presente invención que modula la actividad de cinasa, por ejemplo la actividad de tirosina cinasas, y da como resultado la inhibición de la angiogénesis 15 y/o la neovascularización, es útil para tratar una enfermedad ocular, por ejemplo, degeneración macular, retinopatía y/o edema macular.

20 La degeneración macular se caracteriza por la fuga retiniana mediada por VEGF (un aumento en la permeabilidad vascular) y por el crecimiento anormal de vasos sanguíneos pequeños en la parte posterior del ojo (angiogénesis). Se ha identificado VEGF en membranas neovasculares en tanto retinopatía diabética como degeneración macular senil, y los niveles intraoculares del factor se correlacionan con la intensidad de la neovascularización en retinopatía diabética (Kvanta, et al.; 1996, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 37, 1929-1934.; Aiello, et al.; 1994, N. Engl. J. Med., 331, 1480-1487). El antagonismo terapéutico de VEGF en estos modelos da como resultado la significativa inhibición de tanto la neovascularización retiniana como coroidea, así como una reducción en la permeabilidad vascular (Aiello, et al.; 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 92, 10457-10461; Krzystolik, et al.; 2002, Arch. Ophthalmol., 120, 338-346; Qaum, et al.; 2001, Invest. Ophthalmol., Vis. Sci., 42, 2408-2413). Así, sin desear quedarse ligado a teoría, se supone que la administración del compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que modula la actividad de VEGF, y da como resultado la inhibición de la angiogénesis y/o la neovascularización, es útil para tratar una enfermedad ocular, por ejemplo, degeneración macular, retinopatía y/o edema macular.

25 30 En el presente documento también se desvela el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que se va a usar en métodos de prevención o protección contra o de tratamiento de un accidente cerebrovascular en un sujeto que está en riesgo de sufrir un accidente cerebrovascular, está sufriendo un accidente cerebrovascular o ha sufrido un ictus.

35 40 Un ictus, también conocido como un accidente cerebrovascular (ACV), es una lesión neurológica aguda por la que se interrumpe el riego sanguíneo a una parte del cerebro debido o al bloqueo de una arteria o a la rotura de un vaso sanguíneo. La parte del cerebro en la que se interrumpe el riego sanguíneo ya no recibe oxígeno y/o nutrientes transportados por la sangre. Las células del cerebro se dañan o se vuelven necróticas, alterando así la función en o desde esa parte del cerebro. El tejido cerebral deja de funcionar si se priva de oxígeno durante más de 60 a 90 segundos y después de algunos minutos sufrirá una lesión irreversible, que posiblemente conducirá a la muerte del tejido, es decir, un infarto.

45 50 Los ictus se clasifican en dos tipos principales: isquémico, es decir, bloqueo de un vaso sanguíneo que suministra al cerebro, y hemorrágico, es decir, hemorragia en o alrededor del cerebro. La mayoría de todos los ictus son ictus isquémicos. El ictus isquémico se divide comúnmente en ictus trombótico, ictus embólico, hipoperfusión sistémica (ictus de la zona marginal) o trombosis venosa. En el ictus trombótico, se desarrolla un proceso de formación de trombo en la arteria afectada, el trombo, es decir, el coágulo de sangre, estrecha gradualmente la luz de la arteria, impidiendo así la circulación sanguínea al tejido distal. Estos coágulos se forman normalmente alrededor de placas ateroscleróticas. Existen dos tipos de ictus trombóticos, que se clasifican basándose en el tipo de vaso en el que se forma el trombo. El ictus trombótico de vasos grandes afecta a las carótidas comunes e internas, vertebral y al polígono de Willis. El ictus trombótico de vasos pequeños afecta a las arterias intracerebrales, las ramas del polígono de Willis, el tronco de la arteria cerebral media y las arterias que surgen de la arteria vertebral y basilar distal.

55 Un trombo, aunque no sea ocluyente, puede conducir a un ictus embólico si se rompe el trombo, momento en el que se convierte en un émbolo. Un émbolo se refiere a una partícula o residuo que se desplaza en la circulación sanguínea arterial que se origina en cualquier parte. El ictus embólico se refiere al bloqueo del acceso arterial a una parte del cerebro por un émbolo. Un émbolo es frecuentemente un coágulo de sangre, pero también puede ser una placa que se ha desprendido de un vaso sanguíneo aterosclerótico o varias otras sustancias que incluyen grasa, aire e incluso células cancerosas. Debido a un émbolo surge en cualquier parte, la terapia local solo resuelve el problema temporalmente. Así, se debe identificar la fuente del embolo. Existen cuatro categorías de ictus embólico: aquellas con una fuente cardíaca conocida; aquellas con una posible fuente cardíaca o aórtica (del ecocardiograma transtorácico o transesofágico); aquellas con una fuente arterial; y aquellas con una fuente desconocida.

La hipoperfusión sistémica es la reducción de la circulación sanguínea a todas las partes del cuerpo. Es más comúnmente debida a un fallo de la bomba cardíaca por paro cardíaco o arritmias, o por un gasto cardíaco reducido como resultado de infarto de miocardio, embolia pulmonar, derrame pericárdico o hemorragia. La hipoxemia (es decir, bajo contenido de oxígeno en sangre) puede precipitar la hipoperfusión. Debido a que la reducción en la circulación sanguínea es global, se pueden afectar todas las partes del cerebro, especialmente las áreas de la "zona marginal" que son regiones de zona fronteriza suministradas por las principales arterias cerebrales. La circulación sanguínea a esta área no ha parado necesariamente, pero en su lugar se ha podido reducir hasta tal punto donde ocurre el daño cerebral.

Las venas en el cerebro funcionan drenando la sangre de nuevo en el cuerpo. Cuando las venas se ocluyen debido a trombosis, se bloquea el drenaje de la sangre y la sangre retrocede, causando un cerebral edema. Este edema cerebral puede dar como resultado tanto ictus isquémicos como hemorrágicos. Esto ocurre comúnmente en la enfermedad rara trombosis venosa sinusoidal.

El ictus se diagnóstica en un sujeto o paciente usando una o más de una variedad de técnicas conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, examen neurológico, análisis de sangre, TAC (sin mejoras de contraste), IRM, ecografía Doppler y arteriografía (es decir, roentgenografía de arterias después de la inyección de material radiopaco en la corriente sanguínea). Si se confirma un ictus con la obtención de imágenes, se realizan diversos otros estudios para determinar si existe una fuente periférica de los émbolos. Estos estudios incluyen, por ejemplo, un estudio de ultrasonidos/Doppler de las arterias carótidas (para detectar estenosis carotidea); un electrocardiograma (ECG) y ecocardiograma (para identificar arritmias y coágulos resultantes en el corazón que pueden diseminar a los vasos del cerebro a través de la circulación sanguínea); un estudio de monitor Holter para identificar arritmias intermitentes y un angiograma de la vasculatura cerebral (si se cree que una hemorragia se ha originado de una aneurisma o malformación arteriovenosa).

Se ha mostrado que la inhibición de la actividad de Src proporciona protección cerebral durante el ictus (véase Paul et al., *Nature Medicine*, vol. 7(2):222-227 (2001). Se ha mostrado que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que se produce en respuesta a la lesión isquémica, promueve la permeabilidad vascular. Los estudios han mostrado que la cinasa Src regula la PV mediada por VEGF en el cerebro tras el accidente cerebrovascular, y la administración de un inhibidor Src antes y después del accidente cerebrovascular redujo el edema, mejoró la perfusión cerebral y disminuyó el volumen del infarto después de que ocurriera la lesión (Paul et al., 2001). Así, la inhibición de Src puede ser útil en la prevención, el tratamiento o la mejora del daño secundario después de un accidente cerebrovascular.

En general, existen tres etapas de tratamiento para el ictus: prevención, terapia inmediatamente después del ictus y rehabilitación postapoplética. Las terapias para prevenir un primer ictus o ictus recurrente se basan en tratar los factores de riesgo subyacentes para el ictus, tales como, por ejemplo, hipertensión, colesterol alto, fibrilación auricular y diabetes. Las terapias para el ictus agudo intentan parar un ictus mientras que está ocurriendo, disolviendo rápidamente el coágulo de sangre que causa un ictus isquémico o parando la hemorragia de un ictus hemorrágico. La rehabilitación postapoplética ayuda a los individuos a vencer las discapacidades que resultan del daño por ictus. La medicación o farmacoterapia es el tratamiento más común para el ictus. Las clases más populares de fármacos usadas para prevenir o tratar el ictus son los antitrombóticos (por ejemplo, antiplaquetarios y anticoagulantes) y trombolíticos. Se pueden administrar el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo a un paciente que está en riesgo de sufrir un ictus, está sufriendo un ictus o ha sufrido un ictus en un momento anterior, durante, después o cualquier combinación de los mismos, de la aparición de un ictus. El compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede estar en composiciones farmacéuticas, o en combinación con cualquiera de una variedad de tratamientos conocidos, tales como, por ejemplo, una medicación antiplaquetaria (por ejemplo, aspirina, clopidogrel, dipyridamol), un anticoagulante (por ejemplo, warfarina) o una medicación trombolítica (por ejemplo, activador tisular del plasminógeno (t-PA), reteplasa, urocinasa, estreptocinasa, tenectaplaza, lanoteplasa o anistreplasa).

En el presente documento también se desvela el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que se va a usar en métodos de tratamiento, prevención o protección contra aterosclerosis o un síntoma de la misma en un sujeto que está en riesgo de o que sufre aterosclerosis.

La aterosclerosis es una enfermedad que afecta a los vasos de sangre arterial y comúnmente se denomina un "endurecimiento" de las arterias. Se provoca por la formación de múltiples placas dentro de las arterias. Las placas ateroscleróticas, aunque se compensan por el agrandamiento de las arterias, con el tiempo conducen a roturas de las placas y a estenosis (es decir, estrechamiento) de la arteria que, a su vez, conduce a un riego sanguíneo insuficiente al órgano que alimenta. Alternativamente, si la compensación del proceso de agrandamiento de las arterias es excesiva, resulta una aneurisma neta. Estas complicaciones son crónicas, lentamente progresivas y acumuladas. Lo más común, se rompe repentinamente la placa blanda, causando la formación de un coágulo de sangre (es decir, trombo) que ralentiza rápidamente o detiene la circulación sanguínea que, a su vez, conduce a la muerte de los tejidos alimentados por la arteria. Este acontecimiento catastrófico se denomina un infarto. Por ejemplo, la trombosis coronaria de una arteria coronaria provoca un infarto de miocardio, comúnmente conocido como un infarto de miocardio. Un infarto de miocardio ocurre cuando una placa aterosclerótica se forma lentamente en el revestimiento interno de una arteria coronaria y entonces se rompe repentinamente, ocluyendo totalmente la arteria y previniendo la circulación sanguínea aguas abajo.

La aterosclerosis y el infarto agudo de miocardio se diagnostican en un paciente usando cualquiera de una variedad de análisis clínicos y/o de laboratorio tales como exploración física, exploración radiológica o ecografía y análisis de sangre. Por ejemplo, un médico o profesional clínico puede escuchar las arterias de un sujeto para detectar un sonido de silbido anormal, llamado un soplo periférico. Un soplo periférico se puede oír con un estetoscopio cuando se pone

5 sobre la arteria afectada. Alternativamente, o además, el profesional clínico o médico puede comprobar los pulsos, por ejemplo, en la pierna o pie, para anomalías tales como debilidad o ausencia. El médico o profesional clínico puede realizar análisis de sangre para comprobar los niveles de colesterol o para comprobar los niveles de enzimas cardíacas, tales como creatina cinasa, troponina y lactato deshidrogenasa, para detectar anomalías. Por ejemplo, las subunidades de troponina I o T, que son muy específicas para el miocardio, suben antes de que se desarrolle la lesión permanente. Una troponina positiva en el contexto del dolor torácico puede predecir con exactitud una alta probabilidad de un infarto de miocardio en un futuro próximo. Otras pruebas para diagnosticar aterosclerosis y/o infarto de miocardio incluyen, por ejemplo, ECG (electrocardiograma) para medir la tasa y regularidad del latido cardíaco de un sujeto; radiografía del tórax, medición del índice tobillo/brazo, que compara la tensión arterial en el tobillo con la tensión arterial en el brazo; el ecografía de las arterias; TAC de áreas de interés; angiografía; una prueba de esfuerzo, gammagrafía cardíaca nuclear; e imagen por resonancia magnética (IRM) y tomografía por emisión de positrones (TEP) del corazón.

10 Se cree que la transducción de señales celulares por Src desempeña una función clave en la elevada permeabilidad de los vasos, conocida como permeabilidad vascular (PV). Se ha mostrado que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que se produce en respuesta a la lesión isquémica, que incluye, por ejemplo, infarto de miocardio, promueve la permeabilidad vascular. Estudios han mostrado que la inhibición de la cinasa Src disminuye la PV mediada por VEGF (véase Parang y Sun, Expert Opin. Ther. Patents, vol. 15(9): 1183-1206 (2005)).

15 Los ratones tratados con un inhibidor de Src demostraron un daño tisular reducido asociado a traumatismo o lesión a los vasos sanguíneos después del infarto de miocardio, en comparación con los ratones sin tratar (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de EE. UU. Nº 20040214836 y 20030130209 por Cheresh et al.). Así, la inhibición de Src puede ser útil en la prevención, el tratamiento o la protección contra daño secundario tras la lesión debida a aterosclerosis, tal como, por ejemplo, infarto de miocardio.

20 La aterosclerosis no produce generalmente síntomas hasta que se estrecha gravemente la arteria y limita la circulación sanguínea, o hasta que provoca una repentina obstrucción. Los síntomas dependen de donde se desarrollen las placas y el estrechamiento, por ejemplo, en el corazón, cerebro, otros órganos vitales y las piernas o casi en cualquier parte en el cuerpo. Los síntomas iniciales de la aterosclerosis pueden ser dolor o calambres cuando el cuerpo requiere más oxígeno, por ejemplo durante el ejercicio, cuando una persona puede sentir dolor torácico (angina) debido a la falta de oxígeno al corazón o calambres en las piernas debido a la falta de oxígeno a las piernas. El estrechamiento de las arterias que suministra sangre al cerebro puede provocar mareos o ataques isquémicos transitorios (AIT) donde los síntomas y los signos de un ictus duran menos de 24 horas. Normalmente, estos síntomas se desarrollan gradualmente.

25 30 35 Los síntomas del infarto de miocardio se caracterizan por grados variables de dolor torácico, molestia, sudoración, debilidad, náuseas, vómitos y arritmias, causando algunas veces la pérdida de conocimiento. El dolor torácico es el síntoma más común del infarto agudo de miocardio y se describe frecuentemente como una opresión, presión o constricción. El dolor puede radiar a la mandíbula, el cuello, los brazos, la espalda y el epigastrio, casi siempre el brazo izquierdo o el cuello. El dolor torácico es más probablemente provocado por infarto de miocardio cuando dura más de 30 minutos. Los pacientes que sufren un infarto de miocardio pueden presentar falta de aliento (disnea), especialmente si la disminución en la contractilidad miocárdica debida al infarto es suficiente para provocar fallo ventricular izquierdo con congestión pulmonar o incluso edema pulmonar.

40 45 En el presente documento también se desvela el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que se va a administrar en una composición farmacéutica, o en combinación con cualquiera de una variedad de tratamientos conocidos para aterosclerosis, tales como, por ejemplo, fármacos hipocolesterolemiantes (por ejemplo, estatinas), medicaciones antiplaquetarias o anticoagulantes.

50 En el presente documento también se desvela el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que se va a usar en métodos de tratamiento, prevención o protección contra dolor neuropático, tal como dolor neuropático crónico, o un síntoma del mismo en un sujeto que está en riesgo de sufrir, está sufriendo o ha sufrido dolor neuropático.

55 El dolor neuropático, también conocido como neuralgia, es cualitativamente diferente del dolor nociceptivo común. El dolor neuropático se presenta normalmente como un ardor constante y/u "hormigueos" y/o sensaciones de "chocque eléctrico". La diferencia entre el dolor nociceptivo y el dolor neuropático es debido al hecho de que el dolor nociceptivo "común" estimula solo los nervios del dolor, mientras que una neuropatía da frecuentemente como resultado la estimulación de tanto los nervios sensoriales del dolor como no de dolor (por ejemplo, nervios que responden al tacto, calor, frío) en el mismo área, produciendo así señales que la médula espinal y el cerebro normalmente no esperan recibir.

El dolor neuropático es un estado de dolor crónico complejo que normalmente va acompañado de lesión de tejido. Con el dolor neuropático, las propias fibras nerviosas pueden ser dañadas, ser disfuncionales o ser lesionadas. Estas

fibras nerviosas dañadas envían señales incorrectas a otros centros de dolor. El impacto de la lesión de las fibras nerviosas incluye un cambio en la función nerviosa tanto en el sitio de lesión como las áreas alrededor de la lesión.

El dolor neuropático se diagnóstica en un sujeto o paciente usando una o más de una variedad de técnicas de laboratorio y/o clínicas conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, exploración física.

- 5 Se ha mostrado que c-Src regula la actividad de receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) (véase Yu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 96:7697-7704 (1999). Los estudios han mostrado que PP2, un inhibidor de cinasas Src de bajo peso molecular, disminuye la fosforilación de la subunidad NM2 del receptor NMDA (véase Guo et al., J. Neuro., vol. 22:6208-6217 (2002)).

10 Así, la inhibición de Src, que a su vez, inhibe la actividad receptores de NMDA, puede ser útil en la prevención, el tratamiento o la mejora del dolor neuropático, tal como dolor neuropático crónico.

En el presente documento también se desvela el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su administración solo, en composiciones farmacéuticas, o en combinación con cualquiera de una variedad de tratamientos conocidos, tales como, por ejemplo, analgésicos, opioides, antidepresivos tricíclicos, anticonvulsivos o inhibidores de la recaptación de serotonina norepinefrina.

- 15 En el presente documento también se desvela el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que se va a usar en un método de tratamiento, prevención o protección contra hepatitis B o un síntoma de la misma en un sujeto que está en riesgo de o que sufre hepatitis B.

20 El virus de la hepatitis B, un miembro de la familia de los hepadnavirus, consiste en una partícula de núcleo proteináceo que contiene el genoma viral en forma de ADN bicitenario con regiones monocatenarias y una envoltura externa basada en lípido con proteínas incorporadas. Las proteínas de la envoltura participan en la unión viral y se liberan dentro de las células susceptibles. La cápside interna reubica el genoma de ADN al núcleo de la célula donde se transcriben los ARNm virales. Se preparan tres transcritos subgenómicos que codifican las proteínas de la envoltura, junto con un transcríto que codifica la proteína X. Se transcribe un cuarto ARN pre-genómico, que se exporta al citosol y traduce la polimerasa viral y las proteínas del núcleo. La polimerasa y el ARN pre-genómico se encapsidan en partículas de núcleo de ensamblaje, donde ocurre la transcripción inversa del ARN pre-genómico en ADN genómico por la proteína polimerasa. La partícula de núcleo madura sale entonces de la célula por vías secretoras normales, que adquieren una envoltura a lo largo del camino.

25 La hepatitis B es uno de los pocos virus no retrovirales conocidos que emplean retrotranscripción como parte del proceso de replicación. Otros virus que usan retrotranscripción incluyen, por ejemplo, HTLV o VIH.

- 30 Durante la infección por el VHB, la respuesta inmunitaria del hospedador es responsable de tanto el daño hepatocelular como la eliminación viral. Aunque la respuesta inmunitaria innata no desempeña una función significativa en estos procesos, la respuesta inmunitaria adaptativa, particularmente los linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de virus, contribuyen a casi toda la lesión hepática asociada a la infección por el VHB. Por destrucción de las células infectadas y por producción de las citocinas antivirales capaces de purgar el VHB de los hepatocitos viables, los CTL también eliminan el virus. Aunque el daño hepático se inicia y está mediado por los CTL, las células inflamatorias no específicas de antígeno pueden empeorar la inmunopatología inducida por CTL y las plaquetas pueden facilitar la acumulación de CTL en el hígado.

35 La hepatitis B se diagnostica en un paciente usando cualquiera de una variedad de análisis clínicos y/o de laboratorio tales como exploración física y análisis de sangre o suero. Por ejemplo, la sangre o el suero se ensaya para la presencia de antígenos virales y/o anticuerpos producidos por el hospedador. En una prueba común para la hepatitis B, se usa la detección del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) para cribar la presencia de infección. Es el primer antígeno viral detectable que aparece durante la infección con este virus; sin embargo, al principio de una infección, puede que este antígeno no esté presente y pueda ser indetectable después en la infección a medida que es eliminado por el hospedador. Durante esta 'ventana' en la que el hospedador sigue estando infectado pero está eliminando satisfactoriamente el virus, los anticuerpos IgM contra el antígeno de núcleo de la hepatitis B (IgM anti-HBc) pueden ser la única evidencia serológica de la enfermedad.

40 Poco después de la aparición del HBsAg, aparecerá otro antígeno llamado el antígeno e de la hepatitis B (HBeAg). Tradicionalmente, la presencia del HBeAg en el suero de un hospedador se asocia con tasas mucho más altas de replicación viral; sin embargo, algunas variantes del virus de la hepatitis B no producen en absoluto el antígeno "e".

- 45 Durante el curso natural de una infección, se puede eliminar HBeAg, y después surgirán inmediatamente los anticuerpos contra el antígeno "e" (anti-HBe). Esta conversión se asocia normalmente a una espectacular disminución en la replicación viral. Si el hospedador es capaz de eliminar la infección, con el tiempo, el HBsAg llegará a ser indetectable e irá seguido por anticuerpos contra el antígeno de superficie de la hepatitis B (anti-HB). Una persona negativa para HBsAg pero positiva para anti-HB o ha eliminado una infección o se ha vacunado previamente. Varias personas que dan positivo para HBsAg pueden tener muy poca multiplicación viral y, por tanto, pueden estar en un bajo riesgo de complicaciones a largo plazo o de transmitir la infección a otros.

Src desempeña una función en la replicación del virus de la hepatitis B. El factor de transcripción viralmente codificado HBx activa Src en una etapa que se requiere desde la propagación del virus VHB (véase, por ejemplo, Klein et al., EMBO J., vol. 18:5019-5027 (1999); Klein et al., Mol. Cell. Biol., vol. 17:6427-6436 (1997)).

Así, la inhibición de Src, que a su vez inhibe la propagación mediada por Src del virus VHB, puede ser útil en la 5 prevención, el tratamiento o la protección contra la hepatitis B o un síntoma de la misma.

En el presente documento también se desvela el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que se va a administrar en composiciones farmacéuticas, o en combinación con cualquiera de una variedad de tratamientos conocidos para la hepatitis B, tal como, por ejemplo, interferón alfa, lamivudina (Epivir-VHB) o Baraclude (entecavir).

10 Como se describe en el presente documento, el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se puede usar para regular la actividad del sistema inmunitario en un sujeto, protegiendo así contra o previniendo la enfermedad autoinmunitaria, por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, septicemia y lupus, así como el rechazo de trasplante y enfermedades alérgicas.

15 Por ejemplo, el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede dar como resultado una reducción en la intensidad de los síntomas o detener la progresión inminente de la enfermedad autoinmunitaria en un sujeto.

Las enfermedades autoinmunitarias son enfermedades provocadas por un fallo en la auto-tolerancia de forma que el 20 sistema inmunitario adaptativo responda a auto-antígenos y medie en el daño celular y tisular. Las enfermedades autoinmunitarias pueden ser específicas de órgano (por ejemplo, tiroiditis o diabetes) o sistémicas (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico). Los linfocitos T modulan la respuesta inmunitaria celular en el sistema inmunitario adaptativo. En condiciones normales, los linfocitos T expresan receptores de antígeno (receptores de linfocitos T) que reconocen fragmentos de péptido de proteínas extrañas unidas a moléculas propias del complejo mayor de histocompatibilidad. Entre los primeros acontecimientos reconocibles después de la estimulación del receptor de linfocitos T (TCR) están la activación de Lck y Fyn, dando como resultado la fosforilación de TCR en restos de tirosina dentro de los motivos 25 de activación basados en tirosina de inmunorreceptor (Zamoyska, et al.; 2003, Immunol. Rev., 191, 107-118). Las tirosina cinasas, tales como Lck (que es un miembro de la familia Src de las proteínas tirosina cinasas), desempeñan una función esencial en la regulación de la señalización de células y la proliferación celular fosforilando restos de tirosina de péptidos y proteínas (Levitzki; 2001, Top. Curr. Chem., 211, 1-15; Longati, et al.; 2001, Curr. Drug Targets, 2, 41-55; Qian, y Weiss; 1997, Curr. Opin. Cell Biol., 9, 205-211). Así, aunque no se desea quedar ligado a teoría, se 30 supone que la administración del compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que modula la actividad de tirosina cinasa (por ejemplo, Src), es útil en el tratamiento de enfermedad autoinmunitaria.

Las tirosina cinasas Lck y fyn son ambas activadas en la vía de TCR; así, los inhibidores de Lck y/o fyn tienen una 35 posible utilidad como agentes autoinmunitarios (Palacios y Weiss; 2004, Oncogene, 23, 7990-8000). Lck y Fyn se expresan predominantemente por linfocitos T durante la mayoría de su vida. Se han demostrado funciones de Lck y Fyn en el desarrollo de linfocitos T, la homeostasis y la activación por estudios animales y de líneas celulares (Parang y Sun; 2005, Expert Opin. The. Patents, 15, 1183-1207). La activación de Lck participa en enfermedades autoinmunitarias y rechazo de trasplante (Kamens, et al.; 2001, Curr. Opin. Investig. Drugs, 2, 1213-1219). Los resultados han mostrado que las líneas celulares de Jurkat Lck (-) son incapaces de proliferar, producir citocinas y generar aumentos en el calcio intracelular, fosfato de inositol y fosforilación de tirosina en respuesta a la estimulación 40 de receptores de linfocitos T (Straus y Weiss; 1992, Cell., 70, 585-593; Yamasaki, et al.; 1996, Mol. Cell. Biol., 16, 7151-7160). Por tanto, un agente que inhibe Lck bloquearía eficazmente la función de linfocitos T, actuaria de agente inmunosupresor y tendría posible utilidad en enfermedades autoinmunitarias, tales como artritis reumatoide, esclerosis múltiple y lupus, así como en el área del rechazo de trasplantes y enfermedades alérgicas (Hanke y Pollok; 1995, Inflammation Res., 44, 357-371). Así, aunque no se desea quedar ligado a teoría, se supone que la administración del 45 compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que modula uno o más miembros de la familia Src de proteínas tirosina cinasa (por ejemplo, Lck y/o fyn) es útil en el tratamiento de enfermedad autoinmunitaria.

La caracterización farmacocinética del compuesto (I) en ratones, ratas y perros mostró que el compuesto (I) está 50 biodisponible por vía oral y tiene aumentos relacionados con la dosis en la exposición a fármacos y máxima concentración plasmática.

55 Se han desarrollado tanto el compuesto (I)-2HCl (diclorhidrato) como el compuesto (I)-MSA (mesilato). Dos estudios farmacocinéticos puentes han demostrado que estas dos formas de sal del compuesto (I) comparten perfiles farmacocinéticos similares en tanto ratas como perros. Así, los hallazgos del compuesto (I)-2HCl son aplicables al desarrollo del compuesto (I)-MSA.

El compuesto (I) es un inhibidor de cinasas Src específico y selectivo que es muy potente contra células cancerosas, y puede ahorrar a los pacientes los efectos secundarios graves, tales como la cardiotoxicidad, cuando se compara 55 con inhibidores de cinasas autorizados y aquellos en desarrollo.

El compuesto (I) está en forma aislada pura (es decir, se produce sintéticamente).

El compuesto (I) o su sal farmacéuticamente aceptable del mismo se puede preparar convencionalmente, por ejemplo, por las técnicas descritas en los documentos de patente US 2008/0221102 y PCT/US2008/006419.

Las composiciones farmacéuticas que contienen el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se pueden formular de un modo convencional usando uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. El

5 compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se puede administrar por vía oral, por vía nasal, por vía transdérmica, por vía pulmonar, por inhalación, por vía bucal, por vía sublingual, por vía intraperitoneal, por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intravenosa, por vía rectal, por vía intrapleural, por vía intratecal o por vía parenteral. En una realización, el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra por vía oral. Un experto en la técnica reconocerá las ventajas de ciertas vías de administración.

10 La pauta posológica que utiliza el compuesto (I) se selecciona según una variedad de factores que incluyen tipo, especie, edad, peso, sexo y afección médica del paciente; la intensidad de la afección que se va a tratar; la vía de administración; la función renal y hepática del paciente; y el compuesto particular o sal del mismo empleado.

15 La invención incluye una combinación según la reivindicación 1 de una composición farmacéutica que comprende (a) el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y (b) gemcitabina, para uso simultáneo o secuencial en el tratamiento de un cáncer o trastorno de proliferación celular. La composición se formula para administración oral, intravenosa, intramuscular o subcutánea dos o tres veces al día. El compuesto está presente en la composición en una cantidad que varía desde 10 mg hasta 300 mg por dosis. En otra realización, la cantidad es desde 20 mg hasta 250 mg. En otra realización, la cantidad es desde 40 mg hasta 200 mg. En otra realización, la cantidad es desde 60 mg hasta 160 mg. En una realización, la dosis se administra dos veces al día. En una realización, la dosis se administra tres veces al día.

20 La invención incluye una combinación según la reivindicación 6 de una composición farmacéutica que comprende (a) el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y (b) gemcitabina, para uso simultáneo o secuencial en el tratamiento de un cáncer o trastorno de proliferación celular. La composición se formula para administración oral, intravenosa, intramuscular o subcutánea una vez al día. El compuesto está presente en la composición en una cantidad que varía desde 20 mg hasta 600 mg por dosis. En otra realización, la cantidad es desde 40 mg hasta 500 mg. En otra realización, la cantidad es desde 80 mg hasta 400 mg. En otra realización, la cantidad es desde 120 mg hasta 320 mg.

25 En una realización, la composición comprende la sal de mesilato del compuesto (I). En una realización, la administración es oral. En otra realización, la administración es intravenosa. En otra realización, la administración es intramuscular. En otra realización, la administración es subcutánea.

30 Las técnicas para la formulación y la administración del compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se pueden encontrar en Remington: the Science and Practice of Pharmacy, 19<sup>a</sup> edición, Mack Publishing Co., Easton, PA (1995).

35 Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen cargas o diluyentes sólidos inertes y disoluciones acuosas u orgánicas estériles. El compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo está presente en dichas composiciones farmacéuticas en cantidades suficientes para proporcionar la cantidad de dosis deseada en el intervalo descrito en el presente documento.

40 En una realización, para la administración por vía oral, el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se combina con un vehículo o diluyente sólido o líquido adecuado para formar cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos, jarabes, disoluciones, suspensiones y similares.

45 Los comprimidos, píldoras, cápsulas y similares contienen desde 1 hasta 99 por ciento en peso del principio activo y un aglutinante, tal como goma tragacanto, gomas arábigas, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato de dicalcio; un agente disgregante tal como almidón de maíz, almidón de patata o ácido algínico; un lubricante tal como estearato de magnesio; y/o un edulcorante tal como sacarosa, lactosa, sacarina, xilitol y similares. Cuando una forma unitaria de dosificación es una cápsula, contiene frecuentemente, además de materiales del tipo anterior, un vehículo líquido tal como un aceite graso.

50 En algunas realizaciones, están presentes diversos otros materiales como recubrimientos o para modificar la forma física de la unidad de dosis. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los comprimidos se recubren con Shellac, azúcar o ambos. En algunas realizaciones, un jarabe o elixir contiene, además del principio activo, sacarosa como edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y un aromatizante tal como aroma de cereza o de naranja, y similares.

55 Para algunas realizaciones referentes a la administración parental, el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se combina con medios acuosos u orgánicos estériles para formar disoluciones o suspensiones inyectables. En una realización, las composiciones inyectables son disoluciones o suspensiones isotónicas acuosas. Las composiciones se pueden esterilizar y/o pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, promotores de la disolución, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Además, también puede contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Las composiciones se preparan según

métodos convencionales de mezcla, granulación o recubrimiento, respectivamente, y contienen 0,1 a 75 %, en otra realización, las composiciones contienen 1 a 50 %, del principio activo.

Por ejemplo, las disoluciones inyectables se producen usando disolventes tales como aceite de sésamo o de cacahuete o propilenglicol acuoso, así como disoluciones acuosas de sales farmacéuticamente aceptables solubles

5 en agua del compuesto (I). En algunas realizaciones, las dispersiones se preparan en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos en aceites. En condiciones de almacenamiento y uso habituales, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos. Los términos "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral", como se usa en el presente documento, significa modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente por inyección, e incluye, sin limitación, inyección intravenosa, 10 intramuscular, intrarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intrarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal, e infusión.

Para administración rectal, las composiciones farmacéuticas adecuadas son, por ejemplo, preparaciones tópicas, supositorios o enemas. Los supositorios se preparan ventajosamente a partir de emulsiones o suspensiones grasas.

15 Las composiciones se pueden esterilizar y/o contener adyuvantes, tales como conservantes, estabilizantes, agentes humectantes o emulsionantes, promotores de la disolución, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Además, también puede contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Las composiciones se preparan según métodos convencionales de mezcla, granulación o recubrimiento, respectivamente, y contienen aproximadamente 0,1 a 75 %, en otra realización, las composiciones contienen aproximadamente 1 a 50 %, del principio activo.

20 El compuesto (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se puede formular para administrar el agente activo por administración pulmonar, por ejemplo, administración de una formulación en aerosol que contiene el agente activo de, por ejemplo, una pulverizador de bomba manual, nebulizador o inhalador presurizado de dosis medida. Las formulaciones adecuadas de este tipo también pueden incluir otros agentes, tales como agentes antiestáticos, para mantener los compuestos desvelados como aerosoles eficaces.

25 Un dispositivo de administración de fármaco para administrar aerosoles comprende una lata de aerosol adecuada con una válvula dosificadora que contiene una formulación farmacéutica en aerosol como se describe y una carcasa con accionador adaptada para contener la lata y permitir la administración del fármaco. La lata en el dispositivo de administración de fármaco tiene un espacio de cabeza que representa más de aproximadamente el 15 % del volumen total de la lata. Frecuentemente, el polímero previsto para administración pulmonar se disuelve, suspende o emulsiona 30 en una mezcla de un disolvente, tensioactivo y propulsor. La mezcla se mantiene a presión en una lata que se ha sellado con una válvula dosificadora.

Para administración nasal, se pueden usar o un sólido o un vehículo líquido. El vehículo sólido incluye un polvo grueso que tiene tamaño de partículas en el intervalo de, por ejemplo, desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 500 micrómetros y dicha formulación se administra por inhalación rápida a través de las fosas nasales. En algunas

35 realizaciones donde se usa el vehículo líquido, la formulación se administra como un espray nasal o gotas e incluye aceite o disoluciones acuosas de los principios activos.

También se contemplan formulaciones que son formas farmacéuticas de dispersión rápida, también conocidas como formas de "dosis instantánea". En particular, algunas realizaciones de la presente invención se formulan como

40 composiciones que liberan sus principios activos dentro de un corto periodo de tiempo, por ejemplo, normalmente menos de aproximadamente cinco minutos, en otra realización, menos de aproximadamente noventa segundos, en otra realización, menos de aproximadamente treinta segundos y en otra realización, en menos de aproximadamente diez o quince segundos. Dichas formulaciones son adecuadas para administración a un sujeto por una variedad de vías, por ejemplo, por inserción en una cavidad del cuerpo o aplicación a una superficie húmeda del cuerpo o herida abierta.

45 Normalmente, una "dosis instantánea" es una forma farmacéutica sólida que se administra por vía oral, que se dispersa rápidamente en la boca, y, por tanto, no requiere un gran esfuerzo de tragárla y permite que el compuesto sea rápidamente ingerido o absorbido a través de las membranas mucosas orales. En algunas realizaciones, también se usan formas farmacéuticas adecuadas que se dispersan rápidamente en otras aplicaciones, que incluyen el tratamiento de heridas y otras agresiones corporales y estados de enfermedad en los que no es posible la liberación 50 del medicamento por humedad externamente suministrada.

Las formas de "dosis instantánea" se conocen en la técnica; véase por ejemplo, formas farmacéuticas efervescentes y recubrimientos de liberación rápida de micropartículas insolubles en las patentes de EE. UU. Nº 5.578.322 y 5.607.697; espumas y líquidos liofilizados en las patentes de EE. UU. Nº 4.642.903 y 5.631.023; hilado en estado fundido de formas farmacéuticas en las patentes de EE. UU. Nº 4.855.326, 5.380.473 y 5.518.730; fabricación de 55 formas libres sólidas en la patente de EE. UU. Nº 6.471.992; matriz de vehículo basada en sacáridos y un aglutinante líquido en las patentes de EE. UU. Nº 5.587.172, 5.616.344, 6.277.406 y 5.622.719; y otras formas conocidas en la técnica.

El compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo también se puede formular como formulaciones de "liberación pulsada", en las que el compuesto o sal se libera de las composiciones farmacéuticas en una serie de descargas (es decir, pulsos). El compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo también se puede formular como formulaciones "de liberación sostenida" en las que el compuesto o la sal se libera continuamente de la composición farmacéutica durante un periodo prolongado.

También se contemplan formulaciones, por ejemplo, formulaciones líquidas, que incluyen agentes de encapsulación o de solvatación cíclicos o acíclicos, por ejemplo, ciclodextrinas, poliéteres o polisacáridos (por ejemplo, metilcelulosa), o en otra realización, derivados polianiónicos de  $\beta$ -ciclodextrina con un grupo de sal de sulfonato de sodio separado de la cavidad lipófila por un grupo espaciador de alquil éter o polisacáridos. El agente puede ser metilcelulosa. El agente puede ser un derivado polianiónico de  $\beta$ -ciclodextrina con una sal de sulfonato de sodio separada de la cavidad lipófila por un grupo espaciador de butil éter, por ejemplo, CAPTISOL® (CyDex, Overland, KS). Un experto en la técnica puede evaluar las relaciones de formulación de agente adecuado/compuesto desvelado preparando una disolución del agente en agua, por ejemplo, una disolución al 40 % en peso; preparando diluciones sucesivas, por ejemplo, para preparar las disoluciones de 20 %, 10, 5 %, 2,5 %, 0 % (control) y similares; añadiendo un exceso (en comparación con la cantidad que se puede solubilizar por el agente) del compuesto desvelado; mezclando en condiciones apropiadas, por ejemplo, por calentamiento, agitación, sonicación y similares; centrifugando o filtrando la mezcla resultante para obtener disoluciones transparentes; y analizando las disoluciones para concentración del compuesto desvelado.

La mención de publicaciones y documentos de patentes no pretende ser una admisión de que cualquiera sea estado de la técnica pertinente, ni constituye una admisión en cuanto al contenido o la fecha de los mismos. Habiéndose descrito ahora la invención a modo de descripción escrita, los expertos en la técnica reconocerán que la invención se puede poner en práctica en una variedad de realizaciones y que la siguiente descripción y los ejemplos que siguen son para fines de ilustración y no de limitación de las reivindicaciones que siguen.

### Definiciones

Por comodidad, aquí se recogen ciertos términos usados en la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones adjuntas.

Las proteínas cinasas son una gran clase de enzimas que catalizan la transferencia del  $\gamma$ -fosfato del ATP al grupo hidroxilo en la cadena lateral de Ser/Thr o Tyr en proteínas y péptidos y están íntimamente implicados en el control de diversas funciones celulares importantes, quizás la mayoría, en particular: transducción de señales, diferenciación y proliferación. Se estima que hay aproximadamente 2.000 proteínas cinasas distintas en el cuerpo humano, y aunque cada una de estas fosforilan sustratos particulares de proteína/péptido, todas se unen al mismo segundo sustrato ATP en un sitio altamente conservado. Aproximadamente el 50 % de los productos oncogénicos conocidos son proteína tirosina cinasas (PTK), y se ha mostrado que su actividad de cinasa conduce a la transformación celular.

Las PTK se pueden clasificar en dos categorías, las PTK de receptor de membrana (por ejemplo, las PTK de receptor del factor de crecimiento) y las PTK no de receptor (por ejemplo, la familia Src familia de productos proto-oncogénicos y cinasa de adhesión focal (FAK)). Se ha informado de la hiperactivación de Src en varios cánceres humanos, que incluyen aquellos de colon, mama, pulmón, vejiga y piel, así como en cáncer gástrico, leucemia de células pilosas y neuroblastoma.

La expresión "inhibe uno o más componentes de una cascada de señalización de proteínas cinasas" significa que uno o más componentes de la cascada de señalización de cinasas se efectúan de forma que cambie el funcionamiento de las células. Los componentes de una cascada de señalización de proteínas cinasas incluyen cualquier proteína implicada directa o indirectamente en la vía de señalización de cinasas, que incluye segundos mensajeros y dianas en la dirección 5' y en la dirección 3'.

"Tratar" incluye cualquier efecto, por ejemplo, disminuir, reducir, modular o eliminar, que da como resultado la mejora de la afección, enfermedad, trastorno, etc. "Tratar" o "tratamiento" de un estado de enfermedad incluye: (a) inhibir un estado de enfermedad existente, es decir, detener su desarrollo o síntomas clínicos; y/o (b) aliviar el estado de enfermedad, es decir, causar la regresión de la enfermedad.

"Prevenir" significar causar que no se desarrolle los síntomas clínicos del estado de enfermedad, es decir, inhibir la aparición de la enfermedad, en un sujeto que se puede exponer a o predisposto al estado de enfermedad, pero que todavía no sufre o muestra los síntomas del estado de enfermedad.

"Proteger contra" significa reducir la intensidad de los síntomas clínicos del estado de enfermedad (disminuir) en un sujeto que se puede exponer a o predisposto al estado de enfermedad administrando el compuesto a un sujeto antes de que el sujeto sienta o presente los síntomas del estado de enfermedad.

"Estado de enfermedad" significa cualquier enfermedad, trastorno, afección, síntoma o indicación.

Como se usa en el presente documento, el término "trastorno proliferativo de células" se refiere a afecciones en las que el crecimiento no regulado y/o anormal de células puede conducir al desarrollo de una afección o enfermedad no

deseada, que puede ser cancerosa o no cancerosa, por ejemplo, una afección psoriásica. Como se usa en el presente documento, los términos "afección psoriásica" o "psoriasis" se refieren a trastornos que implican la hiperproliferación de queratinocitos, la infiltración de células inflamatorias y la alteración de citocinas.

5 En una realización, el trastorno de proliferación celular es cáncer. Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" incluye tumores sólidos, tales como tumores de pulmón, mama, colon, ovario, cerebro, hígado, páncreas, próstata, melanoma maligno, cánceres de piel distintos de melanoma, así como tumores hematológicos y/o tumores malignos, tales como leucemia infantil y linfomas, mieloma múltiple, enfermedad de Hodgkin, linfomas de origen linfocítico y cutáneo, leucemia aguda y crónica, tal como leucemia linfoblástica aguda, mielocítica aguda o mielocítica crónica, neoplasia de células plasmáticas, neoplasia linfoide y cánceres asociados al SIDA.

10 Además de las afecciones psoriásicas, los tipos de enfermedades proliferativas que se pueden tratar usando las composiciones de la presente invención son quistes epidérmicos y dermoides, lipomas, adenomas, hemangiomas capilares y cutáneos, linfangiomas, lesiones por nevos, teratomas, nefromas, miofibromatosis, tumores osteoplásicos y otras masas displásicas y similares. Las enfermedades proliferativas pueden incluir displasias y trastornos similares.

15 Una "cantidad eficaz" del compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es la cantidad que, cuando se administra a un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno, da como resultado la regresión de la enfermedad o trastorno en el sujeto. Por ejemplo, una cantidad eficaz del compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es la cantidad que, cuando se administra a un sujeto que tiene un trastorno de proliferación celular, da como resultado la regresión del crecimiento celular en el sujeto. La cantidad del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo que se va a administrar a un sujeto dependerá del trastorno particular, el modo de administración, 20 los compuestos administrados simultáneamente, si los hay, y las características del sujeto, tales como la salud general, otras enfermedades, edad, sexo, genotipo, peso corporal y tolerancia a los fármacos.

25 Como se usa en el presente documento, el término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad del compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una combinación de compuestos, eficaz cuando se administran solos o en combinación como un agente antiproliferativo. Por ejemplo, una cantidad eficaz se refiere a una cantidad del compuesto (I) presente en una formulación o sobre un dispositivo médico administrado a un paciente receptor o sujeto suficiente para provocar la actividad biológica, por ejemplo, actividad antiproliferativa, tal como, por ejemplo, actividad anticancerosa o actividad antineoplásica. La combinación de los compuestos es opcionalmente una combinación sinérgica. Sinergia, como se describe, por ejemplo, por Chou y Talalay, *Adv. Enzyme Regul.* vol. 22, pp. 27-55 (1984), 30 ocurre cuando el efecto de los compuestos cuando se administran en combinación es mayor que el efecto aditivo de los compuestos cuando se administran solos como un agente único. En general, un efecto sinérgico se demuestra más claramente en concentraciones inferiores a las óptimas de los compuestos. La sinergia puede ser en términos de citotoxicidad más baja, o elevado efecto antiproliferativo, o algún otro efecto beneficioso de la combinación en comparación con los componentes individuales.

35 Una cantidad eficaz de uno o más de los compuestos se puede formular con un vehículo farmacéuticamente aceptable para administración a un ser humano o un animal. Por consiguiente, los compuestos o las formulaciones se pueden administrar, por ejemplo, por vías oral, parenteral o tópica, para proporcionar una cantidad eficaz del compuesto. En realizaciones alternativas, el compuesto (I) o una sal del mismo, preparado según la presente invención, se puede usar para recubrir o impregnar un dispositivo médico, por ejemplo, una prótesis endovascular.

40 El término "cantidad profilácticamente eficaz" significa una cantidad eficaz del compuesto (I) o una sal del mismo que se administra para prevenir o reducir el riesgo de la proliferación celular no deseada.

45 "Efecto farmacológico", como se usa en el presente documento, engloba los efectos producidos en el sujeto que logran el fin previsto de una terapia. En una realización, un efecto farmacológico significa que las indicaciones primarias del sujeto que está tratándose se previenen, alivian o reducen. Por ejemplo, un efecto farmacológico sería uno que da como resultado la prevención, el alivio o la reducción de las indicaciones primarias en un sujeto tratado. En otra realización, un efecto farmacológico significa que los trastornos o síntomas de las indicaciones primarias del sujeto que está tratándose se previenen, alivian o reducen. Por ejemplo, un efecto farmacológico sería uno que da como resultado la prevención o la reducción de indicaciones primarias en un sujeto tratado.

50 Una "composición farmacéutica" es una formulación que contiene el compuesto (I) o una sal del mismo, en una forma adecuada para administración a un sujeto. En una realización, la composición farmacéutica está a granel o en forma farmacéutica unitaria. La forma farmacéutica unitaria es cualquiera de una variedad de formas, que incluyen, por ejemplo, una cápsula, una bolsa para IV, un comprimido, una bomba simple en un inhalador de aerosol, o un vial. La cantidad de principio activo (por ejemplo, una formulación del compuesto desvelado o sal, hidrato, solvato, o isómero del mismo) en una dosis unitaria de composición es una cantidad eficaz y varía según el tratamiento particular implicado. Un experto en la técnica apreciará que algunas veces es necesario hacer variaciones rutinarias a la dosificación dependiendo de la edad y la afección del paciente. La dosificación también dependerá de la vía de administración. Se contemplan una variedad de vías, que incluyen oral, pulmonar, rectal, parenteral, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, inhalacional, bucal, sublingual, intrapleural, intratecal, intranasal y similares. Las formas farmacéuticas para la administración tópica o transdérmica de un compuesto de la presente invención incluyen polvos, esprays, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, disoluciones, parches e

inhalantes. En una realización, el compuesto activo se mezcla en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservante, tampón o propulsor que se requiera.

El término "dosis inmediata" se refiere a formulaciones de compuesto que son formas farmacéuticas de dispersión rápida.

5 El término "liberación inmediata" se define como una liberación del compuesto de una forma farmacéutica en un periodo de tiempo relativamente breve, en general, hasta aproximadamente 60 minutos. Se define que el término "liberación modificada" incluye la liberación retardada, la liberación prolongada y la liberación pulsada. El término "liberación pulsada" se define como una serie de descargas de fármaco de una forma farmacéutica. El término "liberación sostenida" o "liberación prolongada" se define como liberación continua de un compuesto de una forma farmacéutica durante un periodo prolongado.

10 Un "sujeto" incluye mamíferos, por ejemplo, seres humanos, animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos, aves y similares), animales de granja (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos, aves de corral y similares) y animales de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, cobayas, aves y similares). En una realización, el sujeto es un ser humano.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones, vehículos y/o formas farmacéuticas que, dentro del alcance del criterio médico sensato, son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable.

20 La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" está reconocida en la técnica e incluye, por ejemplo, materiales, composiciones o vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, disolvente o material de encapsulación, implicado en llevar o transportar cualquier composición objeto de un órgano, o porción del cuerpo, a otro órgano, o porción del cuerpo. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros componentes de una composición objeto y no perjudicial para el paciente. En ciertas realizaciones, un vehículo farmacéuticamente aceptable es no pirógeno. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) 25 almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras de suppositorio; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) 30 glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes de tamponamiento, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua sin pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) disolución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) disoluciones de tampón fosfato; y (21) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en las formulaciones farmacéuticas.

35 "Excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un excipiente que es útil en preparar una composición farmacéutica que, en general, es segura, no tóxica y ni biológica ni de otro modo no deseable, e incluye excipiente que es aceptable para uso veterinario, así como uso farmacéutico humano. Un "excipiente farmacéuticamente aceptable", como se usa en la especificación y las reivindicaciones, incluye tanto uno como más de uno de dicho excipiente.

40 El compuesto (I) de la invención es capaz de formas más sales. Todas estas formas también se contemplan dentro del alcance de la invención reivindicada.

45 El compuesto (I) de la invención puede contener isótopos de los átomos presentes. La presente invención pretende incluir todos los isótopos de átomos que ocurren en los presentes compuestos. Los isótopos incluyen los átomos que tienen el mismo número atómico pero diferente número másico. A modo de ejemplo general y sin limitación, los isótopos de hidrógeno incluyen tritio y deuterio, y los isótopos de carbono incluyen C-13 y C-14.

50 "Sal farmacéuticamente aceptable" de un compuesto significa una sal que es farmacéuticamente aceptable y que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto parental.

55 Como se usa en el presente documento, "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados del compuesto (I) en donde el compuesto (I) se modifica preparando sales ácidas o básicas del mismo. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos minerales u orgánicos de restos básicos tales como aminas, sales alcalinas u orgánicas de restos ácidos tales como ácidos carboxílicos, y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario del compuesto parental formado, por ejemplo, de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Por ejemplo, dichas sales no tóxicas convencionales incluyen, pero no se limitan a, las derivadas de ácidos inorgánicos y orgánicos seleccionados de 2-acetoxibenzoico, 2-hidroxietanosulfónico, acético, ascórbico, bencenosulfónico, benzoico, bicarbónico, carbónico, cítrico, edético, etanodisulfónico, 1,2-etanosulfónico, fumárico, glucoheptónico, glucónico, glutámico, glicólico, glicolilarsanílico, hexilresorcínico, hidrabámico, bromhídrico, clorhídrico, yodhídrico, hidroximaleico, hidroxinaftoico, isetiónico, láctico, lactobiónico, laurilsulfónico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, napsílico, nítrico, oxálico, pamoico, pantoténico, fenilacético, fosfórico, poligalacturónico, propiónico, salicílico, esteárico,

subacético, succínico, sulfámico, sulfanílico, sulfúrico, tánico, tartárico, toluenosulfónico, y los ácidos de amina que ocurren comúnmente, por ejemplo, glicina, alanina, fenilalanina, arginina, etc.

Otros ejemplos incluyen ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido pirúvico, ácido malónico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido 4-clorobencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-toluenosulfónico, ácido canforsulfónico, ácido 4-metilbicitclo-[2.2.2]-oct-2-eno-1-carboxílico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido *terc*-butilacético, ácido mucónico y similares. La invención también engloba sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto parental o está sustituido por un ion metálico, por ejemplo, un ion metal alcalino, un ion metal alcalinotérreo, o un ion aluminio; o se coordina con una base orgánica tal como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina y similares.

5 10 Se debe entender que todas las referencias a sales farmacéuticamente aceptables incluyen formas de adición de disolvente (solvatos) o formas cristalinas (polimorfos) como se define en el presente documento, de la misma sal.

15 15 Los términos "cristales polimorfos" o "polimorfos" o "formas cristalinas" significan estructuras cristalinas en las que el compuesto (I) (o sal o solvato del mismo) puede cristalizar en diferentes disposiciones de empaquetamiento cristalino, todas las cuales tienen la misma composición elemental. Diferentes formas cristalinas normalmente tienen diferentes patrones de difracción de rayos X, espectros de infrarrojos, puntos de fusión, densidad dureza, forma cristalina, propiedades ópticas y eléctricas, estabilidad y solubilidad. El disolvente de recristalización, la tasa de cristalización, la temperatura de almacenamiento, y otros factores, pueden provocar que domine una forma cristalina. Se pueden preparar polimorfos cristalinos del compuesto (I) por cristalización en diferentes condiciones.

20 20 Además, el compuesto (I), por ejemplo, las sales del compuesto (I), pueden existir en forma hidratada o no hidratada (la anhidra) o como solvatos con otras moléculas de disolvente. Los ejemplos no limitantes de hidratos incluyen monohidratos, dihidratos, etc. Los ejemplos no limitantes de solvatos incluyen solvatos de etanol, solvatos de acetona, etc.

25 25 "Solvatos" significa formas de adición de disolvente que contienen cantidades estequiométricas o no estequiométricas de disolvente. Algunos compuestos tienen una tendencia a atrapar una relación molar fija de moléculas de disolvente en el estado cristalino sólido, formando así un solvato. Si el disolvente es agua, el solvato formado es un hidrato, cuando el disolvente es alcohol, el solvato formado es un alcoholato. Los hidratos se forman por la combinación de una o más moléculas de agua con una de las sustancias en las que el agua retiene su estado molecular como H<sub>2</sub>O, siendo dicha combinación capaz de formar uno o más hidratos.

30 30 Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden sintetizar a partir del compuesto (I) por métodos químicos convencionales. En general, dichas sales se pueden preparar haciendo reaccionar el compuesto (I) con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos; se pueden usar medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Las listas de sales adecuadas se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>a</sup> ed. (Mack Publishing Company, 1990).

35 35 El compuesto (I) también se puede preparar como un profármaco, por ejemplo profármaco farmacéuticamente aceptable. Los términos "pro-fármaco" y "profármaco" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a cualquier compuesto que libere un fármaco original activo *in vivo*. Puesto que se conoce que los profármacos potencian numerosas cualidades deseables de los productos farmacéuticos (por ejemplo, solubilidad, biodisponibilidad, fabricación, etc.), el compuesto (I) se puede administrar en forma de profármaco. Así, la presente invención pretende cubrir profármacos del compuesto (I), métodos de administración de los mismos y composiciones que contienen los mismos. "Profármacos" pretenden incluir cualquier vehículo covalentemente unido que libere un compuesto activo (I) *in vivo* cuando dicho profármaco se administra a un sujeto. Los profármacos se preparan modificando los grupos funcionales presentes en el compuesto (I) de tal forma que las modificaciones se escindan, ya sea en manipulación rutinaria o *in vivo*, dando el compuesto (I).

45 45 "Terapia de combinación" (o "co-terapia") incluye la administración del compuesto (I) o una sal del mismo y al menos un segundo agente como parte de una pauta de tratamiento específica prevista para proporcionar el efecto beneficioso de la acción conjunta de estos agentes terapéuticos. El efecto beneficioso de la combinación incluye, pero no se limita a, co-acción farmacocinética o farmacodinámica resultante de la combinación de agentes terapéuticos. La administración de estos agentes terapéuticos en combinación se lleva a cabo normalmente durante un periodo de tiempo definido (normalmente minutos, horas, días o semanas dependiendo de la combinación seleccionada). Se puede prever, pero, en general, no, que la "terapia de combinación" englobe la administración de dos o más de estos agentes terapéuticos como parte de pautas de monoterapia separadas que den accidentalmente y arbitrariamente como resultado las combinaciones de la presente invención.

55 55 "Terapia de combinación" pretende englobar la administración de estos agentes terapéuticos en un modo secuencial, es decir, en donde cada agente terapéutico se administre en un momento diferente, así como la administración de estos agentes terapéuticos, o al menos dos de los agentes terapéuticos, en un modo sustancialmente simultáneo. La administración sustancialmente simultánea se puede llevar a cabo, por ejemplo, administrando al sujeto una única cápsula que tiene una relación fija de cada agente terapéutico o en múltiples cápsulas individuales para cada uno de

los agentes terapéuticos. La administración secuencial o sustancialmente simultánea de cada agente terapéutico se puede efectuar por cualquier vía adecuada que incluye, pero no se limita a, vías orales, vías intravenosas, vías intramusculares y absorción directa a través de tejidos de la membrana mucosa. Los agentes terapéuticos se pueden administrar por la misma vía o por vías diferentes. Por ejemplo, se puede administrar un primer agente terapéutico de

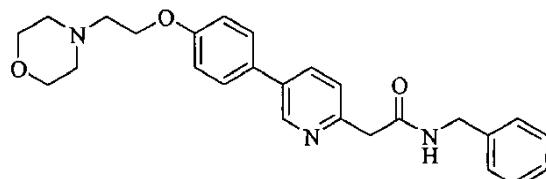
5 la combinación seleccionada por inyección intravenosa, mientras que los otros agentes terapéuticos de la combinación se pueden administrar por vía oral. Alternativamente, por ejemplo, todos los agentes terapéuticos se pueden administrar por vía oral o todos los agentes terapéuticos se pueden administrar por inyección intravenosa. La secuencia en la que se administran los agentes terapéuticos no es estrictamente crítica.

10 "Terapia de combinación" también engloba la administración de los agentes terapéuticos como se ha descrito anteriormente en combinación adicional con otros principios biológicamente activos y terapias no de fármaco (por ejemplo, cirugía o tratamiento de radiación). Donde la terapia de combinación comprende además un tratamiento no de fármaco, el tratamiento no de fármaco se puede realizar en cualquier momento adecuado, mientras que se logra un efecto beneficioso de la acción conjunta de la combinación de los agentes terapéuticos y tratamiento no de fármaco. Por ejemplo, en casos apropiados, el efecto beneficioso se logra aún cuando el tratamiento no de fármaco se retira 15 temporalmente de la administración de los agentes terapéuticos, quizás por días o incluso semanas.

20 En toda la descripción, donde se describe que las composiciones tienen, incluyen o comprenden componentes específicos, se contempla que las composiciones también consisten esencialmente en, o consisten en, los componentes citados. Similarmente, donde se describe que los procesos tienen, incluyen o comprenden etapas de proceso específicas, los procesos también consisten esencialmente en, o consisten en, las etapas de procesamiento citadas. Además, se debe entender que el orden de las etapas u orden para realizar ciertas acciones son inmateriales, mientras que la invención sigue siendo operable. Además, se pueden realizar simultáneamente dos o más etapas o acciones.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1 como referencia: Síntesis a pequeña escala del compuesto (I)



25 La síntesis preliminar descrita a continuación se ilustró en el documento de patente US20060160800A1. Este procedimiento es útil para reacciones a pequeña escala, por ejemplo, reacciones que producen hasta 50 g de producto.

30 Para la siguiente síntesis, a menos que se indique lo contrario, se usaron los reactivos y disolventes que se recibieron de proveedores comerciales. Se obtuvieron los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono en un espectrómetro Bruker AC 300 o Bruker AV 300 a 300 MHz para protón y 75 MHz para carbono. Los espectros se dan en ppm ( $\delta$ ) y las constantes de acoplamiento,  $J$ , se informan en hercios. Se usó tetrametilsilano como patrón interno para los espectros de protones y se usó el pico de disolvente como el pico de referencia para los espectros de carbono. Se obtuvieron los espectros de masas y los datos de masas de CL-EM en un espectrómetro de masas de ionización a presión atmosférica (APCI) de Perkin Elmer Sciex 100. Los análisis de CL-EM se obtuvieron usando una columna 35 Luna C8(2) (100 x 4,6 mm, Phenomenex) con detección UV a 254 nm usando un programa en gradiente de disolvente convencional (Método B). Se realizó cromatografía en capa fina (CCF) usando placas de gel de sílice de Analtech y se visualizaron por luz ultravioleta (UV), yodo, o 20 % en peso de ácido fosfomolíbdico en etanol. Se obtuvieron análisis de HPLC usando una columna Prevail C18 (53 x 7 mm, Alltech) con detección UV a 254 nm usando un programa de gradiente de disolvente convencional (Método A o B).

## Método A:

A = Agua con 0,1 v/v de ácido trifluoroacético

B = Acetonitrilo con 0,1 v/v de ácido trifluoroacético

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% de A	% de B
0,0	3,0	95,0	5,0
10,0	3,0	0,0	100,0
11,0	3,0	0,0	100,0

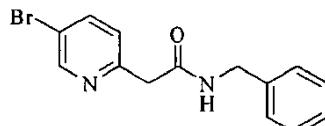
## 5 Método B:

A = Agua con 0,02 v/v de ácido trifluoroacético

B = Acetonitrilo con 0,02 v/v de ácido trifluoroacético

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% de A	% de B
0,0	2,0	95,0	5,0
4,0	2,0	5,0	95,0

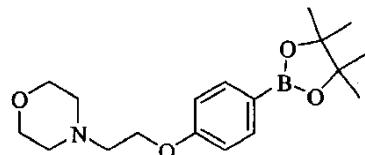
## Síntesis de N-bencil-2-(5-bromopiridin-2-il)acetamida:



10

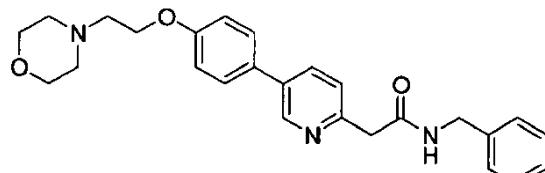
Se cargó un matraz con 5-(5-bromopiridin-2(1H)-iliden)-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona (1,039 g, 3,46 mmoles), bencilamina (0,50 mL, 4,58 mmoles) y tolueno (20 mL). La reacción se llevó a reflujo bajo nitrógeno durante 18 horas, luego se enfrió y se dispuso en un congelador hasta que se enfrió. El producto se recogió por filtración y se lavó con hexanos dando una masa de cristales blancos brillantes (1,018 g, 96 %).

## 15 Síntesis de 4-(2-(4-(4,4,5,5-tetrametil[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-fenoxi)etil)morfolina:



A una disolución con agitación de 4-(4,4,5,5-tetrametil[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-fenol (2,55 g, 11,58 mmoles), 2-morfolin-4-iletanol (1,60 mL, 1,73 g, 13,2 mmoles) y trifenilfosfina (3,64 g, 13,9 mmoles) en cloruro de metileno (60 mL) a 0 °C se añadió gota a gota DIAD (2,82 g, 13,9 mmoles). La reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó durante la noche. Después de 18 horas, se añadieron porciones adicionales de trifenilfosfina (1,51 g, 5,8 mmoles), 2-morfolin-4-iletanol (0,70 mL, 5,8 mmoles) y DIAD (1,17 g, 5,8 mmoles). Después de agitar 2 horas adicionales a temperatura ambiente, se concentró la reacción y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (5 % a 25 % de EtOAc en CHCl<sub>3</sub>) proporcionando el producto como un sólido blanco (2,855 g, 74 %).

## Síntesis de 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)-N-bencilacetamida Compuesto (I)



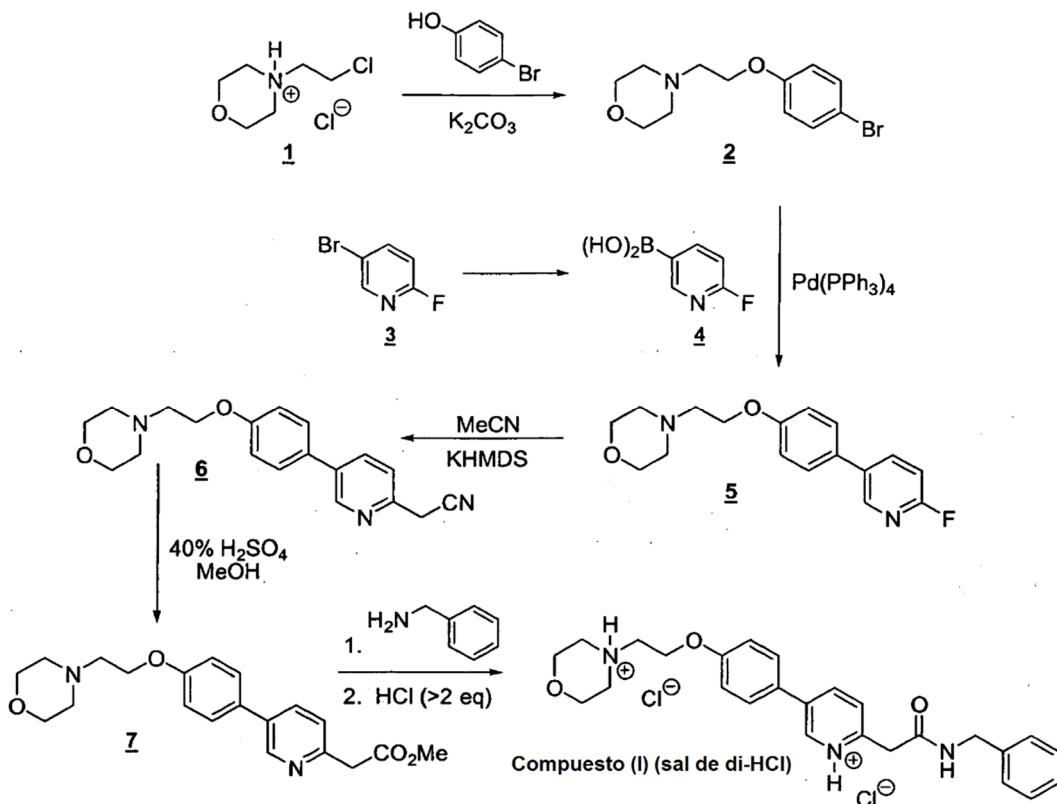
25

Se cargó un tubo de reacción de 10 mL con un cierre de tabique y una barra de agitación con *N*-bencil-2-(5-bromopiridin-2-il)acetamida (123 mg, 0,403 mmoles), 4-(2-(4-(4,4,5,5-tetrametil[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-fenoxi)etil)morfolina (171 mg, 0,513 mmoles) y FibreCat 1007<sup>1</sup> (30 mg, 0,015 mmoles). Se añadió etanol (3 mL), seguido por disolución acuosa de carbonato de potasio (0,60 mL, 1,0 M, 0,60 mmoles). Se cerró el tubo y se calentó bajo condiciones de microondas a 150 °C durante 10 minutos. Se enfrió la reacción y se concentró para retirar la mayoría del etanol, y luego se recogió en 10 mL de acetato de etilo y se lavó sucesivamente con agua y disolución saturada de cloruro sódico. Se secó la fase orgánica con MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró dando un sólido blanco. Este sólido blanco se trituró con etil éter dando el compuesto (I) como un sólido blanco (137 mg, 79 %): pf 135-137 °C; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,70 (d, 1H, J=2,0 Hz), 7,81 (dd, 1H, J=2,4 Hz, J=8,0 Hz), 7,65 (s a, 1H), 7,49 (d, 2H, J=8,8 Hz), 7,37-7,20 (m, 6H), 7,01 (d, 2H, J=8,8 Hz), 4,49 (d, 2H, J=5,8 Hz), 4,16 (t, 2H, J=5,7 Hz, 3,82 (s, 2H), 3,78-3,72 (m, 4H), 2,84 (t, 2H, J=5,7 Hz), 2,62-2,58 (m, 4H); HPLC (Método B) 98,0 % (ABC), *t*<sub>R</sub> = 1,834 min; APCI EM *m/z* 432 [M+H]<sup>+</sup>.

Ejemplo 2 como referencia: Síntesis a escala intermedia del compuesto (I) di-clorhidrato

Se puede usar la síntesis brevemente expuesta en este ejemplo en reacciones a escala intermedia. La preparación de lotes de al menos 50 g de la sal de diclorhidrato del compuesto (I) se muestra en el Esquema 1. La síntesis lineal consistió en 6 etapas, siendo una séptima etapa la preparación de uno de los reactivos, ácido 6-fluoropiridin-3-ilborónico (que también está comercialmente disponible). El rendimiento global de la secuencia fue 35 % con un rendimiento promedio de 83 %, siendo la etapa de rendimiento más baja 68 %. De las siete etapas solo una requirió la cromatografía. El procedimiento listado a continuación se realizó en una escala de 70 g.

<sup>1</sup> Di(acetato)diciclohexilfenilfosfinopaladio(II) unido a polímero, fabricado por Johnson Matthey, Inc. y disponible de Aldrich (Nº de catálogo 590231).



La primera etapa es una síntesis de éter de Williamson entre 4-bromofenol (131 g) y N-cloroetilmorfolina (1 como la sal de HCl; 141 g) usando polvo de  $K_2CO_3$  (3 a 3,5 equivalentes) como base y que tiene acetonitrilo como disolvente. Los componentes se mezclaron y se agitaron a reflujo durante la noche con alta conversión (96,3-99,1 %). Después de la dilución con diclorometano y heptano, la mezcla de reacción se filtró y se evaporó dando el producto deseado 2 con un rendimiento esencialmente cuantitativo (216 g). Obsérvese que con sustratos similares (por ejemplo, 4-bromo-3-fluorofenol), las conversiones (incluso con un gran calentamiento) no fueron siempre tan altas (por ejemplo, 59,9-98,3 %). Tanto el cloruro de alquilo como el  $K_2CO_3$  se compran preferentemente de Aldrich. Si el calentamiento continuado no conduce a la finalización de la reacción, se puede retirar fácilmente el bromofenol sin reaccionar disolviendo la mezcla de reacción en bruto en 4 partes tolueno y lavando el fenol con 4 partes de NaOH acuoso al 15 %.

Uno de los reactivos requeridos para la segunda etapa (acoplamiento de Suzuki) fue el ácido 6-fluoropiridin-3-ilborónico (**4**). Aunque está disponible comercialmente, este reactivo se preparó fácilmente por intercambio con bromuro de litio de 5-bromo-2-fluoropiridina (**3**, 102 g) con n-butil-litio (1,2 eq) a bajas temperaturas (<-60 °C) en TBME, seguido por la adición de triisopropilborato (1,65 eq). Ambas etapas de la reacción son cortas, con un tiempo de reacción global (incluyendo los tiempos de adición) de ~3 h. La extinción se logra con NaOH acuoso al 24 %, que también extrae el producto dejando impurezas en la fase orgánica. Una vez se retira la fase acuosa, entonces se neutraliza con HCl y se extrae con EtOAc. Despues de secar los extractos orgánicos y diluir con algo de heptano, la concentración conduce a la precipitación / cristalización del producto. La filtración dio el ácido borónico **4** en pureza relativamente alta (96,4 % de ABC) y buen rendimiento (69 g, 79-90 %; véase la nota sobre la estimación del rendimiento en la sección experimental), que se puede usar sin más purificación.

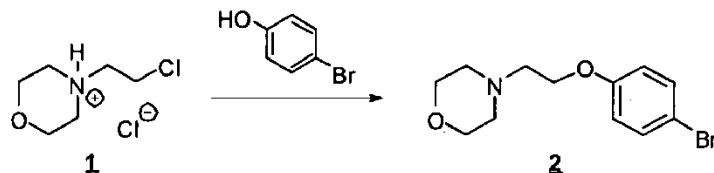
La segunda etapa de reacción en la secuencia lineal (un acoplamiento de Suzuki) es una reacción simple de configuración; todos los reactivos [**2** (111 g), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> acuoso, DME y Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0,04 eq)] se cargaron al matraz de reacción y la mezcla se calentó a refluo; obsérvese que la mezcla de reacción se desgasificó para retirar el oxígeno. Una vez se completa la reacción (en el plazo de 7 h), el procesamiento implicó la decantación (o extracción con sifón) de la disolución de reacción de las sales orgánicas en el lado del matraz (no hubo fase acuosa visible), se aclaró el matraz y se secó, y el disolvente se retiró de los extractos orgánicos combinados. La cristalización de **5** en bruto de isopropanol/heptano proporcionó material de pureza mejorada en comparación con el bruto, pero todavía requirió cromatografía (relación entre gel de sílice y bruto fue ~8,5:1) para obtener material de pureza adecuada (>98 %); el rendimiento fue 68 % (79,5 g). El uso de **5** limpio previno la necesidad de cromatografía en la siguiente etapa, desplazamiento con acetonitrilo del átomo de flúor.

La sustitución de fluoruro con acetonitrilo también fue una reacción simple, y una simple cristalización a temperatura ambiente del producto en bruto proporcionó **6** limpio con alto rendimiento y pureza. La reacción implicó la formación inicial del "enolato" a partir de acetonitrilo (6,5 eq) usando hexametildisilano de potasio KHMDS (8 eq)/THF a -10 °C, seguido inmediatamente por la adición de fluoruro **5** (79 g). La reacción fue rápida y después de una hora se logró la extinción con salmuera saturada. Después del secado y la evaporación de disolvente de los extractos orgánicos, la mezcla en bruto resultante consistió en solo dos componentes, el producto deseado y un producto mucho menos polar de la evidente auto-condensación de acetonitrilo. Se arremolinó la mezcla en bruto en isopropanol/heptano y se dejó que se asentara durante la noche, que produjo la cristalización completa del producto, que se separó por filtración y se lavó proporcionando alta pureza **6** (99,3 % de ABC) con buen rendimiento (64 g, 76 %).

Se llevó a cabo la metanólisis de **6** (64 g) calentando en 40 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (en MeOH) hasta que la reacción estuvo completa (25 h). Entonces se enfrió la reacción, se agitó con MgSO<sub>4</sub> para convertir las trazas de producto hidrolizado (ArCH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>Me) de nuevo en el producto, y luego se añadió a K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> acuoso enfriado con extracción simultánea en diclorometano. El secado y la evaporación de la mayoría del DCM seguido por la adición de 5 % de EtOAc (en heptano) y concentración adicional produjeron la cristalización del producto. La filtración del sólido y el lavado dieron alta pureza (98,9 % de ABC) **7** con buen rendimiento (82 %), obteniéndose producto de alta pureza adicional (4 g) de las aguas madres dando un rendimiento total de 61,7 g (87 %).

La etapa de amidación también conllevó cargar el recipiente de reacción con los componentes (7 (61 g), bencilamina (3 eq) y anisol de alto punto de ebullición) y luego calentar a refluo hasta que la reacción estuvo completa. El enfriamiento de la mezcla de reacción produjo la cristalización completa del compuesto diana con alta pureza (98,9 %) y buen rendimiento (81 %).

La etapa final fue la formación de la sal diclorídrica del compuesto diana. Para garantizar la protonación completa en ambos sitios básicos, la reacción se realizó en etanol absoluto, que disolvió libremente la sal de diclorhidrato. Después de la evaporación hasta casi sequedad, la mezcla de reacción se "cazó" con etanol dos veces para retirar el exceso de cloruro de hidrógeno. El aceite viscoso resultante se disolvió en etanol (2 partes) y luego se añadió, con agitación rápida, a un gran volumen (20 partes) de EtOAc (acetato de etilo). La filtración, el lavado con acetato de etilo (no heptano) y el secado a vacío proporcionaron la sal de diclorhidrato del compuesto (**1**) como un polvo blanco cremoso. Se obtuvo un total de 68 g (rendimiento de 97 %) de la sal final con alta pureza (99,6 % de ABC), que contuvo trazas de EtOAc (4,8 % p/p), EtOH (0,3 % p/p) y heptano (0,6 % p/p; de un lavado final con heptano antes del secado a vacío). Esta sal también cristalizó (en lugar del método de precipitación descrito anteriormente) en EtOH/EtOAc caliente, proporcionando perlas cristalinas que tenían niveles de disolvente atrapado mucho más bajos (solo 0,26 % p/p de EtOAc y 0,45 % p/p de EtOH) y eran fluidas.



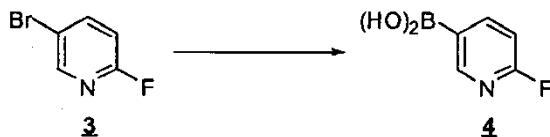
## Preparación de 4-(2-(4-bromofenoxy)etil)morfolina (2):

Se cargó un matraz redondo de tres bocas de 5 L, equipado con agitador mecánico, termómetro con adaptador, condensador y entrada de nitrógeno (además del condensador), con 1 (140,7 g, 0,756 moles), 4-bromofenol (130,6 g, 0,755 moles), polvo de  $K_2CO_3$  anhídrico (367,6 g, 2,66 moles, 3,5 eq) y acetonitrilo (1,3 L). La mezcla se agitó

5 vigorosamente (cuchilla que toca el fondo del matraz) a 80 °C (durante la noche), seguido por dilución con DCM (500 mL) y heptano (200 mL) y filtración a través de Celite. La evaporación a sequedad (rotovapor, luego alto vacío) dio **2** como un aceite amarillo claro (216,00 g, rendimiento de 100 %, 96,3 % de ABC, contiene 3,7 % de bromofenol sin reaccionar). Este material se usó satisfactoriamente sin más purificación.

10 RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  2,57 (t, 4 H), 2,79 (t, 2 H), 3,73 (t, 4 H), 4,08 (t, 2 H), 6,78 (d, 2 H), 7,37 (d, 2 H). EM (de EM/CL):  $m/z$  287,1 [M + 1].

Que el bromofenol se pueda retirar fácilmente se demostró en una muestra de 2 g disolviendo primero la muestra en tolueno (8 g) y lavando con 8 g de NaOH acuoso al 15 %; la cromatografía de líquidos no mostró traza de bromofenol sin reaccionar en el producto recuperado (1,97 g; 98,5 % de recuperación).



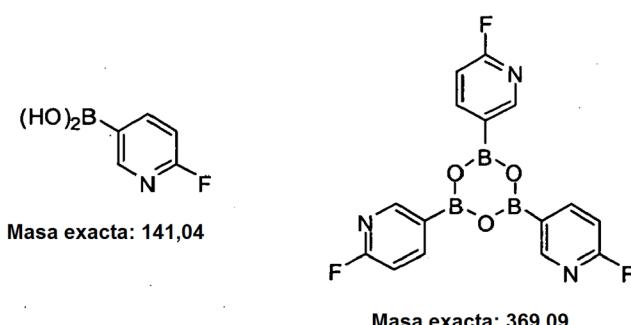
## 15 Preparación de ácido 6-fluoropiridin-3-ilborónico (4):

A [TBME] anhídrico agitado y enfriado (baño de nieve carbónica-acetona) (620 mL; en un matraz redondo de tres bocas de 3 L equipado con agitador mecánico, sonda de temperatura con adaptador y entrada de nitrógeno) se añadió (por jeringa) BuLi 2 M (352 mL, 0,704 moles, 1,2 eq). A esta mezcla rápidamente agitada y enfriada (< -75 °C) se añadió una disolución de 3 (102,2 g, 0,581 moles) en TBME anhídrico (100 mL) durante un periodo de 13 min, tiempo durante

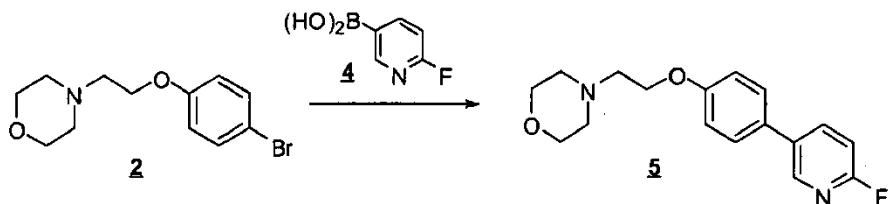
20 el cual la temperatura interna aumentó hasta -62 °C. La reacción se agitó durante otros 45 min (la temperatura se mantuvo entre -62 °C y -80 °C), seguido por la rápida y secuencial adición de cuatro porciones de borato de triisopropilo (total de 180 g, 0,957 moles, 1,65 eq). Al final de la adición, la temperatura interna había subido hasta -33 °C. Despues de agitar 45 min adicionales en el baño frío (la temperatura interna se redujo desde -33 °C hasta -65 °C), se retiró el baño frío y la mezcla con agitación subió por si misma hasta -22 °C durante un periodo de 50 min. Despues de calentarse (por baño de agua) hasta 6 °C durante un periodo de 15 min, la mezcla de reacción con agitación se dispuso en un baño de agua con hielo y luego se extinguió bajo nitrógeno con una disolución enfriada de NaOH (160 g) en agua (500 mL). Una vez se completó la adición, la temperatura interna fue 20 °C. Esta mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. Se retiró la fase acuosa, se neutralizó hasta pH 7 con ~350 mL de HCl concentrado y luego se extrajo con EtOAc (3 x 1 L). Debido a que el pH era ahora 8-9, la fase acuosa se ajustó a pH 7 usando ~15 mL de

30 HCl concentrado y se extrajo adicionalmente (2 x 1 L) con acetato de etilo. Se secaron los extractos combinados de EtOAc ( $Na_2SO_4$ ), se filtraron y se concentraron hasta un volumen de ~150 mL. Arremolinando el concentrado, se añadió heptano en porciones (volumen total de 300 mL) dando como resultado la precipitación/cristalización del producto. La filtración, el lavado del sólido con heptano (100 mL, 300 mL, luego otros 300 mL) y el secado con aire dio el producto del título como un sólido blanquecino (68,6 g, rendimiento de 79-90 %\*; pureza por CL de 96,4 %, la RMN

35 mostró una estimación de 5,5 % p/p de heptano), que se usó satisfactoriamente sin más purificación. La EM/CL mostró que era una mezcla de las dos siguientes entidades, siendo mayor la intensidad de la entidad de peso molecular más alto (\*Nota: el rendimiento de reacción es 79 % si se supone que el ácido borónico es el único constituyente y es 90 % si se supone que el borato cíclico es el único constituyente):



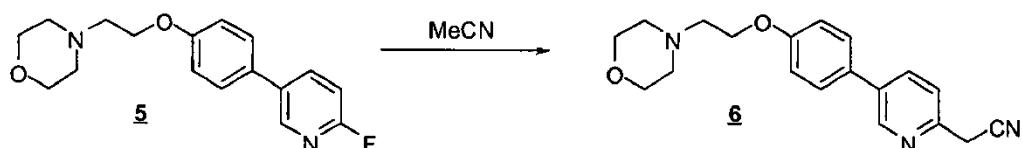
40 RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  7,14 (dd, 1 H), 8,27 (ddd, 1 H), 8,39 (s a, 2 H, 2 OH), 8,54 (d fino, 1 H). EM (de EM/CL):  $m/z$  143,0 [M + 1; para ácido borónico] y 370,0 [M + 1; para el borato cíclico anterior].



Preparación de 4-(2-(4-(6-fluoropiridin-3-il)fenoxi)ethyl)morfolina (5):

Se cargó un matraz redondo de tres bocas de 2 L equipado con agitador mecánico, termómetro y adaptador, condensador y entrada de nitrógeno (encima del condensador) con **2** (110,7 g, 0,387 moles), **4** (71,05 g, 0,477 moles, 1,23 eq) y DME (700 mL). La disolución resultante se desgasificó con agitación pasando una corriente rápida de nitrógeno a través de la disolución con agitación durante un periodo de 5 min, seguido por la adición de una disolución desgasificada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (121,06 g, 1,142 moles, 3 eq) en H<sub>2</sub>O (250 mL) y también Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> sólido (19,8 g, 0,044 eq). Inmediatamente después de la última adición, se purgó con nitrógeno el espacio de cabeza por encima de la mezcla de reacción y entonces se agitó la mezcla a 80-85 °C (temperatura interna) durante 7 h, seguido por enfriamiento hasta temperatura ambiente. Debido a la falta de una fase acuosa, se decantó el sobrenadante, dejando atrás las sales inorgánicas (con agua adsorbida). Se lavó el matraz de reacción con las sales inorgánicas con 50 % de diclorometano/acetato de etilo (2 x 250 mL), añadiéndose los lavados al sobrenadante decantado. Estos extractos orgánicos combinados se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtraron y se evaporaron a sequedad dando un aceite marrón oscuro (148 g). A este aceite se añadió 150 g de 50 % de heptano/alcohol isopropílico (IPA) y después de arremolinar y enfriar (mediante un baño de agua con hielo), empezó la cristalización. Se añadió heptano adicional (50 g) y el sólido resultante se filtró, se lavó y se secó al aire dando 48 g de un sólido marrón claro. Después de evaporar el filtrado a sequedad, se arremolinó la mezcla resultante en 100 mL de 50 % de heptano/IPA, seguido por la adición de más heptano (~100 mL), taponado y disposición en el congelador para cristalización. El sólido resultante se filtró, se lavó con heptano y se secó al aire dando 61 g de un sólido gomoso. La evaporación del filtrado resultante dio un aceite (34 g) que contuvo impurezas significativamente menos polares que incluían Ph<sub>3</sub>P=O y así se repartió entre HCl 2 N (240 mL) y EtOAc (220 mL). Se retiró la fase acuosa inferior y luego se agitó con EtOAc mientras se neutralizaba con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> hasta un pH de 7-8. Se secó la fase de EtOAc, se filtró y se evaporó a sequedad (22 g). Se purificaron porciones de 48 g, 61 g y 22 g por cromatografía sobre gel de sílice (1,1 kg) cargadas en DCM. La elución con DCM (400 mL), 50 % de DCM/EtOAc (5 L) y luego 50 % de DCM/EtOAc (8 L) que contenía cantidades crecientes de MeOH/Et<sub>3</sub>N (empezando con 1,5 % de MeOH/1 % de Et<sub>3</sub>N y terminando con 5 % de MeOH/3 % de Et<sub>3</sub>N) dieron 77,68 g de un aceite viscoso (pureza 98,0 %) que cristalizó inmediatamente tras el arremolinamiento en heptano (300 mL). La filtración, el lavado con heptano y el secado al aire dieron 75,55 g (98,7 % de ABC) del sólido **5**. Se obtuvo **5** puro adicional (total de 3,9 g, 98,6-99,3 % de ABC) de las fracciones cromatográficas previas que contenían Ph<sub>3</sub>P=O purificándolas como se hizo para la muestra de 34 g anterior, seguido por cristalización evaporativa. El rendimiento total de **5** fue 79,5 g (68 %).

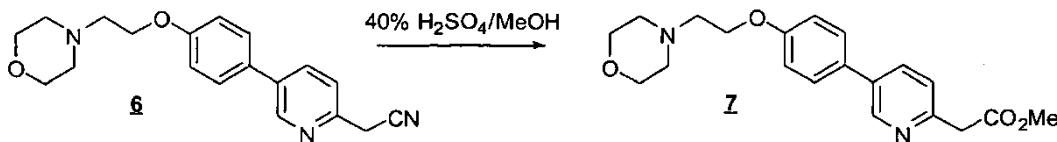
RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 2,59 (t, 4 H), 2,84 (t, 2 H), 3,75 (t, 4 H), 4,16 (t, 2 H), 6,97 (dd, 1 H), 7,01 (d, 2 H), 7,46 (d, 2 H), 7,92 (ddd, 1 H), 8,37 (d fino, 1 H). EM (de EM/CL): m/z 303,2 [M + 1].



Preparación de 2-(5-(4-(2-morpholin-4-ylmethoxy)phenyl)piridin-2-il)acetonitrilo (6):

Se equipó un matraz redondo de tres bocas de 3 L con agitador mecánico, termómetro y adaptador, embudo adicional y entrada de nitrógeno (encima del embudo de adición, presión positiva a través de un burbujeador). Con una corriente de nitrógeno rápida que pasa a través del burbujeador, se retiró el tapón y se cargó el matraz con KHMDS (415,8 g, 2,08 moles) y luego THF anhídrido (1 L). A la disolución de KHMDS/THF con agitación y enfriada (baño de hielo/metanol, la temperatura interna de la disolución fue -8 °C) se añadió gota a gota una disolución de MeCN (70 g) en THF (110 mL) durante un periodo de 22 min, seguido inmediatamente por la adición relativamente rápida (4 min) de una disolución de **5** (79,06 g, 0,262 moles) en THF (400 mL), tiempo después del cual la temperatura interna de la mezcla de reacción había alcanzado 10 °C. Con enfriamiento continuo (1 h), la temperatura interna fue -6 °C y la reacción apareció completa por CCF. Después de 30 min adicionales (temperatura interna de -3 °C), la mezcla de reacción se inactivó con salmuera saturada (1 L) y se diluyó con EtOAc (500 mL). Después de retirar la fase acuosa, se secó la disolución orgánica (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se evaporó a sequedad (dando un aceite), seguido por disolución completa en IPA (150 mL), dilución con heptano (300 mL), adición de cristales de semilla (preparados disolviendo ~100 mg de aceite en bruto en IPA (~150 mg) y dilución con heptano (~2,5 mL)), y se dejó reposar durante la noche. Después de agitar para romper el sólido cristalino, el sólido se filtró, se lavó con 250 mL de 2:1 de heptano/IPA y luego múltiples lavados con heptano y se secó al aire dando 64,38 g (rendimiento de 76 %) del producto del título **6** como un sólido cristalino de color tostado (pureza por CL de 99,3 %). Se obtuvieron otros 5,88 g de material menos puro del filtrado.

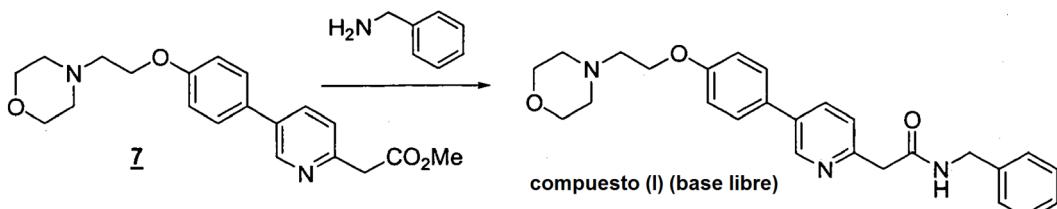
RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2,59 (t, 4 H), 2,84 (t, 2 H), 3,74 (t, 4 H), 3,97 (s, 2 H), 4,17 (t, 2 H), 7,02 (d, 2 H), 7,46 (d, 1 H), 7,51 (d, 2 H), 7,87 (dd, 1 H), 8,77 (d fino, 1 H). EM (de EM/CL):  $m/z$  324,4 [M + 1].



Preparación de 2-(5-(4-(2-morpholinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetato de metilo (7):

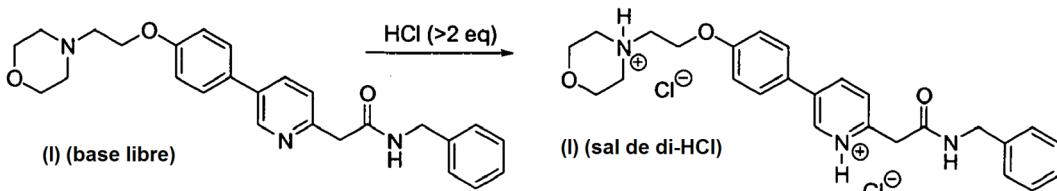
- 5 Se cargó un matraz redondo de una sola boca de 2 L con 6 (64,00 g, 0,198 moles) y MeOH (360 g), seguido por la adición lenta, cuidadosa y gota a gota de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (240 g) y la disolución homogénea resultante se agitó a reflujo (baño de aceite a 115 °C) hasta que la reacción se completó (25 h con 0,8 % de material de partida sin reaccionar) con 3,5 % de  $\text{ArCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ . Despues de un breve enfriamiento, se añadió  $\text{MgSO}_4$  (75 g) y la mezcla se arremolinó y se dejó que reposara 45 min adicionales (composición ahora 96,3 % de producto, 0,8 % de material de partida sin reaccionar y 2,5 % de  $\text{ArCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ ). Entonces se añadió lentamente la mezcla de reacción a una mezcla de DCM (2 L) rápidamente agitada y enfriada (baño de agua con hielo) y una disolución de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (450 g) en  $\text{H}_2\text{O}$  (600 mL). La emulsión resultante se dejó reposar durante la noche. Se vaciaron por sifón porciones claras de disolución orgánica y las porciones restantes se trataron iterativamente con agua y DCM, siendo los extractos orgánicos claros combinados con la porción original que vació por sifón. Se secaron los extractos orgánicos combinados ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), se filtraron y se combinaron hasta un volumen de ~1,2 L, seguido por la adición de 300 mL de 5 % de EtOAc (en heptano) y luego heptano (300 mL) y la mezcla se concentró (rotovapor con calor) nuevamente para retirar el DCM. En este momento se añadieron 15 mL de EtOAc y la mezcla caliente se arremolinó hasta que empezó la cristalización, el arremolinado continuó hasta que la cristalización fue casi completa, y entonces se dejó que reposara y enfriara hasta temperatura ambiente para la cristalización completa. Entonces se filtró el sólido, se lavó con 300 mL de 5 % de EtOAc (en heptano) y heptano (100 mL) y luego se secó completamente al aire dando 57,74 g (rendimiento de 82 %) de 7 como un sólido amarillo claro (98,9 % de ABC). Se obtuvieron otros 3,94 g de producto claro (97,9 % de ABC) del filtrado (rendimiento total de 87 %).

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2,60 (t, 4 H), 2,84 (t, 2 H), 3,74 (t y s que se solapan, 6 H), 3,89 (s, 2 H), 4,17 (t, 2 H), 7,01 (d, 2 H), 7,34 (d, 1 H), 7,49 (d, 2 H), 7,80 (dd, 1 H), 8,74 (d fino, 1 H). EM (de EM/CL):  $m/z$  357,4 [M + 1].



- 25 Preparación de 2-(5-(4-(2-morpholinoetoxi)fenil)piridin-2-il)-N-bencilacetamida (base libre del compuesto (I)).
- Se cargó un matraz redondo de una sola boca de 1 L con 7 (61,4 g, 0,172 moles), bencilamina (55,6 g, 0,519 moles, 3 eq) y anisol anhídrido (300 g) y luego se agitó a reflujo hasta que la reacción fue esencialmente completa (23 h, temperatura del baño de aceite 165 °C; la temperatura interna fue 147 °C) y luego se dejó enfriar hasta casi temperatura ambiente. Se diluyó una porción (1 mL) de la mezcla de reacción con tolueno (1 mL) dando como resultado la completa cristalización de esa porción. Entonces se añadió esa semilla a la mezcla de reacción y se dejó que reposara hasta que toda la mezcla de reacción había cristalizado dando un único bloque. Se añadió tolueno (150 mL) y la mezcla se arremolinó para romper el sólido. Se añadió heptano/tolueno (1:1, 100 mL) y la mezcla sólida se rompió adicionalmente. Finalmente, se añadió heptano (50 mL, luego 25 mL) y la mezcla se rompió incluso más, dejando que reposara 30 min adicionales antes de filtrar el sólido. La filtración del sólido, lavado con 2:1 de tolueno/heptano (300 mL), 1:2 de tolueno/heptano (300 mL) y luego heptano (2 x 300 mL), y luego secado (aire, luego alto vacío) dio 60,16 g (rendimiento de 81 %) del producto del título como un sólido blanco (≥98,9 % de ABC). Se obtuvieron otros 2,5 g de material menos puro (97,4 %) de las aguas madres.

- 40 RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2,60 (t, 4 H), 2,83 (t, 2 H), 3,74 (t, 4 H), 3,82 (s, 2 H), 4,18 (t, 2 H), 4,49 (d, 2 H), 7,01 (d, 2 H), 7,2-7,35 (m, 6 H), 7,49 (d, 2 H), 7,64 (t a, 1 H), 7,81 (dd, 1 H), 8,69 (d fino, 1 H). EM (de EM/CL):  $m/z$  432,5 [M + 1].



Preparación de cloruro de 4-(2-(4-(6-(2-(bencilamino)-2-oxoetil)piridinio-3-il)fenoxi)etil)-morfolin-4-ilo (Compuesto (I), sal de di-HCl).

A una suspensión con agitación del compuesto (I) (base libre, 60,00 g) en EtOH absoluto (600 mL) se añadió 170 mL de HCl 2,5 M (en etanol), añadiéndose 25 mL de EtOH para lavar las paredes del matraz. La disolución homogénea resultante se agitó a temperatura ambiente (20 min) y luego se evaporó hasta casi sequedad (hasta que hace espuma). Después de cazar con EtOH (2 x 150 mL), el residuo se recogió otra vez en EtOH (150 mL) y luego fue seguido por la lenta adición de heptano hasta que la mezcla pareció saturada (se requirieron 33 mL para que permaneciera la turbidez). Después de asentar durante la noche, se formaron dos capas. Después de añadir heptano adicional (250 mL), todavía no se pudo inducir la cristalización y entonces se concentró la mezcla de reacción hasta un volumen de ~200 mL, momento en el que la mezcla fue homogénea. Esta disolución homogénea densa se añadió gota a gota a EtOAc (2 L) muy rápidamente agitado (mecánico). Después de completarse la adición, se añadió un aclarado de 25 mL de EtOH del matraz original y embudo de adición a la mezcla rápidamente con agitación. La rápida agitación continuó durante ~1 h y luego la mezcla se filtró y se lavó el sólido (parcialmente gomoso) con EtOAc (300 mL) y luego heptano. Tan pronto como empezó el lavado con heptano, el sólido se volvió mucho más gomoso. Se cubrieron el 5 Buchner fritado y su contenido (toalla de papel/banda de goma) y se dispusieron inmediatamente en la estufa de vacío. Después del vacío durante la noche a ~45 °C, se soltó el vacío bajo nitrógeno, y el embudo Buchner que contenía el producto (sólido espumoso) se dispuso inmediatamente en una bolsa con cierre de cremallera y luego, bajo nitrógeno (Glove Bag), se transfirió a una botella y se rompió el sólido espumoso (espátula) dando un polvo. Una segunda noche 10 bajo alto vacío (~45 °C) solo produjo 1,3 g de pérdida de peso adicional. Se obtuvo esencialmente peso constante con la tercera noche de alto vacío (~45 °C) donde solo se perdió 0,2 g de peso. El peso de material final fue 68,05 g (rendimiento de 97 %), que contenía 0,29 eq (4,8 % p/p) de EtOAc, 0,035 eq (0,3 % p/p) de EtOH y 0,03 eq (0,6 % p/p) de heptano. La pureza fue 99,6 %.

20 RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 3,1-3,3 (m, 2 H), 3,45-3,65 (m, 4 H), 3,8-4,0 (m, 4 H), 4,11 (s, 2 H), 4,32 (d, 2 H), 4,57 (t, 2 H), 7,19 (d, 2 H), 7,2-7,4 (m, 5 H), 7,88 (d, 2 H), 7,93 (d, 1 H), 8,68 (dd, 1 H), 8,99 (t a, 1 H), 9,10 (d fino, 1 H), 11,8 (s a, 1 H). EM (de EM/CL): m/z 432,5 [M + 1 de base libre].

25 Análisis elemental (para C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> • 2 HCl • 0,035 EtOH • 0,29 EtOAc • 0,03 heptano • 0,8 H<sub>2</sub>O):

30 a. Calculado (%): C, 60,03; H, 6,54; N, 7,65; Cl, 12,91

b. Observado (%): C, 59,85/59,97; H, 6,54/6,47; N, 7,67/7,67; Cl, 13,10/13,24

35 FW calculado: 534,63 (no tiene en cuenta los 0,8 H<sub>2</sub>O que probablemente surgieron durante la manipulación del polvo muy higroscópico, puesto que RMN <sup>1</sup>H no muestra evidencia de H<sub>2</sub>O).

Se midió el nivel de cloruro de etilo en este material y se encontró que era 98 ppm. También se analizó la muestra y se encontró que contenía 5.800 ppm de heptano.

40 El análisis de otra porción de esta muestra dio los siguientes resultados: 99,6 % de ABC, 1640 ppm de etanol, 41.480 ppm de acetato de etilo, 5600 ppm de heptano, no se detectó anisol, y 120 ppm de cloruro de etilo.

45 También se desarrolló un procedimiento de recristalización de la sal usando la sal anteriormente secada. Este procedimiento funcionaría precisamente bien en la sal en bruto altamente pura (que contiene EtOH residual) obtenida de la concentración de la mezcla de reacción que forma la sal de HCl:

Se disolvió la sal (575 mg) en dos veces la masa de EtOH absoluto (1,157 g) y luego se calentó bajo nitrógeno. A esta 45 disolución caliente (agitada) se añadió 1,6 g de 25 % de EtOH (en EtOAc), seguido por la adición de EtOAc (0,25 mL), dando como resultado una turbidez que siguió. Se dejó enfriar la disolución caliente turbia hasta temperatura ambiente durante el tiempo que ocurrió la cristalización. Después de completarse la cristalización (2 h), se filtró el sólido cristalino, se lavó con EtOAc anhidro (~40 mL) y se secó a vacío dando 424 mg de la sal de diclorhidrato del compuesto (I) como un sólido fluido (perlas minúsculas, 99,8 % de ABC) que solo contenían 0,05 eq (0,45 % p/p) de EtOH y 0,015 eq (0,26 % p/p) de EtOAc. Se obtuvo una recuperación ligeramente mejor (460 mg a partir de 586 mg) usando isopropanol/EtOAc, pero el nivel de atrapamiento de disolvente fue más alto [0,085 eq (1,0 % p/p) de isopropanol y 0,023 eq (0,4 % p/p) de EtOAc].

**Ejemplo 3 como referencia: Síntesis a gran escala de di-HCl del compuesto (I)**

Los reactivos y disolventes se usaron como se recibieron de los proveedores comerciales. El progreso de las reacciones se monitorizó por HPLC, CG/EM o RMN <sup>1</sup>H. Se realizó cromatografía en capa fina (CCF) usando placas de gel de sílice Analtech y se visualizaron por luz UV (254 nm). Se realizó cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

5 en un instrumento Agilent 1100 Series. Se obtuvieron espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono usando un Bruker AV 300 a 300 MHz para el protón y 75 MHz para el carbono. Se usó el pico de disolvente como el pico de referencia para los espectros de protón y de carbono.

**Preparación de 4-(2-(4-Bromofenoxy)ethyl)morfolina (2)**

10 Se cargó un reactor encamisado de 50 L equipado con un condensador de reflujo y sonda de temperatura con 4-(3-cloropropil)morfolina (2,44 kg, 0,54 moles), 4-bromofenol (2,27 kg, 0,54 moles, 1,0 equiv.), en carbonato de potasio en polvo (6,331 kg, 1,88 moles, 3,50 equiv.) y DMF (12,2 L) y se agitó. Entonces se calentó la mezcla de reacción hasta 60-65 °C y se agitó durante la noche. Después de 17,5 h, la mezcla de reacción se enfrió hasta 20-25 °C. La mezcla de reacción se cargó a un reactor diferente equipado con válvula inferior para el procesamiento. Mientras se mantenía una temperatura entre 20-30 °C, se cargó agua DI (48,7 L) al reactor. Se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo con MTBE (3 × 24,4 L). A los extractos orgánicos combinados se añadieron agua DI (18,3 L) y luego hidróxido sódico 6 M (18,2 L). La mezcla se agitó durante 2-5 minutos y se separaron las fases. La fase orgánica se lavó con agua (24,4 L) y salmuera (24,4 L), se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró dando 3370 g de un aceite amarillo (89 % de rendimiento en bruto, 99,4 % de ABC por HPLC).

**Preparación de ácido 6-fluoropiridin-3-ilborónico (4)**

20 Un reactor de 72 L equipado con condensador de reflujo y sonda de temperatura. Al reactor se cargaron 5-bromo-2-fluoropiridina (1,17 L, 0,568 moles), tolueno (18,2 L) y borato de triisopropilo (3,13 L, 0,68 moles, 1,2 equiv.) y se agitó. Se añadió tetrahidrofurano (4,4 L) al reactor y la mezcla de reacción se enfrió hasta entre -35 y -50 °C. Mientras se mantenía una temperatura entre -35 y -45 °C, se añadió cuidadosamente al reactor n-butil-litio (disolución 2,5 M de hexanos, 5,44 L, 0,68 moles, 1,2 equiv.). Después de 5 h, la reacción se consideró completa y la mezcla de reacción se calentó hasta entre -15 y -20 °C. A la reacción se añadió HCl 2 M (11,80L) al reactor mientras se mantenía una temperatura entre -15 °C y 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a 18 a 23 °C durante (16 h) y se separaron las fases. Entonces se trajeron los extractos orgánicos con hidróxido sódico 6 M (6,0 L). Se mezclaron las fases ácidas y básicas en el reactor y se añadió HCl 6 M (2,5 L) hasta que se alcanzó pH 7,5. Entonces se añadió cloruro sódico (6,0 kg) a la fase acuosa. Entonces se extrajo la fase acuosa con THF (3 × 20 L). Los extractos orgánicos combinados se secaron con sulfato de magnesio y se concentraron dando 1300 g de un sólido de color tostado (81 % de rendimiento en bruto).

**Preparación de 4-(2-(4-(6-fluoropiridin-3-il)fenoxi)ethyl)morfolina (5)**

35 Se cargó un reactor de 72 L equipado con condensador de reflujo, tubo de burbujeo, burbujeador y sonda de temperatura con ácido 6-fluoropiridin-3-ilbórico (2,84 kg, 1,24 equiv.), 4-(2-(4-bromofenoxy)ethyl)morfolina (4,27 kg, 1,0 equiv.) y DME (27 L). Empezó la agitación y entonces se cargó a la mezcla de reacción carbonato sódico (4,74 kg, 3,0 equiv.) como una disolución en agua DI (17,1 L). Se burbujeó argón a través de la mezcla de reacción durante 50 minutos. Bajo una atmósfera de argón, se añadió tetraquis(trifenilfosfina)paladio (750 g, 0,04 equiv.) a la mezcla de reacción como una suspensión en DME (1,0 L). La mezcla de reacción se calentó hasta 75 - 85 °C y se agitó durante la noche (17 h). La mezcla de reacción se enfrió hasta entre 18 – 22 °C. Se cargaron al reactor agua DI (26,681 kg) y 40 MTBE (26,681 L) y se agitó durante 5 minutos. Se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con MTBE (2 × 26,7 L). Se trajeron los extractos orgánicos combinados con HCl 2 M (1 × 15,0 L, 3 × 21,8 L). Entonces se cargó de nuevo al reactor la fase acuosa y se añadió acetato de etilo (26,7 L). El pH se ajustó a 6,2 usando hidróxido sódico 6 M (26,7 L) mientras se mantenía una temperatura entre 15 - 25 °C. Se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 × 26,7 L). Los extractos orgánicos combinados se secaron con sulfato de magnesio y se concentraron dando 4555 g de un residuo (101 % de rendimiento en bruto, 67,1 % de ABC por HPLC).

**Purificación de 4-(2-(4-(6-fluoropiridin-3-il)fenoxi)ethyl)morfolina (5)**

50 El producto en bruto (575 g) se purificó por cromatografía en gel de sílice eluyendo con metanol/acetato de etilo/heptano (30 % de acetato de etilo/heptano, 50 % de acetato de etilo/heptano, 75 % de acetato de etilo/heptano, 100 % de acetato de etilo y 5 % de metanol/acetato de etilo). La concentración de las fracciones puras por CCF (10 % de metanol/diclorometano, R<sub>f</sub> = 0,3) proporcionó 420 g de un sólido marrón claro (73 % de recuperación, >99,9 % de ABC por HPLC).

**Preparación de 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetonitrilo (6)**

55 Se cargó una disolución 1 M de NaHMDS (2,0 L, 5,0 equiv.) en THF a un matraz de 5 L y se enfrió hasta -20 a -15 °C. Mientras se mantenía la temperatura por debajo de -10 °C, se cargó fluoruro (119,7 g, 1,0 equiv.) en THF (500 mL) al matraz durante 20 minutos. Se añadió acetonitrilo (82,5 mL, 4,0 equiv.) en THF (170 mL) al matraz durante 20 minutos, mientras se mantenía una temperatura por debajo de -10 °C. Entonces se agitó la mezcla de reacción durante 1 h. A la reacción se añadió salmuera (1,5 L, 12,6 vol.) a una tasa como para mantener una temperatura inferior a 10 °C.

Entonces se calentó la disolución hasta temperatura ambiente y se dejó que se separaran las fases. La mezcla se filtró sobre Celite y se lavó con THF (1 x 200 mL, 1 x 100 mL). La fase acuosa se extrajo con tolueno (750 mL). Los extractos orgánicos combinados se secaron con sulfato de magnesio, se filtraron, se lavaron con tolueno (2 x 250 mL) y se concentraron a sequedad.

5 Se añadió tolueno (1L) y la disolución se concentró a sequedad nuevamente dando 169,8 g de un aceite. Se añadió MTBE (1190 mL, 7 vol.) al aceite a 50 °C y se agitó durante 15 minutos. Se añadió heptano (850 mL, 5 vol.) durante diez minutos a 50 °C. Entonces se enfrió la mezcla hasta temperatura ambiente durante 1,5 h y se agitó durante 2 h. Se filtró la suspensión, se lavó con 1:4 de MBTE/heptano (2 x 100 mL) y se secó en un horno durante la noche a 45 °C dando 102,3 g de un sólido blanquecino (80 % de rendimiento, 98,8 % de ABC por HPLC).

10 Preparación de 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetato de metilo (7)

Se cargaron el nitrilo 6 (101 g) y metanol (1,01 L, 10 vol.) a un matraz de 3 L equipado con barra de agitación y termopar. Se añadió gota a gota  $H_2SO_4$  concentrado (175 mL, 10,0 equiv.) a la disolución durante 15 minutos mientras se mantenía una temperatura inferior a 60 °C. Siguió la adición gota a gota de 30 % de ácido sulfúrico fumante (124 mL), a la disolución mientras se mantenía una temperatura inferior a 60 °C. Entonces la disolución se calentó

15 hasta reflujo con una manta calefactora y se agitó durante la noche. Cuando la reacción se consideró completa, se enfrió hasta 20 °C. En un segundo matraz (22 L), se cargaron bicarbonato sódico saturado (10,7 L) y diclorometano (1,1 L) y se enfrió hasta 15 °C. Mientras se mantenía una temperatura inferior a 20 °C, la mezcla de reacción se añadió a la mezcla de bicarbonato sódico/diclorometano. La extinción se agitó durante 15 minutos y se separaron las fases. 20 La fase acuosa se extrajo con diclorometano (1 x 550 mL, 1 x 300 mL). Los extractos orgánicos combinados se secaron con sulfato de magnesio y se concentraron a sequedad dando 105 g de un sólido naranja (94 % de rendimiento en bruto, 97,7 % de ABC por HPLC).

Preparación de 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)-N-bencilacetamida (Compuesto (I))

Se cargaron el éster 7 (103 g), anisol (513 mL, 5 vol.) y bencilamina (94 mL, 3,0 equiv.) a un matraz de 3 L equipado con termopar y agitador superior. La mezcla de reacción se calentó entonces hasta 142 °C y se agitó durante dos días.

25 La mezcla de reacción se enfrió hasta 45-50 °C y se agitó durante 2 horas. A la mezcla se añadió n-heptano (1,5 L) gota a gota durante una hora. La disolución se enfrió hasta temperatura ambiente durante tres horas y luego se agitó durante la noche. La suspensión resultante se filtró, se lavó con 4:1 de anisol/n-heptano (200 mL) y n-heptano (3 x 100 mL). Secando en el horno durante la noche, el producto resultante fue 112,1 g de un sólido de color tostado (90 % de rendimiento, 99,6 % de ABC por HPLC). El uso de un único isómero de heptano fue esencial para cuantificar suficientemente el disolvente residual.

30 Preparación de sal de diclorhidrato de 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)-N-bencilacetamida (Compuesto (I)·2HCl)

Se cargó EtOH (1,0 L) a un matraz de 2 L y se añadió lentamente al matraz cloruro de acetilo (62,5 mL, 3,0 equiv.) y se agitó durante 40 minutos. La disolución resultante se añadió al compuesto (I) (100 g) durante 30 minutos mientras se mantenía una temperatura de 30 °C. La disolución se concentró hasta una masa de 270 g. La disolución concentrada se añadió a acetato de etilo (2 L) durante 20 minutos con agitación rápida. La mezcla se agitó durante la noche y luego se filtró bajo nitrógeno dando dos productos sólidos distintos, sólidos de color tostado (73,5 g) y sólidos más oscuros (42,2 g). Los sólidos se mezclaron secos dando un rendimiento combinado de 99 %. El análisis de HPLC indicó 99,0 % de pureza (ABC).

40 Los análisis indicaron que el etanol estaba presente a 2530 ppm, acetato de etilo a 48.110 ppm, cloruro de etilo a 170 ppm, y no se detectaron heptano ni anisol. El contenido de paladio se ensayó tres veces y se midió que era 29 ppm, 2 ppm e inferior a 1 ppm.

Estudio de cristalización del compuesto (I)·2HCl

45 Los experimentos mostrados en la tabla que sigue se realizaron para explorar diferentes condiciones de cristalización y de precipitación del compuesto (I)·2HCl.

Estudio de cristalización del compuesto (I) 2HCl

Experimento	Condiciones de formación de sales				Condiciones de cristalización				Comentarios
	Amida (g)	Lote	Disolvente	Ácido	Disolvente (vol)	Lote	EtOAc (vol)	Temp. (°C)	
02BP097 A	0,1	02BP090D (blanquecino)	IPA	IPA-HCl (5M)	IPA (10)	--	10	60	N
02BP097 B	0,1	02BP091E (blanco)	IPA	IPA-HCl (5M)	IPA (10)	--	--	60	N
02BP097 C	0,1	02BP091E (blanco)	IPA	IPA-HCl (5M)	IPA (15)	--	6	65	N
02BP097 D	0,1	02BP091E (blanco)	--	IPA-HCl (5M)	EtOAc/IPA	--	--	60	N
02BP097 E	0,3	02BP090D (blanquecino)	EtOH	IPA-HCl (5M)	EtOH (3,3)	Acros	6,3	30-60	S
02BP097 F	0,3	02BP093G (sólido de color tostado)	EtOH	IPA-HCl (5M)	EtOH (3,3)	Acros	6,6	60	S
02BP097 G	0,3	02BP093G (sólido de color tostado)	PrOH	IPA-HCl (5M)	PrOH (3,3)	--	1,7	60	S
02BP097 H	0,3	02BP093G (sólido de color tostado)	BuOH	IPA-HCl (5M)	BuOH (5)	--	1,2	60	S
02BP098 A,B,C	1,0	02BP093G (sólido de color tostado)	EtOH	IPA-HCl (5M)	EtOH (3,3)	Ald	4-6	60	N
02BP098 D	1,0	02BP093G (sólido de color tostado)	EtOH	EtOH-HCl (2,5 M)	EtOH (3,3)	Ald	4,6	60	N
02BP098 E	0,3	02BP090D (blanquecino)	EtOH	EtOH-HCl (2,5 M)	EtOH (3,3)	Ald	5,3	60	N
02BP098 F	0,3	02BP091E (blanco)	EtOH	IPA-HCl (5M)	EtOH (3,3)	Acros	6	60	N

Experimento	Condiciones de formación de sales			Condiciones de cristalización				Comentarios	
	Amida (g)	Lote	Disolvente	Ácido	Disolvente (vol)	Lote	EtOAc (vol)	Temp. (°C)	
02BP098 G	0,3	02BP091E (blanco)	PrOH	IPA-HCl (5M)	PrOH (3,3)	--	4	60	N Separación de aceite con enfriamiento

- 5 Se logró la precipitación por una adición inversa del compuesto (I)-2HCl en una disolución concentrada de etanol a un gran volumen de acetato de etilo rápidamente agitado. Este procedimiento de precipitación se implementó para demostrar que el lote dio como resultado la formación de dos tipos de sólido distintos. Los dos tipos de sólido distintos se separaron físicamente y se filtraron por separado. Se filtró primero un sólido menos denso de color tostado (lote 02BP111E, 74 g, 99,1 % de ABC por HPLC), seguido por un sólido más oscuro más denso (lote 02BP111F, 43 g, 99,1 % de ABC por HPLC). Después del secado en una estufa de vacío y antes de mezclar los dos sólidos, se guardó una muestra de cada uno para el análisis. Los datos de HPLC para las dos muestras fueron comparables, mientras que DSC y XRPD fueron diferentes.
- 10 Las dos preparaciones de HPLC fueron superiores al 99,0 % puro (por % en área), la muestra del lote 02BP111E mostró un único acontecimiento endotérmico a aproximadamente 198 °C mientras que la muestra del lote 02BP111F mostró dos acontecimientos endotérmicos a 117 °C y 189 °C. Los datos de XRPD para las dos muestras también fueron diferentes, la muestra del lote 02BP111E pareció cristalina, mientras que la muestra del lote 02BP111F pareció ser amorfa. Los datos de HPLC, los datos de XRPD y los datos de DSC apoyan que las dos muestras son formas diferentes del mismo material.
- 15 15 Los dos lotes del compuesto (I)-2HCl (lote 02BP111E y 02BP111F) se mezclaron en seco dando como resultado un nuevo lote del compuesto (I)-2HCl (lote 02BP111G). El compuesto (I)-2HCl (lote 02BP111G) contuvo 170 ppm de cloruro de etilo.
- 20 **Ejemplo 4 como referencia: Preparación de mesilato de 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)-N-bencilacetamida (Compuesto (I)-MSA).**
- 20 Preparación de 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetonitrilo (6)
- 25 A un reactor 1 redondo se cargó bis(trimetildisilil)amida de sodio (1,0 M en THF, 23,2 L) y la disolución se enfrió hasta ≤-10 °C durante 52 minutos. A una damajuana de vidrio, bajo nitrógeno, se cargó el compuesto 5 (1400 g, 1 peso) y THF (7,0 L, anhidro, 5 vol). El lote se agitó con un agitador alimentado por aire bajo nitrógeno. El lote no fue completamente soluble y fue una disolución turbia. La disolución del compuesto 5 se añadió al reactor 1 durante 41 minutos por un embudo de adición de 5 L. Se preparó una disolución de acetonitrilo (965 mL, anhidro, 0,69 vol) en THF (2,0 L, anhidro, 1,43 vol) y se añadió al reactor 1 durante 48 minutos a ≤-10 °C por el mismo embudo de adición (estaba presente una menor cantidad de un sólido amarillo en la pared del reactor). Después del envejecimiento durante 45 minutos a ≤-10 °C, el lote se muestreó para el análisis y el compuesto 5 fue 0,03 % por conversión (especificación ≤1,5 % por conversión). Una hora y 24 minutos después del muestreo, se añadió salmuera (17,6 L, 12,6 vol) al reactor 1 durante 52 minutos y dio un lote con mala agitación (se pareció a una emulsión). Se preparó una almohadilla de tierra de diatomeas en un embudo de 61 cm (24") de polipropileno (1026 g de Celite 545 suspensa en 3,3 L de agua con el filtrado desecharido). El lote se filtró bajo succión por la almohadilla y el reactor se aclaró con THF (1,75 L, 1,25 vol) y el aclarado se transfirió a la torta. La torta se aclaró con una segunda porción de THF (1,75 L, 1,25 vol) y el tiempo de filtración total fue 1 hora 17 minutos. El filtrado se transfirió al reactor 2 y las fases se separaron y se mantuvieron durante la noche (el lote se mantuvo en el reactor bajo nitrógeno). Se drenó la fase orgánica (aproximadamente 34,5 L) y la fase acuosa se extrajo con tolueno (8,1 L, 5,8 vol), agitación durante 16 minutos y sedimentación durante 12 minutos. Es posible omitir la extracción con tolueno y simplemente añadir tolueno directamente a la fase orgánica después de la separación. Se retiró la fase acuosa (aproximadamente 19 L) y las fases orgánicas se combinaron y se secaron en el reactor 2 con sulfato de magnesio (1400 g, 1 peso, anhidro) durante 55 minutos. El lote se filtró por un embudo de polipropileno de 61 cm (24") equipado con un filtro en línea en una damajuana de vidrio. El lote se inertizó con argón y se guardó en la sala fría (2-8 °C) pendiente de ser concentrado. Al día siguiente, se concentró el lote dando un residuo y se aclaró con tolueno (11,8 L, 8,4 vol), que a su vez se concentró (baño de agua 50 ± 5 °C). En el momento de la adición de tolueno, el lote fue una suspensión naranja y siguió así después de la concentración. El tiempo de concentración total fue 5 horas 3 minutos.
- 30 45 Al reactor 3 se cargó MTBE (13,9 L, 9,9 vol, ACS) que luego se calentó hasta 45 ± 5 °C. Se drenó el MTBE y se usó aproximadamente 2 L de MTBE para la suspensión del lote desde el balón en el reactor 3. Se añadió el MTBE restante al reactor 3 manteniendo el lote a 45 ± 5 °C y luego se envejeció el lote durante 33 minutos en este intervalo de temperatura. Entonces se añadió *n*-heptano (10 L, 7,1 vol, 99 %) al reactor 3 durante 39 minutos manteniendo el lote a 45 ± 5 °C. Se desconectó la fuente de calor, se enfrió el lote hasta 25 ± 5 °C durante 4 horas 5 minutos y se envejeció en ese intervalo de temperatura durante 27 horas 4 minutos. Entonces se filtró el lote bajo succión por un embudo de polipropileno de 61 cm (24") (tela de PTFE), se cubrió y se secó por aspiración bajo nitrógeno. El tiempo de filtración total fue 20 minutos. Se secó el lote naranja (peso húmedo neto 1322 g) hasta peso constante durante 48 horas 3 minutos en una estufa de vacío establecida a 45 ± 5 °C. El lote se transfirió a dos frascos de vidrio de color ámbar de 80 oz (2,4 L) (cierre revestido de teflón) y se inertizó con argón (1217 g de 6, 81 % del teórico).
- 50 55 Preparación de 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetato de metilo (7)
- 55 A un reactor de 22 L se cargó el compuesto 6 (900 g, 2,78 moles) y metanol (9,0 L, 10 vol, anhidro). Se añadió ácido sulfúrico (1115 mL, fumante) a la suspensión durante 2 horas y 11 minutos dando una disolución oscura. La temperatura máxima fue 65,5 °C (objetivo <65 °C). Se añadió ácido sulfúrico (1565 mL, 1,74 vol, concentrado) al lote durante 1 hora y 49 minutos y entonces el lote se calentó hasta reflujo visible (74 °C) durante 18 minutos. El lote se

mantuvo a esa temperatura durante 16 horas y 57 minutos. Se observó que el reflujo suave visible estaba ausente, de manera que el lote se calentó entonces otra vez a reflujo a 79-80 °C durante 2 horas 15 minutos. El lote se mantuvo a esa temperatura (80 ± 5 °C) durante 10 horas y 57 minutos y luego se desconectó la fuente de calor; se realizó una carga de metanol adicional (0,75 L, 0,8 vol, anhídrico) después de 26 horas y 4 minutos para reponer el volumen de disolvente perdido. Se estimó que se perdieron 2,5-3,3 L de disolvente por evaporación. El análisis de HPLC después de 42 horas y 31 minutos de reflujo indicó que el nivel del compuesto 6 era 0,6 % por conversión (especificación ≤1,0 %). A cada uno del reactor 1 y 2 se cargó cloruro de metileno (4,8 L, 5,3 vol) y disolución de hidrogenocarbonato de sodio (48 L, 53,3 vol, saturado). Las disoluciones de hidrogenocarbonato de sodio se almacenaron durante la noche a 2-8 °C y se retiraron a la siguiente mañana. La mitad del lote del reactor de 22 L se añadió en porciones a cada reactor durante 47 y 44 minutos respectivamente (la temperatura del lote fue 12-13 y 14-15 °C, respectivamente). La extinción fue acompañada por el desprendimiento de dióxido de carbono (vigoroso en el vórtex). Entonces se transfirieron los lotes de cada reactor a un reactor de 200 L y el lote se agitó durante 16 minutos, luego sedimentó durante 25 minutos y se separó la fase orgánica. La fase acuosa se extrajo sucesivamente con dos porciones de cloruro de metileno (5 L, 5,6 vol y 2,7 L, 3 vol); cada extracción tuvo lugar durante 15 minutos con agitación con sedimentación durante 6 y 9 minutos, respectivamente. La fase orgánica combinada se transfirió al reactor 3 y se secó con sulfato de magnesio (900 g, 1 peso, anhídrico) durante 35 minutos. Entonces se filtró el lote bajo succión por un embudo de polipropileno de 61 cm (24") provisto de tela Sharkskin y equipado con un filtro en línea (10 micrómetros, Pall P/N 12077). El filtrado se concentró en un evaporador rotatorio durante un total de 2 horas y 18 minutos a 40 ± 5 °C (temperatura del baño de agua). Después de 54 minutos, el lote solidificó y formó bolas. Estas se rompieron y continuó la concentración. Entonces se trituró adicionalmente el lote (una mezcla de sólidos finos y trozos frágiles) y se devolvió al balón y continuó la concentración. El lote se transfirió a un frasco de color ámbar de 80 oz (2,4 L) con una tapa revestida de teflón y se inertizó con argón dando el compuesto 7 (871 g, 88 % del teórico).

Preparación de 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)-N-bencilacetamida (compuesto (I))

A un reactor de 22 L se cargó el compuesto 7 (650 g, 1,82 moles), anisol (3,25 L, 5 vol, anhídrico) y bencilamina (600 mL, 0,92 vol, 3 equiv). El lote (aproximadamente 18 °C) se calentó hasta 142 ± 5 °C durante 1 hora y 44 minutos, con disolución que ocurrió a 30 °C. El lote se mantuvo a 142 ± 5 °C durante 69 horas y 30 minutos, momento en el que el análisis de HPLC indicó que el compuesto 7 era 0,9 % por conversión (especificación ≤1,7 % por conversión). El lote se enfrió hasta 45-50 °C durante 5 horas y 12 minutos (para ayudar en el enfriamiento, el flujo de nitrógeno aumentó una vez el lote estaba a aproximadamente 72 °C). En ese intervalo de temperatura, el lote se agitó mal y tras la mezcla la temperatura del lote aumentó hasta 52 °C. Fue >50 °C durante ≤15 minutos. El lote se envejeció durante 2 horas y 2 minutos una vez inicialmente <50 °C, luego se añadió n-heptano (9,75 L, 15 vol, 99 %) al lote durante 1 hora y 56 minutos, manteniéndose la temperatura del lote a 45-50 °C. Entonces se interrumpió el calentamiento y el lote se enfrió hasta 25 °C durante 10 horas y 32 minutos y luego hasta aproximadamente 20 °C durante 20 minutos. El tiempo total que el lote se mantuvo ≤25 °C fue 4 horas y 50 minutos (2 horas y 47 minutos a aproximadamente 20 °C). El lote se filtró bajo succión por un embudo de filtro de polipropileno de 61 cm (24") (provisto con una tela de PTFE) y el reactor se aclaró con anisol/n-heptano (1,3 L, 4: 1) y el aclarado se transfirió a la torta. Entonces se lavó sucesivamente la torta con dos porciones de n-heptano (1,3 L, 0,65 L). El tiempo de filtración total fue 39 minutos. El lote (peso húmedo neto 1004 g de KX2-391) se transfirió a tres bandejas de vidrio y se dispuso en una estufa de vacío establecida a 50 °C y se secó hasta peso constante durante 96 horas y 26 minutos.

Preparación de mesilato de 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)-N-bencilacetamida (compuesto (I)-MSA)

Se transfirió el compuesto (I) (520 g, 1,21 moles) al reactor 1 usando acetona (41,6 vol, 80 vol, ACS) para facilitar la transferencia. El lote se calentó hasta 50 ± 5 °C durante 33 minutos con disolución que ocurrió a 30 °C. El lote se clarificó en un segundo reactor por una bomba de transferencia provista de un filtro en línea (Pall P/N 12077, 10 micrómetros) y se recalentó desde 46 °C hasta 50 ± 5 °C. Se añadió ácido metanosulfónico (121,4 g, 1,05 equiv, 99 % extrapuro) al lote amarillo pálido durante 12 minutos y luego continuó el calentamiento. Después de catorce minutos, se observaron sólidos blancos, que aumentaron en número dando después de 59 minutos una suspensión blanca. El lote estuvo en el intervalo de 25 ± 5 °C después de 7 horas y 51 minutos y se envejeció durante 19 horas y 21 minutos adicionales (10 horas y 30 minutos a ≤27 °C). El lote se filtró bajo succión por un filtro de polipropileno de 61 cm (24") (tela de PTFE) y el reactor se aclaró con acetona (2,0 L, se clarificó, ACS) y el aclarado se transfirió a la torta. La torta se cubrió con una tapa de acero inoxidable y se secó por aspiración bajo un flujo de nitrógeno. El tiempo de filtración total fue 21 minutos. El lote (peso húmedo neto 764 g) se transfirió a tres bandejas de secado de vidrio y se secó en una estufa de vacío hasta peso constante a 25 ± 5 °C durante 21 horas y 54 minutos (565 g, 89 % del teórico). Se retiró una muestra para el análisis y el lote se mantuvo a vacío a 25 ± 5 °C. Entonces se transfirió el lote a dos botellas de vidrio de color ámbar de 80 oz (2,4 L) (cierre de polipropileno revestido con teflón), se inertizaron con argón y se guardaron a -10 a -20 °C.

**Ejemplo 5 como referencia: Determinación de la dosis para el estudio de dosis única ascendente (RSD) y de dosis múltiple ascendente (RMD)**

Se seleccionó la dosis inicial basándose en los resultados de los estudios de toxicidad de 28 días en perros y ratas. En estos estudios, se encontró que los perros eran la especie más sensible. El nivel tóxico mínimo fue 0,5 mg/kg/dosis

5 administrada por sonda nasogástrica oral dos veces al día. A este nivel, no se observaron signos clínicos, cambios en el peso corporal ni resultados macroscópicos. El único resultado que se consideró que estaba posiblemente relacionado con el artículo de prueba fue la alanina aminotransferasa de mínimamente a ligeramente elevada. Muchos resultados microscópicos no se observaron en animales administrados con 0,5 mg/kg/dosis dos veces al día, pero estos fueron de menor intensidad y afectaron a menos animales que el grupo de alta dosis y no se asociaron a signos clínicos. Basándose en los consejos de la FDA, se calculó la dosis inicial como un décimo de la dosis por metro cuadrado que es gravemente tóxica para el 10 % de los roedores (STD10), es decir, 2 mg.

10 Se han seleccionado tres niveles de dosis para la parte de RSD para determinar la farmacocinética oral de la dosis única del compuesto (I) y para apoyar o refinar el programa de administración para la parte de RMD del estudio. Los niveles de dosis del compuesto (I) seleccionados para la parte de RSD del estudio son 2, 5 y 10 mg (equivalentes de base libre), administrados como una disolución oral.

15 Se han seleccionado los niveles de dosis para la parte de RMD para conseguir inmediatamente y precavidamente la dosis máxima tolerada para el compuesto (I). En anticipación de la toxicidad a los niveles de dosis más altos, las dosis se aumentarán por incrementos de 40 mg después del nivel de dosis de 80 mg. La administración de dos veces al día está apoyada por el intervalo de semivida de 5-8 horas como se observa en la administración oral en perros. Los 20 niveles de dosis del compuesto (I) seleccionados para la parte de RMD del estudio son 2, 5, 10, 20, 40, 80, 120, 160 mg o más altas (en incrementos de 40 mg), dependiendo de la seguridad y la tolerabilidad, administradas como una disolución oral dos veces al día. Se pueden modificar tanto la dosis como la frecuencia de administración dependiendo de la farmacocinética de dosis única del compuesto (I) y la seguridad.

**Ejemplo 6 como referencia: Estudio de dosis única ascendente (RSD) y de dosis múltiple ascendente (RMD)**

25 Para determinar la farmacocinética (FC) de dosis única del compuesto (I), se realiza un estudio de dosis única ascendente (RSD) a un estudio de dosis única ascendente. Se enrrollan cohortes sucesivas de 3 pacientes en cohortes de dosis ascendente. Cada paciente enrolado recibe una dosis oral única de la disolución del compuesto (I) a 2, 5 o 10 mg (se requieren al menos 2 horas de ayuno antes y después de la dosis) y se observa durante al menos 7 días. Si no se desarrolla toxicidad (como se define a continuación), los pacientes continúan con el compuesto (I) en un 30 programa de administración de dos veces al día durante 2 ciclos en la parte de RMD del estudio.

Para determinar la dosis máxima tolerada (DMT) del compuesto (I) cuando se administra como disoluciones múltiples orales a los pacientes con múltiples tumores malignos, se realiza un estudio de dosis múltiple ascendente. La realización de la parte de RMD del estudio es la siguiente:

Primer ciclo

35 Cohortes sucesivas de 3 pacientes reciben el compuesto (I) como una disolución oral a 2, 5, 10, 20, 40, 80, 120, 160 mg o más alta (en incrementos de 40 mg) dos veces al día (separadas aproximadamente 10 horas; se requieren al menos 2 horas de ayuno antes y después de la dosis) durante 21 días, con una dosis adicional administrada AM el día 22 por la conveniencia de muestreo FC prolongado. Solo el primer ciclo tiene 22 días de administración. Todos los ciclos posteriores tienen 21 días de administración.

40 El programa de administración se puede modificar basándose en los resultados FC simultáneos y las preocupaciones de seguridad.

Si ocurre una toxicidad de grado 2 clínicamente significativa (como se define a continuación) dentro de una cohorte para la parte 1 o la parte 2 del estudio, a menos que el acontecimiento adverso sea claramente el resultado de la progresión de la enfermedad, se ralentiza el aumento de dosis. Se reduce el incremento de dosis para la siguiente 45 cohorte de administración.

Si 1 paciente de 3 desarrolla toxicidad limitante de la dosis (TLD, como se define más adelante) entonces la cohorte se expandirá desde 3 hasta 6 pacientes. Si solo 1 de 6 pacientes o ninguno en la cohorte expandida desarrolla TLD, el aumento de dosis avanzará al siguiente nivel (se refiere a la sección 6.3.1). Si  $\geq 2$  de 3 o 6 pacientes en la cohorte expandida desarrollan TLD, entonces el tratamiento se detendrá en ese nivel de dosis. Otra cohorte de 3 pacientes se

50 administra con una dosis reducida dos veces al día. El proceso continúa hasta que se determine la DMT. La DMT se define como el nivel de dosis más alto al que no más de 1 de 6 pacientes desarrolla TLD. Se administran 10 pacientes adicionales en la DMT para caracterizar mejor la farmacocinética de seguridad y los efectos biológicos del compuesto (I). Si en cualquier momento el número de pacientes que experimentan TLD es  $> 33\%$ , se detendrá la administración.

55 Se considera que la dosis justamente por debajo de este nivel es la DMT y en este nivel se enrrollan 10 pacientes adicionales.

Segundo ciclo

Cuando los pacientes en una cohorte completan el periodo de lavado del primer ciclo sin TLD, pasan al segundo ciclo de 21 días de administración y 7 días de lavado. Después de dos ciclos de administración, los pacientes que pueden tolerar el compuesto (I) y no tienen progresión de la enfermedad reciben ciclos adicionales del compuesto (I) (21 días con y 7 días sin).

5 La toxicidad se define como un acontecimiento adverso que tiene una atribución de estar posiblemente, probablemente o definitivamente relacionado con el tratamiento en investigación.

La toxicidad limitante de la dosis (TLD) se evalúa durante el primer ciclo de tratamiento y se definirá como:

- 10 • Cualquier toxicidad no hematológica  $\geq$  grado 3 según los NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) versión 3.0. Se considerarán TLD las náuseas, los vómitos, la diarrea y los desequilibrios de electrolitos solo si estos son  $\geq$  grado 3 a pesar de los cuidados paliativos adecuados;
- 15 • Neutropenia de grado 4 que dura  $>$  5 días;
- Neutropenia febril (definida como recuento absoluto de neutrófilos [ANC]  $<$  1,0 x 10<sup>9</sup>/L y fiebre  $>$  38,5 °C) o grado documentado  $>$  3 infección con ANC  $<$  1,0 x 10<sup>9</sup>/L;
- 15 • Trombocitopenia de grado 4 o trombocitopenia que requiere la transfusión de plaquetas;
- Retraso de la administración en el segundo ciclo durante  $>$  14 días debido a la toxicidad.

## Duración del estudio

20 El estudio descrito anteriormente incluye un máximo de 18 visitas programadas durante 14 semanas por paciente a partir de la selección hasta la finalización de la RSD y los primeros 2 ciclos de administración de RMD. Se requieren menos visitas de las cohortes que solo se enrolan para la parte de RMD del estudio. Las visitas se usan para la evaluación de los criterios de valoración del estudio. La evaluación de 7 niveles de dosis durante 2 ciclos de administración, el estudio dura aproximadamente 12 meses. Después de la finalización de los primeros 2 ciclos de RMD, se permiten ciclos adicionales de administración en pacientes que toleran el compuesto (I) y no tienen progresión de la enfermedad.

## 25 Criterios de valoración del estudio

Se evalúan los criterios de valoración del estudio como se describe a continuación. La seguridad se evalúa por acontecimientos adversos y evaluaciones de laboratorio (es decir, hematología, bioquímica sérica y análisis de orina).

30 La farmacocinética se evalúa del siguiente modo: se analizan niveles en plasma para el compuesto (I), utilizando un método bioanalítico de EM/CL/EM validado. Se recoge orina y se analiza proporcionando una evaluación semicuantitativa de la eliminación y el metabolismo. Los efectos biológicos se determinan del siguiente modo: se toman muestras para medir los niveles en plasma del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Además, se evalúan los niveles de fosfo-Src Tyr419 y transfosforilación de sustratos seleccionados en células mononucleares de sangre periférica y en biopsias tumorales. Los análisis de efectos biológicos en biopsias se realizan en el subconjunto de pacientes que reciben la DMT del compuesto (I) y que tienen tumores accesibles. Los parámetros de seguridad se evalúan al final del primer ciclo para permitir el aumento de dosis. Todos los parámetros anteriores recogidos en los primeros 2 ciclos se analizan como criterios de valoración del estudio al final del estudio.

## 35 Selección de pacientes

40 Lo siguiente son los requisitos de los criterios de inclusión para la entrada de pacientes en el estudio:

1. Consentimiento informado por escrito firmado
- 40 2. Adultos de más de 18 años de edad
3. Tumor sólido avanzado confirmado o linfoma que podía ser metastásico o no reseccable y para el que no existen medidas curativas o paliativas convencionales o ya no son eficaces; también son elegibles pacientes con metástasis al cerebro u oculares tratadas
4. Estado funcional de ECOG de 0-2
- 45 5. Esperanza de vida de al menos 14 semanas
6. Reserva de médula ósea adecuada como se demuestra por recuento de neutrófilos absoluto (ANC)  $\geq$  1,5 x 10<sup>9</sup>/L, número de plaquetas (PLT)  $\geq$  100 x 10<sup>9</sup>/L o hemoglobina (Hgb)  $\geq$  10 g/L

7. Función hepática adecuada como se demuestra por bilirrubina en suero, alanina aminotransferasa (ALT), aspartato transaminasa (AST) y fosfatasa alcalina (ALP)  $\leq 2,5 \times$  límite superior de la normalidad (ULN)
8. Función renal adecuada (creatinina sérica  $\leq 1,5 \times$  ULN o depuración de la creatinina calculada  $> 60 \text{ mL/min}$ )
- 5 9. Perfil de coagulación normal (PT/INR y aPTT dentro de los límites normales institucionales) para los que dan consentimiento a la biopsia tumoral, en el plazo de 1 semana antes del procedimiento.
- 10 10. Prueba de embarazo negativa para mujeres en la selección, preferentemente hecha en el plazo de 1 semana antes del día 1 de administración (no aplicable a pacientes con ooforectomía bilateral y/o hysterectomía)
11. Dispuesto a abstenerse de actividad sexual o practicar la anticoncepción de barrera física 28 días antes del día 1 de administración y 6 meses después de la última dosis para el paciente
- 10 12. Consentimiento informado por escrito firmado para biopsia tumoral para los 10 sujetos adicionales que se administrarán con la DMT y que tienen tumores accesibles.

Lo siguiente son los criterios para la exclusión de pacientes de participar en el estudio:

1. Toxicidad no resuelta de intensidad superior a grado 1 del tratamiento previo contra el cáncer o agentes en investigación
- 15 2. Recibir o haber recibido agentes en investigación o agentes antineoplásicos sistémicos en el plazo de 14 días desde el día 1 de la administración o 28 días para los agentes con semividas de eliminación desconocidas o semividas superiores a 50 horas
- 20 3. Haber recibido una amplia radioterapia que incluye esternón, pelvis, escápula, vértebras o cráneo,  $\leq 4$  semanas o radioterapia paliativa de baja dosis limitada a las extremidades  $\leq 1$  semana antes de empezar el fármaco en estudio, o que no se han recuperado de los efectos secundarios de dicha terapia
- 25 4. Estar tomando actualmente hormonas (es decir, anticonceptivos estrógenos, sustitución de hormonas, antiestrógeno), agentes antiplaquetarios o anticoagulantes, por ejemplo, Coumadin, excepto los que están tomando dosis profilácticas de anticoagulantes para catéteres venosos permanentes.
5. Uso de inhibidores o inductores fuertes de enzimas de citocromo P450 3A4 2 semanas o 5 semividas antes del día 1 de administración y durante el estudio
- 25 6. Embarazo o lactancia
7. Cirugía mayor 4 semanas antes del día 1 de la administración
8. Cirugía mayor al tubo gastrointestinal superior, o enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome de malabsorción u otra afección médica que puede interferir con la absorción oral
- 30 9. Signos o síntomas de daño orgánico específico, enfermedades crónicas mayores distintas de cáncer, o cualquier afección concomitante intensa que, en opinión del investigador, hace no deseable que el sujeto participe en el estudio o que pueda poner en riesgo el cumplimiento del protocolo
10. Antecedentes de angina de pecho, enfermedad de las arterias coronarias o accidente cerebrovascular, ataque isquémico transitorio o arritmia cardíaca que requiere terapia médica
- 35 11. Evidencia de hepatitis B o C, infección por inmunodeficiencia humana (VIH), trastornos de la coagulación o afecciones hemolíticas, por ejemplo, anemia de células falciformes

#### Procedimientos del estudio

Se realizan los siguientes procedimientos en las visitas programadas de los pacientes.

#### Consentimiento informado y antecedentes médicos completos

- 40 Se obtiene el consentimiento informado y los antecedentes médicos en la selección.

#### Muestreo farmacocinético (FC) de RSD

Se recogen muestras de sangre para el análisis farmacocinético en:

- 45 el día 1 a 0 h (antes de la administración), y a las 1, 2, 3, 4, 6, 9, 11, 24 (día 2), 48 (día 3), 96 h (día 5) y 168 h (día 8) después de la dosis (12 muestras). Se recoge la orina para el análisis farmacocinético en: el día 1 a 0 h (antes de la administración), 0-6 h, 6-12 h, 12-24 h y 24-48 h (5 muestras).

La recogida de muestras de plasma y la preparación es del siguiente modo: se extraen muestras de sangre (aproximadamente 2,0 mL) de catéteres permanentes o por venopunción directa en un tubo de recogida Vacutainer con EDTA de potasio (K3) (tamaño - 3 mL) como anticoagulante y se mantiene sobre hielo hasta la centrifugación. Se centrifugan las muestras (~2.000 rpm a 4 °C durante 10 minutos) en el plazo de 30 minutos desde la recogida. El

5 plasma se recoge inmediatamente usando pipetas de transferencia de polipropileno para dividir el plasma en dos volúmenes aproximadamente iguales (aproximadamente 400 microlitros) en los tubos de transporte de polipropileno previamente etiquetados. Se tapan las muestras de plasma resultantes y se disponen inmediatamente en un congelador mantenido a -70 °C.

10 La recogida de muestras de orina y la preparación es del siguiente modo: se recoge orina en bolsas de orina durante cada intervalo de tiempo especificado. Las bolsas de orina se almacenan a ~4 °C (refrigeración o sobre hielo) hasta la finalización del periodo de recogida. Después de la recogida, cada muestra de orina se mezcla bien por agitación. Al final de cada intervalo de tiempo de recogida, se mide el volumen y se documenta en el CRD. Para el análisis de orina, se recoge una alícuota de ~2 mL de orina por pipeta de transferencia y se prueba por tira reactiva. Para la medición FC, se transfieren alícuotas de orina de ~5 mL de cada recogida a cada uno de dos tubos de transporte de polipropileno previamente etiquetados. Se tapan las muestras de orina resultantes y se disponen inmediatamente en un congelador mantenido a -70 °C.

#### Muestreo farmacocinético de RMD

Se recogen muestras de sangre (como se ha descrito anteriormente) para el análisis farmacocinético en:

20 el primer ciclo (se toman 20 muestras de los pacientes que se administran con 2, 5 y 10 mg; se toman 25 muestras de los pacientes que se administran con >10 mg): día 1 a 0 h (antes de la primera dosis AM), y a las 1, 2, 3, 4, 6, 10 (antes de la dosis PM), 11 h (1 h después de la dosis PM); día 2 a 0 h (antes de la dosis AM), 1 h después; día 3 a 0 h (antes de la dosis AM), 1 h después; día 8 a 0 h (antes de la dosis AM), 1 h después; día 15 a 0 h (antes de la dosis AM), 1 h después; día 22 a 0 h (antes de la dosis AM, es decir, la última dosis), y a las 1, 2, 3, 4, 6, 9, 11, 24 h (día 23) y 48 h (día 24).

25 Los pacientes en las primeras 3 cohortes (es decir, 2, 5 o 10 mg) que han recibido RSD tienen un muestreo FC en el día 1 del siguiente modo: Día 1 a 0 h (antes de la dosis AM) y 11 h (1 h después de la dosis PM).

30 Segundo ciclo (5 muestras): Día 29 a 0 h (antes de la dosis AM); día 36 a 0 h (antes de la dosis AM); día 43 a 0 h (antes de la dosis AM); día 50; y día 57. Los pacientes que pueden tolerar la administración adicional y no tienen progresión de la enfermedad, y que eligen continuar con el ciclo de dosis después de los primeros dos ciclos, se muestrean para FC antes de empezar la dosis y al final de la administración (2 horas después de la última dosis) para cada uno de los ciclos posteriores.

#### Constantes vitales (RSD y RMD)

35 Se miden la frecuencia del pulso, la tensión arterial sistólica y diastólica, la respiración y la temperatura corporal en: la selección; RSD y RMD: día 1 a 0 h (antes de la administración), 2 y 8 h después de la dosis; en cada visita en la clínica.

40 La frecuencia del pulso se obtiene con el paciente en estado de reposo (sentado durante al menos 5 minutos), el pulso se midió durante 30 segundos, se multiplicó por 2 y se registró en latidos por minuto. Se mide la tensión arterial sistólica/diastólica usando un esfingomanómetro con el paciente en estado de reposo (sentado erguido durante al menos 5 minutos) usando el mismo brazo cada vez. Se registra la tensión arterial en mmHg. La respiración se obtiene con el paciente en estado de reposo (sentado durante al menos 5 minutos), se cuenta el número de respiraciones durante 30 segundos, se multiplica por 2 y se registra en respiraciones por minuto. La temperatura se obtiene con el paciente en estado de reposo (sentado erguido durante al menos 5 minutos) usando un termómetro oral o auditivo.

#### Peso corporal y altura

Se obtienen el peso del paciente en kilogramos y la altura en pulgadas en: la selección; RMD: días 1, 22, 29, 50 y 57.

45 Evaluaciones de laboratorio para seguridad

50 Se recogen sangre para hematología, bioquímica sérica y análisis de orina en: la selección; RSD: días 2, 3 y 8; RMD: días 2, 3, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50 y 57. Los pacientes con ciclos adicionales después de los primeros dos ciclos tienen evaluaciones de laboratorio para seguridad justo antes de la dosis inicial y al final de la administración para cada uno de los ciclos posteriores. Se analiza la sangre para PT/INR y aPTT en los pacientes de los que se están tomando biopsias tumorales, en el plazo de una semana antes del procedimiento.

Exploración física

Se realizará una exploración física completa en: la selección. Se hace una exploración física parcial para actualizar cualquier cambio en: RSD: días 1 y 8; RMD: días 1, 22, 29, 50 y 57.

ECG

- 5 Se realiza ECG de 12 derivaciones y derivación larga II en: la selección; RSD: día 1 a 1 y 4 h después de la dosis y día 8; RMD: día 1 a 1 y 4 h después de la dosis, y días 8, 22, 50 y 57. Los pacientes en las primeras 3 cohortes (es decir, 2, 5 o 10 mg) que han recibido RSD solo se harán el ECG en los días 8, 22, 50 y 57 de la parte de RMD.

Prueba de embarazo

- 10 Se recoge sangre de las pacientes para prueba de embarazo en suero en la selección, preferentemente en el plazo de 1 semana antes del día 1 de la administración (no aplicable a pacientes con ooforectomía bilateral y/o histerectomía).

Acontecimientos adversos

- 15 Se monitorizan los acontecimientos adversos durante todo el estudio. En cada visita, el investigador empieza indagando los acontecimientos adversos preguntando a cada paciente una cuestión general no dirigida tal como '¿Cómo se ha sentido desde la última visita?' Se hace interrogatorio y examen dirigidos según corresponda.

Medicaciones concomitantes

En cada visita, se registra el uso de cualquier medicación simultánea, de venta con receta o sin receta, junto con el motivo por el que se tomó la medicación.

Evaluación de efectos biológicos

- 20 Se recoge sangre para la medición de VEGF en plasma; se evalúa la fosforilación de Src y de sustrato seleccionado en CMSP en RMD en los días 1, 22 y 50.

- Para pacientes que cumplen los criterios para biopsia, se realiza una biopsia pre-dosis en el plazo de 4 semanas antes del día 1 de la administración y la biopsia después de la dosis se realiza entre los días -20-22. Simultáneamente con el momento adecuado de la biopsia, se recoge sangre para la medición de efectos biológicos. Además, se recoge sangre en el día 50 para el análisis de efectos biológicos.

Terapia concomitante

- 30 No se permite que los pacientes usen medicaciones simultáneas crónicas que sean inhibidores o inductores fuertes de citocromo P450 3A4 o coagulación. Por ejemplo, está prohibido el uso sistémico de los siguientes moduladores de CYP3A4 en los 14 días o 5 semividas (sea cual sea el tiempo más largo) antes del día 1 de la administración y durante todo el estudio:

Inductores de CYP3A4: barbitúricos, carbamacepina, efavirenz, glucocorticoides, modafinilo, nevirapina, fenobarbital, fenitoína, rifampina, hierba de San Juan, troglitazona, oxcarbacepina, pioglitazona, rifabutina

- 35 Inhibidores de CYP3A4: amiodarona, aprepitant, cloranfenicol, cimetidina, claritromicina, ditiocarbamato de dietilo, diltiazem, eritromicina, fluconazol, fluvoxamina, gestodeno, zumo de pomelo, imatinib, itraconazol, ketoconazol, mifepristona, nefazodona, norfloxacino, norfluoxetina, mibefradilo, carambola, verapamilo, voriconazol.

Se permiten los anticoagulantes usados moderadamente para mantener la permeabilidad de los puertos intravenosos o catéteres. Se prohíbe el uso simultáneo de hormonas (es decir, anticonceptivos de estrógeno, sustitución de hormonas, antiestrógenos) (véase a continuación, Periodos de lavado).

Periodos de lavado

- 40 Existe un periodo de lavado u observación de al menos 7 días después de la administración de una dosis única en RSD. El periodo de lavado después del primer ciclo de la parte de RMD es 6 días. Todos los otros ciclos tienen periodos de lavado de 7 días entre 2 ciclos consecutivos.

Cumplimiento del tratamiento

- 45 Se retiran del estudio los pacientes que se encuentra que han sido involuntariamente enrolados con desviación significativa de los criterios especificados en el protocolo. Los pacientes se evalúan para la adherencia al programa de dosis. Se les enseña a completar un calendario del estudio en casa para seguir su administración. En las visitas semanales programadas, los pacientes traen su calendario junto con todos los frascos de dosis usados y sin usar al (a los) sitio(s) clínico(s). Estos son comprobados por el personal del sitio antes de que los pacientes sean dispensados con un nuevo suministro de los fármacos del estudio. Los investigadores preguntan a los pacientes en cada visita de

seguimiento si habían usado alguna medicación simultánea desde la visita previa, determinan si dicho uso es una violación del protocolo y registran los datos y la conclusión.

#### Medicación del estudio

5 El compuesto (I) se proporciona en este estudio como la sal de mesilato de la N-bencil-2- {5-[4-(2-morfolin-4-il-etoxy)-fenil]-piridin-2-il}-acetamida de base libre. Se calcula la dosis clínica como el peso de la base libre en la disolución. La sal de mesilato del compuesto (I) es un polvo cristalino blanco con una fórmula empírica de  $C_{26}H_{29}N_3O_3 \cdot HO_3SCH_3$  y un peso molecular de 527,63 dáltones. El peso molecular de la base libre es 431,53 dáltones.

10 El polvo de mesilato del compuesto (I) se suministra en una base cohorte por cohorte en frascos de dosis unitarias que contienen diferentes cantidades del fármaco del estudio correspondiente a la dosis: 2, 5, 10, 20, 40, 80, 120, 160 mg o más alta (equivalentes de base libre). Los niveles de dosis que se modifican para seguridad también se van a preparar como frascos de dosis unitarias y se suministran al (a los) sitio(s) clínico(s). Tras la disolución, la disolución de mesilato del compuesto (I) resultante es clara y se dispensa a pacientes en frascos de dosis unitarias a concentraciones que varían desde 0,2 hasta 4,0 mg/mL (equivalentes de base libre).

#### Dosificación y pauta posológica

15 15 El mesilato del compuesto (I) se administra por vía oral según la cohorte de dosis del paciente, es decir, RSD: 2, 5 o 10 mg; RMD: 2, 5, 10, 20, 40, 80, 120, 160 mg (equivalentes de base libre), o más alta, en incrementos de 40 mg. Para la parte de RMD, el compuesto (I) se administra dos veces al día (separadas aproximadamente 10 horas, administrado después de al menos 2 horas de ayuno, y seguido por 2 horas de ayuno) durante 21 días seguido por 7 días de lavado por ciclo. La única excepción es el primer ciclo donde una dosis adicional se administra en el día 22 para facilitar el muestreo FC prolongado. Hay 6 días de lavado para este ciclo. Los pacientes que pueden tolerar el fármaco del estudio y no tienen progresión de la enfermedad pueden elegir recibir ciclos adicionales de dosis después de los primeros dos ciclos de RMD.

20 20 Se añade un volumen fijo de agua estéril a un frasco de dosis unitaria del mesilato del compuesto (I) y se agita bien (se invierte aproximadamente 10 veces) hasta que se obtenga un líquido claro.

Nivel de dosis (mg, base libre)	Cantidad de polvo del compuesto (I) en el frasco (mg, base libre)	Volumen de agua añadido a cada frasco (mL)	Concentración resultante (mg/mL)	Volumen de una dosis única (mL)
2	2	10	0,2	10
5	5	20	0,25	20
10	10	20	0,50	20
20	20	20	1,0	20
40	40	20	2,0	20
80	80	20	4,0	20
120	120	40	3,0	40
160	160	40	4,0	40

25 Se toma el compuesto (I) después de al menos 2 horas de ayuno. Se permite beber agua en todo momento. Bajo supervisión del sitio, con la administración de la primera dosis, el paciente o la paciente se administra el frasco entero de dosis unitaria. Se proporciona una alícuota de 20 mL de agua estéril para aclarar el frasco y el contenido se toma por vía oral para dar con la dosis inicial. Se repite este proceso. No se toma comida hasta 2 horas después.

30 30 Para RMD, se prepara un suministro de 7 días de las disoluciones del compuesto (I) y se dispensa en la farmacia del sitio a los pacientes. Los pacientes vuelven cada semana en los días 8, 15, 22, 36, 43 y 50 para devolver los frascos usados. En los días 8, 15, 36 y 43, los pacientes obtienen un nuevo suministro de 7 días.

#### Modificación de la dosis

##### Ralentizamiento del aumento de dosis

35 35 Cuando ocurre la toxicidad de grado 2, se puede ralentizar el aumento de la dosis. El nivel de dosis de la siguiente cohorte tendrá incrementos más pequeños, del siguiente modo:

Nivel de dosis cuando ocurre la toxicidad de grado 2 (mg)	Siguiente dosis aumentada (mg)	Cantidad del compuesto (l) en el frasco (mg)	Volumen de agua añadido a cada frasco (mL)	Concentración resultante (mg/mL)	Volumen de una dosis única (mL)
2	3,5	3,5	10	0,35	10
5	7,5	7,5	20	0,375	20
10	15	15	20	0,75	20
20	30	30	20	1,5	20
40	60	60	20	3,0	20
60	70	70	20	3,5	20
80	100	100	40	2,5	40
100	110	110	40	2,75	40
120	140	140	40	3,5	40
140	150	150	40	3,75	40
160	180	180	40	4,5	40

Si no ocurre más toxicidad de grado 2 o toxicidad más alta al nivel de dosis aumentada, se puede reanudar el programa de aumento de dosis inicial.

#### Modificación de dosis en TLD

- 5 Cuando ocurre TLD en  $\geq 2$  de 3 o 6 pacientes en una cohorte, se detiene el aumento de dosis. La dosis adicional a una dosis reducida en las siguientes cohortes es del siguiente modo:

Nivel de dosis cuando ocurre TLD (mg)	Dosis reducida (mg)	Cantidad de compuesto (l) en el frasco (mg)	Volumen de agua añadido a cada frasco (mL)	Concentración resultante (mg/mL)	Volumen de una dosis única (mL)
5	2,5	2,5	10	0,25	10
10	7,5	7,5	20	0,375	20
20	15	15	20	0,75	20
40	30	30	20	1,5	20
80	60	60	20	3,0	20
120	100	100	40	2,5	40
160	140	140	40	3,5	40

#### Análisis farmacocinético

- 10 Se realiza el análisis farmacocinético no compartimental en los datos de concentración del compuesto (l) en plasma-tiempo individuales usando WinNonlin Professional (Pharsight Corp., Mountain View, CA Versión 4.1) u otro software adecuado. Cuando no se pueden analizar los datos de pacientes individuales, se usan los datos medios de la concentración del compuesto (l)-tiempo para calcular los parámetros farmacocinéticos. Los siguientes parámetros farmacocinéticos se calculan a partir de las concentraciones plasmáticas: Cmáx (concentración máxima en suero), tmáx (tiempo para alcanzar la máxima concentración), ABC<sub>T</sub> (área bajo la curva de concentración-tiempo desde tiempo cero hasta la última concentración medible (CT) a tiempo T, ABC<sub>0-∞</sub> (área bajo la curva de concentración-tiempo desde tiempo cero hasta el infinito), t<sub>1/2</sub> (semivida de fase terminal), Ae (cantidad de fármaco excretada en la orina). A criterio del farmacocinético del estudio se determinan parámetros adicionales considerados apropiados para la descripción e interpretación de los datos farmacocinéticos.
- 15

#### Evaluación de efectos biológicos

Se miden por ELISA niveles en plasma del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Se determinan los niveles de fosfo-Src Tyr419 y la transfosforilación de sustratos seleccionados en células mononucleares de sangre periférica. El objetivo de realizar las biopsias tumorales antes y después del tratamiento en DMT es determinar los efectos biológicos del compuesto (I) en la inhibición de la fosforilación de la cinasa Src que pueden estar implicados en la proliferación tumoral. Se realizan biopsias emparejadas en los 10 pacientes en la cohorte de expansión en DMT. Se dividen los tejidos por la mitad evaluándose una porción por patología rutinaria y la otra mitad se evaluó para niveles de fosfo-Src Tyr419 y la transfosforilación de sustratos seleccionados.

#### Evaluación de la progresión de la enfermedad

Para enfermedad medible, se evalúa la respuesta tumoral según los criterios de RECIST (Therasse, P., et. al., New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors. *J Natl Can Inst.* 2000, 92(3), p. 205-216). Se obtienen mediciones en el nivel basal y después de cada dos ciclos (2 ciclos). Todos los pacientes respondedores (respondedores completos y respondedores parciales) deben haber confirmado su respuesta 4 semanas después de la primera documentación de la respuesta usando el mismo método de medición como medición basal. En pacientes con enfermedad no medible, la respuesta se evalúa como se indicó clínicamente (marcadores tumorales, mediciones radiográficas, ultrasonidos, etc.) Cuando las metástasis al hueso son el único sitio de enfermedad, se usan los criterios de la OMS para la evaluación de la respuesta de la enfermedad en hueso para evaluar la respuesta. La progresión de otra enfermedad no medible se define como un aumento del 25 % en los marcadores tumorales en 2 determinaciones mensuales sucesivas o progresión radiográfica significativa de la enfermedad. Se hace la reevaluación de la respuesta tumoral por los mismos métodos usados para establecer las mediciones tumorales basales. La evaluación de la respuesta tumoral es del siguiente modo:

#### Lesiones indicadoras

- Respuesta completa (CR): desaparición de todas las lesiones indicadoras
- Respuesta parcial (PR): disminución de al menos el 30 % en la suma del diámetro más largo (LD) de las lesiones indicadoras, tomando como referencia la suma de LD basal
- Enfermedad progresiva: aumento de al menos 20 % en la suma de LD de lesiones indicadoras, tomando como referencia la suma de LD más pequeña registrada desde el inicio del tratamiento, o la aparición de una o más lesiones nuevas
- Enfermedad estable: ni disminución suficiente para cumplir los requisitos para respuesta parcial ni aumento suficiente para cumplir los requisitos para enfermedad progresiva, tomando como referencia la suma de LD más pequeña desde el inicio del tratamiento

#### Lesiones no indicadoras

- Respuesta completa: desaparición de todas las lesiones no indicadoras
- Respuesta incompleta/enfermedad estable: persistencia de una o más lesiones no indicadoras
- Enfermedad progresiva: aparición de una o más lesiones nuevas o progresión inequívoca de lesiones no indicadoras existentes, o ambas

Una clara progresión de solo lesiones no indicadoras es excepcional. Sin embargo, si el investigador cree que ha ocurrido la progresión de solo lesiones no indicadoras, esta progresión se verifica mediante un TAC de confirmación 4 semanas después. Las respuestas tumorales  $\geq$  PR se confirman 4 semanas después usando el mismo método de medición que la evaluación basal.

La respuesta clínica global para todas las posibles combinaciones de respuestas tumorales en lesiones indicadoras y no indicadoras se determina según la siguiente tabla:

#### Respuesta clínica global

Respuesta en lesiones indicadoras	Respuesta en lesiones no indicadoras	Lesiones nuevas	Respuesta clínica global
CR	CR		
CR	IR/SD		
PR	Cualquiera excepto PD		

Respuesta en lesiones indicadoras	Respuesta en lesiones no indicadoras	Lesiones nuevas	Respuesta clínica global
SD	Cualquiera excepto PD		
PD	Cualquiera		
Cualquiera	PD		
Cualquiera	Cualquiera		
CR = respuesta completa; IR = respuesta incompleta PD = enfermedad progresiva; PR = respuesta parcial; SD = enfermedad estable.			

#### Ejemplo 7 como referencia: Inhibición del crecimiento celular

Se mide como  $IC_{50}$  la concentración de fármaco requerida para bloquear el 50 % el crecimiento celular neto con respecto a una muestra de control. Las  $IC_{50}$  para el compuesto (I) se ensayaron como se describe en el presente documento.

5

La línea celular HT29 es una línea celular de carcinoma de colon humano convencional del NCI. Se obtuvieron células HT-29 de ATCC en el pase 125 y se usaron para estudios de inhibición entre el pase 126 - 151. Las células HT29 se cultivaron rutinariamente en medio McCoy's 5A complementado con suero bovino fetal (1,5 % v/v) y L-glutamina (2 mM).

10 3T3 de c-Src es una línea celular normal 3T3 del NIH de fibroblasto de ratón que se ha transfectado con un mutante puntual de c-Src humano en donde la tirosina 527 se ha convertido en una fenilalanina. Esta mutación da como resultado c-Src "constitutivamente activo" debido a que la fosforilación en la tirosina 527 da como resultado la auto-inhibición de Src al hacer que se pliegue sobre su propio dominio SH2. Con una Phe allí, esta fosforilación no puede ocurrir y, por tanto, no puede ocurrir la auto-inhibición. Así, el Src mutante siempre completamente activo convierte entonces los fibroblastos de ratón normal en células tumorales de rápido crecimiento. Puesto que Src hiperactivo es el principal factor que conduce el crecimiento en estas células (particularmente cuando se cultivan en condiciones de suero de bajo crecimiento), se cree que los compuestos activos en bloquear este crecimiento funcionan bloqueando la señalización de Src (por ejemplo, como un inhibidor de cinasas Src directo o como un inhibidor que actúa en cualquier otra parte en la cascada de señalización de Src). Las células se cultivaron rutinariamente en DMEM complementado con suero bovino fetal (2,0 % v/V), L-glutamina (2 mM) y piruvato de sodio (1 mM).

15

20 En el ensayo de BrdU para la inhibición del crecimiento celular, la cuantificación de la proliferación celular se basó en la medición de la incorporación de BrdU durante la síntesis de ADN. El kit del ensayo de BrdU de ELISA de proliferación celular (colorimétrico) se obtuvo de Roche Applied Science y se realizó según las instrucciones del vendedor.

25 La inhibición del crecimiento se expresó como  $IC_{50}$  donde  $IC_{50}$  es la dosis de muestra que inhibe el 50 % del crecimiento celular. La inhibición del crecimiento (IC) se determina a partir de la fórmula  $IC = (T_0 - T_n) \times 100 / T_0 - CON_n$  donde  $T_0$  es el crecimiento con BrdU de células sin tratar en tiempo "0",  $T_n$  es el crecimiento con BrdU de células tratadas en el día "n" y  $CON_n$  es el crecimiento con BrdU de control de células de control en el día "n". Se extrapolió  $IC_{50}$  y los datos se representaron usando el software XL-Fit 4.0.

30 Se triplicaron cultivos que crecían activamente y las células se resuspendieron en 190  $\mu$ L de medio de cultivo apropiado complementado con 1,05 % de FBS en cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos (1000 células HT-29; 2500 células c-Src 3T3). Para los experimentos en la placa de cultivo de 96 pocillos, se complementó medio c-Src 3T3 con tampón HEPES 10 mM. Se sembraron células HT-29 en placas de 96 pocillos convencionales de cultivo de tejido y se sembraron células c-Src 3T3 en placas de 96 pocillos recubiertas con poli-D-lisina (BIOCOAT<sup>TM</sup>). Para aumentar la difusión de CO<sub>2</sub>, se incubaron placas de 96 pocillos de c-Src 3T3 con sus tapas subidas ~2 mm usando tapones de goma estériles.

35

Se dejó que las placas de 96 pocillos sembradas se fijaran durante la noche durante 18-24 horas, o a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> para HT-29 o a 37 °C y 10 % CO<sub>2</sub> para c-Src 3T3. Aproximadamente 18-24 horas después de la siembra, se determinó el crecimiento inicial ( $T_0$ ) de las células para células sin tratar usando el ensayo de BrdU. Las muestras se reconstituyeron en DMSO a 20 mM y se hicieron diluciones intermedias usando DMEM que contenía 10 % de FBS.

40 Las concentraciones de ensayo final fueron 1,5 % para FBS y 0,05 % para DMSO. Se añadieron muestras como alícuotas de 10  $\mu$ L por triplicado y las placas se incubaron como antes durante ~72 horas. Se incluyeron controles negativos (vehículo) y positivos (por ejemplo, AZ28 (KX2-328)). Las placas se ensayaron para BrdU y los datos se analizaron como antes para  $IC_{50}$ .

45 Los resultados se muestran en la tabla que sigue. En esta tabla, los datos se enumeran como % de crecimiento de control, de forma que un número más bajo a una concentración indicada indica una mayor potencia del compuesto en

5 bloquear el crecimiento de esa línea de células tumorales. Todos los compuestos se prepararon inicialmente como disoluciones madre 20 mM de DMSO y luego se diluyeron en tampón para los ensayos de crecimiento tumoral *in vitro*. NG significa sin crecimiento celular más allá del control y T significa que el número de células en los pocillos tratados con fármaco era inferior a en el control (es decir, pérdida neta de células). NT indica que la prueba no se realizó. El compuesto AZ28 (KX2-328) es un inhibidor de las tirosina cinasas competitivas de ATP, como se describe en Plé et al., *J. Med. Chem.* 47:871-887 (2004).

10 Como se muestra en la tabla que sigue, se obtuvieron IC<sub>50</sub> para el compuesto (I) en otras líneas celulares. Estas IC<sub>50</sub> se determinaron usando la inhibición convencional de los ensayos de crecimiento tumoral, similares a los descritos en detalle para la línea celular HT29 anterior, y las siguientes líneas celulares: líneas celulares de tumor de colon KM12, línea celular de cáncer de pulmón H460 y línea celular de cáncer de pulmón A549 (todas son líneas de células tumorales convencionales de NCI).

		Crecimiento de HT-29, % de control			IC <sub>50</sub>	Crecimiento de c-Src 3T3, % de control		
		Media, n=3				Media, n=3		
compuesto	5 uM	500 nM	50 nM	10 uM	1,0 uM	100 nM		
KX2-328	T	10,0	73,0	99 nM (c-Src 3T3), 794 nM (HT29)	T	T	13,0	
(compuesto I)				13 nM (c-Src 3T3); 23 nM (HT-29)				

NG = Sin crecimiento, inhibición total del crecimiento; T = efecto citotóxico sobre las células, crecimiento negativo; NT = no probado

La siguiente tabla muestra la inhibición por el compuesto (I) del crecimiento de células tumorales conducido por Src en comparación con los inhibidores de Src competitivos de ATP actualmente en ensayos clínicos.

Compuesto	IC <sub>50</sub> de c-Src527F/NIH3T3 (nM)	IC <sub>50</sub> de HT29 (colon) (nM)
Compuesto (I)	23	25
KX2-328	87	647
dasatinib	3	20
SKI-606	208	173
AZD0530	203	330

15

La siguiente tabla muestra la inhibición por el compuesto (I) en líneas celulares de tumor cerebral. Estas IC<sub>50</sub> se determinaron usando ensayos convencionales de inhibición del crecimiento tumoral, similares a los descritos en detalle en este Ejemplo 7.

IC<sub>50</sub> del compuesto (I) y dasatinib en líneas celulares de tumor cerebral:

Línea celular	IC <sub>50</sub> del compuesto (I)	IC <sub>50</sub> de dasatinib	Organismo	Enfermedad	Morfología	Tumorigénica
<b>Daoy</b>	13,6 nM	2927 nM	Humano	Meduloblastoma cerebeloso desmoplásico	Poligonal	Sí
<b>SK-N-MC</b>	5,8 nM	5114 nM	Humano	Neuroepiteloma	Epitelial	Sí
<b>SW1088</b>	76,1 nM	897,3 nM	Humano	Astrocitoma	Fibroblasto	Sí
<b>LN-18</b>	14,5 nM	565,3 nM	Humano	Glioblastoma; glioma	Epitelial	Sí
<b>SK-N-FI</b>	1,7 nM	12,6 nM	Humano	Neuroblastoma	Epitelial	Sí
<b>U87</b>	33,1 nM	1586 nM	Humano	Glioblastoma; astrocitoma	Epitelial	Sí

Línea celular	IC <sub>50</sub> del compuesto (I)	IC <sub>50</sub> de dasatinib	Organismo	Enfermedad	Morfología	Tumorigénica
GL261	13,7 nM	17,7 nM	Ratón	Glioblastoma	Epitelial	Sí

La siguiente tabla muestra la inhibición del compuesto (I) en líneas celulares de tumor renal. Estas IC<sub>50</sub> se determinaron usando ensayos convencionales de inhibición del crecimiento tumoral, similares a los descritos en detalle en la sección de ejemplo.

5 IC<sub>50</sub> del compuesto (I) y dasatinib en líneas celulares de tumor renal:

Línea celular	IC <sub>50</sub> del compuesto (I)	IC <sub>50</sub> de dasatinib	Organismo	Enfermedad	Morfología	Tumorigénica
769-P	45,0 nM	46,3 nM	Humano	Adenocarcinoma de células renales	Epitelial	Sí
786-O	378,4 nM	2014 nM	Humano	Adenocarcinoma de células renales	Epitelial	Sí
Caki-2	39,2 nM	14,2 nM	Humano	Carcinoma de células claras	Epitelial	Sí
ACHN	33,2 nM	21,1 nM	Humano	Adenocarcinoma de células renales	Epitelial	Sí

La siguiente tabla muestra un resumen de los resultados de la inhibición por el compuesto (I) en cinco líneas celulares de carcinoma hepatocelular. La siguiente tabla muestra las IC<sub>50</sub> y IC<sub>80</sub> de la sal de mesilato del compuesto (I) y dasatinib en líneas celulares de carcinoma hepatocelular (8,0 x 10<sup>3</sup> células/pocillo, 1,5 % de FBS) a 78 h; resultados de datos de respuesta normalizados:

10 IC<sub>50</sub> del compuesto (I) y dasatinib en líneas celulares de carcinoma hepatocelular:

Línea celular	MSA del compuesto (I)		Dasatinib	
	IC <sub>50</sub> (nM)	IC <sub>80</sub> (nM)	IC <sub>50</sub> (nM)	IC <sub>80</sub> (nM)
HuH7	9	23	1972	7135
WRL-68	15	25	5650	45.580
PLC/PRF/5	13	24	15	>50.000
Hep 3B	26	88	86	>50.000
Hep G2	60	3658	NA	NA

15 Se formularon muestras de los compuestos de prueba en 100 % de DMSO para obtener disoluciones madre 20 mM; se almacenaron a 4 °C. Se determinaron las IC<sub>50</sub> y IC<sub>80</sub> como se describe a continuación. Se cultivaron rutinariamente líneas de cáncer humano HuH7, WRL-68, PLC/PRF/5, Hep 3B y Hep G2 y se mantuvieron en un medio basal que contenía 2 % de FBS a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>. Las células se sembraron a 4,0 x 10<sup>3</sup>/190 µL y 8,0 x 10<sup>3</sup>/190 µL por pocillo de una placa de 96 pocillos. El medio de ensayo fue medio basal / 1,5 % de FBS. Las células se cultivaron durante la noche en placas de 96 pocillos a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> antes de la adición de la sal de mesilato del compuesto (I) (compuesto (I).MSA) y dasatinib. Se prepararon diluciones de los artículos de prueba del siguiente modo: se diluyeron

20 sucesivamente muestras de disolución madre 20 mM en medio basal/1,5 % de FBS usando diluciones 1:3, dando concentraciones 20x; intervalo 131 µM a 0,24 nM. Se añadieron 10 µL de diluciones 20x a los pocillos apropiados (n = 3) que contenían 190 µL de línea celular de cáncer; intervalo de concentraciones finales 6561 nM a 0,012 nM. Las células contuvieron control de vehículo, no muestra. Las células contuvieron control de medio, no muestra, 0,03 % de DMSO (concentración de DMSO más alta presente en las muestras). Las células tratadas se incubaron durante 72 horas a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>. En el día 3, se añadieron 10 µL de MTT (5 mg/mL) a cada pocillo. Las células se incubaron en presencia de MTT durante 4 horas a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>. Se añadió 90 µL de 10 % de SDS (+HCl) a cada pocillo para lisar las células y solubilizar el formazano. Entonces se incubaron las células durante la noche a 37 °C, 5 % de

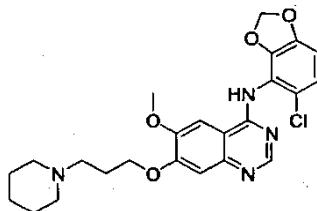
CO<sub>2</sub>. Se tomaron la medición de DO<sub>570</sub> usando el lector de microplacas multiplataforma BioTek Synergy HT. Se determinó la inhibición de las curvas de crecimiento Cl<sub>50</sub> y Cl<sub>80</sub> usando el software estadístico GraphPad Prism 5.

**Ejemplo 8 como referencia: Inhibición de cinasas aisladas**

5 Se cree que la conformación de Src fuera de las células frente a dentro de las células es notablemente diferente, debido a que dentro de las células Src se incorpora en complejos de señalización multiproteína. Así, debido a que el sitio de unión al sustrato peptídico no se forma bien en Src aislado (como se muestra por estructuras de rayos X de Src), se cree que sería débil la actividad contra Src aislado para un inhibidor de unión a sustrato peptídico. La unión a este sitio requerirá que el inhibidor capturará el muy pequeño porcentaje de proteína Src total en el ensayo de enzima aislada que está en la misma conformación que existe dentro de las células. Esto requiere un gran exceso del inhibidor 10 para drenar cantidades significativas de la enzima del ciclo catalítico en el ensayo.

Sin embargo, dentro de las células, no es necesario este gran exceso de inhibidor debido a que las proteínas de unión al dominio SH2 y SH3 ya han desplazado la conformación de Src de manera que el sitio de unión al sustrato peptídico se forme completamente. Ahora, bajas concentraciones de inhibidor pueden retirar la enzima del ciclo catalítico puesto que toda la enzima está en la conformación de unión compacta.

15 KX2-328 es el inhibidor de Src competitivo de ATP publicado por AstraZeneca (AZ28) y se usa como control positivo en muchos de los experimentos descritos en el presente documento. KX2-328 es el compuesto que tiene la estructura:



20 Obsérvese que el compuesto (I) tiene una débil actividad contra cinasas aisladas debido a que el sitio de unión al péptido no se forma bien fuera de las células, pero tienen actividad muy potente dentro de las células completas. Sin desear quedar ligado a teoría, se cree que la diferencia en la actividad se atribuye al hecho de que el sitio de unión al péptido está ahora completamente formado en células debido a los efectos alóstéricos de los componentes de la proteína de unión en los complejos de señalización multi-proteína, con respecto a los ensayos de cinasa aisladas.

La siguiente tabla ilustra el porcentaje actividad de cinasas aisladas en presencia del inhibidor competitivo de ATP de AstraZeneca (KX2-328, AZ28) o compuesto (I) relativo para controlar cinasas aisladas (no tratadas).

Objetivo	AZ28 a 10 µM	Compuesto (I) a 10 µM
Abl(h)	1	120
CHK1(h)	NT	105
EGFR(h)	3	134
FGFR2(h)	94	94
Fyn(h)	2	85
IGF-1R(h)	110	101
IR(h)	125	112
Lck(h)	1	109
Lyn(h)	0	113
MAPK2(h)	105	112
PDGFRβ(h)	98	110
PKCα(h)	111	111
Pyk2(h)	43	97
Yes(h)	1	92

Objetivo	AZ28 a 10 $\mu$ M	Compuesto (I) a 10 $\mu$ M
ZAP-70(h)	97	108
Cinasa PI3	99	100

El inhibidor competitivo de ATP de AstraZeneca muestra la inhibición típica de cinasas inespecíficas para inhibidores competitivos de ATP, mala selectividad como se demuestra por la fuerte inhibición de Abl, EGFR, Fyn, Lck, Lyn y Yes. A diferencia, la mala inhibición de estas cinasas inespecíficas se observa con el compuesto (I).

5 Sin embargo, el compuesto (I) es un inhibidor más potente del crecimiento celular conducido por Src, ensayado como se describe en el ejemplo anterior. En la línea celular manipulada c-Src/NIH-3T3, IC<sub>50</sub> para AZ28 es 99 nM, frente a 13 nm para el compuesto (I), y en la línea de células de cáncer de colon HT29 humana de NCI, la IC<sub>50</sub> para AZ28 es 794 nM, frente a 23 nm para el compuesto (I).

10 En ejemplos separados, los datos de valoración indican que AZ28 es un potente inhibidor de Src aislado (Cl<sub>50</sub>=8 nM). Los datos de valoración de FAK muestran que AZ28 es al menos aproximadamente 100 X menos potente contra FAK aislado (Cl<sub>50</sub>>500 nM). Mientras que los datos de valoración indican que el compuesto (I) es un inhibidor menos potente de Src aislado (Cl<sub>50</sub> = 46  $\mu$ M). Los datos de valoración con FAK muestran que el compuesto (I) es similarmente potente contra FAK aislado (Cl<sub>50</sub>>48  $\mu$ M).

15 Obsérvese que AZ28 es 10-100 X menos potente contra el crecimiento celular que contra Src aislado. Esto es típico de inhibidores competitivos de ATP puesto que la concentración de competición por ATP es mucho más alta en células completas que en los ensayos de enzima aislada. El compuesto I presentó una Cl<sub>50</sub> = 46 mM contra cSrc.

#### Ejemplo 9 como referencia: Efecto sobre los niveles de fosforilación intracelular

20 Se trataron líneas celulares HT29 (cáncer de colon) y c-Src527F/NIH-3T3 (transformada con Src) con el compuesto (I) o con el inhibidor de Src competitivo de ATP de AstraZeneca AZ28. AZ28 sirve de comparador positivo para mostrar qué debe hacer un inhibidor de Src validado en estos ensayos. Después del tratamiento con compuesto, se lisaron las células, se sometieron a PAGE y se sondaron con una batería de anticuerpos. Los anticuerpos se seleccionaron para determinar si los compuestos causaron cambios en la fosforilación de sustratos de Src conocidos. Además, también se investigó la fosforilación de proteínas inespecíficas. Además, se evaluó la inducción de la apoptosis por escisión por caspasa 3. Se probaron dosis múltiples de cada compuesto debido a que las tendencias en respuesta a aumentar la concentración de fármaco son el indicador más fiable de la actividad.

25 Se generó una curva de respuesta a dosis para el compuesto (I) usando la IC<sub>50</sub> para este compuesto en cada una de las dos líneas celulares como la concentración 1X. También se probaron tres dosis adicionales 0,2X, 5X y 25X múltiplos de las IC<sub>50</sub>, además de un control sin fármaco "C". Se obtuvo el mismo intervalo de múltiplos de la Figura 1, la respuesta a dosis esperada para la autofosforilación de Src-Y416, en ambas líneas celulares, y para ambos compuestos. Estos datos indican que el compuesto (I) es un inhibidor de Src dentro de las células.

30 La Figura 2 muestra la fosforilación de FAK Tyr 925, un sustrato de transfosforilación de Src conocido dentro de las células. El compuesto (I) y AZ28 inhibieron la transfosforilación de Src. Estos datos indican que el compuesto (I) es un inhibidor de Src dentro de las células.

35 La Figura 3 muestra la fosforilación de Shc Y239/240, un sustrato de transfosforilación de Src conocido dentro de las células. El compuesto (I) y AZ28 inhibieron la transfosforilación de Src. Estos datos indican que el compuesto (I) es un inhibidor de Src dentro de las células.

40 La Figura 4 muestra la fosforilación de paxilina Y-31, un sustrato de transfosforilación de Src conocido dentro de las células. El compuesto (I) y AZ28 inhibieron la transfosforilación de Src. Estos datos indican que el compuesto (I) es un inhibidor de Src dentro de las células. Nota: la paxilina Y-31 no se detectó en células HT29 con o sin fármaco añadido.

45 La escisión de caspasa-3 es una buena medida de la inducción de la apoptosis. Se conoce que AZ28 no es eficaz en inducir la apoptosis en líneas celulares HT29 (cáncer de colon) y c-Src527F/NIH-3T3 (transformada con Src). A diferencia, como se muestra en la Figura 5, el compuesto (I) es muy eficaz en inducir la apoptosis.

50 Puesto que la actividad de Src es muy alta en tanto las líneas celulares HT29 (cáncer de colon) como c-Src527F/NIH-3T3 (transformada con Src), cabría esperar que se observara una reducción en los niveles de fosfotirosina total cuando se inhibiera la actividad de Src. La Figura 6 indica que esto es cierto para tanto AZ28 como el compuesto (I). Estos datos indican que el compuesto (I) es un inhibidor de Src dentro de las células.

52 La tirosina cinasa receptora de PDGF se autofosforila en Y572/574. Se cree que este no es un sustrato de Src directo en las células. Se conoce que AZ28 no es un potente inhibidor de la tirosina cinasa receptora de PDGF aislada (véase la tabla en el Ejemplo 8). Sin embargo, se observa una reducción de la respuesta a dosis en la autofosforilación del receptor de PDGF con AZ28, como se muestra en la Figura 7. Esto sugiere que esto es un efecto indirecto. Se observa

algun efecto con el compuesto (I), sin embargo, es algo menos potente. Así, el compuesto (I) es menos activo que AZ28 contra la inhibición de la autofosforilación de PDGF indirecta. No se detectó tirosina cinasa receptora de PDGF Y572/574 en células HT29 sin fármaco añadido (así como con fármaco añadido).

5 FAK Y397 es principalmente un sitio de autofosforilación de FAK y solo un mal sitio de transfosforilación de Src. AZ28 no es un potente inhibidor de FAK (véanse los datos de enzima aislada en el Ejemplo 8). Sin embargo, cierta inhibición de la autofosforilación de FAK en células c-Src527F/NIH3T3 con AZ28 se muestra en la Figura 8. Sin embargo, no se observa inhibición de la autofosforilación de FAK en células c-Src527F/NIH3T3 con el compuesto (I). Lo opuesto es cierto en la línea de células de cáncer humano HT29 de NCI.

10 Los datos de enzima aislada mostrados en el Ejemplo 8 demostraron que AZ28 es un potente inhibidor de las tirosina cinasas de EGFR. De acuerdo con esto, los datos de células tumorales en la Figura 9 muestran que AZ28 inhibe potenteamente la autofosforilación de tirosina cinasas de EGFR. Este sitio no es un sitio de fosforilación de Src directo. Los datos de células tumorales en la Figura 9 también muestran que el compuesto (I) es menos activo contra la autofosforilación inespecífica de EGFRTK.

15 La inhibición de la autofosforilación se correlaciona con las  $IC_{50}$  del compuesto (I). Las Figuras 10A y 10B muestran la inhibición de la autofosforilación de Src (Y416) por el compuesto (I) en comparación con AZ28 en células c-Src527F/NIH-3T3 y en células HT-29. La inhibición de la transfosforilación también se correlaciona con la  $IC_{50}$  del compuesto (I). Las Figuras 10C y 10D muestran la inhibición de la transfosforilación de Src de Shc Y239/240 por el compuesto (I) en comparación con Az28 en células c-Src527F/NIH-3T3 y en células HT-29.

20 El compuesto (I) muestra selectividad de la proteína tirosina cinasa muy alta en ensayos de células completas. Por ejemplo, la Figura 11 muestra la selectividad del compuesto (I) por la proteína tirosina cinasas en comparación con dasatinib.

**Ejemplo 10 como referencia: Protección contra la sordera parcial inducida por el ruido**

25 Se usan chinchillas (N=6) en los estudios de sordera parcial inducida por el ruido. Se mide la sensibilidad auditiva de los animales usando técnicas electrofísicas convencionales antes de la manipulación experimental. En particular, se miden los umbrales auditivos mediante potenciales provocados de la grabación de electrodos crónicamente implantados en el tubérculo cuadrigémino inferior, siguiendo procedimientos de laboratorio habituales. Se anestesiaron los animales, se abrieron las bullas auditivas y se visualizaron las cócleas izquierda y derecha. Se usó la ventana redonda que conduce a la rampa timpánica de la cóclea como el punto de acceso para la administración del fármaco. Los animales se tratan con el compuesto (I) o KX2-328 (un inhibidor no competitivo por ATP de AstraZeneca, KX2-328), emulsionado en DMSO, en 1000 mM de solución salina, que se pone en la ventana redonda de un oído.

30 Se coloca una disolución de control de DMSO 3 mM en 1000 mM de solución salina en la ventana redonda del otro oído. Se deja que la disolución se endurezca sobre la ventana redonda durante 30 minutos, entonces se cierran las bullas auditivas. Posteriormente, los animales se exponen a un ruido de banda de 4 kHz a 105 dB SPL durante cuatro horas. Tras la exposición al ruido, se prueba la audición de los animales en el día 1, día 7 y día 21 para determinar los desplazamientos del umbral de potencial provocado. Se evalúa el desplazamiento del umbral permanente en el día 21.

**Ejemplo 11 como referencia: Protección contra la sordera parcial inducida por cisplatino**

35 Los efectos del ruido de alto nivel y los fármacos ototóxicos, tales como el cisplatino o la clase de aminoglucósidos, comparten varias características comunes en el oído interno. Primero, el ruido y/o los fármacos alteran los niveles de radicales libres/antioxidantes en la cóclea (oído interno). Se ha mostrado que el aumento en los radicales libres es un factor causante de la muerte apoptótica de las células sensoriales. Se usan cobayas (por ejemplo, N=7) en estudios de sordera parcial inducida por cisplatino. Se mide la sensibilidad auditiva de los animales usando técnicas electrofísicas habituales antes de la manipulación experimental. En particular, los umbrales auditivos se miden mediante potenciales provocados de la grabación de electrodos crónicamente implantados en el tubérculo cuadrigémino inferior, siguiendo procedimientos de laboratorio habituales. Se anestesian los animales y se tratan con cisplatino. Posteriormente, se prueba la audición de los animales para determinar los desplazamientos del umbral de potencial provocado.

**Ejemplo 12 como referencia: Efecto sobre la formación de osteoclastos.**

40 Para determinar el efecto del compuesto (I) sobre la formación de osteoclastos, el compuesto se añade a precursores de osteoclastos derivados de células del bazo. Para la generación de osteoclastos derivados del bazo, las células del bazo que comprenden precursores de osteoclastos se tratan con rapamicina, el compuesto (I) o KX2-328 (compuesto de AstraZeneca) durante 5 días en presencia del ligando de receptor activador para el factor nuclear- $\kappa$ B (RANKL) y el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF). En modelos de osteoclastos humanos murinos o humanos *in vitro*, RANKL soluble permite que los precursores de osteoclastos se diferencien en presencia de M-CSF (Quinn, et al.; 1998, *Endocrinology*, 139,4424-4427; Jimi, et al.; 1999, *J. Immunol.*, 163, 434-442). Se incubaron las células de control no tratadas en presencia de RANKL y M-CSF solos. Se usa rapamicina como control positivo para la inhibición de la formación de osteoclastos.

**Ejemplo 13 como referencia: Efecto sobre la supervivencia de osteoclastos.**

Para determinar el efecto del compuesto (I) sobre la supervivencia de osteoclastos, los osteoclastos se tratan con rapamicina, el compuesto (I) o KX2-328 durante 48 horas en presencia de RANKL y M-CSF. Las células de control no tratadas se incuban en presencia de RANKL y M-CSF solos. Se usa rapamicina como control positivo para la inhibición de la supervivencia de osteoclastos.

5

**Ejemplo 14 como referencia: Efecto sobre la resorción ósea *in vitro*.**

Para determinar los efectos del compuesto (I) sobre la formación de osteoclastos sobre cortes de hueso, se tratan los cortes de hueso con rapamicina, el compuesto (I) o KX2-328 en concentraciones ascendentes, por ejemplo, 0,1 nM, 1 nM o 10 nM. Se cuenta el número de osteoclastos sobre los cortes de hueso.

10 Durante la resorción ósea, los osteoclastos forman fosas de resorción. Para determinar los efectos del compuesto (I) sobre la formación de fosas de resorción sobre cortes de hueso, los cortes de hueso se tratan con rapamicina, el compuesto (I) o KX2-328 como se ha descrito anteriormente. Se determina el número de fosas de resorción sobre los cortes de hueso.

15 Se tratan cortes de hueso como se indica anteriormente y luego se tiñen con TRAP. Se determina el número de osteoclastos positivos para TRAP.

Se tratan cortes de hueso como se indica anteriormente y luego se tiñen con azul de toluidina para revelar las fosas de resorción, que son indicadores de la resorción ósea mediada por osteoclastos.

**Ejemplo 15 como referencia: Efecto sobre los osteoblastos**

20 Se ha usado la enzima fosfatasa alcalina como indicador de la actividad de los osteoblastos, ya que participa en la producción de fosfato disponible para la calcificación del hueso. Para determinar los efectos del compuesto (I) sobre la actividad de los osteoblastos, se tratan osteoblastos con el compuesto (I) o KX2-328 a concentraciones ascendentes y se determina la expresión de fosfatasa alcalina (nM de fosfatasa alcalina/μg de proteína/min). Como controles, se tratan osteoblastos con medio solo, sulfóxido de dimetilo (DMSO) o proteína-2 morfogénica ósea (BMP2). Se cree que las BMP, definidas como osteoinductivas por su capacidad para inducir la osteogénesis cuando se implantan en sitios extraesqueléticos, median en la transformación de células mesenquimatosas no diferenciadas en osteoblastos productores de hueso.

25

Para determinar los efectos del compuesto (I) sobre la actividad de los osteoblastos y la expresión de proteínas, se tratan osteoblastos con medio, DMSO, BMP2, el compuesto (I) o KX2-328 como se indica anteriormente. Se determina la concentración de proteína en lisados celulares.

30 **Ejemplo 16 como referencia: Efecto sobre la obesidad**

35 El siguiente ejemplo ilustra que el compuesto (I) se podría usar para tratar la obesidad. El compuesto (I) se prueba usando un método descrito previamente (Minet-Ringuet, et al.; 2006, *Psychopharmacology*, publicación electrónica antes de impresión). Se alojan treinta ratas Sprague-Dawley macho que pesaban inicialmente 175-200 g en jaulas individuales de plexiglás con un ciclo artificial de 12:12 h de luz-oscuridad (las luces se encienden a las 08:00 h) en una sala mantenida a  $24\pm1$  °C y  $55\pm5$  % de humedad. Todo el tiempo están disponibles a voluntad comida y agua. Todas las ratas se alimentan con una dieta de grasa media (energía metabolizable 17,50 kJ/g) compuesta de 140 g/kg de proteína de leche entera, 538,1 g/kg de almidón de maíz, 87,6 g/kg de sacarosa y 137 g/kg de aceite de haba de soja, y esta dieta se complementa con minerales y vitaminas (sales minerales 35 g/kg, vitaminas 10 g/kg, celulosa 50 g/kg y colina 2,3 g/kg). Este alimento, denominado P14-L, que se parece a la dieta humana usual (14 % de proteínas, 31 % de lípidos y 54 % de hidratos de carbono) se prepara en el laboratorio en forma de un polvo.

40

45 Se prueban varias dosis del compuesto (I): 0,01, 0,1, 0,5 y 2 mg/kg, además de la disolución de control. El compuesto se solubiliza en agua y luego se incorpora en la dieta. El consumo basal de alimentos se registra durante el periodo de adaptación y se usa para determinar la cantidad diaria del compuesto de la presente invención incorporado en el alimento. El compuesto se mezcla en el alimento en el laboratorio. Después de 1 semana de adaptación a las condiciones de laboratorio, las ratas se separan en cinco grupos (n=6 por grupo) con peso homogéneo y reciben el compuesto de la presente invención en su alimento durante 6 semanas. Se registra el peso tres veces por semana.

50

La composición del cuerpo se mide al final del estudio por disección y pesando los principales órganos y tejidos. Brevemente, las ratas se anestesian profundamente por una inyección intraperitoneal de una sobredosis de anestésico (pentobarbital sódico 48 mg/kg) y se heparinizan (100 U de heparina/100 g de peso corporal). Se desangran (para evitar la coagulación en tejidos) seccionando la vena cava y la aorta abdominal antes de extirparlas y de pesar los principales órganos frescos (hígado, bazo, riñones y páncreas) y tejidos (tejido adiposo marrón perirenal y escapular, tejidos adiposos blancos epididimario, retroperitoneal, visceral y subcutáneo (WAT), y cadáver definido por músculos y esqueleto).

**Ejemplo 17 como referencia: Efecto sobre la translocación de GLUT4 inducida por insulina en adipocitos 3T3-L1.**

El siguiente ejemplo ilustra que el compuesto (I) se podría usar para tratar diabetes. Se prueba el compuesto (I) usando un método descrito previamente (Nakashima, et al.; 2000, J. Biol. Chem., 275, 12889-12895). Se inyecta o IgG de control o el compuesto de la presente invención en el núcleo de adipocitos 3T3-L1 diferenciados sobre cubreobjetos.

5 Se inyectan simultáneamente proteínas de fusión de glutatión S-transferasa con 5 mg/mL de IgG de oveja para fines de detección. Antes de la tinción, se deja que las células se recuperen durante un periodo de 1 h. Se dejan morir de hambre las células durante 2 h en medio sin suero, estimulado con o sin insulina (0,5 nM o 17 nM) durante 20 min y se fijan.

10 Se realiza inmunotinción usando anti-GLUT4 policlonal de conejo (F349) (1 µg/mL). Se evalúa cada célula microinyectada positiva para isiotiocianato de fluoresceína para la presencia de tinción de GLUT4 asociada a la membrana plasmática. Se inyectan células de control con IgG preinmune de oveja y luego se procesan de la misma forma que las células experimentalmente inyectadas. A medida que se cuantificó por tinción inmunofluorescente con GLUT4, la insulina conduce a un aumento en la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática. Las células se incuban con wortmanina como control para bloquear la translocación de GLUT4 basal e inducida por la insulina. El 15 compuesto de la presente invención podría estimular la translocación de GLUT4 inducida por insulina, que podría indicar que la administración del compuesto de la invención inhibió la actividad de cinasa, por ejemplo, función de PTEN, dando como resultado un aumento en los niveles intracelulares de 3,4,5-trifosfato de fosfatidilinositol, que estimula la translocación de GLUT4.

**Ejemplo 18 como referencia: Efecto sobre la neovascularización retiniana**

20 El siguiente ejemplo ilustra que el compuesto (I) se podría usar para tratar enfermedades oculares, por ejemplo, degeneración macular, retinopatía y edema macular. El efecto del compuesto (I) sobre la neovascularización retiniana se determina usando un modelo de neovascularización retiniana como se describe previamente (Aiello, et al.; 1995, Proc. Natl. Acad. Sci., 92, 10457-10461). Brevemente, se exponen ratones C57B1/6J a 75 % de O<sub>2</sub> desde el día posnatal 7 (P7) hasta P12 junto con madres lactantes. En P12, los ratones se devolvieron al aire ambiente. Se realizan 25 inyecciones intraoculares en P12 y algunas veces P14 como se describe a continuación. En P17 los ratones se sacrifican por perfusión cardíaca de 4 % de paraformaldehído en solución salina tamponada con fosfato y los ojos se encuelan y se fijan en 4 % de paraformaldehído durante la noche a 4 °C antes de la incorporación en parafina.

30 Los ratones se anestesian profundamente con tribromoetanol para todos los procedimientos. Se abre la fisura del párpado (por ejemplo, usando una hoja de bisturí Nº 11) y se proptosa el ojo. Se realizan inyecciones intravítreas entrando primero en el ojo izquierdo con una aguja de sutura Ethicon TG140-8 en el limbo posterior. Se usa una aguja y jeringa de Hamilton de calibre 32 para administrar el compuesto de la presente invención diluido en solución salina equilibrada con Alcon a través del sitio de entrada existente. Entonces se vuelve a colocar el ojo y los párpados se aproximan por encima de la córnea. Se realizan inyecciones repetidas a través de una sección previamente sin manipular del limbo 2 días después. Como control, se inyectan cantidades iguales de solución salina al ojo derecho.

35 Se obtienen más de 50 secciones axiales sucesivas incorporadas en parafina de 6 µm empezando en la cabeza del nervio óptico. Después de la tinción con ácido peryódico / reactivo de Schiff y hematoxilina (Pierce, et al.; 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 92, 905-909; Smith et al.; 1994, Invest. Ophthal. Vis. Sci., 35, 101-111), se evalúan 10 secciones intactas de longitud igual, cada una separada 30 µm, para un alcance de 300 µm. Se excluyen de la evaluación los ojos que presentan desprendimiento de retina o endoftalmitis. Se cuentan todos los núcleos de células vasculares retinianas anteriores a la membrana limitante interna en cada sección por un protocolo completamente enmascarado. La media de las 10 secciones contadas da núcleos de células neovasculares promedio por sección de 6 µm por ojo. 40 No se observan núcleos de células vasculares anteriores a la membrana limitante interna en animales normales sin manipular (Smith et al.; 1994, Invest. Ophthal. Vis. Sci., 35, 101-111). La reducción en la neovascularización se pudo observar en los ojos tratados con compuesto en comparación con los ojos en el grupo de control de solución salina.

**Ejemplo 19 como referencia: Modulación de una cascada de señalización de cinasas asociada a ictus**

Se han desarrollado muchos modelos animales para ictus y se caracterizaron, véanse, por ejemplo, Andaluz, et al., Neurosurg. Clin. North Am., vol. 13:385-393 (2002); Ashwal, S. y W. J. Pearce., Curr. Opin. Pediatr., vol 13:506-516 (2001); De Lecinana, et al., Cerebrovasc. Dis., vol. 11(Suppl. 1):20-30 (2001); Ginsberg y Busto, Stroke, vol. 20:1627-1642 (1989); Lin, et al., J. Neurosci. Methods, vol. 123:89-97 (2003); Macrae, I. M., Br. J. Clin. Pharmacol., vol. 34:302-308 (1992); McAuley, M. A., Cerebrovasc. Brain Metab. Rev., vol. 7:153-180 (1995); Megyesi, et al., Neurosurgery, 50 vol. 46:448-460 (2000); Stefanovich, V. (ed.), Stroke: animal models. Pergamon Press, Oxford (1983); y Traystman, R. J., ILAR J. 44:85-95 (2003). Para una revisión de modelos animales de isquemia cerebral focal (ictus) y global (paro cardíaco), véanse, por ejemplo, Traystman, ILAR J., vol. 44(2):85-95 (2003) y Carmichael, NeuroRx®: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics, vol. 2:396-409 (2005).

55 Se identifican compuestos que modulan la muerte celular en ictus usando cualquiera de los modelos para ictus reconocidos en la técnica. En los estudios descritos en el presente documento, se usa oclusión de la sutura intrarterial de la arteria cerebral media (MCA), un procedimiento conocido como MCAo, a través de la arteria carótida interna como un modelo para muerte celular en ictus. En el grupo de control y de prueba de ratas, se corta transversalmente

la arteria carótida externa, se anuda la arteria carótida común y entonces se usa la arteria carótida externa como una vía para pasar una sutura a través de la arteria carótida interna, en donde la sutura se aloja en la unión de las arterias cerebrales anterior y media. Para reducir la hemorragia subaracnoidea y la reperfusión prematura, la sutura se recubre preferentemente con un agente tal como silicona. La sutura se usa para ocluir la MCA, por ejemplo, durante una duración de 60, 90 o 120 minutos y para ocluir permanentemente la MCA.

En el grupo de prueba, las ratas se administran con el compuesto (I) en una variedad de momentos antes, durante y después de la oclusión de MCA con la sutura. El efecto del compuesto sobre el grupo de prueba se compara con los efectos observados en el grupo de control, por ejemplo, midiendo el grado de muerte celular en cada grupo de MCAo. Normalmente, en el grupo de control, el patrón de muerte celular sigue una progresión de infarto temprano en el estriado hacia el infarto retardado en la corteza dorsolateral que cubre el estriado. El estriatal es principalmente necrótico y ocurre rápidamente. El patrón de muerte celular en el grupo de prueba se compara con el del grupo de control para identificar compuestos que modulan la muerte celular en ictus.

**Ejemplo 20 como referencia: Modulación de una cascada de señalización de cinasas asociadas a aterosclerosis**

15 Se han desarrollado y caracterizado muchos modelos animales para aterosclerosis. Para una revisión de modelos animales de investigación de aterosclerosis, reestenosis e injerto endovascular, véase, por ejemplo, Narayanaswamy et al., JVIR, vol. 11(1): 5-17 (2000).

20 La aterosclerosis se induce en un modelo animal adecuado usando una dieta hiperlipídica/alta en colesterol (HFHC). El animal de prueba es un animal que contiene éster transferasa de colesterol, tal como el conejo o el cerdo. La dieta HFHC se produce, por ejemplo, usando comida comercial complementada con grasa. El consumo de colesterol es entre 0,5-2,0 % de la dieta. Un grupo de prueba de animales, por ejemplo, conejos o cerdos, recibe el compuesto (I). El efecto del compuesto de prueba se compara con los efectos de la aterosclerosis en el grupo de control sin tratar de animales. Los efectos que se comparan incluyen, por ejemplo, el grado de formación de placas, el número y/o la frecuencia de infartos de miocardio observados en cada grupo de animales y el grado de daño tisular secundario al infarto de miocardio presentado en tejido coronario.

25 El infarto de miocardio se estudia usando una variedad de modelos animales tales como ratas y ratones. La mayoría de los infartos de miocardio resultan de oclusión transbólica aguda de placas ateroscleróticas preexistentes de arterias coronarias, que se imita en modelos animales por ligadura de la arteria coronaria izquierda en, por ejemplo, ratas y ratones. El infarto de miocardio induce cambios globales en la arquitectura ventricular, un proceso denominado remodelación ventricular. El corazón infartado se dilata progresivamente y acelera el deterioro de la disfunción ventricular que con el tiempo da como resultado insuficiencia cardíaca.

30 La isquemia miocárdica se induce en grupos de prueba y de control de animales, por ejemplo, ratones o ratas, ligando la arteria coronaria descendente anterior izquierda. El tejido del corazón afectado se pone en contacto con el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, por ejemplo, por inyecciones intraperitoneales (i.p.), después de la inducción de isquemia. Se determinan la imagen por resonancia magnética (IRM) de alta resolución, las mediciones del peso seco, el tamaño del infarto, el volumen del corazón y el área en riesgo 24 horas postoperatoriamente. Se determinan las tasas de supervivencia y la ecocardiografía en diversos momentos postoperatoriamente en las ratas que recibieron inyecciones del compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Se comparan otros efectos del compuesto de prueba con el grupo de control de ratas. Por ejemplo, los cambios en la geometría ventricular izquierda y la función se caracterizan usando ecocardiografía para comparar diámetros telediastólicos, espesor relativo de la pared y el porcentaje de acortamiento fraccionario. En corazones extirpados, se calculó el tamaño del infarto y se expresó como un porcentaje de área superficial ventricular izquierda.

**Ejemplo 21 como referencia: Modulación de una cascada de señalización de cinasas asociada a dolor neuropático**

45 Se han desarrollado muchos modelos animales para dolor neuropático, tales como dolor neuropático crónico, y se caracterizaron, véanse, por ejemplo, Bennett & Xie, Pain, vol. 33, 87-107 (1988); Seltzer et al., Pain, vol. 43, 205-18 (1990); Kim & Chung, Pain, vol. 50, 355-63 (1992); Malmberg & Basbaum, Pain, vol. 76, 215-22 (1998); Sung et al., Neurosci Lett., vol. 246, 117-9 (1998) ; Lee et al., Neuroreport, vol. 11, 657-61 (2000); Decosterd & Woolf, Pain, vol. 87, 149-58 (2000); Vadakkan et al., J Pain, vol. 6, 747-56 (2005).

50 Para una revisión de modelos animales usados para dolor neuropático, véase, por ejemplo, Eaton, J. Rehabilitation Research and Development, vol. 40(4 Supplement):41-54 (2003).

55 Se identifican los compuestos que modulan el dolor neuropático usando cualquiera de los modelos reconocidos en la técnica para dolor neuropático. Por ejemplo, los modelos para dolor neuropático implican, en general, lesión al nervio ciático, aunque varía el método usado para inducir la lesión. Por ejemplo, el nervio ciático se daña debido a la constrictión parcial, corte transversal completo, congelación del nervio y agresiones metabólicas, químicas o inmunitarias al nervio. Se ha mostrado que los animales con estos tipos de lesión nerviosa desarrollan sensaciones anormales de dolor similares a las informadas por los pacientes con dolor neuropático. En los estudios descritos en el presente documento, se lesiona el nervio ciático de grupos de prueba y de control de sujetos, tales como ratones. En

el grupo de prueba, los sujetos se administran con el compuesto (I) en una variedad de momentos antes, durante y después de la lesión al nervio ciático. Se comparan los efectos del compuesto en el grupo de prueba con los efectos observados en el grupo de control, por ejemplo, mediante observación y exploración física de los sujetos. Por ejemplo, en ratones, se usa la pata trasera del sujeto para probar la respuesta a estímulos no dañinos, tales como estimulación táctil, o para probar la respuesta del sujeto a estímulos que serían nocivos en el transcurso de acontecimientos normales, por ejemplo, calor radiante suministrado a la pata trasera. La evidencia de alodinia, una afección en la que, en general, estímulos no dolorosos provocan dolor, o una hiperalgesia, la excesiva sensibilidad o sensibilidad al dolor, en los sujetos de prueba indica que el compuesto de prueba no está modulando eficazmente el dolor neuropático en los sujetos de prueba.

10 **Ejemplo 22 como referencia: Modulación de una cascada de señalización de cinasas asociadas a hepatitis B**

Se han desarrollado y caracterizado muchos modelos animales para hepatitis B. Para una revisión de modelos animales de hepatitis B, véanse, por ejemplo, Guha et al., *Lab Animal*, vol. 33(7):37-46 (2004). Los modelos animales adecuados incluyen, por ejemplo, el chimpancé, las musarañas arborícolas (pequeños animales no roedores que están filogenéticamente próximos a los primates, véase Walter et al., *Hepatology*, vol. 24(1):1-5 (1996)) y modelos sustitutos tales como la marmota, el pato y la ardilla terrestre (véase, por ejemplo, Tennant y Gerin, *ILAR Journal*, vol. 42(2):89-102 (2001)).

Por ejemplo, se aíslan hepatocitos primarios de los hígados de las especies de musarañas arborícolas Tupaia belangeri y se infectan con VHB. La infección *in vitro* da como resultado la síntesis de ADN y ARN viral en hepatocitos y la secreción de antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) y antígeno e de la hepatitis B (HBeAg) en el medio de cultivo. Las tupayas también se pueden infectar con VHB *in vivo*, dando como resultado la replicación de ADN viral y la expresión génica en hígados de tupaya. Similar a la hepatitis B autolimitada aguda en seres humanos, el HBsAg se elimina rápidamente del suero, seguido por seroconversión en anti-HBe y anti-HBs.

25 Se identifican compuestos que modulan la hepatitis B usando cualquiera de los modelos reconocidos en la técnica para hepatitis B. En los estudios descritos en el presente documento, se infectan con el VHB grupos de prueba y de control de animales, por ejemplo, chimpancés o musarañas arborícolas. En el grupo de prueba, los sujetos se administran con el compuesto (I) en una variedad de momentos antes, durante y después de la exposición a VHB. Los efectos del compuesto sobre el grupo de prueba se comparan con los efectos observados en el grupo de control, por ejemplo, mediante observación física y examen de los sujetos y mediante análisis de sangre o de suero para determinar en qué momento de tiempo se elimina la infección del sujeto. Por ejemplo, se realizan ensayos para detectar la presencia y/o la cantidad de virus de la hepatitis B denominados antígenos de superficie y fragmentos de los mismos. Alternativamente o, además, se analiza el hígado del sujeto. Las pruebas de la función hepática analizan los niveles de ciertas proteínas y enzimas, tales como, por ejemplo, aspartato aminotransferasa (AST, antiguamente la glutámico-oxaloacético transaminasa sérica (SGOT)) y alanina aminotransferasa (ALT, antiguamente la glutamato-piruvato transaminasa sérica (SGPT)).

35 **Ejemplo 23 como referencia: Efecto sobre la inhibición de tirosina cinasas**

El siguiente ejemplo ilustra que el compuesto (I) se podría usar para tratar enfermedades autoinmunitarias. Se prueba el compuesto (I) usando un método descrito previamente (Goldberg, et al.; 2003, *J. Med. Chem.*, 46, 1337-1349). Se mide la actividad de cinasa usando DELFIA (fluoroinmunoensayo de lantánidos potenciado por la disociación), que utiliza anticuerpos anti-fosfotirosina marcados con quelato de europio para detectar la transferencia de fosfato a un polímero al azar, poli-Glu4-Tyr1 (PGTYR). El ensayo de cinasa se realiza en una placa blanca de 96 pocillos recubierta con neutravidina en tampón de ensayo cinasa (HEPES 50 mM, pH 7,0, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, MnCl<sub>2</sub> 5 mM, KCl 50 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 100 μM, 0,2 % de BSA, 0,01 % de CHAPS). Se prediluyen muestras de prueba (compuesto (I)) inicialmente disueltas en DMSO a 1 mg/mL para la respuesta a dosis (10 dosis con concentración final inicial de 1 μg/mL, 1-3,5 diluciones sucesivas) con el tampón de ensayo. Se añaden sucesivamente una alícuota de 25 μL de esta muestra diluida y una alícuota de 25 μL de enzima diluida (Ick) (concentración final 0,8 nM) una detrás de la otra a cada pocillo. La reacción empieza con 50 μL/pocillo de una mezcla de sustratos que contienen ATP 2 μM (concentración final de ATP es 1 μM) y 7,2 ng/μL de PGTYR-biotina en tampón cinasa. Los pocillos de fondo se incuban con tampón y sustratos solo. Después de 45 min de incubación a temperatura ambiente, la placa de ensayo se lava tres veces con 300 μL/pocillo de tampón de lavado DELFIA. Se añade a cada pocillo una alícuota de 100 μL/pocillo de anti-fosfotirosina marcada con europio (Eu<sup>3+</sup>-PT66, 1 nM, Wallac CR04-100) diluida en tampón de ensayo DELFIA y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Tras completarse la incubación, la placa se lava cuatro veces con 300 μL/pocillo de tampón de lavado y 100 μL/pocillo de tampón de lavado DELFIA. Se añade disolución de potenciamiento (Wallac) a cada pocillo. Después de 15 min, se mide la fluorescencia resuelta en el tiempo en el analizador L JL (excitación a 360 nm, emisión a 620 nm, espejo dicroico EU 400) después de un tiempo de retraso de 250 μs. El compuesto de la presente invención podría inhibir la actividad de cinasas de Ick, que indica que el compuesto se puede usar para tratar enfermedad autoinmunitaria en un sujeto.

55 **Ejemplo 24 como referencia: Cl<sub>50</sub> del compuesto (I) y dasatinib en líneas celulares resistentes a dasatinib; doce (12) concentraciones de inhibidor en cada línea celular.**

5 Se cultivaron líneas celulares de cáncer informadas en la bibliografía actual por ser resistentes a dasatinib (es decir, COLO-320DM, H460, H226 y HCT-116) en presencia del inhibidor de Src del compuesto (I) o control de dasatinib para determinar el efecto del compuesto (I) sobre la inhibición del crecimiento celular. Se evaluó la proliferación/inhibición del crecimiento celular usando el ensayo colorimétrico de MTT. Además, se determinó la  $IC_{50}$  de tanto el compuesto (I) como el control de dasatinib. La siguiente tabla proporciona una lista de las líneas celulares usadas en este estudio de inhibición del crecimiento.

NOMBRE	ATCC Nº	TIPO
H460	HTB-177	NSCLC
H226	CRL-5826	NSCLC
COLO-320DM	CCL-220	adenocarcinoma colorrectal
HCT116	CCL-247	carcinoma colorrectal

10 Se cultivaron rutinariamente las líneas celulares de cáncer humano COLO-320DM, H460, H226 y HCT-116 y se mantuvieron en medio basal que contenía 2 % de FBS a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>. Para los experimentos, se siembran células a 4,0 x 10<sup>3</sup>/190 µL y 8,0 x 10<sup>3</sup>/190 µL por pocillo de placa de 96 pocillos en medio basal/1,5 % de FBS. Las células se cultivan durante la noche (16 h) en placas de 96 pocillos a 37 °C en condiciones apropiadas de CO<sub>2</sub> antes de la adición del compuesto (I) y de dasatinib.

15 Para las diluciones del compuesto (I) y de dasatinib (BMS354825), se diluyeron sucesivamente muestras de disolución madre 20 mM en medio basal/1,5 % de FBS usando diluciones 1:3, dando concentraciones 20x en el intervalo de 131 µM a 0,74 nM. Entonces se añaden 10 µL de diluciones 20x a los pocillos apropiados (n=3) que contenían 190 µL de líneas de células cancerosas, dando el intervalo 6561 nM a 0,037 nM de concentraciones finales. Se usaron los siguientes controles: Control de vehículo de células y sin muestra; control de medio de células, sin muestra y 0,03 % de DMSO (concentración de DMSO más alta presente en muestras; no informada en los resultados).

20 Se incubaron células de cáncer tratadas durante 3 días (78 horas) a 37 °C, condiciones de CO<sub>2</sub> apropiadas. En el día 3, se añadió 10 µL de MTT (5 mg/mL) a cada pocillo. Entonces se incubaron las células en presencia de MTT durante 4 horas a 37 °C, condiciones de CO<sub>2</sub> apropiadas. Después de este periodo de incubación, se añadió 90 µL de 10 % de SDS(+HCl) a cada pocillo para lisar las células y solubilizar el formazano. Entonces se incubaron las células durante la noche a 37 °C, condiciones de CO<sub>2</sub> apropiadas.

25 Se midió la DO<sub>50</sub> usando lector de microplacas. Se determinó la inhibición de las curvas de crecimiento y CE<sub>50</sub>/ IC<sub>50</sub> usando el software estadístico GraphPad Prism 4. Los datos se normalizaron para representar el porcentaje de respuesta máxima.

La siguiente tabla muestra las IC<sub>50</sub> del compuesto (I) y dasatinib en líneas de células cancerosas (8,0 x 10<sup>3</sup> células/pocillo, 1,5 % de FBS) a 78 h (resultados de los datos de respuesta normalizados).

Línea de células tumorales sólidas humanas	Compuesto (I) nM			Dasatinib nM			Dasatinib nM	
	NOMBRE	IC <sub>50</sub>	IC <sub>80</sub>	IC <sub>90</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>80</sub>	IC <sub>90</sub>	
H460 H226		51 98	105 277	162 490	90 163	7.110 7.758	48.880 34.340	1.800* 10.000*
COLO-320DM		30	80	144	1	2	14	10.000**
HCT116		31	106	195	880	NA	NA	5.000**

\* Johnson et al., Clin Cancer Res 2005;11(19):6924-6932, 1 de octubre de 2005

\*\* Pupputi et al., Mol Cancer Ther 2006;5 (12):927-934, diciembre de 2006

30 **Ejemplo 25 como referencia: Efecto del compuesto (I) sobre células de leucemia resistentes a dasatinib e imatinib**

Se cultivaron células Ba/F3 (véase, por ejemplo, Palacios et al., Nature 309: 126-131 (1984); Palacios et al., Cell 41: 727-734 (1985)) en placas de 96 pocillos en medio completo + IL-3. También se transfecaron cultivos de células Ba/F3 para expresar Bcr-Abl natural (WT), la mutación E255K de Bcr-Abl o la mutación T315I de Bcr-Abl y se cultivaron en placas de 96 pocillos en medio completo sin IL-3. La línea celular Ba/F3 se vuelve resistente a Gleevec cuando está

presente la mutación en la tirosina cinasa Bcr/Abl E225K. La línea celular Ba/F3 se vuelve resistente a tanto Gleevec como a dasatinib cuando está presente la mutación T315I de la tirosina cinasa Bcr/Abl. Entonces se trataron las células de cada grupo sin fármaco, dasatinib 0,1 - 10.000 nM o compuesto (I) 0,1 - 10.000 nM en diluciones al 10 % durante 96 h. Se realizaron ensayos de MTT (lectura de placa a 570 nM). Todos los ensayos son por triplicado.

- 5 Los resultados de este estudio, resumidos en las Figuras 12-13 y la tabla que sigue, muestran que el compuesto (I) inhibe el mutante T315I de BCR-Abl a  $IC_{50} = 35$ , mientras que dasatinib no inhibe a 10.000 nM. Además, dasatinib no inhibe la proliferación inducida por IL-3 de células Ba/F3 mientras que el compuesto (I) es un potente inhibidor ( $IC_{50} = 3,5$  nM).

Línea celular	Valores de $IC_{50}$ (nM)	
	Dasatinib	Compuesto (I)
Ba/F3	---	3,5
+ WT BCR-Abl	1	85
+ E225K	1	80
+ T315I	>10.000	35

10 **Ejemplo 26 como referencia: Ensayo de  $IC_{50}$  / BrdU en cinco líneas celulares con el compuesto (I) y BMS354825.**

Evaluación de las  $IC_{50}$  en cinco líneas celulares (SKOV-3, K562, HT-29, A549 y MDA-MB-231) con el compuesto (I) y BMS354825 ensayadas a T=0 y T=72 usando BrdU.

15 Para estos experimentos, se sembraron células en dos placas de 96 pocillos por línea celular con el número de células indicado más adelante en 200  $\mu$ L de medio de crecimiento que contenía 1,5 % de FBS. Líneas celulares que se evaluaron son: SKOV-2, K562, HT-29, A549 y MDA231. Todas se sembraron a 1000 células por pocillo, excepto HT-29 (2000 células) y MDA MB 231 (5000 células). Las placas se incubaron durante 24 horas después de la siembra a 37 °C + 5 % de CO<sub>2</sub>. Excepto MDA231, esta línea se cultiva a 37 °C y 0 % de CO<sub>2</sub>.

20 Después de 24 horas después de la siembra, se añadieron el compuesto (I) y BMS354825 a 128 nM, 64 nM, 32 nM, 16 nM, 8 nM, 4 nM, 2 nM y 1 nM a 1 placa de cada línea celular (n=3). Los conjuntos tratados con el compuesto (I) y BMS354825 de las placas de línea celular se incubaron durante 72 horas a 37 °C + 5 % de CO<sub>2</sub>. Excepto MDA231, esta línea se cultiva a 37 °C y 0 % de CO<sub>2</sub>. El ensayo de BrdU se realizó a T=0 y T=72.

Inhibición del crecimiento. Se usaron los datos de BrdU para determinar el % de inhibición del crecimiento para cada concentración de muestra usando la fórmula:

$$GI = [ (T_1 - T_0) / (Con - T_0) ] \times 100$$

25 donde  $T_0$  = Fluorescencia de células a tiempo 0;  $T_1$  = Fluorescencia de células tratadas a las x horas; Con = Fluorescencia de células de control a las x horas. Los valores de  $T_1 \leq$  valores de  $T_0$  se designaron T, citotoxicidad. Se estimó  $IC_{50}$  usando XLFit que excluye valores de  $T_1 \leq T_0$  (citotoxicidad). Los resultados de este estudio se resumieron en las Figuras 14-18 y la tabla que sigue.

Resumen de datos de $IC_{50}$		
	Compuesto (I)	BMS-354825
HT-29	1,54E-08 M	2,05E-08 M
SKOV-3	9,75E-09 M	3,24E-09 M
A549	9,39E-09 M	1,25E-08 M
K562	1,09E-08 M	<1,0E-9 M
MDA-MB-321	1,98E-08 M	6,02E-09 M

30 **Ejemplo 27:  $IC_{50}$  de combinación de Gemzar® y el compuesto (I) en la línea celular L3.6pl usando el ensayo de BrdU.**

Este estudio implicó la evaluación de  $IC_{50}$  de Gemzar® ± compuesto (I) en la línea celular L3.6pl ensayada a T=0 y T=72 usando el ensayo de BrdU (Roche: Número de catálogo 11647229001). Se sembraron células L3.6pl, una línea

celular de cáncer pancreático humano, en tres placas de 96 pocillos con 2000 células/pocillo para L3.6pl en 190  $\mu$ L de medio de crecimiento que contenía 1,5 % de FBS. Se describen previamente las células L3.6pl en Trevino et al. Am J Pathol. 2006 Mar;168(3):962-72. Las células se incubaron durante 18-24 horas después de la siembra a 37 °C + 5 % de CO<sub>2</sub>. Despues de 24 horas, se añadió Gemzar® + compuesto (I), Gemzar® y el compuesto (I) a las células L3.6pl (n=3). Se evaluó Gemzar® a concentraciones de 8 nM, 4 nM, 2 nM, 1 nM, 0,5 nM, 0,25 nM, 0,125 nM, 0,063 nM. El compuesto (I) se evaluó a concentraciones de 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12,5 nM, 6,25 nM, 3,125 nM, 1,56 nM y 0,78 nM. Se incubó cada placa tratada de muestra durante 72 horas a 37 °C + 5 % de CO<sub>2</sub>. Se realizó el ensayo de BrdU a T=0 y otra vez después de 72 horas de incubación, T=72. Los resultados del estudio se proporcionan en las Figuras 19 y 20. La siguiente tabla proporciona un resumen de IC<sub>50</sub> calculada para Gemzar® ± compuesto (I).

Tabla resumen de IC <sub>50</sub>		
	Compuesto (I) nM	Gemzar® nM
Individuales	53,03	1,76
Combinados	1,15	0,09

10

#### Ejemplo 28 como referencia: Modelo de próstata ortotópica para medir en metástasis *in vivo*

Se inyectaron ratones Nu/Nu (8-12 semanas de edad) con células de cáncer de próstata PC3-MM2 en la próstata como se describe previamente en Pettaway et al., Clin Cancer Res 1996;2:1627-1636. Catorce días después de la inyección ortotópica de células PC3-MM2, los ratones se aleatorizaron en cuatro grupos: tratamiento con dasatinib (15 mg/kg/día); tratamiento con el compuesto (I) (5 mg/kg/día); tratamiento con el compuesto (I) (10 mg/kg/día); y control (vehículo). Se administraron dasatinib, el compuesto (I) y vehículo por sonda nasogástrica oral. Todos los ratones se sacrificaron por dislocación cervical en aproximadamente el día 42. Se registraron el volumen del tumor (medido por compás calibrador), el peso y la incidencia de las metástasis a los ganglios linfáticos regionales (celíacos o para-aórticos). Los resultados del experimento se informan en la siguiente tabla y se muestran en las Figuras 21 y 22.

	Incidencia tumoral	Peso del tumor (g)		Metástasis a GL
		Mediana	(IQR)	
<b>Control</b>	5/6	2,27	(1,94 ~ 2,61)	5/5
<b>Compuesto (I) (5,0 mg/kg/día)</b>	5/6	1,16	(0,94 ~ 1,28)	4/5
<b>Compuesto (I) (10,0 mg/kg/día)</b>	5/6	0,35	(0,24 ~ 0,56)	2/5
<b>Dasatinib (15 mg/kg/día)</b>	5/6	0,43	(0,30 ~ 1,34)	2/5

20

#### Ejemplo 29 como referencia: Ensayo primario de VHB

El ensayo primario para VHB desarrollado se realizó similarmente al descrito por Korba et al. (Antiviral Res. 15: 217-228 (1991) y Antiviral Res. 19: 55-70 (1992)), con la excepción de que se han mejorado y simplificado la detección y la cuantificación del ADN viral (Korba et al., Antiviral Res. 19: 55-70 (1992)).

25 Se evaluó el compuesto (I) para la posible actividad anti-VHB usando una alta concentración de prueba única del compuesto en el ensayo antiviral normalizado HepG2-2.2.15. HepG2-2.2.15 es una línea celular estable que produce altos niveles de la cepa natural ayw1 del VHB. Brevemente, se sembraron células HepG2-2.2.15 en placas de 96 pocillos. Solo se utilizaron los pocillos interiores para reducir los "efectos de borde" observados durante el cultivo celular; los pocillos exteriores se llenan con medio completo para ayudar a minimizar la evaporación de muestras. Al día siguiente, 30 se lavó la monocapa confluente de células HepG2-2.2.15 y el medio se sustituyó por medio completo que contenía las concentraciones de prueba de un artículo de prueba por triplicado. Se usó 3TC como control positivo, mientras que el medio solo se añadió a las células como control no tratado. Tres días después se sustituyó el medio de cultivo con medio fresco que contenía el compuesto de prueba apropiadamente diluido. Seis días después de la administración inicial del compuesto de prueba, se recogió el sobrenadante de cultivo celular, se trató con pronasa y DNase y luego se usó en un 35 ensayo de PCR cuantitativa TaqMan en tiempo real para la medición directa de las copias de ADN del VHB usando un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7900 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

40 Se calculó la actividad antiviral de cada compuesto de prueba comparando sus copias de ADN del VHB con las de las células de control no tratado (100 %) para obtener el porcentaje del nivel de inhibición. Despues de retirar el sobrenadante, las células restantes se sometieron al ensayo de proliferación celular en disolución CellTiter 96 Aqueous One (Promega, Madison, WI) (basado en MTS) para medir la viabilidad celular. Se determinó la citotoxicidad del

compuesto comparando su viabilidad celular con la del control de células no tratadas para obtener el porcentaje del control de células. Los resultados de este estudio se proporcionan en la siguiente tabla y en la Figura 23.

Compuesto	Concentración de prueba	Actividad antiviral	Citotoxicidad	Interpretación
		Porcentaje de inhibición del control de células	Porcentaje del control de células	
3TC	1 µM	92,0 %	103,3 %	Activa
Compuesto (I) : 2HCl	10 µM	48,2 %	51,3 %	Citotóxica

#### **Ejemplo 30 como referencia: Inhibición de la actividad de cinasas Src en células completas**

- 5 El compuesto (I) inhibe la actividad de cinasas Src en células completas como se muestra en las Figuras 10A, 10B, 10C y 10D. La Figura 10A es un gráfico que representa el efecto del compuesto (I) sobre la autofosforilación de Src en células c-Src/NIH-3T3; la Figura 10B es un gráfico que indica el efecto del compuesto (I) sobre la autofosforilación de Src en células HT-29; la Figura 10C es un gráfico que representa el efecto del compuesto (I) sobre la transfosforilación de Src en células c-Src/NIH-3T3; y la Figura 10D es un gráfico que indica el efecto del compuesto (I) sobre la autofosforilación de Src en células HT-29. El compuesto (I) es un potente inhibidor de la actividad de cinasas Src en células completas. Como se muestra en las Figuras 10A-10D, el compuesto (I) es un potente inhibidor de la actividad de cinasas Src en células completas. En particular, el compuesto (I) fue un potente inhibidor de la autofosforilación de Src (Figuras 10A y 10B) y la transfosforilación de Src (Figuras 10C y 10D) en diversas líneas celulares. Se obtuvieron resultados de inhibición de células completas similares para sustratos de transfosforilación adicionales, es decir, FAK Y925 y paxilina Y31. Las fosforilaciones de PDGF Y572/574, EGF Y845, JAK1 Y1022/1023 y JAK2 Y1007/1008, Lck Y405 y ZAP70 Y319 no se inhibieron en células completas. Lyn Y416 y Bcr/Abl &245 se inhibieron menos potenteamente.

#### **Ejemplo 31 como referencia: Selectividad por proteína tirosina cinasas en células completas**

- 20 El compuesto (I) es selectivo por la proteína tirosina cinasas (PTK). La Figura 11 es una ilustración que representa la selectividad del compuesto (I) por la proteína tirosina cinasas (PTK) en células completas en comparación con dasatinib, un inhibidor de Src competitivo de ATP actualmente en ensayos clínicos. Las células SYF son fibroblastos de ratón que carecen de los miembros de la familia Src de cinasas Src, Yes y Fyn. El compuesto (I) demostró selectividad por PTK muy alta en células completas en comparación con dasatinib.

#### **Ejemplo 32 como referencia: Potencia oral**

- 25 El compuesto (I) demuestra alta potencia oral. Por ejemplo, la Figura 24 muestra la potencia oral del compuesto (I) en comparación con dasatinib. La potencia oral se determinó usando xenoinjertos de ratón HT29 estadificados (cáncer de colon humano) durante un periodo de 28 días de tratamiento. El compuesto (I) se probó a 2,0 y 4 mg/kg dos veces al día. Dasatinib se probó a 25 mg/kg dos veces al día. En el día 5, la dosis de dasatinib se redujo hasta 15 mg/kg dos veces al día debido a la pérdida de peso.

#### **Ejemplo 33 como referencia: Ensayo primario de VHC**

- 30 Se podría usar el compuesto (I) para tratar el VHC. Se prueba el compuesto (I) usando el método de Pietschmann, T., et al. J. Virol. 76:4008-4021. La línea celular ET es una línea celular de hepatoma humano, Huh-7, que alberga un replicón de ARN del VHC (genotipo 1b) con un indicador de luciferasa (Luc) estable y tres mutaciones adaptativas del cultivo celular. Las células se cultivan en medio esencial modificado con Dulbecco (DMEM), 10 % de suero bovino fetal (FBS), 1 % de penicilina-estreptomicina (pen-estrep), 1 % de glutamina, 5 mg/mL de G418 en una estufa de incubación con 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Todos los reactivos de cultivo celular son de, por ejemplo, Mediatech (Herndon, VA).

#### **Ejemplo 34 como referencia: Exposición en plasma y cerebro**

- 35 El compuesto (I) demuestra buena exposición en plasma/cerebro. Por ejemplo, la exposición en plasma y cerebro del compuesto (I) se describe a continuación. Se midieron las concentraciones plasmáticas en ratones después de la administración por vía oral. Todas las dosis se formularon en agua purificada. Se administraron ratones CD-1 macho después de un ayuno durante la noche y se alimentaron 4 horas después de la dosis. La dosis fue del siguiente modo:

Número de grupo	Vía	Compuesto	Dosis (mg/kg)*	Vol. de dosis (mL/kg)
1	PO	Mesilato del compuesto (I)	10	10
2	PO	Mesilato del compuesto (I)	50	10

\*Nota: Las dosis administradas fueron mg de base libre/kg

5 Se precipitó proteína con 0,25 mL de acetonitrilo para plasma, 0,25 mL para cerebro. Después de la centrifugación, el sobrenadante se inyectó directamente en un sistema de EM/CL. El límite de cuantificación fue 1 ng/mL usando una alícuota de 50 µL para plasma y una alícuota de 50 µL para cerebro. La curva patrón fue 1 a 1.000 ng/mL para tanto plasma como cerebro.

Las condiciones de HPLC fueron del siguiente modo:

Sistema de HPLC:	Sistema Shimadzu SCL-10
Columna analítica:	Columna Aquasil C18 5 µm 100 x 2 mm
Temperatura de la columna:	Temperatura ambiente
Temperatura del inyector automático:	Temperatura ambiente
Fase móvil	A) Formiato de amonio 10 mM en agua (pH 4). B) Acetonitrilo
Caudal:	0,6 mL/min
Volumen de inyección:	2 µL

Gradiente:

Tiempo (minuto)	0,0	1,6	2,6	3,8	3,9	4,1	4,4	4,6	4,65	7,0
% de B	20	20	65	65	20	20	95	95	20	Parada

10 Las condiciones de espectrometría de masas fueron del siguiente modo:

Instrumento:	ABI Sciex API 4000
Modo:	ESI+
Experimento:	MRM (monitorización de múltiples reacciones)
Transiciones:	Compuesto (I): m/z 432,4→114,2 (Rt = 3,11 minuto)

Las cuatro tablas directamente a continuación muestran las concentraciones en plasma y cerebro después de la administración de una única dosis oral del compuesto (I) a 10 mg/kg y 50 mg/kg.

**Concentraciones plasmáticas del compuesto (I) (ng/mL) en ratones CD-1 macho después de una única dosis PO de 10 mg/kg (Grupo 1)**

Tiempo (h)	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Media	DE	% de CV
0	BLQ	BLQ	BLQ	0,00	0,00	NA
0,5	778,51	1096,62	737,37	870,83	196,62	22,58
1	516,97	328,28	243,96	363,07	139,79	38,50
2	328,47	271,89	261,57	287,31	36,02	12,54
5	133,38	147,74	160,62	147,25	13,63	9,26

NA: No aplicable.

BLQ: Por debajo del límite de cuantificación (1 ng/mL)

BLQ = 0 cuando se calcula la media, DE y % de CV

**Concentraciones en cerebro del compuesto (I) (ng/g) en ratones CD-1 macho después de una única dosis PO de 10 mg/kg (Grupo 1)**

Tiempo (h)	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Media	DE	% de CV
0	BLQ	BLQ	BLQ	0,00	0,00	NA
0,5	398,43	509,00	286,70	398,04	111,15	27,92
1	150,70	266,66	92,06	169,81	88,85	52,32
2	125,69	84,04	85,88	98,54	23,53	23,88
5	67,68	75,21	71,22	71,37	3,77	5,28

**5 Concentraciones plasmáticas del compuesto (I) (ng/mL) en ratones CD-1 macho después de una única dosis PO de 50 mg/kg (Grupo 2)**

Tiempo (h)	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Media	DE	% de CV
0	BLQ	BLQ	BLQ	0,00	0,00	NA
0,5	8511,88	8334,53	12315,31	9720,57	2248,85	23,13
1	2374,12	2442,20	1365,56	2060,62	602,91	29,26
2	1148,57	1546,09	1850,18	1514,95	351,84	23,22
5	424,48	1139,11	1201,91	921,83	431,86	46,85

**Concentraciones en cerebro del compuesto (I) (ng/g) en ratones CD-1 macho después de una única dosis PO de 50 mg/kg (Grupo 2)**

Tiempo (h)	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Media	DE	% de CV
0	BLQ	BLQ	BLQ	0,00	0,00	NA
0,5	2795,27	3190,42	5089,32	3691,67	1226,42	33,22
1	945,72	936,29	482,22	788,08	264,92	33,62
2	613,18	530,41	684,97	609,52	77,34	12,69
5	200,01	387,73	522,17	369,97	161,81	43,74

10

Los parámetros farmacocinéticos en cerebro y plasma del compuesto (I) en ratones después de una dosis única de 10 mg/kg (Grupo 1) son del siguiente modo:

ID de muestra	T <sub>máx</sub> (h)	C <sub>máx</sub> (ng/mL)	ABCúltima (ng·h/mL)
Cerebro	0,50	398	631
Plasma	0,50	871	1503

Nota: C<sub>máx</sub> en cerebro y ABCúltima son ng/g y ng·h/g, respectivamente.

La relación ABCúltima Cerebro/ ABCúltima Plasma es 0,42.

5 Los parámetros farmacocinéticos en cerebro y plasma del compuesto (I) en ratones después de una dosis única de 50 mg/kg (Grupo 2) son del siguiente modo:

ID de muestra	T <sub>máx</sub> (h)	C <sub>máx</sub> (ng/mL)	ABCúltima (ng·h/mL)
Cerebro	0,50	3692	4211
Plasma	0,50	9721	10818

Nota: C<sub>máx</sub> en cerebro y ABCúltima son ng/g y ng·h/g, respectivamente.

La relación ABCúltima Cerebro/ ABCúltima Plasma es 0,39.

#### Ejemplo 35 como referencia: Estudios de supervivencia con glioma

Se realizó un estudio de xenoinjerto de ratón de tumor cerebral que comparaba el compuesto (I) con Temodar®. Los estudios se realizaron en ratones C57BL/6. Se implantaron células de glioma GL261 ( $1 \times 10^5$  en 5 µl de DMEM) 10 coordenadas intracraneales: bregma, lateral 2,0 mm, anterior 1,2 mm, 3,0 mm profundidad dura. El tratamiento se inició 3 días después de la implantación. Los grupos fueron del siguiente modo (todas las dosis en 100 µl de H<sub>2</sub>O):

Vehículo (H <sub>2</sub> O)		
Compuesto (I) 2,5 mg/kg	dos veces al día oral	
Compuesto (I) 5 mg/kg	dos veces al día oral	
Temodar® 5 mg/kg	una vez a la semana oral	

La siguiente tabla muestra un resumen de los resultados. El intervalo de la mediana de la supervivencia y los resultados de la prueba estadística del rango logarítmico (Mantel-Cox) que comparan las distribuciones de supervivencia de las muestras.

	Vehículo	Compuesto (I) 2,5 mg/kg dos veces al día oral	Compuesto (I) 5 mg/kg dos veces al día oral	Temodar® 5 mg/kg semanalmente x 1 oral
<u>Intervalo de la mediana de la supervivencia:</u>	<b>22 21-25</b>	<b>25 22-36</b>	<b>23 22-29</b>	29 26-29
frente a vehículo		P=0,1062	P=0,1762	<u>P=0,0017</u>
frente a Temodar	<u>P=0,0017</u>	P=0,3649	P=0,1366	
frente al compuesto (I) 2,5 mg/kg				P=0,8901
frente al compuesto (I) 5 mg/kg				P=0,1366

Las Figuras 24 y 25 A-D muestran el aumento de peso en cada uno de los ratones C57BL/6 en los diferentes grupos de tratamiento. El peso promedio en el punto extremo para cada uno de los grupos de tratamiento se muestra en la tabla a continuación. La Figura 26 es un gráfico que muestra los pesos promedio durante un periodo de 40 días para cada uno de los grupos de tratamiento.

20 Peso promedio en el punto extremo

Vehículo		19,2 g
Compuesto (I)	2,5 mg/kg	16,0 g
Compuesto (I)	5 mg/kg	14,3 g
Temodar®	5 mg/kg	13,3 g

**Ejemplo 36 como referencia: Inhibición sinérgica del crecimiento celular usando una combinación**

5 Se probó la combinación del compuesto (I) y tamoxifeno *in vitro* para determinar la capacidad de la combinación para inhibir el crecimiento celular en células de cáncer de mama MCF-7. Se probó un intervalo de concentraciones por ensayo de MTT como se muestra a continuación. La primera columna corresponde a la concentración del compuesto (I).

(I) (nM)	Tamoxifeno (nM)	Fa	IC
10	50	0,325758	0,819
10	100	0,47365	0,915
25	50	0,3521	0,900
25	100	0,4937	0,906
50	50	0,3715	1,048
50	100	0,5326	0,852
75	100	0,6913	0,505
75	50	0,4196	0,948

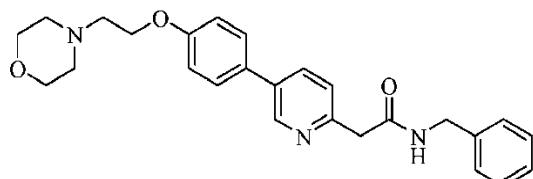
10 Se analizaron los datos del crecimiento celular de MTT por el software Calcusyn (Biosoft). Este programa usa el principio mediana-efecto (77) para delinear la interacción entre dos fármacos. Para cada combinación de dosis, el programa genera un índice de combinación (IC). Un índice de combinación (IC) de <1, 1 o >1 indica sinergia, aditividad o antagonismo, respectivamente. La Figura 27 muestra efectos inhibidores del crecimiento sinérgico con tamoxifeno 100 nM + compuesto (I) 75 nM. Se calculó que el valor de IC para esta combinación era 0,505.

## REIVINDICACIONES

1. Una combinación de:

(a) una composición farmacéutica que comprende

(i) compuesto (I):



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y

(ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable,

en donde el compuesto está presente en una cantidad que varía desde 10 mg hasta 300 mg por dosis, y  
10 en donde la composición se formula para administración oral, intravenosa, intramuscular o subcutánea dos o tres veces al día;

y

(b) gemcitabina;

para uso simultáneo o secuencial en el tratamiento de un cáncer o trastorno de proliferación celular.

2. La combinación para su uso según la reivindicación 1, en donde la cantidad es desde 20 mg hasta 250 mg.

15 3. La combinación para su uso según la reivindicación 2, en donde la cantidad es desde 40 mg hasta 200 mg.

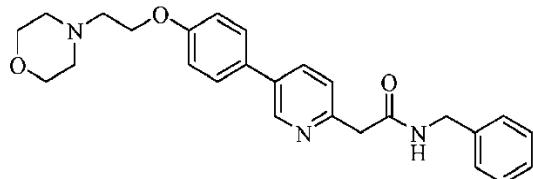
4. La combinación para su uso según la reivindicación 3, en donde la cantidad es 40 mg.

5. La combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la composición farmacéutica es para administración dos veces al día.

6. Una combinación de

20 (a) una composición farmacéutica que comprende

(i) compuesto (I):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y

(ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable,

25 en donde el compuesto está presente en una cantidad que varía desde 20 mg hasta 600 mg por dosis, y en donde la composición se formula para administración oral, intravenosa, intramuscular o subcutánea una vez al día;

y

(b) gemcitabina;

30 para uso simultáneo o secuencial en el tratamiento de un cáncer o trastorno de proliferación celular.

7. La combinación para su uso según la reivindicación 6, en donde la cantidad es desde 40 mg hasta 500 mg.

8. La combinación para su uso según la reivindicación 7, en donde la cantidad es desde 80 mg hasta 400 mg.

9. La combinación para su uso según la reivindicación 6, en donde la cantidad es 80 mg.

10. La combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la composición farmacéutica comprende la sal de mesilato del compuesto (I).
- 5 11. La combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde dicho cáncer o trastorno de proliferación celular es cáncer seleccionado de cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer de colon, leucemia, cáncer de ovario, cáncer epitelial, cáncer de esófago, un tumor maligno avanzado, un tumor sólido y linfoma.
12. La combinación para su uso según la reivindicación 11, en donde el cáncer es leucemia.

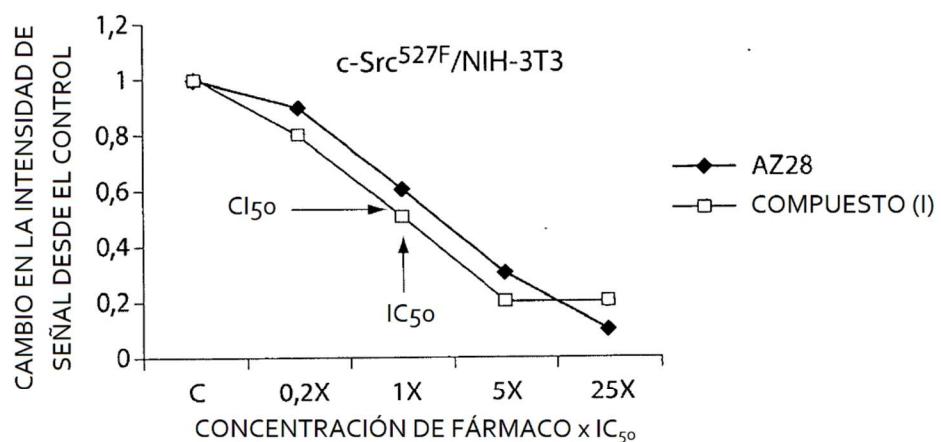


Fig. 1A

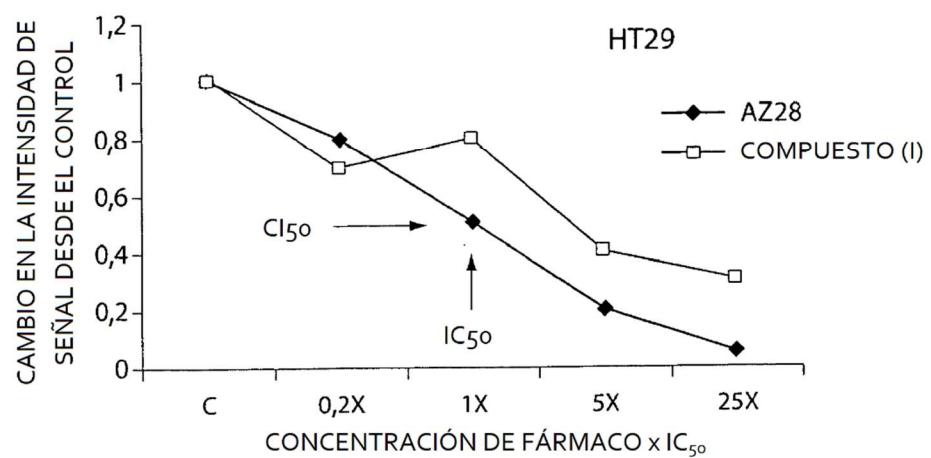


Fig. 1B

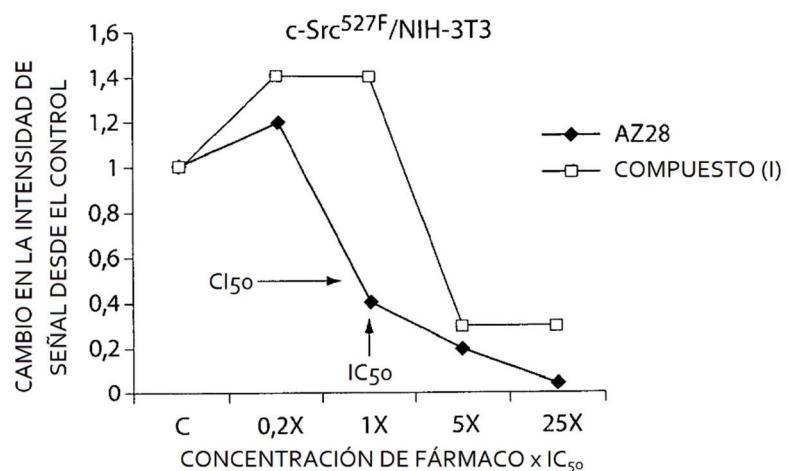


Fig. 2A

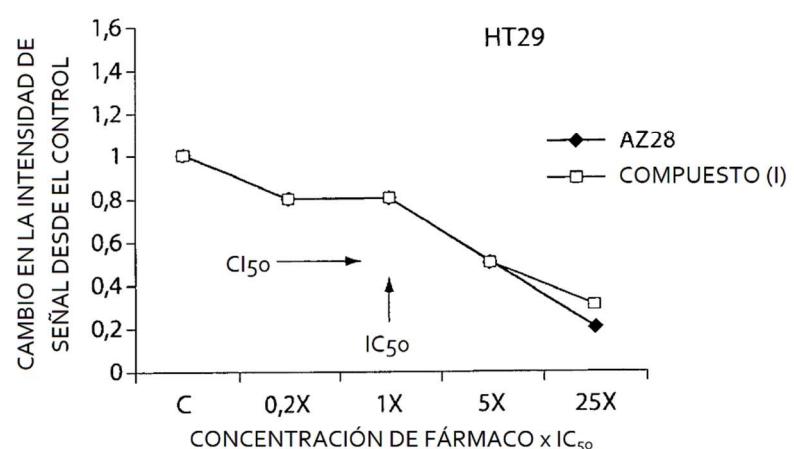


Fig. 2B

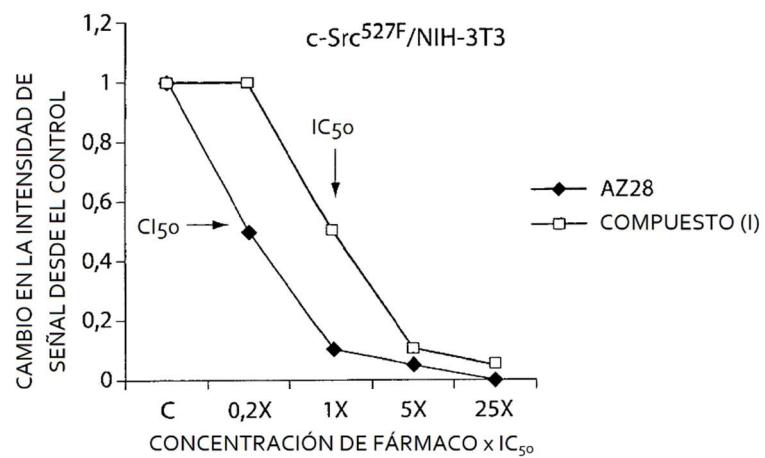


Fig. 3A

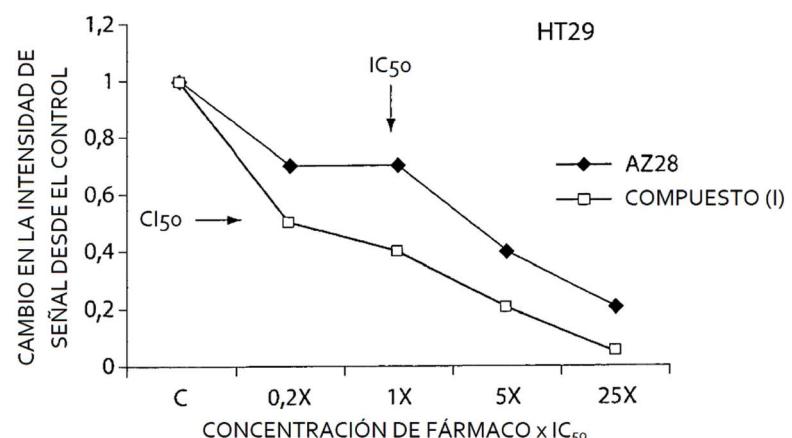


Fig. 3B

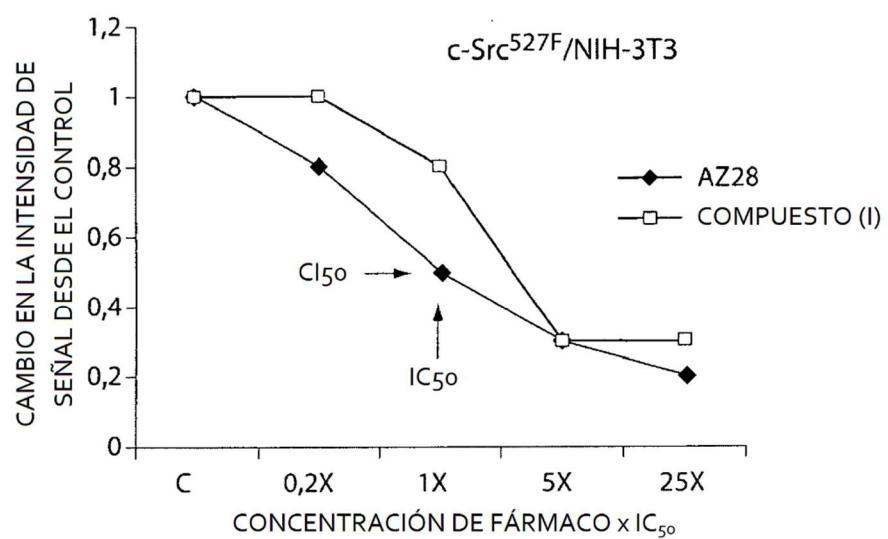


Fig. 4

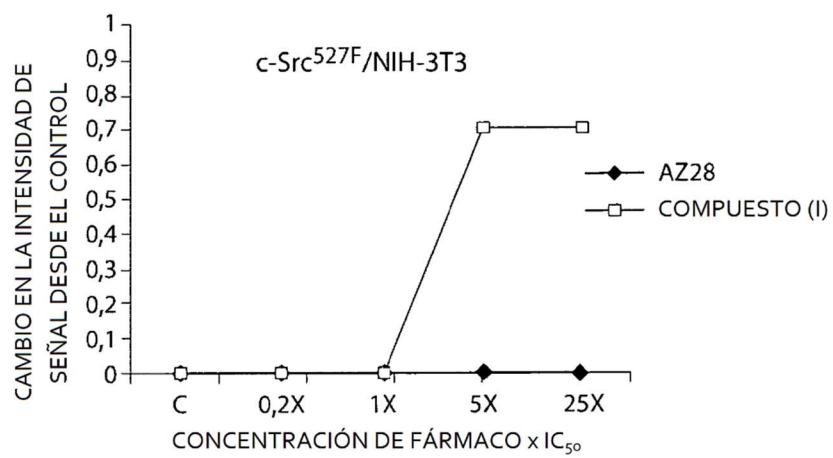


Fig. 5A

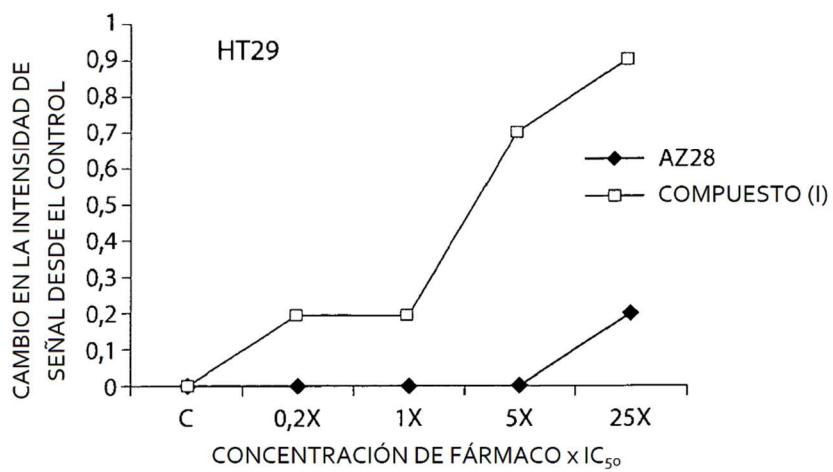


Fig. 5B

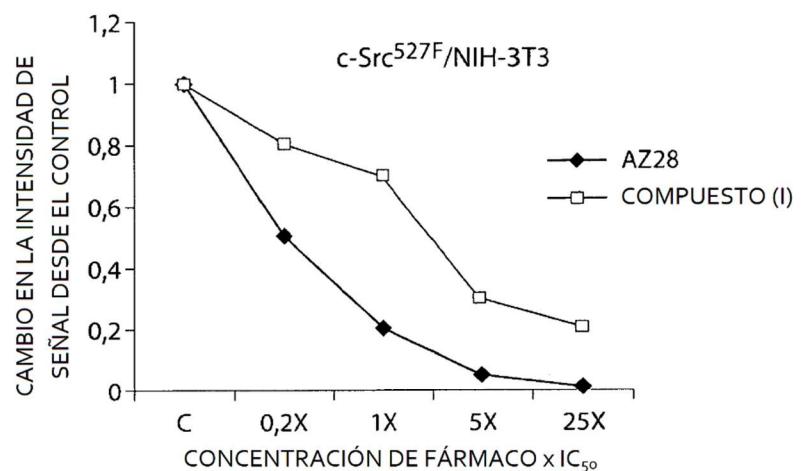


Fig. 6A

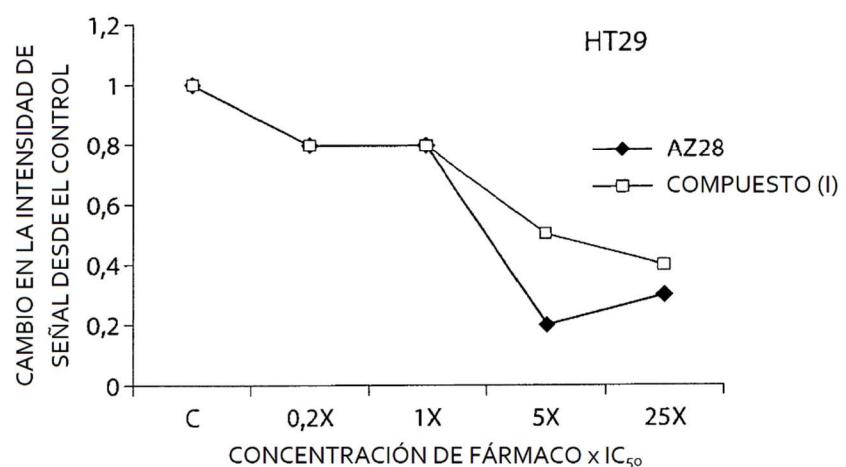


Fig. 6B

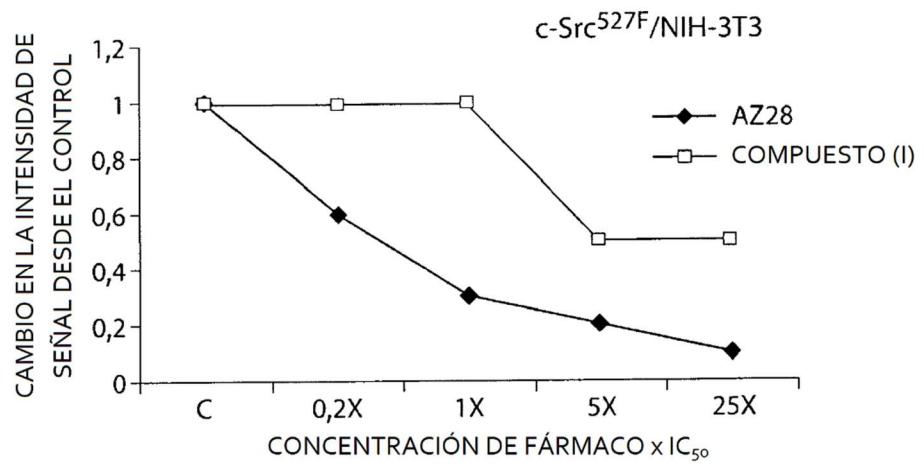


Fig. 7

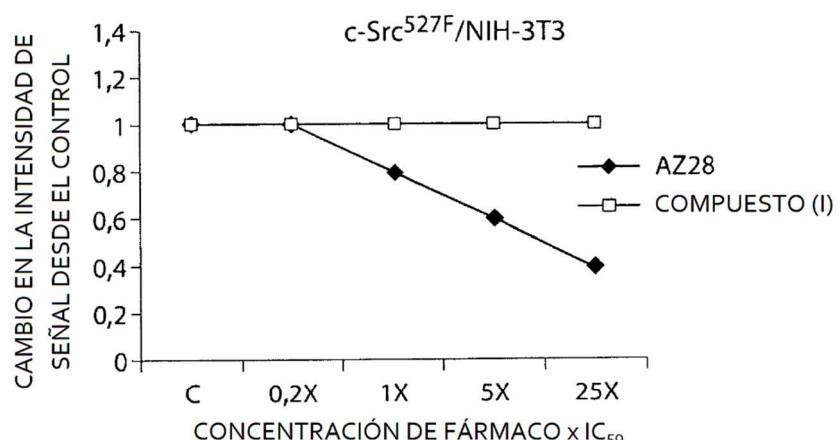


Fig. 8A

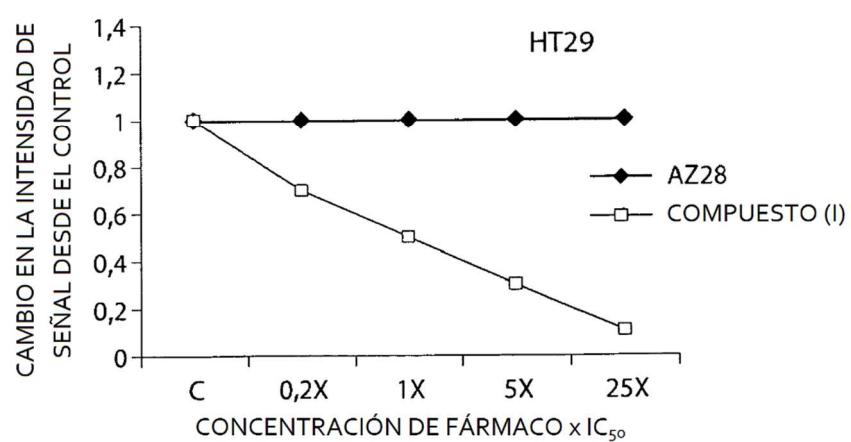


Fig. 8B

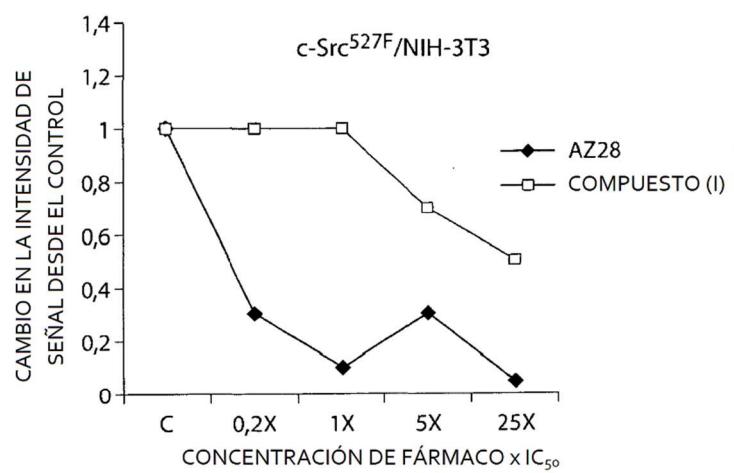


Fig. 9A

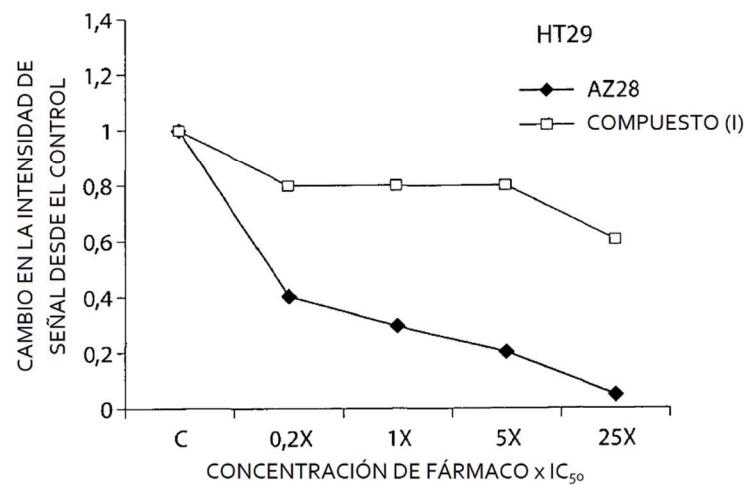


Fig. 9B

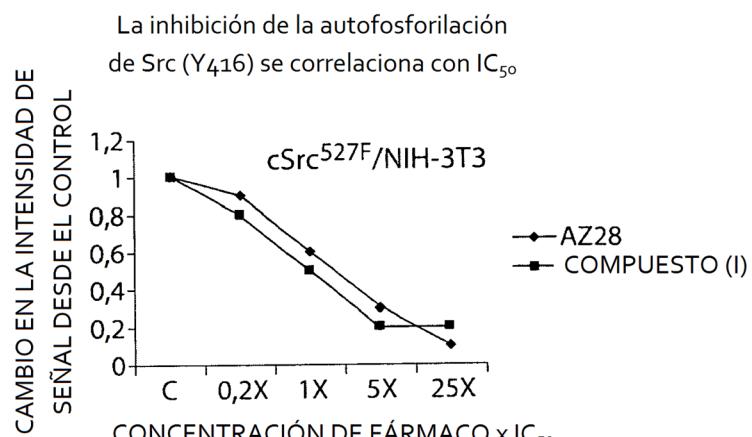


Fig. 10A

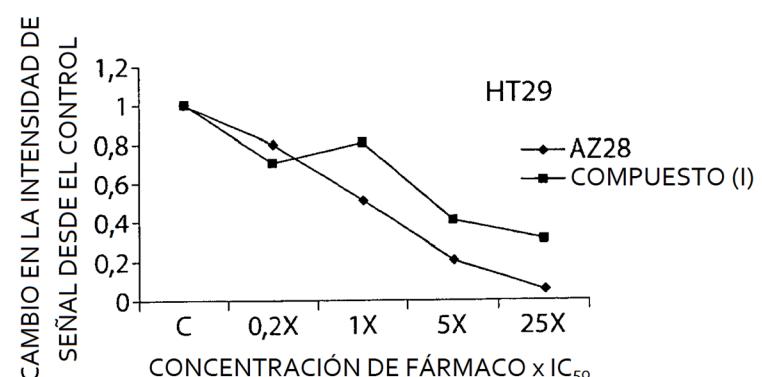


Fig. 10B

La inhibición de la transfosforilación de Src de Shc  
Y239/240 se correlaciona con IC<sub>50</sub>

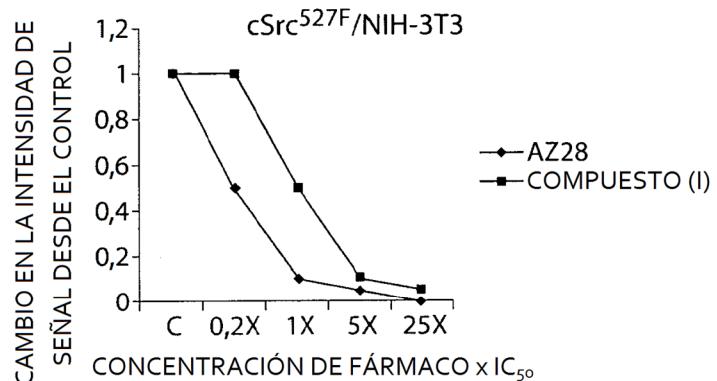


Fig. 10C

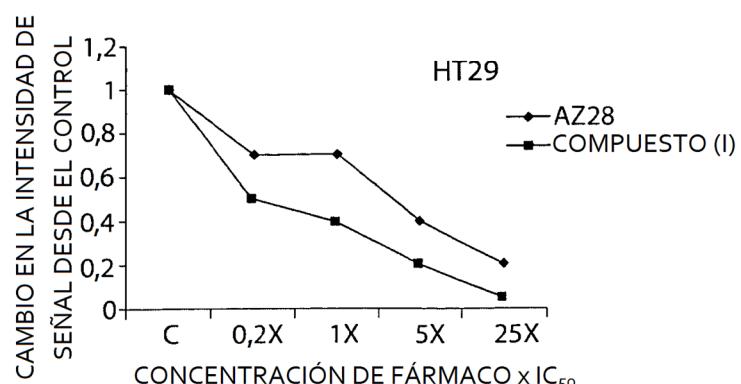
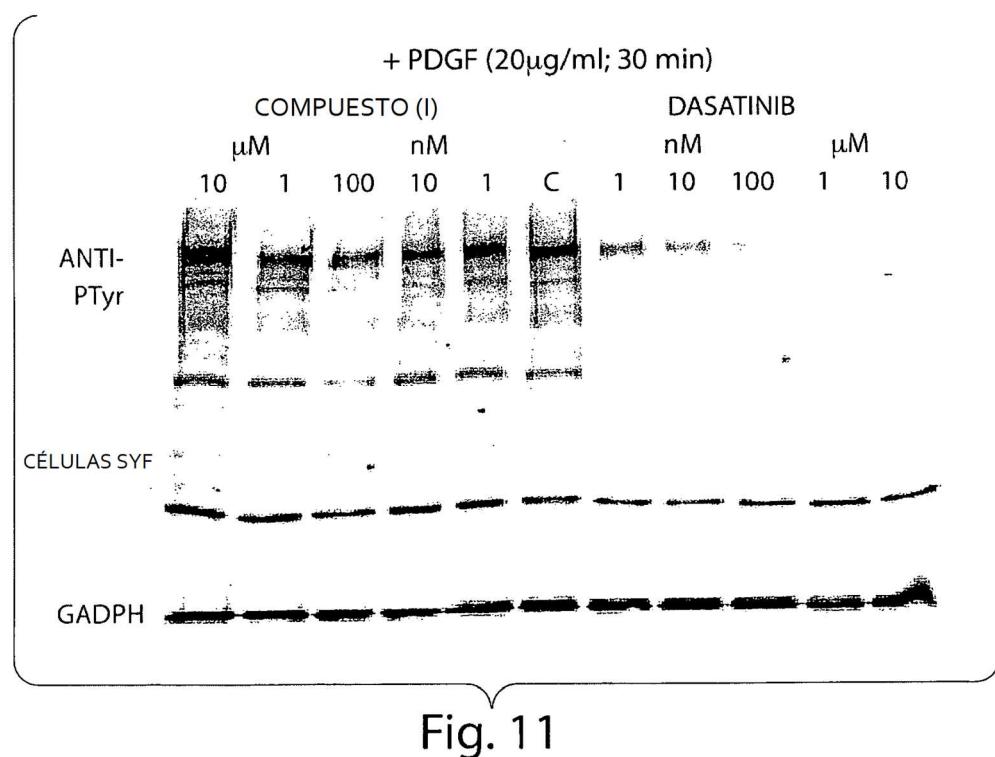


Fig. 10D



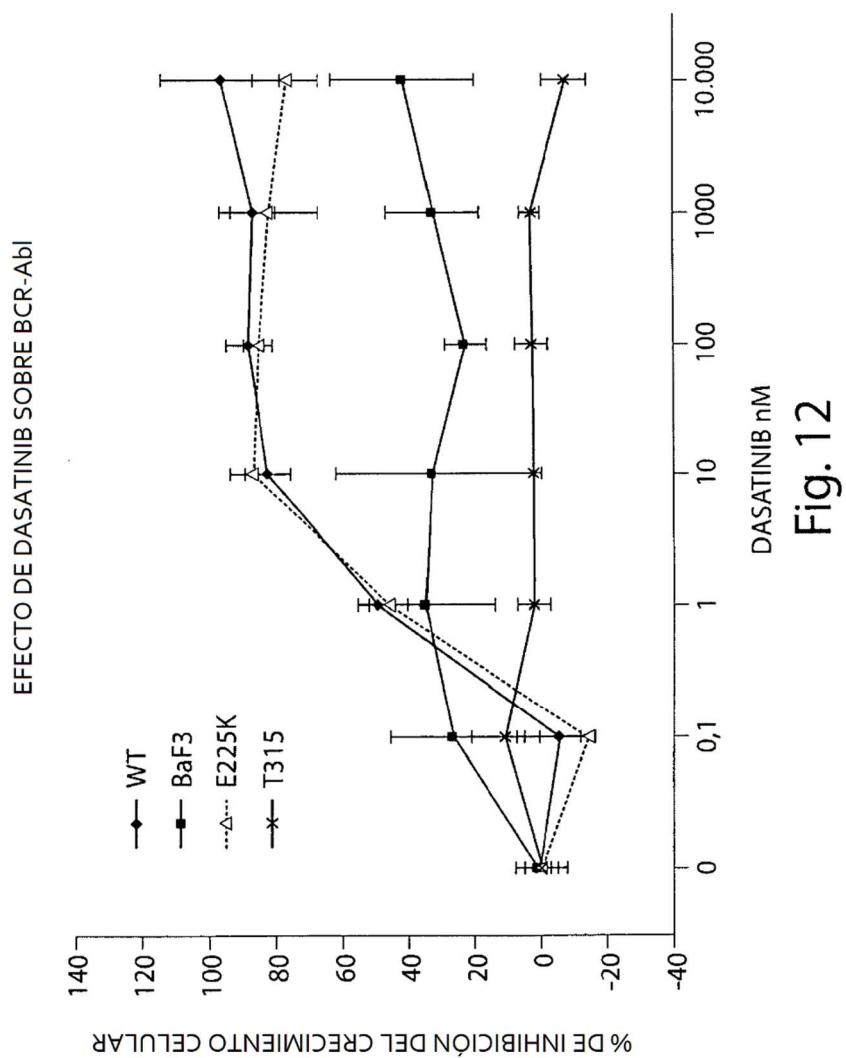
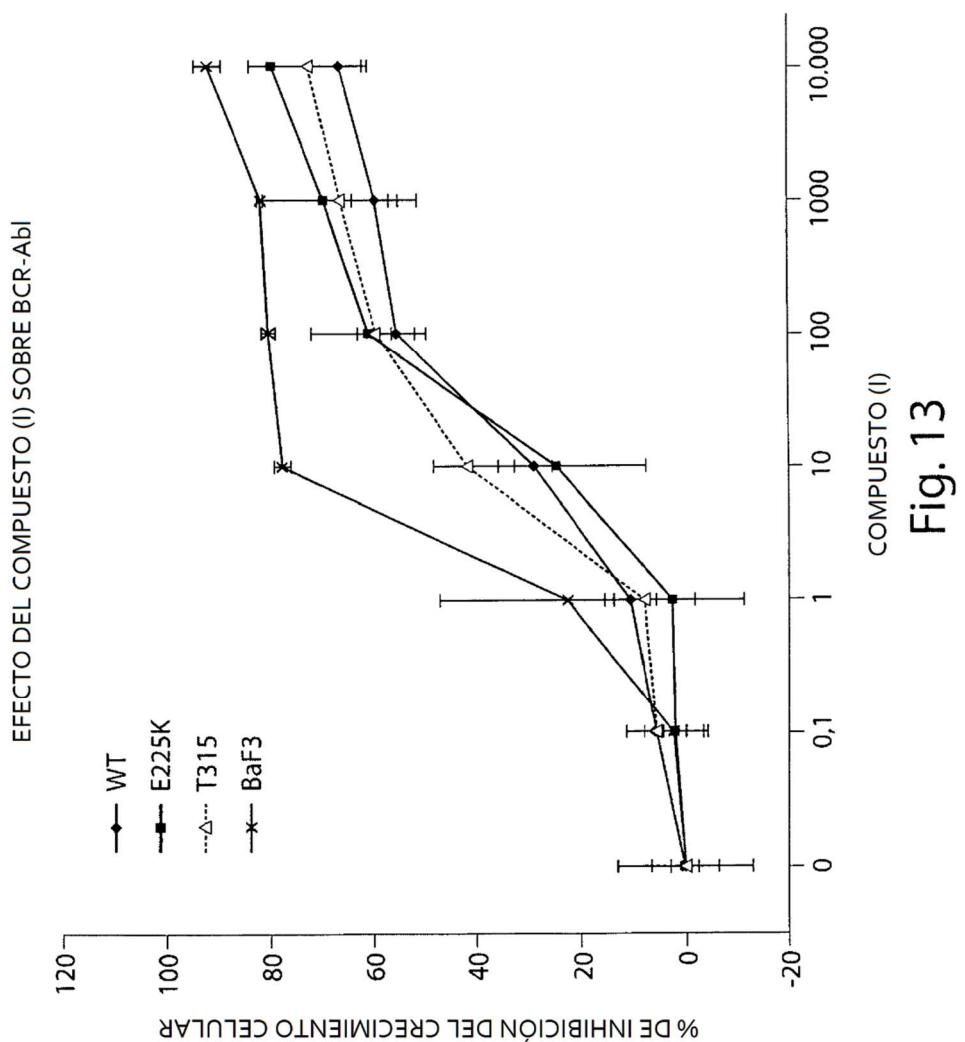


Fig. 12



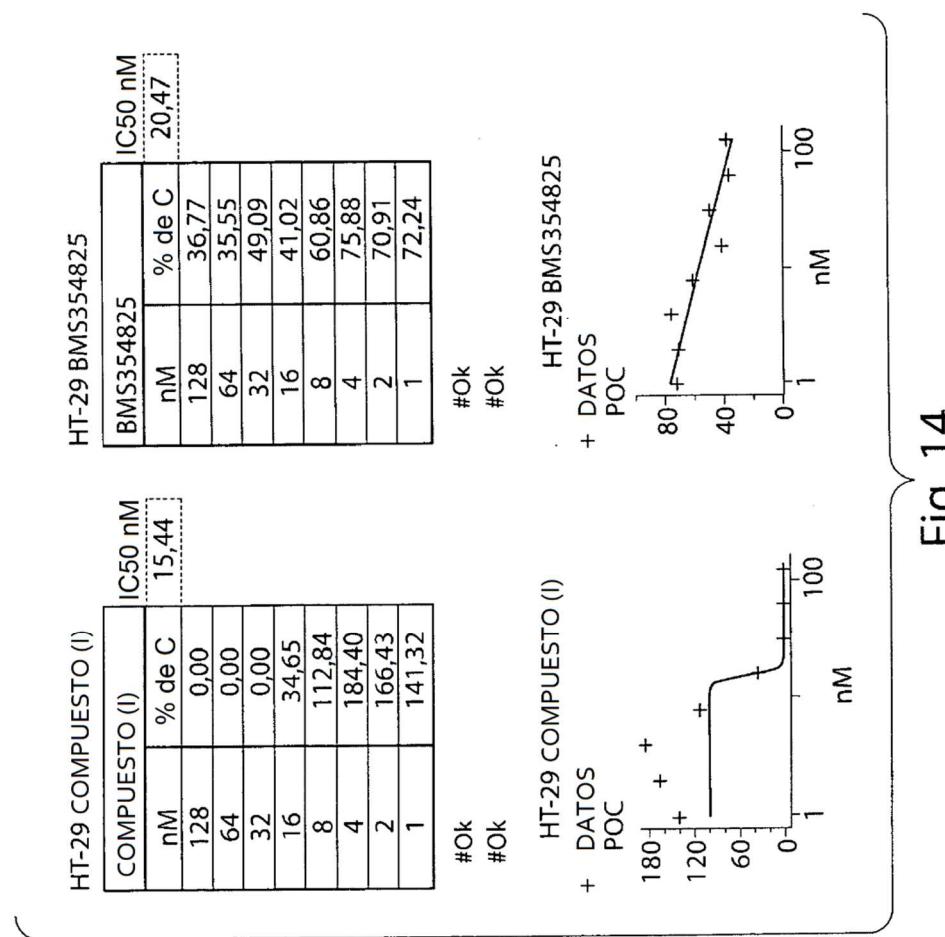
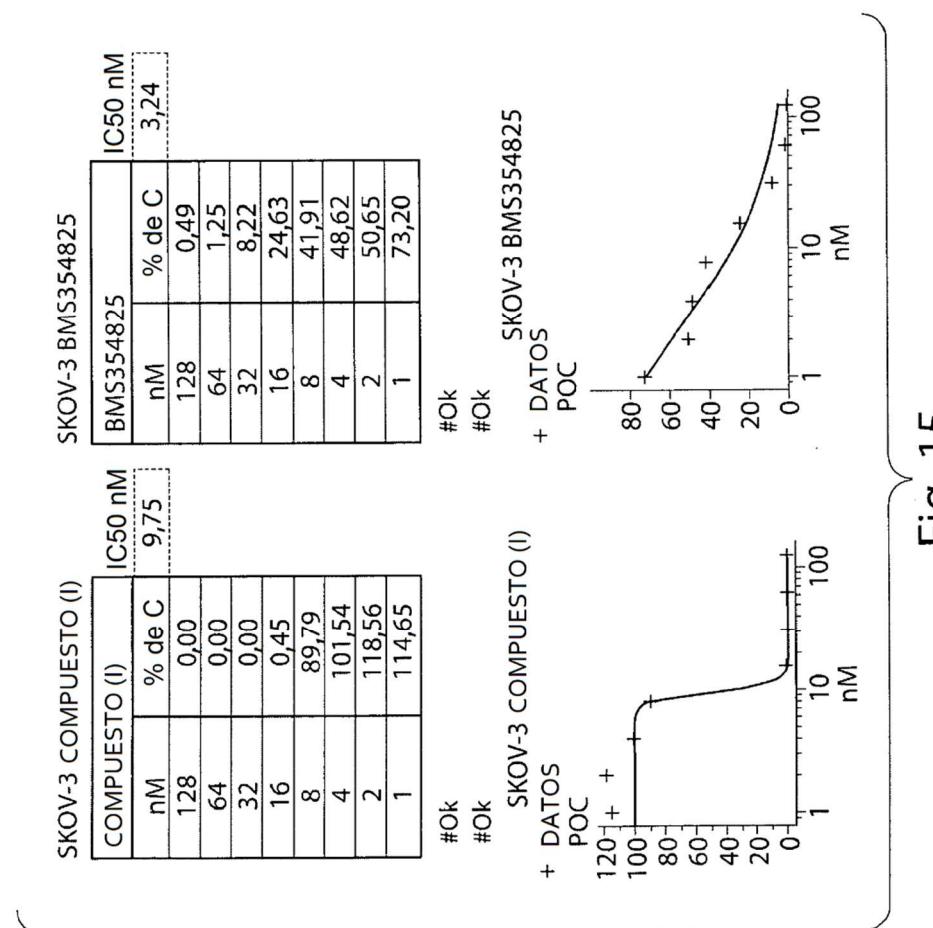
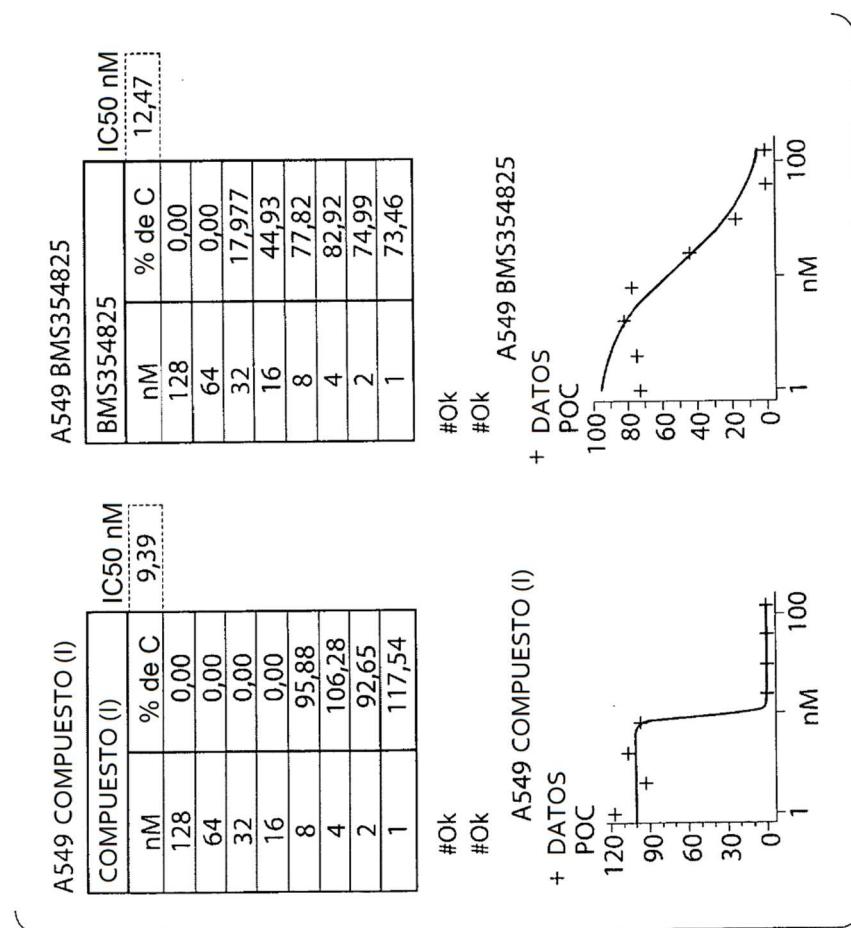
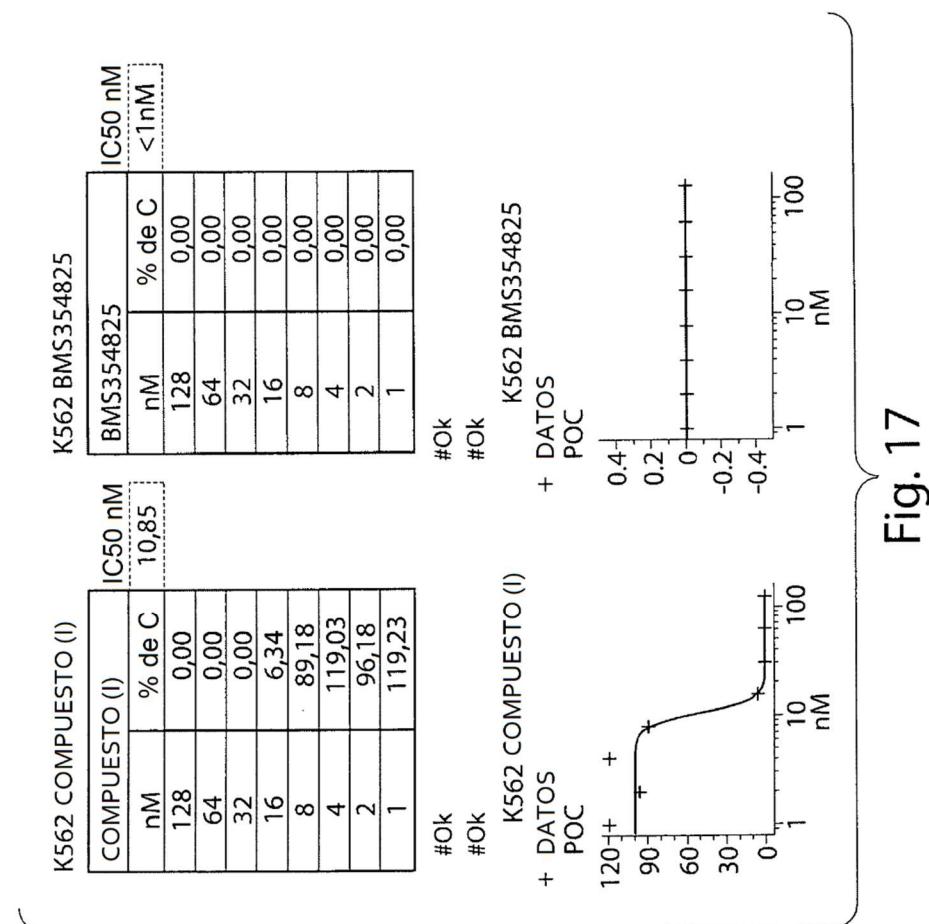
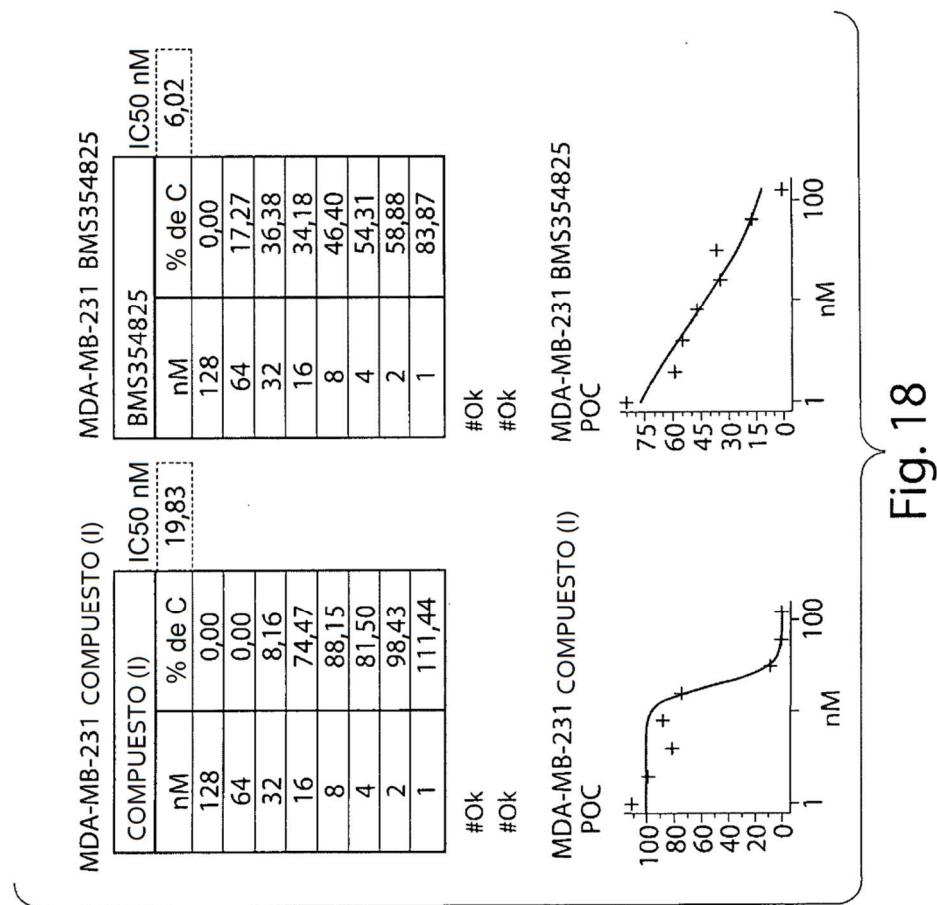


Fig. 14









## DATOS DE MUESTRAS COMBINADAS

L3.6pl MUESTRAS COMBINADAS

GEMZAR		COMP (I)	GEMZAR COMP (I)
nM	% de G	nm	nM
8	0,00	100	0,09
4	0,00	50	1,15
2	0,00	25	
1	0,00	12,5	
0,5	0,00	6,25	
0,25	10,02	3,12	
0,125	32,43	1,56	
0,0625	82,43	0,78	

#Ok

#Ok

#Ok

L3.6pl MUESTRAS COMBINADAS

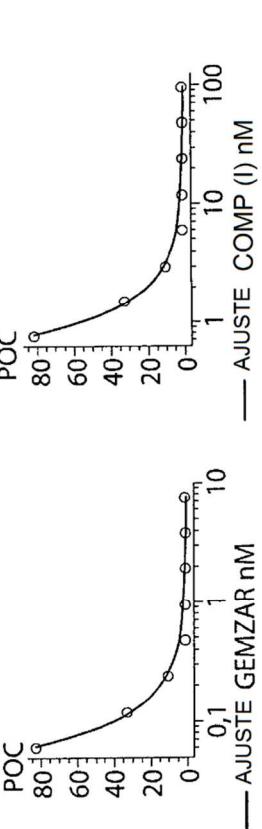


Fig. 19

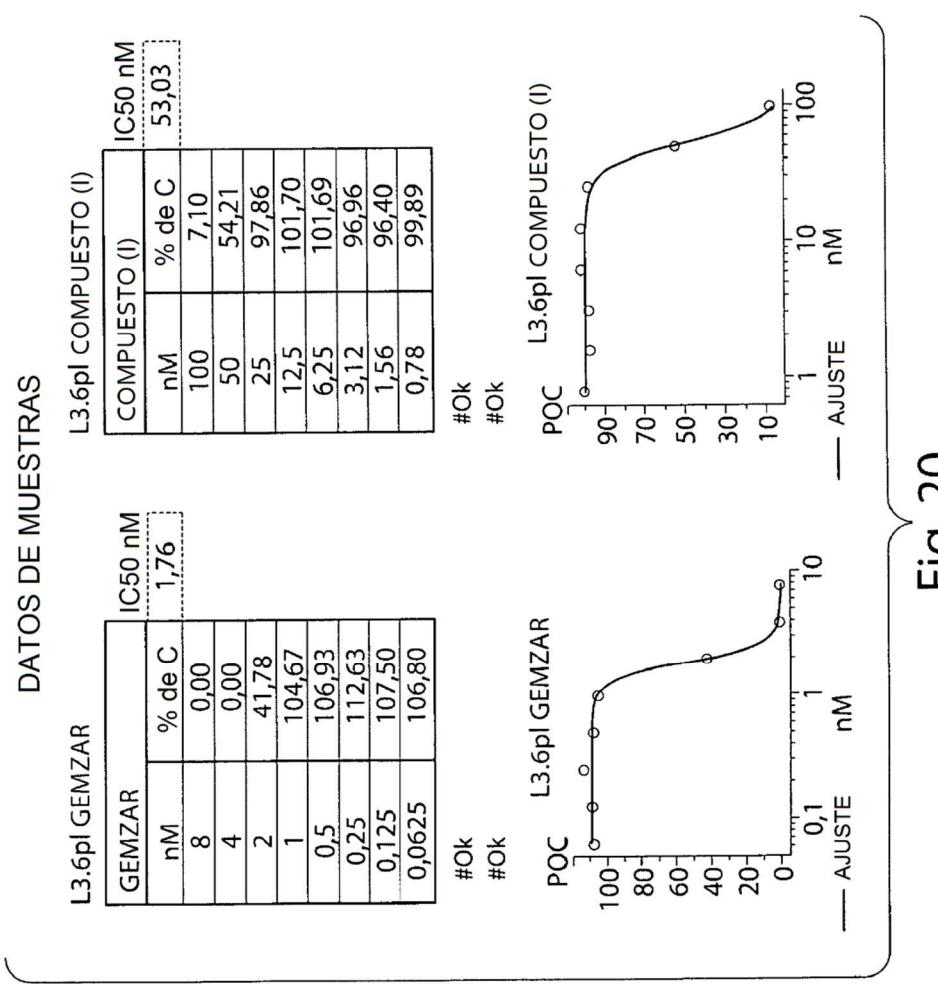


Fig. 20

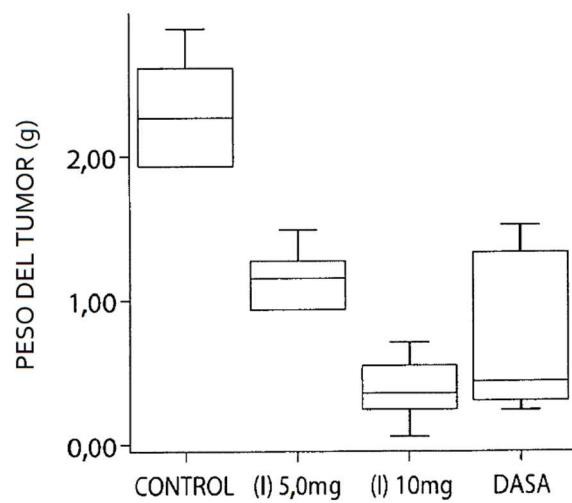


Fig. 21

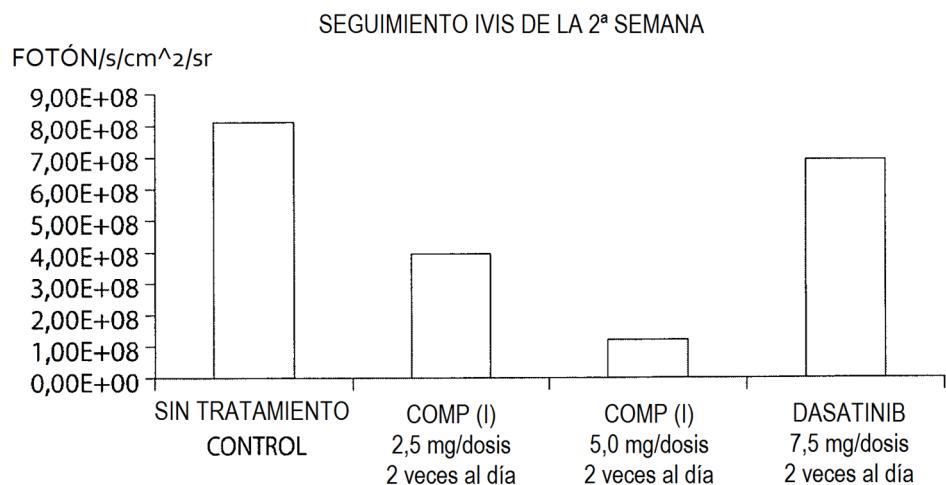


Fig. 22

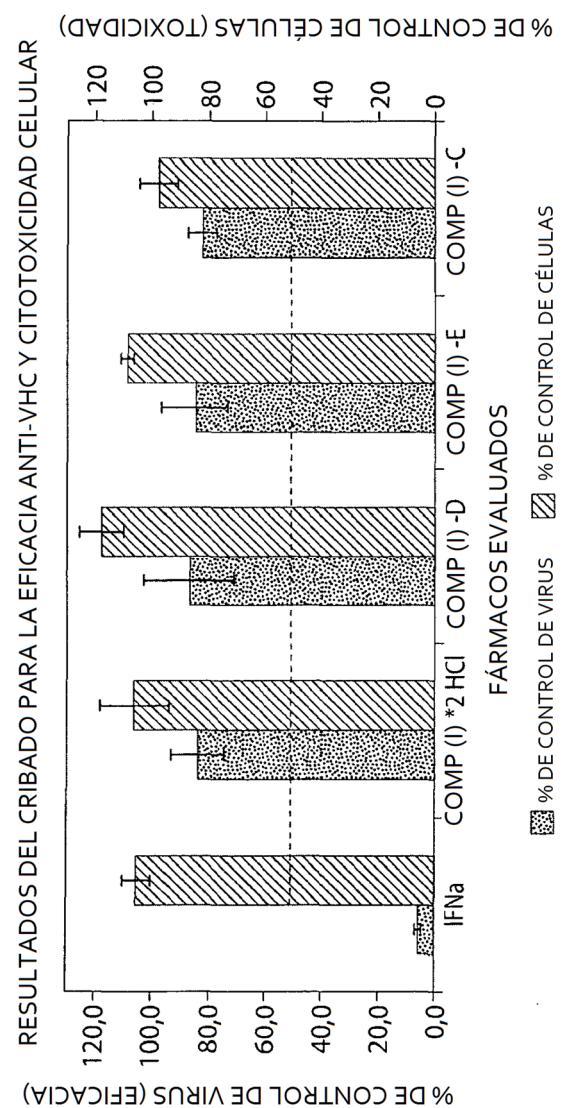


Fig. 23

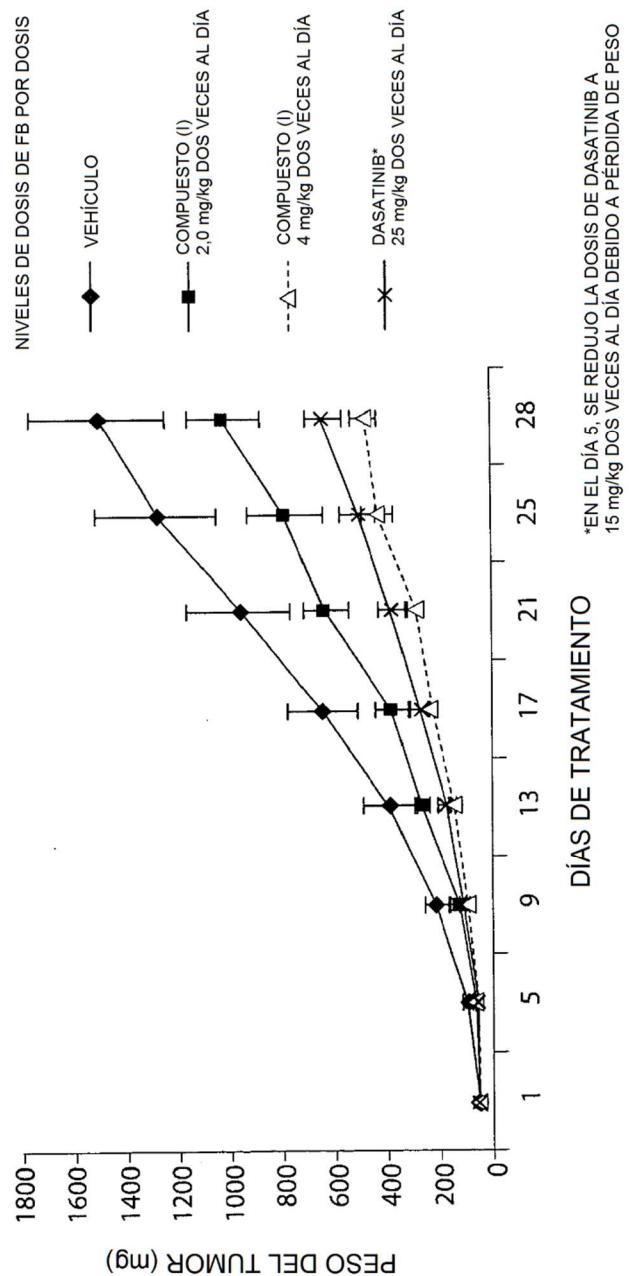


Fig. 24

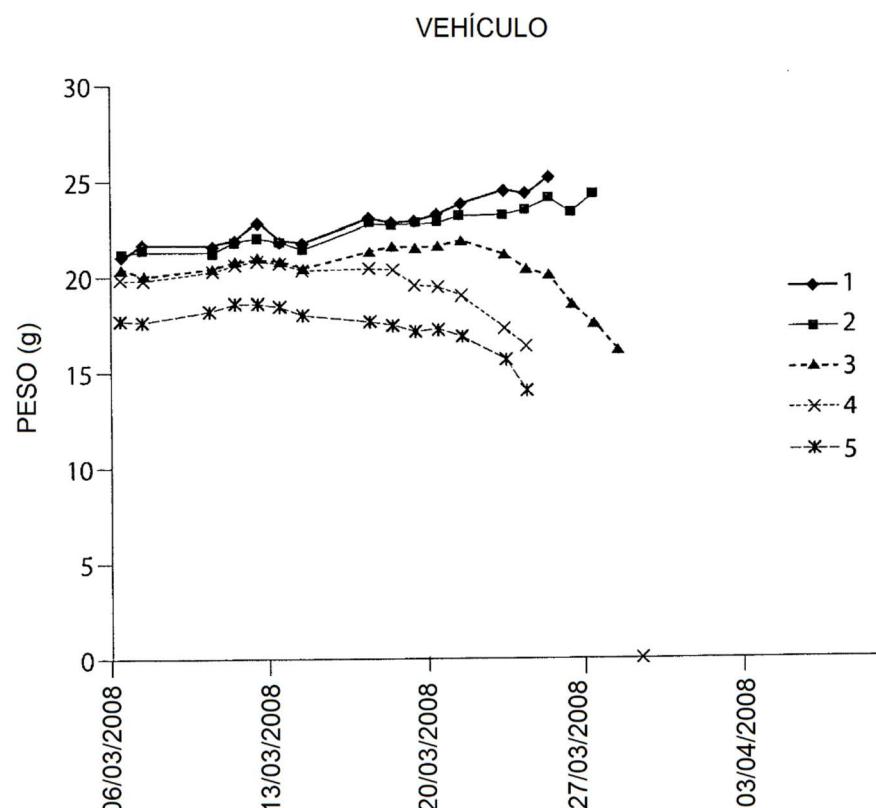


Fig. 25A

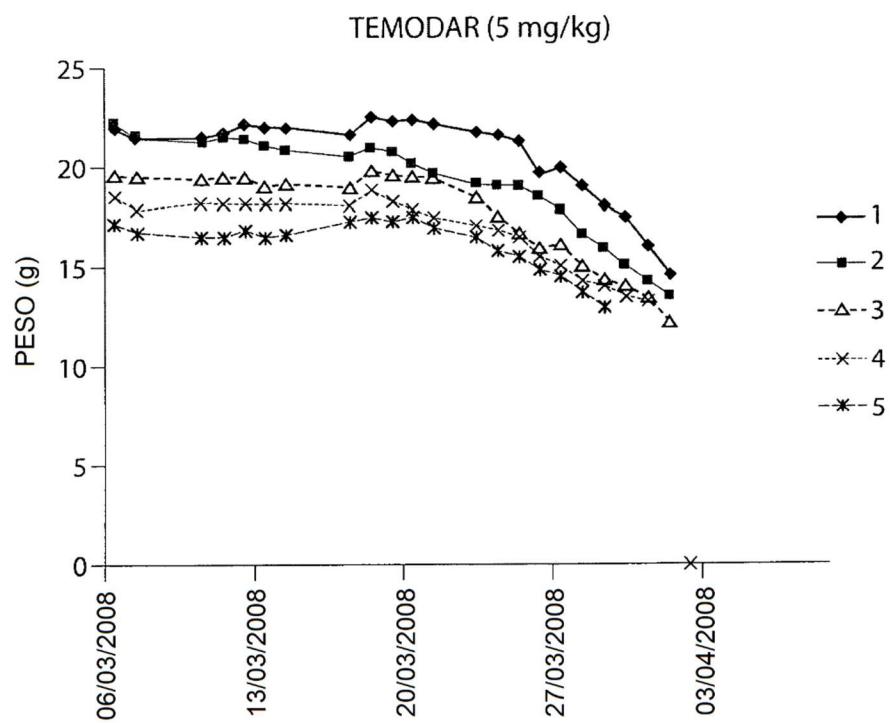


Fig. 25B

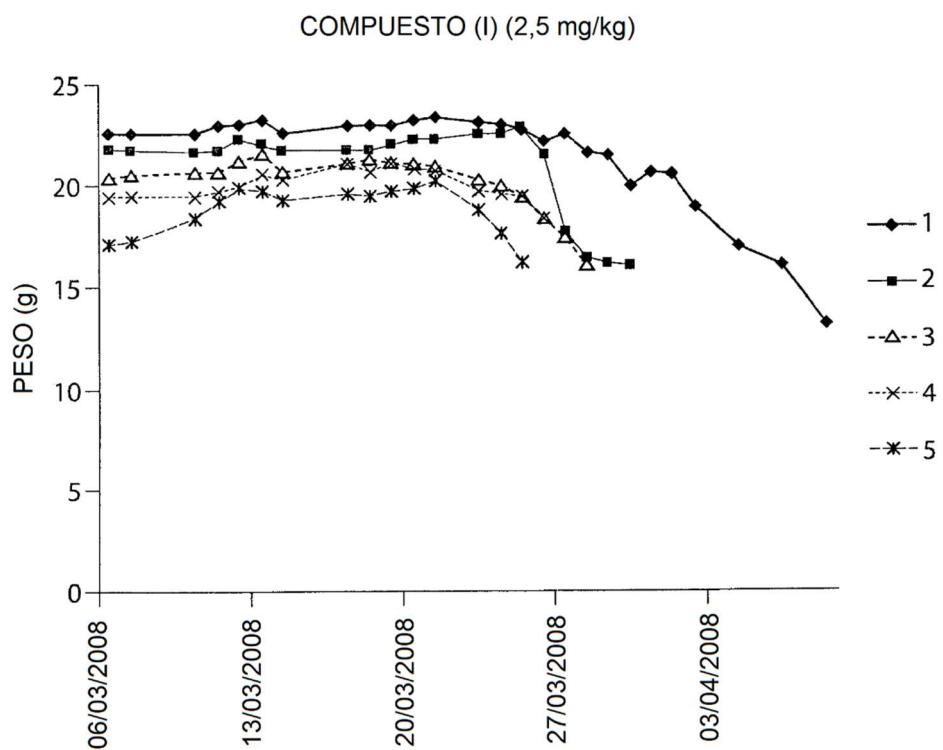


Fig. 25C

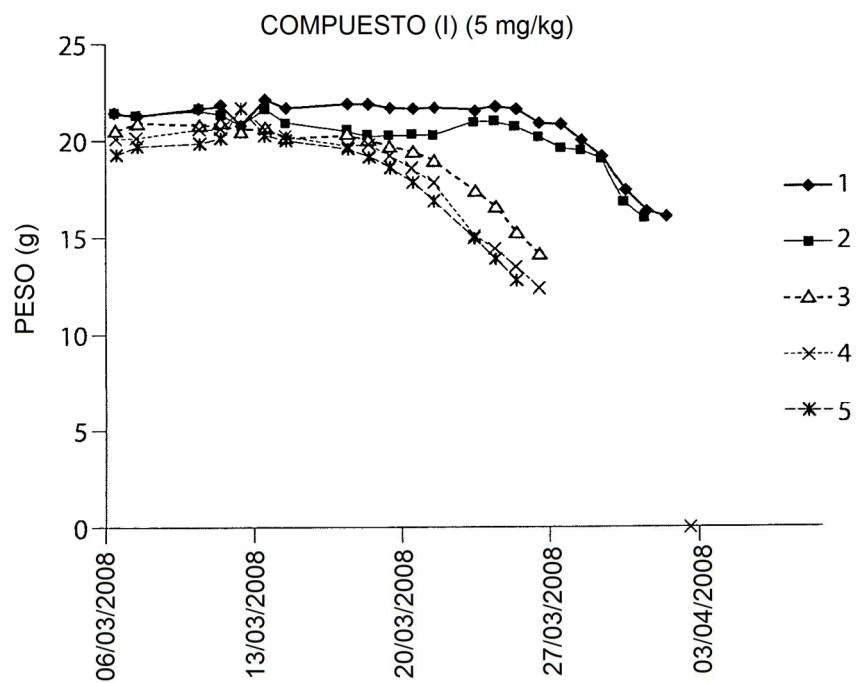


Fig. 25D

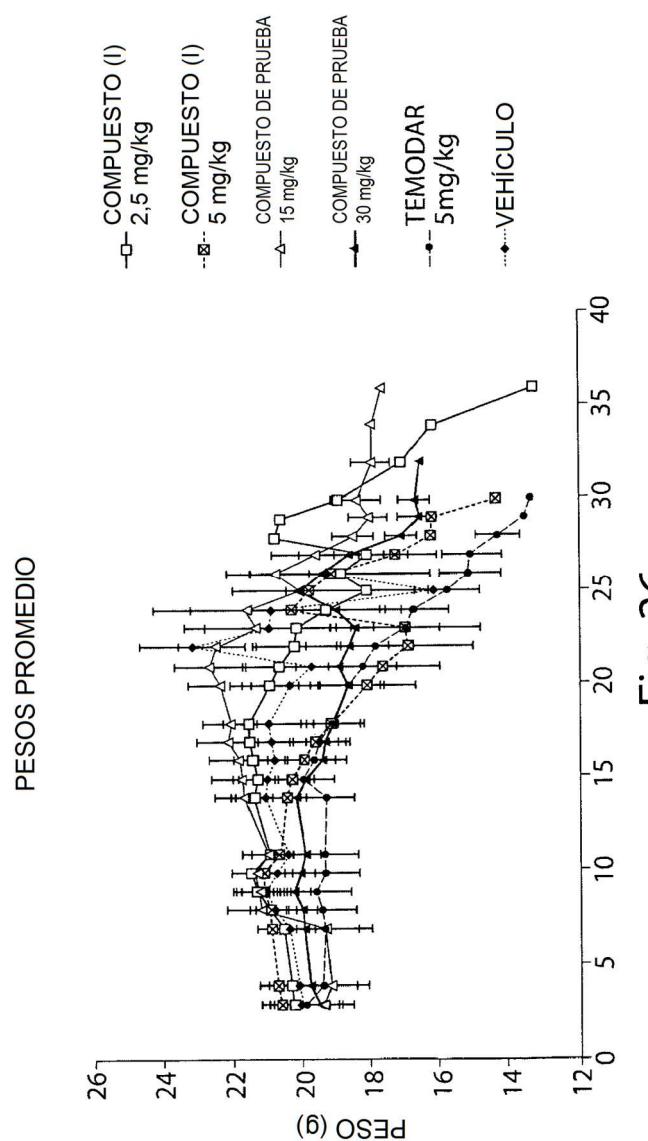


Fig. 26

## EFECTO INHIBIDOR DEL CRECIMIENTO DE TAMOXIFENO Y EL COMPUESTO (I) SOBRE CÉLULAS MCF-7 POR ENSAYO DE MTT

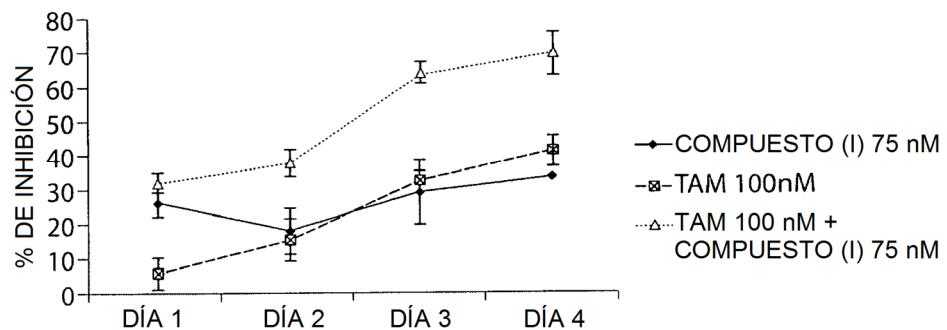


Fig. 27