



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 284 887**

51 Int. Cl.:
A61K 31/415 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02746764 .6**

86 Fecha de presentación : **01.07.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1408950**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.04.2004**

54 Título: **Métodos para tratar enfermedades transmitidas por citocinas.**

30 Prioridad: **11.07.2001 US 304511 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

73 Titular/es:
Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals Inc.
900 Ridgebury Road, P.O. Box 368
Ridgefield, Connecticut 06877-0368, US

72 Inventor/es: **Moss, Neil y**
Regan, John, R.

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Métodos para tratar enfermedades transmitidas por citocinas.

5 **Ámbito técnico de la presente invención**

La presente invención se refiere a métodos para el tratamiento del cáncer.

10 **Antecedentes de la presente invención**

En la patente WO 00/43384 se describen compuestos heterocíclicos aromáticos que son útiles para el tratamiento de ciertas enfermedades transmitidas por citocinas. El factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleucina-1 (IL-1) son entidades biológicas importantes, llamadas colectivamente citocinas proinflamatorias. Estas, junto con diversas moléculas afines, intervienen en la respuesta inflamatoria asociada al reconocimiento inmunológico de agentes infecciosos. La respuesta inflamatoria tiene un papel importante en la limitación y en el control de las infecciones patógenas.

Los niveles altos de citocinas proinflamatorias también están relacionados con varias enfermedades autoinmunes, tales como el síndrome del choque tóxico, la artritis reumatoide, la osteoartritis, la diabetes y las dolencias inflamatorias del intestino (Dinarello, C.A., y otros, 1984, *Rev. Infect. Disease* 6:51). En estas enfermedades el aumento crónico de la inflamación exacerba o causa gran parte de la patofisiología observada. Por ejemplo, el tejido sinovial reumatoide es invadido por células inflamatorias, que destruyen el cartílago y el hueso (Koch, A.E., y otros, 1995, *J. Invest. Med.* 43: 28-38). Los estudios sugieren que las alteraciones inflamatorias transmitidas por la citocinas pueden estar implicadas en la patogénesis de la restenosis posterior a una angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA) (Tashiro, H., y otros, 2001 Mar, *Coron Artery Dis* 12(2): 107-13). Un enfoque terapéutico importante y aceptado, para poder intervenir con fármacos en estas enfermedades, es la reducción de citocinas proinflamatorias tales como TNF (también designada como TNF α en su forma secretada, libre de células) y IL-1 β . Actualmente hay varias terapias anticitocina en fase de ensayos clínicos. Su eficacia ha sido demostrada con un anticuerpo monoclonal dirigido contra TNF α en una serie de enfermedades autoinmunes (Heath, P., "CDP571: una IgG4 humana producida por ingeniería genética como anticuerpo anti-TNF α " Reunión IBC sobre Antagonistas de citocinas, Filadelfia, PA, 24-5 de abril de 1997), incluyendo el tratamiento de la artritis reumatoide, de la enfermedad de Crohn y de la colitis ulcerosa (Rankin, E.C.C., y otros, 1997, *British J. Rheum.* 35: 334-342 y Stack, W.A. y otros, 1997, *Lancet* 349: 521-524). Se cree que el anticuerpo monoclonal funciona fijándose tanto al TNF α soluble como al TNF α unido a la membrana.

Por ingeniería genética se ha producido un receptor de TNF α soluble que interactúa con TNF α . El enfoque es similar al descrito arriba para anticuerpos monoclonales dirigidos contra TNF α ; ambos agentes se fijan al TNF α soluble, disminuyendo así su concentración. Una versión de esta construcción, llamada Enbrel (Immunex, Seattle, WA) demostró recientemente su eficacia en un ensayo clínico de fase III para el tratamiento de artritis reumatoide (Brower y otros, 1997, *Nature Biotechnology* 15: 1240). Otra versión del receptor de TNF α , Ro 45-2081 (Hoffman-La Roche Inc., Nutley, NJ), ha demostrado su eficacia en varios modelos animales de inflamación pulmonar alérgica y de lesión pulmonar aguda. El Ro 45-2081 es una molécula recombinante quimérica formada a partir del receptor de TNF humano soluble de 55 kDa unido a la región bisagra del gen de cadena pesada de la IgG1 y expresado en células eucariotas (Renzetti y otros, 1997, *Inflamm. Res.* 46: S143).

La IL-1 ha sido implicada como molécula de efecto inmunológico en un gran número de procesos patológicos. El antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra) se había examinado en ensayos clínicos humanos. Se ha demostrado la eficacia para el tratamiento de la artritis reumatoide (Anril, de Amgen). En un ensayo clínico humano en fase III, el IL-1ra redujo la tasa de mortalidad en pacientes con síndrome de choque séptico (Dinarello, 1995, *Nutrition* 11, 492). La osteoartritis es una enfermedad de evolución lenta, que se caracteriza por la destrucción del cartílago articular. La IL-1 se detecta en el líquido sinovial y en la matriz cartilaginosa de las articulaciones osteoartíticas. Se ha demostrado que los antagonistas de la IL-1 disminuyen la degradación de los componentes de la matriz cartilaginosa en varios modelos experimentales de artritis (Chevalier, 1997, *Biomed Pharmacother.* 51, 58). El óxido nítrico (NO) es un mediador de la homeostasis cardiovascular, de la neurotransmisión y de la función inmune; recientemente se ha demostrado que tiene efectos importantes en la modulación de la remodelación ósea. Las citocinas tales como la IL-1 y el TNF son potentes estimuladores de la producción de NO. El NO es una molécula reguladora importante en el hueso, con efectos en las células del linaje osteoblástico y del linaje osteoclástico (Evans y otros, 1996, *J Bone Miner Res.* 11, 300). El fomento de la destrucción de células beta, que conduce a la diabetes mellitus dependiente de insulina, demuestra dependencia de la IL-1. Parte de este daño puede ser transmitido mediante otros efectores, tales como prostaglandinas y tromboxanos. La IL-1 puede efectuar este proceso controlando el nivel de ciclooxigenasa II y de la expresión de sintetasa inducible de óxido nítrico (McDaniel y otros, 1996, *Proc Soc Exp Biol Med.* 211, 24).

Se supone que los inhibidores de la producción de citocinas bloquean la expresión de la ciclooxigenasa inducible (COX-2). Se ha demostrado que las citocinas incrementan la expresión de la COX-2 y se cree que la isoforma de la ciclo-oxygenasa es responsable de la inflamación (M.K. O'Banion y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1992, 89, 4888). Por lo tanto cabría esperar que los inhibidores de citocinas, tales como la IL-1, fueran eficaces contra los trastornos tratados actualmente con inhibidores de COX como los conocidos NSAIDs. Estos trastornos incluyen el dolor agudo y crónico, así como síntomas de inflamación y enfermedad cardiovascular.

Se ha demostrado el aumento de varias citocinas durante la fase activa de la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD). Los pacientes con IBD presentan un desequilibrio entre IL-1 e IL-1ra en la mucosa intestinal. La producción insuficiente de IL-1ra endógena puede contribuir a la patogénesis de la IBD (Cominelli y *otros*, 1996, *Aliment Pharmacol Ther.* 10, 49). La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la presencia de depósitos de proteína beta-amiloide, complicaciones neurofibrilares y disfunción colinérgica a lo largo de la región del hipocampo. El daño estructural y metabólico encontrado en la enfermedad de Alzheimer se debe probablemente a un incremento sostenido de IL-1 (Holden y *otros*, 1995, *Med Hypotheses*, 45, 559). En la patogénesis del virus de inmunodeficiencia humana (HIV) se ha identificado un papel para la IL-1. Se observó una clara relación del IL-1ra con episodios de inflamación aguda y también con varias fases de la enfermedad en la patofisiología de la infección por HIV (Kreuzer y *otros*, 1997, *Clin Exp Immunol.* 109, 54). Tanto la IL-1 como el TNF están implicados en la patología periodontal. El proceso destructivo asociado a la enfermedad periodontal puede ser debido al desarreglo de la IL-1 y del TNF (Howells, 1995, *Oral Dis.* 1, 266).

Las citocinas proinflamatorias tales como TNF α e IL-1 β también son mediadores importantes del choque séptico y de la disfunción cardiopulmonar asociada, del síndrome del distrés respiratorio agudo (ARDS) y del fallo orgánico múltiple. En un estudio de pacientes hospitalizados con sepsis se encontró una correlación entre los niveles de TNF α e IL-6 y las complicaciones sépticas (Terregino y *otros*, 2000, *Ann. Emerg. Med.*, 35, 26). La TNF α también se ha implicado en la caquexia y en la degradación muscular asociada a la infección por HIV (Lahdiverta y *otros*, 1988, *Amer. J. Med.*, 85, 289). La obesidad se asocia a una mayor incidencia de infecciones, diabetes y enfermedades cardiovasculares. En cada uno de los estados antes citados se han observado anomalías en la expresión de la TNF α (Loffreda y *otros*, 1998, *FASEB J.* 12, 57). Se ha propuesto que los altos niveles de TNF α están implicados en otros trastornos de la alimentación, tales como la anorexia y la bulimia nerviosa. Se señalan paralelismos patofisiológicos entre la anorexia nerviosa y la caquexia cancerosa (Holden y *otros*, 1996, *Med Hypotheses*, 47, 423). Con un modelo experimental se demostró que un inhibidor de la producción de TNF α , HU-211, mejoraba el desenlace de la lesión cerebral cerrada (Shohami y *otros*, 1997, *J Neuroimmunol.* 72, 169). Se sabe que la aterosclerosis tiene un componente inflamatorio y se ha sugerido que citocinas tales como la IL-1 y el TNF promueven la enfermedad. En un modelo animal se demostró que un antagonista del receptor de la IL-1 inhibía la formación de estría adiposa (Elhage y *otros*, 1998, *Circulation*, 97, 242).

En las vías respiratorias de los pacientes con obstrucción pulmonar crónica los niveles de TNF α son altos y pueden contribuir a la patogénesis de esta enfermedad (M.A. Higham y *otros*, 2000, *Eur. Respiratory J.*, 15, 281). La TNF α circulante también puede contribuir a la pérdida de peso asociada con esta enfermedad (N. Takabatake y *otros*, 2000, *Amer. J. Resp. & Crit. Care Med.*, 161 (4 Pt 1), 1170). También se ha descubierto que los niveles altos de TNF α van asociados al fallo cardíaco congestivo y el respectivo nivel se ha relacionado con la gravedad de la enfermedad (A.M. Feldman y *otros*, 2000, *J. Amer. College of Cardiology*, 35, 537). Asimismo la TNF α se ha implicado en el daño por reperfusión en el pulmón (Borjesson y *otros*, 2000, *Amer. J. Physiol.*, 278, L3-L-12), riñón (Lemay y *otros*, 2000, *Transplantation*, 69, 959) y el sistema nervioso (Mitsui y *otros*, 1999, *Brain Res.*, 844, 192).

La TNF α también es un potente agente osteoclastogénico, que interviene en la resorción ósea y en enfermedades donde ésta se produce (Abu-Amer y *otros*, 2000, *J. Biol. Chem.*, 275, 27307). También se ha encontrado altamente expresada en los condrocitos de pacientes con artritis traumática (Melchiorri y *otros*, 2000, *Arthritis and Rheumatism*, 41, 2165). También se ha demostrado que la TNF α juega un papel clave en el desarrollo de la glomerulonefritis (Le Hir y *otros*, 1998, *Laboratory Investigation*, 78, 1625).

La expresión anormal de la sintetasa inducible de óxido nítrico (iNOS) se ha asociado con la hipertensión de la rata hipertensa espontánea (Chou y *otros*, 1998, *Hypertension*, 31, 643). La IL-1 juega un papel en la expresión de la iNOS y por lo tanto también puede tenerlo en la patogénesis de la hipertensión (Singh y *otros*, 1996, *Amer. J. Hypertension*, 9, 867).

Asimismo se ha demostrado que la IL-1 induce uveítis en las ratas, la cual pudo inhibirse con bloqueadores de la IL-1 (Xuan y *otros*, 1998, *J. Ocular Pharmacol. and Ther.*, 14, 31). Se ha demostrado que las citocinas -incluyendo IL-1, TNF y GM-CSF- estimulan la proliferación de blastos en la leucemia mielógena aguda (Bruserud, 1996, *Leukemia Res.* 20, 65). Se ha comprobado que la IL-1 era fundamental para la dermatitis de contacto, tanto irritante como alérgica. La sensibilización epicutánea se puede evitar administrando un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 antes de la aplicación epicutánea de un alérgeno (Muller y *otros*, 1996, *Am J Contact Dermat.* 7, 177). Los datos obtenidos de ratones noqueados de IL-1 revelan la implicación crítica de esta citocina en la fiebre (Kluger y *otros*, 1998, *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 25, 141). Una serie de citocinas, incluyendo TNF, IL-1, IL-6 e IL-8, inician la reacción de fase aguda estereotipada en la fiebre, malestar, mialgia, cefaleas, hipermetabolismo celular y varias respuestas endocrinas y enzimáticas (Beisel, 1995, *Am J Clin Nutr.* 62, 813). Estas citocinas inflamatorias se producen rápidamente después de un traumatismo o de una invasión patógena del organismo.

Otras citocinas proinflamatorias se han relacionado con numerosos estados mórbidos. La IL-8 está relacionada con la afluencia de neutrófilos a zonas de inflamación o lesión. Los anticuerpos bloqueadores contra la IL-8 han demostrado que la IL-8 interviene en la lesión hística asociada a neutrófilos, en caso de inflamación aguda (Harada y *otros*, 1996, *Molecular Medicine Today* 2, 482). Por tanto, un inhibidor de la producción de IL-8 puede ser útil para tratar enfermedades transmitidas predominantemente por neutrófilos, como los ataques de apoplejía y el infarto de miocardio, solos o a consecuencia de terapia trombolítica, lesión térmica, síndrome del distrés respiratorio del adulto (ARDS), lesión orgánica múltiple derivada de un traumatismo, glomerulonefritis aguda, dermatosis con componentes de infla-

mación aguda, meningitis purulenta aguda u otros trastornos del sistema nervioso central, hemodiálisis, leucoféresis, síndromes relacionados con la transfusión de granulocitos y enterocolitis necrosante. El rinovirus desencadena la producción de varias citocinas proinflamatorias, predominantemente de IL-8, que ocasionan enfermedades sintomáticas, tales como la rinitis aguda (Winther y otros, 1998, *Am J Rhinol.* 12, 17).

Otras enfermedades causadas por la IL-8 son la isquemia y reperusión miocárdica, la inflamación intestinal y muchas otras.

La citocina proinflamatoria IL-6 está involucrada en la respuesta de fase aguda. La IL-6 es un factor de crecimiento en numerosas enfermedades oncológicas, incluyendo el mieloma múltiple y las discrasias plasmocelulares relacionadas (Treon y otros, 1998, *Current Opinion in Hematology* 5: 42). También se ha comprobado que es un mediador importante en la inflamación dentro del sistema nervioso central. Se encuentran altos niveles de IL-6 en varios trastornos neurológicos, incluyendo el complejo de demencia del SIDA, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple, el lupus eritematoso sistémico, el trauma del sistema nervioso central, y la meningitis vírica y bacteriana (Gruol y otros, 1997, *Molecular Neurobiology* 15: 307). La IL-6 también tiene un papel importante en la osteoporosis. En modelos murinos se ha visto que produce resorción ósea y que induce la actividad de los osteoclastos (Ershler y otros, 1997, *Development and Comparative Immunol.* 21: 487). *En vivo* hay notables diferencias de citocinas, tales como los niveles de IL-6, entre los osteoclastos de huesos normales y los de huesos de pacientes con la enfermedad de Paget (Mills y otros, 1997, *Calcif Tissue Int.* 61, 16). Se ha demostrado que hay varias citocinas implicadas en la caquexia cancerosa. La gravedad de los principales parámetros de la caquexia se puede reducir mediante tratamiento con anticuerpos anti-IL-6 o con antagonistas de receptores de IL-6 (Strassmann y otros, 1995, *Cytokines Mol Ther.* 1, 107). Varias enfermedades infecciosas, como la gripe, revelan que la IL-6 y el IFN alfa son factores clave, tanto en la formación de los síntomas como en la defensa del huésped (Hayden y otros, 1998, *J Clin Invest.* 101, 643).

La sobreexpresión de la IL-6 ha sido relacionada con la patología de varias enfermedades, incluyendo el mieloma múltiple, la artritis reumatoide, la enfermedad de Castleman, la psoriasis y la osteoporosis postmenopáusica (Simpson y otros, 1997, *Protein Sci.* 6, 929). Los compuestos que interfieren en la producción de citocinas, incluyendo la IL-6 y el TNF, fueron efectivos para bloquear una anafilaxis cutánea pasiva en ratones (Scholz y otros, 1998, *J. Med. Chem.*, 41, 1050).

La GM-CSF es otra citocina proinflamatoria fundamental para una serie de trastornos terapéuticos. No solo influye en la proliferación y diferenciación de células madre, sino que también regula otras células diversas implicadas en la inflamación aguda y crónica. El tratamiento con GM-CSF se ha probado en diversos estados mórbidos, incluyendo la curación de quemaduras, la resolución de injertos cutáneos, y también la mucositis inducida por citostáticos y radioterapia (Masucci, 1996, *Medical Oncology* 13: 149). Al parecer la GM-CSF tiene un papel en la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) en células de linaje macrófago relevantes para la terapia del SIDA (Crowe y otros, 1997, *Journal of Leukocyte Biology* 62, 41). El asma bronquial está caracterizado por un proceso inflamatorio en los pulmones. Entre las citocinas implicadas figura la GM-CSF (Lee, 1998, *J R Coll Physicians Lond* 32, 56).

El interferón γ (IFN γ) ha sido relacionado con varias enfermedades. Se ha asociado con el incremento de deposición de colágeno, que es una característica histopatológica principal de la reacción del injerto contra el huésped (Parkman, 1998, *Curr Opin Hematol.* 5, 22). Tras un trasplante de riñón, a un paciente se le diagnosticó una leucemia mielógena aguda. El análisis retrospectivo de las citocinas en la sangre periférica reveló elevados niveles de GM-CSF y de IFN γ . Estos elevados niveles coincidieron con un aumento del recuento de leucocitos en la sangre periférica (Burke y otros, 1995, *Leuk Lymphoma.* 19, 173). El desarrollo de la diabetes dependiente de insulina (tipo 1) puede relacionarse con la acumulación de células T productoras de IFN γ en células de los islotes pancreáticos (Ablumunits y otros, 1998, *J Autoimmun.* 11, 73). El IFN γ -junto con TNF, IL-2 e IL-6- activa la mayor parte de las células T periféricas antes de que en el sistema nervioso central se desarrollen lesiones de enfermedades tales como la esclerosis múltiple (MS) y el complejo de demencia del SIDA (Martino y otros, 1998, *Ann Neurol.* 43, 340). Las lesiones ateroscleróticas producen trastornos arteriales que pueden llevar al infarto cardíaco y cerebral. En esas lesiones están presentes muchas células inmunológicas activadas, sobre todo células T y macrófagos. Estas células producen grandes cantidades de citocinas proinflamatorias como TNF, IL-1 e IFN γ . Se cree que estas citocinas intervienen promoviendo la apoptosis o muerte celular programada de las células del músculo liso vascular circundante y dando como resultado las lesiones ateroscleróticas (Geng, 1997, *Heart Vessels Suppl* 12, 76). Los sujetos alérgicos producen ARNm específico del IFN γ tras la irritación por veneno de avispa (Boney y otros, 1997, *Clin Exp Immunol.* 109, 342). Se ha demostrado que la expresión de varias citocinas, incluyendo IFN γ , aumenta tras una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado, lo cual indica que el IFN γ juega un papel en la dermatitis atópica (Szepietowski y otros, 1997, *Br J Dermatol.* 137, 195). Se realizaron estudios histopatológicos e inmunológicos en casos de malaria cerebral fatal. Se observaron indicios de elevados niveles de IFN γ , entre otras citocinas, como prueba de su intervención en esta enfermedad (Udomsangpetch y otros, 1997, *Am J Trop Med Hyg.* 57, 501). Se ha demostrado la importancia de las especies con radicales libres en la patogénesis de varias enfermedades infecciosas. La vía de la síntesis de óxido nítrico se activa como respuesta a la infección con ciertos virus, mediante la inducción de citocinas proinflamatorias tales como el IFN γ (Akaike y otros, 1998, *Proc Soc Exp Biol Med.* 217, 64). Los pacientes infectados crónicamente con virus de la hepatitis B (HBV) pueden desarrollar cirrosis y carcinoma hepatocelular. La expresión y replicación de genes víricos en ratones transgénicos con HBV se puede suprimir por un mecanismo postranscripcional en el que intervienen IFN γ , TNF e IL-2 (Chisari y otros, 1995, *Springer Semin Immunopathol.* 17, 261). El IFN γ puede inhibir selectivamente la resorción ósea inducida por citocinas. Al parecer lo hace por mediación del óxido nítrico (NO), que es una molécula reguladora importante en la remodelación ósea. El NO puede intervenir como mediador de enfermedades óseas tales

como: artritis reumatoide, osteólisis relacionada con tumores y osteoporosis postmenopáusica (Evans y otros, 1996, *J Bone Miner Res.* 11, 300). Estudios con ratones genéticamente deficitarios han demostrado que la producción de IFN γ y dependiente de IL-12 es crítica para el control del crecimiento parasitario precoz. A pesar de que este proceso es independiente del óxido nítrico, el control de la infección crónica sí parece depender del NO (Alexander y otros, 1997, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352, 1355). El NO es un importante vasodilatador y hay pruebas convincentes de su papel en el choque cardiovascular (Kilbourn y otros, 1997, *Dis Mon.* 43, 277). El IFN γ es necesario para que la inflamación intestinal crónica progrese en enfermedades tales como la de Crohn y la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), presuntamente con la mediación de linfocitos CD4+, probablemente del fenotipo TH1 (Sartor 1996, *Aliment Pharmacol Ther.* 10 Suppl 2, 43). Un alto nivel de IgE en el suero está relacionado con varias enfermedades atópicas, tales como el asma bronquial y la dermatitis atópica. El nivel de IFN γ se relacionó negativamente con IgE en suero, sugiriendo un papel del IFN γ en pacientes atópicos (Teramoto y otros, 1998, *Clin Exp Allergy* 28, 74).

La patente WO 01/01986 revela compuestos particulares, supuestamente capaces de inhibir el TNF-alfa. Los inhibidores específicos ahí revelados son estructuralmente diferentes de los nuevos compuestos revelados en la presente solicitud de patente expuesta más adelante. Se indica que ciertos compuestos revelados en la patente WO 01/01986 son efectivos para el tratamiento de las siguientes enfermedades: demencia asociada a la infección por HIV, glaucoma, neuropatía óptica, neuritis óptica, isquemia retiniana, daño óptico inducido por láser, víteorretinopatía proliferativa inducida por cirugía o por traumatismo, isquemia cerebral, hipoxia-isquemia, hipoglucemia, intoxicación por ácido domoico, anoxia, intoxicación por monóxido de carbono o por manganeso o por cianuro, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, meningitis, esclerosis múltiple y otras enfermedades desmielinizantes, esclerosis lateral amiotrófica, traumatismo craneoencefálico o medular, ataques de apoplejía, convulsiones, atrofia olivopontocerebelar, síndromes de dolor neuropático, neuropatía diabética, neuropatía relacionada con HIV, síndromes de MERRF y MELAS enfermedad de Leber, encefalopatía de Wernicke, síndrome de Rett, homocistinuria, hiperprolinemia, hiperhomocisteinemia, hiperglicinemia no cetónica, aminoaciduria hidroxibutírica, deficiencia de sulfito-oxidasa, enfermedad de sistemas combinados, encefalopatía saturnina, síndrome de Tourett, encefalopatía hepática, drogadicción, tolerancia a los medicamentos, farmacodependencia, depresión, ansiedad y esquizofrenia. La patente WO 02/32862 revela que los inhibidores de citocinas proinflamatorias, incluyendo el TNF α , son seguramente útiles para tratar la inflamación pulmonar aguda y crónica causada por la inhalación de humo, como el de los cigarrillos. Al parecer los antagonistas de la TNF α también son útiles para el tratamiento de la endometriosis; véase patente EP 1022027 A1. En ensayos clínicos sobre la AR también se ha señalado la utilidad del Infliximab para tratar varias enfermedades inflamatorias, incluyendo la enfermedad de Behcet, la uveítis y la espondilitis anquilosante. La pancreatitis también se puede regular mediante la producción de mediadores inflamatorios; véase *J Surg Res* 15 de mayo de 2000 90(2)95-101; *Shock* 10 de sept. de 1998 (3):160-75.

Los fármacos anti-citocina también pueden ser de utilidad terapéutica en el tratamiento de células tumorales. *Drug Resistance Updates* 4(4):253-267, agosto de 2001. La patente WO 02/38143 revela el uso de inhibidores de p38 para aumentar la eficacia y la seguridad de la terapia genotóxica, a fin de tratar, por ejemplo, envejecimiento, cáncer y ciertos tipos de fallo cardíaco.

Los compuestos que modulan la liberación de una o más de las citocinas inflamatorias antes mencionadas pueden ser útiles para tratar enfermedades relacionadas con la liberación de estas citocinas. Por ejemplo, la patente WO 98/52558 revela compuestos de heteroaril-urea que han sido declarados de utilidad para tratar enfermedades en que intervienen citocinas. La patente WO 99/23091 revela otra clase de compuestos de urea que son útiles como agentes antiinflamatorios. La patente WO 99/32463 se refiere a aril-ureas y a su empleo para tratar enfermedades transmitidas por citocinas y enfermedades en las cuales intervienen enzimas proteolíticos. La patente WO 00/41698 revela aril-ureas supuestamente útiles para tratar enfermedades transmitidas por p38 MAP quinasa. La patente WO 99/32455 revela el empleo de derivados de diaril-urea para tratar tumores mediante la inhibición de raf quinasa.

La patente U.S. n° 5,162,360 revela compuestos de urea N-sustituidos y con sustitución aril-N'-heterocíclica, que se describen como útiles para el tratamiento de la hipercolesterolemia y de la aterosclerosis.

La mencionada publicación sostiene el principio de que la inhibición de la producción de citocinas es favorable para tratar la inflamación pulmonar aguda y crónica causada por la inhalación de humo, la endometriosis, la enfermedad de Behcet, la uveítis, la espondilitis anquilosante, la pancreatitis, el cáncer, la angioplastia coronaria transluminal percutánea, la enfermedad de Alzheimer, la artritis traumática, la sepsis, la enfermedad de obstrucción pulmonar crónica y el fallo cardíaco congestivo. En la patente WO 00/43384 no se ha explicado o descrito ninguna de estas enfermedades concretas como posibles indicaciones para los compuestos ahí señalados. Por consiguiente se necesitan inhibidores de molécula pequeña para tratar estas enfermedades con eficacia, farmacocinética y perfiles de seguridad optimizados.

Descripción detallada de la presente invención

La presente invención se refiere al uso de 1-[5-terc.-butil-2-p-tolil-2H-pirazol-3-il]-3-[4-(2-morfolin-4-il-etoxi) nafatalen-1-il]-urea, o de sus sales fisiológicamente aceptables, para elaborar un medicamento destinado al tratamiento del cáncer.

El compuesto arriba descrito puede existir en más de una forma tautomérica. La presente invención incluye todos estos tautómeros.

El uso aquí descrito incluye el empleo de sales farmacéuticamente aceptables del compuesto antes citado, comprendiendo las derivadas de ácidos y bases, tanto de tipo inorgánico como orgánico, farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de ácidos adecuados son el clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, perclórico, fumárico, maleico, fosfórico, glicólico, láctico, salicílico, succínico, toluen-p-sulfónico, tartárico, acético, cítrico, metanosulfónico, fórmico, benzoico, malónico, naftalen-2-sulfúrico y bencenosulfónico. Otros ácidos como el oxálico, de por sí inaceptables farmacéuticamente, se pueden usar para preparar sales que son útiles como productos intermedios en la obtención de los compuestos de la presente invención y de sus sales de adición farmacéuticamente aceptables. Las sales derivadas de bases apropiadas incluyen las de metal alcalino (*p.ej.* sodio), de metal alcalinotérreo (*p.ej.* magnesio), de amonio y de N-(alquil-C₁-C₄)₄⁺.

Métodos de uso terapéutico

Conforme a la presente invención se proporcionan nuevos métodos para usar el compuesto 1-[5-terc.-butil-2-p-tolil-2H-pirazol-3-il]-3-[4-(2-morfolin-4-il-etoxi)naftalen-1-il]-urea descrito en las patentes WO 00/43384 y US 6,319,921. El compuesto bloquea eficazmente la producción de citocinas inflamatorias a partir de las células. La inhibición de la producción de citocinas es un método atractivo de prevenir y tratar múltiples enfermedades transmitidas por citocinas o estados relacionados con el exceso de producción de citocinas, *p.ej.* enfermedades y estados patológicos que implican inflamación. Así se indica que el compuesto es útil para el tratamiento de los siguientes estados y enfermedades: artritis reumatoide, osteoartritis, esclerosis múltiple, el síndrome de Guillain-Barre, la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, psoriasis, la reacción del injerto contra el huésped, lupus eritematoso sistémico, glomerulonefritis, daño por reperusión, enfermedades de resorción ósea incluyendo osteoporosis, aterosclerosis; síndrome del choque tóxico, asma, dermatitis de contacto y diabetes mellitus dependiente de insulina.

Sorprendentemente se ha descubierto por primera vez que el compuesto 1-[5-terc.-butil-2-p-tolil-2H-pirazol-3-il]-3-[4-(2-morfolin-4-il-etoxi)naftalen-1-il]-urea ahí descrito es útil en métodos para el tratamiento del cáncer.

Para uso terapéutico, el compuesto se puede administrar en cualquier dosis usual de cualquier modo convencional. Las vías de administración incluyen, sin limitación, la intravenosa, la intramuscular, la subcutánea, la intrasínovial, por infusión, la sublingual, la transdérmica, la oral, la tópica o por inhalación. Los modos de administración preferidos son por vía oral o intravenosa.

El compuesto se puede administrar solo o combinado con adyuvantes que incrementan la estabilidad de los inhibidores, facilitan la administración de composiciones farmacéuticas que los contienen en ciertas formas de ejecución, promueven una mayor disolución o dispersión, aumentan la acción inhibitoria, proporcionan terapia accesoria, y análogos, incluyendo otros ingredientes activos. Estas terapias combinadas emplean ventajosamente menores dosis de los productos terapéuticos convencionales, evitando así una posible toxicidad y efectos secundarios adversos que se producen cuando estos agentes se usan como monoterapias. El compuesto de la presente invención se puede combinar físicamente con los productos terapéuticos convencionales o con otros adyuvantes en una única composición farmacéutica. El compuesto se puede administrar ventajosamente de golpe, en forma de dosis única. En algunas formas de ejecución las composiciones farmacéuticas que llevan estas combinaciones de compuestos contienen como mínimo un 5%, pero como mínimo preferiblemente un 20%, (peso/peso) del compuesto 1-[5-terc.-butil-2-p-tolil-2H-pirazol-3-il]-3-[4-(2-morfolin-4-il-etoxi)naftalen-1-il]-urea o una combinación del mismo. El porcentaje óptimo (peso/peso) del compuesto de la presente invención puede variar y cae dentro del alcance de aquellos experimentados en la especialidad. Como alternativa, los compuestos se pueden administrar por separado (bien en serie o en paralelo). La administración por separado proporciona una mayor flexibilidad en el régimen de dosis.

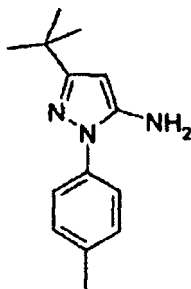
Tal como se ha mencionado arriba, las formas de dosificación del compuesto aquí descrito contienen los soportes y adyuvantes farmacéuticamente aceptables, conocidos del especialista en la materia. Estos soportes y adyuvantes incluyen, por ejemplo, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, sustancias tampón, agua, sales o electrolitos y sustancias a base de celulosa. Como formas de administración se prefieren las tabletas, las cápsulas, las grageas, los líquidos, las soluciones, las suspensiones, las emulsiones, las pastillas rómbicas, los jarabes, los polvos reconstituibles, los granulados, los supositorios y los parches transdérmicos. Los métodos de preparación de dichas formas de administración son conocidos (véase por ejemplo H.C. Ansel y N.G. Popovich, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems [Formas de dosificación farmacéuticas y sistemas de administración de fármacos]*, 5ª ed., Lea and Febiger (1990)). Los niveles y necesidades de dosificación están bien definidos en el estado técnico y se pueden elegir por parte de los especialistas en la materia, a partir de métodos y técnicas adecuadas para un paciente determinado. En algunas formas de ejecución los niveles de dosificación varían aproximadamente entre 1-1000 mg/dosis para un paciente de 70 kg. Aunque puede bastar una dosis diaria, se pueden dar hasta 5 dosis al día. Para dosis orales se pueden necesitar hasta 2000 mg/día. Como podrá apreciar el especialista en la materia, se necesitarán dosis menores o mayores en función de factores particulares. Por ejemplo, la dosificación concreta y el régimen de tratamiento dependerán de factores tales como el estado general de la salud del paciente, la gravedad y el curso de su enfermedad o la propensión a la misma y el juicio del médico que lo trata.

Para que la presente invención sea más plenamente comprensible se describen los siguientes ejemplos, destinados a ilustrar las formas de ejecución preferidas de la presente invención.

El ejemplo siguiente es ilustrativo y, como puede apreciar un especialista en la materia, los reactivos y condiciones particulares podrían modificarse para cada compuesto sin excesiva experimentación. Los materiales de partida abajo empleados están comercialmente disponibles o se preparan fácilmente partiendo de materiales disponibles y conocidos de los especialistas en la materia. A este respecto cabe referirse también a las patentes US n° 6,319,921 y 6,358,945.

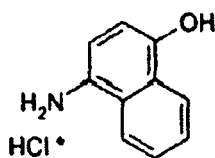
Ejemplos de síntesis

Materiales de partida de fórmula LXVII y LXIV



LXVII

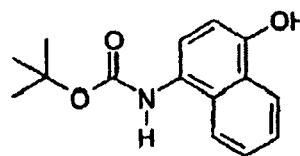
Una mezcla de hidrocloreto de 4-metilfenil-hidrazina (10,0 g) y 4,4-dimetil-3-oxopentanonitrilo (8,67 g) en 150 ml de etanol y 7 ml de HCl concentrado se calentó a reflujo toda la noche, se enfrió hasta temperatura ambiente, se basificó con álcali a pH 12 y se extrajo con dietiléter. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera y se secaron (MgSO_4). Después de eliminar los volátiles al vacío quedó un residuo que se trituró con éter de petróleo caliente (100 ml) y se obtuvieron 12,5 g de LXVII.



LXIII

1. n-butil
litio

2. $(\text{BOC})_2\text{O}$

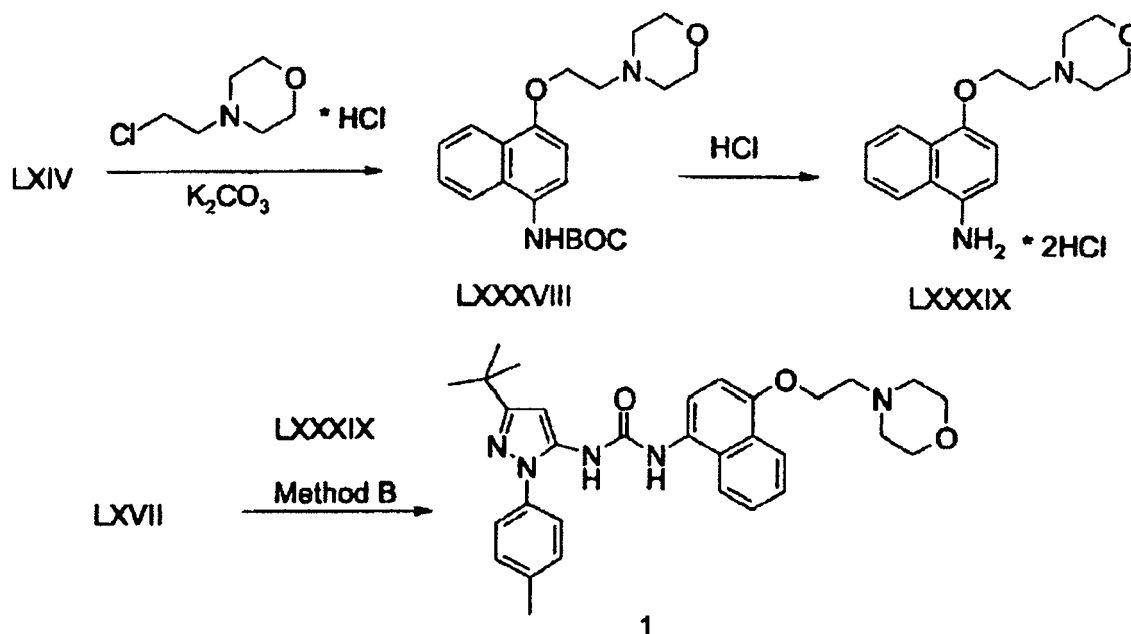


LXIV

A una mezcla de hidrocloreto de 4-amino-1-naftol (LXIII) (172,1 g) en 750 ml de THF anhidro a -78°C se le añadió gota a gota n-butil-litio durante 60 min. (490 ml de una solución 1,60 M en hexanos). Una vez completada la adición se dejó que la mezcla se calentara hasta temperatura ambiente; después se enfrió a -78°C y se le agregó dicarbonato de di-tert.-butilo $((\text{BOC})_2\text{O})$ (192 g) en 200 ml de THF durante 20 min. La mezcla se calentó lentamente hasta la temperatura ambiente, agitando durante 3 h, y la mayoría de componentes volátiles se eliminó al vacío. El residuo se diluyó con acetato de etilo (1 l), se lavó con agua (2 x 200 ml) y salmuera (200 ml), se filtró a través de celite y se secó (MgSO_4). Tras eliminar los volátiles al vacío se obtuvo el compuesto LXIV (226,1 g).

Ejemplo 1

1-[5-terc.-butil-2-p-tolil-2H-pirazol-3-il]-3-[4-(2-morfolin-4-il-etoxi)naftalen-1-il]-urea (1)



Una mezcla de LXIV (0,464 g), hidrocloreto de 4-(2-cloro-etil)morfolina (0,3435 g) y carbonato potásico pulverizado (0,93 g) se calentó a 80°C durante 3 horas en acetonitrilo (15 ml), se enfrió hasta temperatura ambiente y se diluyó con acetato de etilo y agua. La capa orgánica se lavó con agua y con salmuera, se secó (MgSO₄) y los componentes volátiles se eliminaron al vacío. El residuo se purificó por cromatografía flash, utilizando como eluyente 12% de hexanos en acetato de etilo, y después de concentrar al vacío las fracciones ricas en producto se obtuvo el compuesto LXXXVIII. Una solución de LXXXVIII (0,511 g) y HCl (1 ml de una solución 4M en dioxano) en 5 ml de dioxano se agitó a la temperatura ambiente durante 20 horas. Tras eliminar los componentes volátiles al vacío se obtuvo el compuesto LXXXIX, que se hizo reaccionar con LXVII para obtener 1, de p.f. = 142-143°C.

Evaluación de las propiedades biológicas

Inhibición de la producción de TNF en células THP

La inhibición de la producción de citocinas se puede observar midiendo la inhibición de TNF α en células THP estimuladas con lipopolisacáridos. Todas las células y todos los reactivos se diluyeron en RPMI 1640 con rojo fenol y L-glutamina, complementado con L-glutamina adicional (total: 4 mM), penicilina y estreptomycin (50 unidades/ml de cada una) y suero bovino fetal (FBS, 3%) (GIBCO, todas las concentraciones finales). El ensayo se realizó en condiciones estériles; solo la preparación del compuesto de ensayo no era estéril. Las soluciones iniciales concentradas se prepararon en DMSO y luego se diluyeron en RPMI 1640, hasta quedar al doble de la concentración final de ensayo deseada. Se añadieron células confluentes THP.1 (concentración final $2 \cdot 10^6$ células/ml; American Type Culture Company, Rockville, MD) a unas placas de polipropileno de 96 pocillos de fondo redondo (Costar 3790; estériles) que contenían 125 μ l del compuesto de ensayo (2 veces concentrado) o vehículo DMSO (controles, blancos). La concentración de DMSO no fue mayor del 0,2% final. La mezcla celular se dejó preincubar durante 30 min. a 37°C y 5% de CO₂ antes de la estimulación con lipopolisacárido (LPS; 1 μ g/ml final; Sigma L-2630, de *E. coli* del serotipo 0111:B4; conservado como reserva de 1 mg/ml en H₂O destilada libre de endotoxinas a -80°C). Los blancos (no estimulados) recibieron H₂O como vehículo; el volumen final de incubación fue de 250 μ l. La incubación durante la noche (18 - 24 h) se desarrolló del modo antes descrito. El ensayo se concluyó centrifugando las placas durante 5 min., a temperatura ambiente y a 1.600 rpm (400 x g); los sobrenadantes se transfirieron a placas de 96 pocillos limpios y se conservaron a -80°C, hasta analizar su contenido de TNF α humano mediante un kit ELISA comercialmente disponible (Biosource #KHC3015, Camarillo, CA). Los datos se analizaron por regresión no lineal (ecuación de Hill), para generar una curva dosis-respuesta, usando el sistema Software SAS (SAS institute, Inc., Cary, NC). El valor IC₅₀ calculado es la concentración del compuesto de ensayo que disminuyó un 50% la producción máxima de TNF α .

Se evaluó el compuesto del anterior ejemplo de síntesis y en este ensayo dio un IC₅₀ < 10 μ M.

Inhibición de otras citocinas

Mediante métodos similares y empleando células monocíticas de sangre periférica, estímulos apropiados y kits ELISA comercialmente disponibles para una citocina particular, se demostró la inhibición de IL-1 β , GM-CSF, IL-6 e IL-8 por el ejemplo de síntesis anterior.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de 1-[5-terc.-butil-2-p-tolil-2H-pirazol-3-il]-3-[4-(2-morfolin-4-il-etoxi)naftalen-1-il]-urea, o de los ácidos o sales fisiológicamente aceptables de la misma, para elaborar un medicamento destinado al tratamiento del cáncer.

2. Uso según la reivindicación 1, efectuando el tratamiento conjuntamente con terapia genotóxica.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65