



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 280 502**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02700679 .0**

86 Fecha de presentación : **21.02.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1362601**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.11.2003**

54 Título: **Método para evaluar el efecto de un inhibidor de la angiogénesis a través de la inhibición de la expresión de integrinas.**

30 Prioridad: **21.02.2001 JP 2001-44646**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.09.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.09.2007**

73 Titular/es: **Eisai R&D Management Co., Ltd.**  
**6-10, Koishikawa 4-chome**  
**Bunkyo-ku, Tokyo 112-8088, JP**

72 Inventor/es: **Ono, Naoto;**  
**Senba, Taro;**  
**Hata, Naoko;**  
**Funahashi, Yasuhiro y**  
**Wakabayashi, Toshiaki**

74 Agente: **Gallego Jiménez, José Fernando**

ES 2 280 502 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

Método para evaluar el efecto de un inhibidor de la angiogénesis a través de la inhibición de la expresión de integrinas.

5

**Sector técnico**

La presente invención se refiere a un método para evaluar el efecto de un fármaco que influye en la expresión de integrinas, preferentemente un inhibidor de la angiogénesis.

10

**Antecedentes de la técnica**

El cáncer es una dolencia que presenta una mortalidad elevada, y el objetivo de los tratamientos con agentes anticancerosos reside en general en mejorar la QOL (calidad de vida) del paciente y en prolongar el tiempo de supervivencia. No obstante, resulta difícil determinar el efecto de prolongación de la vida de un fármaco en un periodo de tiempo breve, y por lo tanto, como marcadores indirectos que actúan como índices del efecto terapéutico, se están usando la tasa de reducción del tumor y el nivel de antígenos tumorales en sangre.

15

Además, como el uso del periodo de prolongación de la vida para determinar el efecto del fármaco en estudios clínicos de agentes anticancerosos requiere también un estudio de larga duración, como marcador indirecto se ha usado la tasa de reducción del tumor, la cual se puede evaluar en un periodo de tiempo relativamente breve. No obstante, se ha señalado que es posible que la tasa de reducción del tumor no actúe necesariamente como índice de prolongación de la vida. Por consiguiente, además de la tasa de reducción del tumor, se ha intentado usar como marcadores indirectos el tiempo hasta la progresión, el periodo de supervivencia libre de enfermedad, marcadores biológicos, etcétera. No obstante, estos métodos no se han establecido todavía.

20

Se considera que si, como marcador indirecto se puede utilizar un marcador biológico que indique un cambio inducido por la administración de un fármaco y asociado íntimamente a la prolongación del tiempo de supervivencia, en un estudio clínico se puede determinar fácilmente un método de tratamiento adecuado, y el marcador se puede usar como índice del efecto terapéutico del fármaco durante el tratamiento.

30

Los siguientes marcadores se han dado a conocer como indirectos.

El Panorex, el cual es un anticuerpo dirigido a la glicoproteína EpCAM, se observó en primer lugar como marcador tumoral de células cancerosas de colon y posteriormente se identificó como molécula de adhesión. Se está revisando su correlación con la tasa de supervivencia como marcador indirecto de la eliminación de células de microcarcinoma que quedan en la médula ósea (Stephan B *et al.*, Clinical Cancer Research, 1999, 5, 3999-4004), y en paralelo se están efectuando estudios clínicos de fase III a gran escala.

35

Los antígenos específicos prostáticos se han usado como marcador indirecto en la terapia hormonal del cáncer prostático para determinar las dosis óptimas (Denis L. y Mahler C. Urology, 1996, 47 (1A Suppl.), 26-32).

40

En cuanto al uso de un marcador indirecto de un inhibidor de la angiogénesis, en un estudio clínico de fase I del BMS275291, que es un inhibidor de la metaloproteasa de matriz, se ha examinado un método de uso de la angiogénesis en la cicatrización de heridas después de que se haya realizado un agujero en la piel como indicador. Además, con respecto a otro inhibidor de la metaloproteasa de matriz, se ha dado a conocer un método de uso de la actividad enzimática en un punto del tumor como marcador (Clin. Cancer Res., 2000, 6(8), 3290-6).

45

Además, se espera que los inhibidores de la angiogénesis actúen como agentes terapéuticos eficaces para dolencias diferentes al cáncer, por ejemplo, arterioesclerosis, retinopatía diabética, oclusión de venas retinianas, retinopatía del prematuro, degeneración macular asociada a la edad, glaucoma neovascular, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, psoriasis, angioma, angiofibroma y otras. Si se halla un marcador indirecto de la angiogénesis, resultará posible determinar una dosis adecuada de un fármaco, el efecto del fármaco y el periodo de administración al usarlo como índice también en estas dolencias.

50

Las integrinas son moléculas de adhesión celular que se expresan sobre una superficie celular y que están compuestas por cadenas  $\alpha$  y cadenas  $\beta$ . Las integrinas están involucradas en la adhesión entre proteínas de membranas de matriz extracelular y células así como en la adhesión entre células. Cuando una molécula de adhesión celular se une a una integrina, en la célula comienzan a actuar sistemas de señalización. Como consecuencia, se producen no solamente adhesión celular, sino también extensión celular, crecimiento celular, apoptosis, diferenciación, orientación del citoesqueleto, migración celular, formación de tejidos, invasión cancerosa y metástasis, cicatrización de heridas, coagulación sanguínea, etcétera.

60

De entre estas integrinas, se sabe que la integrina  $\alpha 2 \beta 1$  actúa sobre el colágeno, la laminina y otros, como moléculas de adhesión y que está implicada en la formación tubular de células endoteliales vasculares durante la angiogénesis (George E. *et al.*, Exp. Cell. Res., 1996, 224, 39-51). Además, se ha dado a conocer también que los anticuerpos dirigidos a la integrina  $\alpha 1$  y a la integrina  $\alpha 2$  inhibían la angiogénesis inducida por VEGF *in vivo* (Donald R.S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1997, 94, 13612-13617).

65

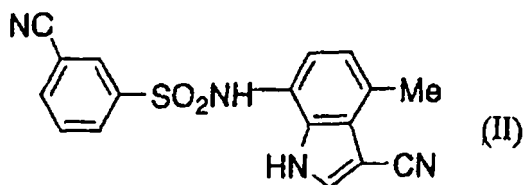
La integrina  $\alpha\beta3$  existe específicamente en células endoteliales bajo angiogénesis, y se ha dado a conocer que el anticuerpo neutralizante de la integrina  $\alpha\beta3$  (LM609) inhibía la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2) en un modelo de angiogénesis que utilizaba la membrana corioalantoidea de un embrión de pollo (Brook, P.C. *et al.*, Science, 1994, 264, 569-571). Además, se ha dado a conocer también que la integrina  $\alpha\beta3$  está implicada en la angiogénesis inducida por el FGF-2 y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , y que la integrina  $\alpha\beta5$  está implicada en la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento transformador  $\alpha$  (Friedlander, M *et al.*, Science, 1995, 270, 1500-1502). El anticuerpo anti-integrina  $\alpha\beta3$  y el inhibidor de la integrina  $\alpha\beta3$  están actualmente bajo estudios clínicos.

Trikha *et al.* (Cancer Res. 56 (21): 5071-5078, 1996) dan a conocer que la integrina  $\alpha2$  presenta unos niveles de expresión elevados en el tejido tumoral prostático. El documento WO98/44797 da a conocer métodos de tratamiento de cáncer usando una combinación de un compuesto el cual es un antagonista de la integrina y un compuesto el cual es un inhibidor de la proteína farnesil transferasa. Henk *et al.* (Blood 96 (13): 4216-4221, 2000 y Clin. Cancer Res. 6 (1): 166-171, 2000) dan a conocer que las plaquetas juegan un papel importante en la formación de vasos nuevos inducida por tumores.

### Descripción de la invención

Uno de los objetivos de la presente invención es proporcionar un marcador indirecto para un fármaco que influye en la expresión de una integrina, preferentemente la integrina  $\alpha2$ , e inhibe la angiogénesis.

Los inventores de la presente invención observaron que, en unas condiciones tales en las que la expresión de la integrina  $\alpha2$  se reduce, la angiogénesis disminuye, y por lo tanto el crecimiento de las células cancerosas se inhibe por medio de un fármaco representado por un compuesto de la fórmula general (II) (al que en lo sucesivo se hará referencia como "Compuesto A"), el cual inhibe la angiogénesis a través de la inhibición de la expresión de la integrina  $\alpha2$ , reduciéndose también la expresión de la integrina  $\alpha2$  en las superficies de plaquetas de sangre periférica.



Observaron además que la cantidad de integrina  $\alpha2$  sobre las superficies de las plaquetas de la sangre periférica resultaba útil como marcador indirecto de la inhibición de la angiogénesis, y por lo tanto materializaron la presente invención.

Es decir, la presente invención proporciona los siguientes aspectos.

1. Método para evaluar la influencia de un fármaco sobre la expresión de integrina, el cual comprende la etapa en la que se mide la cantidad de expresión de integrina en las plaquetas recogidas de un paciente al cual se le administra el fármaco y la etapa en la que se determina la influencia del fármaco sobre la expresión de integrina en otras células que no sean las plaquetas sobre la base de la reducción de la cantidad de expresión medida, en el que la integrina es integrina  $\alpha2$ , y las células son células de un tejido en el cual se puede producir angiogénesis o células tumorales.

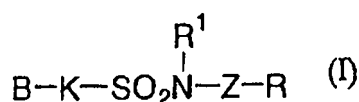
2. Método según el punto 1, en el que la cantidad de expresión de integrina se mide a través de un método inmunológico.

3. Método según el punto 2, en el que el método inmunológico es un método de citometría de flujo.

4. Método según el punto 1, en el que la cantidad de expresión de integrina se mide midiendo una cantidad de codificación de ARNm para la integrina.

5. Método según el punto 4, en el que la cantidad de ARNm se mide mediante una PCR cuantitativa.

6. Método según el punto 1, en el que el fármaco es un compuesto de sulfonamida representado por la fórmula general (I):



## ES 2 280 502 T3

en la que

B representa un anillo arilo C6-C10 o un anillo heteroarilo de entre 6 y 10 miembros, pudiendo estar cada uno de ellos sustituido y parcialmente saturado;

K representa un enlace simple,  $-\text{CH}=\text{CH}-$  o  $-(\text{CR}^{4b}\text{R}^{5b})_m^b$  en el que  $\text{R}^{4b}$  y  $\text{R}^{5b}$  pueden ser iguales o diferentes y cada uno de ellos representa un átomo de hidrógeno o alquilo C1-C4, y  $m^b$  es un entero de entre 1 o 2;

$\text{R}^1$  representa un átomo de hidrógeno o alquilo C1-C6;

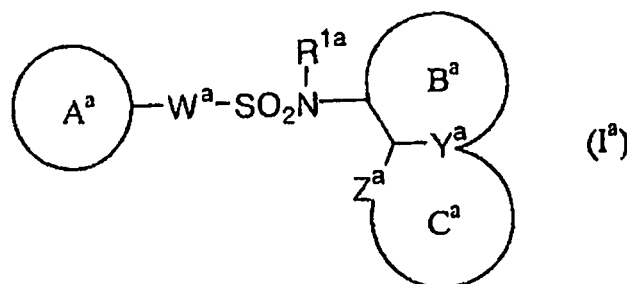
Z representa un enlace simple o  $-\text{CO}-\text{NH}-$ ; y

R representa un anillo arilo C6-C10 o un anillo heteroarilo de entre 6 y 10 miembros, pudiendo estar cada uno de ellos sustituido y parcialmente saturado; o

una sal farmacológicamente aceptable del mismo, o un hidrato del mismo.

7. Método según el punto 6, en el que R representa indol, quinolina o isoquinolina.

8. Método según el punto 1, en el que el fármaco es un compuesto de sulfonamida representado por la fórmula general (I<sup>a</sup>):



en la que

$\text{A}^a$  representa un anillo aromático monocíclico o bicíclico el cual puede estar sustituido;

$\text{B}^a$  representa un anillo de hidrocarburo insaturado de 6 miembros o un heterociclo de 6 miembros insaturado que contenga un átomo de hidrógeno como heteroátomo, pudiendo estar sustituido cada uno de ellos;

$\text{C}^a$  representa un heterociclo de 5 miembros que contiene uno o dos átomos de nitrógeno el cual puede estar sustituido;

$\text{R}^{1a}$  representa un átomo de hidrógeno o alquilo C1-C6;

$\text{W}^a$  representa un enlace simple o  $-\text{CH}=\text{CH}-$ ;

$\text{Y}^a$  representa un átomo de carbono o nitrógeno;

$\text{Z}^a$  representa  $-\text{N}(\text{R}^{2a})-$  en la que  $\text{R}^{2a}$  representa un átomo de hidrógeno o alquilo C1-C6, o un átomo de nitrógeno; o una sal del mismo farmacológicamente aceptable, o un hidrato del mismo.

9. Método según el punto 8, en el que  $\text{W}^a$  representa un enlace simple.

10. Método según el punto 8, en el que  $\text{W}^a$  representa un enlace simple,  $\text{Z}^a$  representa  $-\text{NH}-$ , e  $\text{Y}^a$  representa un átomo de carbono.

11. Método según uno cualquiera de los puntos 8 a 10, en el que  $\text{B}^a$  representa benceno o piridina los cuales pueden estar sustituidos.

12. Método según uno cualquiera de los puntos 8 a 11, en el que  $\text{C}^a$  representa pirrol el cual puede estar sustituido.

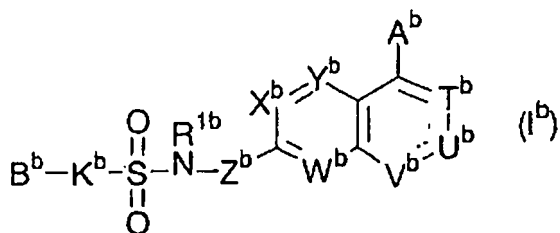
13. Método según el punto 8, en el que  $\text{A}^a$  representa benceno o piridina los cuales pueden estar sustituidos,  $\text{B}^a$  representa benceno el cual puede estar sustituido,  $\text{C}^a$  representa pirrol el cual puede estar sustituido,  $\text{W}^a$  representa un enlace simple y  $\text{Z}^a$  representa  $-\text{NH}-$ .

## ES 2 280 502 T3

14. Método según el punto 1, en el que el fármaco es un compuesto heterocíclico que contiene sulfonamida representado por la fórmula general (I<sup>b</sup>):

5

10

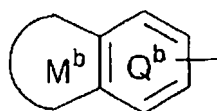


15

20

en la que A<sup>b</sup> representa un átomo de hidrógeno; un átomo de halógeno; hidroxilo; alquilo o alcoxi C1-C4 los cuales pueden estar sustituidos con un átomo de halógeno; ciano; -(CO)<sub>k</sub><sup>b</sup>NR<sup>2b</sup>R<sup>3b</sup> en la que R<sup>2b</sup> y R<sup>3b</sup> pueden ser iguales o diferentes y cada uno de ellos representa un átomo de hidrógeno o alquilo C1-C4 los cuales pueden estar sustituidos con un átomo de halógeno, y k<sup>b</sup> es 0 o 1; alquenoilo o alquinilo C2-C4 los cuales pueden estar sustituidos; o fenilo o fenoxi los cuales pueden tener un sustituyente seleccionado de entre el Grupo A que se menciona posteriormente; B<sup>b</sup> representa arilo o heteroarilo monocíclico los cuales pueden tener un sustituyente seleccionado de entre el Grupo A que se menciona posteriormente, o

25



30

en la que Q<sup>b</sup> representa un anillo aromático el cual puede tener uno o dos átomos de nitrógeno, M<sup>b</sup> representa un anillo policíclico o monocíclico insaturado C5-C12 que comparte un enlace doble con Q<sup>b</sup>, el cual puede tener entre uno y cuatro heteroátomos seleccionados de entre un átomo de nitrógeno, un átomo de oxígeno y un átomo de azufre, Q<sup>b</sup> y M<sup>b</sup> pueden compartir un átomo de nitrógeno, y Q<sup>b</sup> y M<sup>b</sup> pueden tener un sustituyente seleccionado de entre el Grupo A que se menciona posteriormente;

35

K<sup>b</sup> representa un enlace simple o -(CR<sup>4b</sup>R<sup>5b</sup>)<sub>m<sup>b</sup></sub>- en la que R<sup>4b</sup> y R<sup>5b</sup> pueden ser iguales o diferentes y cada uno de ellos representa un átomo de hidrógeno o alquilo C1-C4, y m<sup>b</sup> es un entero de entre 1 o 2;

40

T<sup>b</sup>, W<sup>b</sup>, X<sup>b</sup> e Y<sup>b</sup> pueden ser iguales o diferentes y cada uno de ellos representa =C(D<sup>b</sup>)- en la que D<sup>b</sup> representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, hidroxilo, alquilo o alcoxi C1-C4 los cuales pueden estar sustituidos con un átomo de halógeno, ciano, -(CO)<sub>n</sub><sup>b</sup>NR<sup>6b</sup>R<sup>7b</sup> en la que R<sup>6b</sup> y R<sup>7b</sup> pueden ser iguales o diferentes y cada uno de ellos representa un átomo de hidrógeno o alquilo C1-C4 el cual puede estar sustituido con un átomo de halógeno, y n<sup>b</sup> es 0 o 1, o alquenoilo o alquinilo C2-C4 los cuales pueden estar sustituidos; o un átomo de nitrógeno;

45

U<sup>b</sup> y V<sup>b</sup> pueden ser iguales o diferentes y cada uno de ellos representa =C(D<sup>b</sup>)- en la que D<sup>b</sup> tiene el mismo significado que el definido anteriormente, un átomo de nitrógeno, -CH<sub>2</sub>-, un átomo de oxígeno o -CO-;

Z<sup>b</sup> representa un enlace simple o -CO-NH-;

R<sup>1b</sup> representa un átomo de hidrógeno o alquilo C1-C4;

50

≡≡ representa un enlace simple o un enlace doble:

55

Grupo A: un átomo de halógeno; hidroxilo; alquilo o alcoxi C1-C4 los cuales pueden estar sustituidos con un átomo de halógeno; ciano; -R<sup>8b</sup>R<sup>9b</sup>N(NH)<sub>p<sup>b</sup></sub>- en la que R<sup>8b</sup> y R<sup>9b</sup> pueden ser iguales o diferentes y cada uno de ellos representa un átomo de hidrógeno o alquilo C1-C4 el cual puede estar sustituido con un átomo de halógeno, y p<sup>b</sup> es 0 o 1, R<sup>8b</sup> y R<sup>9b</sup> pueden formar un anillo de 5 o 6 miembros junto con un átomo de nitrógeno al cual se unan, y este anillo puede contener además un átomo de nitrógeno, un átomo de oxígeno o un átomo de azufre y puede estar sustituido; aminosulfonilo el cual puede estar sustituido con mono o di-(alquilo C1-C4); acilo C1-C8 el cual puede estar sustituido; (alquilo C1-C4)-S(O)<sub>s<sup>b</sup></sub>-(alquileno C1-C4) en la que s<sup>b</sup> es un entero de entre 0, 1 o 2; alquilo o fenilsulfonilamino C1-C4 los cuales pueden estar sustituidos; -(CO)<sub>q<sup>b</sup></sub>NR<sup>10b</sup>R<sup>11b</sup> en la que R<sup>10b</sup> y R<sup>11b</sup> pueden ser iguales o diferentes y cada uno de ellos representa un átomo de hidrógeno o alquilo C1-C4 el cual puede estar sustituido con un átomo de halógeno o amino el cual puede estar sustituido con alquilo C1-C4, y q<sup>b</sup> es 0 o 1; o arilo o heteroarilo el cual puede estar sustituido; o una sal del mismo farmacológicamente aceptable, o un hidrato del mismo.

65

15. Método según el punto 14, en el que U<sup>b</sup> y V<sup>b</sup> representan cada uno de ellos =C(D<sup>b</sup>)- en la que D<sup>b</sup> tiene el mismo significado que el definido anteriormente, o un átomo de nitrógeno.

16. Método según el punto 14 o 15, en el que Z<sup>b</sup> representa un enlace simple.

## ES 2 280 502 T3

17. Método según uno cualquiera de los puntos 14 a 16, en el que por lo menos uno de entre T<sup>b</sup>, U<sup>b</sup>, V<sup>b</sup>, W<sup>b</sup>, X<sup>b</sup> e Y<sup>b</sup> representa un átomo de nitrógeno.

18. Método según uno cualquiera de los puntos 14 a 17, en el que A<sup>b</sup> representa un átomo de halógeno; alquilo o alcoxi C1-C4 los cuales pueden estar sustituidos con un átomo de halógeno; ciano; -(CO)<sub>r</sub><sup>b</sup>NR<sup>12b</sup>R<sup>13b</sup> en la que R<sup>12b</sup> y R<sup>13b</sup> pueden ser iguales o diferentes y cada uno de ellos representa un átomo de hidrógeno o alquilo C1-C4 el cual puede estar sustituido con un átomo de halógeno, y r<sup>b</sup> es 0 o 1; o alquenilo o alquinilo C2-C4 el cual puede estar sustituido.

19. Método según uno cualquiera de los puntos 14 a 18, en el que solamente uno de entre T<sup>b</sup>, U<sup>b</sup>, V<sup>b</sup>, W<sup>b</sup>, X<sup>b</sup> e Y<sup>b</sup> representa un átomo de nitrógeno.

20. Método según uno cualquiera de los puntos 14 a 19, en el que solamente uno de entre T<sup>b</sup>, W<sup>b</sup> e Y<sup>b</sup> representa un átomo de nitrógeno.

21. Método según el punto 1, en el que las células que no son plaquetas son células de un tejido en el cual se puede producir angiogénesis, y la inhibición de la expresión de la integrina se determina como una acción inhibitoria de la angiogénesis.

22. Método según el punto 1, en el que las células que no son plaquetas son células tumorales, y la inhibición de la expresión de la integrina se determina como una acción inhibitoria del crecimiento tumoral.

### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra el efecto del Compuesto A sobre la expresión de la integrina  $\alpha 2$ .

La Fig. 2 muestra la influencia del anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  sobre la formación de tubos.

La Fig. 3 muestra la influencia del Compuesto A sobre la formación de tubos.

La Fig. 4 muestra una acción inhibitoria del Compuesto A sobre el aumento del volumen del tumor.

La Fig. 5 muestra la influencia del Compuesto A sobre la expresión de la integrina  $\alpha 2$  en plaquetas.

### Mejor modo de llevar a cabo la invención

El método de la presente invención es un método para evaluar la influencia de un fármaco sobre la expresión de integrina, el cual comprende la etapa en la que se mide la cantidad de expresión de integrina en plaquetas de un paciente al cual se administra el fármaco, y la etapa en la que se determina la influencia del fármaco sobre la expresión de integrina en células que no sean plaquetas sobre la base de la cantidad de expresión medida.

La integrina es integrina  $\alpha 2$ . La integrina  $\alpha 2$  es uno de los miembros de la familia de moléculas de adhesión de las integrinas expresadas sobre superficies celulares. La secuencia de la integrina humana  $\alpha 2$  está registrada en el GenBank con el n.º de Acceso NM\_002203.

El Compuesto A antes mencionado reduce, en particular, la expresión de integrina  $\alpha 2$ , y presenta una acción inhibitoria de la angiogénesis y una acción contra el crecimiento tumoral. Por esta razón, el efecto de un fármaco representado por el Compuesto A se puede determinar con una sensibilidad mayor midiendo la cantidad de expresión de integrina  $\alpha 2$  en plaquetas.

Las dosis y los métodos para administrar un fármaco a un paciente no están limitados de forma específica, y se pueden usar aquellos que resulten adecuados para la finalidad del fármaco. El método de la presente invención se usa preferentemente para evaluar la influencia de un fármaco administrado por administración sistémica tal como administración oral.

Las células que no son plaquetas son células de un tejido en el cual se puede producir angiogénesis. Por ejemplo, se pueden mencionar las células endoteliales vasculares de un tejido tumoral. Además, las mismas son preferentemente fibroblastos o células tumorales, por ejemplo, células de melanoma, en las cuales a través de la integrina  $\alpha 2$  se transmiten señales tales como las correspondientes al crecimiento celular, apoptosis y diferenciación. Además, como la expresión de la integrina  $\alpha 2$  se ha confirmado en monocitos, células B y células T, también se pueden mencionar estas células. El método de la presente invención resulta también útil para realizar estimaciones de funciones de estas células.

El método usado para medir la cantidad de expresión de integrina en plaquetas no está limitado de forma específica. La cantidad de expresión de integrina se puede medir a través de un método inmunoquímico u otro similar, o se puede medir una cantidad de codificación de ARNm para la integrina.

Entre los ejemplos del método destinado a medir la cantidad de expresión de integrina basado en un método inmunoquímico se incluyen un método FACS. El método FACS es un método de medición de la intensidad de fluorescencia

## ES 2 280 502 T3

o de un factor similar de células con tinción inmunoquímica y con anticuerpos marcados con fluorescencia mediante el uso de un separador celular activado por fluorescencia.

Entre los ejemplos del método para medir la cantidad de codificación de ARNm para la integrina se incluyen la PCR cuantitativa.

De aquí en adelante se explicará detalladamente una realización de la etapa de medición de la cantidad de expresión en el siguiente orden 1. aislamiento de plaquetas, 2. cuantificación de la cantidad de integrina sobre las superficies de las plaquetas y 3. cuantificación de la cantidad de ARNm de integrina en las plaquetas.

### 1. Aislamiento de las plaquetas

Las plaquetas se pueden aislar mediante técnicas de centrifugación, filtración en gel, citometría de flujo y otras.

1) Centrifugación: Se añade a la sangre un volumen del 10% de disolución acuosa de citrato de sodio al 3,8% y la mezcla se centrifuga a 100 x g a temperatura ambiente durante 10 minutos. La capa superior se usa como plasma rico en plaquetas y se centrifuga a 1500 x g durante 10 minutos. A partir de los precipitados se obtienen plaquetas.

2) Citometría de flujo: En un citómetro de flujo se hizo fluir sangre diluida con PBS o una disolución similar y la misma se expuso a un haz de láser o un haz similar. Las plaquetas se pueden aislar con respecto a otras células sanguíneas basándose en las intensidades de la luz de dispersión frontal y la luz de dispersión lateral generadas en ese momento.

### 2. Cuantificación de la cantidad de integrina sobre las superficies de las plaquetas

La cantidad de integrina sobre las superficies de las plaquetas se puede cuantificar a través de un método inmunoquímico, por ejemplo, tinción inmunohistológica, ELISA, transferencia Western, citometría de flujo y otras similares. Por ejemplo, en el ELISA, las plaquetas se unen a una fase sólida a través de anticuerpos dirigidos a un antígeno de superficie de plaquetas y por lo tanto inmovilizados en la fase sólida, y se produce un lavado de las mismas. A continuación, con este conjunto se hacen reaccionar anticuerpos anti-integrina marcados, y la integrina sobre las superficies de las plaquetas se puede cuantificar a partir de la cantidad de las marcas de unión. En la transferencia Western, por ejemplo, las plaquetas aisladas se solubilizan en un tampón que contiene SDS y a continuación se someten a una SDS-PAGE y a una transferencia Western. La integrina transferida sobre una membrana se puede cuantificar usando anticuerpos anti-integrina marcados. En este caso, si la cantidad de plaquetas se cuantifica usando anticuerpos dirigidos a un antígeno de superficie de las plaquetas al mismo tiempo, también se puede cuantificar la cantidad de integrina por plaqueta.

En la citometría de flujo, por ejemplo, la sangre total se diluye y se une con anticuerpos anti-integrina marcados. Se puede aislar una fracción de las plaquetas basándose en la luz de dispersión frontal y la luz de dispersión lateral, y se puede cuantificar la cantidad de integrina sobre las plaquetas midiendo la intensidad de la fluorescencia sobre las mismas. La citometría de flujo se explicará posteriormente de forma específica, aunque el alcance de la presente invención no queda limitado por la explicación. Mediante el uso de la citometría de flujo, se puede cuantificar la cantidad de integrina usando sangre total sin aislar plaquetas.

4  $\mu$ l de sangre se diluyen con 396  $\mu$ l de PBS que contenía una disolución acuosa de citrato de sodio 0,0038%. Unos anticuerpos dirigidos a la integrina marcados con FITC, preferentemente anticuerpos dirigidos a la integrina  $\alpha$ 2, por ejemplo, anticuerpos anti-CD49b de ratón marcados con FITC (BD Pharmingen, Cat. n.º BD-558757) en el caso de los ratones, o anticuerpos anti-CD49b humano marcados con FITC (BD Pharmingen, Cat. n.º BD-555498) en el caso de los humanos, se diluyen con PBS que contenía BSA 0,1% hasta obtener una concentración adecuada. A 90  $\mu$ l de la sangre diluida se le añaden 10  $\mu$ l de los anticuerpos. La mezcla se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 60 minutos y se hace pasar a través de un filtro (FALCON, Cat. n.º 2235). Al residuo se le añaden 900  $\mu$ l de PBS, y se aísla una fracción de plaquetas basándose en las intensidades de la luz de dispersión frontal y la luz de dispersión lateral medidas mediante el uso de un citómetro de flujo (Becton Dickinson, FACS Calibur). Se cuantifica la integrina, preferentemente la integrina  $\alpha$ 2, sobre las plaquetas midiendo la intensidad de fluorescencia en las mismas.

### 3. Cuantificación de la cantidad de ARNm de integrina en plaquetas

#### 1) Extracción del ARN

El ARN se puede extraer con el método del tiocianato de guanidina, el método del fenol o métodos similares. Las plaquetas aisladas se disuelven en 1 ml de ISOGEN y se dejan a temperatura ambiente durante 5 minutos. A la mezcla se le añaden 0,2 ml de cloroformo, y la mezcla se agita y a continuación se deja durante 2 minutos. La mezcla de la reacción se centrifuga a 4°C durante 15 minutos a 13000 rpm (MX-150, TOMY, Rotor TMA-11), y el sobrenadante se transfiere a otro tubo. Se añaden 0,5 ml de isopropanol y la mezcla se deja a temperatura ambiente durante 5 minutos. La mezcla se centrifuga a 13000 rpm a 4°C durante 10 minutos (MX-150, TOMY, Rotor TMA-11), y el sobrenadante se descarta. A los precipitados se les añade 1 ml de disolución de etanol acuosa al 70% y la mezcla se centrifuga a 15000 rpm a 4°C durante 15 minutos (MX-150, TOMY, Rotor TMA-11). El sobrenadante se descarta, y los precipitados se disuelven en H<sub>2</sub>O libre de RNasa.

2) *Cuantificación del ARN*

El ARN se puede cuantificar mediante técnicas de análisis de transferencia Northern, análisis de transferencia de puntos, ensayo de protección contra la RNasa, RT-PCR comparativa, RT-PCR competitiva, PCR cuantitativa y otras. Se prefiere la PCR cuantitativa. A continuación se explicará la técnica de la PCR cuantitativa, aunque el ámbito de la presente invención no queda limitado por dicha explicación. La PCR cuantitativa se realiza de la forma siguiente usando una Sonda TagMan y un Sistema de Detección de Secuencias ABI Prism 7700 (Perkin-Elmer Applied Biosystems).

La operación se realiza con dos etapas de reacción de transcripción inversa y PCR. La reacción de transcripción inversa de la primera etapa se lleva a cabo añadiendo dNTP, un cebador oligo d(T)<sub>16</sub>, un inhibidor de la RNasa y Transcriptasa Inversa Multiescribe (Perkin-Elmer Applied Biosystems) al ARN obtenido, manteniendo la mezcla a 25°C durante 10 minutos y a continuación calentando la mezcla a 48°C durante 30 minutos. La mezcla se calienta a 95°C durante 5 minutos para finalizar la reacción.

El ADNc obtenido se usa en la PCR de la segunda etapa. La PCR se lleva a cabo, por ejemplo, en un sistema de reacción que comprende 2,5 ng de ADNc, 1 x tampón de PCR TagMan, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 μM de cada uno de entre dATP, dCTP y dGTP, 400 μM de dUTP, 200 nM de un par de cebadores, 0,01 U/μl de la UNG AmpErase, y 0,025 U/μl de ADN Polimerasa ApliTaq Gold (Perkin-Elmer Applied Biosystems). En cuanto a las condiciones de reacción, las reacciones se realizan a 50°C durante 2 minutos y 95°C durante 10 minutos seguidas por un ciclo que consta de reacciones a 95°C durante 20 segundos, a 55°C durante 20 segundos y a 72°C durante 30 segundos, lo cual se repite 40 veces. Los cebadores y la sonda se diseñan usando el Primer Expression (Perkin-Elmer Applied Biosystems). Para la comparación de dos o más muestras, se usan valores cuantificados después de la corrección sobre la base del nivel de ARNm de un gen de mantenimiento, el cual presenta una variación reducida en la cantidad de transcripción en cada muestra, preferentemente el nivel de ARNm de la GAPDH.

La influencia de un fármaco sobre la expresión de integrina en células que no sean plaquetas se determina basándose en la cantidad de expresión medida con la etapa de medición de la cantidad de expresión tal como se ha descrito anteriormente. Esta determinación se puede realizar basándose en la correlación de la cantidad de expresión de integrina en plaquetas con la cantidad de expresión de integrina en células que no sean plaquetas. Es decir, si la cantidad de expresión en las plaquetas disminuye, se puede determinar que el fármaco presenta una influencia de disminución de la expresión de integrina en células que no sean plaquetas. Por el contrario, cuando la cantidad de expresión en las plaquetas aumenta, se puede determinar que el fármaco presenta una influencia de aumento de la expresión de integrina en células que no sean plaquetas.

Además, la presente invención usa un reactivo de cuantificación en el método de la presente invención.

El reactivo de cuantificación es un reactivo para cuantificar integrina destinado a ser usado en el método para evaluar la influencia de un fármaco sobre la expresión de integrina, el cual comprende la etapa en la que se mide la cantidad de expresión de integrina en plaquetas de un paciente al cual se le administra el fármaco, a través de un método inmunológico, y la etapa en la que se determina la influencia del fármaco sobre la expresión de integrina en células que no sean plaquetas basándose en la cantidad de expresión medida.

Los componentes del reactivo de cuantificación pueden ser similares a reactivos destinados a ser usados en la cuantificación inmunológica de la integrina. El reactivo de cuantificación se puede producir mediante una técnica seleccionada de entre las usadas convencionalmente en la producción de reactivos de cuantificación dependiendo del método de medición basado en el método inmunológico. Habitualmente, se incluye un anticuerpo anti-integrina. El anticuerpo anti-integrina se puede marcar con una sustancia fluorescente.

El reactivo de cuantificación puede estar constituido por dos o más componentes, en forma de kit. Además, el reactivo de cuantificación se puede proporcionar como una composición que contenga además un vehículo aceptable en el uso del reactivo de cuantificación. Por ejemplo, el kit puede incluir un anticuerpo monoclonal marcado con fluorescencia dirigido a la integrina α2 o un anticuerpo monoclonal dirigido a la integrina α2 y un anticuerpo contra ratones Ig marcado con fluorescencia, un diluyente y una disolución de inmovilización.

Otro de los reactivos de cuantificación es un reactivo para cuantificar integrina destinado a ser usado en el método para evaluar la influencia de un fármaco sobre la expresión de integrina, el cual comprende la etapa en la que se mide la cantidad de expresión de integrina en plaquetas de un paciente al cual se administra el fármaco, midiendo la cantidad de codificación del ARNm para la integrina, y la etapa en la que se determina la influencia del fármaco sobre la expresión de integrina en células que no sean plaquetas basándose en la cantidad de expresión medida.

Los componentes del reactivo de cuantificación pueden ser similares a los correspondientes a los reactivos usados en la cuantificación de la codificación del ARNm para la integrina. El reactivo de cuantificación se puede producir mediante una técnica seleccionada de entre las usadas convencionalmente en la producción de reactivos de cuantificación sobre la base del método de cuantificación del ARNm. Entre los ejemplos del método se incluyen aquellos que se basan en la PCR, la hibridación, etcétera. Habitualmente, el reactivo incluye un ácido nucleico complementario con la codificación del ARNm para la integrina, el cual se puede usar como cebador o sonda. Los cebadores y las sondas pueden diseñar fácilmente los expertos en la materia basándose en la codificación consecutivas de nucleótidos para integrinas conocidas.

## ES 2 280 502 T3

El reactivo de cuantificación puede estar constituido por dos o más componentes en forma de kit. Además, el reactivo de cuantificación se puede proporcionar en forma de una composición que contenga además un vehículo aceptable en el uso del reactivo de cuantificación. Por ejemplo, el kit puede incluir cebadores de PCR, preferentemente cebadores marcados para PCR cuantitativa, un cebador de control y ADN de control.

5

El fármaco es preferentemente un compuesto de sulfonamida representado por la fórmula general (I), (I<sup>a</sup>) o (I<sup>b</sup>), o una sal del mismo aceptable farmacológicamente, o un hidrato de ellos.

El anillo arilo C6-C10 o el anillo heteroarilo de entre 6 y 10 miembros representados por B y R en la fórmula general (I), los cuales pueden estar sustituidos y parcialmente saturados, significa un grupo hidrocarburo aromático que tiene entre 6 y 10 átomos de carbono o un heterociclo aromático de entre 6 y 10 miembros que contiene por lo menos uno de entre un átomo de nitrógeno, un átomo de oxígeno y azufre como heteroátomo, pudiendo presentar cada uno de ellos uno o más sustituyentes sobre el mismo y pudiendo estar parcialmente saturados. Entre los ejemplos específicos de los mismos se incluyen benceno, piridina, pirimidina, pirazina, piridazina, naftaleno, quinolina, isoquinolina, ftalazina, naftiridina, quinoxalina, quinazolina, cinolina, indol, isoindol, indolizina, indazol, benzofurano, benzotiofeno, benzoxazol, bencimidazol, benzopirazol, benzotiazol, 4,5,6,7-tetrahidroindol, 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina, 2,3-dihidrobenzofurano, indano, tetralona, indolina, isoindolina, cromano, tetralina y otros. Los anillos aromáticos antes mencionados pueden tener entre uno y tres sustituyentes. Cuando hay presentes dos o más sustituyentes, los mismos pueden ser iguales o diferentes. Entre los ejemplos de los sustituyentes se incluyen amino el cual puede estar sustituido con un alquilo inferior o un cicloalquilo inferior; alquilo inferior; alcoxi inferior; hidroxilo; nitro; mercapto; ciano; alquiltío inferior; halógeno; un grupo representado por la fórmula -a<sup>a</sup>-b<sup>a</sup> en la que a<sup>a</sup> representa un enlace simple, -(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub><sup>a</sup>-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub><sup>a</sup>-, -S-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub><sup>a</sup>- o -N(R<sup>3a</sup>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub><sup>a</sup>- en las que k<sup>a</sup> es un entero de entre 1 a 5, y R<sup>3a</sup> representa un átomo de hidrógeno o alquilo inferior, y b<sup>a</sup> representa -CH<sub>2</sub>-d<sup>a</sup> en el que d<sup>a</sup> representa amino el cual puede estar sustituido con alquilo inferior, un átomo de halógeno, hidroxilo, alquiltío inferior, ciano o alcoxi inferior; un grupo representado por la fórmula -a<sup>a</sup>-e<sup>a</sup>-f<sup>a</sup> en la que a<sup>a</sup> tiene el mismo significado que el definido anteriormente, e<sup>a</sup> representa -S(O)- o -S(O)<sub>2</sub>-, y f<sup>a</sup> representa amino el cual puede estar sustituido con alquilo inferior o alcoxi inferior, alquilo inferior, trifluorometilo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub><sup>a</sup>-b<sup>a</sup> o -N(R<sup>4a</sup>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub><sup>a</sup>-b<sup>a</sup> en la que b<sup>a</sup> tiene el mismo significado que el definido anteriormente, R<sup>4a</sup> representa un átomo de hidrógeno o alquilo inferior, y m<sup>a</sup> es un entero de entre 1 a 5; un grupo representado por la fórmula -a<sup>a</sup>-g<sup>a</sup>-h<sup>a</sup> en la que a<sup>a</sup> tiene el mismo significado que el definido anteriormente, g<sup>a</sup> representa -C(O)- o -C(S)-, y h<sup>a</sup> representa amino el cual puede estar sustituido con alquilo inferior, hidroxilo, alquilo inferior, alcoxi inferior, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub><sup>a</sup>-b<sup>a</sup> o -N(R<sup>5a</sup>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub><sup>a</sup>-b<sup>a</sup> en la que b<sup>a</sup> tiene el mismo significado que el definido anteriormente, R<sup>5a</sup> representa un átomo de hidrógeno o alquilo inferior, y n<sup>a</sup> es un entero de entre 1 a 5; un grupo representado por la fórmula -a<sup>a</sup>-N(R<sup>6a</sup>)-g<sup>a</sup>-i<sup>a</sup> en la que a<sup>a</sup> y g<sup>a</sup> tienen los mismos significados que los definidos anteriormente, R<sup>6a</sup> representa un átomo de hidrógeno o alquilo inferior, e i<sup>a</sup> representa un átomo de hidrógeno, un grupo alcoxi inferior o f<sup>a</sup> (f<sup>a</sup> tiene el mismo significado que el definido anteriormente); un grupo representado por la fórmula -a<sup>a</sup>-N(R<sup>7a</sup>)-e<sup>a</sup>-f<sup>a</sup> en la que a<sup>a</sup>, e<sup>a</sup> y f<sup>a</sup> tienen los mismos significados que los definidos anteriormente, y R<sup>7a</sup> representa un átomo de hidrógeno o alquilo inferior; un grupo representado por la fórmula -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub><sup>a</sup>-j<sup>a</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub><sup>a</sup>-b<sup>a</sup> en la que j<sup>a</sup> representa un átomo de oxígeno o un átomo de azufre, b<sup>a</sup> tiene el mismo significado que el definido anteriormente, y p<sup>a</sup> y q<sup>a</sup> pueden ser iguales o diferentes y cada uno de ellos representa un entero de entre 1 a 5; un grupo representado por la fórmula -(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub><sup>a</sup>-Ar<sup>a</sup> en la que Ar<sup>a</sup> representa fenilo o heteroarilo el cual puede estar sustituido con alquilo inferior, alcoxi inferior o un átomo de halógeno, y u<sup>a</sup> es un entero de entre 0 o 1 a 5; un grupo representado por la fórmula -CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>v</sub><sup>a</sup>-Ar<sup>a</sup> en la que Ar<sup>a</sup> y u<sup>a</sup> tienen los mismos significados que los definidos anteriormente; un grupo representado por la fórmula -SO<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub><sup>a</sup>-Ar<sup>a</sup> en la que Ar<sup>a</sup> y u<sup>a</sup> tienen los mismos significados que los definidos anteriormente; y otros.

En los compuestos representados por la fórmula general (I), R representa preferentemente indol, quinolina o isoquinolina.

En la anterior fórmula general (I<sup>a</sup>), el “anillo aromático monocíclico o bicíclico el cual puede estar sustituido” representado por A<sup>a</sup> es un anillo de hidrocarburo aromático o un heterociclo aromático que contiene por lo menos uno de entre un átomo de nitrógeno, un átomo de oxígeno y un átomo de azufre, pudiendo presentar cada uno de ellos entre uno y tres sustituyentes en el anillo. Entre los ejemplos típicos del anillo aromático contenido en A<sup>a</sup> se incluyen pirrol, pirazol, imidazol, tiofeno, furano, tiazol, oxazol, benceno, piridina, pirimidina, pirazina, piridazina, naftaleno, quinolina, isoquinolina, ftalazina, naftiridina, quinoxalina, quinazolina, cinolina, indol, isoindol, indolizina, indazol, benzofurano, benzotiofeno, benzoxazol, bencimidazol, benzopirazol, benzotiazol y otros. Los anillos aromáticos antes mencionados pueden tener entre uno y tres sustituyentes. Cuando hay presentes dos o más sustituyentes, los mismos pueden ser iguales o diferentes. Entre los ejemplos de los sustituyentes se incluyen amino el cual puede estar sustituido con un alquilo inferior o un cicloalquilo inferior; alquilo inferior; alcoxi inferior; hidroxilo; nitro; mercapto; ciano; alquiltío inferior; halógeno; un grupo representado por la fórmula -a<sup>a</sup>-b<sup>a</sup> en la que a<sup>a</sup> representa un enlace simple, -(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub><sup>a</sup>-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub><sup>a</sup>-, -S-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub><sup>a</sup>- o -N(R<sup>3a</sup>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub><sup>a</sup>- en las que k<sup>a</sup> es un entero de entre 1 a 5, y R<sup>3a</sup> representa un átomo de hidrógeno o alquilo inferior, y b<sup>a</sup> representa -CH<sub>2</sub>-d<sup>a</sup> en el que d<sup>a</sup> representa amino el cual puede estar sustituido con alquilo inferior, halógeno, hidroxilo, alquiltío inferior, ciano o alcoxi inferior; un grupo representado por la fórmula -a<sup>a</sup>-e<sup>a</sup>-f<sup>a</sup> en la que a<sup>a</sup> tiene el mismo significado que el definido anteriormente, e<sup>a</sup> representa -S(O)- o -S(O)<sub>2</sub>-, y f<sup>a</sup> representa amino el cual puede estar sustituido con alquilo inferior o alcoxi inferior, alquilo inferior, trifluorometilo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub><sup>a</sup>-b<sup>a</sup> o -N(R<sup>4a</sup>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub><sup>a</sup>-b<sup>a</sup> en la que b<sup>a</sup> tiene el mismo significado que el definido anteriormente, R<sup>4a</sup> representa un átomo de hidrógeno o alquilo inferior, y m<sup>a</sup> es un entero de entre 1 a 5; un grupo representado por la fórmula -a<sup>a</sup>-g<sup>a</sup>-h<sup>a</sup> en la que a<sup>a</sup> tiene el mismo significado que el definido anteriormente, g<sup>a</sup> representa -C(O)- o -C(S)-, y h<sup>a</sup> representa amino el cual puede estar sustituido con alquilo inferior, hidroxilo, alquilo inferior, alcoxi inferior, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub><sup>a</sup>-b<sup>a</sup> o -N(R<sup>5a</sup>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub><sup>a</sup>-b<sup>a</sup> en la que b<sup>a</sup> tiene el mismo significado que el definido anteriormente, R<sup>5a</sup> representa

## ES 2 280 502 T3

un átomo de hidrógeno o alquilo inferior, y  $n^a$  es un entero de entre 1 a 5; un grupo representado por la fórmula  $-a^a-N(R^{6a})-g^a-i^a$  en la que  $a^a$  y  $g^a$  tienen los mismos significados que los definidos anteriormente,  $R^{6a}$  representa un átomo de hidrógeno o alquilo inferior, e  $i^a$  representa un átomo de hidrógeno, alcoxi inferior o  $f^a$  ( $f^a$  tiene el mismo significado que el definido anteriormente); un grupo representado por la fórmula  $-a^a-N(R^{7a})-e^a-f^a$  en la que  $a^a$ ,  $e^a$  y  $f^a$  tienen los mismos significados que los definidos anteriormente, y  $R^{7a}$  representa un átomo de hidrógeno o alquilo inferior; un grupo representado por la fórmula  $-(CH_2)_p^a-j^a-(CH_2)_q^a-b^a$  en la que  $j^a$  representa un átomo de oxígeno o un átomo de azufre,  $b^a$  tiene el mismo significado que el definido anteriormente, y  $p^a$  y  $q^a$  pueden ser iguales o diferentes y cada uno de ellos representa un entero de entre 1 a 5; un grupo representado por la fórmula  $-(CH_2)_u^a-Ar^a$  en la que  $Ar^a$  representa fenilo o heteroarilo el cual puede estar sustituido con alquilo inferior, alcoxi inferior o halógeno, y  $u^a$  es 0 o un entero de entre 1 a 5; un grupo representado por la fórmula  $-CONH-(CH_2)_u^a-Ar^a$  en la que  $Ar^a$  y  $u^a$  tienen los mismos significados que los definidos anteriormente; un grupo representado por la fórmula  $-SO_2-(CH_2)_u^a-Ar^a$  en la que  $Ar^a$  y  $u^a$  tienen los mismos significados que los definidos anteriormente; y otros.

En los ejemplos antes mencionados de los sustituyentes, cuando el sustituyente es amino sustituido con dos grupos alquilo, estos grupos alquilo se pueden unir para formar un anillo de 5 o 6 miembros. Además, cuando  $A^a$  es un heterociclo que contiene nitrógeno con hidroxilo o mercapto, estos grupos pueden estar presentes en forma de un grupo oxo o tioxo por resonancia.

El "anillo de hidrocarburo insaturado de 6 miembros o heterociclo de 6 miembros insaturado que contiene un átomo de nitrógeno como heteroátomo, el cual puede estar sustituido" representado por  $B^a$  es benceno o piridina los cuales pueden estar parcialmente hidrogenados y pueden tener uno o dos sustituyentes en el anillo. Cuando hay presentes dos sustituyentes, los mismos pueden ser iguales o diferentes.

El "heterociclo de 5 miembros que contiene uno o dos átomos de nitrógeno el cual puede estar sustituido" representado por  $C^a$  es pirrol, pirazol o imidazol el cual puede estar parcialmente hidrogenado y puede tener uno o dos sustituyentes en el anillo. Cuando hay presentes dos sustituyentes, los mismos pueden ser iguales o diferentes.

Entre los ejemplos de los sustituyentes que pueden tener  $B^a$  y  $C^a$  se incluyen, por ejemplo, halógeno; ciano; alquilo inferior; alcoxi inferior; hidroxilo; oxo; un grupo representado por la fórmula  $-C(O)-r^a$  en la que  $r^a$  representa un átomo de hidrógeno, amino el cual puede estar sustituido con alquilo inferior, alquilo inferior, alcoxi inferior o hidroxilo; amino el cual puede estar sustituido con alquilo inferior; trifluorometilo; y otros.

En la anterior fórmula general ( $I^a$ ), el grupo alquilo inferior en las definiciones de  $R^{1a}$  y  $R^{2a}$  así como los sustituyentes que pueden tener  $A^a$ ,  $B^a$  y  $C^a$  significa un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene entre 1 y 6 átomos de carbono. Entre los ejemplos de los mismos se incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, tert-butilo, n-pentilo (amilo), isopentilo, neopentilo, tert-pentilo, 1-metilbutilo, 2-metilbutilo, 1,2-dimetilpropilo, n-hexilo, isohexilo, 1-metilpentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 1,1-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo, 3,3-dimetilbutilo, 1-etilbutilo, 2-etilbutilo, 1,1,2-trimetilpropilo, 1,2,2-trimetilpropilo, 1-etil-1-metilpropilo, 1-etil-2-metilpropilo y otros. Entre estos, se prefieren el metilo, el etilo, el n-propilo, el isopropilo, el n-butilo y el isobutilo, y los más preferidos de entre estos últimos son el metilo, el etilo, el n-propilo y el isopropilo.

El grupo cicloalquilo inferior en las definiciones de los sustituyentes que puede tener  $A^a$  es un grupo cicloalquilo que tiene entre 3 y 8 átomos de carbono, y entre los ejemplos del mismo se incluyen ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo y otros.

El grupo alcoxi inferior en las definiciones de los sustituyentes que pueden tener  $A^a$ ,  $B^a$  y  $C^a$  significa alcoxi inferior obtenido a partir del alquilo inferior antes mencionado tal como metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, isobutoxi y tert-butoxi. Entre estos, los más preferidos son metoxi y etoxi. El alquiltío inferior significa alquiltío inferior obtenido a partir del alquilo inferior antes mencionado. Entre los ejemplos del átomo de halógeno se incluye un átomo de flúor, un átomo de cloro, un átomo de bromo y otros.

Entre estos, los compuestos particularmente preferidos incluyen:

- 1) N-(3-ciano-4-metil-1H-indol-7-il)-3-cianobencenosulfonamida
- 2) N-(3-ciano-4-metil-1H-indol-7-il)-6-cloro-3-piridinasulfonamida
- 3) N-(3-bromo-5-metil-1H-indol-7-il)-4-sulfamoilbencenosulfonamida
- 4) N-(5-bromo-3-cloro-1H-indol-7-il)-6-amino-3-piridinasulfonamida
- 5) N-(3-bromo-5-metil-1H-indol-7-il)-3-cianobencenosulfonamida
- 6) N-(4-bromo-1H-indol-7-il)-4-cianobencenosulfonamida
- 7) N-(4-cloro-1H-indol-7-il)-6-amino-3-piridinasulfonamida

## ES 2 280 502 T3

8) N-(3-bromo-4-cloro-1H-indol-7-il)-6-amino-3-piridinasulfonamida

9) N-(3-bromo-5-metil-1H-indol-7-il)-5-ciano-2-tiofenosulfonamida

5 10) N-(4-bromo-3-cloro-1H-indol-7-il)-2-amino-5-pirimidinsulfonamida

11) N-(3-cloro-1H-indol-7-il)-4-sulfamoilbencenosulfonamida y otros.

El derivado de sulfonamida representado por la fórmula general (I<sup>a</sup>) puede formar una sal con un ácido o una base.  
10 La presente invención incluye también sales de los compuestos representados por la fórmula general (I<sup>a</sup>). Entre los ejemplos de la sal con un ácido se incluyen sales con ácidos inorgánicos tales como hidroclouros, hidrobromuros y sulfatos y sales con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido láctico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido metanosulfónico y ácido p-toluensulfónico, y entre los ejemplos de la sal con una base se incluyen sales inorgánicas tales como sales de sodio, sales de potasio y sales de calcio y sales con bases orgánicas tales como trietilamina, arginina y lisina.  
15

En la presente invención, el “anillo aromático el cual puede tener uno o dos átomos de nitrógeno” representado por Q<sup>b</sup> significa un hidrocarburo aromático o un heterociclo aromático de 6 miembros el cual contiene uno o dos átomos de nitrógeno. Entre los ejemplos del anillo aromático contenido en Q<sup>b</sup> se incluyen benceno, piridina, pirimidina, pirazina, piridazina y otros. Además, el “anillo policíclico o monocíclico insaturado C5-12 el cual puede tener entre 1 y 4 heteroátomos seleccionados de entre un átomo de nitrógeno, un átomo de oxígeno y un átomo de azufre” representado por M es un anillo monocíclico o policíclico insaturado, el cual comparte un enlace doble con Q<sup>b</sup>. Entre los ejemplos de estos últimos se incluyen hidrocarburos aromáticos tales como benceno y naftaleno, hidrocarburos insaturados tales como ciclopenteno, ciclohexeno, ciclohepteno, cicloocteno, ciclopentadieno, cicloheptadieno y ciclooctadieno, y heterociclos insaturados tales como tetrahidropiridina, pirrol, furano, tiofeno, oxazol, isoxazol, tiazol, isotiazol, pirazol, imidazol, triazol, piridina, pirimidina, pirazina, piridazina, triazina, indol, isoindol, quinolina, isoquinolina, indazolidina, naftiridina, benzofurano, benzopirano, benzotiofeno, bencimidazol, benzoxazol, benzotiazol, pirrolopiridina, piridopirimidina e imidazopiridina. Además, la expresión “Q<sup>b</sup> y M<sup>b</sup> pueden compartir un átomo de nitrógeno” significa el caso en el que un átomo de nitrógeno está contenido en los sitios de condensación de ambos anillos. Entre los ejemplos de anillo formado de esta manera se incluyen indazolidina, imidazo[1,2-a]piridina, imidazo[1,5-a]piridina, pirazolo[1,5-a]pirimidina y otros.  
20  
25  
30

En la presente invención, el alquilo C1-C4 de R<sup>1b</sup>, R<sup>4b</sup> y R<sup>5b</sup> o el alquilo C1-C4 del alquilo C1-C4 el cual puede estar sustituido con un átomo de halógeno en A<sup>b</sup>, D<sup>b</sup>, R<sup>1b</sup>, R<sup>2b</sup>, R<sup>3b</sup>, R<sup>6b</sup>, R<sup>7b</sup>, R<sup>8b</sup>, R<sup>9b</sup>, R<sup>10b</sup>, R<sup>11b</sup>, R<sup>12b</sup>, R<sup>13b</sup>, R<sup>14b</sup>, R<sup>15b</sup>, G<sup>1b</sup>, G<sup>2b</sup> y Grupo A significa un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene entre 1 y 4 átomos de carbono, y entre los ejemplos de los mismos se incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo y tert-butilo. La expresión “puede estar sustituido con un átomo de halógeno” significa que estos grupos alquilo se pueden sustituir con un átomo de halógeno seleccionado de entre un átomo de flúor, un átomo de cloro, un átomo de bromo y un átomo de yodo. Los ejemplos incluyen monofluorometilo, monoclorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, 1- o 2-monofluoroetilo, 1- o 2-monocloroetilo, 1- o 2-monobromoetilo, 1,2-difluoroetilo, 1,2-dicloroetilo, 1,1,2,2,2-pentafluoroetilo, 3,3,3-trifluoropropilo y otros. Entre estos, se prefieren el monofluorometilo, el difluorometilo, el trifluorometilo, el 1- o 2-monofluoroetilo, el 1,2-difluoroetilo, el 1,1,2,2,2-pentafluoroetilo y otros.  
35  
40

En la presente invención el alcoxi C1-C4 en el alcoxi C1-C4 el cual puede estar sustituido con un átomo de halógeno en A<sup>b</sup>, D<sup>b</sup> y el Grupo A significa un alcoxi lineal o ramificado que tiene entre 1 y 4 átomos de carbono. Entre los ejemplos del mismo se incluyen metoxi, etoxi, n-propiloxi, isopropiloxi, n-butiloxi, isobutiloxi, sec-butiloxi y tert-butiloxi. La expresión “puede estar sustituido con un átomo de halógeno” significa que el alcoxi se puede sustituir con un átomo de halógeno seleccionado de entre un átomo de flúor, un átomo de cloro, un átomo de bromo y un átomo de yodo. Entre los ejemplos se incluyen monofluorometoxi, difluorometoxi, trifluorometoxi, 1- o 2-monofluoroetoxi, 1- o 2-monocloroetoxi, 1- o 2-monobromoetoxi, 1,2-difluoroetoxi, 1,1,2,2,2-pentafluoroetoxi, 3,3,3-trifluoropropiloxi y otros. Entre estos, se prefieren monofluorometoxi, difluorometoxi, trifluorometoxi, 1- o 2-monofluoroetoxi, 1,2-difluoroetoxi, 1,1,2,2,2-pentafluoroetoxi y otros.  
45  
50

En la presente invención, el alqueno o alquino C2-C4 el cual está presente en A<sup>b</sup> y D<sup>b</sup> significa alqueno o alquino que tiene entre 2 y 4 átomos de carbono. Entre los ejemplos de los mismos se incluyen vinilo, alilo, 2- o 3-butenilo, 1,3-butadienilo, etinilo, 2-propinilo, 2-metiletinilo, 2- o 3-butenilo y otros.  
55

En la presente invención, el arilo que está presente en B<sup>b</sup> y el Grupo A significa un hidrocarburo aromático. Entre los ejemplos del mismo se incluyen fenilo, naftilo y otros. Además, el heteroarilo es un anillo monocíclico o policíclico que contiene uno o más átomos de nitrógeno, oxígeno y azufre. Entre los ejemplos del mismo se incluyen pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, furilo, tienilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, tiadiazolilo, piridilo, pirimidilo, pirazilo, indolilo, indolizínilo, benzoimidazolilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, quinolinilo, isoquinolinilo, quinazolinilo, ftalazínilo y otros.  
60

En la presente invención, la expresión “R<sup>8b</sup> y R<sup>9b</sup> pueden formar un anillo de 5 o 6 miembros junto con un átomo de nitrógeno al cual se unen, y el anillo puede contener además un átomo de nitrógeno, un átomo de oxígeno o un átomo de azufre” en las definiciones de R<sup>8b</sup> y R<sup>9b</sup> significa que R<sup>8b</sup> y R<sup>9b</sup> pueden formar pirrolidinilo, piperidinilo, morfolino, tiomorfolino, piperacínilo o similares junto con el átomo de nitrógeno al cual se unen.  
65

## ES 2 280 502 T3

En la presente invención, el alquilo del aminosulfonilo el cual puede estar sustituido con mono- o di(alquilo C1-C4), (alquilo C1-C4), (alquilo C1-C4)-S(O)<sub>s</sub><sup>b</sup>-(alquileo C1-C4), alquilo C1-C4 o fenilsulfonilamino el cual puede estar sustituido y el alquilo C1-C4 el cual puede estar sustituido con alquilo C1-C4 en el Grupo A significan los mismos grupos alquilo que se han definido anteriormente. Entre los ejemplos del alquileo se incluyen metileno, etileno, propileno, butileno, metilmileno, 1- o 2-metiletileno, 1-, 2- o 3-metilpropileno, dimetilmileno y otros.

Además, el alcanilo C1-C8 significa formilo, acetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, valerilo, benzoilo o similares.

En la presente invención, el grupo protector en el “grupo amino que puede tener un grupo protector” presente en J<sup>b</sup> no está limitado de forma específica siempre que se sepa que el grupo es un grupo protector de amino para la síntesis orgánica habitual. Entre los ejemplos del mismo se incluyen benciloxicarbonilo, t-butoxicarbonilo, formilo, acetilo, cloroacetilo, 2,2,2-tricloroetilo, bencilideno, benzhidrido, tritilo y otros. Además, el grupo protector en el carboxi el cual puede tener un grupo protector y el grupo protector del carboxi en R<sup>16b</sup> no están limitados de forma específica siempre que se sepa que los grupos son un grupo protector de carboxi en la síntesis orgánica habitual. Entre los ejemplos de los mismos se incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, t-butilo, metoximetilo, 2,2,2-tricloroetilo, pivaloiloiloximetilo, bencilo y otros.

En la presente invención, entre los ejemplos del sustituyente para la expresión “el cual puede estar sustituido” o “el cual puede tener un sustituyente” se incluyen un átomo de halógeno; alquilo o alcoxi C1-C4 el cual puede estar sustituido con un átomo de halógeno; hidroxilo; hidroxi(alquilo C1-C4); amino el cual puede estar sustituido con mono- o di-(alquilo C1-C4); alqueno o alquino C2-C4; ciano; acilo C1-C8; aminosulfonilo el cual puede estar sustituido con mono- o di-(alquilo C1-C4); carboxi; (alcoxi C1-C4)carbonilo; carbamoilo el cual puede estar sustituido con mono- o di-(alquilo C1-C4); y otros.

Los compuestos heterocíclicos que contienen sulfonamida representados por la fórmula general (I<sup>b</sup>) pueden formar una sal con un ácido o una base. La presente invención incluye también sales de los compuestos representados por la fórmula general (I<sup>b</sup>). Entre los ejemplos de la sal con un ácido se incluyen sales con ácidos inorgánicos tales como hidroclouros, hidrobromuros y sulfatos y sales con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido láctico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido metanosulfónico y ácido p-toluensulfónico. Además, entre los ejemplos de la sal con una base se incluyen sales inorgánicas tales como sales de sodio, sales de potasio y sales de calcio y sales con bases orgánicas tales como trietilamina, arginina y lisina.

Los hidratos así como los isómeros ópticos de estos compuestos, en el caso de que existan, están todos ellos incluidos evidentemente en el alcance de los compuestos. Además, también se incluyen compuestos los cuales se forman *in vivo* a partir de estos compuestos mediante metabolismo tal como oxidación, reducción, hidrólisis y conjugación y que presentan una acción inhibitoria de la angiogénesis. Además, la presente invención incluye también compuestos los cuales experimentan metabolismo tal como oxidación, reducción e hidrólisis *in vivo* para producir los compuestos de la presente invención.

Los compuestos destinados a ser usados en la presente invención se pueden producir a través de varios métodos. Por ejemplo, algunos de los métodos se dan a conocer específicamente en los documentos de publicación de patente japonesa (Kokai) n.º 7-165708 y 8-231505.

### Ejemplos

Se explicará más específicamente la presente invención haciendo referencia a los siguientes ejemplos.

#### Ejemplo de Referencia 1

##### *Efecto del Compuesto A sobre la expresión de integrina $\alpha 2$*

A partir de cordón umbilical humano se aislaron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) y las mismas se cultivaron en un medio EGM (FCS 2%, libre de hidrocortisona, Clonetics). Las células se subcultivaron en un matraz recubierto con colágeno de tipo I (Sumilon), y se usaron del cuarto al sexto subcultivos. El anticuerpo anti-integrina humana  $\alpha 2$  (A2-III10) se adquirió en Upstate Biotechnology Inc. El anticuerpo anti-CD31 humano (JC/70A) y un fragmento F(ab')<sub>2</sub> marcado con FITC de inmunoglobulina de conejo anti-ratón se adquirieron en Dako.

Las células se inocularon en un matraz de 25 cm<sup>2</sup> para el cultivo de las mismas y se cultivaron a 37°C en un incubador de CO<sub>2</sub>. Después de 3 horas, el medio se sustituyó con el mismo medio con el Compuesto A (5, 50, 500 ng/ml) y se cultivó adicionalmente durante 48 horas. Las células se recogieron, y 2 x 10<sup>5</sup> células se dejaron flotar en 100  $\mu$ l de PBS (BSA 0,1%, NaN<sub>3</sub> 0,05%). Se añadió 1  $\mu$ g del anticuerpo primario, y las células se incubaron a 4°C durante 30 minutos, se lavaron con PBS y a continuación se incubaron con el anticuerpo secundario marcado con FITC durante 30 minutos. Las células se lavaron con PBS y a continuación se inmovilizaron con CellFix (Becton

## ES 2 280 502 T3

Dickinson). Se midió el valor de fluorescencia de  $2 \times 10^4$  de cada muestra usando un método FACS Calibur (Becton Dickinson). Se obtuvo la cantidad de expresión de la molécula de la superficie celular mediante la corrección del valor de fluorescencia de cada muestra usando el valor de fluorescencia de la muestra de control, la cual no contenía el anticuerpo primario (siguiente ecuación).

5

$$\text{RMFI (intensidad de fluorescencia media relativa)} = \frac{\text{MFI de la Muestra (intensidad de fluorescencia media)}}{\text{MFI de Fondo}}$$

10 Tal como se muestra en la Fig. 1, el Compuesto A (50, 500 ng/ml) redujo la cantidad de expresión de la integrina  $\alpha 2$  en las HUVEC.

Ejemplo de Referencia 2

15

*Influencia del anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  y el Compuesto A sobre la formación de tubos*

Se colocó gel de colágeno de tipo I en cada pocillo de una placa de 24 pocillos y el mismo se dejó gelificar, y se inocularon, a una densidad de entre  $1$  y  $1,2 \times 10^5$  células por pocillo, células HUVEC suspendidas en un medio sin suero (Medio de Crecimiento Basal SFM-Endotelial Humano, GIBCO BRL) que contenía 10 ng/ml de EGF (GIBCO BRL) y 20 ng/ml de bFGF (GIBCO BRL) o 20 ng/ml de VEGF (Wako Pure Chemical Industries). Las células se cultivaron durante la noche a  $37^\circ\text{C}$ , y se cubrieron con gel de colágeno de tipo I para la gelificación. A continuación, se añadió el medio sin suero antes mencionado (que contenía EGF y bFGF o VEGF) con un fármaco (anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  o Compuesto A) y las células se cultivaron adicionalmente a  $37^\circ\text{C}$  durante 4 días. Para estudiar la acción del anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$ , el experimento se efectuó usando una placa de 96 pocillos.

Después del cultivo, las células se tiñeron con MTT, y los tubos formados por las HUVEC se fotografiaron bajo un microscopio. La fotografía se digitalizó mediante un escáner, y se cuantificó la formación de tubos por HUVEC midiendo las longitudes de los tubos mediante el uso de un software de análisis de imágenes, Mac SCOPE 2.56 (MITANI).

Tal como se muestra en la Fig. 2, se descubrió que el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  inhibía la formación de tubos de HUVEC inducida por bFGF, lo cual indicaba que la integrina  $\alpha 2$  estaba implicada en la formación de tubos inducida por bFGF. Además, tal como se muestra en la Fig. 3, el Compuesto A inhibía la formación de tubos de HUVEC inducida por bFGF o VEGF. Junto con los resultados del Ejemplo de Referencia 2, se consideró que el Compuesto A inhibía la formación de tubos inhibiendo la expresión de la integrina  $\alpha 2$ .

Ejemplo 1

*Correlación de la acción inhibitoria del aumento del volumen del tumor y la acción inhibitoria de la expresión de integrina  $\alpha 2$  en plaquetas, del Compuesto A*

Se transplantaron al subcutis de un ratón (SLC KSN, hembra, Lot. n.º 085605376)  $100 \mu\text{l}$  de suspensión de KP-1 (cepa celular de cáncer pancreático humano) en PBS ( $5 \times 10^7$  células/ml). A partir de una semana después del trasplante, se le administró oralmente dos veces al día una disolución acuosa de metilcelulosa 0,5% (vehículo) o 100 o 200 mg/kg del Compuesto A (suspensión en metilcelulosa 0,5%). El peso corporal y el volumen del tumor se midieron diariamente. El ratón se anestesió con éter dietílico, y se extrajo sangre del fondo ocular usando un tubo capilar diariamente. Se diluyeron  $4 \mu\text{l}$  de sangre con  $396 \mu\text{l}$  de PBS que contenía una disolución acuosa de citrato de sodio 0,0038%. El anticuerpo anti-CD49b de ratón marcado con FITC (Pharmingen, Cat. n.º 09794D, Lot. n.º M006073) se diluyó 30 veces con PBS que contenía BSA 0,1%. A  $90 \mu\text{l}$  de la sangre diluida se le añadieron  $10 \mu\text{l}$  del anticuerpo. La mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 60 minutos y se hizo pasar a través de un filtro (FALCON, Cat. n.º 2235). Al residuo se le añadieron  $900 \mu\text{l}$  de PBS, y se separó una fracción de plaquetas basándose en la luz de dispersión frontal y la luz de dispersión lateral mediante el uso de un citómetro de flujo (Becton Dickinson, FACS Calibur), y se midió la intensidad de la fluorescencia en las plaquetas.

Tal como se muestra en la Fig. 4, el Compuesto A inhibía el aumento del volumen tumoral KP-1 con unas dosis de 100 mg/kg y 200 mg/kg. Junto con los resultados de los Ejemplos de Referencia 1 y 2, se consideró que el Compuesto A inhibía la formación de tubos inhibiendo la expresión de integrina  $\alpha 2$  e inhibía la angiogénesis inducida por el tumor, dando como resultado la inhibición del aumento del volumen tumoral.

Tal como se muestra en la Fig. 5, el Compuesto A reducía la cantidad de expresión de integrina  $\alpha 2$  en las plaquetas medidas al mismo tiempo. La reducción de la cantidad de expresión de integrina  $\alpha 2$  en plaquetas se observó con dosis de 100 mg/kg y 200 mg/kg, en las cuales se observó la inhibición del aumento del volumen tumoral. De este modo, se demostró que la cantidad de expresión de integrina  $\alpha 2$  en las plaquetas se podía usar como marcador indirecto de la acción inhibitoria del Compuesto A sobre el aumento del volumen tumoral.

**Aplicabilidad industrial**

Según la presente invención, resulta posible monitorizar la eficacia de un fármaco, por ejemplo, un inhibidor de la angiogénesis, el cual manifiesta su eficacia farmacológica inhibiendo la expresión de integrina, mediante el uso de la cantidad de expresión de integrina en las plaquetas como marcador indirecto. Como las plaquetas se pueden extraer fácilmente en forma de muestras, resulta posible realizar una monitorización eficaz.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Método para evaluar la influencia de un fármaco sobre la expresión de integrina, que comprende la etapa en la que se mide la cantidad de expresión de integrina en plaquetas recogidas de un paciente al cual se le administra el fármaco y la etapa en la que se determina la influencia del fármaco sobre la expresión de integrina en células que no son plaquetas sobre la base de la reducción de la cantidad de expresión medida, en el que la integrina es integrina  $\alpha 2$ , y las células son células de un tejido en el cual se puede producir angiogénesis o células tumorales.

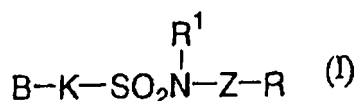
2. Método según la reivindicación 1, en el que la cantidad de expresión de integrina se mide a través de un método inmunoquímico.

3. Método según la reivindicación 2, en el que el método inmunoquímico es un método de citometría de flujo.

4. Método según la reivindicación 1, en el que la cantidad de expresión de integrina se mide midiendo una cantidad de codificación de ARNm para la integrina.

5. Método según la reivindicación 4, en el que la cantidad de ARNm se mide mediante una PCR cuantitativa.

6. Método según la reivindicación 1, en el que el fármaco es un compuesto de sulfonamida representado por la fórmula general (I):



en la que

B representa un anillo arilo C6-C10 o un anillo heteroarilo de entre 6 y 10 miembros, pudiendo estar cada uno de ellos sustituido y parcialmente saturado;

K representa un enlace simple, -CH=CH- o  $-(CR^{4b}R^{5b})_m$ , en el que  $R^{4b}$  y  $R^{5b}$  pueden ser iguales o diferentes y cada uno de ellos representa un átomo de hidrógeno o alquilo C1-C4, y  $m$  es un entero de entre 1 o 2;

$R^1$  representa un átomo de hidrógeno o alquilo C1-C6;

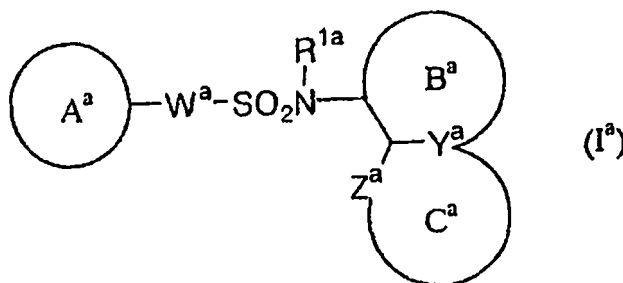
Z representa un enlace simple o -CO-NH-; y

R representa un anillo arilo C6-C10 o un anillo heteroarilo de entre 6 y 10 miembros, pudiendo estar cada uno de ellos sustituido y parcialmente saturado; o

una sal farmacológicamente aceptable del mismo, o un hidrato del mismo.

7. Método según la reivindicación 6, en el que R representa indol, quinolina o isoquinolina.

8. Método según la reivindicación 1, en el que el fármaco es un compuesto de sulfonamida representado por la fórmula general (I<sup>a</sup>):



en la que

A<sup>a</sup> representa un anillo aromático monocíclico o bicíclico el cual puede estar sustituido;

B<sup>a</sup> representa un anillo de hidrocarburo insaturado de 6 miembros o un heterociclo de 6 miembros insaturado que contenga un átomo de hidrógeno como heteroátomo, pudiendo estar sustituido cada uno de ellos;

## ES 2 280 502 T3

C<sup>a</sup> representa un heterociclo de 5 miembros que contiene uno o dos átomos de nitrógeno el cual puede estar sustituido;

R<sup>1a</sup> representa un átomo de hidrógeno o alquilo C1-C6;

W<sup>a</sup> representa un enlace simple o -CH=CH-;

Y<sup>a</sup> representa un átomo de carbono o nitrógeno;

Z<sup>a</sup> representa -N(R<sup>2a</sup>)- en la que R<sup>2a</sup> representa un átomo de hidrógeno o alquilo C1-C6, o un átomo de nitrógeno;

una sal del mismo farmacológicamente aceptable, o un hidrato del mismo.

9. Método según la reivindicación 8, en el que W<sup>a</sup> representa un enlace simple.

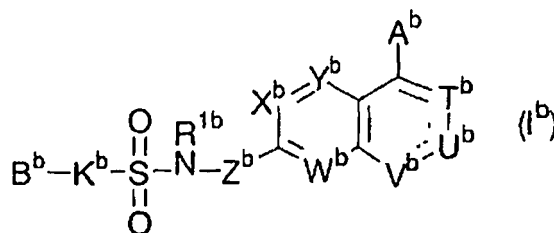
10. Método según la reivindicación 8, en el que W<sup>a</sup> representa un enlace simple, Z<sup>a</sup> representa -NH-, e Y<sup>a</sup> representa un átomo de carbono.

11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que B<sup>a</sup> representa benceno o piridina los cuales pueden estar sustituidos.

12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que C<sup>a</sup> representa pirrol el cual puede estar sustituido.

13. Método según la reivindicación 8, en el que A<sup>a</sup> representa benceno o piridina los cuales pueden estar sustituidos, B<sup>a</sup> representa benceno el cual puede estar sustituido, C<sup>a</sup> representa pirrol el cual puede estar sustituido, W<sup>a</sup> representa un enlace simple y Z<sup>a</sup> representa -NH-.

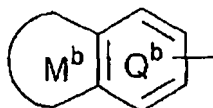
14. Método según la reivindicación 1, en el que el fármaco es un compuesto heterocíclico que contiene sulfonamida representado por la fórmula general (I<sup>b</sup>):



en la que

A<sup>b</sup> representa un átomo de hidrógeno; un átomo de halógeno; hidroxilo; alquilo o alcoxi C1-C4 los cuales pueden estar sustituidos con un átomo de halógeno; ciano; -(CO)<sub>k</sub><sup>b</sup>NR<sup>2b</sup>R<sup>3b</sup> en la que R<sup>2b</sup> y R<sup>3b</sup> pueden ser iguales o diferentes y cada uno de ellos representa un átomo de hidrógeno o alquilo C1-C4 los cuales pueden estar sustituidos con un átomo de halógeno, y k<sup>b</sup> es 0 o 1; alquenilo o alquinilo C2-C4 los cuales pueden estar sustituidos; o fenilo o fenoxi los cuales pueden tener un sustituyente seleccionado de entre el Grupo A que se menciona posteriormente;

B<sup>b</sup> representa arilo o heteroarilo monocíclico los cuales pueden tener un sustituyente seleccionado de entre el Grupo A que se menciona posteriormente, o



en la que Q<sup>b</sup> representa un anillo aromático el cual puede tener uno o dos átomos de nitrógeno, M<sup>b</sup> representa un anillo policíclico o monocíclico insaturado C5-C12 que comparte un enlace doble con Q<sup>b</sup>, el cual puede tener entre uno y cuatro heteroátomos seleccionados de entre un átomo de nitrógeno, un átomo de oxígeno y un átomo de azufre, Q<sup>b</sup> y M<sup>b</sup> pueden compartir un átomo de nitrógeno, y Q<sup>b</sup> y M<sup>b</sup> pueden tener un sustituyente seleccionado de entre el Grupo A que se menciona posteriormente;

K<sup>b</sup> representa un enlace simple o -(CR<sup>4b</sup>R<sup>5b</sup>)<sub>m</sub><sup>b</sup>- en la que R<sup>4b</sup> y R<sup>5b</sup> pueden ser iguales o diferentes y cada uno de ellos representa un átomo de hidrógeno o alquilo C1-C4, y m<sup>b</sup> es un entero de entre 1 o 2;

## ES 2 280 502 T3

T<sup>b</sup>, W<sup>b</sup>, X<sup>b</sup> e Y<sup>b</sup> pueden ser iguales o diferentes y cada uno de ellos representa =C(D<sup>b</sup>)- en la que D<sup>b</sup> representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, hidroxilo, alquilo o alcoxi C1-C4 los cuales pueden estar sustituidos con un átomo de halógeno, ciano, -(CO)<sub>n</sub><sup>b</sup>NR<sup>6b</sup>R<sup>7b</sup> en la que R<sup>6b</sup> y R<sup>7b</sup> pueden ser iguales o diferentes y cada uno de ellos representa un átomo de hidrógeno o alquilo C1-C4 el cual puede estar sustituido con un átomo de halógeno, y n<sup>b</sup> es 0 o 1, o alqueno o alquino C2-C4 los cuales pueden estar sustituidos; o un átomo de nitrógeno;

U<sup>b</sup> y V<sup>b</sup> pueden ser iguales o diferentes y cada uno de ellos representa =C(D<sup>b</sup>)- en la que D<sup>b</sup> tiene el mismo significado que el definido anteriormente, un átomo de nitrógeno, -CH<sub>2</sub>-, un átomo de oxígeno o -CO-;

10 Z<sup>b</sup> representa un enlace simple o -CO-NH-;

R<sup>1b</sup> representa un átomo de hidrógeno o alquilo C1-C4;

15 == representa un enlace simple o un enlace doble:

Grupo A: un átomo de halógeno; hidroxilo; alquilo o alcoxi C1-C4 los cuales pueden estar sustituidos con un átomo de halógeno; ciano; -R<sup>8b</sup>R<sup>9b</sup>N(NH)<sub>p</sub><sup>b</sup>- en la que R<sup>8b</sup> y R<sup>9b</sup> pueden ser iguales o diferentes y cada uno de ellos representa un átomo de hidrógeno o alquilo C1-C4 el cual puede estar sustituido con un átomo de halógeno, y p<sup>b</sup> es 0 o 1, R<sup>8b</sup> y R<sup>9b</sup> pueden formar un anillo de 5 o 6 miembros junto con un átomo de nitrógeno al cual se unan, y este anillo puede contener además un átomo de nitrógeno, un átomo de oxígeno o un átomo de azufre y puede estar sustituido; aminosulfonilo el cual puede estar sustituido con mono o di-(alquilo C1-C4); acilo C1-C8 el cual puede estar sustituido; (alquilo C1-C4)-S(O)<sub>s</sub><sup>b</sup>-(alquilo C1-C4) en la que s<sup>b</sup> es un entero de entre 0, 1 o 2; alquilo o fenilsulfonilamino C1-C4 los cuales pueden estar sustituidos; -(CO)<sub>q</sub><sup>b</sup>NR<sup>10b</sup>R<sup>11b</sup> en la que R<sup>10b</sup> y R<sup>11b</sup> pueden ser iguales o diferentes y cada uno de ellos representa un átomo de hidrógeno o alquilo C1-C4 el cual puede estar sustituido con un átomo de halógeno o amino el cual puede estar sustituido con alquilo C1-C4, y q<sup>b</sup> es 0 o 1; o arilo o heteroarilo el cual puede estar sustituido; o una sal del mismo farmacológicamente aceptable, o un hidrato del mismo.

15. Método según la reivindicación 14, en el que U<sup>b</sup> y V<sup>b</sup> representan cada uno de ellos =C(D<sup>b</sup>)- en la que D<sup>b</sup> tiene el mismo significado que el definido anteriormente, o un átomo de nitrógeno.

30 16. Método según la reivindicación 14 o 15, en el que Z<sup>b</sup> representa un enlace simple.

17. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que por lo menos uno de entre T<sup>b</sup>, U<sup>b</sup>, V<sup>b</sup>, W<sup>b</sup>, X<sup>b</sup> e Y<sup>b</sup> representa un átomo de nitrógeno.

35 18. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en el que A<sup>b</sup> representa un átomo de halógeno; alquilo o alcoxi C1-C4 los cuales pueden estar sustituidos con un átomo de halógeno; ciano; -(CO)<sub>r</sub><sup>b</sup>NR<sup>12b</sup>R<sup>13b</sup> en la que R<sup>12b</sup> y R<sup>13b</sup> pueden ser iguales o diferentes y cada uno de ellos representa un átomo de hidrógeno o alquilo C1-C4 el cual puede estar sustituido con un átomo de halógeno, y r<sup>b</sup> es 0 o 1; o alqueno o alquino C2-C4 el cual puede estar sustituido.

40 19. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, en el que solamente uno de entre T<sup>b</sup>, U<sup>b</sup>, V<sup>b</sup>, W<sup>b</sup>, X<sup>b</sup> e Y<sup>b</sup> representa un átomo de nitrógeno.

45 20. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, en el que solamente uno de entre T<sup>b</sup>, W<sup>b</sup> e Y<sup>b</sup> representa un átomo de nitrógeno.

21. Método según la reivindicación 1, en el que las células que no son plaquetas son células de un tejido en el cual se puede producir angiogénesis, y la inhibición de la expresión de integrina se determina como una acción inhibitoria de la angiogénesis.

50 22. Método según la reivindicación 1, en el que las células que no son plaquetas son células tumorales, y la inhibición de la expresión de integrina se determina como una acción inhibitoria del crecimiento tumoral.

55

60

65

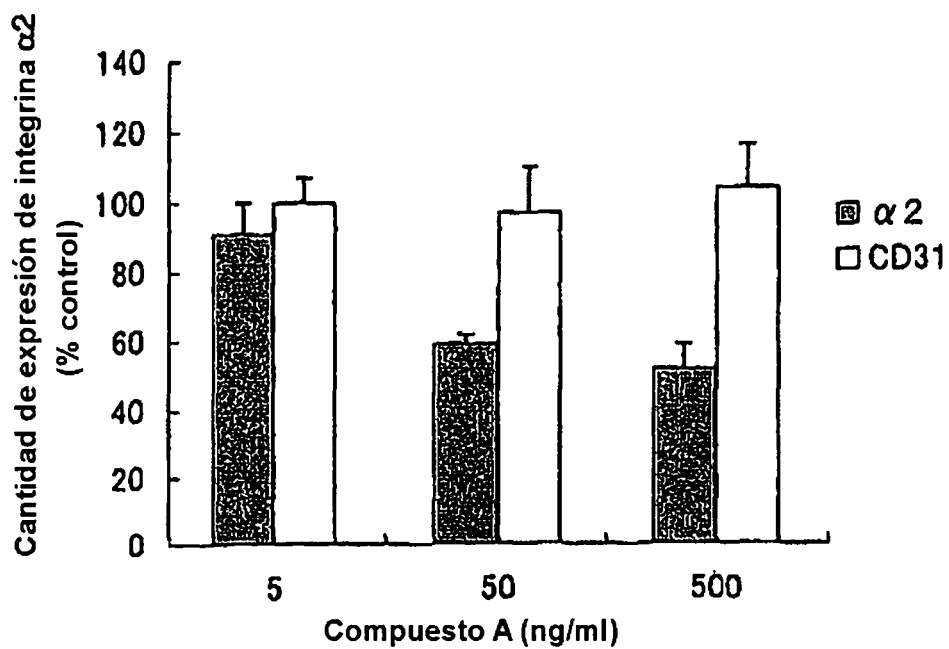


Fig. 1

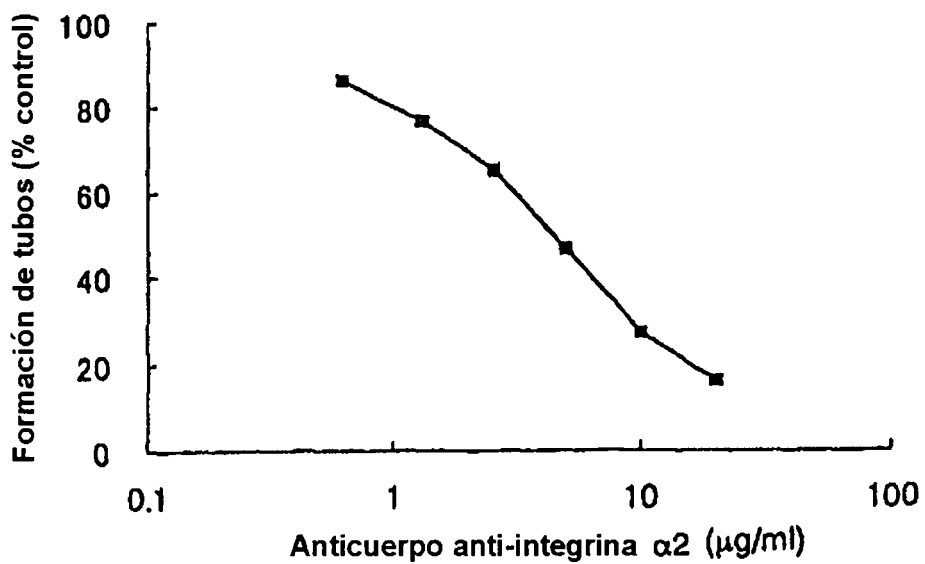


Fig. 2

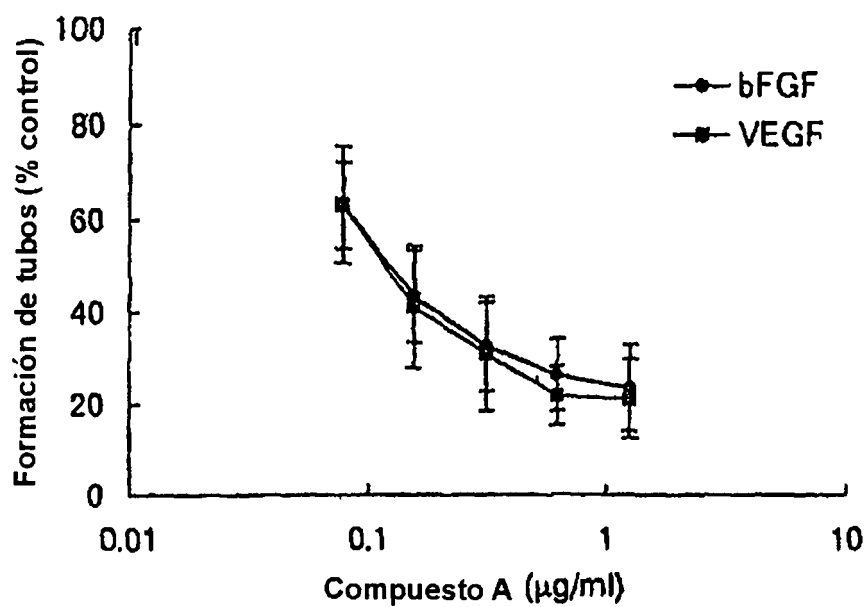


Fig. 3

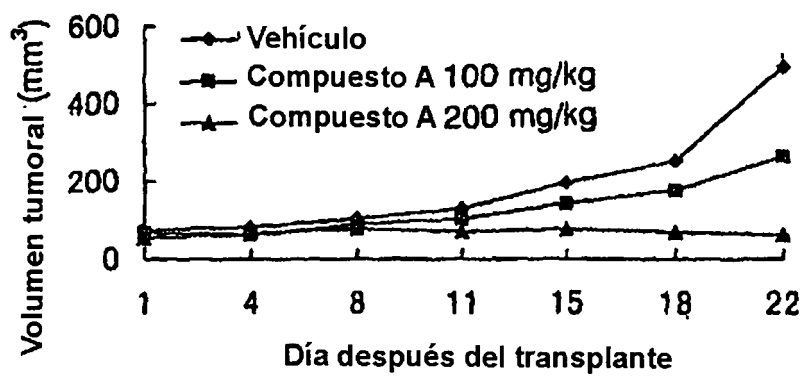


Fig. 4

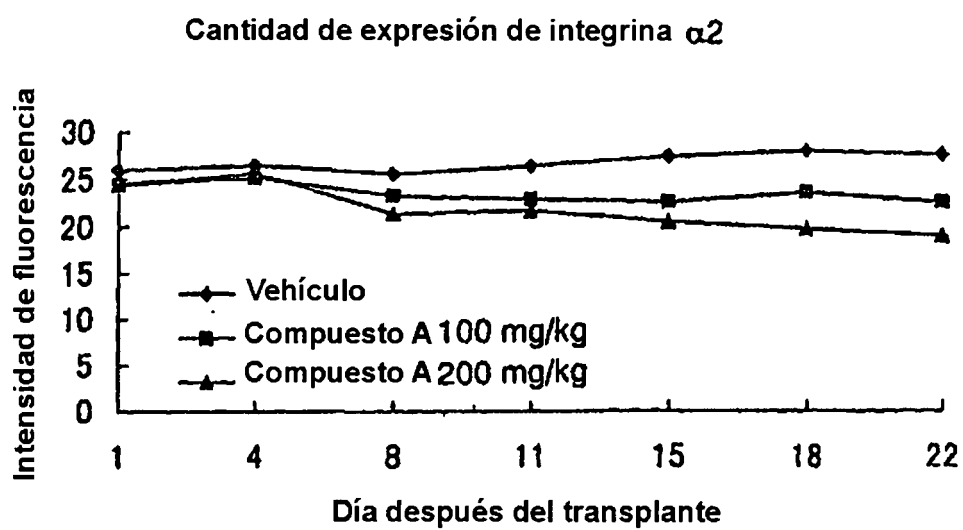


Fig. 5