

ESCOBAR - URIBE ASOCIADOS

A B O G A D O S

Carrera 11A No. 94-76 Of. 305 P.O. Box 94948, Santafé de Bogotá, Colombia, S.A.

Tel.: (571) 6162051 6162061 6161839 6161869

Fax: (571) 6161889

2402/P

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E S D

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO	
Radicación: 00097404	Folios: 259
Fecha (MM): 2001-01 16	15:50:36
Tramite: 042 PATENTES D	1 REGISTRO/ 329 COMPLETOS
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES	

Re Expediente No 00 097 404
Solicitud de Patente en nombre de
NOVARTIS AG

Yo, JIMENA ESCOBAR URIBE, identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en Bogotá, en la Carrera 11 A No 94-76 Of 305, obrando como apoderada de la sociedad NOVARTIS AG, solicitante de la patente de la referencia, anexo al presente memorial los siguientes documentos

Copia certificada de la solicitud de Patente Numero MI99A002711 presentada en Italia el día 27 de diciembre de 1999, con la debida traducción de lo pertinente, incluyendo el capítulo reivindicatorio correspondiente

A este mismo respecto, debe tenerse en cuenta que en la primera página de la copia en mención la Oficina de Patentes correspondiente certifico la fecha de presentación de esa solicitud, cumpliéndose de esta forma todos y cada uno de los requisitos establecidos en el inciso segundo del artículo 10 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina

Senor Superintendente,



JIMENA ESCOBAR URIBE

C C 39 779 452 de usaquén

T P 68228

Cod 5376

137 ~~140~~

(TRADUCCIÓN DEL ITALIANO)

MINISTERIO DE INDUSTRIA, COMERCIO Y ARTESANADO

DIRECCIÓN GENERAL DE PRODUCCIÓN INDUSTRIAL

OFICINA ITALIANA DE PATENTES Y MARCAS

Timbre fiscal por 20,000 liras cancelado con un sello del Ministerio de Industria, Comercio y Artesanado, Oficina Italiana de Patentes y Marcas.

Autenticación de la copia de documentos relativos a la solicitud de patente de invención industrial número MI99 A 002711

Se declara que la copia adjunta se encuentra conforme con los documentos originales depositados con la solicitud de patente especificada arriba, cuyos datos se mencionan en el acta de Registro de Depósito adjunta.

Roma, el 2 de noviembre de 2000

EL DIRECTOR DE LA DIVISIÓN

Dr. Fotito GALLOPPO

(Firmado)

Aparece un sello móvil de la Oficina Italiana de Patentes y Marcas.

MINISTERIO DE INDUSTRIA, COMERCIO Y ARTESANADO,

OFICINA DE PATENTES Y MARCAS EN ROMA

**SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION INDUSTRIAL DEPOSITADA BAJO
RESERVA, ACCESIBILIDAD ANTICIPADA AL PÚBLICO.**

Aparecen dos timbres fiscales cancelados con dos sellos de la
Oficina de Patentes y Marcas de Italia.

SOLICITANTE (1)

1) Nombre: NOVARTIS AG

Dirección: BASILEA, SUIZA código

2) Denominación: -

Domicilio: - código

REPRESENTANTE DEL SOLICITANTE ANTE LA U.I.B.M.

Apellido y nombre COLETTI Raimondo y otros código fiscal

Denominación del despacho correspondiente BARZANO & ZANARDO
MILANO S.p.A.

Via BORGONUOVO No. 10 Ciudad de MILÁN cap 20121 prov MI

TÍTULO

COMPUESTOS ORGÁNICOS

ACCESIBILIDAD ANTICIPADA AL PÚBLICO:

INVENTORES DESIGNADOS Sí [] No [X]

Urgente Fecha __/__/__ No. de protocolo _____

Apellido y nombre	Apellido y nombre
1) _____	3) _____
2) _____	4) _____

PRIORIDAD

País u organización	Tipo de prioridad
1) _____	_____
2) _____	_____

No. de solicitud	Fecha de depósito	Anexo S/R
_____	_____	_____
_____	_____	_____

SELECCIÓN DE RESERVA

FECHA	No. DE PROTOCOLO
__/__/__	_____
__/__/__	_____

CENTRO HABILITADO DE RECOLECCIÓN DE CULTIVOS DE
MICROORGANISMOS, nombre _____

ANOTACIONES ESPECIALES

DOCUMENTACIÓN ADJUNTA

No. de ejemplares			
Doc. 1) [2]	PROV	No. de pág. 125	extracto con diseños, descripción y reivindicaciones (obligatorio un ejemplar)
Doc. 2) [2]	PROV	No. de hojas 17	Dibujos (obligatorios si se cita en la descripción, un ejemplar)
Doc. 3) [0]	RES	Carta de encargo, poder o referencia del poder general	
Doc. 4) [0]	RES	Designación de inventor	
Doc. 5) []	RES	Documento de prioridad con traducción al italiano	
Doc. 6) []	RES	Autorización o acto de cesión	
Doc. 7) []		Nombre completo del solicitante	

OPCIÓN DE RESERVA

FECHA	No. DE PROTOCOLO
___/___/___	_____
___/___/___	_____
___/___/___	_____

COMPARACIÓN CON PRIORIDAD ÚNICA

___/___/___	_____
-------------	-------

8) Comprobante de pago de UN MILLÓN CUATROCIENTOS QUINCE MIL
LIRAS (Firmado) Obligatorio

A1 / 144

COMPILADO 27.12.1999 FIRMA DEL SOLICITANTE LOS APODERADOS
(firma de por sí y por los demás)

Continúa Sí/No [No]

DE LA PRESENTE ACTA SE SOLICITA COPIA AUTENTICADA Sí/No [Sí]

OFICINA PROVINCIAL DE INDUSTRIA, COMERCIO Y ARTESANADO DE
MILÁN

ACTA DE DEPÓSITO Número de solicitud MI99A 002711 Reg.A

En el año de mil novecientos noventa y nueve, el día
veintisiete de diciembre el solicitante mencionado arriba
depositó ante el suscrito la presente solicitud con 00 anexos
para la concesión de la patente correspondiente.

1. ANOTACIONES DIVERSAS DE LA OFICINA DE DEPÓSITO _____

EL DEPOSITANTE

(Firmado)

EL FUNCIONARIO QUE RECIBE

(Firmado)

M. CORTONESI

142 ~~145~~

EXTRACTO DE INVENCION CON DIBUJO PRINCIPAL, DESCRIPCION Y
REIVINDICACIONES

No. DE SOLICITUD MI99A 002711 REG. A

Fecha de depósito 27.12.1999

Fecha de otorgamiento __/__/__

Título: **COMPUESTOS ORGANICOS**

1. ANEXO

Sello rectangular que dice: OFICINA DE PATENTES - 27 DE DICIEMBRE DE 1999 - MILÁN

5 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION INDUSTRIAL
a nombre de: NOVARTIS AG
de nacionalidad: SUIZA
con asiento en: BASILEA (SUIZA)

10 Esta invención se refiere a combinaciones de un
inhibidor de cinasa de tirosina de abl, receptora de PDGF y/o
receptora de Kit, con un compuesto orgánico capaz de enlazarse
con glicoproteína ácida- α_1 (AGP), así como a preparaciones
farmacéuticas y/o terapias, en relación con estados de
15 enfermedad que respondan a la inhibición de cinasa de tirosina
de abl, receptora PDGF, y/o receptora de Kit. En particular, la
invención se refiere a productos o combinaciones que comprenden
un inhibidor de cinasa de tirosina de abl, receptora de PDGF
y/o receptora de Kit con un compuesto orgánico capaz de
20 enlazarse con glicoproteína ácido- α_1 en una combinación fija,
o para su administración cronológicamente escalonada o
simultánea, y al uso combinado de ambas clases de compuestos,
ya sea en una combinación fija, o para su administración
cronológicamente escalonada o simultánea, para el tratamient
25 de enfermedades proliferativas, especialmente enfermedades
tumorales especialmente aquellas que se puedan tratar mediante
la inhibición de la actividad de cinasa de tirosina de abl,
receptora de PDGF, y/o receptora de Kit.

Antecedentes de la Invención

Se sabe que un número de compuestos inhiben la proliferación de células por medio de la inhibición de la cinasa de tirosina de abl, receptora de PDGF, y/o receptora de Kit. Por ejemplo, la Solicitud Internacional Número WO 98/35958, la Solicitud de Patente Internacional Número WO 97/02266, y especialmente la Solicitud de Patente Europea Número EP 0,564,409-A, así como la Solicitud Internacional Número WO 99/03854, todas las cuales se incorporan a la presente como referencia, mencionan compuestos que son inhibidores de cuando menos una de las cinasas de tirosina mencionadas anteriormente. Además, los compuestos que son de interés, son Tirfostina AG957 (ver Kaur y colaboradores, Anticancer Drugs 5, 213-222 (1994)), Herbimicina A (Okabe and Uehara, Leukemia and Lymphoma 12, 2156-2162 (1994), Blood 80, 1330-1338 (1994) y Leuk. Res 18, 213-220 (1994), así como Rioran y colaboradores, Oncogene 16, 133-1542 (1998)); Tirfostinas AG 1295, AG 1296 (ver Kovalenko y colaboradores, Cancer Res 54, 6106-6114 (1994), Lipson y colaboradores, Pharmacol & Exp- Therap. 285, 844-852 (1998), Krystal y colaboradores, Cancer Res. 57, 2203-2208 (1997)); SU 101 (Leflunomida), así como su metabolito (ver Shawer y colaboradores, Clin. Cancer Res. 3, 1167-1177 (1997), Mattar y colaboradores FEBS Lett 334, 161-164 (1993), Cherwinskyi y colaboradores, Inflamm. Res. 3, 1167-1177 (1997), y Strawn y colaboradores, Exp. Opin. Invest. Drugs 7, 533-573 (1988)); y Piridopirimidinas

(ver, por ejemplo Hamby y colaboradores, J. Med. Chem. 40, 2296-2303 (1997), Dahring y colaboradores, J. Pharmacol. Exp. Ther. 281, 1446-1456 (1997), Klutcho y colaboradores, Life Sci. 62, 143-150 (1998), Panek y colaboradores J. Pharmacol. Exp. Ther 283, 1433-1444 (1997), Boschelli y colaboradores, J. Med. Chem. 41, 4365-4377 (1998)). Todas las referencias mencionadas anteriormente se incorporan a la presente como referencia.

Estos compuestos, como se describen en las Solicitudes de Patentes mencionadas y en otras publicaciones, han demostrado ser efectivos en la profilaxis, y especialmente en el tratamiento de enfermedades que son ocasionadas por la desregulación de la fosforilación y/o de la actividad de las cinasas de tirosina recién mencionadas.

La fosforilación de proteínas se ha conocido durante mucho tiempo como un paso esencial en la diferenciación y en la división de las células. La fosforilación es catalizada por las cinasas de proteína subdivididas en las cinasas de serina/treonina y de tirosina. Las cinasas de tirosina comprenden la cinasa de tirosina receptora de PDGF (Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas) = PDGF-R TK, la cinasa de tirosina de abl (abl), y la cinasa de tirosina receptora de Kit (Kit R TK). Cuando se desregulan estas cinasas de tirosina, por ejemplo, por medio de mutación o activación a través de factores externos, por ejemplo compuestos (compuestos internos naturales, ta-

les como PDGF, o compuestos externos) que se enlazan con ellas, entre otras cosas, el resultado es la desregulación del crecimiento celular.

El PDGF (Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas) es un factor de crecimiento que se presenta con mucha frecuencia, que tiene un papel importante tanto el crecimiento normal como en la proliferación celular patológica, tal como en la carcinogénesis y en los desórdenes en las células de músculo liso de los vasos sanguíneos, por ejemplo en aterosclerosis y trombosis. Su inhibición se puede medir en analogía al procedimiento descrito en la Patente Europea Número EP 0,564,409, mencionada anteriormente (ver también E. Andrejauskas-Buchdunger y U. Regenass en Cancer Research 52, 5353-5358 (1992)).

La inhibición de cinasa de abl, por ejemplo, la cinasa de tirosina de v-abl, se determina de acuerdo con los métodos de N. Lydon y colaboradores, Oncogene Research 5, 161-173 (1990) y J.F. Geissler y colaboradores, Cancer Research 52, 4492-4498 (1992). En estos métodos, se utilizan [Val⁵]-angiotensina II y [γ -³²P]-ATP como sustratos.

La inhibición de la cinasa de tirosina receptora de Kit se puede medir, por ejemplo, como en el ensayo de cinasa c-Kit *in vitro*:

El ensayo de cinasa c-Kit *in vitro* se realiza en placas de 96 pozos como un ensayo de enlace de filtro, utilizando el dominio de cinasa c-Kit fusionado con GST(glutathiona-S-

transferasa) recombinante expresado en baculovirus, y purificado sobre glutathiona-Sepharose. La proteína de fusión con GST se incubaba bajo condiciones optimizadas en la presencia o en ausencia de fármaco, y la inhibición de cinasa se mide detectando la reducción en la fosforilación del péptido P-275 de poli(GluTyr) (4:1). Se utiliza Gamma-[³²P]-ATP como el donador de fosfato. De una manera alternativa, es posible utilizar un ensayo celular para c-Kit: A las células que sobreexpresan c-Kit se les agota el suero, y se incuban durante 90 minutos a 37°C con el fármaco, antes de su estímulo con el factor de células de tallo humano recombinante. Se analizan cantidades iguales de proteína a partir de los lisados celulares, para determinar la inhibición de fosforilación de c-Kit mediante Western blot, utilizando anticuerpos contra la fosfotirosina.

Debido a las propiedades descritas, los compuestos que muestran inhibición de una de las cinasas de tirosina mencionadas anteriormente, se pueden utilizar como terapéuticos, especialmente para el tratamiento de enfermedades proliferativas, tales como cáncer, especialmente tumores y leucemias.

Los compuestos, por otra parte, se pueden utilizar no solamente como ingredientes activos inhibidores de tumores, sino también como fármacos contra enfermedades proliferativas no malignas, por ejemplo aterosclerosis, trombosis, psoriasis, esclerodermatitis, y fibrosis. También son adecuados para las aplicaciones adicionales mencionadas anteriormente para los mo-

duladores de cinasa C de proteína, y se pueden utilizar especialmente en el tratamiento de enfermedades que respondan a la inhibición de la cinasa receptora de PDGF.

Un inhibidor de cinasa de tirosina como se describe anteriormente, también inhibe la cinasa de BCR/Abl (ver Nature Medicine 2, 561-566 (1996)) y por lo tanto, es adecuado para el tratamiento de cáncer y enfermedades tumorales positivas para BCR/Abl, tales como leucemias (especialmente leucemia mieloide crónica y leucemia linfoblástica aguda, en donde se encuentran especialmente mecanismos de acción apoptóticos), y también muestra efectos sobre el subgrupo de células de tallo leucémicas, así como el potencial para la purificación de estas células in vitro después de remover estas células (por ejemplo, remoción de médula ósea) y reimplantación de las células una vez que se han liberado de las células de cáncer (por ejemplo, reimplantación de células de médula ósea purificadas).

En adición, un inhibidor de cinasa de tirosina como se describe anteriormente, puede mostrar efectos útiles en el tratamiento de desórdenes que se presenten como un resultado de trasplante, por ejemplo trasplante alogénico, especialmente rechazo de tejido, tal como especialmente bronquiolitis obliterativa (OB), es decir, un rechazo crónico de trasplantes de pulmón alogénicos. En contraste con los pacientes sin OB, aquéllos con OB con frecuencia muestran una concentración elevada de PDGF en los fluidos de lavado broncoalveolares. Los

inhibidores de cinasa de tirosina también pueden ser efectivos en enfermedades asociadas con la migración y proliferación de células de músculo liso vasculares (en donde el PDGF y el PDGF-R con frecuencia también tienen un papel), tales como restenosis y aterosclerosis. También puede inhibir la angiogénesis.

Todos estos usos se describen con detalle en las Patentes Números EP 0,564,409; WO 97/02266; WO 99/03854 y WO 98/35958, o en las otras referencias mencionadas anteriormente.

Un ejemplo de un compuesto que muestra actividad inhibidora sobre las cinasas de tirosina anteriormente mencionadas, es el compuesto denominado 4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il)pirimidin-2-ilamino]fenil]benzamida, que se describe en la Patente Europea Número EP 0,564,409, y en la forma de la sal de metansulfonato (STI571 posteriormente en la presente), de preferencia en la forma del cristal- β , en la Publicación Internacional Número WO 99/03854.

Este compuestos es un potente inhibidor de bcr/abl, una proteína de fusión oncogénica que ocasiona Leucemia Mieloide Crónica (CML). Sin embargo, se ha observado en un ensayo clínico continuo, que los pacientes de CML en crisis, y los pacientes de Leucemia Linfoblástica Aguda Positiva de Cromosoma Filadelfia reincidentes (Ph+-ALL) muestran solamente respuestas temporales al STI571, que son seguidas por un breve período de tiempo por el desarrollo de resistencia.

Previamente mostramos que este c mpuesto puede curar rato-

nes inyectados con células leucémicas BCR/ABL+humanas, si se mantiene una inhibición continua de la actividad de cinasa de bcr/abl. Este modelo se utilizó para estudiar el posible desarrollo de resistencia a STI571. Cuando se trataron animales que tenían tumores grandes (>400 miligramos), se observó una reducción del tumor en todos los animales, con desaparición en algunos. Sin embargo, ningún animal se curó, y los animales reincidentes no respondieron a un tratamiento adicional, y la actividad de cinasa de bcr/abl no fue inhibida por la administración de STI571 *in vivo*, aunque se obtuvieron concentraciones en plasma activas (aproximadamente 10 μM). Los tumores se separaron de los animales resistentes reincidentes, se pusieron en cultivo, y se probaron dentro de 24 horas para determinar su sensibilidad *in vitro* al STI571. 5/5 tumores examinados mostraron una IC_{50} (0.1-0.3 μM) no significativamente diferente de aquélla de la línea parental KU812.

Se puede desarrollar resistencia como el resultado de varios factores, operando al nivel celular, o bien solamente *in vivo*. Se puede desarrollar resistencia al fármaco, por ejemplo, como un resultado de mutación/amplificación del gen blanco, inducción de metabolismo, y, paradójicamente, una mayor degradación posterior a la traducción de la proteína blanco, y similares.

De una manera sorprendente, se ha encontrado que los datos farmacocinéticos indicaron que los animales reincidentes alcan-

zaron concentraciones pico similares a las de los controles, pero mostraron una reducción significativamente más lenta en las concentraciones de STI571 a través del tiempo. Ahora hemos encontrado que esto se debe a la presencia de un factor de enlace en el plasma de los animales reincidentes, que puede reducir la distribución del tejido, y liberar el STI571. Se probaron un número de proteínas *in vitro*, para determinar su capacidad para inhibir la actividad biológica del STI571. Aunque la albúmina no tiene influencia sobre la inhibición por el STI571 de la proliferación de KU812, la glicoproteína ácida- α_1 (AGP) lo hace en concentraciones fisiológicas, incrementando la IC_{50} para STI571 hasta 90 veces. La AGP también inhibe el efecto del STI571 sobre la fosforilación de bcr/abl *in vitro*. La Constante de Asociación (K_a) para el enlace específico con STI571 se calcula y se encuentra que es 60 veces más alta en AGP que en la albúmina. Los niveles de AGP se miden en ratones mediante un inmunoensayo. Se encuentra una fuerte correlación entre la carga tumoral y las concentraciones de AGP. En adición, el tratamiento previo con STI571 *in vivo* también incrementa los niveles en plasma de AGP. De acuerdo con lo anterior, los animales previamente tratados con STI571, y luego inyectados con células KU812 y tratados con STI571 24 horas más tarde, responden menos al tratamiento que los controles (animales curados: 8/16 contra 16/16, $p > 0.01$). Estos resultados sugieren que la elevación de los niveles de AGP, ya sea inducida por el

tumor o por el tratamiento mismo, es responsable del desarrollo de resistencia al STI571.

La presente invención tiene la tarea de proporcionar un medio para superar la resistencia que se desarrolla en los animales de sangre caliente si se aplica STI571 o cualquier otro de los inhibidores de cinasa de tirosina mencionados anteriormente, durante el tratamiento de una enfermedad, como se mencionó anteriormente.

El resultado sorprendente de que la resistencia contra un inhibidor de cinasa de tirosina, especialmente STI571, se puede deber al enlace de AGP, y por lo tanto, a la concentración libre más baja del fármaco activo en el plasma sanguíneo, forma una base para la búsqueda de una solución, sea mediante la detención de una molécula reguladora, por ejemplo una proteína reguladora, para que no se permita la activación de la transcripción del gen de AGP, mediante la detención de la amplificación del gen de AGP, mediante la inhibición de la transcripción genética del ARNm que codifica AGP, mediante la inhibición de la traducción de este ARNm en la proteína madura, mediante la influencia en su distribución y acabado hasta la glicoproteína final, mediante la inhibición de su secreción hacia el plasma sanguíneo, mediante la dosificación más grande del inhibidor de cinasa de tirosina, mediante la neutralización de la AGP, por ejemplo por anticuerpos, mediante la activación del metabolismo o la eliminación del plasma, mediante la activación de la de-

gradación posterior a la traducción de AGP o sus precursores, y similares.

Inesperadamente, en vista de los reportes que informan que hay dudas sobre la relevancia del desplazamiento del fármaco durante la terapia de fármacos combinados (ver, por ejemplo, Kremer y colaboradores, Pharmacological Rev. 40 (1), 1-47 (1988)), se ha encontrado que es posible, mediante la combinación de uno o más compuestos de enlace de AGP, con un inhibidor de cinasa de tirosina de abl, receptora de PDGF, y/o receptora de Kit, superar este tipo de resistencia.

Por consiguiente, la presente invención permite tener una mejora importante en la terapia de pacientes que tengan una de las enfermedades mencionadas en la presente divulgación.

15 Compendio de la Invención

Esta invención se refiere a una combinación de (a) un inhibidor de cinasa de tirosina de abl, receptora de PDGF, y/o receptora de Kit (componente (a)) y (b) un compuesto orgánico capaz de enlazarse con una glicoproteína ácida- α_1 (AGP) (componente (b)), así como a preparaciones farmacéuticas y/o terapias, en relación con estados de enfermedad que respondan a la inhibición de la cinasa de tirosina de abl, receptora de PDGF, y/o receptora de Kit. En particular, la invención se refiere a productos o combinaciones que comprenden (a) un inhibidor de

20 cinasa de tirosina de abl, receptora de PDGF, y/o receptora de

25

154 / 53

Kit, y (b) un compuesto orgánico capaz de enlazarse con la glicoproteína ácido- α_1 (AGP), ya sea en una combinación fija, o para su administración cronológicamente escalonada o simultánea, y al uso combinado de ambas clases de compuesto, ya sea en una combinación fija o para su administración cronológicamente escalonada o simultánea, para el tratamiento de enfermedades proliferativas, especialmente enfermedades tumorales, especialmente aquéllas que puedan ser tratadas mediante la inhibición de la actividad de cinasa de tirosina de abl, receptora de PDGF, y/o receptora de Kit.

Descripción de las Figuras

Las Figuras 1A y B muestran los efectos de la carga tumoral inicial y de la duración del tratamiento con STI571.

Figura 1A: Se inyectaron dos grupos de 15 ratones sin pelo con 50×10^6 células leucémicas KU812. El tratamiento con STI571 (160 miligramos/kilogramo oralmente cada 8 horas durante 11 días) se inicia después de un día (grupo I; cuadros) o después de 8 días (grupo II; rombos) en la presencia de un peso de tumor promedio de 276 ± 97 miligramos. Los números entre paréntesis indican el número de animales exentos de tumor.

Figura 1B: Los ratones sin pelo inyectados con células KU812 se tratan con STI571 (160 miligramos/kilogramo oralmente cada 8 horas durante 11 días) después de un día (grupo I), después de 8 días (grupo II, peso del tumor promedi de 253 ± 122

miligramos), o después de 15 días (grupo III, peso del tumor promedio de 1054 ± 258 miligramos). Los resultados representan el promedio de tres experimentos consecutivos.

Figura 1C: Los animales pertenecientes al grupo II se dejan sin tratamiento (controles), o se tratan con STI571 (160 miligramos/kilogramo oralmente cada 8 horas) durante 11 ó 18 días con STI571.

La Figura 2 muestra el efecto del re-tratamiento con STI571 sobre la reincidencia del tumor después de una respuesta inicial al STI571. Las líneas punteadas se refieren al crecimiento si los tumores no fueron tratados (ver la parte de métodos en los Ejemplos).

La Figura 3 muestra la sensibilidad *in vitro* a STI571 de dos tumores resistentes *in vivo*. Los valores se expresan como un porcentaje de los controles que incorporaron $129'362 \pm 6329$ cpm.

La Figura 4 muestra la inhibición *in vivo* de la actividad de cinasa de Bcr/Abl mediante STI571. Los ratones que tienen tumor se tratan agudamente con STI571 oralmente (160 miligramos/kilogramo), y se sacrifican en diferentes puntos del tiempo. Las muestras de tumor se extraen y se utilizan para el análisis Western blot con anti-fosfotirosina (pTyr) o anti-Abelson (Abl). El STI571 inhibe eficientemente la fosforilación de la cinasa de tirosina de BCR/ABL en los controles (Ctrl) a las 2 y a las 4 horas (inhibición del 80 por ciento y del 50

por ciento mediante análisis densitométrico), comparándose con los animales no tratados (n.t.), mientras que los extractos de los animales reincidentes (Rel) son resistente al tratamiento con STI571.

5 La Figura 5 muestra las concentraciones en plasma y en tumor de STI571, en ratones que tienen tumor previamente tratados o no con STI571. Los animales se tratan agudamente con STI571 (160 miligramos/kilogramo oralmente), y se sacrifican a las 0.5, 2, y 5 horas más tarde. El STI571 se determina mediante
10 HPLC en muestra de plasma y en extractos de tumor. Los ratones de control nunca reciben un tratamiento previo con STI571, mientras que los ratones previamente tratados se someten a dos ciclos de 11 días de STI571 (como en la Figura 2). Los pesos de tumor promedio son de 450 ± 129 miligramos en los controles
15 de 684 ± 283 miligramos en los ratones previamente tratados. La Figura 6 muestra la sensibilidad *in vitro* a STI571 de células KU812 en la presencia de glicoproteína ácida α_1 (A) y albúmina (B) (ver la recuperación de ^3H -timidina en los métodos).

20 La Figura 7 muestra el efecto de dos muestras de suero que contienen diferentes cantidades de AGP sobre la actividad *in vitro* de STI571 sobre células KU812.

Las Figuras 8A y B muestran la determinación de AGP en ratones normales y que tienen tumor.

Figura 8A: Concentraciones en plasma promedio de AGP en
25 ratones con diferentes estados de enfermedad o de tratamiento.

Grupo 1 (n=11) se refiere a ratones normales, grupo 2 (n=8) a ratones tratados con STI571 durante 11 días (y muestreados tres días después de la discontinuación del tratamiento), grupo 3 (n=6) a ratones que tienen un tumor de 8 días de edad (peso promedio de 304 ± 116 miligramos), grupo 4 (n=7) a ratones que tienen un tumor de 15 días de edad (peso promedio de 1184 ± 295 miligramos).

Figura 8B: Determinación directa de AGP en ratones normales y que tienen tumor, mediante isoelectroenfoque: las pistas 1-2 se refieren a ratones normales, las pistas 3-4 a los animales que tienen tumores grandes (>1 gramo). Las diferentes isoformas de AGP se indican y están comprendidas entre un pH de 3.4 y 4.0.

La Figura 9 muestra el efecto de AGP (en 1 miligramos/mililitro) y eritromicina, sobre la actividad de STI571 (en un μM) sobre células KU812.

La Figura 10 muestra el efecto de AGP y eritromicina sobre la inhibición de la autofosforilación de bcr/abl inducida por STI571.

Se incuban 3×10^6 células por pozo a 37°C con base de eritromicina ($100 \mu\text{M}$), STI571 ($3 \mu\text{M}$) AGP (2 miligramos/mililitro). Después de 1 hora, la células se lavan dos veces con suero regulado con fosfato frío (PBS), y subsecuentemente se lisan en 500 microlitros de regulador de Laemmli 1 x. Los lisados celulares que corresponden a 90,000 células se analizan

mediante electroforesis SDS sobre poliacrilamida al 7.5 por ciento. Se detectan bcr/abl endógeno y bcr/abl fosforilado con tirosina, con el anticuerpo monoclonal de ratón correspondiente.

5 Las Figuras 11A y B muestran el efecto in vivo de la eritromicina sobre la co-administración con STI571 a ratones que tienen tumor. Los animales que tienen tumores de 11 días de edad se asignan aleatoriamente a dos grupos separados. 15 ratones se tratan con STI571 y eritromicina (peso de tumor promedio de 385 $\pm$ 53 miligramos), mientras que otros 15 ratones recibieron solamente STI571 (peso de tumor promedio de 390 $\pm$ 114 miligramos). Los grupos de control reciben eritromicina solamente, resuspendida en metilcelulosa al 5 por ciento (5 ratones), o metilcelulosa al 5 por ciento solamente (6 ratones).

15 Figura 11A: Peso de tumor promedio durante el tratamiento (días 0-20).

Figura 11B: Porcentaje de ratones que tienen tumor: en cada punto del tiempo, se calcula el porcentaje de los ratones que tienen un tumor palpable sobre el número total de ratones vivos en ese momento.

20

La Figura 12 muestra el efecto del tratamiento previo sobre el efecto anti-leucémico de STI571. Dos grupos de ratones sin pelo se tratan con STI571 (160 miligramos/kilogramo cada 8 horas) durante 11 días, empezando en el día 1 después de la inyección de células leucémicas. La línea punteada se refiere a los animales de control, no tratados previamente. La línea sólida se refiere a los animales que han recibido un tratamiento idéntico de STI571, 14 días antes de ser inyectados con células leucémicas bcr/abl + de KU812.

10

Descripción Detallada de la Invención

De una manera sorprendente, se han observado efectos positivos, y de preferencia inclusive sinérgicos, entre los inhibidores de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit, y los compuestos orgánicos capaces de enlazarse con glicoproteína ácida- α_1 (AGP) en modelos de xenoinjerto de ratones sin pelo. Esta es una evidencia de que los inhibidores de cinasa de tirosina se pueden utilizar no solamente como agentes individuales; sino también especialmente en una terapia de combinación con compuestos orgánicos capaces de enlazarse con AGP para el tratamiento de enfermedades de cáncer.

Esta combinación ofrece una gran cantidad de ventajas: en primer lugar, los inhibidores de cinasa de tirosina pueden exhibir efectos secundarios significativos hasta efectos realmente tóxicos, de modo que simplemente la compensación del en-

25

lace de AGP mediante un incremento de la dosis de un inhibidor de cinasa de tirosina con frecuencia es muy difícil o imposible, con el objeto de obtener un equilibrio responsable entre el uso terapéutico y los efectos secundarios. Sin embargo, en las nuevas combinaciones descritas en la presente, es posible disminuir la cantidad de inhibidor de cinasa de tirosina necesaria, y por lo tanto, aliviar los efectos secundarios. Segundo, el compuesto orgánico que se puede utilizar como el compuesto capaz de enlazarse con AGP, se puede seleccionar a partir de compuestos con muy alta tolerabilidad, permitiendo de esta manera una gran flexibilidad en el tratamiento de pacientes de cáncer. Tercero, debido al hecho de que la liberación de los inhibidores de cinasa de tirosina farmacéuticamente activos a partir de AGP que se enlace en plasma, abre una ruta totalmente nueva de tratamiento, también es posible tratar tipos de cáncer que hayan sido muy difíciles de tratar, o inclusive prácticamente no afectados por la terapia con quimioterapéuticos convencionales. Más importante, es posible superar la desensibilización *in vivo* (resistencia) de las células proliferativas a un inhibidor de cinasa de tirosina, que pueda estar presente ya sea al principio del tratamiento (por ejemplo, de preferencia debido a altos niveles de AGP en el plasma sanguíneo), o que bien pueda haberse desarrollado o se esté desarrollando durante el tratamiento con un inhibidor de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit, como se descri-

be en la presente divulgación.

La presente invención de preferencia se refiere a una preparación en combinación que comprende (a) cuando menos un inhibidor de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit, y (b) cuando menos un compuesto orgánico capaz de enlazarse con glicoproteína ácida- α_1 (AGP); o sales farmacéuticamente aceptables de cualquier componente (a), (b), ó (a) y (b), si está presente cuando menos un grupo formador de sal.

La invención también se refiere a un método para el tratamiento de una enfermedad proliferativa que se pueda tratar mediante la administración de un inhibidor de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit, en donde:

(a) cuando menos un inhibidor de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit, y

(b) cuando menos un compuesto orgánico capaz de enlazarse con glicoproteína ácida- α_1 (AGP),

se administran a un mamífero en combinación con una cantidad que sea conjuntamente efectiva terapéuticamente contra una enfermedad proliferativa que se pueda tratar mediante la administración de un inhibidor de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit, en donde cualquier componente (a) y/o (b) también puede estar presente en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, si está presente cuando menos un grupo formador de sal.

La invención también se refiere a un producto que compren-

162 65

de:

(a) cuando menos un inhibidor de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit, y

(b) cuando menos un compuesto orgánico capaz de enlazarse
5 con glicoproteína ácida- α_1 (AGP),

en donde cualquier componente (a) y/o (b) también puede estar presente en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, si está presente cuando menos un grupo formador de sal,

en la presencia o en ausencia de uno o más materiales de
10 vehículo farmacéuticamente aceptables, como una preparación en combinación para su uso simultáneo o cronológicamente escalonado dentro de un período de tiempo que sea suficientemente pequeño para que los compuestos de tanto el componente (a) como del componente (b), mejoren la actividad antiproliferativa del
15 compuesto (a) contra las células proliferantes, especialmente en un paciente, para el tratamiento de una enfermedad proliferativa que responda a este compuesto.

La invención también se refiere a una preparación farmacéutica que comprende una cantidad, que es conjuntamente efectiva para el tratamiento de una enfermedad proliferativa que
20 pueda ser tratada mediante la administración de un inhibidor de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit, de:

(a) cuando menos un inhibidor de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit, y

25 (b) cuando menos un compuesto orgánico capaz de enlazarse

con glic proteína ácida- α_1 ,

en donde cualquier componente (a) y/o (b) también puede estar presente en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, si está presente cuando menos un grupo formador de sal,

5 con uno o más materiales de vehículo farmacéuticamente aceptables.

La invención también se refiere al uso de una combinación de:

(a) cuando menos un inhibidor de cinasa de tirosina de
10 abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit, y

(b) cuando menos un compuesto orgánico capaz de enlazarse con glicoproteína ácida- α_1 ,

en donde cualquier componente (a) y/o (b) también puede estar presente en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, si está presente cuando menos un grupo formador de sal,
15 para producir preparaciones farmacéuticas para utilizarse como composiciones contra una enfermedad proliferativa que pueda ser tratada mediante la administración de un inhibidor de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit.

20 Se incluye el uso en un método para inhibir la hiperproliferación de células, el cual comprende poner en contacto las células hiperproliferantes con una preparación farmacéutica o producto como se especifica en los últimos dos párrafos, especialmente un método para el tratamiento de una enfermedad pro-
25 liferativa, el cual comprende poner en contacto a un sujeto, a

las células, a los tejidos, o a un fluido corporal de este sujeto, del que se sospeche que tenga una enfermedad hiperproliferativa, con una composición o producto farmacéutico como se especifica en los últimos dos párrafos.

5 Los términos generales utilizados anteriormente en la presente y posteriormente en la presente, de preferencia tienen los siguientes significados, si no se indica de otra manera:

El término "cuando menos uno", haciendo referencia a: a) inhibidores de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit, o b) compuestos orgánicos capaces de enlazarse con glicoproteína ácido- α_1 , se refiere a uno o más, especialmente uno a cinco miembros de cada grupo a) o b), de preferencia a un compuesto del grupo a) y uno o más, especialmente 1 a 5, más especialmente 1 ó 2 compuestos del grupo b).

15 El término "inhibidor de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit", de preferencia significa uno de los siguientes compuestos:

Un compuesto mencionado en la Solicitud Internacional Número WO 97/02266, en la Solicitud de Patente Internacional Número WO 98/35958, y especialmente en la Solicitud de Patente Europea Número EP 0,564,409-A, así como en la Solicitud Internacional Número WO 99/03854, todas las cuales se incorporan a la presente como referencia; Tirfostina AG957 (ver Kaur y colaboradores, Anticancer Drugs 5, 213-222 (1994)), Herbimicina A
25 (Okabe and Uehara, Leukemia and Lymphoma 12, 2156-2162 (1994),

Blood 80, 1330-1338 (1994) y Leuk. Res 18, 213-220 (1994), así como Rioran y colaboradores, Oncogene 16, 133-1542 (1998)); Tirfostinas AG 1295, AG 1296 (ver Kovalenko y colaboradores, Cancer Res 54, 6106-6114 (1994), Lipson y colaboradores, Pharmacol & Exp- Therap. 285, 844-852 (1998), Krystal y colaboradores, Cancer Res. 57, 2203-2208 (1997)); SU 101 (Leflunomida), así como su metabolito (ver Shower y colaboradores, Clin. Cancer Res. 3, 1167-1177 (1997), Mattar y colaboradores FEBS Lett 334, 161-164 (1993), Cherwinskyi y colaboradores, Inflamm. Res. 3, 1167-1177 (1997), y Strawn y colaboradores, Exp. Opin. Invest. Drugs 7, 533-573 (1998)); y Piridopirimidinas (ver, por ejemplo Hamby y colaboradores, J. Med. Chem. 40, 2296-2303 (1997), Dahring y colaboradores, J. Pharmacol. Exp. Ther. 281, 1446-1456 (1997), Klutcho y colaboradores, Life Sci. 62, 143-150 (1998), Panek y colaboradores J. Pharmacol. Exp. Ther 283, 1433-1444 (1997), Boschelli y colaboradores, J. Med. Chem. 41, 4365-4377 (1998)). Todas las referencias mencionadas anteriormente se incorporan a la presente como referencia. Los inhibidores de cinasa de tirosina, su síntesis, y su uso, se pueden deducir de estas referencias.

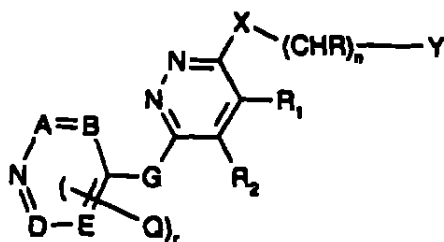
El término "y/o" utilizado en "inhibidor de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit" significa que cualquiera o más de las cinasas de tirosina mencionadas es inhibida por un compuesto abarcado por esta expresión.

De preferencia, uno de los siguientes compuestos signifi-

ca, en el término de "inhibidor de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit":

(A) Un compuesto de la fórmula IV:

5



(IV)

10

en donde:

r es de 0 a 2;

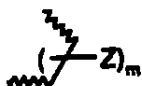
n es de 0 a 2;

m es de 0 a 4;

R₁ y R₂ (i) son alquilo inferior, especialmente metilo, o

15

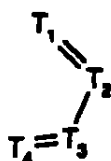
(ii) forman juntos un puente en la subfórmula I*:



(I*)

lográndose el enlace por medio de los dos átomos de carbono terminales, o (iii) forman juntos un puente en la subfórmula I**:

20



(I**)

25

en donde uno o dos de los miembros de anillo T_1 , T_2 , T_3 , y T_4 son nitrógeno, y los otros en cada caso son CH, y el enlace se logra por medio de T_1 y T_4 ;

A, B, D, y E son, independientemente unos de otros, N ó
5 CH, estipulando que no más de dos de estos radicales sean N;

G es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido por aciloxilo o hidroxilo, $-\text{CH}_2-\text{O}-$, $-\text{CH}_2-\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{NH}-$, oxa ($-\text{O}-$),
tia ($-\text{S}-$), ó imino ($-\text{NH}-$);

Q es alquilo inferior, especialmente metilo;

10 R es H ó alquilo inferior;

X es imino, oxa, o tia;

Y es arilo, piridilo, o cicloalquilo insustituido o sustituido; y

Z es amino mono o disustituido, halógeno, alquilo, alquilo
15 sustituido, hidroxilo, hidroxilo eterificado o esterificado, nitro, ciano, carboxilo, carboxilo esterificado, alcanofilo, carbamofilo, carbamofilo N-mono- o N,N-disustituido, amidino, guanidino, mercapto, sulfo, tiofenilo, feniltioalquilo inferior, alquiltiofenilo, fenilsulfinilo, fenilalquilsulfinilo in-
20 ferior, alquilfenilsulfinilo, fenilsulfonilo, fenilalquilsulfonilo inferior, o alquilfenilsulfonilo, en donde - si está presente más de un radical Z ($m = \geq 2$) - los sustituyentes Z son iguales o diferentes unos de otros;

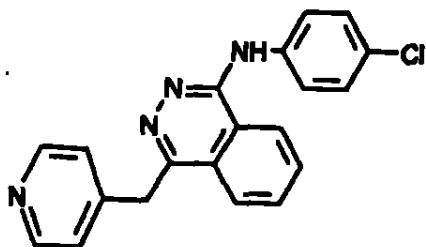
y en donde los enlaces caracterizados, si están presentes,
25 por una línea ondulada, son enlaces sencillos o dobles;

o un N-óxido del compuesto definido, en donde uno o más átomos de N llevan un átomo de oxígeno;

con la estipulación de que, si Y es piridilo o cicloalquilo insustituido, X sea imino, y los radicales restantes sean como se definen, G se seleccione a partir de un grupo que comprenda alquileno inferior, $-\text{CH}_2-\text{O}-$, $-\text{CH}_2-\text{S}-$, oxa, y tía;

o una sal del mismo.

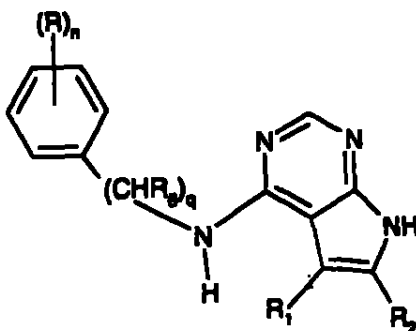
De preferencia, las definiciones de los sustituyentes dadas anteriormente tienen los significados, especialmente los significados preferidos, descritos en la Solicitud de Patente Internacional Número WO 91/35958. El más preferido de estos compuestos es el compuesto de la fórmula V:



(V)

con el nombre 1-(4-cloroanilino)-4-(4-piridilmetil)-ftalazina, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

(B) un compuesto de 7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina de la fórmula VI:



(VI)

en donde:

q es 0 ó 1,

n es de 1 a 3 cuando q es 0, o n es de 0 a 3 cuando q es 1,

5 R es halógeno, alquilo inferior, hidroxilo, alcanoiloxilo inferior, alcoxilo inferior, carboxilo, alcoxycarbonilo inferior, carbamoilo, N-alquilcarbamoilo inferior, N,N-dialquilcarbamoilo inferior, ciano, amino, alcanoilamino inferior, alquilamino inferior, N,N-dialquilamino inferior, o tri-
10 fluorometilo, siendo posible, cuando estén presentes varios radicales R en la molécula, que estos radicales sean idénticos o diferentes;

a) R_1 y R_2 son cada uno independientemente del otro:

α) fenilo sustituido por carbamoilmtoxilo, carboximeto-
15 xilo, benzoiloxycarbonilmtoxilo, alcoxycarbonilmtoxilo inferior, fenilo, amino, alcanoilamino inferior, alquilamino inferior, N,N-dialquilamino inferior, hidroxilo, alcanoiloxilo inferior, carboxilo, alcoxycarbonilo inferior, carbamoilo, N-alquilcarbamoilo inferior, N,N-dialquilcarbamoilo inferior,
20 ciano, o por nitro;

β) hidrógeno;

γ) piridilo insustituido o sustituido por halógeno o por alquilo inferior;

δ) N-bencilpiridinio-2-ilo; naftilo; ciano; carboxilo;
25 alcoxycarbonilo inferior; carbamoilo; N-alquilcarbamoilo infe-

rior; N,N-dialquilcarbamoílo inferior; N-bencilcarbamoílo; formilo; alcanolílo inferior; alquenílo inferior; alqueníloxilo inferior; o

ε) alquilo inferior sustituido por:

5

εα) halógeno, amino, alquilamino inferior, piperazino, dialquilamino inferior,

εβ) fenilamino que está insustituido o sustituido en la fracción de fenilo por halógeno, alquilo inferior, hidroxilo, 10 alcanoiloxilo inferior, alcoxilo inferior, carboxilo, alcoxycarbonilo inferior, carbamoílo, N-alquilcarbamoílo inferior, N,N-dialquilcarbamoílo inferior, ciano, amino, alcanoilamino inferior, alquilamino inferior, N,N-dialquilamino inferior, o por trifluorometilo,

15 εγ) hidroxilo, alcoxilo inferior, ciano, carboxilo, alcoxycarbonilo inferior, carbamoílo, N-alquilcarbamoílo inferior, N,N-dialquilcarbamoílo inferior, mercapto, o

εδ) por un radical de la fórmula $R_1-S(O)_m-$ en donde R_1 es alquilo inferior, y m es 0, 1 ó 2, o

20 b) cuando q es 1, uno de los radicales R_1 y R_2 es alquilo inferior insustituido o fenilo insustituido, y el otro de los radicales R_1 y R_2 tiene uno de los significados dados anteriormente en el párrafo a), con la excepción de hidrógeno, o

c) R_1 y R_2 son juntos 1,4-alcadienileno de 4 a 10 átomos 25 de carbon sustituido por amino, alcanoilamino inferior, alqui-

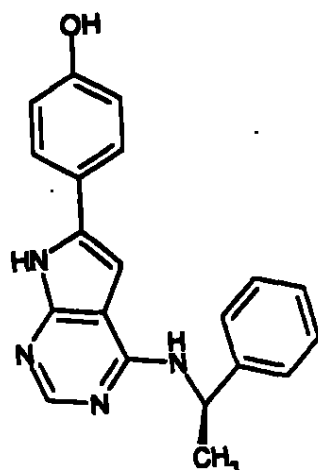
lamino inferior, N,N-dialquilamino inferior, nitro, halógeno, hidroxilo, alcanoiloxilo inferior, carboxilo, alcoxicarbonilo inferior, carbamoilo, N-alquilcarbamoilo inferior, N,N-dialquilcarbamoilo inferior, o por ciano, o son aza-1,4-alcadienileno que tiene hasta 9 átomos de carbono, o

d) cuando q es 1, R₁ y R₂ son cada uno independientemente del otro, alquilo inferior insustituido o fenilo insustituido, o tienen uno de los significados dados anteriormente en el párrafo a), y

R₃ es hidrógeno, alquilo inferior, alcoxicarbonilo inferior, carbamoilo, N-alquilcarbamoilo inferior, o N,N-dialquilcarbamoilo inferior,

o una sal del mismo.

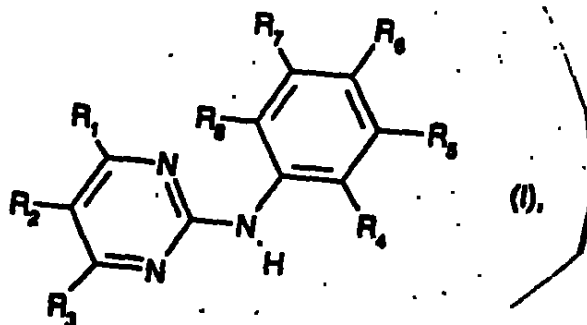
De preferencia, las definiciones de los sustituyentes dadas anteriormente tienen los significados, especialmente los significados preferidos, descritos en la Solicitud de Patente Internacional Número WO 97/02266. El más preferido de estos compuestos es el compuesto de la fórmula VII:



(VII).

que tiene el nombre (R)-6-(4-hidroxifeil)-4-[(1-feniletil)-amino]-7H-pirrolo[2,3-d] pirimidina; o más preferido:

(c) un derivado de N-fenil-2-pirimidinamida de la fórmula I:

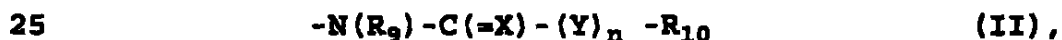


en donde:

R_1 es 4-pirazinilo, 1-metil-1H-pirrolilo, fenil sustituido por amino o por aminoalquilo inferior, en donde el grupo amino en cada caso está libre, alquilado, o acilado, 1H-indolilo ó 1H-imidazolilo enlazado en un átomo de carbono del anillo de 5 miembros, o piridilo insustituido o sustituido por amino o por aminoalquilo inferior enlazado en un átomo de carbono del anillo, e insustituido o sustituido en el átomo de nitrógeno por oxígeno,

R_2 y R_3 son cada uno independientemente del otro, hidrógeno o alquilo inferior,

uno o dos de los radicales R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno nitro, alcoxilo inferior sustituido por flúor, un radical de la fórmula II:



en donde:

R₁ es hidrógeno o alquilo inferior,

X es oxo, tio, imino, N-alquilimino inferior, hidroximino, u
O-alquilhidroximino inferior,

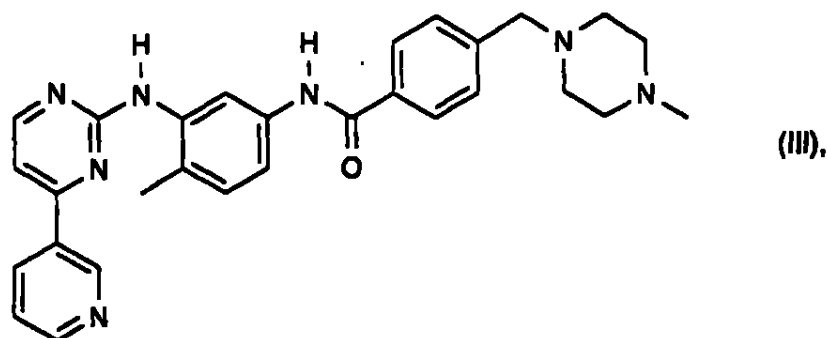
5 Y es oxígeno o el grupo NH,

n es 0 ó 1, y

R₁₀ es un radical alifático que tiene cuando menos 5 átomos
de carbono, o un radical aromático, aromático-alifático, ci-
cloalifático, cicloalifático-alifático, heterocíclico, o hete-
10 rocíclico-alifático, y los radicales restantes R₄, R₅, R₆, R₇, y
R₈ son cada uno independientemente de los otros, hidrógeno, al-
quilo inferior que está insustituido o sustituido por amino li-
bre o alquilado, piperazinilo, piperidinilo, pirrolidinilo, o
por morfolinilo, o alcanofilo inferior, trifluorometilo, hidro-
15 xilo libre, eterificado o esterificado, amino libre, alquilado
o acilado, o carboxilo libre o esterificado, o

una sal de estos compuestos que tengan cuando menos un
grupo formador de sal.

De preferencia, las definiciones de los sustituyentes da-
20 das anteriormente tienen los significados, especialmente los
significados preferidos, descritos en la Solicitud de Patente
Europea Número EP 0,564,409. El más preferido de estos com-
puesto es el compuesto de la fórmula III:



5

10

15

con el nombre 4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il)pirimidin-2-ilamino)fenil]benzamida, de preferencia en la forma de la sal de metansulfonato, como se describe en la Publicación Internacional Número WO 99/03854, más preferiblemente en la forma de la sal de metansulfonato en la forma del cristal- β , como se describe en la Publicación Internacional Número WO 99/03854. Este compuesto (la forma de la sal de metansulfonato) se denomina como STI571 posteriormente en la presente.

Un "compuesto orgánico capaz de enlazarse con una glicoproteína ácida- α_1 (AGP)", es en general un fármaco básico o neutro, pero también un fármaco ácido, especialmente seleccionado a partir del grupo que consiste en:

20

bloqueadores-alfa, especialmente Nicergolina o Prazosina; anestésicos/analgésicos, especialmente Alfentanil, Cetamina, o Etidocaína;

analgésicos, especialmente Fentanil, Meperidina, Metadona, o Fenilbutazona;

25

anestésicos, especialmente Bupivacaína, Etidocaína, o Fen-

ciclidina;

anestésicos/antiarrítmicos, especialmente Lidocaína o Fen-
ciclidina;

antiarrítmicos, especialmente Aprindina, Disopiramida,
5 Quinidina, o Verapamil;

antibióticos, especialmente Eritromicina;

anticuagulantes, especialmente Acenocumarol, Dipyridamol,
PCR2362 (derivado de tienopiridina), Ticlopidina, o Warfarina;

antiepilépticos, especialmente Fenitoína, o Carbamazepina;
10 agentes antiinflamatorios, especialmente Naproxeno;

bloqueadores-beta, especialmente Alprenolol, Metoprolol,
Oxprenolol, Pindolol, y compuestos relacionados, Propranolol, o
Timolol;

esteroides, tales como Progesterona, Cortexona, Cortisol,
15 Testosterona, Estradiol, o Prednisolona;

bloqueadores neuromusculares, especialmente Metocurina o
d-Tubocurarina;

psicotrópicos, especialmente Amitriptilina, Clorpromazina,
Ciclazindol, Desmetilimipramina, Diazepam, Doxepina, Fluraze-
20 pam, Flufenazina, Haloperidol, Imipramina, Loxapina, Mianseri-
na, Nortriptilina, Norzimelidina, Perazina, Perfenazina, Feno-
barbital, Derivados de Fenotiazina, Promazina, Acepromazina,
Protipendilo, Tioridazina, Tiotixeno, Triazolam, Trifluoperazi-
na, o Zimelidina;

25 vitaminas y provitaminas, especialmente Vitamina B₁₂ ó áci-

do fóllico;

sondas fluorescentes, especialmente DAPN (derivado de propranolol), 1,8-Anilino-naftalensulfonato;

fármacos adicionales, especialmente Aminopirina, Amoxapina, Bupropión, Maprolitina, Nomifensina, Trazodona, fármacos con grupo amonio cuaternario, Ritodrina, Doxazosina, Trimazosina, Binedalina, Amsacrina, Apazona, SKF 525A, Ciclazindol, PCR 2362, Indometacina, Probenecida, Acido Retinoico, Sulfinpirazona, Tolmetina, Benoxaprofeno, Heparina, Sufentanil, Lofentanil, Metoclopramida, Nicardipina, Pirmenol, mifepristona, RU 42 633, Aprindil, Auramina, O, Bepridil, Desipramina, Desmetilclomipramina, Moxaprendina, Quinina, Lorcainida, Protipendilo, Protriptilina, Trihexifenidilo, Biperideno, Maticualona, Difenhidramina, Glutetimida, Clordiazepóxido, L-triptófano, Mepivacaína, Levometadona, Opipramol, Trifluopromazina, o Trimipramina;

plastificantes, tales como fosfato de tris-butoxiethyl (TBEP);

estaurosporina (ver la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,107,297) o derivados estaurosporina, de preferencia aquéllos dados a conocer en las Solicitudes de Patente Europeas Números EP 0,296,110 y/o EP 0,238,011, especialmente N-benzoil-estaurosporina (PTK412 - ver la Solicitud de Patente Europea Número EP 0,296,110), ó 7-hidroxi-estaurosporina (UCN-01 - ver la Solicitud de Patente europea Número EP 0,238,011);

así com un metabolito de cualquiera de estos compuestos;

o una sal - especialmente farmacéuticamente aceptable - de los mismos.

Las Patentes Números EP 0,238,011; US 4,107,297 y EP 0,296,110 se incorporan como referencia, así como las siguientes publicaciones: Kremer y colaboradores, Pharmacol. Rev. 40(1), 1-47 (1988); Cancer Res. 58, 3248-3253 (1998); Br. J. Clin. Pharmacol 22, 499-506 (1986); Physiol. Functions, and Pharmacol., páginas 321-336: F. Bree y colaboradores, "Binding to α_1 -acidic glycoprotein and relevant apparent volume of distribution", Alan R. Liss Inc., 1989; Protein Binding and Drug Transport (Tillement y Lindenlaub, editores): "Drug binding to human α_1 -acidic glycoprotein - focus on a single binding site", Stuttgart 1986. En todas estas publicaciones, se mencionan compuestos capaces de enlazarse con AGP, que son las modalidades preferidas de la presente invención.

Se prefiere más cualquiera de los compuestos mencionados anteriormente diferentes de un esteroide. Para un segundo uso médico (por ejemplo, en los grupos de pacientes en donde se haya desarrollado resistencia, más especialmente pacientes de CML en crisis y pacientes de Ph⁺-ALL reincidentes), también los esteroides son útiles.

Un compuesto orgánico capaz de enlazarse con AGP, para utilizarse en la combinación de acuerdo con la invención, en adición a una cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, o receptora de Kit, también se puede seleccionar a partir de una o más ci-

nasas de tirosina de abl, de PDGF-R, o receptora de Kit adicionales, significando que el componente (b) en las modalidades de la invención, también puede ser uno de estos compuestos.

De preferencia, la cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit (componente (a)), se selecciona a partir del grupo que consiste en 1-(4-cloroanilino)-4-(4-piridilmetil)-ftalazina, (R)-6-(4-hidroxifeil)-4-[(1-fenil-etil)-amino]-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidina, y de preferencia 4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il)pirimidin-2-ilamino]fenil]-benzamida; o una sal de las mismas; más preferiblemente, la sal de metansulfonato de 4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il)pirimidin-2-ilamino]fenil]-benzamida, más preferible en la forma del cristal- β , como se describe en la Publicación Internacional Número WO 99/03854.

El compuesto orgánico capaz de enlazarse con la glicoproteína ácido- α_1 (componente (b)), de preferencia es un antibiótico, especialmente eritromicina, o estaurosporina o un derivado de estaurosporina, especialmente N-benzoil-estaurosporina (PKC412) ó 7-hidroxi-estaurosporina (UCN-01), o una sal de las mismas, más especialmente eritromicina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Se puede utilizar uno o más de cada uno de los inhibidores de cinasa de tirosina y el compuesto orgánico capaz de enlazarse con AGP, en una combinación o en una terapia de combinación,

de acuerdo con la presente invención.

Enlace significa especialmente un enlace competitivo, pero también puede ser cualquier otro tipo de enlace (por ejemplo, para sitios de enlace que muestren efectos aloestéricos sobre el componente de enlace del sitio (a)) que conduzca a un enlace reducido de un inhibidor de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R-, y/o receptora de Kit con AGP. Este enlace se puede determinar *in vitro* en analogía a los métodos descritos en los ejemplos que se encuentran más adelante en la presente.

El enlace puede ser irreversible (por ejemplo, mediante enlace covalente o iónico), o de preferencia reversible.

"Capaz de enlazarse" significa que el compuesto tiene afinidad con AGP, que permite el enlace como se describió anteriormente, de preferencia con una concentración en un enlace medio-máximo en el rango milimolar a sub-nanomolar, especialmente en el rango de 100 μ M a 1 nM.

El término "una enfermedad proliferativa que pueda ser tratada mediante la administración de una cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit", para cualquier enfermedad mencionada en la presente, significa: de preferencia cualquier enfermedad que responda a estos compuestos; especialmente una enfermedad proliferativa seleccionada a partir de una enfermedad de cáncer, especialmente una enfermedad tumoral o leucemia, o una enfermedad proliferativa no maligna, por ejemplo aterosclerosis, trombosis, psoriasis, esclerodermatitis, o fi-

brosis. De una manera más preferible, significa una enfermedad seleccionada a partir del grupo que consiste en CML (leucemia mieloide crónica) y ALL (leucemia linfoblástica aguda), o un tumor sólido, especialmente seleccionado a partir de cáncer de pulmón, especialmente cáncer de pulmón que no es de células pequeñas, y a partir de cáncer de la próstata.

El término "cantidad que es conjuntamente efectiva terapéuticamente contra una enfermedad proliferativa que pueda ser tratada mediante la administración de un inhibidor de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R y/o receptora de Kit", de preferencia significa cualquier cantidad de los componentes de las combinaciones que, en la combinación, reduzca la proliferación de las células responsables de cualquiera de las enfermedades proliferativas mencionadas (por ejemplo, crecimiento tumoral reducido), o de preferencia, inclusive que ocasione una regresión, más preferiblemente inclusive la desaparición parcial o completa, de estas células (por ejemplo, regresión de tumor, de preferencia cura).

De preferencia, en cualquiera de las modalidades de la presente invención, la dosis de cada uno de los componentes de la combinación (componentes (a) y (b)) se selecciona de tal manera que se alcance un nivel en plasma sanguíneo que esté arriba de la concentración del enlace medio-máximo del componente (b), el compuesto orgánico capaz de enlazarse con AGP, *in vivo*, cuando menos una parte del tiempo en que esté presente el com-

ponente (a), el inhibidor de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit. Esta concentración se puede determinar, por ejemplo, in vitro, de acuerdo con los procedimientos convencionales, por ejemplo en analogía a los métodos descritos en los ejemplos para la determinación de K_a , mientras que la concentración en plasma sanguíneo de los componentes (a) y (b) en un animal de sangre caliente (significando especialmente un paciente humano) también se puede determinar de acuerdo con los métodos de rutina.

De preferencia, la dosificación del componente (b) se selecciona de tal manera que la concentración del componente (b) sea mayor de $0.05 \mu\text{M}$, en plasma, más preferiblemente mayor de $0.1 \mu\text{M}$, y muy preferiblemente entre 0.5 y $100 \mu\text{M}$, especialmente entre 1 y $50 \mu\text{M}$, del individuo tratado, cuando menos parte del tiempo en que también esté presente el componente (a). Más preferiblemente, la concentración de cualquiera de los componentes (a) y (b) es mayor de $0.1 \mu\text{M}$, más preferiblemente mayor de $1 \mu\text{M}$, y muy preferiblemente entre 0.5 y $100 \mu\text{M}$, especialmente entre 1 y $50 \mu\text{M}$, en el plasma sanguíneo del individuo tratado, cuando menos parte del tiempo en que también esté presente el componente (a) ó el componente (b), respectivamente.

Las concentraciones en plasma se puede determinar de acuerdo con los métodos convencionales, por ejemplo empleando HPLC de muestras procesadas de acuerdo con los procedimientos convencionales.

El término "un producto que comprende:

(a) cuando menos un inhibidor de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit, y

(b) cuando menos un compuesto orgánico capaz de enlazarse
5 con glicoproteína ácida- α_1 (AGP),

en donde cualquier componente (a) y/o (b) también puede estar presente en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, si está presente cuando menos un grupo formador de sal,

en la presencia o en ausencia de uno o más materiales de
10 vehículo farmacéuticamente aceptables, como una preparación en combinación para su uso simultáneo o cronológicamente escalonado dentro de un período de tiempo que sea suficientemente pequeño para que los compuestos de tanto el componente (a) como del componente (b), mejoren la actividad antiproliferativa del
15 compuesto (a) contra las células proliferantes, especialmente en un paciente, para el tratamiento de una enfermedad proliferativa que responda a este compuesto", significa especialmente un "estuche" o "estuche de partes" en el sentido de que los componentes efectivos (a) y (b) de la combinación, se puedan
20 dosificar de manera independiente, o mediante el uso de combinaciones fijas diferentes con cantidades distinguidas de cualquiera de los componentes (a) y (b) en diferentes puntos del tiempo. Las partes del estuche de partes se pueden entonces administrar de una manera simultánea, o de una manera cronológicamente escalonada, es decir, en diferentes puntos del tiempo.
25

po, y con intervalos de tiempo iguales o diferentes para cualquier parte del estuche de partes, con la condición de que los intervalos de tiempo se seleccionen de tal manera que el efecto sobre la enfermedad proliferativa en el uso combinado de las partes sea mayor que el efecto que se obtendría mediante el uso de solamente el componente (a), es decir, una inhibición más fuerte de la proliferación, o de preferencia, una regresión más fuerte o inclusive la cura de la enfermedad proliferativa, que cuando se administre solamente la misma dosis de un solo componente (a). Esto es lo que significa el término "para mejorar la actividad antiproliferativa contra células proliferantes, especialmente en un paciente"; de preferencia; esto significa una mejora del efecto mediante el componente (b), especialmente una reversión parcial o completa de la resistencia de una enfermedad proliferativa a uno o más compuestos del tipo del componente (a), y/o que ocasione la regresión de las células proliferantes, hasta e incluyendo su destrucción completa.

El término "células proliferantes", de preferencia significa las células que se proliferan de una manera anormal, tales como las células de cáncer.

Se prefieren las combinaciones que muestren una mejor actividad antiproliferativa, al compararse con el único componente (a) solo, especialmente combinaciones que muestren sinergismo (combinaciones sinérgicas), o combinaciones que conduzcan a la regresión de los tejidos proliferativos y/o a la cura de las

enfermedades proliferativas, más preferiblemente combinaciones en donde se supere parcial o completamente la resistencia (significando la resistencia ya al principio del tratamiento, o la resistencia que sea un resultado de períodos más o menos prolongados de tratamiento con el componente (a)) de una enfermedad proliferativa en un animal de sangre caliente, especialmente un ser humano, a uno o más compuestos del tipo de componente (a).

Los "materiales de vehículo farmacéuticamente aceptables" se explica más adelante en la definición de las preparaciones farmacéuticas.

En cualquier combinación o tratamiento de combinación de acuerdo con la invención descrita en la presente, el uso en combinación con el objeto de revertir completa o parcialmente la resistencia (presente antes del tratamiento, o desarrollada o en desarrollo durante el tratamiento con un fármaco que comprenda un componente (a) como se describe en la presente) de una enfermedad proliferativa al tratamiento con un fármaco que comprenda un componente (a) como se define en la presente in vivo, especialmente en un animal de sangre caliente, especialmente un ser humano, es el preferido.

Una resistencia completa o parcial significa especialmente que se encuentra una eficiencia más baja, por ejemplo en términos de detener o demorar la proliferación, ocasionar la regresión o inclusive la cura, por ejemplo, menos inhibición de prolifera-

ción, o una duración más larga del tratamiento hasta que se encuentre una respuesta esperada si ya no está presente la resistencia, por ejemplo de un tumor o leucemia, que en un animal, por ejemplo, un ser humano, que no muestre resistencia, o que ya no se encuentren los éxitos de tratamiento iniciales (especialmente en un paciente que desarrolle resistencia solamente durante el tratamiento con un componente (a)) en las etapas posteriores del tratamiento, especialmente en pacientes de CML con crisis, y en los pacientes de Ph⁺-ALL reincidentes.

10 Se debe entender que la invención se refiere también a cualquier uso de combinaciones de un componente (a) y un componente (b), como se definen anteriormente y más adelante, en un método para inhibir la hiperproliferación de células, el cual comprende poner en contacto las células hiperproliferantes con
15 una preparación o producto farmacéutico en el sentido de un estuche de partes, especialmente un método para el tratamiento de una enfermedad proliferativa, el cual comprende poner en contacto a un sujeto, a las células, a los tejidos, o a un fluido corporal de este sujeto, del que se sospeche que tenga una enfermedad hiperproliferativa. Esto incluye especialmente el
20 tratamiento de, por ejemplo, células afuera del cuerpo, con la intención de reemplazar las células hiperproliferantes en el cuerpo de un sujeto con células hiperproliferantes, por células normales; por ejemplo, se pueden tomar sangre con células del
25 sistema inmune de un sujeto, se pueden tratar afuera del cuerpo

con un componente (a) y un componente (b) para seleccionar las células no hiperproliferativas, se pueden destruir las células de tallo y las células sanguíneas restantes del sistema inmune en el sujeto, por ejemplo, mediante irradiación o quimioterapia, y luego se pueden reimplantar las células normales seleccionadas en el sujeto, por ejemplo mediante inyección, etcétera. Los métodos que se van a emplear en estas clases de tratamiento son conocidos por la persona que tenga experiencia en la materia.

10 Cualquiera de las referencias mencionadas en esta memoria descriptiva, se incorpora como referencia, especialmente los pasajes marcados como preferidos en la presente.

En el entendido de que estén presentes uno o más grupos formadores de sal, también pueden estar presentes las sustancias de fármaco correspondientes a los componentes (a) y/o (b) en la forma de sales.

Las sales son especialmente las sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo sustancialmente no tóxicas.

Estas sales se forman, por ejemplo, a partir de compuestos que tengan un grupo ácido, por ejemplo un grupo carboxil, fosfodiéster, o fosforotiato, y son, por ejemplo, sus sales con bases adecuadas, tales como sales de metal no tóxicas derivadas a partir de metales de los grupos Ia, Ib, Iia, y Iib de la Tabla Periódica de los Elementos, especialmente las sales de metales alcalinos adecuadas, por ejemplo las sales de litio, so-

dio, o potasio, o las sales de metales alcalinotérreos, por ejemplo las sales de magnesio o calcio, además las sales de zinc o amonio, también las sales que se forman con aminas orgánicas, tales como mono-, di-, o tri-alquilaminas insustituidas o sustituidas por hidroxilo, especialmente mono-, di-, o tri-alquilaminas inferiores, o con compuestos de amonio cuaternario, por ejemplo con N-metil-N-etilamina, dietilamina, trietilamina, mono-, bis-, o tris-(2-hidroxialquilo inferior)amina, tales como mono-, bis-, o tris-(2-hidroxietil)amina, 2-hidroxihidroxiterbutilamina, o tris(hidroximetil)metilamina, N,N-dialquilo inferior-N-(hidroxialquilo inferior)-aminas, tales como N,N-dimetil-N-(2-hidroxietil)-amina o tri-(2-hidroxietil)-amina, o N-metil-D-glucamina, o sales de amonio cuaternario, tales como sales de tetrabutilamonio. Los compuestos que tengan un grupo básico, por ejemplo un grupo amino o imino, pueden formar sales de adición de ácido, por ejemplo con ácidos inorgánicos, por ejemplo un ácido halohídrico, tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, o ácido fosfórico, o con ácidos carboxílicos orgánicos, sulfónicos, sulfo, o fosfo, o ácidos sulfámicos N-sustituidos, tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido succínico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido metilmaleico, ácido fumárico, ácido málico, ácido tartárico, ácido glucónico, ácido glucárico, ácido glucurónico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido salicílico, ácido 4-

aminosalicílico, ácido 2-fenoxibenzoico, ácido 2-acetoxibenzoico, ácido embónico, ácido nicotínico, o ácido isonicotínico, también con aminoácidos, por ejemplo α -aminoácidos, y también con ácido metansulfónico, ácido etansulfónico, ácido 2-hidroxietansulfónico, ácido etan-1,2-disulfónico, ácido bencensulfónico, ácido 4-metilbencensulfónico, ácido naftalen-2-sulfónico, 2- ó 3-fosfoglicerato, glucosa-6-fosfato, ácido N-ciclohexilsulfámico (con la formación de los ciclamatos), o con otros compuestos orgánicos ácidos, tales como ácido ascórbico.

10 Los compuestos que tengan grupos ácidos o básicos también pueden formar sales internas. Si está presente más de un grupo formador de sal, también es posible que estén presentes sales mixtas.

Para el propósito de aislamiento o purificación, también

15 es posible utilizar sales farmacéuticamente inaceptables, por ejemplo sales de picrato o perclorato.

Los términos "compuestos", "componentes", y "sales", también incluyen expresamente los compuestos individuales o las sales individuales.

20 Como se puede entender a partir del presente texto, el término "combinación" en los párrafos anteriores, y especialmente en los párrafos siguientes, que describen variantes más específicas y preferidas de la presente invención, se pretende referir a:

25 (i) una preparación en combinación que comprende: (a)

cuando menos un inhibidor de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit, y (b) cuando menos un compuesto orgánico capaz de enlazarse con glicoproteína ácida- α_1 (AGP), o sales farmacéuticamente aceptables de cualquier componente (a),
5 (b), o (a) y (b), si está presente cuando menos un grupo formador de sal;

(ii) un método para el tratamiento de una enfermedad proliferativa que pueda ser tratada mediante la administración de un inhibidor de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit, en donde (a) cuando menos un inhibidor de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit, y
10

(b) cuando menos un compuesto orgánico capaz de enlazarse con glicoproteína ácido- α_1 (AGP),

se administran a un mamífero en combinación con una cantidad que sea conjuntamente efectiva terapéuticamente contra una enfermedad proliferativa que se pueda tratar mediante la administración de un inhibidor de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit, en donde cualquier componente (a) y/o (b) también puede estar presente en la forma de una sal
15
20 farmacéuticamente aceptable, si está presente cuando menos un grupo formador de sal;

(iii) un producto que comprende:

(a) cuando menos un inhibidor de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit, y

25 (b) cuando menos un compuesto orgánico capaz de enlazarse

con glicoproteína ácida- α_1 (AGP),

en donde cualquier componente (a) y/o (b) también puede estar presente en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, si está presente cuando menos un grupo formador de sal,

5 en la presencia o en ausencia de uno o más materiales de vehículo farmacéuticamente aceptables, como una preparación en combinación para su uso simultáneo o cronológicamente escalonado dentro de un período de tiempo que sea suficientemente pequeño para que los compuestos de tanto el componente (a) como
10 del componente (b), mejoren la actividad antiproliferativa del compuesto (a) contra las células proliferantes, especialmente en un paciente, para el tratamiento de una enfermedad proliferativa que responda a este compuesto.

(iv) una preparación farmacéutica que comprende una cantidad,
15 que es conjuntamente efectiva para el tratamiento de una enfermedad proliferativa que se pueda tratar mediante la administración de inhibidor de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit, de:

(a) cuando menos un inhibidor de cinasa de tirosina de
20 abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit, y

(b) cuando menos un compuesto orgánico capaz de enlazarse con glicoproteína ácida- α_1 ,

en donde cualquier componente (a) y/o (b) también puede estar presente en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, si está presente cuando menos un grupo formador de sal,
25

con uno o más materiales de vehículo farmacéuticamente aceptables; y/o

v) el uso de una combinación de:

(a) cuando menos un inhibidor de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit, y

(b) cuando menos un compuesto orgánico capaz de enlazarse con glicoproteína ácida- α_1 ,

en donde cualquier componente (a) y/o (b) también puede estar presente en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, si está presente cuando menos un grupo formador de sal,

para producir preparaciones farmacéuticas para utilizarse como composiciones contra una enfermedad proliferativa que pueda ser tratada mediante la administración de un inhibidor de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit;

o cualquier combinación de estos objetos de la invención, hasta donde sea permisible bajo las leyes de patente respectivas;

o las variantes más específicas y preferidas de las mismas, como se dan más adelante;

en donde cualquier componente (a) y/o (b) también puede estar presente en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, si está presente cuando menos un grupo formador de sal;

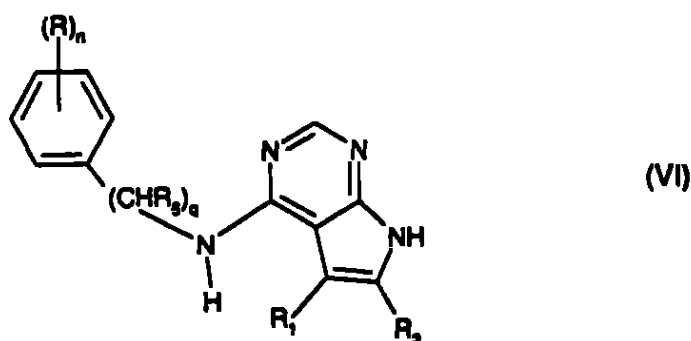
si no se define de otra manera o es evidente de otra manera a partir del contexto.

dentro de los siguientes grupos de modalidades más prefe-

ridas de la invención, las definiciones más generales pueden ser reemplazadas por definiciones más específicas de acuerdo con las dadas anteriormente, o (especialmente con respecto a la definición de composiciones farmacéuticas y métodos de uso) más adelante.

Se prefiere una combinación de (a) cuando menos uno, y de preferencia un inhibidor de cinasa de tirosina de abl, receptora de PDGF, y/o receptora de Kit, seleccionado a partir de:

(i) un compuesto de 7H-pirrólo[2,3-d]pirimidina de la fórmula VI:



en donde:

q es 0 ó 1,

n es de 1 a 3 cuando q es 0, o n es de 0 a 3 cuando q es 1,

R es halógeno, alquilo inferior, hidroxilo, alcanoiloxilo inferior, alcoxilo inferior, carboxilo, alcoxicarbonilo inferior, carbamofilo, N-alquilcarbamofilo inferior, N,N-dialquilcarbamofilo inferior, ciano, amino, alcanoilamino inferior, alquilamino inferior, N,N-dialquilamino inferior, o trifluorometilo, siendo posible, cuando estén presentes varios ra-

dicales R en la molécula, que estos radicales sean idénticos o diferentes;

a) R_1 y R_2 son cada uno independientemente del otro:

5 α) fenilo sustituido por carbamoilmetoxilo, carboximeto-
xilo, benzoiloxicarbonilmetoxilo, alcoxicarbonilmetoxilo infe-
rior, fenilo, amino, alcanoilamino inferior, alquilamino infe-
rior, N,N-dialquilamino inferior, hidroxilo, alcanoiloxilo in-
ferior, carboxilo, alcoxicarbonilo inferior, carbamoilo, N-
alquilcarbamoilo inferior, N,N-dialquilcarbamoilo inferior,
10 ciano, o por nitro;

β) hidrógeno;

γ) piridilo insustituido o sustituido por halógeno o por
alquilo inferior;

δ) N-bencilpiridinio-2-ilo; naftilo; ciano; carboxilo;
15 alcoxicarbonilo inferior; carbamoilo; N-alquilcarbamoilo infe-
rior; N,N-dialquilcarbamoilo inferior; N-bencilcarbamoilo; for-
milo; alcanofilo inferior; alquenilo inferior; alqueniloxilo in-
ferior; o

ϵ) alquilo inferior sustituido por:

20

$\epsilon\alpha$) halógeno, amino, alquilamino inferior, piperazino,
dialquilamino inferior,

$\epsilon\beta$) fenilamino que está insustituido o sustituido en la
fracción de fenilo por halógeno, alquilo inferior, hidroxilo,
25 alcanoiloxilo inferior, alcóxilo inferior, carboxilo, alcóxi-

carbonilo inferior, carbamoilo, N-alquilcarbamoilo inferior, N,N-dialquilcarbamoilo inferior, ciano, amino, alcanoilamino inferior, alquilamino inferior, N,N-dialquilamino inferior, o por trifluorometilo,

5 sy) hidroxilo, alcoxilo inferior, ciano, carboxilo, alcoxicarbonilo inferior, carbamoilo, N-alquilcarbamoilo inferior, N,N-dialquilcarbamoilo inferior, mercapto, o

sd) por un radical de la fórmula $R_1-S(O)_m$ - en donde R_1 es alquilo inferior, y m es 0, 1 ó 2, o

10 b) cuando q es 1, uno de los radicales R_1 y R_2 es alquilo inferior insustituido o fenilo insustituido, y el otro de los radicales R_1 y R_2 tiene uno de los significados dados anteriormente en el párrafo a), con la excepción de hidrógeno, o

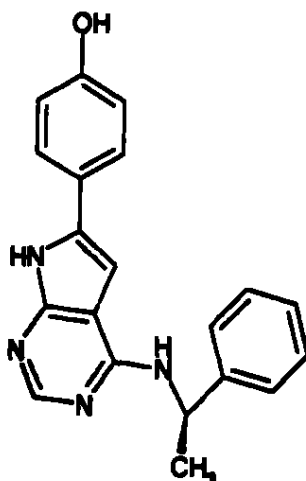
15 c) R_1 y R_2 son juntos 1,4-alcadienileno de 4 a 10 átomos de carbono sustituido por amino, alcanoilamino inferior, alquilamino inferior, N,N-dialquilamino inferior, nitro, halógeno, hidroxilo, alcanoiloxilo inferior, carboxilo, alcoxycarbonilo inferior, carbamoilo, N-alquilcarbamoilo inferior, N,N-dialquilcarbamoilo inferior, o por ciano, o son aza-1,4-
20 alcadienileno que tiene hasta 9 átomos de carbono, o

d) cuando q es 1, R_1 y R_2 son cada uno independientemente del otro, alquilo inferior insustituido o fenilo insustituido, o tienen uno de los significados dados anteriormente en el párrafo a), y

25 R_6 es hidrógeno, alquilo inferior, alcoxycarbonilo inferior,

carbamoílo, N-alquilcarbamoílo inferior, o N,N-dialquilcarbamoílo inferior,

o una sal del mismo (de preferencia, las definiciones de los sustituyentes dadas anteriormente tienen los significados, especialmente los significados preferidos, descritos en la So-
licitud de Patente Internacional Número WO 97/02266 - el más preferido de estos compuestos es el compuesto de la fórmula VII:



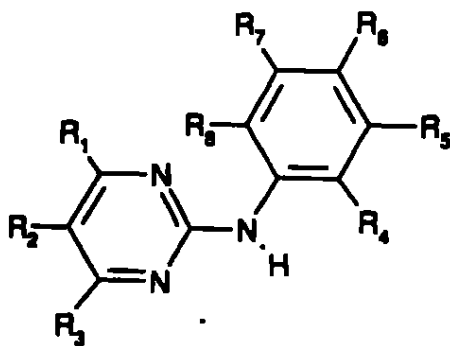
(VII).

que tiene el nombre (R)-6-(4-hidroxifenil)-4-[(1-feniletíl)-amino]-7H-pirrólo[2,3-d]pirimidina);

y

(ii) un derivado de N-fenil-2-pirimidinamina de la fórmula

I:



(I).

en donde:

5 R_1 es pirazinilo, 1-metil-1H-pirrolilo, fenilo sustituido por amino o por aminoalquilo inferior, en donde el grupo amino en cada caso está libre, alquilado, o acilado, 1H-indolilo ó 1H-imidazolilo enlazado en un átomo de carbono del anillo de 5 miembros, o piridilo insustituido o sustituido por alquilo inferior enlazado en un átomo de carbono del anillo, e insustituido o sustituido en el átomo de nitrógeno por oxígeno,

10 R_2 y R_3 son cada uno independientemente del otro, hidrógeno o alquilo inferior,

uno o dos de los radicales R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , y R_8 son cada uno nitro, alcoxilo inferior sustituido por flúor, o un radical de

15 la fórmula II:



en donde:

R_9 es hidrógeno o alquilo inferior,

20 X es oxo, tio, imino, N-alquilimino inferior, hidroximino, u O-alquilhidroximino inferior,

Y es oxígeno o el grupo NH,

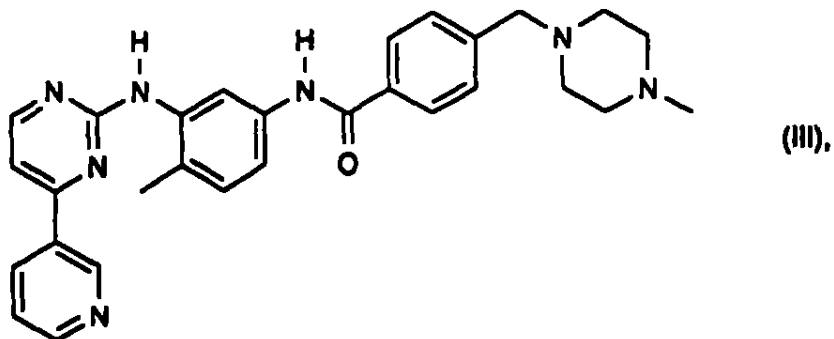
n es 0 ó 1, y

R_{10} es un radical alifático que tiene cuando menos 5 átomos

25 de carbono, o un radical aromático, aromático-alifático, ci-

cloalifático, cicicalifático-alifático, heterocíclico, o heterocíclico-alifático, y los radicales restantes R₁, R₂, R₆, R₇, y R₈ son cada uno independientemente de los otros, hidrógeno, alquilo inferior que está insustituido o sustituido por amino libre o alquilado, piperazinilo, piperidinilo, pirrolidinilo, o por morfolinilo, o alcanoílo inferior, trifluorometilo, hidroxilo libre, eterificado o esterificado, amino libre, alquilado o acilado, o carboxilo libre o esterificado, o

una sal de estos compuestos que tengan cuando menos un grupo formador de sal (de preferencia, las definiciones de los sustituyentes dadas anteriormente tienen los significados, especialmente los significados preferidos, descritos en la Solicitud de Patente Europea Número EP 0,564,409. El más preferido de estos compuestos es el compuesto de la fórmula III:



con el nombre de 4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il)pirimidin-2-ilamino]fenil]benzamida, de preferencia en la forma de la sal de metansulfonato, como se describe en la Publicación Internacional Número WO 99/03854,

más preferiblemente en la forma de la sal de metansulfonato en la forma del cristal- β como se describe en la Publicación Internacional Número WO 99/03854;

con (b) cuando menos un (de preferencia uno) compuesto orgánico capaz de enlazarse con la glicoproteína ácida- α_1 (AGP),
5 seleccionado a partir del grupo que consiste en:

Nicergolina, Prazosina, Alfentanil, Cetamina, Etidocaína, Fentanil, Meperidina, Metadona, Fenilbutazona, Bupivacaína, Etidocaína, Fenciclidina, Lidocaína, Fenciclidina, Aprindina,
10 Disopiramida, Quinidina, Verapamil, Eritromicina, Acenocumarol, Dipyridamol, PCR2362, Ticlopidina, Warfarina, Fenitofina, Carbamazepina, Naproxeno, Alprenolol, Metoprolol, Oxprenolol, Pindolol, Propranolol, Timolol, Progesterona, Cortexona, Cortisol, Testosterona, Estradiol, Prednisolona, Metocurina, d-
15 Tubocurarina, Amitriptilina, Clorpromazina, Ciclazindol, Desmetilimipramina, Diazepam, Doxepina, Flurazepam, Flufenazina, Haloperidol, Imipramina, Loxapina, Mianserina, Nortriptilina, Norzimelidina, Perazina, Perfenazina, Fenobarbital, Derivados de Fenotiazina, Promazina, Acepromazina, Protipendilo, Tioridazina, Tiotixeno, Triazolam, Trifluoperazina, Zimelidina, vitamina B₁₂, ácido fólico, DAPN, 1,8-Anilino-naftalensulfonato; Aminopirina, Amoxapina, Bupropión, Maprolitina, Nomifensina, Trazodona, Ritodrina, Doxazosina, Trimazosina, Binedalina, Amsacrina, Apazona, SKF 525A, Ciclazindol, PCR 2362, Indometacina,
20 cina, Probenecida, Acido Retinoico, Sulfinpirazona, Tolmetina,
25

Benoxaprofeno, Heparina, Sufentanil, Lofentanil, Metocloprami-
da, Nicardipina, Pirmenol, mifepristona, RU 42 633, Aprindil,
Auramina O, Bepridil, Desipramina, Desmetilclomiprafina, Moxa-
prindina, Quinina, Lorcainida, Protipendilo, Protriptilina,
5 Trihexifenidilo, Biperideno, Matacualona, Difenhidramina, Glu-
tetimida, Clordiazepóxido, L-triptófano, Mepivacaína, Levometa-
dona, Opipramol, Trifluopromazina, Trimipramina, Fosfato de
tris-butoxietilo, estaurosporina, N-benzoil-estaurosporina, y
7-hidroxi-estaurosporina;

10 así como un metabolito de cualquiera de estos compuestos;
en donde cualquier componente (a) y/o (b) de preferencia
puede estar presente en la forma libre o en la forma de una sal
farmacéuticamente aceptable, si está presente cuando menos un
grupo formador de sal.

15 Se prefiere más una combinación de: (a) cuando menos uno,
de preferencia un inhibidor de cinasa de tirosina de abl, re-
ceptora de PDGF, y/o receptora de Kit, seleccionado a partir
del grupo que consiste en 1-(4-cloroanilino)-4-(4-
piridilmetil)-ftalazina, (R)-6-(4-hidroxifeil)-4-[(1-fenil-
20 etil)-amino]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina, y de preferencia 4-
(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il)pi-
rimidin-2-ilamino]fenil]-benzamida; o una sal farmacéuticamente
aceptable de cualquiera o más de estos compuestos; más preferi-
blemente la sal de metansulfonato de 4-(4-metilpiperazin-1-
25 ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il)pirimidin-2-ilamino]fe-

nil|benzamida, más preferiblemente en la forma del cristal- β ;
con

(b) cuando menos uno, de preferencia un compuesto capaz de enlazarse con glicoproteína ácido α_1 , que de preferencia sea
5 un antibiótico, especialmente eritromicina, o estaurosporina o un derivado de estaurosporina, especialmente N-benzoil-estaurosporina o 7-hidroxi-estaurosporina, o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas, más especialmente eritromicina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

10 De una manera más preferible, en todas las modalidades mencionadas anteriormente, la enfermedad que se va a tratar es una enfermedad de cáncer, especialmente una leucemia o un tumor sólido, de preferencia una enfermedad seleccionada a partir del grupo que consiste en CML (leucemia mieloide crónica), y ALL
15 (leucemia linfoblástica aguda), o un tumor sólido, especialmente seleccionado a partir de cáncer de pulmón, especialmente cáncer de pulmón que no sea de células pequeñas, y a partir de cáncer de la próstata.

De preferencia, se utiliza una combinación de acuerdo con
20 la presente invención en el tratamiento de un animal de sangre caliente, especialmente un ser humano, que tenga una enfermedad proliferativa que (especialmente debido a niveles de AGP más altos que los normales) sea, o durante el tratamiento con un inhibidor de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R y/o receptora
25 de Kit, esté llegando a ser, o haya llegado a ser, completa o

parcialmente resistente a este tratamiento, tales como animales de sangre caliente que representen un grupo especial de sujetos a prueba.

En otra modalidad preferida de la presente invención, la combinación se utiliza dirigida a un animal de sangre caliente, especialmente un ser humano, con el objeto de evitar ya profilácticamente el surgimiento de una resistencia parcial o completa durante el tratamiento de una enfermedad proliferativa con un inhibidor de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit.

Composiciones Farmacéuticas (=Preparaciones). y Procesos:

Cuando se mencione el siguiente "componente (a) y/o (b)", pretende significar cualquiera o más de los compuestos definidos anteriormente como el componente (a) y el componente (b) como tales, o una sal farmacéuticamente aceptable de uno o más de los componentes respectivos.

Las composiciones farmacéuticas pueden encontrar uso en una combinación de acuerdo con la invención que comprenda cualquiera o más de los componentes (a) y (b), con las propiedades de acuerdo con la invención, como ingrediente activo. Las combinaciones se pueden utilizar solas (por ejemplo, como una combinación fija), o como estuches de partes. Se prefieren especialmente las composiciones para administración enteral, especialmente oral, o parenteral. Las composiciones comprenden uno

o más de los componentes (a) y (b), o combinaciones de los mismos como tales, o de preferencia junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La dosis de cualquier ingrediente activo depende de la enfermedad que se vaya a tratar y de la especie, edad, peso, y condición individual, así como del método de administración.

Se prefiere una composición farmacéutica o una combinación que sea adecuada para administrarse a un animal de sangre caliente, especialmente un ser humano, que sufra de cualquier enfermedad mencionada en la presente; de preferencia, cualquier enfermedad significa que responda a un inhibidor de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit; especialmente una enfermedad proliferativa seleccionada a partir de una enfermedad de cáncer, especialmente una enfermedad tumoral o leucemia, o una enfermedad proliferativa no maligna, por ejemplo aterosclerosis, trombosis, psoriasis, esclerodermatitis, o fibrosis; de una manera más preferible, significa una enfermedad seleccionada a partir del grupo que consiste en CML (leucemia mieloide crónica) y ALL (leucemia linfooblástica aguda), o un tumor sólido, especialmente seleccionado a partir de cáncer de pulmón, especialmente cáncer de pulmón que no sea de células pequeñas, y de cáncer de la próstata; más preferiblemente, significa cualquiera de las enfermedades mencionadas que haya llegado a ser, o que esté llegando a ser, resistente al tratamiento con uno más de los inhibidores de cinasa de tirosina men-

cionados, o que fuera resistente a este tratamiento ya antes del tratamiento con cualquier inhibidor de cinasa de tirosina, especialmente debido a que estén presentes concentraciones más altas de AGP en el plasma sanguíneo del individuo que se vaya a
5 tratar.

Las composiciones farmacéuticas comprenden de aproximadamente el 0.0001 por ciento a aproximadamente el 95 por ciento de cualquier componente (a) y/o (b), comprendiendo de preferencia las formas de dosificación que estén en una forma de una
10 sola dosis, de aproximadamente el 10 por ciento a aproximadamente el 90 por ciento del componente (a) ó (b), y comprendiendo de preferencia las formas de dosificación que no estén en una forma de una sola dosis, de aproximadamente el 10 por ciento a aproximadamente el 60 por ciento de cada componente. Las
15 formas de dosificación unitaria, tales como grageas, tabletas, ampollitas, o cápsulas, comprenden de aproximadamente 5 miligramos a aproximadamente 1.5 gramos del componente (a) y/o del componente (b), de preferencia de 5 miligramos a aproximadamente 1 gramo.

20 Las composiciones farmacéuticas se preparan de una manera conocida por sí misma, por ejemplo por medio de procesos convencionales de mezcla, granulación, confitería, disolución, o liofilización. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas para administración oral se pueden obtener mediante la combinación
25 ción del componente (a) y/o (b) con uno o más vehículos sólidos

o líquidos, donde sea necesarios se granula una mezcla resultante, y se procesa la mezcla o los gránulos, si se desea o es apropiado, con la adición de excipientes adicionales, para formar tabletas o núcleos de grageas o soluciones, respectivamente.

Los vehículos adecuados son especialmente rellenos, tales como azúcares, por ejemplo lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol, preparaciones de celulosa y/o fosfatos de calcio, por ejemplo trifosfato de calcio o fosfato ácido de calcio, y aglutinantes, tales como almidones, por ejemplo almidón de maíz, de trigo, de arroz o de papa, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, y/o polivinilpirrolidona, y/o, si se desea, desintegrantes, tales como los almidones anteriormente mencionados, y también almidón de carboximetilo, polivinilpirrolidona reticulada o ácido algínico, o una sal del mismo, tal como alginato de sodio. Los excipientes adicionales son especialmente acondicionadores de flujo y lubricantes, por ejemplo ácido silícico, talco, ácido esteárico, o sales del mismo, tales como estearato de magnesio o de calcio, y/o polietilenglicol, o sus derivados.

A los núcleos de grageas se les pueden proporcionar recubrimientos adecuados, opcionalmente entéricos, utilizándose, entre otras cosas, soluciones de azúcar concentradas, las cuales pueden comprender goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, polietilenglicol, y/o dióxido de titanio, o soluciones de

recubrimiento en solventes o mezclas de solventes orgánicos adecuados, o, para la preparación de recubrimientos entéricos, soluciones de preparaciones de celulosa adecuadas, tales como ftalato de acetilcelulosa o ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa. Se pueden agregar colorantes o pigmentos a las tabletas o a los recubrimientos de grageas, por ejemplo para propósitos de identificación, o para indicar diferentes dosis del ingrediente activo.

Las composiciones farmacéuticas oralmente administrables también son cápsulas llenadas en seco que consistan en gelatina, y también cápsulas selladas blandas consistentes en gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas llenadas en seco pueden contener el componente (a) y/o (b) en la forma de gránulos, por ejemplo mezclados con rellenos, tales como almidón de maíz, aglutinantes y/o abrillantadores, tales como talco o estearato de magnesio, y donde sea apropiado, estabilizantes (ver anteriormente para los "vehículos adecuados"). En las cápsulas blandas, el ingrediente activo de preferencia se disuelve o se suspende en excipientes líquidos adecuados, por ejemplo aceites grasos, [®]Lauroglicol (Gattefossé S.A., Saint Priest, Francia), [®]Gelucire (Gattefossé S.A., Saint Priest, Francia) o aceite de ajonjolí, aceite de parafina, o polietilenglicoles líquidos, tales como PEG 300 ó 400 (Fluka, Suiza), o polipropilenglicoles, a cada uno de los cuales también se les pueden agregar estabilizantes o detergen-

tes, o en agua que comprenda vehículos solubles adicionales como se mencionaron anteriormente, tales como metilcelulosa o manitol.

Otras formas orales de administración son, por ejemplo, soluciones o jarabes preparados de la manera acostumbrada, que comprendan al componente (a) y/o (b), por ejemplo en una forma suspendida, y en una concentración de aproximadamente el 0.001 por ciento al 20 por ciento, de preferencia de aproximadamente el 0.001 por ciento a aproximadamente el 2 por ciento, o en una concentración similar que proporcione una sola dosis adecuada cuando se administre, por ejemplo, en medidas de 0.5 a 10 mililitros. También son adecuados, por ejemplo, los concentrados en polvo o líquidos para preparar licuados, por ejemplo en leche. Estos concentrados también se pueden empacar en cantidades de una sola dosis.

Son posibles los Sistemas de Suministro Transdérmico, especialmente con ingredientes activos neutros. Las formulaciones adecuadas comprenden, por ejemplo, de aproximadamente el 0.0001 por ciento a aproximadamente el 2 por ciento en peso del componente (a) y/o (b). En un aspecto preferido, se proporcionan formulaciones que comprenden de aproximadamente el 2 por ciento al 99.9999 por ciento (o el resto hasta el 100 por ciento) de un alcohol alifático de cadena corta. Los alcoholes adecuados incluyen etanol, isopropanol, propilenglicol, y glicerol. En un aspecto más preferido, estas formulaciones pueden

comprender adicionalmente un mejorador de flujo. Los mejoradores de flujo adecuados incluyen, por ejemplo, sulfóxido de decilmetilo, sulfóxido de dimetilo, así como cetonas cíclicas, lactonas, anhídridos, y ésteres. Algunos de estos mejoradores de flujo también incrementan la retención del componente (a) y/o (b), y por lo tanto, actúan para incrementar su concentración en la piel misma. Para las formulaciones para tratamiento directo (local), tal como aplicación tópica a la piel, se prefiere utilizar un mejorador de flujo que no solamente maximice el flujo transdérmico, sino que incremente la retención del componente (a) y/o (b) en la piel. Se ha reportado que ciertos mejoradores de cetonas cíclica y lactona incrementan la retención local, así como, y por lo tanto, comprenden una clase preferida de mejoradores para administración tópica del componente (a) y/o (b). En las formulaciones para tratamiento sistémico, es preferible utilizar un mejorador de flujo que maximice el flujo con una retención local mínima del ingrediente activo.

Las concentraciones farmacéuticas rectalmente administrables adecuadas son, por ejemplo supositorios que consistan en una combinación del ingrediente activo con una base de supositorio. Las bases de supositorio adecuadas son, por ejemplo, triglicéridos naturales o sintéticos, hidrocarburos de parafina, polietilenglicoles, o alcoholes superiores.

Para administración parenteral, son adecuadas especialmente las soluciones acuosas de un ingrediente activo en una forma

soluble en agua, por ejemplo en la forma de una sal soluble en agua, en la presencia o en ausencia de sales, tales como cloruro de sodio, y/o alcoholes de azúcar, tales como manitol, o suspensiones acuosas para inyección que comprendan sustancias incrementadoras de la viscosidad, por ejemplo carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol, y/o dextrano, y donde sea apropiado, estabilizantes. El componente (a) y/o (b), donde sea apropiado junto con excipientes, también puede estar en la forma de un liofilizado, y se puede hacer en una solución antes de su administración parenteral mediante la adición de solventes adecuados.

Las soluciones como se utilizan, por ejemplo, para administración parenteral, también se pueden utilizar como soluciones para infusión.

Las formulaciones preferidas que comprenden cualquier componente (b), son aquéllas que se acostumbran para el uso clínico respectivo de cualquiera o más agentes que pertenezcan a ese grupo de compuestos que se conocen en la técnica.

Las formulaciones preferidas para el componente (a) son las mencionadas en los ejemplos.

La invención también se refiere a un método para el tratamiento de las condiciones patológicas anteriormente mencionadas. Para este propósito, en las combinaciones como se describen anteriormente en la presente, cualquiera de los componentes (a) y/o (b), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mis-

mos, se puede administrar profilácticamente o terapéuticamente, de preferencia en una cantidad que sea efectiva contra las enfermedades mencionadas, a un animal de sangre caliente, por ejemplo el hombre, que requiera dicho tratamiento, de preferencia en la forma de una composición farmacéutica. La dosis de cualquier componente (a) y/o (b) depende de la especie del animal de sangre caliente que se vaya a tratar, de su peso corporal, de su edad, y de su estado individual, de las circunstancias farmacocinéticas individuales, de la enfermedad que se vaya a tratar, y de la vía de administración. De preferencia, para un peso corporal de aproximadamente 70 kilogramos, se administra una dosis diaria de 10 miligramos a 2,500 miligramos, más preferiblemente de aproximadamente 50 miligramos a aproximadamente 2,000 miligramos, muy preferiblemente de aproximadamente 100 miligramos a aproximadamente 1,500 miligramos de cualquiera de los componentes (a) y/o (b). Los niños reciben una dosis correspondientemente más baja, basándose en su área superficial de piel, (el área superficial de piel de un adulto de 70 kilogramos como referencia es de 1.73 metros cuadrados).

La presente invención se puede ilustrar mediante los siguientes ejemplos, que no pretenden limitar el alcance de la presente invención, sino que sirven meramente como modalidades paradigmáticas:

Ejemplos:**Introducción**

El gen de fusión oncogénico BCR/ABL codifica para la proteína híbrida bcr/abl que ocasiona, debido a su actividad de cinasa de tirosina mejorada y constitutiva, tres enfermedades diferentes: Leucemia Mieloide Crónica (CML), parte de Leucemia Linfoblástica Aguda (ALL) y de Leucemia Mieloide Aguda (AML).

El bloque de la actividad de cinasa de bcr/abl representa una estrategia innovadora y racional para el tratamiento de CML y de los otros cánceres ocasionados por esta proteína de fusión oncogénica (Druker BJ, y colaboradores: Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr/Abl positive cells. Nat. Med. 2: 561-6, 1996).

El STI571 (anteriormente conocido como CGP57148 representa un inhibidor activo y relativamente específico de la actividad de cinasa de bcr/abl. El STI571 bloquea la proliferación, e induce la apoptosis en células BCR/ABL+ *in vitro*; inhibe el crecimiento de las células de médula ósea clonogénica obtenidas de pacientes de CML, y puede erradicar el crecimiento de células leucémicas *in vivo*. La actividad de STI571 *in vivo* está condicionada al logro de una inhibición estable y continua de bcr/abl, que requiere de múltiples administraciones diarias en el modelo murino que se estudió (le Coutre y colaboradores, J. Natl. Cancer Inst. 91, 163-168 (1999)).

Basándose en esta y en información adicional, el STI571 se

está probando ahora en ensayos clínicos iniciales en CML y en otras enfermedades asociadas con BCR/ABL. Esta disponible una información muy limitada con respecto al posible surgimiento de resistencia a STI571. Se han seleccionado dos líneas celulares para estudiar la resistencia a STI571 *in vitro* (le Coutre P. y colaboradores, Blood 90:496a, 1997). El mecanismo de resistencia se desconoce en un caso, mientras que involucra la amplificación de BCR/ABL y la sobreexpresión de proteína en el segundo. La relevancia biológica de estas sublíneas seleccionadas *in vitro*, sin embargo, todavía se tiene que establecer, debido a que las condiciones de selección *in vitro* son diferentes, y normalmente más estrictas que la situación *in vivo*.

No hay información disponible sobre el desarrollo y caracterización de la resistencia *in vivo* a STI571. En nuestro modelo de ratón anteriormente descrito (le Coutre P y colaboradores, J. Natl. Cancer Inst. 91, 163-168, 1999), se observó un fracaso del tratamiento en algunos animales, cuando el tratamiento se demoró por una semana después de la inyección de células leucémicas, y ya estaba presente una masa de tumor mensurable. Este modelo, por consiguiente, podría ser útil para estudiar y caracterizar el posible surgimiento de resistencia a STI571 *in vivo*.

Aquí, se establece un modelo para la resistencia *in vivo* a STI571. La caracterización molecular de este modelo, así como una estrategia para superar la presencia de resistencia,

también se identifica y se valida experimentalmente.

MATERIALES Y METODOS

STI571

5 El STI571 (previamente conocido como CGP57148B) se obtiene como se describe en las Patentes Números EP 0,564,409 y WO 99/03854. Para los experimentos *in vitro*, se preparan soluciones de suministro de este compuesto en 1 y en 10 mM con agua destilada, se filtran y se almacenan a -20°C, y luego se des-
10 congelan antes de que se inicie el experimento, y se utilizan en una concentración de 0.1-10 µM. Las preparaciones utilizadas para los experimentos animales, se hacen diariamente en una concentración de 16 miligramos/mililitro, y se disuelven en agua o en una solución de metilcelulosa al 5 por ciento (Metho-
15 cell, Fluka) y se mantienen a 4°C.

Eritromicina

Para los experimentos *in vitro*, se utiliza base de eritromicina (Sigma). Se prepara una nueva solución de suministro justo antes de cada experimento, en una concentración de 20 mM, y se utiliza en una concentración de 1-100 µM. La eritromicina
20 se disuelve en etanol, y se diluye adicionalmente con agua destilada. Para los experimentos *in vivo*, se utiliza estolato de eritromicina (proporcionado por Gist-Brocades Italy SPA, Capua, Italia) en una concentración de 35 miligramos/mililitro, en una
25 solución de metilcelulosa al 5 por ciento, y STI571 16 miligra-

mos/mililitro.

Administración in vivo de STI571

Los ratones CD1 nu/nu hembras de 7 a 9 semanas de edad adquiridos en Chales River Breedin Laboratories (Calco, Italia) se mantienen bajo condiciones de laboratorio convencionales de acuerdo con los lineamientos de los Institutos Nacionales de Cáncer, Milán, Italia. Este estudio está aprobado por el comité de ética institucional para los animales de laboratorio utilizados en la investigación experimental. Se inyecta la línea celular positiva para bcr/abl Ku812 (50×10^6 células por animal) subcutáneamente en el flanco izquierdo del animal. Se administra el tratamiento oral a través de una jeringa conectada con un tubo de plástico suave introducido en el esófago (dándolo). El peso del tumor (TW) y el peso total se monitorean cada 3 a 4 días. El peso del tumor se calcula mediante la fórmula $TW [mg] = (d^2 \times D)$, en donde d y D son los diámetros más corto y más largo del tumor, respectivamente, medidos en milímetros. El tratamiento se inicia de 1 a 15 días después de la inyección de células leucémicas.

Líneas Celulares

Se utiliza la línea celular de leucemia humana KU812 positiva para Bcr/Abl (ver Kishi K. A new leukemia cell line with Philadelphia chromosome characterized as basophil precursors.

Leuk Res 2: 381-90, 1985). La línea KU812 se obtuvo de un paciente de CML en crisis, y se mantiene en RPMI 1640 (Bio Whittaker Europe), complementado con suero fetal de becerro al 10 por ciento (FCS) bajo condiciones de cultivo celular convencionales.

La línea celular KU812 es accesible por medio de Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Mascheroder Weg, Braunschweig, Alemania, que tiene el número de acceso DSMZ No: ACC 378.

Otras líneas celulares análogas que se pueden utilizar en las pruebas descritas más adelante, son:

Línea Celular: BV-173 (Tipo de Célula: leucemia precursora de células B humanas) DSMZ No: ACC 20;

Línea Celular: K-562 (Tipo de Célula: leucemia mieloide crónica humana en crisis) DSMZ No: ACC 10;

Línea Celular: LAMA-84 (Tipo de Célula: leucemia mieloide crónica humana en crisis) DSMZ No: ACC 168;

Línea Celular: EM-3 (Tipo de Célula: leucemia mieloide crónica humana en crisis) DSMZ No: ACC 134;

Línea Celular: MEG-01 (Tipo de Célula: leucemia mieloide crónica humana en crisis megacariocítica) DSMZ No: ACC 364; 6

Línea Celular: NALM-1 (Tipo de Célula: leucemia mieloide crónica humana en crisis) DSMZ No: ACC 131.

Determinación de la actividad de proliferación in vitro (ensayo de recuperación de timidina tritiada [³HtdR])

200 microlitros de cada línea celular (KU 812, LAMA 84),
conteniendo 104 células, se siembran en diferentes concentra-
5 ciones de STI571, desde 0 hasta 10 μ M, en placas de microtitu-
lación de 96 pozos (Corning Costar Corp., Cambridge, MA) en
seis réplicas. Después de 54 horas a 37°C, se agregan 20 mi-
crolitros de RPMI 1640 + FCS al 10 por ciento conteniendo timi-
dina tritiada (1 μ Ci/pozo) a cada pozo. Después de 18 horas
10 adicionales, se cosechan las células y se transfieren a un fil-
tro (Estera de Filtro, Spot-on, Pharmacia Biotech Europe, Bru-
selas, Bélgica). La recuperación timidina tritiada se determi-
na mediante un contador de cintilación de líquidos de placa be-
ta 1205 (Wallac Inc., Turku, Finlandia). La IC₅₀ (concentra-
15 ción inhibidora 50) se define como la concentración del com-
puesto que produce una reducción de proliferación del 50 por
ciento en comparación con los controles no tratados.

Análisis Western blot

20 Se realiza el inmunomanchado como se describió anterior-
mente (Gambacorti-Passerini C y colaboradores: Blood Cells, Mo-
lecules, and Diseases 23, 380-94, 1997). Las células se lavan
dos veces con suero regulado con fosfato (PBS) frío, y subse-
cuentemente se lisan en 200 microlitros de regulador de Laemmli
25 1 x (Tris-HCl 50 mM, pH de 6.8, SDS al 2 por ciento, azul de

bromofenol al 0.1 por ciento, glicerol al 10 por ciento, β -mercaptoetanol al 5 por ciento). Los lisados celulares, correspondientes a 90,000 - 150,000 células, se hierven a 95°C durante 10 minutos, se sonicán durante 1 minuto, y se analizan mediante electroforesis en gel SDS sobre geles de poliacrilamida al 7.5 por ciento. Se detectan bcr/abl endógeno, bcr/abl tirosinfosforilado, y la actina endógena, con el anticuerpo monoclonal de ratón correspondiente, o con antisuero de conejo, y luego se visualizan mediante detección de quimiluminiscencia mejorada (ECL, Amersham Corp.) utilizando inmunoglobulina G de cabra anti-ratón o anti-conejo enlazada con peroxidasa de rábano como el anticuerpo secundario (Amersham Corp). El anticuerpo monoclonal anti-abl (Clon Ab-3) se adquiere en Calbiochem. El anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina (clon 4G10) se adquiere en Upstate Biotechnology. El anticuerpo policlonal de conejo anti-actina se adquiere en Sigma. El análisis densitométrico se realiza con un Fosfodensitómetro Eagle Eye 11 (Stratagene), y las intensidades de las bandas de bcr/abl fosforilado con tirosina se normalizan contra los niveles de expresión de bcr/abl y actina.

Determinación de AGP

Los niveles en suero de glicoproteína ácido- α_1 (AGP) se detectan mediante inmunodifusión, o bien mediante el método de isoelectroenfoque. Para la inmunodifusión, se aplican 5.0 mi-

crolitros de cada muestra en un pequeño pozo de una placa de ágar (SRID, prueba de placa de inmunodifusión radial sencilla, Cardiotech Services JINIC Louisville, 1KY, EUA), que contiene antisuero de AGP. La placa se incuba durante 24 horas a 37°C.

5 La cantidad específica de AGP dentro de la muestra se mide por el tamaño del anillo de precipitina, y se determina mediante una comparación con los estándares a 1,000, 250, y 125 microgramos/mililitro, proporcionados con cada estuche de prueba. Las determinaciones se realizan por duplicado. Para el isoe-

10 lectroenfoque, se vacía una IPG (gradiente de pH inmovilizado) (Gianazza, E., Celentano, F, Ettori, C., Righetti, P.G., Immobilized pH gradients: Theory and methodology. Electrophoresis 1989, 10, 806-808) en el rango de pH de 2.5 a 5, entre una solución ácida que contiene Inmovilina pK 1, 3 mM, pK 3.6, 11.83

15 mM, pK 9.3, 0.76 mM, y Tris 12.9 mM, y una solución básica que contiene inmovilina pK 3.6, 9.28 mM, pK 4.6, 9.50 mM, y pK 9.3, 16.13 mM (Amersham Pharmacia, Uppsala, Suecia). Después de la polimerización, el gel se lava tres veces en glicerol al 1 por ciento, se seca y se hidrata en urea 8M - anfolitos portadores

20 al 0.5 por ciento, rango de pH de 2.5 a 5 (Pharmacia). Subsecuentemente, se cargan alícuotas de 7.5 microlitros de suero, diluidas hasta 25 microlitros con 2-mercaptoetanol al 2 por ciento, cerca del cátodo. Después de una prueba durante la noche a 55 V/cm, las muestras se enfocan durante 90 minutos a 165

25 V/cm. el patrón de proteína se tiñe con Coomassie.

Estimación de los parámetros de enlace

Se incuban plasma o AGP humana purificada (Sigma) o albúmina (diluida en PBS) con diferentes concentraciones de STI571 a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las concentraciones de STI571 se determinan mediante HPLC, con un límite inferior de detección de 0.1 μ M. El STI571 libre se determina mediante ultrafiltración con un corte a 30 KD. Se construyen las gráficas de Scatchard Modificadas. Se calcula la Constante de Asociación (Ka) como se describió anteriormente (Fuse E, Tani H, Kurata N y colaboradores, Cancer Res., 58, 3248-53, 1998).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realiza con la prueba exacta de Fisher o T. Estudiante utilizando el programa de análisis Prism. Para los análisis de sobrevivencia, los datos se comparan mediante la prueba de Logrank. Los valores $P < 0.05$ se consideran estadísticamente significativos, y se derivan a partir de pruebas estadísticas dobles.

20

Ejemplo 1: La eficacia de STI571 está relacionada con la carga de tumor inicial

Los ratones sin pelo se inyectan subcutáneamente con 50 millones de células KU812. El tratamiento se inicia después de 1, 8, y 15 días, respectivamente (grupos I a III), en la pre-

sencia de aproximadamente 50.300 millones y 1,000 millones de células leucémicas. Aunque se observa regresión del tumor en todos los grupos, solamente se obtienen curas en los primeros dos grupos. La Figura 1A muestra los resultados de un experimento representativo. Aunque todos los animales del grupo I se curan de una manera reproducible, los ratones del grupo II desarrollan reincidencias de entre el 33 por ciento y el 40 por ciento; no se observa nunca una cura en el grupo III. Las reincidencias normalmente se desarrollan de 1 a 3 semanas después de la discontinuación del tratamiento. La Figura 1B presenta los resultados combinados de tres experimentos diferentes. Es evidente una clara relación entre la cantidad de tumor presente al principio del tratamiento, y el resultado de la terapia. Una posible explicación para estos resultados podría residir en la duración insuficiente de administración de STI571 en los grupos II y III. Para probar esta hipótesis, los ratones del grupo II se tratan durante 11 ó 18 días. El resultado de un experimento representativo se muestra en la Figura 1C, e indica que el incremento en la duración del tratamiento no amin ra la velocidad de cura. Estos resultados indican que, en este modelo, el tratamiento con STI571 puede curar a los animales solamente si se erradica el tumor en los primeros 11 días del tratamiento. Si no sucede esto, no se puede alcanzar la cura, inclusive con una exposición más larga al compuesto. En otras palabras: ha surgido algún tipo de resistencia.

Ejemplo 2: Los tumores reincidentes muestran resistencia in vivo, pero retienen su sensibilidad in vitro a STI571

Los animales que presentan tumores recurrentes se vuelven
5 a tratar con el mismo programa de STI571 (régimen de 11 días).
El tratamiento empieza tan pronto como los tumores llegan a ser
nuevamente mensurables. La Figura 2 muestra un experimento re-
presentativo. Es evidente que los tumores reincidentes respon-
den pobremente al nuevo tratamiento, y eventualmente empiezan a
10 crecer de una manera similar a los tumores de los animales no
tratados (líneas punteadas). Aunque las células leucémicas son
resistentes in vivo a STI571, no se conoce su sensibilidad in-
trínseca al STI571. Para investigar esta cuestión, se separan
los tumores de los animales resistentes, se obtienen suspensio-
15 nes celulares, y se colocan las células en cultivo, y se prue-
ban para determinar la sensibilidad in vitro a STI571 dentro de
24-48 horas, como se describió anteriormente (le Coutre P, y
colaboradores, J. Natl, Cancer Inst. 91, 163-168, 1999). La Fi-
gura 3 presenta los resultados obtenidos de dos de estos tumo-
20 res. Es evidente que las células leucémicas obtenidas de los
animales resistentes retienen su sensibilidad a STI571, debido
a que su IC₅₀ no difiere de aquélla de la línea celular paren-
tal KU812. Estos resultados no conducen a evaluar si la acti-
vidad es cinasa de la proteína bcr/abl todavía es inhibida por
25 la administración de STI571. Con este objetivo, se realizan

experimentos farmacocinéticos moleculares (descritos en le Cou-
tre P, y colaboradores, J. Natl, Cancer Inst. 91, 163-168,
1999), para investigar el grado y la duración de inhibición de
bcr/abl *in vivo* en los animales que no son previamente trata-
dos, o en ratones que reincidieron después del tratamiento ini-
cial, y fueron resistentes a un segundo ciclo de administración
de STI571. Los ratones que tienen tumor se tratan agudamente, y
se sacrifican a las 2 y a las 4 horas. Los niveles de activi-
dad de cinasa de Bcr/Abl (medida como autofosforilación) obte-
nidos en un experimento representativo, se muestran en la Figu-
ra 4. Aunque los ratones no tratados previamente muestran la
inhibición anteriormente reportada en la fosforilación de
bcr/abl tanto a las 2 como a las 4 horas (pistas 4 y 6), los
animales reincidentes resistentes a STI571 no son inhibidos por
el tratamiento (pistas 3 y 5). Estos experimentos indican que
los ratones reincidentes son resistentes a un tratamiento adi-
cional, y que no se logró en esta situación la inhibición de la
actividad de cinasa de bcr/abl. Sin embargo, las células leu-
cémicas retienen su sensibilidad *in vitro* a STI571.

20

Ejemplo 3: Niveles de plasma de STI571 en ratones reinci-
dentes

Una posible explicación de los resultados anteriormente
reportados, podría residir en un metabolismo incrementado de
STI571 en los animales previamente tratados, con niveles en

25

222 3/5

plasma de STI571 más bajos resultantes. Para investigar esta cuestión, los ratones que tienen tumor, ya sea previamente tratados con STI571 o no (controles), se sacrifican a las 0.5, 2.0, y 5.0 horas después de un tratamiento agudo con STI571, y se determinan las concentraciones totales en plasma de STI571 mediante HPLC. Los resultados se presentan en la Figura 5. Aunque los animales de control y previamente tratados alcanzan niveles en plasma similares a los 30 minutos, los niveles de STI571 disminuyen más rápidamente en los animales de control, comparándose con los ratones previamente tratados ($p < 0.01$). Las concentraciones intratumorales muestran un patrón opuesto; los tumores presentes en los animales previamente tratados contienen concentraciones más bajas de STI571 en todos los puntos del tiempo, alcanzando este fenómeno un significado estadístico en el punto del tiempo de 5 horas. Estos resultados no confirman nuestra hipótesis, e inclusive muestran que los animales resistentes mantienen concentraciones más altas de STI571 en su sangre durante un tiempo mas largo. Estos datos, entre otras alternativas, podrían en su lugar se compatibles con la presencia, en la sangre de los ratones resistentes, de un "factor" capaz de fijarse y reducir la tolerancia y la actividad biológica del STI571.

Ejemplo 4: La glicoproteína ácida- α_1 (AGP) fija el STI571, e inhibe sus efectos.

Dos proteínas de plasma que pueden fijar fármacos son albúmina y AGP. La AGP de preferencia fija las moléculas básicas (Kremer y colaboradores, Drug binding to human α_1 -acidic glycoprotein in health and disease, Pharmacological Reviews 40, 1-47, 1988). Se utilizan células KU812 *in vitro* para evaluar el efecto de la AGP sobre la actividad biológica del STI571. Debido a que no está disponible la AGP de murino en cantidades suficientes para este tipo de experimentos (Fuse E y colaboradores, Cancer Res. 58, 3248-53, 1998), se utiliza AGP humana.

Los resultados de un experimento representativo se presentan en la Figura 6A. Es evidente que la AGP inhibe la actividad del STI571 (medida con IC_{50}); este efecto es proporcional a la concentración de AGP. La IC_{50} se incrementa desde los 0.05 μM usuales en ausencia de AGP (Gambacorti-Passerini C, y colaboradores, Blood Cells, Molecules, and Diseases 23, 380-94, 1997), hasta más de 3.0 μM en una concentración de AGP de 2 miligramos/mililitro. En un experimento separado, se calcula la IC_{50} en 2.0 miligramos/mililitro de AGP, a 4.5 μM (no se muestran los datos). La albúmina no incrementa sustancialmente la IC_{50} para STI571, inclusive en 50 miligramos/mililitro (Figura 6B). Por consiguiente, la AGP pero no la albúmina, puede incrementar la IC_{50} para STI571 hasta valores 90 veces más altos que en los controles.

Debido a que se observa un efecto inhibitor de AGP, se calcula la Constante de Asociación (K_a) de STI571 para AGP y

para albúmina. Con este objetivo, se incubaba una cantidad fija de AGP (5 μ M) con diferentes concentraciones de STI571, y se evalúa la cantidad de fármaco no fijado (fracción libre) mediante ultrafiltración. Se obtienen las curvas de la gráfica de Scatchard tanto para AGP como para albúmina. En el caso de la AGP, se encuentra un valor de 8.7 litros/mol, que es aproximadamente 60 veces más alta que la K_a calculada para albúmina (0.15). Estos resultados indican que, aunque tanto la albúmina como la AGP pueden fijar el STI571, la última fija el STI571 con una afinidad mucho más alta, y como resultado, inhibe la actividad biológica del STI571.

Para confirmar los resultados anteriormente mencionados, se estimulan células KU812 ² in vitro con sueros que contienen diferentes cantidades de AGP. La Figura 7 presenta un experimento representativo en donde se agregan dos sueros que contienen 130 microgramos/mililitro de AGP (triángulos), y 1,150 microgramos/mililitro de AGP (cuadros), respectivamente (en una concentración final del 15 por ciento), a cultivos de KU812 (control: suero al 0 por ciento; rombos). Es evidente que la inhibición de la actividad de STI571 está asociada con el contenido respectivo de AGP de cada muestra de suero. El cambio en el porcentaje de suero presente en el cultivo, produce un incremento o una reducción proporcional en su actividad inhibidora (no mostrado). Se concluye que la AGP puede fijar el STI571, y esta fijación tiene importantes consecuencias bioló-

gicas, y bloquea la capacidad del STI571 para inhibir la actividad enzimática de la cinasa de Bcr/Abl.

Ejemplo 5: Relación entre los niveles en suero de AGP, la carga tumoral y el tratamiento con STI571

Los resultados previamente presentados indican que la AGP, una proteína en plasma inducible, inhibe potentemente la actividad de STI571 *in vitro*. Se determinan los niveles en plasma de AGP en ratones sin pelo en diferentes etapas de la enfermedad, mediante inmunodifusión, para evaluar si estos valores se pueden asociar con la sensibilidad *in vivo* de las células leucémicas KU812 al tratamiento con STI571. La Figura 8A presenta los valores de AGP en ratones en diferentes etapas de la enfermedad. Los valores de AGP basales en ratones son muy bajos (96 ± 21 microgramos/mililitro). Las concentraciones de AGP se elevan proporcionalmente con la carga de tumor presente. Los ratones con una carga de tumor de aproximadamente 200 miligramos (correspondientes a aproximadamente 200 millones de células leucémicas) muestran un incremento del cuádruple en los valores de AGP (383 ± 131 microgramos/mililitro), mientras que los ratones con 0.8 - 1 gramo de tumores, muestran valores de AGP mayores de 1 miligramo/mililitro ($1,580 \pm 234$ microgramos/mililitro). Los animales con tumores mensurables que se curan mostraron una reducción progresiva en las concentraciones de AGP, y regresaron a los niveles normales en 4 - 8 semanas. Los

experimentos con AGP purificada indican que las variaciones en las concentraciones de AGP observadas entre los ratones normales y los animales que tienen tumores grandes, ocasionan un cambio en la fracción de STI571 fijada por AGP desde el 42 por ciento hasta más del 99 por ciento (no mostrado). Es interesante que el tratamiento con STI571 (160 miligramos/kilo-gramo oralmente durante 11 días) también produce un incremento más bajo pero estadísticamente significativo de los valores de AGP (213 ± 43 microgramos/mililitro). Los mayores niveles de AGP en los ratones que tienen tumor también son evidenciados mediante isoelectroenfoque (Figura 8B). Estos resultados tomados juntos, muestran que la carga de tumor (y hasta un menor grado el tratamiento previo con STI571) induce la síntesis de AGP, una proteína en plasma que, a su vez, puede fijar e inactivar el STI571.

Ejemplo 6: La eritromicina, enlazadora de AGP, puede liberar el bloqueo mediado por AGP de la actividad del STI571 in vitro.

(a) Se sabe que varios fármacos se enlazan con AGP, incluyendo eritromicina (Kremer y colaboradores, Pharmacological reviews 40, 1-47, 1988). Si el mecanismo mediante el cual la AGP bloque el STI571 es mediado por el enlace de la AGP al STI571, entonces una tercera molécula capaz de enlazarse con AGP podría competir con el STI571 por el enlace de AGP, hacien-

do de esta manera que el STI571 esté más disponible para la actividad biológica. Para validar esta hipótesis, se agrega eritromicina en 5 a 30 μM a cultivos de KU812 conteniendo STI571 (1 μM), AGP 1 miligramo/mililitro), o tanto STI571 L(1 μM) como AGP (1 miligramo/mililitro). Los resultados de un experimento representativo se presentan en la Figura 9 (STI solo: cuadros; AGP sola: triángulos; STI y AGP: rombos). La eritromicina restablece la sensibilidad al STI571 con una clara relación de respuesta a la dosis. La eritromicina no modifica la IC_{50} para STI571 en ausencia de AGP, excluyendo de esta manera un efecto directo sobre el efecto anti-leucémico del STI571 (no mostrado).

(b) También se evalúan los efectos de la eritromicina sobre el bloque mediado por STI571 de la actividad de cinasa de bcr/abl (Figura 10). Las células KU812 se tratan *in vitro* con STI571, AGP, y eritromicina, se incuban a 37°C durante 1 hora y se lisa; luego se evalúa la cantidad de actividad de cinasa utilizando un anticuerpo anti-fosfotirosina. La Figura 10 muestra que la AGP inhibe la actividad del STI571. La actividad del STI571 se puede restablecer mediante la adición de eritromicina.

Los experimentos (a) y (b) proporcionan evidencia en dos ensayos diferentes, de que la eritromicina puede restablecer la sensibilidad del STI571 *in vitro*.

Ejemplo 7: Efectos in vivo de la administración de eritromicina y del tratamiento previo con STI571

(a) Habiendo demostrado el efecto inhibidor de la AGP y su reversión mediante eritromicina *in vitro*, validamos experimentalmente la modulación *in vivo* de los valores de AGP, o de su capacidad de enlace. Los ratones se inyectan con células KU812, y se inicia el tratamiento 11 días después en la presencia de una carga de tumor aproximada de 400 miligramos. En esta situación, se esperan pocas o ninguna cura a partir de un tratamiento estándar con STI571. Los ratones se tratan con STI571 (160 miligramos/kilogramo oralmente cada 8 horas) o en combinación con estolato de eritromicina (350 miligramos/kilogramo cada 8 horas) durante 18 días. La formulación de etolato de eritromicina se selecciona, debido a que previamente se demostró su buena disponibilidad oral en ratones, esperándose que la dosis seleccionada produzca concentraciones pico más altas que 20 μ M. Como se ejemplifica en la Figura 11A, el tratamiento combinado produce una reducción de tumor significativamente más alta en el día 6, y a partir del día 16 en adelante. Es importante observar que, aunque la regresión del tumor es progresiva en los ratones que reciben el tratamiento combinado, algunos tumores empiezan a volver a crecer durante los últimos días del tratamiento en el grupo tratado solamente con STI571. El efecto de agregar eritromicina al STI571 es todavía más evidente cuando se comparan las velocidades de curación en

los dos grupos (Figura 11B). En la serie que recibe solamente STI571, 5/15 animales muestran desaparición del tumor. Sin embargo, 4 animales reincidieron entre los días 25 y 40, curándose solamente 1/13 animales en el día 120 (último día del seguimiento). En el grupo que recibió la terapia combinada de eritromicina/STI571, 14/15 ratones llegaron a quedar sin tumor, y solamente un animal reincidió, en el día 30. Por consiguiente, 10/12 animales se curan con el tratamiento combinado; este valor es significativamente diferente ($p < 0.01$) del obtenido (1/13) en el grupo con solamente STI571. Los grupos de control que reciben eritromicina solamente, no muestran evidencia alguna de regresión del tumor (no mostrado).

(b) También se evalúan los efectos biológicos del tratamiento previo con STI571. Los ratones se tratan previamente o no con STI571 durante 14 días, se inyectan con células KU812, y luego se tratan con STI571 (160 miligramos/-kilogramo cada 8 horas durante 11 días), empezando 24 horas después de la inyección de células leucémicas. Bajo estas circunstancias, se espera que el 100 por ciento de los animales se curen con el STI571. Los resultados se presentan en la Figura 12. En el grupo de control (ratones no tratados previamente) 0/14 animales desarrollaron crecimiento del tumor. En el grupo de los ratones previamente tratados, el crecimiento del tumor se presenta en 7/14 animales ($p < 0.05$), indicando que el incremento de AGP asociado con el tratamiento previo con STI571 también puede

producir un efecto biológico significativo. Estos resultados, tomados juntos, apoyan la evidencia experimental para los efectos negativos de la AGP sobre la actividad terapéutica del STI571; también sugieren y proporcionan una validación experimental parcial de una estrategia que tiene como objetivo derivar *in vivo* la resistencia mediada por AGP, utilizando moléculas capaces de enlazarse con AGP en competencia con el STI571.

Ejemplo 8: Tabletas con metansulfonato de 4-[(4-metil-1-piperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-fenil]benzamida, forma del cristal-β.

Normalmente se preparan tabletas que contienen 100 miligramos de la sustancia activa mencionada en el título, en la siguiente composición:

Composición

Ingrediente activo	100 mg
Lactosa cristalina	240 mg
Avicel	80 mg
PVPPXL	20 mg
Aerosil	2 mg
Estearato de magnesio	5 mg

	447 mg

231 3/4

Preparación: La sustancia activa se mezcla con los materiales de vehículo, y se comprimen en una máquina formadora de tabletas (Korsch EKO, diámetro de perforación de 10 milímetros).

Avicel es celulosa microcristalina (FMC, Filadelfia, EUA).

5 PVPPXL es polivinilpirrolidona, reticulada (BASF, Alemania).

Aerosil es dióxido de silicio (Degussa, Alemania).

10 Ejemplo 9: Cápsulas con metansulfonato de 4-[(4-metil-1-piperazin-1-ilmetil)-N-(4-metil-3-[(4-(3-piridinil)-2-pirimidinilaminofenil]benzamida, forma del cristal-β.

Se preparan normalmente cápsulas que contienen 100 miligramos del compuesto mencionado en el título como sustancia activa, en la siguiente composición:

15

Composición

	Ingrediente activo	100 mg
	Avicel	200 mg
	PVPPXL	15 mg
20	Aerosil	2 mg
	Estearato de magnesio	1.5 mg

		318.5 mg

25 Las cápsulas se preparan mezclando los componentes, y lle-

nando la mezcla en cápsulas de gelatina dura, tamaño 1. PVPPXL
= Crospovidona XL (ver el Ejemplo 10).

5 Ejemplo 10: Cápsulas con metansulfonato de 4-[(4-metil-1-
piperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-[(4-(3-piridinil)-2-pirimidi-
nillaminofenil]benzamida, forma del cristal-β.

Crospovidona XL: Povidona reticulada = homopolímero reti-
culado insoluble en agua de N-vinil-2-pirrolidona.

10 Aerosil 200: gel de sílice puro (área superficial de
acuerdo con BET $200 \pm 25 \text{ m}^2/\text{g}$. tamaño de grano promedio, 12
nanómetros).

Avicel: celulosa microcristalina.

15 La composición del relleno de la cápsula para las cápsulas
de 100, 50, y 25 miligramos es idéntica. Las diferentes con-
centraciones de dosificación se obtienen variando solamente el
peso del relleno de la cápsula. Los tamaños de cápsula preten-
didos son 100 miligramos tamaño 1, 50 miligramos tamaño 3, y 25
miligramos tamaño 4.

20

25

Tabla 1: Composición para cápsulas (Cantidades utilizadas por cada lote en [kg])

	Excipientes	Porcentaje	100 mg.	50 mg.	25 mg.
	sal de metansul-				
5	fonato de 4-(4-				
	metilpiperazin-1-				
	ilmetil)-N-[4-me-				
	til-3-(4-piridin-				
	3-il)pirimidin-2-				
10	ilamino)fenil]-				
	benzamida en la				
	forma del cristal-				
	β	51.96	119.50	59.75	29.875
	Avicel PH 102	40.00	92.00	46.00	23.000
15	Crospovidona XL	6.52	15.00	7.50	3.750
	Aerosil 200	0.87	2.00	1.00	0.500
	Estearato de mag-				
	nesio	0.65	1.50	0.75	0.375
	Total	100.00	230.00	115.00	57.50
20	Tamaño de cápsula		1	3	4

Tabla 2:

Ingrediente	Porcentaje	100 mg	50 mg
	CANTIDAD POR LOTE (%)	CANTIDAD POR LOTE (Kg)	CANTIDAD POR LOTE (Kg)
sal de mentan- sulfonato de 4- (4-metilpipera- zin-1-ilmetil)-N- [4-metil-3-(4-pi- ridin-3-il)piri- midin-2-ilamino)- fenil]-benzamida en la forma del cris-tal- β	51.96	18.224	9.112
Celulosa MK GR	40.00	14.030	7.015
Crospovidona XL	6.52	2.288	1.144
Aerosil 200	0.87	0.305	0.153
Estearato de Mag- nesio	0.65	0.228	0.114
Total	100.00	35.075	17.538
Tamaño de cápsula		1	3
Cantidad de cáps- ulas		152'500	152'500

Ejemplo 11: Composición de formulación de Eritromicina típica

Aquí se puede utilizar cualquier formulación convencional conocida para la eritromicina

5 Un ejemplo para una formulación con estolato de eritromicina se da en la Tabla 3.

Tabla 3: (Cantidades Utilizadas por cada lote en [Kg])

Excipiente	Porcentaje	100 mg.	50 mg.	25 mg.
10 Estolato de eritromicina	51.96	119.50	59.75	29.875
Avicel PH 102	40.00	92.00	46.00	23.000
Crospovidona XL	6.52	15.00	7.50	3.750
Aerosil 200	0.87	2.00	1.00	0.500
15 Estearato de Magnesio	0.65	1.50	0.75	0.375
Total	100.00	230.00	115.00	57.50

20

25

Ejemplo 12: Posible composición combinada con tanto eritromicina como STI571

Tabla 4: (Cantidades utilizadas por cada lote en [kg])

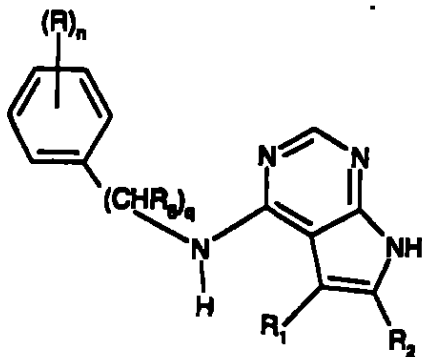
	Excipientes	Porcentaje	100 mg.	50 mg.	25 mg.
5	sal de metansulfonato de 4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-				
10	3-il)pirimidin-2-ilamino)fenil]-benzamida en la forma del cristal- β	25.98	59.75	29.875	14.9375
15	Estolato de eritromicina	25.98	59.75	29.875	14.9375
	Avicel PH 102	40.00	92.00	46.00	23.000
	Crospovidona XL	6.52	15.00	7.50	3.750
	Aerosil 200	0.87	2.00	1.00	0.500
20	Estearato de magnesio	0.65	1.50	0.75	0.375
	Total	100.00	230.00	115.00	57.50

234 ~~284~~
2/10REIVINDICACIONES

1. Una preparación en combinación que comprende: (a) cuando menos un inhibidor de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit, y (b) cuando menos un compuesto orgánico capaz de enlazarse con glicoproteína ácido- α_1 (AGP); o sales farmacéuticamente aceptables de cualquier componente (a), (b), o (a) y (b), si está presente cuando menos un grupo formador de sal, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

2. Una preparación en combinación de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el inhibidor de cinasa de tirosina de abl, receptora de PDGF, y/o receptora de Kit, (a) se selecciona a partir del grupo que consiste en:

(i) un compuesto de 7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina de la fórmula VI:



(VI)

en donde:

q es 0 ó 1,

n es de 1 a 3 cuando q es 0, o n es de 0 a 3 cuando q es

1,

R es halógeno, alquilo inferior, hidroxilo, alcanoiloxilo inferior, alcoxilo inferior, carboxilo, alcoxicarbonilo inferior, carbamoflo, N-alquilcarbamoflo inferior, N,N-dialquilcarbamoflo inferior, ciano, amino, alcanoilamino inferior, alquilamino inferior, N,N-dialquilamino inferior, o trifluorometilo, siendo posible, cuando estén presentes varios radicales R en la molécula, que estos radicales sean idénticos o diferentes;

a) R_1 y R_2 son cada uno independientemente del otro:

10 α) fenilo sustituido por carbamoilmetoxilo, carboximetoxilo, benzoiloxicarbonilmetoxilo, alcoxicarbonilmetoxilo inferior, fenilo, amino, alcanoilamino inferior, alquilamino inferior, N,N-dialquilamino inferior, hidroxilo, alcanoiloxilo inferior, carboxilo, alcoxicarbonilo inferior, carbamoflo, N-
15 alquilcarbamoflo inferior, N,N-dialquilcarbamoflo inferior, ciano, o por nitro;

β) hidrógeno;

γ) piridilo insustituido o sustituido por halógeno o por alquilo inferior;

20 δ) N-bencilpiridinio-2-ilo; naftilo; ciano; carboxilo; alcoxicarbonilo inferior; carbamoflo; N-alquilcarbamoflo inferior; N,N-dialquilcarbamoflo inferior; N-bencilcarbamoflo; formilo; alcanoflo inferior; alquenilo inferior; alqueniloxilo inferior; o

25 ε) alquilo inferior sustituido por:

εα) halógeno, amino, alquilamino inferior, piperazino, dialquilamino inferior,

εβ) fenilamino que está insustituido o sustituido en la
5 fracción de fenilo por halógeno, alquilo inferior, hidroxilo, alcanoiloxilo inferior, alcoxilo inferior, carboxilo, alcoxycarbonilo inferior, carbamoflo, N-alquilcarbamoflo inferior, N,N-dialquilcarbamoflo inferior, ciano, amino, alcanoilamino inferior, alquilamino inferior, N,N-dialquilamino inferior, o
10 por trifluorometilo,

εγ) hidroxilo, alcoxilo inferior, ciano, carboxilo, alcoxycarbonilo inferior, carbamoflo, N-alquilcarbamoflo inferior, N,N-dialquilcarbamoflo inferior, mercapto, o

εδ) por un radical de la fórmula $R_3-S(O)_m$ en donde R_3 es
15 alquilo inferior, y m es 0, 1 ó 2, o

b) cuando q es 1, uno de los radicales R_1 y R_2 es alquilo inferior insustituido o fenilo insustituido, y el otro de los radicales R_1 y R_2 tiene uno de los significados dados anteriormente en el párrafo a), con la excepción de hidrógeno, o

20 c) R_1 y R_2 son juntos 1,4-alcadienileno de 4 a 10 átomos de carbono sustituido por amino, alcanoilamino inferior, alquilamino inferior, N,N-dialquilamino inferior, nitro, halógeno, hidroxilo, alcanoiloxilo inferior, carboxilo, alcoxycarbonilo inferior, carbamoflo, N-alquilcarbamoflo inferior, N,N-dialquilcarbamoflo inferior, o por ciano, o son aza-1,4-
25

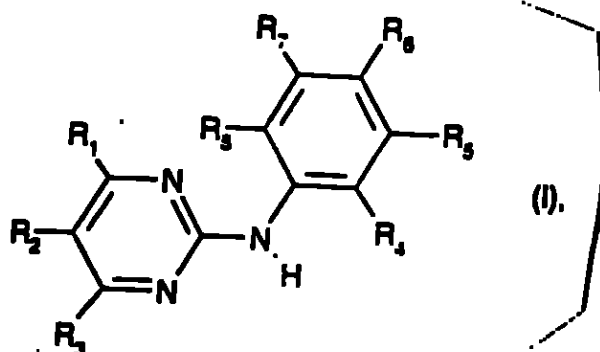
alcadienileno que tiene hasta 9 átomos de carbono, o

(d) cuando q es 1, R_1 y R_2 son cada uno independientemente del otro, alquilo inferior insustituido fenilo insustituido, o tienen uno de los significados dados anteriormente en el párrafo a), y

R_6 es hidrógeno, alquilo inferior, alcóxicarbonilo inferior, carbamóilo, N-alquilcarbamóilo inferior o N,N-dialquilcarbamóilo inferior,

o una sal del mismo; y

(ii) un derivado de N-fenil-2-pirimidinamina de la fórmula I:



en donde:

R_1 es 4-pirazinilo, 1-metil-1H-pirrolilo, fenil sustituido por amino o por aminoalquilo inferior, en donde el grupo amino en cada caso está libre, alquilado, o acilado, 1H-indolilo ó 1H-imidazolilo enlazado en un átomo de carbono del anillo de 5 miembros, o piridilo insustituido o sustituido por alquilo inferior enlazado en un átomo de carbono del anillo, e insusti-

tuido o sustituido en el átomo de nitrógeno por oxígeno,

R_2 y R_3 son cada uno independientemente del otro, hidrógeno o alquilo inferior,

uno o dos de los radicales R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , y R_8 son cada uno
5 nitro, alcoxilo inferior sustituido por flúor, o un radical de la fórmula II:



en donde:

10 R_9 es hidrógeno o alquilo inferior,

X es oxo, tio, imino, N-alquilimino inferior, hidroximino, u O-alquilhidroximino inferior,

Y es oxígeno o el grupo NH,

n es 0 ó 1, y

15 R_{10} es un radical alifático que tiene cuando menos 5 átomos de carbono, o un radical aromático, aromático-alifático, cicloalifático, cicloalifático-alifático, heterocíclico, o heterocíclico-alifático, y los radicales restantes R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , y R_8 son cada uno independientemente de los otros, hidrógeno, al-
20 quilo inferior que está insustituido o sustituido por amino libre o alquilado, piperazinilo, piperidinilo, pirrolidinilo, o por morfolinilo, o alcanofilo inferior, trifluorometilo, hidroxilo libre, eterificado o esterificado, amino libre, alquilado o acilado, o carboxilo libre o esterificado, o

25 una sal de estos compuestos que tengan cuando menos un

grupo formador de sal;

y el compuesto orgánico capaz de enlazarse con la glicoproteína ácido- α_1 (AGP) (b) se selecciona a partir del grupo que consiste en:

5 Nicergolina, Prazosina, Alfentanil, Cetamina, Etidocaína, Fentanil, Meperidina, Metadona, Fenilbutazona, Bupivacaína, Etidocaína, Fenciclidina, Lidocaína, Fenciclidina, Aprindina, Disopiramida, Quinidina, Verapamil, Eritromicina, Acenocumarol, Dipyridamol, PCR2362, Ticlopidina, Warfarina, Fenitoína, Car-
10 bamazepina, Naproxeno, Alprenolol, Metoprolol, Oxprenolol, Pindolol, Propranolol, Timolol, Progesterona, Cortexona, Cortisol, Testosterona, Estradiol, Prednisolona, Metocurina, d-Tubocurarina, Amitriptilina, Clorpromazina, Ciclazindol, Desmetilimipramina, Diazepam, Doxepina, Flurazepam, Flufenazina, Ha-
15 loperidol, Imipramina, Loxapina, Mianserina, Nortriptilina, Norzimelidina, Perazina, Perfenazina, Fenobarbital, Derivados de Fenotiazina, Promazina, Acepromazina, Protipendilo, Tioridazina, Tiotixeno, Triazolam, Trifluoperazina, Zimelidina, vitamina B₁₂, ácido fólico, DAPN, 1,8-Anilino-naftalensulfonato;
20 Aminopirina, Amoxapina, Bupropión, Maprolitina, Nomifensina, Trazodona, Ritodrina, Doxazosina, Trimazosina, Binedalina, Amsacrina, Apazona, SKF 525A, Ciclazindol, PCR 2362, Indometacina, Probenecida, Acido Retinoico, Sulfinpirazona, Tolmetina, Benoxaprofeno, Heparina, Sufentanil, Lofentanil, Metoclopramida,
25 da, Nicardipina, Pirmenol, mifepristona, RU 42 633, Aprindil,

Auramina O, Bepridil, Desipramina, Desmetilclomiprafina, Moxapridina, Quinina, Lorcainida, Protipendilo, Protriptilina, Trihexifenidilo, Biperideno, Matacualona, Difenhidramina, Glutetimida, Clordiazepóxido, L-triptófano, Mepivacaína, Levometadona, Opipramol, Trifluopromazina, Trimipramina, Fosfato de tris-butoxi-etilo, estaurosporina, N-benzoil-estaurosporina, y 7-hidroxi-estaurosporina;

así como un metabolito de cualquiera de estos compuestos;

en donde cualquier componente (a) y (b) también puede estar presente en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, si está presente cuando menos un grupo formador de sal.

3. Una preparación en combinación de acuerdo con la reivindicación 1, en donde se combinan (a) cuando menos un inhibidor de cinasa de tirosina de abl, receptora de PDGF, y/o receptora de Kit, seleccionado a partir del grupo que consiste en 1-(4-cloroanilino)-4-(4-piridilmetil)-ftalazina, (R)-6-(4-hidroxifeil)-4-[(1-fenil-etil)-amino]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina, y 4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il)pirimidin-2-ilamino]fenil]-benzamida; o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera o más de estos compuestos; y

(b) cuando menos un compuesto capaz de enlazarse con la glicoproteína ácida- α_1 , seleccionado a partir del grupo que consiste en un antibiótico, estaurosporina, N-benzoil-estaurosporina, y 7-hidroxi-estaurosporina, o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas.

4. Una preparación en combinación de acuerdo con la reivindicación 1, en donde (a) el inhibidor de cinasa de tirosina de abl, receptora de PDGF, y/o receptora de Kit es 4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il)pirimidin-2-ilamino}fenil}benzamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y (b) el compuesto capaz de enlazarse con la glicoproteína ácido- α_1 es eritromicina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

5. Un producto que comprende:

(a) cuando menos un inhibidor de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit, y

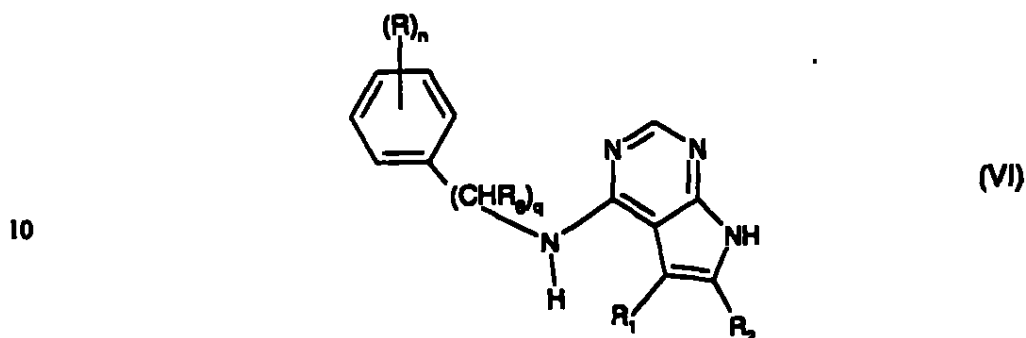
(b) cuando menos un compuesto orgánico capaz de enlazarse con glicoproteína ácida- α_1 ,

en donde cualquier componente (a) y/o (b) también puede estar presente en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, si está presente cuando menos un grupo formador de sal,

en la presencia o en ausencia de uno o más materiales de vehículo farmacéuticamente aceptables, como una preparación en combinación para su uso simultáneo o cronológicamente escalonado dentro de un período de tiempo que sea suficientemente pequeño para que los compuestos de tanto el componente (a) como del componente (b), mejoren la actividad antiproliferativa del compuesto (a) contra las células proliferantes, especialmente en un paciente, para el tratamiento de una enfermedad proliferativa que responda a este compuesto.

6. El producto de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el inhibidor de cinasa de tirosina de abl, receptora de PDGF, y/o receptora de Kit, se selecciona a partir del grupo que consiste en:

- 5 (i) un compuesto de 7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina de la fórmula VI:



en donde:

q es 0 ó 1,

- 15 n es de 1 a 3 cuando q es 0, o n es de 0 a 3 cuando q es 1,

R es halógeno, alquilo inferior, hidroxilo, alcanoiloxilo inferior, alcoxilo inferior, carboxilo, alcoxycarbonilo inferior, carbamoflo, N-alquilcarbamoflo inferior, N,N-dialquilcarbamoflo inferior, ciano, amino, alcanoilamino inferior, alquilamino inferior, N,N-dialquilamino inferior, o trifluorometilo, siendo posible, cuando estén presentes varios radicales R en la molécula, que estos radicales sean idénticos o diferentes;

- 25 a) R₁ y R₂ son cada uno independientemente del otro:

α) fenilo sustituido por carbamoilmetoxilo, carboximeto-
xilo, benzoiloxicarbonilmetoxilo, alcoxicarbonilmetoxilo infe-
rior, fenilo, amino, alcanoilamino inferior, alquilamino infe-
rior, N,N-dialquilamino inferior, hidroxilo, alcanoiloxilo in-
5 ferior, carboxilo, alcoxicarbonilo inferior, carbamoilo, N-
alquilcarbamoilo inferior, N,N-dialquilcarbamoilo inferior,
ciano, o por nitro;

β) hidrógeno;

γ) piridilo insustituido o sustituido por halógeno o por
10 alquilo inferior;

δ) N-bencilpiridinio-2-ilo; naftilo; ciano; carboxilo;
alcoxicarbonilo inferior; carbamoilo; N-alquilcarbamoilo infe-
rior; N,N-dialquilcarbamoilo inferior; N-bencilcarbamoilo; for-
milo; alcanoil inferior; alquenilo inferior; alqueniloxilo in-
15 ferior; o

ε) alquilo inferior sustituido por:

εα) halógeno, amino, alquilamino inferior, piperazino,
dialquilamino inferior,

20 εβ) fenilamino que está insustituido o sustituido en la
fracción de fenilo por halógeno, alquilo inferior, hidroxilo,
alcanoiloxilo inferior, alcóxilo inferior, carboxilo, alcoxi-
carbonilo inferior, carbamoilo, N-alquilcarbamoilo inferior,
N,N-dialquilcarbamoilo inferior, ciano, amino, alcanoilamino
25 inferior, alquilamin inferior, N,N-dialquilamino inferior, o

por trifluorometil ,

sy) hidroxilo, alcoxilo inferior, ciano, carboxilo, alcóxicarbonilo inferior, carbamóilo, N-alquilcarbamóilo inferior, N,N-dialquilcarbamóilo inferior, mercapto, o

5 eδ) por un radical de la fórmula $R_3-S(O)_m-$ en donde R_3 es alquilo inferior, y m es 0, 1 ó 2, o

 b) cuando q es 1, uno de los radicales R_1 y R_2 es alquilo inferior insustituido o fenilo insustituido, y el otro de los radicales R_1 y R_2 tiene uno de los significados dados anteriormente en el párrafo a), con la excepción de hidrógeno, o

10

 c) R_1 y R_2 son juntos 1,4-alcadienileno de 4 a 10 átomos de carbono sustituido por amino, alcanoilamino inferior, alquilamino inferior, N,N-dialquilamino inferior, nitro, halógeno, hidroxilo, alcanoiloxilo inferior, carboxilo, alcóxicarbonilo inferior, carbamóilo, N-alquilcarbamóilo inferior, N,N-dialquilcarbamóilo inferior, o por ciano, o son aza-1,4-alcadienileno que tiene hasta 9 átomos de carbono, o

15

 d) cuando q es 1, R_1 y R_2 son cada uno independientemente del otro, alquilo inferior insustituido o fenilo insustituido, o tienen uno de los significados dados anteriormente en el párrafo a), y

20

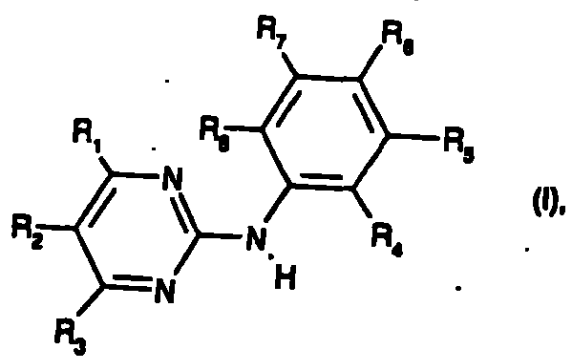
R_4 es hidrógeno, alquilo inferior, alcóxicarbonilo inferior, carbamóilo, N-alquilcarbamóilo inferior, o N,N-dialquilcarbamóilo inferior,

25 o una sal del mismo;

y

(ii) un derivado de N-fenil-2-pirimidinamina de la fórmula I:

5



10

en donde:

R₁ es 4-pirazinilo, 1-metil-1H-pirrolilo, fenilo sustituido por amino o por aminoalquilo inferior, en donde el grupo amino en cada caso está libre, alquilado, o acilado, 1H-indolilo ó 1H-imidazolilo enlazado en un átomo de carbon del anillo de 5 miembros, o piridilo insustituido o sustituido por

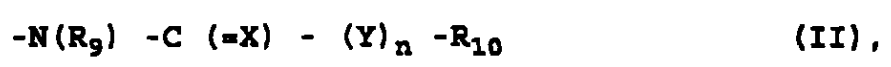
15

alquilo inferior enlazado en un átomo de carbono del anillo, e insustituido o sustituido en el átomo de nitrógeno por xígeno,

20

R₂ y R₃ son cada uno independientemente del tro, hidrógeno o alquilo inferior,

uno o dos de los radicales R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno nitro, alcoxilo inferior sustituido por flúor, o un radical de la fórmula II:



25

en donde:

R₉ es hidrógeno o alquilo inferior,

X es oxo, tio, imino, N-alquilimino inferior, hidroximino,
u O-alquilhidroximino inferior,

Y es oxígeno o el grupo NH,

5 n es 0 ó 1, y

R₁₀ es un radical alifático que tiene cuando menos 5 átomos
de carbono, o un radical aromático, aromático-alifático, ci-
cloalifático, cicloalifático-alifático, heterocíclico, o hete-
rocíclico-alifático, y los radicales restantes R₄, R₅, R₆, R₇, y
10 R₈ son cada uno independientemente de los otros, hidrógeno, al-
quilo inferior que está insustituido o sustituido por amino li-
bre o alquilado, piperazinilo, piperidinilo, pirrolidinilo, o
por morfolinilo, o alcanóilo inferior, trifluorometilo, hidro-
xilo libre, eterificado o esterificado, amino libre, alquilado
15 o acilado, o carboxilo libre o esterificado, o

una sal de estos compuestos que tengan cuando menos un
grupo formador de sal;

y el compuesto orgánico capaz de enlazarse con la glico-
proteína ácido- α_1 (AGP) (b) se selecciona a partir del grupo
20 que consiste en:

Nicergolina, Prazosina, Alfentanil, Cetamina, Etidocaína,
Fentanil, Meperidina, Metadona, Fenilbutazona, Bupivacaína,
Etidocaína, Fenciclidina, Lidocaína, Fenciclidina, Aprindina,
Disopiramida, Quinidina, Verapamil, Eritromicina, Acenocumarol,
25 Dipiridamol, PCR2362, Ticlopidina, Warfarina, Fenitoína, Car-

bamazepina, Naproxeno, Alprenolol, Metoprolol, Oxprenolol, Pindolol, Propranolol, Timolol, Progesterona, Cortexona, Cortisol, Testosterona, Estradiol, Prednisolona, Metocurina, d-Tubocurarina, Amitriptilina, Clorpromazina, Ciclazindol, Desmetilimipramina, Diazepam, Doxepina, Flurazepam, Flufenazina, Haloperidol, Imipramina, Loxapina, Mianserina, Nortriptilina, Norzimelidina, Perazina, Perfenazina, Fenobarbital, Derivados de Fenotiazina, Promazina, Acepromazina, Protipendilo, Tioridazina, Tiotixeno, Triazolam, Trifluoperazina, Zimelidina, vitamina B₁₂, ácido fólico, DAPN, 1,8-Anilino-naftalensulfato; Aminopirina, Amoxapina, Bupropión, Maprolitina, Nomifensina, Trazodona, Ritodrina, Doxazosina, Trimazosina, Binedalina, Amsacrina, Apazona, SKF 525A, Ciclazindol, PCR 2362, Indometacina, Probenecida, Acido Retinoico, Sulfinpirazona, Tolmetina, Benoxaprofeno, Heparina, Sufentanil, Lofentanil, Metoclopramida, Nicardipina, Pirmenol, mifepristona, RU 42 633, Aprindil, Auramina O, Bepridil, Desipramina, Desmetilclomipramina, Moxapridina, Quinina, Lorcainida, Protipendilo, Protriptilina, Trihexifenidilo, Biperideno, Maticualona, Difenhidramina, Glutetimida, Clordiazepóxido, L-triptófano, Mepivacaína, Levometadona, Opipramol, Trifluopromazina, Trimipramina, Fosfato de tris-butoxietilo, estaurosporina, N-benzoil-estaurosporina, y 7-hidroxi-estaurosporina;

así como un metabolito de cualquiera de estos compuestos; en donde cualquier componente (a) y/o (b) también puede

inhibidor de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, y/o receptora de Kit, y

(b) cuando menos un compuesto orgánico capaz de enlazarse con glicoproteína ácida- α_1

5 en donde cualquier componente (a) y/o (b) también puede estar presente en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, si está presente cuando menos un grupo formador de sal,

10 para producir una preparación farmacéutica para utilizarse como composiciones contra una enfermedad proliferativa que pueda ser tratada mediante la administración de un inhibidor de cinasa de tirosina de abl, de PDGF-R, y/ receptora de Kit.

Ing. Barzano & Zanardo Milano S.p.A.

15 (Firmado)

Tr. 1392/c/vf

Los Mandatarios:

(Firma) (Firmado)

(Por si mismo y por los demás)

20 Aparece un sello del Ministerio de Industria, Comercio y Artesanado, Oficina de Patentes en Milán.

(Siguen 17 páginas de dibujos).



El suscrito, WILLY I. DE WINTER GALLEGOS, Av. Horacio 528-404, 11570 México, D. F., perito traductor autorizado para los idiomas Italiano - español, certifica que la anterior es una traducción fiel y correcta del documento adjunto.

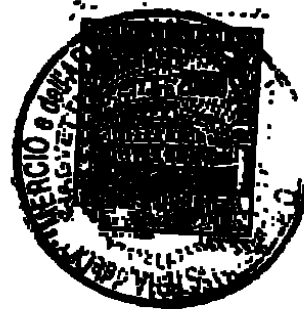
México, D. F.

WILLY I. DE WINTER GALLEGOS

4 ENE. 2001



MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO
DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI



Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per Invenzione Industriale

MI99 A 002711

N.

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito*

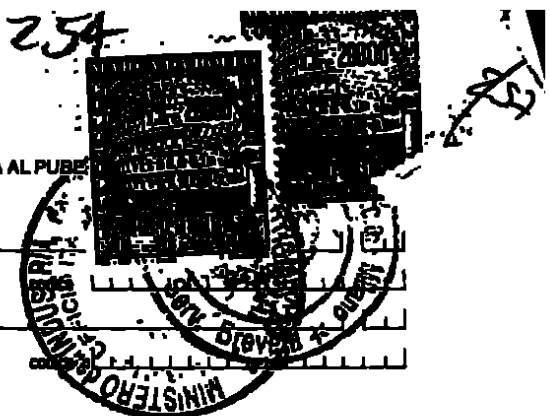
Roma, il

2 NOV. 2000

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE

Dr. Paolo CALLEPPA

P. Calleppa



AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

A. INVENZIONE (I)

1) Denominazione NOVARTIS AG
Residenza BASILEA SVIZZERA
2) Denominazione _____
Residenza _____

B. RAPPRESENTANTE DELL'INVENZIONE PRESSO L'ILL.M.

cognome nome COLETTI Raimondo e altri cod. fiscale _____
denominazione studio di appartenenza BARZANO & ZANARDO MILANO S.p.A.
via BORGONUOVO n. 10 città MILANO cap 20121 (prov) MI

C. SOGGERO ELETTO DESTINATARIO

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/ci/sci) _____ gruppo/sottogruppo _____/_____/_____

COMPOSTI ORGANICI

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA ____/____/____

N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI NOMINATI

cognome nome

cognome nome

1) _____ 3) _____
2) _____ 4) _____

F. PRIORITY

razione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

1) _____
2) _____

SCIoglimento RISERVE

Data N° Protocollo

____/____/____
____/____/____

G. CENTO AMBITATO IN RACCOLTA CULTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

H. AMBITAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) ☒ 1502 n. pag. 125 riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)....
Doc. 2) ☒ 1502 n. inv. 127 disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare) _____
Doc. 3) ☒ 1502 lettere d'incarico, procura o riferimento procura generale _____
Doc. 4) ☒ 1502 designazione inventore _____
Doc. 5) ☐ 1502 documenti di priorità con traduzione in italiano _____
Doc. 6) ☐ 1502 autorizzazione o atto di cessione _____
Doc. 7) ☐ nominativo completo del richiedente

SCIoglimento RISERVE

Data N° Protocollo

____/____/____
____/____/____
____/____/____
____/____/____
____/____/____
____/____/____

8) attestati di versamento, totale lire UN MILIONE QUATTROCENTO QUINDICI MILA obbligatorio
COMPIUTO IL 27/12/1999 FIRMA DEL(I) INVENIENTE(I) I INVENTORI (firma per sé e per gli altri)
CONTINUA SI/NO ☒
DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO ☒

UFFICIO PROVINCIALE REG. COMM. ART. IN MIXX MILANO codice 15

VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA MIXXMI 99A 002711 Reg. A.

L'anno millesimocento NOVANTANOVE, il giorno VENTISETTE, del mese di DICEMBRE

Il/i richiedente/i soprarichiedente/i ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto soprarichiesto.

I. AMBITAZIONI NAQUE DELL'UFFICIALE RISPONDE

IL RISPONDE

Ufficiale
dell'Ufficio

UFFICIALE RISPONDE
M. CORTONESI

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

M.199A002711

REG. A

DATA DI DEPOSITO

27/12/1999

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

/ / / / /

28
25

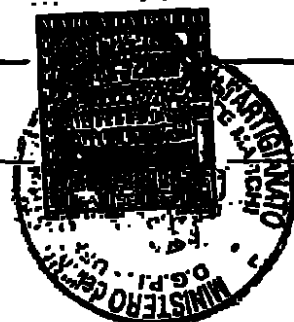
A. TITOLO

"Composti organici".

L. RASSEMBO

La presente invenzione riguarda combinazioni di un inibitore della abl-tirosina-chinasi, del PDGF-recettore e/o del Kit-recettore con un composto organico in grado di legarsi ad una al-glicoproteina acida (AGP), e riguarda anche preparati farmaceutici e/o terapie, in relazione a malattie che rispondono ad una inibizione della abl-tirosina-chinasi del PDGF-recettore e/o del Kit-recettore, in particolare l'invenzione riguarda prodotti oppure combinazioni che contengono un inibitore della abl-tirosina-chinasi, del PDGF-recettore e/o del Kit-recettore con un composto organico in grado di legarsi ad una al-glicoproteina acida (AGP), in combinazione fissa oppure per una somministrazione distribuita nel tempo oppure contemporanea, e riguarda l'impiego combinato di due classi di composti o in combinazione fissa oppure per una somministrazione distribuita nel tempo oppure contemporanea, per il trattamento di malattie proliferative, in particolare malattie tumorali, in modo specifico quelle che possono venire trattate mediante inibizione della attività della abl-tirosina-chinasi, del PDGF-recettore e/o del Kit-recettore.

M. DISEGNO



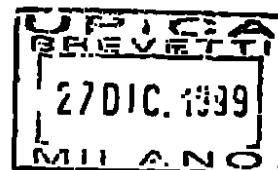
MI 99 AL 02 711

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE INDUSTRIALE

a nome: NOVARTIS AG

di nazionalità: svizzera

con sede in: BASILEA (Svizzera)



La presente invenzione riguarda combinazioni di un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore con un composto organico in grado di legarsi ad una α 1-glicoproteina acida (AGP), e riguarda anche preparati farmaceutici e/o terapie, in relazione a malattie che rispondono ad una inibizione della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore. In particolare l'invenzione riguarda prodotti oppure combinazioni che contengono un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore con un composto organico in grado di legarsi ad una α 1-glicoproteina acida (AGP), in combinazione fissa oppure per una somministrazione distribuita nel tempo oppure contemporanea, e riguarda l'impiego combinato di due classi di composti o in combinazione fissa oppure per una somministrazione distribuita nel tempo oppure contemporanea, per il trattamento di malattie proliferative, in particolare malattie tumorali, in modo specifico quelle che possono venire trattate mediante inibizione della attività

257 360

della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore.

Base dell'Invenzione

Sono noti numerosi composti che inibiscono la proliferazione di cellule mediante inibizione della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del

Kit-recettore Per esempio, la Domanda di Brevetto

Internazionale No. WO 97/02266, la Domanda di Brevetto

Internazionale No. WO 98/35958 e in modo particolare

la Domanda di Brevetto Europeo EP 0.564.409-A, e

anche la Domanda Internazionale No. WO 99/03854, che

vengono qui incorporati tutti come riferimento, citano composti che sono inibitori di almeno una delle tirosina-chinasi citate sopra. Ulteriori composti che sono interessanti sono Tyrphostin AG957 (vedere Kaur et al., Anticancer Drugs 5, 213-222 (1994), Herbimycin A (Okabe e Uehara, Leukemia and Lymphoma 12, 2156-2162 (1994), Blood 80, 1330-1338 (1994) and Leuk. Res. 18, 213-220 (1994), e anche Rioran et al., Oncogene 16, 133-1542 (1998)); Tyrphostins AG 1295, AG 1296 (vedere Kovalenko et al., Cancer Res. 54, 6106-6114 (1994); Lipson et al., Pharmacol & Exp-Therap. 285, 844-852 (1998); Krystal et al., Cancer Res. 57, 2203-2208 (1997)); SU 101 (Leflunomide), e anche come suo metabolita (vedere Shower et al.,

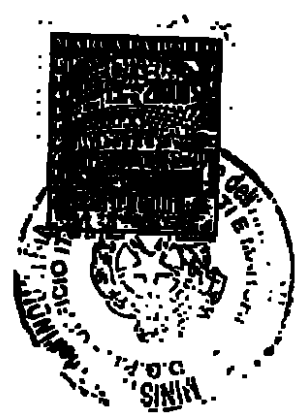
Clin. Cancer Res. 3, 1167-1177 (1997), Mattar et al.,
FEBS Lett. 334, 161-164 (1993), Cherwinskyi et al.,
Inflamm. Res. 3, 1167-1177 (1997), e Strawn et al.,
Exp. Opin. Invest. Drugs 7, 533-573 (1998)); e

Piridopirimidine (vedere per esempio Hamby et al., J.
Med. Chem. 40, 2296-2303 (1997); Dahring et al., J.
Pharmacol. Exp. Ther. 281, 1446-1456 (1997); Klutcho
et al., Life Sci. 62, 143-150 (1998); Panek et al., J.
Pharmacol. Exp. Ther. 283, 1433-1444; Boschelli et
al., J. Med. Chem. 41, 4365-4377 (1998)). Tutte le
citazioni riportate sopra vengono qui incorporate
come riferimento.

Si è dimostrato che questi composti, come
descritti nelle domande di brevetto citate sopra e in
altre pubblicazioni, a causa di questa capacità sono
efficaci nella profilassi e in particolare nel
trattamento di malattie che vengono provocate da una
deregolazione della fosforilazione e/o dell'attività
delle tirosina-chinasi appena citate.

La fosforilazione di proteine è nota da lungo
tempo come stadio essenziale nella differenziazione
e nella divisione delle cellule. La fosforilazione
viene catalizzata dalle proteina-chinasi suddivise in
serina/treonina-chinasi e tirosina-chinasi. Le
tirosina-chinasi comprendono una tirosina-chinasi del

259 262



recettore di PDGF (fattore di crescita derivato dalle piastrine = PDGF-R-TK, abl-tirosina-chinasi (abl); e tirosina-chinasi del kit-recettore (kit-R-TK). Quando queste tirosina-chinasi vengono deregolate, per esempio mediante mutazione oppure mediante attivazione tramite fattori esterni, per esempio composti (composti naturali interni, come PDGF, oppure composti esterni) che si legano ad esse, il risultato tra l'altro è una deregolazione della crescita di cellule.

Il PDGF (fattore di crescita derivato dalle piastrine) è un fattore di crescita che è presente molto spesso, che ha un ruolo importante sia nella crescita normale che nella proliferazione cellulare patologica come nella carcinogenesi e nei disturbi delle cellule della muscolatura liscia dei vasi sanguigni, per esempio nella aterosclerosi e nella trombosi. La sua inibizione può venire misurata in analogia al procedimento descritto in EP 0.564.409 citato sopra (vedere anche E. Andrejauskas-Buchdunger e U. Regenass in Cancer Research 52, 5353-5358 (1992)).

L'inibizione della abl-chinasi, per esempio v-abl-tirosina-chinasi viene determinata secondo i metodi di N. Lydon et al., Oncogene Research 5, 161-173 (1990) e J. F. Geissler et al., Cancer Research 52, 4492-4498 (1992). In questi metodi come substrati si

usano [Val⁵]-angiotensina II e [γ -³²P]-ATP.

L'inibizione della tirosina-chinasi del kit-recettore può venire misurata per esempio sotto forma di un saggio di c-Kit-chinasi *in vitro*:

Il saggio di c-Kit-chinasi *in vitro* viene effettuato in piastre da 96 pozzetti come saggio di legame su filtro, impiegando il dominio della c-Kit-chinasi fuso con GST ricombinante (glutathione-S-trasferasi) espresso in baculovirus e purificato su glutathione-sefariosio. La proteina di fusione di GST viene fatta incubare in condizioni ottimali in presenza oppure in assenza di un farmaco e si misura l'inibizione della chinasi rivelando la diminuzione nella fosforilazione del poly(GluTyr) (4:1) peptide P-275. Si usa gamma-[³³P-ATP] come donatore di fosfato. Come alternativa è possibile usare un saggio cellulare per c-Kit: Cellule che iperesprimono C-Kit vengono raccolte dal siero e vengono fatte incubare per 90 minuti a 37°C con un farmaco prima della stimolazione con un fattore di cellule staminali umane ricombinanti. Quantità uguali di proteina proveniente dai lisati di cellule vengono analizzate per la inibizione della fosforilazione di c-Kit mediante Western blotting impiegando anticorpi anti-fosfotirosina.

A causa delle proprietà descritte, i composti

261 2/2

che presentano una inibizione di una delle tirosina-chinasi citate sopra possono venire usati come sostanze terapeutiche, in particolare per il trattamento di malattie proliferative, come cancro, in particolare tumori e leucemie.

D'altra parte i composti possono venire usati non soltanto come ingredienti attivi di inibizione dei tumori ma anche come farmaci contro malattie proliferative non maligne, per esempio aterosclerosi, trombosi, psoriasi, sclerodermi e fibrosi. Essi sono adatti anche per le ulteriori applicazioni citate sopra come C-modulatori di proteina-chinasi e possono venire usati in particolare nel trattamento di malattie che rispondono alla inibizione della chinasi del PDGF-recettore.

Un inibitore della tirosina-chinasi come descritto sopra inibisce anche BCR-abl-chinasi (vedere Nature Medicine 2, 561-566 (1996)) e così è adatto per il trattamento di malattie cancerose e tumorali BCR-abl-positive come leucemie (in particolare leucemia mieloide cronica e leucemia linfoblastica acuta, in cui si trovano in particolare meccanismi apoptotici di azione), e presenta inoltre effetti sul sottogruppo delle cellule staminali leucemiche e anche come sostanza potenziale per la purificazione di queste

262 265

cellule in vitro dopo allontanamento di dette cellule (per esempio allontanamento del midollo osseo) e reimpianto delle cellule una volta che esse sono state ripulite da cellule cancerose (per esempio reimpianto di cellule di midollo osseo purificate).

Inoltre, un inibitore di tirosina-chinasi come descritto sopra può presentare effetti utili nel trattamento di disturbi che derivano come risultato di un trapianto, per esempio un allo-trapianto, in particolare un rigetto di tessuto, come per esempio in particolare bronchiolite obliterativa (OB), ossia un rigetto cronico di trapianti allogenici del polmone. Contrariamente a pazienti senza OB, quelli che presentano OB spesso presentano una elevata concentrazione di PDGF in fluidi di lavaggio degli alveoli bronchiali. Gli inibitori della tirosina-chinasi possono essere efficaci in malattie associate con la migrazione e la proliferazione di cellule della muscolatura liscia vascolare (in cui PDGF e PDGF-R spesso hanno anche un ruolo), come restenosi e aterosclerosi. Essi possono essere in grado anche di inibire l'angiogenesi.

Tutti questi impieghi vengono descritti dettagliatamente in EP 0.564.409, WO 97/02266, WO 99/03854 e WO 98/35958, oppure nelle altre citazioni

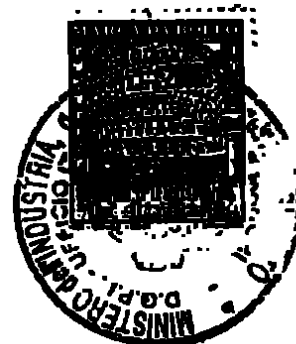
263 ~~766~~

riportate sopra.

Un esempio di un composto che presenta una attività inibitrice sulle tirosina-chinasi citate sopra è il composto denominato 4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il)pirimidin-2-ilammino]fenil]benzammide, che viene descritto in EP 0.564.409 e, sotto forma del sale metansolfonato (qui di seguito STI571), preferibilmente nella forma di cristalli β , viene descritto in WO 99/03854.

Questo composto è un inibitore potente di bcr/abl, una proteina di fusione oncogenica che provoca la leucemia mieloide cronica (CML). Tuttavia si è osservato in prove cliniche in atto che i pazienti affetti da CML in crisi respiratoria e pazienti Ph+-ALL con recidiva presentano soltanto risposte temporanee nei confronti di STI571, dopodichè in un breve periodo di tempo è seguito lo sviluppo della resistenza.

La Richiedente in precedenza ha dimostrato che questo composto può curare topi iniettati con cellule leucemiche BCR/ABL+ umane se si mantiene una continua inibizione della attività di chinasi di bcr/abl. Questo modello è stato usato per studiare il possibile sviluppo della resistenza nei confronti di STI571. Quando sono stati trattati animali che portano tumori



26A 762

grandi (con un peso maggiore di 400 mg), si è osservata una riduzione del tumore in tutti gli animali, con la scomparsa del tumore in alcuni. Tuttavia nessun animale era guarito, animali con recidive non rispondono ad un ulteriore trattamento e l'attività di bcr/abl-chinasi non è stata inibita da STI571 somministrata in vivo, sebbene si fossero ottenute concentrazioni attive nel plasma (circa 10 μM). Tumori sono stati recisi da animali resistenti, con recidiva, sono stati posti in coltura e sono stati esaminati entro 24 ore per la sensibilità in vitro. 5/5 tumori esaminati hanno presentato una CI_{50} (0,1-0,3 μM) non differente in modo significativo da quella della linea KU812 parentale.

La resistenza può svilupparsi come risultato di parecchi fattori che operano o a livello cellulare oppure soltanto in vivo. Una resistenza ai farmaci, per esempio, può svilupparsi come risultato di una mutazione/amplificazione del gene bersaglio, di una induzione di metabolismo, e in modo paradossale di una aumentata degradazione di traduzione della proteina bersaglio e di fattori simili.

Sorprendentemente, si è trovato che i dati farmacocinetici indicano che gli animali con recidive hanno raggiunto concentrazioni di picco simili a quelle

265 / 268

dei controlli, però essi presentavano una diminuzione significativamente più lenta nelle concentrazioni di STI571 col passare del tempo. La Richiedente ha ora trovato che ciò è dovuto alla presenza di un fattore

di legame nel plasma di animali che hanno avuto recidive, in grado di far diminuire la distribuzione nei tessuti e la depurazione di STI571. In vitro si sono esaminate numerose proteine per la loro capacità di inibire l'attività biologica di STI571. Mentre l'albumina non influisce sulla inibizione da parte di STI571 della proliferazione di KU812, la α -glicoproteina acida (AGP) in effetti influisce in corrispondenza di concentrazioni fisiologiche facendo aumentare il valore CI50 per STI571 fino a 90 volte. AGP inibisce inoltre l'effetto di STI571 sulla fosforilazione bcr/abl in vitro. Si calcola che la costante di associazione (K_a) per il legame specifico con STI571 e si trova che essa è 60 volte più elevata in AGP che in albumina. I livelli di AGP vengono misurati nei topi mediante un immunosaggio. Si trova una forte correlazione tra il peso del tumore e le concentrazioni di AGP. Inoltre, un pre-trattamento con STI571 in vivo fa aumentare anche i livelli di AGP nel plasma. Pertanto, animali preventivamente trattati con STI571 e quindi iniettati con cellule

KU812 trattati con STI571 nelle 24 ore successive, rispondono meno al trattamento rispetto a controlli (animali guariti 8/16 rispetto a 16/16, $p < 0,01$). Questi risultati suggeriscono che un aumento nei livelli di AGP o indotti dal tumore oppure dal trattamento stesso sono responsabili dello sviluppo della resistenza nei confronti di STI571.

La presente invenzione ha il compito di mettere a disposizione un metodo per superare la resistenza che si sviluppa in animali a sangue caldo se durante il trattamento di una malattia come indicata sopra si applica STI571 oppure uno qualsiasi di altri inibitori delle tirosina-chinasi citate sopra.

Il risultato sorprendente consiste nel fatto che la resistenza contro un inibitore delle tirosina-chinasi, in particolare STI571 può essere dovuta ad un legame di AGP e così concentrazioni inferiori del farmaco attivo libero nel plasma del sangue costituiscono una base della ricerca per una soluzione, per esempio inibendo una molecola regolatrice, per esempio una proteina regolatrice, consentendo l'attivazione della trascrizione del gene AGP, mediante interruzione dell'amplificazione del gene AGP, mediante inibizione della trascrizione genetica del mRNA che codifica AGP, mediante inibizione della

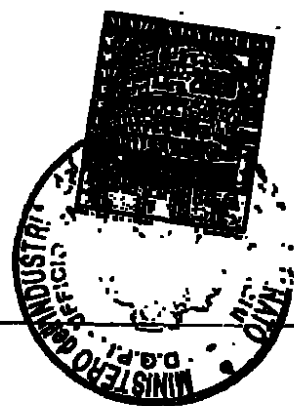
traduzione del mRNA nella proteina matura, influenzando sulla sua distribuzione nella glicoproteina finale, inibendo la sua secrezione nel plasma sanguigno, per mezzo di un dosaggio maggiore dell'inibitore della tirosina-chinasi, mediante neutralizzazione di AGP per esempio con anticorpi, mediante attivazione del metabolismo oppure eliminazione dal plasma, mediante attivazione della degradazione post-traduzione di AGP oppure di suoi precursori, e simili.

Inaspettatamente, in base a riferimenti che hanno indicato che vi è un dubbio sulla relazione dello spostamento di farmaci durante una terapia combinata con farmaci (vedere per esempio Kremer et al., Pharmacological Rev. 40(1), 1-471988)), si è trovato ora che è possibile, superare questo tipo di resistenza, combinando uno o più composti che legano AGP con un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore

Pertanto, la presente invenzione consente un importante miglioramento nella terapia di pazienti che presentano una delle malattie citate nella presente descrizione.

Riassunto dell'invenzione

Questa invenzione riguarda una combinazione di
(a) un inibitore della abl-tirosina-chinasi



del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore (componente (a)) e di (b) un composto organico in grado di legarsi alla α 1-glicoproteina acida (AGP) (componente (b)), e riguarda anche preparati farmaceutici e/o terapie, in relazione a stati di malattie che rispondono ad una inibizione della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore. In particolare, questa invenzione riguarda prodotti oppure combinazioni che contengono (a) un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore e (b) un composto organico in grado di legarsi ad una α 1-glicoproteina acida (AGP), o in combinazione stabilita oppure per una somministrazione distribuita nel tempo oppure contemporanea, e l'impiego combinato di due classi di composti, o in combinazione stabilita oppure per una somministrazione distribuita nel tempo oppure contemporanea, per il trattamento di malattie proliferative, in particolare malattie tumorali, in particolare quelle che possono venire trattate mediante inibizione dell'attività della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore.

Descrizione delle Figure

Le Figure 1 A e B illustrano l'effetto del peso iniziale del tumore e della durata di un trattamento

269 2A

con STI571.

Figura 1 A: Due gruppi di 12 topi "nude" vengono iniettati con 50×10^5 cellule della leucemia KU812 in corrispondenza del giorno 1. Un trattamento con

STI571 (160 mg/kg per os ogni 8 ore per 11 giorni) viene iniziato in corrispondenza del giorno 2 (quadrati) oppure in corrispondenza del giorno 8 (rombi) in presenza di un peso medio del tumore di 276 ± 97 mg.

Figura 1 B: Topi "nude" iniettati con cellule KU812 vengono trattati in corrispondenza del giorno 2 (gruppo I), del giorno 8 (gruppo II), con un peso medio del tumore di 253 ± 122 mg), oppure in corrispondenza del giorno 15 (gruppo III, peso medio del tumore di 1054 ± 258 mg). I risultati rappresentano la media di tre esperimenti consecutivi.

Figura 1 C: Animali che appartengono al gruppo II vengono lasciati non trattati (controlli) oppure vengono trattati per 11 oppure 18 giorni senza STI571.

La Figura 2 illustra l'effetto di un nuovo trattamento con STI571 su una recidiva del tumore dopo una risposta iniziale nei confronti di STI571. Le linee tratteggiate si riferiscono alla crescita dei tumori non trattati (vedere la parte relativa ai metodi negli esempi).

La Figura 3 illustra la sensibilità in vitro nei

confronti di STI571 di due tumori resistenti in vivo. I valori vengono espressi come % dei controlli che contengono incorporati $129'362 \pm 6329$ cpm.

La Figura 4 mostra l'inibizione in vivo dell'attività della Bcr/Abl-chinasi da parte di STI571. Topi che portano tumori vengono trattati acutamente con STI571 per via orale (160 mg/kg), e vengono uccisi in corrispondenza di diversi periodi di tempo. I campioni dei tumori vengono estratti e vengono usati per l'analisi western blot con antifosfotirosina (pTyr) oppure anti-Abelson (Abl). STI571 inibisce in modo efficace la fosforilazione della tirosina-chinasi di BCR/ABL in controlli in corrispondenza di 2 e 4 ore (inibizione dell'80% e del 50% mediante analisi densitometrica), mentre gli estratti ottenuti da animali con recidiva sono resistenti nei confronti di un trattamento con STI571.

La Figura 5 illustra le concentrazioni nel plasma e nel tumore di STI571 in topi che portano tumore preventivamente trattati oppure non trattati con STI571. Gli animali vengono trattati con STI571 (160 mg/kg per os) e vengono uccisi in corrispondenza di 0,5, 2 e 5 ore più tardi. STI571 viene determinato mediante HPLC in campioni di plasma e in estratti di tumore. I topi di controllo non ricevono mai

271 3/3



un precedente trattamento con STI571, mentre topi preventivamente trattati vengono sottoposti a due cicli di 11 giorni di STI571 (come in Figura 2). I pesi medi dei tumori sono 450 ± 129 mg in controlli e 684 ± 283 mg in topi preventivamente trattati.

La Figura 6 mostra la sensibilità in vitro verso STI571 di cellule KU812 in presenza di una α -glicoproteina acida (A) e in presenza di albumina (B) (vedere assorbimento di ^3H -timidina sotto i metodi).

La Figura 7 mostra l'effetto di due campioni di siero che contengono differenti quantità di AGP sull'attività in vitro di STI571 su cellule KU812.

Le Figure 8 A e B mostrano la determinazione di AGP in topi normali e topi che portano tumore.

Figura 8 A: Concentrazioni medie di AGP in topi con differenti stati di malattia oppure di trattamento. Il gruppo 1 si riferisce a topi normali, il gruppo 2 si riferisce a topi trattati con STI571 per 11 giorni (e ai quali si sono prelevati campioni 3 giorni dopo l'interruzione del trattamento), il gruppo 3 si riferisce a topi che portano un tumore di 8 giorni (peso medio 304 ± 116 mg), il gruppo 4 si riferisce a topi che portano un tumore di 15 giorni (peso medio 1.184 ± 295 mg).

Figura 8 B: Determinazione diretta del AGP in topi

272 ~~274~~

normali e in topi che portano tumore mediante isoelettrofocalizzazione: le piste 1 e 2 si riferiscono a topi normali, le piste 3 e 4 si riferiscono ad animali che portano tumori grandi (con un peso maggiore di 1 g). Le differenti isoforme di AGP vengono indicate e sono comprese tra un pH di 3,4 e un pH di 4,0.

La Figura 9 illustra l'effetto di AGP (in corrispondenza di 1 mg/ml) ed eritromicina sull'attività di STI571 (in corrispondenza di 1 μ M) su cellule KU812.

La Figura 10 illustra l'effetto di AGP ed eritromicina sulla inibizione di una autofosforilazione di bcr/abl indotta da STI571. 3×10^6 cellule per pozzetto vengono fatte incubare a 37°C con eritromicina base (100 μ M), con STI571 (3 μ M), AGP (2 mg/ml). Dopo 1 ora, le cellule vengono lavate 2 volte con salina tamponata con fosfato fredda (PBS) e successivamente vengono sottoposte a lisi in 500 μ L di 1 X tampone di Laemmli. Lisati di cellule corrispondenti a 90.000 cellule vengono analizzati mediante elettroforesi su SDS su poliacrilammide al 7,5%. Si mettono in evidenza bcr-abl endogena, bcr-abl fosforilata con tirosina, con i corrispondenti anticorpi monoclonali di topo.

Le Figure 11 A e B illustrano l'effetto in vivo di eritromicina in seguito a co-somministrazione con

273/275

STI571 a topi che portano tumore. Gli animali che portano tumori di 11 giorni vengono distribuiti a caso in due gruppi separati. 15 topi vengono trattati con STI571 e con eritromicina (peso medio del tumore

385 $\pm$ 53), mentre 14 hanno ricevuto STI571 (peso medio del tumore 390 $\pm$ 114 mg). I gruppi di controllo ricevono soltanto eritromicina posta in sospensione in metil cellulosa al 5% (5 topi) oppure metil cellulosa al 5% (6 topi).

Figura 11. A: Pesi medi del tumore durante il trattamento (giorno 0-20).

Figura 11 B: Percentuale di topi che portano tumore: in corrispondenza di ciascun momento la percentuale di topi che portano un tumore palpabile viene calcolata rispetto al numero totale di topi vivi in quel momento.

La Figura 12 illustra l'effetto di un pre-trattamento sull'effetto anti-leucemico di STI571. Due gruppi di topi "nude" vengono trattati con STI571 (160 mg/kg ogni 8 ore) per 11 giorni, partendo dal giorno 1 dopo iniezione di cellule leucemiche. Le linee tratteggiate si riferiscono ad animali di controllo non preventivamente trattati. La linea intera si riferisce ad animali che hanno ricevuto un trattamento identico con STI571 14 giorni prima di venire iniettati con cellule leucemiche KU812

274 ^{2/2}

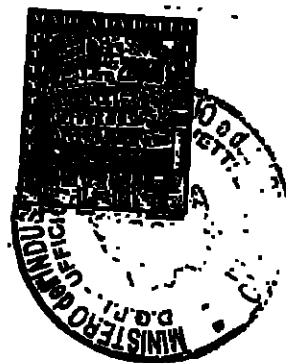
bcr/abl+.

Descrizione Dettagliata dell'Invenzione.

Sorprendentemente, si è osservato in modelli di eterotrapianto in topi "nude" effetti positivi e preferibilmente anche sinergici tra inibitori della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore e composti organici in grado di legarsi ad una α 1-glicoproteina acida (AGP). Questa è la dimostrazione che gli inibitori della tirosina-chinasi possono venire usati non soltanto come singole sostanze ma anche in particolare in una terapia combinata con composti organici in grado di legarsi ad AGP per il trattamento di malattie costituite da cancro.

Questa combinazione offre notevoli vantaggi; in primo luogo, gli inibitori delle tirosina-chinasi possono presentare effetti laterali significativi fino ad effetti realmente tossici, in modo che una semplice compensazione del legame di AGP mediante un aumento della dose di un inibitore di tirosina-chinasi spesso è molto difficile oppure impossibile allo scopo di ottenere un equilibrio responsabile tra effetto terapeutico ed effetti laterali. Nelle nuove combinazioni qui descritte, tuttavia, è possibile far diminuire la quantità di inibitore della tirosina-chinasi necessaria e così alleviare gli effetti laterali. In

275 77



secondo luogo, il composto organico che può venire usato come composto in grado di legarsi ad AGP può venire scelto tra composti con una tollerabilità molto elevata, consentendo così una grande flessibilità nel

trattamento di pazienti affetti da cancro. In terzo luogo, a causa del fatto che inibitori delle tirosina-chinasi farmaceuticamente attive vengano liberati dal legame con AGP nel plasma apre una via completamente nuova di trattamento, è anche possibile trattare i tipi di cancro che sono stati molto difficili da trattare oppure anche non sono stati praticamente influenzati dalla terapia con composti chemioterapici standard. Come cosa più importante, è possibile superare una desensibilizzazione in vivo (resistenza) di cellule in fase di proliferazione nei confronti di un inibitore delle tirosina-chinasi, che può essere presente già all'inizio del trattamento (preferibilmente per esempio a causa di elevati livelli di AGP nel plasma sanguigno) oppure può essersi sviluppato oppure può essere in fase di sviluppo durante il trattamento con un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore come descritto nella presente descrizione.

La presente invenzione preferibilmente riguarda un preparato in combinazione che contiene (a) almeno un

278
216

inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore, e (b) almeno un composto organico in grado di legarsi ad una α 1-glicoproteina acida (AGP); oppure sali farmaceuticamente accettabili di un qualsiasi componente (a), (b) oppure (a) e (b), se è presente almeno un gruppo che forma sale.

L'invenzione riguarda inoltre un procedimento per trattare una malattia proliferativa che può venire trattata mediante somministrazione di un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore, in cui

(a) almeno un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore, e

(b) almeno un composto organico in grado di legarsi ad una α 1-glicoproteina acida (AGP) vengono somministrati ad un mammifero in combinazione in una quantità che insieme è efficace dal punto di vista terapeutico contro una malattia proliferativa che può venire trattata mediante somministrazione di un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore, in cui qualsiasi componente (a) e/o (b) può essere presente anche sotto forma di un sale farmaceuticamente accettabile, se è presente almeno un gruppo che forma sale.

L'invenzione riguarda inoltre un prodotto che

229
277

contiene

(a) almeno un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore, e

(b) almeno un composto organico in grado di legarsi

ad una α 1-glicoproteina acida (AGP); in cui qualsiasi componente (a) e/o (b) può essere presente anche sotto forma di un sale farmaceuticamente accettabile, se è presente almeno un gruppo che forma sale, in presenza oppure in assenza di una o più sostanze-veicolo farmaceuticamente accettabili, sotto forma di un preparato in combinazione per un impiego contemporaneo oppure distribuito nel tempo entro un periodo di tempo che sia sufficientemente piccolo perchè i composti attivi sia del componente (a) che del componente (b) facciano aumentare l'attività antiproliferativa del composto (a) nei confronti di cellule in fase di proliferazione, in particolare in un paziente, per il trattamento di una malattia proliferativa che risponde a tale composto.

L'invenzione inoltre riguarda un preparato farmaceutico che contiene una quantità che congiuntamente è efficace per trattare una malattia proliferativa che può venire trattata mediante somministrazione di un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore,

278 280

costituito da:

(a) almeno un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore, e

(b) almeno un composto organico in grado di legarsi ad una α 1-glicoproteina acida,

in cui qualsiasi componente (a) e/o (b) può essere presente sotto forma di un sale farmaceuticamente accettabile, se è presente almeno un gruppo che forma sale,

con una o più sostanze-veicolo farmaceuticamente accettabili.

L'invenzione riguarda anche l'impiego di una combinazione di

(a) almeno un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore, e

(b) almeno un composto organico in grado di legarsi ad una α 1-glicoproteina acida, in cui qualsiasi componente (a) e/o (b) può essere presente anche sotto forma di un sale farmaceuticamente accettabile, se è presente almeno un gruppo che forma sale,

per la produzione di preparati farmaceutici da impiegare sotto forma di composizioni contro una malattia proliferativa che può venire trattata mediante somministrazione di un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore.

279/81



Viene incluso l'impiego in un metodo per inibire una iperproliferazione di cellule che consiste nel porre a contatto cellule in fase di iperproliferazione con un preparato o prodotto farmaceutico come specificato negli ultimi due paragrafi, in particolare un metodo per trattare una malattia proliferativa che consiste nel porre a contatto un soggetto, cellule, tessuti oppure un fluido dell'organismo di detto soggetto, sospettato di essere affetto da una malattia iperproliferativa con una composizione o prodotto farmaceutico come specificato negli ultimi due paragrafi.

I termini generali usati qui in precedenza e qui di seguito preferibilmente hanno i seguenti significati se non viene altrimenti indicato:

L'espressione "almeno uno" riferendosi ad a) inibitori della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore oppure b) composti organici in grado di legarsi ad una α 1-glicoproteina acida si riferisce a uno o più, in particolare da 1 a 5 componenti di ciascun gruppo a) oppure b), preferibilmente ad un composto del gruppo a) e a uno o più, in particolare da 1 a 5, in modo più specifico 1 oppure 2 composti del gruppo b).

Con l'espressione "inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore" si

287
280

intende preferibilmente uno dei seguenti composti:

Un composto citato nella Domanda Internazionale No. WO 97/02266, nella Domanda di Brevetto Internazionale WO 98/35958 e in modo specifico nella Domanda di Brevetto Europeo EP 0.564.409-A, e anche nella Domanda Internazionale No. WO 99/03854, i quali vengono tutti qui incorporati come riferimento; Tyrphostin AG957 (vedere Kaur et al., Anticancer Drugs 5, 213-222 (1994), Herbimycin A (Okabe e Uehara, Leukemia and Lymphoma 12, 2156-2162 (1994), Blood 80, 1330-1338 (1994) and Leuk. Res. 18, 213-220 (1994), e anche Rioran et al., Oncogene 16, 133-1542 (1998)); Tyrphostins AG 1295, AG 1296 (vedere Kovalenko et al., Cancer Res. 54, 6106-6114 (1994); Lipson et al., Pharmacol & Exp-Therap. 285, 844-852 (1998); Krystal et al., Cancer Res. 57, 2203-2208 (1997)); SU 101 (Leflunomide), e anche come suo metabolita (vedere Shower et al., Clin. Cancer Res. 3, 1167-1177 (1997), Mattar et al., FEBS Lett. 334, 161-164 (1993), Cherwinskyi et al., Inflamm. Res. 3, 1167-1177 (1997), e Strawn et al., Exp. Opin. Invest. Drugs 7, 533-573 (1998)); e Piridopirimidine (vedere per esempio Hamby et al., J. Med. Chem. 40, 2296-2303 (1997); Dahring et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 281, 1446-1456 (1997); Klutcho et al., Life Sci. 62, 143-150 (1998); Panek et al., J.

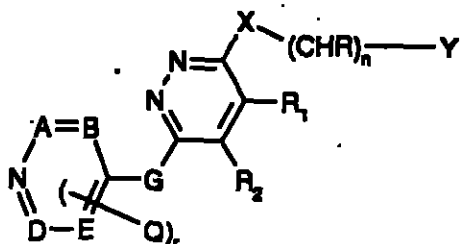
281 283

Pharmacol. Exp. Ther. 283, 1433-1444; Boschelli et al., J. Med. Chem. 41, 4365-4377 (1998)). Tutte le citazioni riportate sopra vengono qui incorporate come riferimento. Gli inibitori delle tirosina-chinasi, la loro sintesi e il loro impiego possono venire dedotti da queste citazioni.

Il termine "e/o" usato in "inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore" significa che o uno o più delle tirosina-chinasi citate vengono inibite da un composto compreso da questa espressione.

Preferibilmente con l'espressione "inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore" si intende uno dei seguenti composti:

(A) Un composto di formula IV,



(IV)

in cui

r è compreso tra 0 e 2,

n è compreso tra 0 e 2,

m è compreso tra 0 e 4,

R_1 e R_2 (i) sono alchile inferiore, in particolare

$$\frac{z}{(f-z)_m}$$

(1*)

$$T_1 = T_2 = T_3 = T_4$$

(133)

X è un gruppo immino, ossa, oppure tia;

283 28

Y è arile, piridile, oppure cicloalchile non sostituito oppure sostituito; e

Z è un gruppo amminico mono- oppure di-sostituito, alogeno, alchile, alchile sostituito, ossidrile, ossidrile

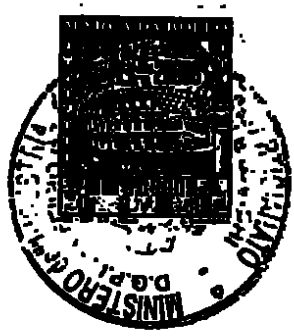
eterificato oppure esterificato, nitro-gruppo, gruppo ciano, carbossile, carbossile esterificato, alcanole, carbambole, carbambole N-mono- oppure N,N-disostituito, ammidino, guanidino, mercapto-gruppo, solfo-gruppo, feniltio, fenil-inferiore-alchiltio, alchilfeniltio, fenilsolfonile, fenil-inferiore-alchilsolfonile, alchilfenilsolfonile, fenilsolfonile, fenil-inferiore-alchilsolfonile, oppure alchilfenilsolfonile, in cui, se è presente più di un radicale Z ($m = \geq 2$), i sostituenti Z sono uguali oppure differenti l'uno dall'altro,

e in cui i legami caratterizzati, se sono presenti, con una linea ondulata sono o un legame semplice oppure un doppio legame;

oppure un N-ossido del composto definito, in cui uno o più atomi di azoto portano un atomo di ossigeno;

-CH₂-O-, -CH₂-S-, ossa e tia;

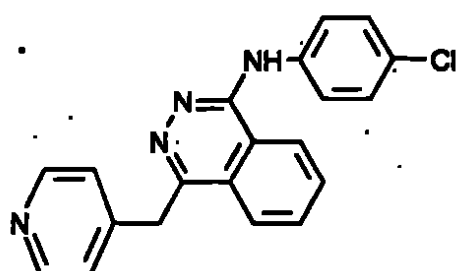
con la condizione che, se Y è piridile oppure cicloalchile non sostituito, X è il gruppo immino, e i rimanenti radicali sono come definiti, G viene scelto dal gruppo costituito da alchilene inferiore,



287 286

-CH₂-O-, -CH₂-S-, ossa e tia;

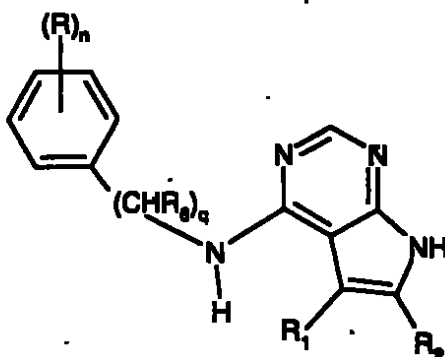
oppure un suo sale. Preferibilmente, le definizioni dei sostituenti riportate sopra hanno i significati, in particolare i significati preferiti, descritti nella Domanda di Brevetto Internazionale WO 98/35958. Tra questi composti il più preferito è il composto di formula V



(V)

con la denominazione 1-(4-cloro-anilino)-4-(4-piridil-metil)-ftalazina, oppure un suo sale farmaceuticamente accettabile.

(B) Un composto di una 7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina di formula VI



(VI)

285 2/3

in cui

q è 0, oppure 1,

n è compreso tra 1 e 3 quando q è 0, oppure n è compreso tra 0 e 3 quando q è 1,

R è alogeno, alchile inferiore, ossidrile, inferiore-alcanoilossi, alcossi inferiore, carbossi, inferiore-alcossicarbonile, carbammoile, N-inferiore-alchilcarbammoile, N,N-di-inferiore-alchilcarbammoile, il gruppo ciano, un gruppo amminico, inferiore-alcanoilamminico, inferiore-alchilamminico, N,N-di-inferiore-alchilamminico oppure trifluorometile, essendo possibile quando sono presenti nella molecola parecchi radicali R, che questi radicali siano identici oppure differenti;

a) R₁ e R₂, ciascuno indipendentemente dall'altro, indicano
α) fenile sostituito con carbammoil-metossi, carbossi-metossi, benzoillossicarbonil-metossi, inferiore-alcossicarbonil-metossi, fenile, ammino, inferiore-alcanoilammino, inferiore-alchilammino, N,N-di-inferiore-etilammino, ossidrile, inferiore-alcanoilossi, carbossile, inferiore-alcossicarbonile, carbammoile, N-inferiore-alchilcarbammoile, N,N-di-inferiore-alchilcarbammoile, gruppo ciano oppure con nitro-gruppo;

β) idrogeno;

γ) piridile non sostituito oppure alogeno oppure inferiore-alchil-sostituito;

δ) N-benzil-piridinio-2-ile; naftile; ciano; carbossile; inferiore-alcossicarbonile; carbammoile; N-inferiore-

alchilcarbammoile; N,N-di-inferiore-alchilcarbammoile;

N-benzilcarbammoile; formile; inferiore-alcanoile; inferiore-alchenile; inferiore-alchenilossi; oppure

ε) inferiore-alchile sostituito con

εα) alogeno, ammino, inferiore-alchilammino, piperazino, di-inferiore-alchilammino;

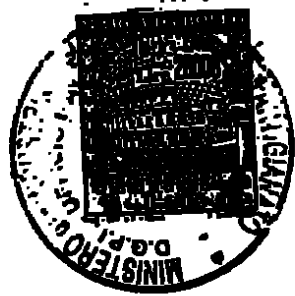
εβ) fenilammino che è non sostituito oppure è sostituito nella porzione fenile con alogeno, alchile inferiore, ossidrile, inferiore-alcanoilossi, inferiore-alcossi, carbossile, inferiore-alcossicarbonile, carbammoile, N-inferiore-alchilcarbammoile, N,N-di-inferiore-alchilcarbammoile, gruppo ciano, ammino, inferiore-alcanoilammino, inferiore-alchilammino, N,N-di-inferiore-alchilammino oppure con trifluorometile,

εγ) ossidrile, alcossile inferiore, gruppo ciano, carbossile, inferiore-alcossicarbonile, carbammoile, N-inferiore-alchilcarbammoile, N,N-di-inferiore-alchilcarbammoile, mercapto, oppure

εδ) con un radicale di formula $R_3-S(O)_m-$ in cui R_3 è alchile inferiore e m è 0, 1 oppure 2, oppure

b) quando q è 1, uno dei radicali R_1 e R_2 è

287 289



alchile inferiore non sostituito oppure fenile non sostituito e gli altri radicali R_1 e R_2 hanno uno dei significati riportati sopra nel paragrafo a) ad eccezione di idrogeno, oppure

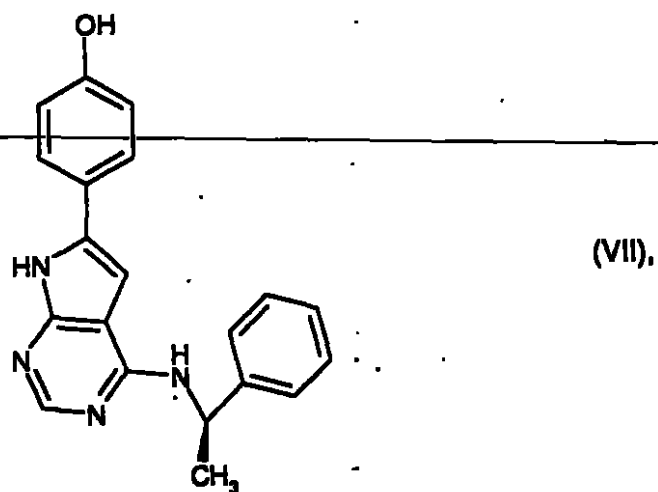
c) R_1 e R_2 insieme sono C_4-C_{10} -1,4-alcadienilene sostituito con ammino, inferiore-alcanoilammino, inferiore-alchilammino, N,N-di-inferiore-alchilammino, nitro, alogeno, ossidrile, inferiore-alcanoilossi, carbossile, inferiore-alcossicarbonile, carbammoile, N-inferiore-alchilcarbammoile, N,N-di-inferiore-alchilcarbammoile oppure con il gruppo ciano oppure sono aza-1,4-alcadienilene avente fino a 9 atomi di carbonio, oppure

d) quando q è 1, R_1 e R_2 , ciascuno indipendentemente dall'altro, sono alchile inferiore non sostituito oppure fenile non sostituito oppure hanno uno dei significati riportati sopra nel paragrafo a), e

R_6 è idrogeno, alchile inferiore, inferiore-alcossicarbonile, carbammoile, N-inferiore-alchilcarbammoile oppure N,N-di-inferiore-alchilcarbammoile, oppure un suo sale. Preferibilmente, le definizioni dei sostituenti riportati sopra hanno i significati, in particolare i significati preferiti, descritti nella Domanda di Brevetto Internazionale WO 97/02266.

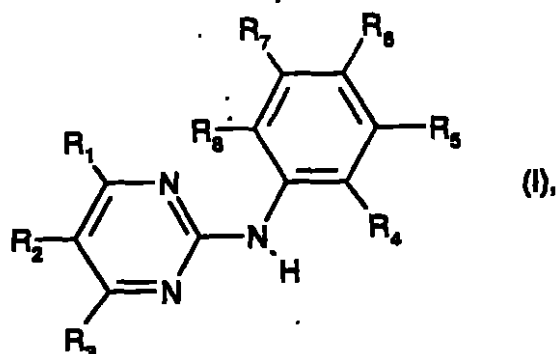
288/290

Tra questi composti il più preferito è il composto di formula VII



avente la denominazione (R)-6-(4-idrossi-fenil)-4-[(1-feniletil)-ammino]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina.

Il più preferito è un derivato di una N-fenil-2-pirimidina-ammina di formula I



in cui

R₁ è 4-pirazinile, 1-metil-1H-pirrolile, fenile ammino- oppure ammino-inferiore-alchil-sostituito, in cui il gruppo amminico in ciascun caso è libero, alchilato oppure acilato, 1H-indolile oppure

1H-immidazolile legato in corrispondenza di un atomo di carbonio dell'anello a cinque membri, oppure piridile non sostituito oppure inferiore-alchil-sostituito legato in corrispondenza di un atomo di carbonio dell'anello e non sostituito oppure sostituito in corrispondenza dell'atomo di azoto con ossigeno, R₂ e R₃, ciascuno indipendentemente dall'altro, sono idrogeno oppure alchile inferiore, uno oppure due dei radicali R₄, R₅, R₆, R₇ e R₈ sono ciascuno il nitro-gruppo, inferiore-alcossi fluoro-sostituito oppure un radicale di formula II



in cui

R₉ è idrogeno oppure alchile inferiore,

X è un osso-gruppo, un tio-gruppo, immينو, N-inferiore-alchil-immينو, idrossiimmينو oppure O-inferiore-alchil-idrossiimmينو,

Y è ossigeno oppure è il gruppo NH,

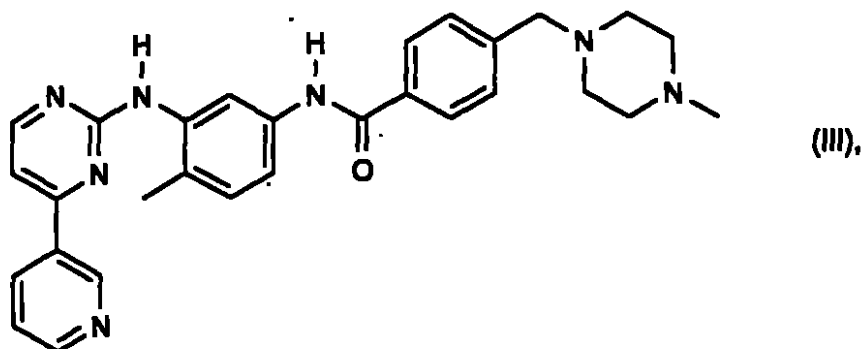
n è 0 oppure 1 e

R₁₀ è un radicale alifatico avente almeno 5 atomi di carbonio, oppure un radicale aromatico, aromatico-alifatico, cicloalifatico, cicloalifatico-alifatico, eterociclico oppure eterociclico-alifatico e gli altri radicali R₄, R₅, R₆, R₇ e R₈, ciascuno indipendentemente dall'altro, sono idrogeno, alchile

290
2/12

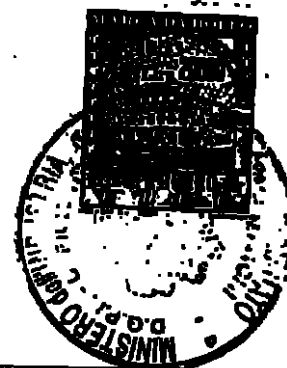
inferiore che è non sostituito oppure è sostituito con un gruppo amminico libero oppure alchilato, con piperazinile, piperidinile, pirrolidinile oppure con morfolinile oppure sono alcanole inferiori, trifluorometile, ossidrile libero, eterificato oppure esterificato, il gruppo amminico libero, alchilato oppure acilato oppure carbossile libero oppure esterificato, oppure

un sale di tali composti che hanno almeno un gruppo che forma sale. Preferibilmente, le definizioni dei sostituenti riportate sopra hanno i significati, in particolare i significati preferiti descritti nella Domanda di Brevetto Europeo EP 0.564.409. Tra questi composti il più preferito è il composto di formula III



con la denominazione 4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il)pirimidin-2-ilammino]fenil]benzammide, preferibilmente nella forma del sale metansolfonato come descritto in WO 99/03854, più preferibilmente nella forma del

sale metansolfonato nella forma di cristalli β come descritto in WO 99/03854. Questo composto (nella forma del sale metansolfonato) viene denominato qui di seguito STI571.



Un composto organico in grado di legarsi ad una α -glicoproteina acida o "AGP" in generale è un farmaco basico oppure neutro, però anche un farmaco acido, in particolare scelto dal gruppo costituito da:

- alfa-bloccanti, in particolare Nicergolina oppure Prazosin;
- anestetici/analgesici, in particolare Alfentanil, Ketamine oppure Ethidocaine;
- analgesici, in particolare Fentanil, Meperidina, Metadone oppure Fenilbutazone;
- anestetici, in particolare Bupivacaine, Etidocaina oppure Fenciclidina;
- anestetici/antiaritmici, in particolare Lidocaina oppure Fenciclidina;
- antiaritmici, in particolare Aprindina, Disopiramide, Chinidina oppure Verapamil;
- antibiotici, in particolare Eritromicina;
- anticoagulanti, in particolare Acenocoumarol, Dipyridamole, PCR2362 (derivato della tienopiridina), Ticlopidine oppure Warfarin;
- antiepilettici, in particolare Phenytoin oppure

292 24

Carbamazepine;

agenti antiinfiammatori, in particolare Naproxen;

beta-bloccanti, in particolare Alprenolol, Metoprolol, Oxprenolol, Pindolol e composti correlati, Propranolol oppure Timolol;

steroidi, come Progesterone, Cortexone, Cortisol, Testosterone, Estradiolo oppure Prednisolone;

bloccanti neuromuscolari, in particolare Metocurina oppure d-Tubocurarina;

psicotropici, in particolare Amitriptilina, Cloropromazina, Cyclazindol, Desmethylinipramine, Diazepam, Doxepine, Flurazepam, Fluphenazine, Haloperidol, Imipramine, Loxapine, Mianserin, Nortriptyline, Norzimelidine, Perazine, Perphenazine, Phenobarbital, Derivati della Fenotiazina, Promazine, Acepromazine, Protipendyl, Thioridazine, Thiothixene, Triazolam, Trifluoperazine oppure Zimelidine;

vitamine e provitamine, in particolare Vitamina B₁₂ oppure Acido Folico;

sonde fluorescenti, in particolare DAPN (derivato del propranolol), 1,8-Anilino-naftalen-solfonato;

ulteriori farmaci, in particolare Aminopyrine, Amoxapine, Bupropion, Maprolitine, Nomifensine, Trazodone, farmaci con gruppo di ammonio quaternario, Ritodrine, Doxazosin, Trimazosin, Binedalin, Amsacrine, Apazone,

293

SKF 525A, Ciclazindol, PCR 2362, Indometacina, Probenecid, Acido Retinoico, Solfinpirazone, Tolmetin, Benoxaprofen, Eparina, Sufentanil, Lofentanil, Metoclopramide, Nicardipine, Pirmenol, Mifepristone,

RU 42 633, Aprindil, Auramine O, Bepriidil, Desipramine, Desmethyldomipramine, Moxaprine, Chinina, Lorcinide, Prothipendyl, Protriptyline, Trihexyphenidyl, Biperiden, Methaqualone, Diphenhydramine, Glutethimide, Chlordiazepoxid, L-Triptofano, Mepivacaine, Levomethadone, Opipramol, Trifluopromazine oppure Trimipramine;

plastificanti, come Tris-butossietil-fosfato (TBEP); Staurosporina (vedere US 4.107.297) oppure Derivati della Staurosporina, preferibilmente quelli descritti nella Domanda di Brevetto Europeo EP 0.296.110 e/o EP 0.238.011, in particolare N-benzoil-staurosporina (PTK412 - vedere Domanda di Brevetto Europeo No. EP 0.296.110) oppure 7-idrossi-staurosporina (UCN-01 - vedere Domanda di Brevetto Europeo No. EP 0.238.211;

e anche un metabolita di uno qualsiasi di questi composti;

oppure un loro sale (in particolare farmaceuticamente accettabile).

EP 0.238.011, US 4.107.297 ed EP 0.296.110

vengono incorporati come riferimento, come anche le seguenti pubblicazioni: Kremer et al., Pharmacol. Rev. 40(1), 1-47 (1988); Cancer Res. 58, 3248-3253 (1998); Br. J. Clin. Pharmacol. 22, 499-506 (1986);

Physiol. Functions, e Pharmacol., pagine 321-336: F. Bree et al., "Binding to α 1-acid glycoprotein and relevant apparent volume of distribution", Alan R. Liss Inc., 1989; Protein Binding and Drug Transport (Tillement e Lindenlaub, ed.): "Drug binding to human α 1-acid glycoprotein - focus on a single binding site", Stuttgart 1986. In tutte queste pubblicazioni, vengono citati i composti in grado di legarsi ad AGP che sono forme di realizzazione preferite della presente invenzione.

Più preferito è uno qualsiasi dei composti citati sopra diversi da uno steroide. Per un impiego medico secondario (per esempio in gruppi di pazienti che hanno sviluppato resistenza, più in particolari pazienti affetti da CML in crisi di blastizzazione e pazienti Ph+-ALL recidivi), sono utili anche steroidi.

Un composto organico in grado di legarsi ad AGP da usare in combinazione secondo l'invenzione in aggiunta ad una abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore oppure del Kit-recettore può anche venire scelto da una o



più ulteriori abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore oppure del Kit-recettore, il che sta ad indicare che il componente (b) nelle forme di realizzazione dell'invenzione può essere anche un tale composto.

Preferibilmente, la abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore (componente (a)) viene scelta dal gruppo costituito da 1-(4-cloro-anilino)-4-(4-piridil-metil)-ftalazina, (R)-6-(4-idrossi-fenil)-4-[(1-feniletil)-ammino]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina e preferibilmente 4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il)pirimidin-2-ilammino]fenil]-benzammide; oppure un suo sale; più preferibilmente il sale metan-solfonato della 4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il)pirimidin-2-ilammino]fenil]benzammide (qui di seguito denominato anche STI571), più preferibilmente nella forma di cristalli β come descritto in WO 99/03854.

Il composto organico in grado di legarsi ad una α 1-glicoproteina acida (componente (b)) preferibilmente è un antibiotico, in particolare eritromicina oppure staurosporina oppure un derivato della steaurosporina, in particolare N-benzoil-staurosporina (PKC412) oppure 7-idrossi-staurosporina (UCN-01), oppure un suo sale, più in particolare eritromicina, oppure un suo sale farmaceuticamente accettabile.

296 298

Uno o più degli inibitori della tirosina-chinasi e dei composti organici in grado di legarsi ad AGP, possono venire usati in combinazione oppure in una terapia in combinazione secondo la presente invenzione.

Il termine legame significa in particolare un legame competitivo, però può essere anche qualsiasi altro tipo di legame (per esempio a siti di legame che presentano effetti allosterici sul componente (a) che si lega al sito) che porta ad un legame diminuito di un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore ad AGP. Questo legame può venire determinato in vitro in analogia ai metodi descritti negli Esempi riportati qui di seguito.

Il legame può essere irreversibile (per esempio mediante legame covalente oppure ionico) oppure preferibilmente reversibile.

L'espressione "in grado di legarsi" sta ad indicare che il composto ha una affinità per AGP che consente un legame come descritto sopra, preferibilmente con una concentrazione in corrispondenza di un legame semi-massimo nell'intervallo da millimolare fino a sub-nanomolare, in particolare nell'intervallo compreso tra 100 μ M e 1 nM.

Con l'espressione "malattia proliferativa che

può venire trattata mediante somministrazione della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore" si intende qualsiasi malattia qui citata; preferibilmente si intende qualsiasi malattia

che risponde a tali composti; in particolare una malattia proliferativa scelta tra malattia costituita da cancro, in particolare una malattia tumorale oppure una leucemia, oppure una malattia proliferativa non maligna, per esempio aterosclerosi, trombosi, psoriasi, sclerodermatite oppure fibrosi. Più preferibilmente, si intende una ~~malattia scelta dal gruppo costituito da CML (leucemia mieloide cronica) e ALL (leucemia linfoblastica acuta)~~, oppure un tumore solido, in particolare scelto tra cancro del polmone, in particolare cancro del polmone non a cellule piccole, e cancro della prostata.

Con l'espressione "quantità che in combinazione è efficace dal punto di vista terapeutico contro una malattia proliferativa che può venire trattata mediante somministrazione di un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore" preferibilmente si intende una qualsiasi quantità dei componenti delle combinazioni che in combinazione fanno diminuire la proliferazione di cellule responsabili di una qualsiasi delle malattie proliferative citate

(per esempio diminuita crescita del tumore) oppure preferibilmente anche provocano una regressione, più preferibilmente anche la scomparsa parziale oppure completa di tali cellule (per esempio regressione del tumore, preferibilmente guarigione).

Preferibilmente, in una qualsiasi delle forme di realizzazione della presente invenzione la dose di ciascuno dei componenti della combinazione (componente (a) e (b)) viene scelta in modo che nel plasma sanguigno si raggiunga un livello del plasma sanguigno che è superiore alla concentrazione di legame semi-massimo del componente (b), il composto organico è in grado di legarsi ad AGP nel plasma, in vivo per almeno una parte del periodo di tempo in cui è presente il componente (a), ossia l'inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore. Questa concentrazione può venire determinata per esempio in vitro secondo procedimenti standard, per esempio in analogia ai metodi descritti negli esempi per la determinazione del K_a , mentre la concentrazione nel plasma del sangue dei componenti (a) e (b) in un animale a sangue caldo (intendendo in modo particolare un paziente umano) può anche venire determinata secondo metodi di routine.

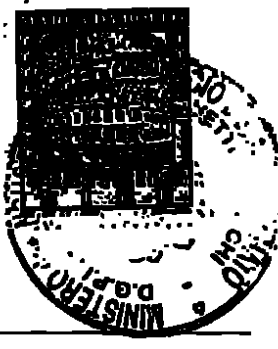
Preferibilmente, il dosaggio del componente (b)

294

viene scelto in modo che la concentrazione del componente (b) nel plasma sia superiore a 0,05 μM , più preferibilmente sia superiore a 0,1 μM , e nel modo più preferibile sia compresa tra 0,5 e 100, in particolare tra 1 e 50 μM dell'individuo trattato, per almeno una parte del periodo di tempo in cui è presente anche il componente (a). Più preferibilmente, la concentrazione di uno qualsiasi dei componenti (a) e (b) nel plasma è superiore a 0,1 μM , più preferibilmente è superiore a 1 μM , e più preferibilmente è compresa tra 0,5 e 100, in modo particolare tra 1 e 50 μM dell'individuo trattato, per almeno una parte del periodo di tempo in cui è presente anche il componente (a).

Le concentrazioni nel plasma possono venire determinate secondo metodi standard, per esempio effettuando una HPLC di campioni sottoposti a lavorazione secondo procedimenti standard.

Con l'espressione "un prodotto che comprende (a) almeno un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore, e (b) almeno un composto organico in grado di legarsi ad una α 1-glicoproteina acida (AGP); in cui un qualsiasi componente (a) e/o (b) può essere presente anche sotto forma di un sale farmaceuticamente.



accettabile, se è presente almeno un gruppo che forma sale,

in presenza oppure in assenza di una o più sostanze-veicolo farmaceuticamente accettabili, sotto forma

di un preparato in combinazione, per un impiego contemporaneo oppure distribuito nel tempo entro un periodo di tempo che è sufficientemente piccolo affinché i composti attivi sia del componente (a) che del componente (b) facciano aumentare l'attività antiproliferativa di un composto (a) contro cellule in fase di proliferazione, in particolare in un paziente, per il trattamento di una malattia proliferativa che risponde ad un tale composto", si intende in particolare un "kit" oppure "kit di parti" nel senso che i componenti efficaci (a) e (b) della combinazione possono venire somministrati indipendentemente oppure mediante l'impiego di combinazioni determinate differenti con quantità differenziate dei componenti (a) e (b) in momenti differenti. Le parti del kit costituito da parti separate possono venire somministrate contemporaneamente oppure in modo distanziato nel tempo, ossia in momenti differenti con intervalli di tempo uguali oppure differenti per una qualsiasi parte del kit costituito da parti differenti, con la condizione che gli intervalli di

tempo vengano scelti in modo che l'effetto sulla malattia proliferativa nell'uso combinato delle parti sia maggiore rispetto all'effetto che si otterrebbe mediante l'impiego soltanto del componente (a), ossia si ha una inibizione più forte della proliferazione oppure preferibilmente una regressione più forte oppure anche una guarigione della malattia proliferativa rispetto a quando la medesima dose del solo componente (a) viene somministrata da sola nella medesima dose. Ciò viene indicato con l'espressione "aumento dell'attività antiproliferativa contro cellule in fase di proliferazione, in particolare in un paziente"; preferibilmente, si intende un aumento dell'effetto provocato dal componente (b), in particolare una reversione parziale oppure completa della resistenza di una malattia proliferativa nei confronti di uno o più composti del tipo componente (a) e/o si intende la stimolazione della regressione delle cellule in fase di proliferazione fino a comprendere la loro completa distruzione.

Con l'espressione "cellule in fase di proliferazione", si intendono preferibilmente cellule in fase di proliferazione anormale, come le cellule cancerose.

Si preferiscono combinazioni che presentano

302/34

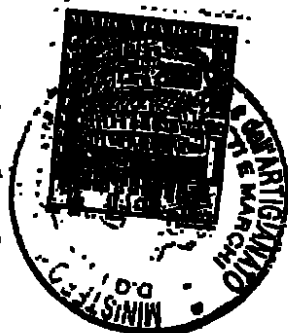
un'aumentata attività antiproliferativa quando vengono confrontate con il singolo componente (a) da solo, in particolare combinazioni che presentano sinergismo (combinazioni sinergiche) oppure combinazioni che

portano ad una regressione di tessuti proliferativi e/o alla guarigione da malattie proliferative, più preferibilmente combinazioni nelle quali viene superata parzialmente oppure completamente una resistenza (intendendo resistenza presente già all'inizio del trattamento oppure resistenza che è un risultato di periodi più o meno lunghi di trattamento con il componente (a)) di una malattia proliferativa in un animale a sangue caldo, in particolare nell'uomo, nei confronti di uno o più composti della classe del componente (a).

L'espressione "sostanze-veicolo farmaceuticamente accettabili" viene spiegata di seguito nella definizione dei preparati farmaceutici.

In una qualsiasi combinazione oppure in un qualsiasi trattamento in combinazione secondo l'invenzione qui descritta, si preferisce l'impiego in combinazione allo scopo di invertire in modo completo oppure parziale una resistenza (presente prima del trattamento oppure sviluppata oppure in fase di sviluppo durante il trattamento con un farmaco che comprende un

componente (a) come qui definito) di una malattia proliferativa nei confronti di un trattamento con un farmaco che comprende un componente (a) come definito qui in vivo, in particolare in un animale a sangue caldo, in particolare in un essere umano.



Resistenza completa oppure parziale in particolare significa una efficienza inferiore, per esempio in termini di interruzione oppure ritardo della proliferazione, che provoca la regressione oppure anche la guarigione, per esempio una minore inibizione della proliferazione oppure una durata di trattamento più lunga fino a che si ha una risposta prevista se non fosse presente alcuna resistenza, per esempio di un tumore oppure di una leucemia rispetto ad un animale, per esempio un essere umano, che non presenta resistenza oppure del quale i successi iniziali del trattamento (in particolare in un paziente che sviluppa resistenza soltanto durante un trattamento con un componente (a)) non si hanno più in corrispondenza di stadi tardivi del trattamento, in particolare in pazienti affetti da CML in crisi di blastizzazione e in pazienti Ph+ ALL con recidiva.

Si deve intendere che l'invenzione riguarda inoltre qualsiasi impiego di combinazioni di un componente (a) e di un componente (b), come definito sopra

è di seguito, in un procedimento per inibire una iperproliferazione di cellule che consiste nel mettere a contatto cellule in fase di iperproliferazione con un preparato farmaceutico oppure un prodotto farmaceutico nel senso di un kit costituito da parti differenti, in particolare un metodo per trattare una malattia proliferativa che consiste nel porre a contatto un soggetto, cellule, tessuti oppure un fluido corporeo di detto soggetto, sospettato di avere una malattia iperproliferativa. Ciò comprende in particolare il trattamento per esempio di cellule all'esterno dell'organismo con lo scopo di sostituire cellule in fase di iperproliferazione nell'organismo di un soggetto che presenta cellule in fase di iperproliferazione con cellule normali; per esempio, sangue con cellule del sistema immunitario può venire prelevato da un soggetto, può venire trattato all'esterno dell'organismo con un componente (a) e con un componente (b) in modo da selezionare cellule non-iperproliferative, le cellule staminali e le altre cellule del sangue del sistema immunitario possono venire distrutte nel soggetto per esempio mediante irradiazione oppure mediante chemioterapia e quindi le cellule normali selezionate possono venire di nuovo impiantate nel soggetto, per esempio

305 362

mediante iniezione ecc. I metodi da adottare in tali tipi di trattamento sono noti a chi è esperto nel settore.

Una qualsiasi delle citazioni riportate all'interno di questa descrizione viene incorporata come riferimento, in particolare quei passaggi indicati qui come preferiti.

A condizione che siano presenti uno o più gruppi che formano sali, le sostanze che costituiscono i farmaci corrispondenti al componente (a) e/o al componente (b) possono essere presenti anche sotto forma di sali.

I sali sono in particolare i sali farmaceuticamente accettabili, per esempio sostanzialmente non tossici.

Tali sali vengono formati, per esempio, da composti aventi un gruppo acido, per esempio un gruppo carbossile, un gruppo di fosfodiestere oppure fosforotioato, e sono, per esempio, loro sali con basi adatte, come sali di metalli non tossici derivati dai metalli dei gruppi Ia, Ib, IIa e IIb della Tabella Periodica degli Elementi, in particolare adatti sali di metalli alcalini, per esempio sali di litio, sodio oppure potassio, oppure sali di metalli alcalino-terrosi, per esempio sali di magnesio oppure di calcio, inoltre sali di zinco oppure di ammonio, e

anche quei sali che vengono formati con ammine organiche, come mono-, di- oppure tri-alchilammine non sostituite oppure idrossi-sostituite, in particolare mono-, di- oppure tri-inferiore-alchilammine oppure

con composti di ammonio quaternario, per esempio con

N-metil-N-etilammina, dietilammina, trietilammina,

mono-, bis- oppure tris-(2-idrossi-inferiore-

alchil)ammine, come mono-, bis- oppure tris-(2-

idrossietil)ammina, 2-idrossi-terz-butilammina oppure

tris(idrossimetil)metilammina, N,N-di-inferiore-

alchil-N-(idrossi-inferiore-alchil)ammine, come

N,N-dimetil-N-(2-idrossietil)-ammina oppure tri-(2-

idrossietil)-ammina, oppure N-metil-D-glucammina,

oppure sali di ammonio quaternario, come sali di

tetrabutilammonio. Composti che hanno un gruppo

basico, per esempio un gruppo amminico oppure

iminico possono formare sali di addizione con acidi,

per esempio con acidi inorganici, per esempio con un

acido alogenidrico, come acido cloridrico, con acido

solforico oppure acido fosforico, oppure con acidi

organici carbossilici, solfonici, con solfo-acidi

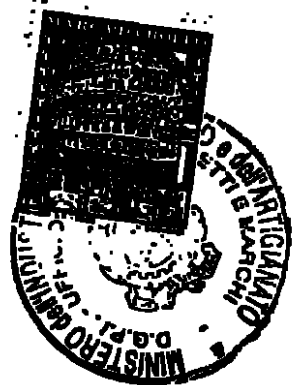
oppure fosfo-acidi oppure con acidi solfammici

N-sostituiti, come, per esempio, acido acetico, acido

propionico, acido glicolico, acido succinico, acido

maleico, acido idrossimaleico, acido metilmaleico,

307 ~~309~~



acido fumarico, acido malico, acido tartarico, acido gluconico, acido glucarico, acido glucuronico, acido citrico, acido benzoico, acido cinnamico, acido mandelico, acido salicilico, acido 4-amminosalicilico, acido 2-fenossibenzoico, acido 2-acetossibenzoico, acido embonico, acido nicotinico oppure acido isonicotinico, e anche con amminoacidi, per esempio, α -ammino-acidi, e anche con acido metansolfonico, acido etansolfonico, acido 2-idrossietansolfonico, acido etan-1,2-disolfonico, acido benzensolfonico, acido 4-metilbenzensolfonico, acido naftalen-2-solfonico, 2- oppure 3-fosfoglicerato, glucosio-6-fosfato, acido N-cicloesilsolfammico (con formazione dei ciclammati) oppure con altri composti organici acidi, come acido ascorbico. Composti che hanno gruppi acidi e basici possono anche formare sali interni. Se è presente più di un gruppo che forma sale, è possibile anche che siano presenti sali misti.

Con lo scopo di isolare e purificare, è anche possibile usare sali non accettabili dal punto di vista farmaceutico, per esempio sali costituiti da picrati oppure perclorati.

I termini "composti", "componenti" e "sali" comprendono anche espressamente singoli composti

oppure singoli sali.

Come si può intendere dal testo della presente invenzione, il termine "combinazione" nei paragrafi precedenti e in particolare nei paragrafi che seguono che descrivono varianti più specifiche e preferite della presente invenzione, deve venire inteso nel senso di riferirsi a

(i) un preparato in combinazione che contiene (a) almeno un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore e (b) almeno un composto organico in grado di legarsi ad una α l-glicoproteina acida (AGP); oppure sali farmaceuticamente accettabili di un qualsiasi componente (a), (b) oppure (a) e (b), se è presente almeno un gruppo che forma sale;

(ii) un metodo per trattare una malattia proliferativa che può venire trattata mediante somministrazione di un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore, in cui

(a) almeno un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore, e

(b) almeno un composto organico in grado di legarsi ad una α l-glicoproteina acida (AGP)

vengono somministrati ad un mammifero in combinazione in una quantità che congiuntamente è efficace dal punto di vista terapeutico contro una malattia proliferativa

309

che può venire trattata mediante somministrazione di un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore,

in cui qualsiasi componente (a) e/o (b) può essere

presente anche sotto forma di un sale farmaceuticamente accettabile, se è presente almeno un gruppo che forma sale;

(iii) un prodotto che contiene

(a) almeno un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore, e

(b) almeno un composto organico in grado di legarsi ad una α 1-glicoproteina acida (AGP);

in cui qualsiasi componente (a) e/o (b) può essere presente anche sotto forma di un sale farmaceuticamente accettabile, se è presente almeno un gruppo che forma sale,

in presenza oppure in assenza di una o più sostanze-veicolo farmaceuticamente accettabili, sotto forma di un preparato in combinazione per un impiego contemporaneo oppure distribuito nel tempo entro un periodo di tempo che è sufficientemente piccolo affinché i composti attivi sia del componente (a) che del componente (b) facciano aumentare l'attività antiproliferativa di un composto (a) contro cellule in fase di proliferazione, in particolare in un

paziente, per il trattamento di una malattia proliferativa che risponde ad un tale composto;

(iv) un preparato farmaceutico che comprende una quantità che in combinazione è efficace per trattare

una malattia proliferativa che può venire trattata mediante somministrazione di un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore, costituito da:

(a) almeno un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore, e

(b) almeno un composto organico in grado di legarsi ad una α 1-glicoproteina acida, in cui qualsiasi componente (a) e/o (b) può essere presente anche sotto forma di un sale farmaceuticamente accettabile, se è presente almeno un gruppo che forma sale, con una o più sostanze-veicolo farmaceuticamente accettabili; e/o

(v) l'impiego di una combinazione costituita da

(a) almeno un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore, e

(b) almeno un composto organico in grado di legarsi ad una α 1-glicoproteina acida,

in cui qualsiasi componente (a) e/o (b) può essere presente anche sotto forma di un sale farmaceuticamente accettabile, se è presente almeno un gruppo che forma



sale,

per la produzione di preparati farmaceutici da impiegare come composizioni contro una malattia proliferativa che può venire trattata mediante somministrazione di un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore;

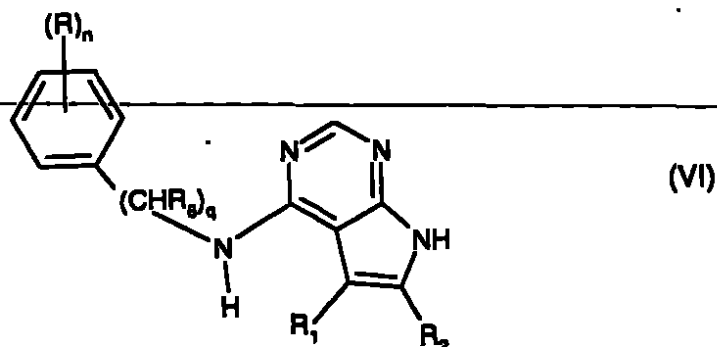
oppure qualsiasi combinazione di questi oggetti dell'invenzione, per quanto siano ammessi sotto le rispettive legislazioni sui brevetti; oppure le loro varianti più specifiche e preferite come riportate di seguito;

in cui qualsiasi componente (a) e/o (b) può essere presente anche sotto forma di un sale farmaceuticamente accettabile, se è presente almeno un gruppo che forma sale; se non definito altrimenti oppure se non è evidente altrimenti dal contesto.

Entro i seguenti gruppi di forme di realizzazione più preferite dell'invenzione, definizioni più generali possono venire sostituite con definizioni più specifiche secondo quelle indicate sopra oppure (in particolare per quel che riguarda la definizione di composizioni farmaceutiche e di metodi di impiego) di seguito.

Si preferisce una combinazione di (a) almeno un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore scelto da

(i) un composto di una 7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina di formula VI



in cui

q è 0 oppure 1,

n è compreso tra 1 e 3 quando q è 0, oppure n è compreso tra 0 e 3 quando q è 1,

R è alogeno, alchile inferiore, ossidrile, inferiore-alcanoilossi, alcossi inferiore, carbossi, inferiore-alcossicarbonile, carbammoile, N-inferiore-alchilcarbammoile, N,N-di-inferiore-alchilcarbammoile, il gruppo ciano, un gruppo amminico, inferiore-alcanoilamminico, inferiore-alchilamminico, N,N-di-inferiore-alchilamminico oppure trifluorometile, essendo possibile quando sono presenti nella molecola parecchi radicali R, che questi radicali siano identici oppure differenti;

a) R₁ e R₂, ciascuno indipendentemente dall'altro, indicano
 α) fenile sostituito con carbammoil-metossi,

carbossi-metossi, benzoilossicarbonil-metossi, inferiore-alcossicarbonil-metossi, fenile, ammino, inferiore-alcanoilammino, inferiore-alchilammino, N,N-di-inferiore-etilammino, ossidrile, inferiore-alcanoilossi, carbossile, inferiore-alcossicarbonile, carbammoile, N-inferiore-alchilcarbammoile, N,N-di-inferiore-alchilcarbammoile, gruppo ciano oppure con nitro-gruppo;

β) idrogeno;

γ) piridile non sostituito oppure alogeno oppure inferiore-alchil-sostituito;

δ) N-benzil-piridinio-2-ile; naftile; ciano; carbossile; inferiore-alcossicarbonile; carbammoile; N-inferiore-alchilcarbammoile; N,N-di-inferiore-alchilcarbammoile; N-benzilcarbammoile; formile; inferiore-alcanoile; inferiore-alchenile; inferiore-alchenilossi; oppure

ε) inferiore-alchile sostituito con

εα) alogeno, ammino, inferiore-alchilammino, piperazino, di-inferiore-alchilammino;

εβ) fenilammino che è non sostituito oppure è sostituito nella porzione fenile con alogeno, alchile inferiore, ossidrile, inferiore-alcanoilossi, inferiore-alcossi, carbossile, inferiore-alcossicarbonile, carbammoile, N-inferiore-alchilcarbammoile, N,N-di-inferiore-alchilcarbammoile, gruppo ciano, ammino,

314 3/6

inferiore-alcanoilammino, inferiore-alchilammino, N,N-di-inferiore-alchilammino oppure con trifluorometile, gy) ossidrile, alcossile inferiore, gruppo ciano, carbossile, inferiore-alcossicarbonile, carbammoile,

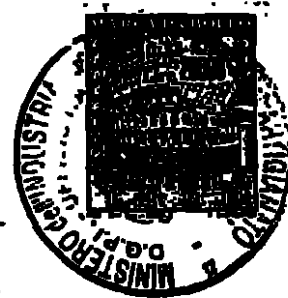
N-inferiore-alchilcarbammoile, N,N-di-inferiore-alchilcarbammoile, mercapto, oppure

sd) con un radicale di formula $R_3-S(O)_m$ in cui R_3 è alchile inferiore e m è 0, 1 oppure 2, oppure

b) quando q è 1, uno dei radicali R_1 e R_2 è alchile inferiore non sostituito oppure fenile non sostituito e gli altri radicali R_1 e R_2 hanno uno dei significati riportati sopra nel paragrafo a) ad eccezione di idrogeno, oppure

c) R_1 e R_2 insieme sono C_4-C_{10} -1,4-alcadienilene sostituito con ammino, inferiore-alcanoilammino, inferiore-alchilammino, N,N-di-inferiore-alchilammino, nitro, alogeno, ossidrile, inferiore-alcanoilossi, carbossile, inferiore-alcossicarbonile, carbammoile, N-inferiore-alchilcarbammoile, N,N-di-inferiore-alchilcarbammoile oppure con il gruppo ciano oppure sono aza-1,4-alcadienilene avente fino a 9 atomi di carbonio, oppure

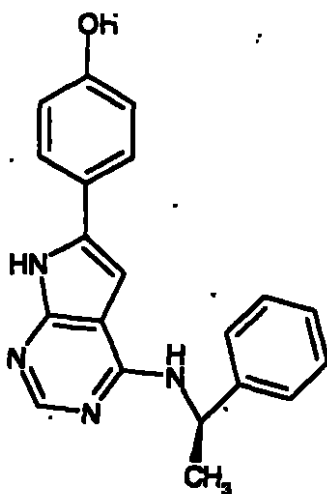
d) quando q è 1, R_1 e R_2 , ciascuno indipendentemente dall'altro, sono alchile inferiore non sostituito oppure fenile non sostituito oppure hanno uno dei



significati riportati sopra nel paragrafo a), e

R_6 è idrogeno, alchile inferiore, inferiore-alcossicarbonile, carbammoile, N-inferiore-alchilcarbammoile oppure N,N-di-inferiore-alchilcarbammoile,

oppure un suo sale (preferibilmente, le definizioni dei sostituenti riportati sopra hanno i significati, in particolare i significati preferiti, descritti nella Domanda di Brevetto Internazionale WO 97/02266, tra questi composti il più preferito è il composto di formula VII



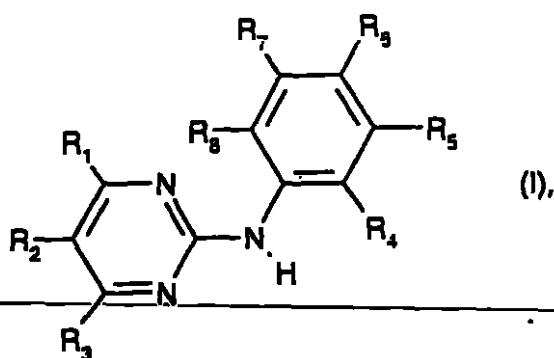
(VII),

avente la denominazione (R)-6-(4-idrossi-fenil)-4-[(1-feniletil)-ammino]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina),

e

(ii) un derivato di una N-fenil-2-pirimidina-ammina di formula I.

316 3/8



in cui

R_1 è 4-pirazinile, 1-metil-1H-pirrolile, fenile ammino- oppure ammino-inferiore-alchil-sostituito, in cui il gruppo amminico in ciascun caso è libero, alchilato oppure acilato, 1H-indolile oppure 1H-imidazolile legato in corrispondenza di un atomo di carbonio dell'anello a cinque membri, oppure piridile non sostituito oppure inferiore-alchil-sostituito legato in corrispondenza di un atomo di carbonio dell'anello e non sostituito oppure sostituito in corrispondenza dell'atomo di azoto con ossigeno, R_2 e R_3 , ciascuno indipendentemente dall'altro, sono idrogeno oppure alchile inferiore, uno oppure due dei radicali R_4 , R_5 , R_6 , R_7 e R_8 sono ciascuno il nitro-gruppo, inferiore-alcossi fluoro-sostituito oppure un radicale di formula II



in cui

R_9 è idrogeno oppure alchile inferiore,

317 3/9

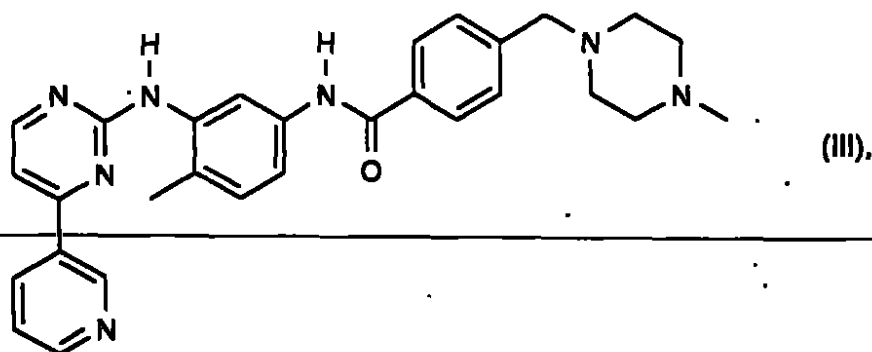
X è un osso-gruppo, un tio-gruppo, immino, N-inferiore-alchil-immino, idrossiimmino oppure O-inferiore-alchil-idrossiimmino,

Y è ossigeno oppure è il gruppo NH,

n è 0 oppure 1 e

R₁₀ è un radicale alifatico avente almeno 5 atomi di carbonio, oppure un radicale aromatico, aromatico-alifatico, cicloalifatico, cicloalifatico-alifatico, eterociclico oppure eterociclico-alifatico e gli altri radicali R₄, R₅, R₆, R₇ e R₈, ciascuno indipendentemente dall'altro, sono idrogeno, alchile inferiore che è non sostituito oppure è sostituito con un gruppo amminico libero oppure alchilato, con piperazinile, piperidinile, pirrolidinile oppure con morfolinile oppure sono alcanole inferiori, trifluorometile, ossidrile libero, eterificato oppure esterificato, il gruppo amminico libero, alchilato oppure acilato oppure carbossile libero oppure esterificato, oppure

un sale di tali composti che hanno almeno un gruppo che forma sale (preferibilmente, le definizioni dei sostituenti riportate sopra hanno i significati, in particolare i significati preferiti descritti nella Domanda di Brevetto Europeo EP 0.564.409. Tra questi composti il più preferito è il composto di formula III

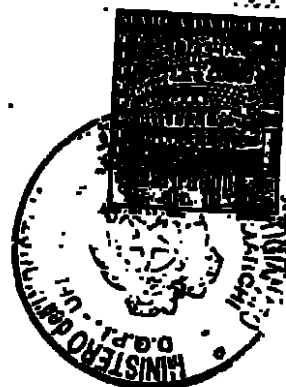


con la denominazione 4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il)pirimidin-2-ilammino]fenil]benzammide, preferibilmente nella forma del sale metansolfonato come descritto in WO 99/03854, più preferibilmente nella forma del sale metansolfonato nella forma di cristalli β come descritto in WO 99/03854),

con (b) almeno un (preferibilmente un) composto organico in grado di legarsi ad una α -glicoproteina acida (AGP) scelto dal gruppo costituito da:

Nicergolina, Prazosin, Alfentanil, Ketamine, Ethidocaine, Fentanil, Meperidina, Metadone, Fenilbutazone, Bupivacaine, Etidocaina, Fenciclidina, Lidocaina, Fenciclidina, Aprindina, Disopiramide, Chinidina, Verapamil, Eritromicina, Acenocoumarol, Dipyridamole, PCR2362, Ticlopidine, Warfarin, Phenytoin, Carbamazepine, Naproxen, Alprenolol, Metoprolol, Oxprenolol, Pindolol, Propranolol, Timolol, Progesterone, Testosterone,

319 321



Estradiolo, Prednisolone, Metocurina, d-Tubocurarina, Amitriptilina, Cloropromazina, Cyclazindol, Desmethylimipramine, Diazepam, Doxepine, Flurazepam, Fluphenazine, Haloperidol, Imipramine, Loxapine,

Mianserin, Nortriptyline, Norzimelidine, Perazine, Perphenazine, Phenobarbital, Derivati della Fenotiazina, Promazine, Acepromazine, Protipendyl, Thioridazine, Thiothixene, Triazolam, Trifluoperazine, Zimelidine, Vitamina B₁₂, Acido Folico, DAPN, 1,8-Anilino-naftalensolfonato, Aminopyrine, Amoxapine, Bupropion, Maprolitine, Nomifensine, Trazodone, Ritodrine, Doxazosin, Trimazosin, Binedalin, Amsacrine, Apazone, SKF 525A, Ciclazindol, PCR 2362, Indometacina, Probenecid, Acido Retinoico, Solfinpirazone, Tolmetin, Benoxaprofen, Eparina, Sufentanil, Lofentanil, Metoclopramide, Nicardipine, Pirmenol, Mifepristone, RU 42 633, Aprindil, Auramine O, Bepridil, Desipramine, Desmethyldomipramine, Moxaprine, Chinina, Lorcainide, Prothipendyl, Protriptyline, Trihexyphenidyl, Biperiden, Methaqualone, Diphenhydramine, Glutethimide, Chlordiazepoxid, L-Triptofano, Mepivacaine, Levomethadone, Opipramol, Trifluopromazine, Trimipramine, Tris-butossietil-fosfato, Staurosporina, N-benzoil-staurosporina e 7-idrossi-staurosporina;

e anche un metabolita di uno qualsiasi di questi composti;

in cui qualsiasi componente (a) e/o (b) può essere presente preferibilmente nella forma libera oppure nella forma di un sale farmaceuticamente accettabile, se è presente almeno un gruppo che forma sale.

Più preferita è una combinazione di (a) almeno un, preferibilmente un, inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Riceettore e/o del Kit-riceettore scelto dal gruppo costituito da 1-(4-cloro-anilino)-4-(4-piridil-metil)-ftalazina, (R)-6-(4-idrossi-fenil)-4-[(1-feniletil)-ammino]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina e preferibilmente 4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il)pirimidin-2-ilammino]fenil]-benzammide; oppure un sale farmaceuticamente accettabile di uno o più di questi composti; più preferibilmente il sale metansolfonato della 4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il)pirimidin-2-ilammino]fenil]benzammide, più preferibilmente nella forma di cristalli β ; e

(b) almeno un, preferibilmente un, composto in grado di legarsi ad una α 1-glicoproteina acida che è preferibilmente un antibiotico, in particolare eritromicina, oppure staurosporina oppure un derivato della staurosporina, in particolare N-benzoil-staurosporina oppure 7-idrossi-staurosporina, oppure

un loro sale farmaceuticamente accettabile, più in particolare eritromicina, oppure un suo sale farmaceuticamente accettabile.

Nel modo più preferibile, in tutte le forme di realizzazione citate sopra, la malattia da trattare è una malattia cancerosa, in particolare una leucemia oppure un tumore solido, preferibilmente una malattia scelta dal gruppo costituito da CML (leucemia mieloide cronica) e ALL (leucemia linfoblastica acuta), oppure un tumore solido, in particolare scelto tra cancro del polmone, in particolare cancro del polmone a cellule non piccole, e cancro della prostata.

Preferibilmente, si usa una combinazione secondo la presente invenzione nel trattamento di un animale a sangue caldo, in particolare un essere umano che soffre di una malattia proliferativa che (in modo particolare è dovuta a livelli di AGP più elevati rispetto ai livelli normali) è resistente nei confronti di un tale trattamento oppure durante il trattamento con un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore sta diventando oppure è diventato completamente oppure parzialmente resistente nei confronti di tale trattamento per esempio animali a sangue caldo che rappresentano un gruppo speciale di individui da sperimentare "probandi".

In un'altra forma di realizzazione preferita della presente invenzione, si usa la combinazione nel caso di un animale a sangue caldo, in particolare l'uomo, allo scopo di evitare già dal punto di vista

profilattico la comparsa di una resistenza parziale oppure completa durante il trattamento di una malattia proliferativa con un inibitore della abl-tirosin-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore.

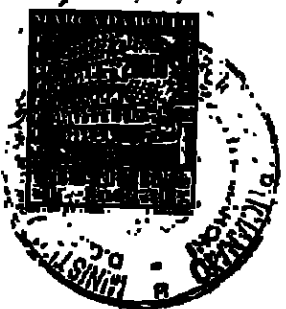
Composizioni (= Preparazioni) Farmaceutiche e Procedimenti

Nel caso in cui, qui di seguito, venga indicato "componente (a) e/o (b)", con questa espressione si intende indicare uno qualsiasi o più dei composti definiti sopra come componente (a) e come componente (b), come tale, oppure un sale farmaceuticamente accettabile di uno o più dei rispettivi componenti.

Le composizioni farmaceutiche che possono venire impiegate in una combinazione secondo l'invenzione comprendono uno o più dei componenti (a) e (b) aventi le proprietà secondo l'invenzione, come ingrediente attivo, che può venire usato da solo (per esempio sotto forma di combinazione fissata) oppure può venire usato sotto forma di un kit di parti. Particolarmente preferite sono composizioni per somministrazione enterale, in particolare orale oppure parenterale. Le composizioni comprendono il componente (a) e il

componente (b), oppure loro combinazioni come tali oppure, preferibilmente, insieme con una sostanza-veicolo farmaceuticamente accettabile. La dose di qualsiasi ingrediente attivo dipende dalla malattia che deve venire trattata e dalla specie, dall'età, dal peso e dalle condizioni dell'individuo e anche dal metodo di somministrazione.

Si preferisce una composizione farmaceutica oppure una combinazione di composizioni farmaceutiche che sia adatta per la somministrazione ad un animale a sangue caldo, in particolare all'uomo, che presenta una qualsiasi delle malattie qui citate; preferibilmente, significa qualsiasi malattia che risponda ad un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore; in particolare significa una malattia proliferativa scelta da un cancro, in particolare un tumore oppure leucemia, oppure una malattia proliferativa non-maligna, per esempio, aterosclerosi, trombosi, psoriasi, sclerodermite oppure fibrosi; più preferibilmente, significa una malattia scelta dal gruppo costituito da CML (leucemia mieloide cronica) e ALL (leucemia linfoblastica acuta), oppure un tumore solido, in particolare scelto da cancro dei polmoni, in particolare cancro dei polmoni con cellule non-piccole, e da cancro della prostata; nel



modo più preferibile, significa una qualsiasi delle malattie or ora citate che è diventata resistente oppure sta diventando resistente ad un trattamento effettuato con uno o più degli inibitori della tirosina-chinasi citati sopra, oppure che era resistente a tale trattamento prima del trattamento con uno qualsiasi di tali inibitori della tirosina-chinasi, in particolare a causa delle più elevate concentrazioni di AGP presenti nel plasma del sangue dell'individuo da trattare.

Le composizioni farmaceutiche contengono da circa 0,0001% fino a circa 95% di un qualsiasi componente (a) e/o (b), comprendono forme di dosaggio che sono costituite da una singola dose, preferibilmente contenente da circa 10% fino a circa 90% di un componente (a) oppure (b), e forme di dosaggio che non sono presenti sotto forma di una singola dose, che contengono preferibilmente da circa 10% fino a circa 60% di ciascun componente. Forme di dosaggio unitarie, per esempio confetti, compresse, fiale oppure capsule, contengono da circa 5 mg fino a circa 1,5 g di componente (a) e/o di componente (b), preferibilmente da 5 mg fino a circa 1 g.

Si preparano le composizioni farmaceutiche in modo di per sé noto, per esempio adottando metodi

325 3/2

tradizionali come miscelazione, granulazione, preparazione di formulazioni, dissoluzione oppure liofilizzazione. Per esempio, si possono ottenere composizioni farmaceutiche per somministrazione orale combinando il componente

(a) e/o (b) con una o più sostanze-veicolo solide oppure liquide, in cui è necessario granulare la miscela ottenuta e lavorare la miscela dei granuli, se si desidera, oppure se è opportuno, con aggiunta di ulteriori eccipienti, per ottenere, rispettivamente, cuori di compresse oppure cuori di confetti, oppure soluzioni.

Adatte sostanze-veicolo sono in particolare cariche, per esempio zuccheri, come lattosio, saccarosio, mannitolo oppure sorbitolo, preparati a base di cellulosa e/o fosfati di calcio, per esempio fosfato tricalcico oppure fosfato acido di calcio, e leganti, per esempio amidi, come amido di mais, di frumento, di riso oppure di patate, metilcellulosa, idrossipropilmetilcellulosa, sodio carbossimetilcellulosa e/o polivinilpirrolidone, e/o, se si desidera, disaggreganti, per esempio di amidi indicati sopra, e inoltre carbossimetil-amido, polivinilpirrolidone reticolato oppure acido alginico oppure un suo sale, per esempio alginato di sodio. Ulteriori eccipienti sono, in particolare, sostanze che favoriscono lo

scorrimento e lubrificanti, per esempio acido silicico, talco, acido stearico oppure loro sali, per esempio stearato di magnesio oppure stearato di calcio, e/o polietilenglicol, oppure loro derivati.

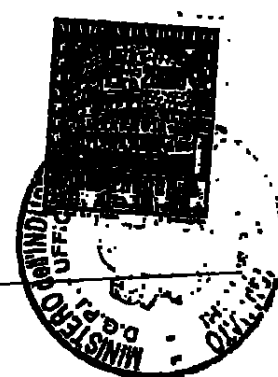
Si possono preparare cuori (parti interne) di confetti usando adatti rivestimenti, eventualmente rivestimenti enterici, tra gli altri, soluzioni di zucchero concentrate che possono contenere gomma arabica, talco, polivinilpirrolidone, polietilenglicol e/o biossido di titanio, oppure soluzioni di rivestimento in adatti solventi organici oppure in adatte miscele di solventi organici, oppure, per la preparazione di rivestimenti enterici, soluzioni di adatti preparati della cellulosa, per esempio, acetilcellulosa ftalato oppure idrossipropilmetilcellulosa ftalato. Si possono aggiungere coloranti oppure pigmenti ai rivestimenti di compresse o ai rivestimenti di confetti, per esempio, a scopo di identificazione oppure per indicare differenti dosi di sostanza attiva.

Composizioni farmaceutiche somministrabili per via orale sono inoltre capsule riempite a secco costituite da gelatina, e inoltre capsule sigillate morbide costituite da gelatina e da un plastificante, per esempio glicerolo oppure sorbitolo. Le capsule

324 329

contenenti una carica secca possono contenere un componente (a) e/o (b) sotto forma di granuli, per esempio, in miscela con cariche, come amido di mais, leganti e/o sostanze che conferiscono scorrevolezza, come talco oppure stearato di magnesio e, se opportuno, stabilizzanti (vedi sopra per "adatte sostanze-veicolo"). Nel caso di capsule morbide, la sostanza attiva, preferibilmente, viene sciolta oppure viene posta in sospensione in adatti eccipienti liquidi, per esempio, olii grassi, [•]Lauroglycol (Gattefossé S.A., Saint Priest, Francia), [•]Gelucire Gattefossé S.A., Saint Priest, Francia) oppure olio di sesamo, olio di paraffina oppure polietilenglicoli liquidi, per esempio PEG 300 oppure PEG 400 (Fluka, Svizzera), oppure polipropilenglicoli, a ciascuno dei quali si possono anche aggiungere stabilizzanti oppure detergenti, oppure in acqua che contiene inoltre sostanze-veicolo solubili come indicate sopra, per esempio, metilcellulosa oppure mannitolo.

Altre forme orali di somministrazione sono, per esempio, soluzioni oppure sciroppi, preparati in modo usuale, che contengono componente (a) e/o (b) per esempio sotto forma di una sospensione e in una concentrazione di circa 0,001% fino a 20%, preferibilmente di circa 0,001% fino a circa 2%, oppure in una



328 3/2

concentrazione simile che mette a disposizione una adatta dose singola quando viene somministrata, per esempio, in quantità di 0,5 ml fino a 10 ml. Inoltre, per esempio, sono adatti concentrati sotto forma di polveri oppure concentrati liquidi per preparare frullati, per esempio, nel latte. Tali concentrati possono anche venire confezionati in quantità che costituiscono dosi singole.

Sono possibili Sistemi di Cessione Transdermica, in particolare con sostanze attive neutre. Tra le formulazioni adatte sono comprese, per esempio, circa 0,0001% fino a circa 2% in peso di componente (a) e/o (b). In un aspetto preferito, vengono realizzate formulazioni che contengono circa 2% fino a 99,9999% (ossia il complemento a 100%) di un alcool alifatico a catena corta. Tra gli alcoli adatti sono compresi etanolo, isopropanolo, propilenglicol e glicerolo. In un aspetto più preferito, queste formulazioni, inoltre, possono contenere una sostanza che favorisce lo scorrimento. Tra le sostanze che favoriscono lo scorrimento adatte sono comprese, per esempio, decilmetilsolfossido, dimetilsolfossido e anche chetoni ciclici, lattoni, anidridi ed esteri. Alcune di queste sostanze che favoriscono lo scorrimento, inoltre, fanno aumentare la ritenzione del componente (a) e/o

(b) e, così, agiscono nel senso di fare aumentare la concentrazione di esso nella pelle. Nel caso di formulazioni per un trattamento diretto (locale), per esempio un'applicazione topica alla pelle, si preferisce usare una sostanza che favorisce lo scorrimento che non renda massimo il flusso transdermico, ma che faccia aumentare la ritenzione del componente (a) e/o (b) nella pelle. E' stato descritto che alcune sostanze che favoriscono il miglioramento costituite da chetoni ciclici e da lattoni ciclici fanno aumentare anche la ritenzione locale e, così, esse costituiscono una classe preferita di sostanze che conferiscono proprietà migliorate per una applicazione topica del componente (a) e/o (b). In formulazioni per un trattamento sistemico, è preferibile usare una sostanza che favorisce lo scorrimento che rende massimo il flusso con una minima ritenzione locale della sostanza attiva.

Adatte composizioni farmaceutiche somministrabili per via rettale sono per esempio supposte che sono costituite da una combinazione della sostanza attiva con una base per supposte. Adatte basi per supposte sono per esempio trigliceridi naturali oppure sintetici, idrocarburi paraffinici, polietilenglicoli oppure alcanoli superiori.

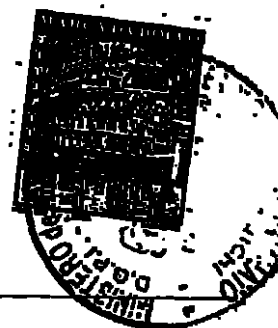
Per una somministrazione parenterale sono adatte, in particolare, soluzioni acquose di un ingrediente attivo in una forma solubile in acqua, per esempio sotto forma di un sale solubile in acqua, in presenza ~~oppure in assenza di sali~~, per esempio cloruro di sodio e/o alcoli zuccheri, per esempio mannitolo, oppure sospensioni acquose iniettabili che contengono sostanze che fanno aumentare la viscosità, per esempio, sodio carbossimetilcellulosa, sorbitolo e/o destrano, e, se opportuno, agenti stabilizzanti. Il componente (a) e/o (b), se opportuno insieme con eccipienti, può anche essere sotto forma di un liofilizzato e può venire sciolto prima di effettuare una somministrazione parenterale mediante l'aggiunta di adatti solventi.

Le soluzioni usate per esempio per una somministrazione parenterale, possono anche venire usate sotto forma di soluzioni per infusione.

Formulazioni preferite che contengono qualsiasi componente (b) sono quelle che sono usuali per il rispettivo uso clinico di uno qualsiasi o più agenti appartenenti a quel gruppo di composti che sono noti nel settore.

Formulazioni preferite per il componente (a) sono quelle indicate negli esempi.

L'invenzione riguarda inoltre un metodo per il trattamento degli stati patologici indicati sopra. Per questo scopo, nelle combinazioni qui precedentemente descritte, uno qualsiasi del componente (a) e/o (b), oppure un suo sale farmaceuticamente accettabile, può venire somministrato, come profilassi, oppure come terapia, preferibilmente, in una quantità che sia efficace contro le malattie citate, ad un animale a sangue caldo, per esempio uomo, che richieda tale trattamento, preferibilmente sotto forma di una composizione farmaceutica. Il dosaggio di un qualsiasi componente (a) e/o (b) dipende dalla specie di animale a sangue caldo da trattare, dal suo peso corporeo, dalla sua età e dal suo singolo stato, dalle singole condizioni farmacocinetiche, dalla malattia che deve venire trattata e dalla via di somministrazione. Preferibilmente, nel caso di un peso corporeo di circa 70 kg, si somministra una dose giornaliera compresa tra 10 mg e 2500 mg, più preferibilmente compresa tra circa 50 mg e circa 2000 mg, nel modo più preferibile compresa tra circa 100 mg e circa 1500 mg, di uno qualsiasi dei componenti (a) e/o (b). Ai bambini viene somministrata una dose corrispondentemente più bassa, con riferimento alla loro area superficiale della pelle (l'area



superficiale della pelle di un adulto di 70 kg come riferimento è 1,73 m²).

La presente invenzione può venire illustrata dagli esempi che seguono che non devono venire intesi nel senso di limitare l'ambito della presente invenzione, ma che servono semplicemente come forme di realizzazione esemplificative.

Esempi:

Introduzione

Il gene di fusione oncogeno BCR/ABL codifica per la proteina ibrida bcr/abl che, a causa della sua attività di tirosina-chinasi aumentata ed essenziale, provoca tre differenti malattie: Leucemia Mieloide Cronica (CML), parte di Leucemia Linfoblastica Acuta (ALL) e Leucemia Mieloide Acuta (AML).

Il blocco della attività di bcr/abl-chinasi rappresenta una strategia nuova e razionale per il trattamento di CML, e di altri tipi di cancro provocati da questa proteina di fusione oncogeno (Druker. B. J., et al.: Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. Nat. Med. 2: 561-6, 1996).

STI571 (precedentemente noto come CGP57148) rappresenta un inibitore attivo e relativamente specifico dell'attività di bcr/abl-chinasi. STI571

blocca la proliferazione e provoca apoptosi in cellule BCR/ABL+ in vitro; esso inibisce la crescita di cellule del midollo osseo clonogenici ottenute da pazienti CML, e può eliminare la crescita di cellule leucemiche in vivo. L'attività di STI571 in vivo è condizionata dall'ottenimento di una inibizione bcr/abl stabile e continua, che richiede somministrazioni giornaliere multiple nel modello che è stato studiato su topi (le Coutre et al., J. Natl. Cancer Inst. 91, 163-168 (1999)).

Sulla base di questa informazione e di ulteriori informazioni, il STI571 viene ora esaminato in prove cliniche iniziali in CML e in altre malattie associate con BCR/ABL. E' reperibile un'informazione molto limitata per ciò che riguarda la possibile manifestazione di resistenza nei confronti di STI571. Si sono selezionate in vitro due linee di cellule per ciò che riguarda la resistenza a STI571 (le Coutre P., et al., Blood 90.496a, 1997). Il meccanismo di resistenza non è noto, in un caso, mentre, nel secondo caso, esso comporta una amplificazione BCR/ABL e una sovraespressione di proteine. La rilevanza biologica di queste sottolinee scelte in vitro, tuttavia, rimane da verificare, poichè le condizioni di selezione in vitro sono differenti e, usualmente, sono più

drastiche rispetto a quelle selezionate in vivo.

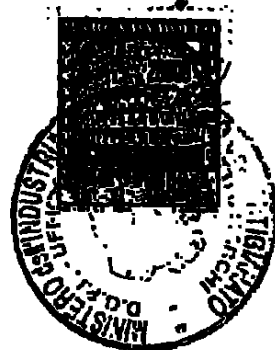
Non è reperibile alcuna informazione riguardante lo sviluppo e la caratterizzazione di una resistenza in vivo nei confronti di STI571. In un modello su ~~tepo precedentemente descritto dalla Richiedente (le~~ Coutre P., et al., J. Natl. Cancer Inst. 91, 163-168 (1999) in alcuni animali si è notata una carenza del trattamento, quando questo trattamento è stato ritardato di una settimana dopo l'iniezione di cellule leucemiche, ed era già presente una massa misurabile. Pertanto, tale modello potrebbe essere utile per studiare e caratterizzare la possibile manifestazione di una resistenza nei confronti di STI571 in vivo.

In questo caso viene dimostrato un modello per la resistenza in vivo nei confronti di STI571. Inoltre, viene identificata e convalidata sperimentalmente la caratterizzazione molecolare di tale modello e anche la strategia per superare il manifestarsi di una resistenza.

PRODOTTI E METODI

STI571:

STI571 (precedentemente noto come CGP57148B) viene ottenuto come descritto in EP 0.564.409 e in WO 99/03854. Per gli esperimenti in vitro, si preparano soluzioni-madre di questo composto a concentrazioni



di 1 mM e di 10 mM, che vengono filtrate e conservate a -20°C e quindi vengono scongelate prima di fare iniziare l'esperimento e vengono usate ad una concentrazione di 0,1-10 µM. Le preparazioni usate per animali da esperimento vengono preparate giornalmente ad una concentrazione di 16 mg/ml e vengono sciolte in acqua oppure in una soluzione di metilcellulosa al 5% (Methocell, Fluka) e vengono mantenute a 4°C.

ERITROMICINA

Per esperimenti in vitro si usa eritromicina base (Sigma). Si prepara una nuova soluzione-madre appena prima di ciascun esperimento ad una concentrazione di 20 mM e la si impiega ad una concentrazione di 1-100 µM. Si scioglie la eritromicina in etanolo e la si diluisce ulteriormente con acqua distillata. Nel caso di esperimenti in vivo, si impiega eritromicina estolato (gentilmente fornito dalla Gist-Brocades Italy SPA, Capua, Italia) ad una concentrazione di 35 mg/ml, in una soluzione di metilcellulosa al 5% e di STI571 16 mg/ml.

SOMMINISTRAZIONE IN VIVO DI STI571

Topi nu/nu CD1 femmine aventi un'età di 7 fino a 9 settimane, acquistati presso la Charles River Breeding Laboratories (Calco, Italia) vengono mantenuti in

condizioni di laboratorio standard secondo le linee-guida dell'Istituto Nazionale del Cancro, Milano, Italia. Questo studio è approvato dal comitato di etica istituzionale per animali da laboratorio usati in ricerche sperimentali. Si inietta una linea di cellule positive bcr/abl KU812 (50×10^6 cellule per ogni animale) per via sottocutanea nel fianco sinistro dell'animale. Si effettua un trattamento per via orale usando una siringa collegata ad un tubo di materia plastica flessibile introdotto in esofago (sonda). Ogni 3-4 giorni si controllano il peso del tumore (TW) e il peso totale. Si calcola il TW per mezzo della formula $TW (mg) = (d^2 \times D)$, in cui d e D sono, rispettivamente, il diametro più corto e il diametro più lungo del tumore, misurati in millimetri. Si fa iniziare il trattamento 1-11 giorni dopo l'iniezione contro la leucemia.

LINEE DI CELLULE

Si impiega la linea di cellule KU812 della leucemia umana positiva Bcr/Abl (vedere Kishi K. A new leukemia cell line with Philadelphia chromosome characterized as basophil precursors. Leuk Res 9: 381-90, 1985). La linea KU812 è stata ottenuta da un paziente CML in crisi da blastomi, e viene mantenuta in RPMI 1640 (Bio Whittaker Europe) integrato con siero di feto di

vitello (FCS) al 10% in condizioni di coltura delle cellule standard.

La linea di cellule KU812 è reperibile presso Deutsche Sammlung für Mikroorganismen e Zellkulturen (DSMZ), Mascheroder Weg, Braunschweig, Germania e ha il numero di accesso DSMZ No: ACC 378.

Altre linee di cellule analoghe che possono venire usate nelle prove descritte qui di seguito sono:

Linea di Cellule: BV-173 (Tipo di Cellula: leucemia dei precursori di cellule B umana) DSMZ No: ACC 20;

Linea di Cellule: K-562 (Tipo di Cellula: leucemia mieloide cronica umana in crisi da blastomi) DSMZ No: ACC 10;

Linea di Cellule: LAMA-84 (Tipo di Cellula: leucemia mieloide cronica umana in crisi da blastomi) DSMZ No: ACC 168;

Linea di Cellule: EM-3 (Tipo di Cellula: leucemia mieloide cronica umana in crisi da blastomi) DSMZ No: ACC 134;

Linea di Cellule: MEG-01 (Tipo di Cellula: leucemia mieloide cronica umana in crisi da blastomi megacariocitici) DSMZ No: ACC 364; oppure

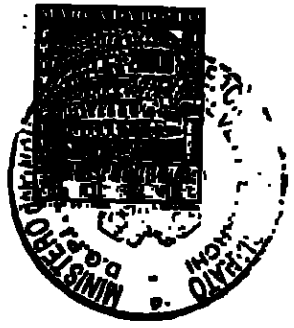
Linea di Cellule: NALM-1 (Tipo di Cellula: leucemia mieloide cronica umana in crisi da blastomi) DSMZ No: ACC 131.

DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' DI PROLIFERAZIONE IN
VITRO (SAGGIO DI ASSORBIMENTO DI TIMIDINA TRITIATA
[³HtdR]

Si seminano 200 µl di ciascuna linea di cellule (KU 812, LAMA 84), contenente 104 cellule, a diverse concentrazioni di STI571; comprese tra 0 e 10 µM in piastre per microtitolazione da 96 pozzetti (Corning Costar Corp., Cambridge, MA) effettuando 6 replicazioni. Dopo 54 ore a 37°C, in ciascun pozzetto si introducono 20 µl di RPMI 1640/FCS 10% contenente timidina tritiata (1 µCi/pozzetto). Dopo ulteriori 18 ore, le cellule sono state raccolte e trasferite su un filtro (Spot-on filtermat, Pharmacia Biotech Europe, Brussels, Belgio). L'assorbimento di timidina tritiata viene determinato mediante un contatore di scintillazione di liquidi 1205 betaplate (Wallac Inc., Turku, Finlandia). Il valore CI50 (concentrazione di inibizione 50) è definito come la concentrazione di un composto che provoca una diminuzione 50% della proliferazione in confronto con controlli non trattati.

ANALISI WESTERN BLOT

Si effettua l'analisi "immunoblotting" come precedentemente descritto (Gambacorti-Passerini, C., et al., Blood Cells, Molecules, and Diseases 23,



380-94, 1997). Si lavano le cellule con soluzione salina tamponata con fosfato, fredda (PBS) e quindi si sottopongono a lisi in 200 μ l di tampone di 1X Laemmli (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, SDS 2%, blu di bromofenolo 0,1%, glicerolo 10%, β -mercaptoetanololo 5%).

Lisati di cellule, corrispondenti a 90.000-150.000 cellule, vengono fatti bollire a 95°C per 10 minuti, vengono sottoposti ad ultrasuoni per 1 minuto e vengono analizzati mediante elettroforesi su gel SDS usando gel di poliacrilammidi 7,5%. Si rivelano bcr-abl endogena, bcr-abl tirosina-forforilata e actina endogena con il corrispondente anticorpo monoclonale di topo oppure antisiero di coniglio e, quindi, si effettua la visualizzazione mediante rivelazione con chemiluminescenza aumentata (ECL, Amersham Corp.) usando immunoglobulina G anti-topo oppure anti-coniglio di capra legata a perossidasi di rafano come anticorpo secondario (Amersham Corp.). L'anticorpo anti-abl monoclonale (clone Ab-3) viene acquistato da Calbiochem. L'anticorpo anti-fosfotirosina monoclonale (clone 4G10) viene acquistato da Upstate Biotechnology. La anti-actina policlonale di coniglio viene acquistata da Sigma. Si effettua un'analisi densitometrica usando un fotodensitometro Eagle Eye 11 (Stratagene) e le intensità di bande di bcr-abl tirosina-fosforilate

vengono normalizzate contro i livelli di espressione di bcr-abl e di actina.

DETERMINAZIONE DI AGP

Livelli di siero di glicoproteina acida ~~alfa-1~~ (AGP) vengono rivelati mediante il metodo di immunodiffusione oppure mediante il metodo di isoelettrofocalizzazione. Per la immunodiffusione, si introducono 5,0 µl di ciascun campione in un pozzetto di una piastra di agar (SRID, saggio su piastra di immunodiffusione radiale singola, Cardiotech Services JINIC Louisville, 1KY, USA) che contiene antisiero AGP. La piastra viene sottoposta ad incubazione per 24 ore a 37°C. La quantità specifica di AGP all'interno del campione viene misurata sulla base delle dimensioni dell'anello di precipitina e viene determinata mediante confronto con standard a 1000, 250 e 125 µg/ml, forniti con ciascun kit di prova. Si effettuano le determinazioni in doppio. Per la isoelettrofocalizzazione, un IPG (gradiente a pH immobilizzato) (Gianazza, E., Celentano, F., Ettori, C., Righetti, P. G., Immobilized pH gradients: Theory and methodology. Electrophoresis 1989, 10, 806-808) nell'intervallo pH 2,5-5 viene colato tra una soluzione acida contenente Immobilina pK 1,3 mM, pK 3,6, 11,83 mM, pK 9,3, 0,76 mM, e 12,9 mM Tris, e una

soluzione basica contenente Immobilina pK 3,6, 9,28 mM, pK 4,6, 9,50 mM, e pK 9,3, 16,13 mM (Amersham Pharmacia, Uppsala, Svezia). Dopo polimerizzazione, il gel viene lavato 3 volte in glicerolo 1%, viene essiccato e nuovamente idratato in urea 8M - 0,5% di anfoliti-veicolo, intervallo di pH 2,5-5 (Pharmacia). Successivamente, in prossimità del catodo si pongono porzioni di siero da 7,5 µl, diluite fino a 25 µl con 2-mercaptoetanololo al 2%. Dopo una prova notturna a 55 V/cm, i campioni vengono focalizzati per 90 minuti a 165 V/cm. Il diagramma delle proteine viene colorato con Coomassie.

VALUTAZIONE DEI PARAMETRI DI LEGAME

Plasma oppure AGP umano purificato (Sigma) oppure Albumina (diluita in PBS) vengono sottoposti a incubazione a diverse concentrazioni di STI571 a temperatura ambiente per 30 minuti. Si determinano le concentrazioni di STI571 mediante HPLC, con un limite inferiore di rivelazione di 0,1 µM. Si determina STI571 libero mediante ultrafiltrazione con una soglia di separazione a 30 KD. Si costruiscono diagrammi Scatchard modificati. Si calcola la Costante di Associazione (Ka) come precedentemente descritto (Fuse, E., Tani, H., Kurata, N., et al., Cancer Res., 58, 3248-53, 1998).

342 384

ANALISI STATISTICA

Si effettua un'analisi statistica secondo Fisher exact test oppure T Student usando il programma Prism: Per l'analisi di sopravvivenza, si confrontano i dati effettuando il saggio logrank. I valori P inferiori a 0,05, sono considerati statisticamente significativi e vengono ottenuti da prove statistiche su due lati.

Esempio 1: L'efficacia di STI571 è in relazione con il carico tumorale iniziale

Topi "nude" vengono iniettati per via sottocutanea con 50 milioni di cellule KU812. Si fa iniziare il trattamento dopo, rispettivamente, 1, 8 e 15 giorni (gruppi I fino a III), in presenza di circa 50 milioni, 300 milioni e 1 bilione di cellule leucemiche. Sebbene in tutti i gruppi si osservi una regressione del tumore, si ottengono effetti di guarigione soltanto nei primi 2 gruppi. La Figura 1 A mostra i risultati di un esperimento rappresentativo. Mentre tutti gli animali presenti nel gruppo I vengono fatti guarire in modo riproducibile, i topi del gruppo II sviluppano ricadute in misura compresa tra 33% e 40%; non si osserva alcuna guarigione nei topi del gruppo III. Le ricadute, usualmente, avvengono da 1 a 3 settimane dopo l'interruzione del trattamento. La

343 3/5



Figura 1 B presenta i risultati combinati ottenuti da 3 differenti esperimenti. E' evidente una chiara relazione tra la quantità di tumore presente all'inizio del trattamento e il risultato della terapia. Una possibile spiegazione di questi risultati potrebbe consistere nell'insufficiente durata della somministrazione di STI571 nei topi del gruppo II e del gruppo III. Per convalidare questa ipotesi, si trattano topi del gruppo II per 11 giorni oppure per 18 giorni. Il risultato di un esperimento esemplificativo viene riportato nella Figura 1 C e indica che un aumento della durata del trattamento non fa migliorare il grado di guarigione. Questi risultati indicano che, in questo modello, il trattamento con STI571 può fare guarire gli animali soltanto se il tumore viene asportato nei primi 11 giorni di trattamento. Se ciò non avviene, non si può ottenere la guarigione anche con un'esposizione prolungata al composto. In altre parole: E' comparso un certo tipo di resistenza.

Esempio 2: Tumori che si manifestano in fase di ricaduta mostrano resistenza in vivo, ma conservano la sensibilità in vitro a STI571

Animali che presentano tumori ricorrenti vengono trattati nuovamente adottando il medesimo modello

STI571 (11 giorni di regime). Il trattamento viene fatto iniziare appena i tumori anche in questo caso diventano misurabili. La Figura 2 mostra un esperimento esemplificativo. E' evidente che i tumori

comparsi in fase di ricaduta rispondono in modo scarso al nuovo trattamento, ed eventualmente iniziano a crescere in modo simile a quello secondo il quale crescono tumori in animali non trattati (linee tratteggiate). Sebbene le cellule leucemiche siano resistenti in vivo a STI571, la loro sensibilità intrinseca nei confronti di STI571 non è nota. Per esaminare questo risultato, si recidono tumori dai rimanenti animali, si ottengono sospensioni di cellule e si pongono le cellule in coltura e si esaminano per la loro sensibilità in vitro nei confronti di STI571 entro 24-48 ore, come precedentemente descritto (le Coutre P., et al., J. Natl. Cancer Inst. 91, 163-168 (1999)). La Figura 3 presenta i risultati ottenuti da 2 di tali tumori. Risulta evidente che le cellule leucemiche ottenute da animali resistenti conservano la loro sensibilità a STI571, in quanto il loro valore CI50 non differisce da quello della linea di cellule KU812 dalla quale esse derivano. Questi risultati ci hanno portato a valutare se l'attività di chinasi di proteina thr bcr/abl viene ancora

inibita da una somministrazione di STI571. Per questo scopo, si effettuano esperimenti di farmacocinetica molecolare (descritti da Coutre P., et al., J. Natl. Cancer Inst. 91, 163-168 (1999), per esaminare

~~il grado e la durata della inibizione di Bcr/Abl in vivo~~, in animali che non vengono pretrattati oppure in topi che hanno presentato ricadute dopo il trattamento iniziale e che erano resistenti ad un secondo ciclo di somministrazione di STI571. Topi affetti da tumore vengono sottoposti ad un trattamento energico e vengono uccisi in corrispondenza di 2 ore e di 4 ore. I livelli di attività di chinasi Bcr/Abl (misurata come autofosforilazione) ottenuti in un esperimento esemplificativo vengono riportati nella Figura 4. Mentre topi non sottoposti a pretrattamento mostrano l'inibizione precedentemente indicata nella fosforilazione bcr/abl in corrispondenza di 2 ore e di 4 ore (piste 4 e 6), gli animali che hanno presentato ricadute, resistenti a STI571, non vengono inibiti dal trattamento (piste 3 e 5). Questi esperimenti indicano che topi che hanno presentato ricadute sono resistenti ad un ulteriore trattamento e che in questo caso non si è avuta alcuna inibizione dell'attività di chinasi bcr/abl. Tuttavia, le cellule leucemiche conservano la loro sensibilità in vitro a STI571.

346 ~~348~~

Esempio 3: Livelli plasmatici di STI571 in topi che hanno presentato ricadute

Una possibile spiegazione dei risultati riportati sopra può consistere in un aumentato metabolismo di STI571 in animali pretrattati, con conseguenti inferiori livelli plasmatici di STI571. Per studiare questo risultato, topi affetti da tumore, pretrattati con STI571 oppure non pretrattati con STI571 (topi di controllo) vengono uccisi in corrispondenza di mezz'ora, 2,0 ore e 5,0 ore dopo un trattamento acuto con STI571 e si determinano le concentrazioni totali plasmatiche di STI571 mediante HPLC. I risultati sono rappresentati nella Figura 5. Mentre gli animali di controllo e gli animali pre-trattati raggiungono livelli plasmatici simili in corrispondenza di 30 minuti, i livelli di STI571 diminuiscono più rapidamente in animali di controllo, in confronto con topi pretrattati (p inferiore a 0,01). Concentrazioni intratumorali presentano un modello opposto, ossia tumori presenti in animali pretrattati contengono minori concentrazioni di STI571 in ogni momento, e questo fenomeno raggiunge un'importante statistica in corrispondenza della 5^a ora. Questi risultati non confermano la nostra ipotesi e inoltre mostrano che animali resistenti mantengono concentrazioni di STI571



più elevate nel sangue per un prolungato periodo di tempo. Questi dati, tra le altre alternative, potrebbero, invece, essere compatibili con la presenza, nel sangue di topi resistenti, di un "fattore" in grado di legare e e fare diminuire la "distanza" ("clearance") e l'attività biologica di STI571.

Esempio 4: La glicoproteina Acida Alfa 1 (AGP) fissa STI571 e inibisce i suoi effetti

Due proteine del plasma che possono fissare farmaci sono albumina e AGP. Preferibilmente, AGP lega molecole basiche (Kremer et al., Drug binding to human alphas-acidic glycoprotein in health and disease. Pharmacological Reviews 40, 1-47 (1988). Si usano cellule KU812 in vitro per valutare l'effetto di AGP sull'attività biologica di STI571. Poiché AGP di topo non è reperibile in quantità sufficienti per questo tipo di esperimenti (Fuse, E., et al., Cancer Res., 58, 3248-53, 1998), si impiega AGP umano. I risultati di un esperimento esemplificativo sono riportati nella Figura 6 A. E' evidente che AGP inibisce l'attività di STI571 (misurata come CI50); questo effetto è proporzionale alla concentrazione di AGP. Il valore CI50 aumenta dal valore usuale 0,05 μ M in assenza di AGP (Gambacorti-Passerini, C., et al., Blood Cells, Molecules, and Diseases 23, 380-94,

1997) fino ad oltre $3,0 \mu\text{M}$ con una concentrazione di AGP di 2 mg/ml . In un esperimento separato, il valore CI_{50} a $2,0 \text{ mg}$ di AGP viene calcolato in $4,5 \mu\text{M}$ (dati non indicati). L'albumina non fa aumentare sostanzialmente il valore CI_{50} per STI571, anche con una concentrazione di $5,0 \text{ g\%}$ (Figura 6 B). Pertanto, AGP, ma non l'albumina, può fare aumentare il valore CI_{50} per STI571 fino a valori 90 volte superiori a quelli dei controlli.

Poichè si nota un effetto di inibizione di AGP, si calcolano le Costanti di Associazione (K_a) di STI571 per AGP e per albumina. Per questo scopo, si sottopone ad incubazione una quantità fissata di AGP ($5 \mu\text{M}$) con differenti concentrazioni di STI571 e, mediante ultrafiltrazione, si valuta la quantità di farmaco non legato (frazione libera). Si ottengono curve di diagrammi Scatchard da AGP e da albumina. Nel caso di AGP, si è trovato un valore di $8,7$ litri/mole, che è circa 60 volte superiore rispetto al valore K_a calcolato per l'albumina ($0,15$). Questi risultati indicano che, sebbene l'albumina e AGP possano legare STI571, AGP lega STI571 con un'affinità molto più elevata e, come risultato, inibisce l'attività biologica di STI571.

Per confermare i risultati indicati sopra,

349 3/

cellule KU812 vengono trattate in vitro con sieri contenenti differenti quantità di AGP. La Figura 7 presenta un esperimento illustrativo nel quale si aggiungono 2 sieri contenenti rispettivamente 130

pg/ml e 1150 pg/ml (ad una concentrazione finale di 15%) a colture di KU812. E' evidente che l'inibizione dell'attività di STI571 è associata con il rispettivo contenuto in AGP di ciascun campione di siero. La variazione nella percentuale di siero presente nella coltura provoca un proporzionale aumento oppure una proporzionale ~~diminuzione nella sua attività di~~ inibizione ~~(non mostrato)~~. ~~Si conclude~~ che AGP può legare STI571, questo legame ha importanti conseguenze biologiche e blocca la possibilità di STI571 di inibire l'attività enzimatica di STI571.

Esempio 5: Relazione tra livelli di AGP nel siero, carico tumorale e trattamento con STI571

I risultati precedentemente presentati indicano che AGP, una proteina del plasma inducibile, inibisce notevolmente l'attività di STI571 in vitro. Si determinano i livelli plasmatici di AGP in topi "nude" in corrispondenza di diversi stadi di malattia, mediante immunodiffusione, per valutare se detti valori possono venire associati alla sensibilità in vivo di cellule leucemiche KU812 nei confronti di un

350 3/2

trattamento con STI571. La Figura 8 A presenta i valori di AGP in topi in diversi stadi di malattia. I valori di AGP basali in topi sono molto bassi (96 ± 21 $\mu\text{g/ml}$). Le concentrazioni di AGP aumentano

proporzionalmente in relazione alla presenza di tumori. Topi aventi un carico tumorale di 200 mg (corrispondente circa a 200 milioni di cellule leucemiche) presentano un aumento quadruplo nei valori AGP (383 ± 131), mentre topi che presentano tumori di 0,8-1 mg presentano valori di AGP superiori a 1 mg/ml (1580 ± 234). Animali con tumori misurabili che vengono curati, presentano una diminuzione progressiva nelle concentrazioni di AGP e ritornano a livelli normali in 4-8 settimane. Esperimenti effettuati con AGP purificato indicano che le variazioni nelle concentrazioni di AGP osservate tra topi normali e animali che presentano grossi tumori, provocano una variazione nella frazione di STI571 legata ad AGP compresa tra 42% e oltre il 99% (non indicato). E' interessante indicare che un trattamento con STI571 (160 mg/kg p.o. per 11 giorni) provoca un aumento inferiore, però statisticamente significativo, di valori di AGP (213 ± 43). I valori di AGP aumentati in topi affetti da tumore vengono inoltre evidenziati per mezzo di isoelettrofocalizzazione

(Figura 8 B). Questi risultati, presi insieme, indicano che un carico tumorale (e, in minor misura, un pretrattamento con STI571) provoca la sintesi di AGP, una proteina del plasma che, a sua volta, può legare e disattivare STI571.

Esempio 6: Eritromicina, un legante di AGP, può alleviare il blocco, favorito da AGP, di attività di STI571 in vitro

(a) E' noto che parecchi farmaci legano AGP, ivi compresa la eritromicina (Kremer et al., Pharmacological Reviews 40, 1-47 (1988)). Se il meccanismo mediante il quale AGP blocca STI571 viene favorito dal legame di AGP a STI571, allora, una certa molecola capace di legare AGP avrà un'azione competitiva con STI571 per legare AGP, così rendendo il STI571 più disponibile per ottenere un'attività biologica. Per convalidare tali ipotesi, si aggiunge eritromicina, a 5-30 μ M a colture di KU812 contenenti STI571 e AGP. I risultati di un esperimento illustrativo vengono rappresentati nella Figura 9. La eritromicina ripristina la sensibilità nei confronti di STI571 con una chiara relazione dose/risposta. La eritromicina non modifica il valore CI50 per STI571 in assenza di AGP, escludendo così un effetto diretto sull'effetto anti-leucemia di STI571 (non indicato).

(b) Gli effetti della eritromicina vengono anch'essi

352 ~~356~~

valutati sul blocco dell'attività di bcr/abl chinasi favorito da STI571 (Figura 10). Le cellule KU812 vengono trattate in vitro con STI571, con AGP e con eritromicina, vengono sottoposte ad incubazione a 37°C per 60 minuti e vengono sottoposte a lisi; la quantità di attività di chinasi viene quindi valutata usando un anticorpo anti-fosfotirosina. La Figura 10 indica che AGP inibisce l'attività di STI571. Si può ripristinare l'attività di STI571 mediante aggiunta di eritromicina.

Gli esperimenti (a) e (b) mettono in evidenza, in 2 differenti prove, che l'eritromicina può ripristinare, in vitro, la sensibilità nei confronti di STI571.

Esempio 7: Effetti in vivo della somministrazione di eritromicina e di un pretrattamento con STI571

(a) La Richiedente, avendo dimostrato l'effetto di inibizione di AGP, e il suo effetto inverso provocato da eritromicina in vitro, convalida sperimentalmente la modulazione in vivo di valori di AGP oppure delle loro possibilità di legame. In topi si iniettano cellule KU812 e si fa iniziare il trattamento 11 giorni dopo in presenza di un carico tumorale di circa 400 mg. In questo caso, ci si aspetta una scarsa azione di cura oppure nessuna azione di cura da un trattamento standard con STI571. Si

353 / 35

trattano i topi con STI571 (160 mg/kg p.o. ogni 8 ore) da solo oppure in combinazione con eritromicina estolato (350 mg/kg ogni 8 ore) per 18 giorni. Si sceglie la formulazione estolato della eritromicina

poichè si è precedentemente dimostrata la sua buona biodisponibilità in topi, la dose scelta essendo quella che ci si poteva aspettare per ottenere concentrazioni di picco superiori a 20 μ M. Come esemplificato nella Figura 11 A, il trattamento combinato provoca una diminuzione del tumore notevolmente più elevata in corrispondenza del giorno 6, e a partire dal giorno 16. E' importante notare che, mentre la regressione del tumore è progressiva in topi che sono stati sottoposti al trattamento combinato, alcuni tumori iniziano a ricrescere durante gli ultimi giorni di trattamento nel gruppo trattato soltanto con STI571. L'effetto di aggiunta di eritromicina a STI571 è anche più evidente, quando si confrontano i gradi di guarigione nei 2 gruppi (Figura 11 B). Nelle serie di topi ai quali è stato somministrato STI571 da solo, 5/15 animali presentano la scomparsa del tumore. Tuttavia, 4 animali hanno avuto ricadute tra il 25^o giorno e il 40^o giorno, soltanto 1/13 degli animali venendo fatto guarire in corrispondenza del 120^o giorno (primo giorno di trattamento). Nel gruppo

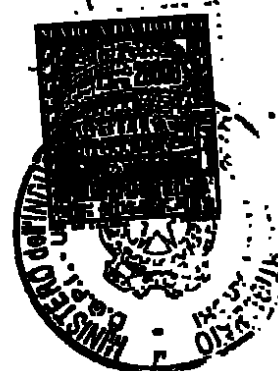
354 3/56

di topi ai quali era stata applicata la terapia combinata eritromicina/STI571, 14/15 topi risultavano privi di tumori, e soltanto 1 animale è morto, in corrispondenza del 30^o giorno. Pertanto, 10/12 animali

~~vengono curati effettuando il trattamento combinato;~~
questo valore è notevolmente diverso (p inferiore a 0,01) da quello (1/13) ottenuto soltanto nel gruppo trattato con STI571. I gruppi di controllo ai quali è stata somministrata eritromicina, da soli, non presentano alcuna comparsa di regressione tumorale (non indicata).

(b) Si valutano, inoltre, gli effetti biologici di un trattamento con STI571. I topi vengono pretrattati oppure non vengono pretrattati con STI571 per 11 giorni, vengono iniettati con cellule KU812 e quindi vengono trattati con STI571 (160 mg/kg ogni 8 giorni per 11 giorni), partendo 24 ore dopo avere effettuato l'iniezione di cellule leucemiche. In questi casi, ci si aspetta che 100% degli animali siano stati guariti mediante l'impiego di STI571. I risultati sono riportati nella Figura 12. Nel gruppo di controllo (topi non pretrattati), 0/14 animali hanno sviluppato crescita tumorale. Nel gruppo di topi pretrattati, si sono avute crescite di tumori di 7/14 (p inferiore a 0,05), e ciò sta ad indicare che l'aumento di AGP associato con il precedente

355



trattamento con STI571 può anch'esso provocare un significativo effetto biologico. Questi risultati, presi insieme, mettono in evidenza sperimentalmente gli effetti di negatività di AGP sull'attività

terapeutica di STI571; essi inoltre suggeriscono e mettono a disposizione una parziale valutazione sperimentale fino ad una strategia a scopo mirato, all'atto del passaggio nella resistenza in vivo favorito da AGP, usando molecole che sono in grado di legarsi ad AGP in competizione con STI571.

Esempio 8: Compresse contenenti 4-[(4-metil-1-piperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]ammino]fenil]benzammide metansolfonato, forma di cristalli β

Usualmente, si preparano compresse contenenti 100 mg della sostanza attiva indicata nel titolo, con la seguente formulazione:

Composizione

Ingrediente attivo	100 mg
Lattosio cristallino	240 mg
Avicel	80 mg
PVPPXL	20 mg
Aerosil	2 mg
Stearato di magnesio	5 mg

	447 mg

356 3/8

Preparazione: Si mescola la sostanza attiva con sostanze di supporto e si effettua la compressione in una macchina per la produzione di compresse (Korsch EKO, diametro del punzone 10 mm).

~~Avicel è cellulosa microcristallina (FMC, Philadelphia, USA).~~

PVPPXL è polivinilpirrolidone, reticolato (BASF, Germania).

Aerosil è biossido di silicio (Degussa, Germania).

Esempio 9: Capsule contenenti 4-[(4-metil-1-piperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]ammino]fenil]benzammide metansolfonato, forma di cristalli β

Usualmente, si preparano capsule contenenti 100 mg del composto indicato nel titolo come sostanza attiva, con la seguente formulazione:

Composizione

Ingrediente attivo	100	mg
Avicel	200	mg
PVPPXL	15	mg
Aerosil	2	mg
Stearato di magnesio	1,5	mg
	318,5	mg

357
89

Si preparano le capsule mescolando i componenti e introducendo la miscela in capsule di gelatina dura, dimensione 1. PVPPXL = Crospovidone XL (vedi Esempio 10).

Esempio 10: Capsule contenenti 4-[(4-metil-1-piperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]ammino]fenil]benzammide metansolfonato, forma di cristalli β

Crospovidone XL: Povidone reticolato = omopolimero reticolato, insolubile in acqua, di N-vinil-2-pirrolidone.

Aerosil 200: Gel di silice puro (area superficiale secondo BET $200 \pm 25 \text{ m}^2/\text{g}$, diametro medio dei granuli 12 nm).

Avicel: cellulosa microstallina.

La composizione del riempimento delle capsule per le capsule da 100 mg, 50 mg e 25 mg è identica. Si ottengono le differenti concentrazioni di dosaggio facendo variare soltanto il peso di riempimento della capsula. Le dimensioni delle capsule desiderate sono 100 mg per il tipo 1, 50 mg per il tipo 3 e 25 mg per il tipo 4.

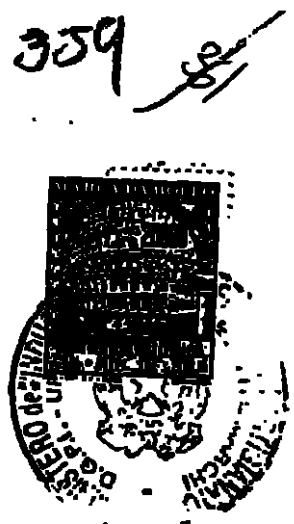
358
/66

Tabella 1 Composizione per capsule

Eccipiente	Percentuale	100 mg	50 mg	25 mg
4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N- [4-metil-3-(4-piridin-3-il)pirimidin-2-ilammino)fenil] benzammide sale metansolfonato nella forma di cristalli β	51,96	119,50	59,75	29,875
Avicel PH 102	40,00	92,00	46,00	23,000
Crospovidone XL	6,52	15,00	7,50	3,750
Aerosil 200	0,87	2,00	1,00	0,500
Stearato di magnesio	0,65	1,50	0,75	0,375
Totale	100,00	230,00	115,00	57,50
Dimensioni della capsula		1	3	4

Tabella 1 Quantità usate per ciascuna carica (kg)

Ingrediente	Percentuale	100 mg	50 mg
	QUANTITA' PER CARICA (%)	QUANTITA' PER CARICA (kg)	QUANTITA' PER CARICA (kg)
4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N- [4-metil-3-(4-piridin-3-il)pirimidin-2-ilammino)fenil] benzammide sale metansolfonato nella forma di cristalli β	51,96	18,224	9,112
Cellulosa MK GR	40,00	14,030	7,015
Crospovidone XL	6,52	2,288	1,144
Aerosil 200	0,87	0,305	0,153
Stearato di magnesio	0,65	0,228	0,114
Totale	100,00	35,075	17,538
Dimensioni della capsula		1	3
Quantità di capsule		152'500	152'500



Esempio 11: Composizione di una tipica formulazione di Eritromicina

In questo caso, si può usare qualsiasi formulazione standard nota per la eritromicina.

Un esempio per una formulazione con eritromicina estolato è il seguente:

Eccipiente	Percentuale	100 mg	50 mg	25 mg
Eritromicina estolato	51,96	119,50	59,75	29,875
Avicel PH 102	40,00	92,00	46,00	23,000
Crospovidone XL	6,52	15,00	7,50	3,750
Aerosil 200	0,87	2,00	1,00	0,500
Stearato di magnesio	0,65	1,50	0,75	0,375
Totale	100,00	230,00	115,00	57,50

Esempio 11: Possibile composizione combinata con Eritromicina e con ST1571

Eccipiente	Percentuale	100 mg	50 mg	25 mg
4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N- [4-metil-3-(4-piridin-3-il)pirimidin-2-ilammino]fenil] benzammide sale metansolfonato nella forma di cristalli β	25,98	59,75	29,875	14,9375
Eritromicina estolato	25,98	59,75	29,875	14,9375
Avicel PH 102	40,00	92,00	46,00	23,000
Crospovidone XL	6,52	15,00	7,50	3,750
Aerosil 200	0,87	2,00	1,00	0,500
Stearato di magnesio	0,65	1,50	0,75	0,375
Totale	100,00	230,00	115,00	57,50

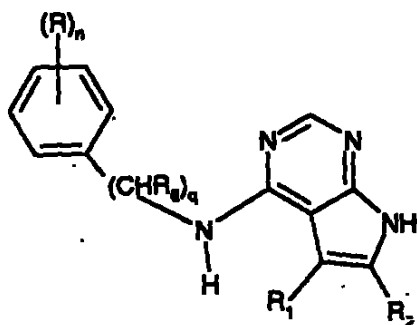
Ing. Barzanò & Zanardo Milano S.p.A.

RIVENDICAZIONI

1. Preparato costituito da una combinazione che contiene (a) almeno un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore e ~~(b) almeno un composto organico in grado di legarsi ad una α -glicoproteina acida (AGP); oppure sali farmaceuticamente accettabili di un qualsiasi componente (a), (b) oppure (a) e (b), se è presente almeno un gruppo che forma sale, e una sostanza-veicolo farmaceuticamente accettabile.~~

2. Preparato costituito da una combinazione secondo la rivendicazione 1, in cui l'inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore (a) è scelto dal gruppo costituito da:

(i) un composto di una 7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina di formula VI



(VI)

in cui

q è 0 oppure 1,

n è compreso tra 1 e 3 quando q è 0, oppure n è compreso tra 0 e 3 quando q è 1,

R è alogeno, alchile inferiore, ossidrile, inferiore-alcanoilossi, alcossi inferiore, carbossi, inferiore-alcossicarbonile, carbammoile, N-inferiore-alchilcarbammoile, N,N-di-inferiore-alchilcarbammoile, il gruppo ciano, un gruppo amminico, inferiore-alcanoilamminico, inferiore-alchilamminico, N,N-di-inferiore-alchilamminico oppure trifluorometile, essendo possibile quando sono presenti nella molecola parecchi radicali R, che questi radicali siano identici oppure differenti;

a) R_1 e R_2 , ciascuno indipendentemente dall'altro, indicano

α) fenile sostituito con carbammoil-metossi, carbossi-metossi, benzoillossicarbonil-metossi, inferiore-alcossicarbonil-metossi, fenile, ammino, inferiore-alcanoilammino, inferiore-alchilammino, N,N-di-inferiore-etilammino, ossidrile, inferiore-alcanoilossi, carbossile, inferiore-alcossicarbonile, carbammoile, N-inferiore-alchilcarbammoile, N,N-di-inferiore-alchilcarbammoile, gruppo ciano oppure con nitro-gruppo;

β) idrogeno;

γ) piridile non sostituito oppure alogeno oppure inferiore-alchil-sostituito;

δ) N-benzil-piridinio-2-ile; naftile; ciano; carbossile; inferiore-alcossicarbonile; carbammoile; N-inferiore-

alchilcarbammoile; N,N-di-inferiore-alchilcarbammoile;

N-benzilcarbammoile; formile; inferiore-alcanoile;

inferiore-alchenile; inferiore-alchenilossi; oppure

ε) inferiore-alchile sostituito con

εα) alogeno, ammino, inferiore-alchilammino, piperazino, di-inferiore-alchilammino;

εβ) fenilammino che è non sostituito oppure è sostituito nella porzione fenile con alogeno, alchile

inferiore, ossidrile, inferiore-alcanoilossi, inferiore-

alcossi, carbossile, inferiore-alcossicarbonile,

carbammoile, N-inferiore-alchilcarbammoile, N,N-di-

inferiore-alchilcarbammoile, gruppo ciano, ammino,

inferiore-alcanoilammino, inferiore-alchilammino, N,N-

di-inferiore-alchilammino oppure con trifluorometile,

εγ) ossidrile, alcossile inferiore, gruppo ciano,

carbossile, inferiore-alcossicarbonile, carbammoile,

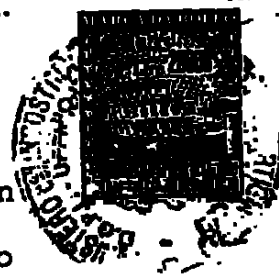
N-inferiore-alchilcarbammoile, N,N-di-inferiore-

alchilcarbammoile, mercapto, oppure

εδ) con un radicale di formula $R_3-S(O)_m-$ in cui R_3 è alchile inferiore e m è 0, 1 oppure 2, oppure

b) quando q è 1, uno dei radicali R_1 e R_2 è

363 3/5



alchile inferiore non sostituito oppure fenile non sostituito e gli altri radicali R_1 e R_2 hanno uno dei significati riportati sopra nel paragrafo a) ad eccezione di idrogeno, oppure

c) R_1 e R_2 insieme sono C_4-C_{10} -1,4-alcadienilene sostituito con ammino, inferiore-alcanoilammino, inferiore-alchilammino, N,N-di-inferiore-alchilammino, nitro, alogeno, ossidrile, inferiore-alcanoilossi, carbossile, inferiore-alcossicarbonile, carbammoile, N-inferiore-alchilcarbammoile, N,N-di-inferiore-alchilcarbammoile oppure con il gruppo ciano oppure sono aza-1,4-alcadienilene avente fino a 9 atomi di carbonio, oppure

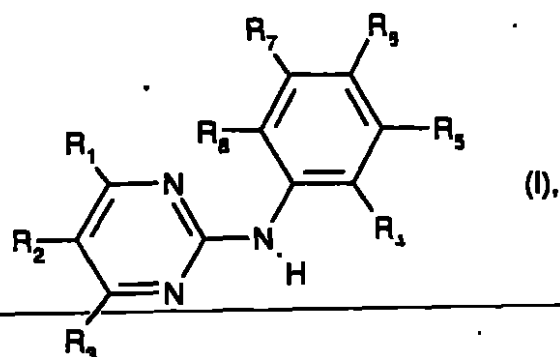
d) quando q è 1, R_1 e R_2 , ciascuno indipendentemente dall'altro, sono alchile inferiore non sostituito oppure fenile non sostituito oppure hanno uno dei significati riportati sopra nel paragrafo a), e

R_6 è idrogeno, alchile inferiore, inferiore-alcossicarbonile, carbammoile, N-inferiore-alchilcarbammoile oppure N,N-di-inferiore-alchilcarbammoile,

oppure un suo sale;

e

(ii) un derivato di una N-fenil-2-pirimidina-ammina di formula I



in cui

R_1 è 4-pirazinile, 1-metil-1H-pirrolile, fenile ammino- oppure amminò-inferiore-alchil-sostituito, in cui il gruppo amminico in ciascun caso è libero, alchilato oppure acilato, 1H-indolile oppure 1H-imidazolile legato in corrispondenza di un atomo di carbonio dell'anello a cinque membri, oppure piridile non sostituito oppure inferiore-alchil-sostituito legato in corrispondenza di un atomo di carbonio dell'anello e non sostituito oppure sostituito in corrispondenza dell'atomo di azoto con ossigeno, R_2 e R_3 , ciascuno indipendentemente dall'altro, sono idrogeno oppure alchile inferiore,

uno oppure due dei radicali R_4 , R_5 , R_6 , R_7 e R_8 sono ciascuno il nitro-gruppo, inferiore-alcossi fluoro-sostituito oppure un radicale di formula II



in cui

R_9 è idrogeno oppure alchile inferiore,

365 36/

X è un osso-gruppo, un tio-gruppo, immino, N-inferiore-alchil-immينو, idrossiimmينو oppure O-inferiore-alchil-idrossiimmينو,

Y è ossigeno oppure è il gruppo NH,

n è 0 oppure 1 e

R₁₀ è un radicale alifatico avente almeno 5 atomi di carbonio, oppure un radicale aromatico, aromatico-alifatico, cicloalifatico, cicloalifatico-alifatico, eterociclico oppure eterociclico-alifatico e gli altri radicali R₄, R₅, R₆, R₇ e R₈, ciascuno indipendentemente dall'altro, sono idrogeno, alchile inferiore che è non sostituito oppure è sostituito con un gruppo amminico libero oppure alchilato, con piperazinile, piperidinile, pirrolidinile oppure con morfolinile oppure sono alcanole inferiori, trifluorometile, ossidrilile libero, eterificato oppure esterificato, il gruppo amminico libero, alchilato oppure acilato oppure carbossile libero oppure esterificato, oppure

un sale di tali composti che hanno almeno un gruppo che forma sale;

e il composto organico in grado di legarsi alla α -glicoproteina acida (AGP) (b) è scelto dal gruppo costituito da:

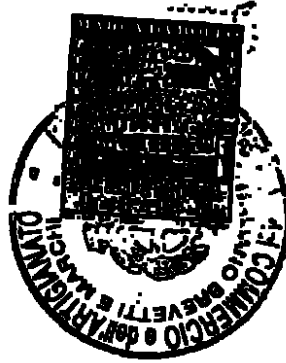
Nicergolina, Prazosin, Alfentanil, Ketamine, Ethidocaine,

366 / 368

Fentanil, Meperidina, Metadone, Fenilbutazone,
Bupivacaine, Etidocaina, Fenciclidina, Lidocaina,
Fenciclidina, Aprindina, Disopiramide, Chinidina,
Verapamil, Eritromicina, Acenocoumarol, Dipyridamole,

PCR2362, Ticlopidine, Warfarin, Phenytoin, Carbamazepine,
Naproxen, Alprenolol, Metoprolol, Oxprenolol, Pindolol,
Propranolol, Timolol, Progesterone, Testosterone,
Estradiolo, Prednisolone, Metocurina, d-Tubocurarina,
Amitriptilina, Cloropromazina, Cyclazindol,
Desmethylinipramine, Diazepam, Doxepine, Flurazepam,
Fluphenazine, Haloperidol, Imipramine, Loxapine,
Mianserin, Nortriptyline, Norzimelidine, Perazine,
Perphenazine, Phenobarbital, Derivati della Fenotiazina,
Promazine, Acepromazine, Protipendyl, Thioridazine,
Thiothixene, Triazolam, Trifluoperazine, Zimelidine,
Vitamina B₁₂, Acido Folico, DAPN, 1,8-Anilino-naftalen-
solfonato, Aminopyrine, Amoxapine, Bupropion, Maprolitine,
Nomifensine, Trazodone, Ritodrine, Doxazosin, Trimazosin,
Binedalin, Amsacrine, Apazone, SKF 525A, Ciclazindol,
PCR 2362, Indometacina, Probenecid, Acido Retinoico,
Solfinpirazone, Tolmetin, Benoxaprofen, Eparina,
Sufentanil, Lofentanil, Metoclopramide, Nicardipine,
Pirmenol, Mifepristone, RU 42 633, Aprindil, Auramine O,
Bepridil, Desipramine, Desmethyldomipramine, Moxaprine,
Chinina, Lorcainide, Prothipendyl, Protriptyline,

369 3/89



Trihexyphenidyl, Biperiden, Methaqualone, Diphenhydramine, Glutethimide, Chlordiazepoxid, L-Triptofano, Mepivacaine, Levomethadone, Opipramol, Trifluopromazine, Trimipramine, Tris-butossietil-fosfato, Staurosporina, N-benzoil-staurosporina e 7-idrossi-staurosporina;

e anche un metabolita di uno qualsiasi di questi composti;

in cui ciascun componente (a) e/o (b) può anche essere presente sotto forma di un suo sale farmaceuticamente accettabile, se è presente almeno un gruppo che forma sale.

3. Preparato costituito da una combinazione secondo la rivendicazione 1, in cui sono mescolati (a) almeno un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore scelto dal gruppo costituito da 1-(4-cloro-anilino)-4-(4-piridil-metil)-ftalazina, (R)-6-(4-idrossi-fenil)-4-[(1-feniletil)-ammino]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina e 4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il)pirimidin-2-ilammino]fenil]benzammide; oppure un sale farmaceuticamente accettabile di uno qualsiasi o più di questi composti; e

(b) almeno un composto organico in grado di legarsi ad una α -glicoproteina acida scelta dal gruppo costituito da un antibiotico, staurosporina, N-benzoil-

368 320

staurosporina e 7-idrossi-staurosporina, oppure un suo sale farmaceuticamente accettabile.

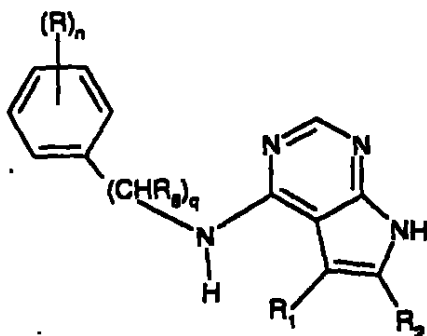
4. Preparato costituito da una combinazione secondo la rivendicazione 1, in cui sono combinati (a) l'inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore 4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il)pirimidin-2-ilammino)fenil]-benzammide, oppure un suo sale farmaceuticamente accettabile, e (b) il composto organico in grado di legarsi ad una α 1-glicoproteina acida eritromicina, oppure un suo sale farmaceuticamente accettabile.

5. Un prodotto che comprende
(a) almeno un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore, e
(b) almeno un composto organico in grado di legarsi ad una α 1-glicoproteina acida;
in cui un qualsiasi componente (a) e/o (b) può essere presente anche sotto forma di un sale farmaceuticamente accettabile, se è presente almeno un gruppo che forma sale,
in presenza oppure in assenza di una o più sostanze-veicolo farmaceuticamente accettabili, sotto forma di un preparato in combinazione, per un impiego contemporaneo oppure distribuito nel tempo entro un periodo di tempo che è sufficientemente piccolo

affinchè i composti attivi sia del componente (a) che del componente (b) facciano aumentare l'attività antiproliferativa di un composto (a) contro cellule in fase di proliferazione, in particolare in un paziente, per il trattamento di una malattia proliferativa che risponde ad un tale composto.

6. Prodotto secondo la rivendicazione 5, in cui l'inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Riceettore e/o del Kit-riceettore è scelto dal gruppo costituito da:

(i) un composto di una 7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina di formula VI



(VI)

in cui

q è 0 oppure 1,

n è compreso tra 1 e 3 quando q è 0, oppure n è compreso tra 0 e 3 quando q è 1,

R è alogeno, alchile inferiore, ossidril, inferiore-alcanoilossi, alcossi inferiore, carbossi,

370 372

inferiore-alcossicarbonile, carbammoile, N-inferiore-alchilcarbammoile, N,N-di-inferiore-alchilcarbammoile, il gruppo ciano, un gruppo amminico, inferiore-alcanoilamminico, inferiore-alchilamminico, N,N-di-

inferiore-alchilamminico oppure trifluorometile, essendo possibile quando sono presenti nella molecola parecchi radicali R, che questi radicali siano identici oppure differenti;

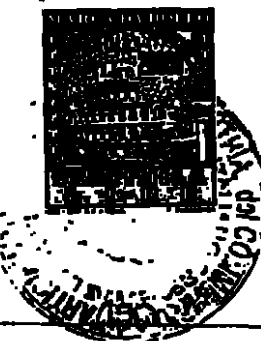
a) R_1 e R_2 ; ciascuno indipendentemente dall'altro, indicano

α) fenile sostituito con carbammoil-metossi, carbossi-metossi, benzoilossicarbonil-metossi, inferiore-alcossicarbonil-metossi, fenile, ammino, inferiore-alcanoilammino, inferiore-alchilammino, N,N-di-inferiore-etilammino, ossidrile, inferiore-alcanoilossi, carbossile, inferiore-alcossicarbonile, carbammoile, N-inferiore-alchilcarbammoile, N,N-di-inferiore-alchilcarbammoile, gruppo ciano oppure con nitro-gruppo;

β) idrogeno;

γ) piridile non sostituito oppure alogeno oppure inferiore-alchil-sostituito;

δ) N-benzil-piridinio-2-ile; naftile; ciano; carbossile; inferiore-alcossicarbonile; carbammoile; N-inferiore-alchilcarbammoile; N,N-di-inferiore-alchilcarbammoile; N-benzilcarbammoile; formile; inferiore-alcanoile;



inferiore-alchenile; inferiore-alchenilossi; oppure

e) inferiore-alchile sostituito con

sa) alogeno, ammino, inferiore-alchilammino, piperazino, di-inferiore-alchilammino;

sb) fenilammino che è non sostituito oppure è sostituito nella porzione fenile con alogeno, alchile inferiore, ossidrile, inferiore-alcanoilossi, inferiore-alcossi, carbossile, inferiore-alcossicarbonile, carbammoile, N-inferiore-alchilcarbammoile, N,N-di-inferiore-alchilcarbammoile, gruppo ciano, ammino, inferiore-alcanoilammino, inferiore-alchilammino, N,N-di-inferiore-alchilammino oppure con trifluorometile,

sy) ossidrile, alcossile inferiore, gruppo ciano, carbossile, inferiore-alcossicarbonile, carbammoile, N-inferiore-alchilcarbammoile, N,N-di-inferiore-alchilcarbammoile, mercapto, oppure

sd) con un radicale di formula $R_3-S(O)_m-$ in cui R_3 è alchile inferiore e m è 0, 1 oppure 2, oppure

b) quando q è 1, uno dei radicali R_1 e R_2 è alchile inferiore non sostituito oppure fenile non sostituito e gli altri radicali R_1 e R_2 hanno uno dei significati riportati sopra nel paragrafo a) ad eccezione di idrogeno, oppure

c) R_1 e R_2 insieme sono C_4-C_{10} -1,4-alcadienilene sostituito con ammino, inferiore-alcanoilammino,

inferiore-alchilammino, N,N-di-inferiore-alchilammino, nitro, alogeno, ossidrile, inferiore-alcanoilossi, carbossile, inferiore-alcossicarbonile, carbammoile, N-inferiore-alchilcarbammoile, N,N-di-inferiore-alchilcarbammoile oppure con il gruppo ciano oppure sono aza-1,4-alcadienilene avente fino a 9 atomi di carbonio, oppure

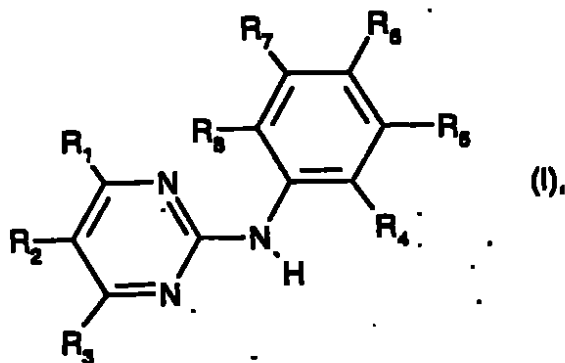
d) quando q è 1, R₁ e R₂, ciascuno indipendentemente dall'altro, sono alchile inferiore non sostituito oppure fenile non sostituito oppure hanno uno dei significati riportati sopra nel paragrafo a), e

R₆ è idrogeno, alchile inferiore, inferiore-alcossicarbonile, carbammoile, N-inferiore-alchilcarbammoile oppure N,N-di-inferiore-alchilcarbammoile,

oppure un suo sale;

e

(ii) un derivato di una N-fenil-2-pirimidina-ammina di formula I



in cui

R₁ è 4-pirazinile, 1-metil-1H-pirrolile, fenile
ammino- oppure ammino-inferiore-alchil-sostituito, in
cui il gruppo amminico in ciascun caso è libero,

alchilato oppure acilato, 1H-indolile oppure
1H-imidazolile legato in corrispondenza di un atomo
di carbonio dell'anello a cinque membri, oppure
piridile non sostituito oppure inferiore-alchil-
sostituito legato in corrispondenza di un atomo di
carbonio dell'anello e non sostituito oppure sostituito
in corrispondenza dell'atomo di azoto con ossigeno,

R₂ e R₃, ciascuno indipendentemente dall'altro, sono
idrogeno oppure alchile inferiore,

uno oppure due dei radicali R₄, R₅, R₆, R₇ e R₈ sono
ciascuno il nitro-gruppo, inferiore-alcossi fluoro-
sostituito oppure un radicale di formula II



in cui

R₉ è idrogeno oppure alchile inferiore,

X è un osso-gruppo, un tio-gruppo, immino,
N-inferiore-alchil-immينو, idrossiimmينو oppure
O-inferiore-alchil-idrossiimmينو,

Y è ossigeno oppure è il gruppo NH,

n è 0 oppure 1 e

R₁₀ è un radicale alifatico avente almeno 5 atomi

374 32/8

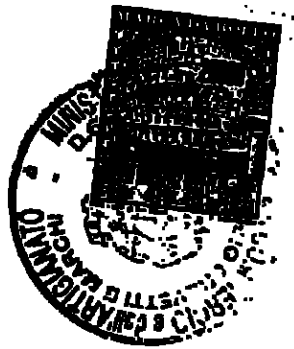
di carbonio, oppure un radicale aromatico, aromatico-alifatico, cicloalifatico, cicloalifatico-alifatico, eterociclico oppure eterociclico-alifatico e gli altri radicali R_4 , R_5 , R_6 , R_7 e R_8 , ciascuno indipendentemente dall'altro, sono idrogeno, alchile inferiore che è non sostituito oppure è sostituito con un gruppo amminico libero oppure alchilato, con piperazinile, piperidinile, pirrolidinile oppure con morfolinile oppure sono alcanole inferiore, trifluorometile, ossidrile libero, eterificato oppure esterificato, il gruppo amminico libero, alchilato oppure acilato oppure carbossile libero oppure esterificato, oppure

un sale di tali composti che hanno almeno un gruppo che forma sale;

e il composto organico in grado di legarsi alla α -glicoproteina acida (AGP) (b) è scelto dal gruppo costituito da:

Nicergolina, Prazosin, Alfentanil, Ketamine, Ethidocaine, Fentanil, Meperidina, Metadone, Fenilbutazone, Bupivacaine, Etidocaina, Fenciclidina, Lidocaina, Fenciclidina, Aprindina, Disopiramide, Chinidina, Verapamil, Eritromicina, Acenocoumarol, Dipyridamole, PCR2362, Ticlopidine, Warfarin, Phenytoin, Carbamazepine, Naproxen, Alprenolol, Metoprolol, Oxprenolol, Pindolol,

375 377



Propranolol, Timolol, Progesterone, Testosterone,
Estradiolo, Prednisolone, Metocurina, d-Tubocurarina,
Amitriptilina, Cloropromazina, Cyclazindol,
Desmethylinipramine, Diazepam, Doxepine, Flurazepam,

Fluphenazine, Haloperidol, Imipramine, Loxapine,
Mianserin, Nortriptyline, Norzimelidine, Perazine,
Perphenazine, Phenobarbital, Derivati della Fenotiazina,
Promazine, Acepromazine, Protipendyl, Thioridazine,
Thiothixene, Triazolam, Trifluoperazine, Zimelidine,
Vitamina B₁₂, Acido Folico, DAPN, 1,8-Anilino-naftalen-
solfonato, Aminopyrine, Amoxapine, Bupropion, Maprolitine,
Nomifensine, Trazodone, Ritodrine, Doxazosin, Trimazosin,
Binedalin, Amsacrine, Apazone, SKF 525A, Ciclazindol,
PCR 2362, Indometacina, Probenecid, Acido Retinoico,
Solfinpirazone, Tolmetin, Benoxaprofen, Eparina,
Sufentanil, Lofentanil, Metoclopramide, Nicardipine,
Pirfenol, Mifepristone, RU 42 633, Aprindil, Auramine O,
Bepridil, Desipramine, Desmethyldomipramine, Moxaprine,
Chinina, Lorcainide, Prothipendyl, Protriptyline,
Trihexyphenidyl, Biperiden, Methaqualone, Diphenhydramine,
Glutethimide, Chlordiazepoxid, L-Triptofano, Mepivacaine,
Levomethadone, Opipramol, Trifluopromazine, Trimipramine,
Tris-butossietil-fosfato, Staurosporina, N-benzoil-
staurosporina e 7-idrossi-staurosporina;
e anche un metabolita di uno qualsiasi di questi

composti;

in cui ciascun componente (a) e/o (b) può anche essere presente sotto forma di un suo sale farmaceuticamente accettabile, se è presente almeno un gruppo che forma sale.

7. Prodotto secondo la rivendicazione 5, in cui (a) l'inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore è scelto dal gruppo costituito da 1-(4-cloro-anilino)-4-(4-piridil-metil)-ftalazina, (R)-6-(4-idrossi-fenil)-4-[(1-feniletil)-ammino]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina e 4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il)pirimidin-2-ilammino]fenil]benzammide; oppure un sale farmaceuticamente accettabile di uno qualsiasi o più di questi composti; e (b) il composto organico in grado di legarsi ad una α 1-glicoproteina acida è scelto dal gruppo costituito da un antibiotico, staurosporina, N-benzoil-staurosporina e 7-idrossi-staurosporina, oppure un sale farmaceuticamente accettabile di uno qualsiasi o più di questi composti.

8. Prodotto secondo la rivendicazione 5, in cui (a) l'inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore è 4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-

377 324

il)pirimidin-2-ilammino)fenil]benzammide, oppure un suo sale farmaceuticamente accettabile, e (b) il composto organico in grado di legarsi ad una α -glicoproteina acida è eritromicina, oppure un suo sale farmaceuticamente accettabile.

9. Impiego di una combinazione di

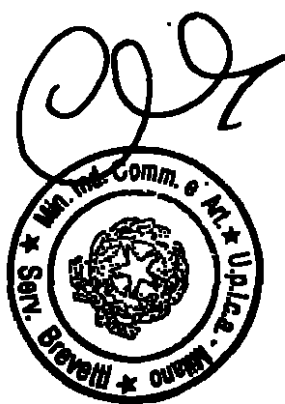
(a) almeno un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore, e

(b) almeno un composto organico in grado di legarsi ad una α -glicoproteina acida, in cui qualsiasi componente (a) e/o (b) può essere presente anche sotto forma di un sale farmaceuticamente accettabile, se è presente almeno un gruppo che forma sale,

per la produzione di preparati farmaceutici da impiegare sotto forma di composizioni contro una malattia proliferativa che può venire trattata mediante somministrazione di un inibitore della abl-tirosina-chinasi del PDGF-Recettore e/o del Kit-recettore.

Ing. Barzanò & Zanardo Milano S.p.A.

Tr. 1392/C/vf



I MANDATARI

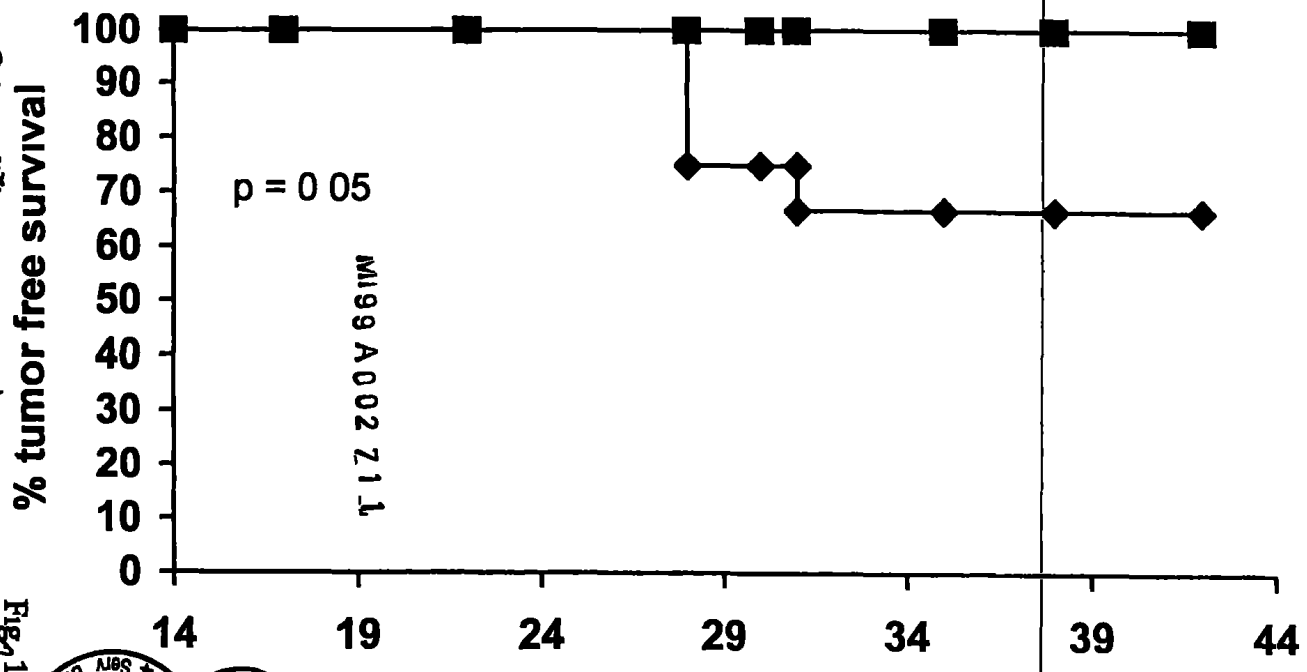
(firma)

[Signature]
(per sé e per gli altri)

378

1/17

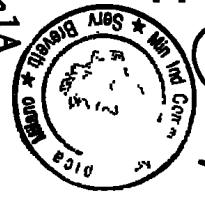
~~1398-386~~



days

from

Fig 1A

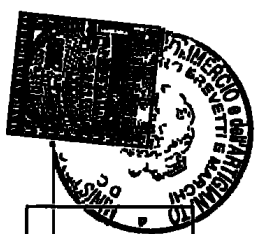
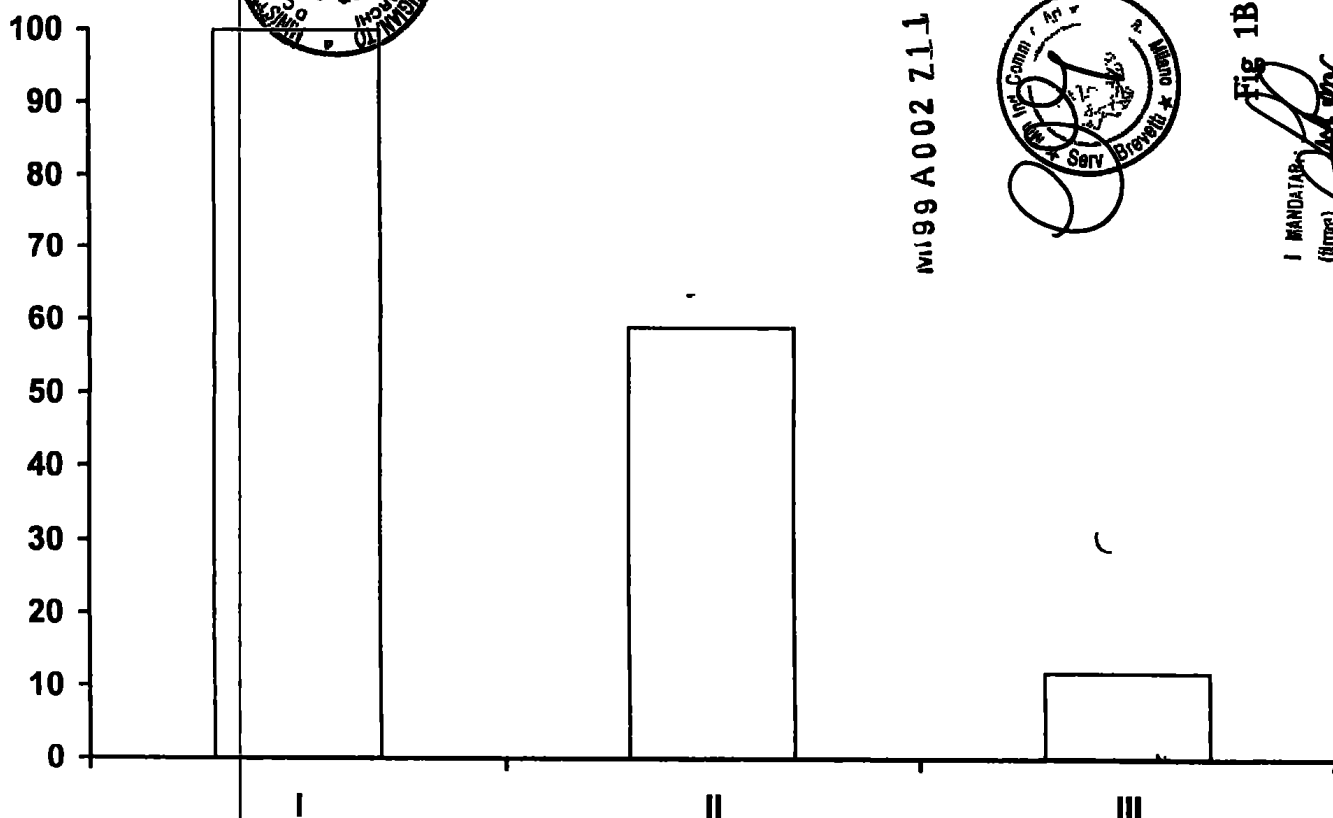


027

separata senza tumore
non tumore
% tumor free survival
MANDIARI
(fitted)
for de a per gill study

1/ de animala quarati
2/17

% of cured animals



MI99 A 002 Z111

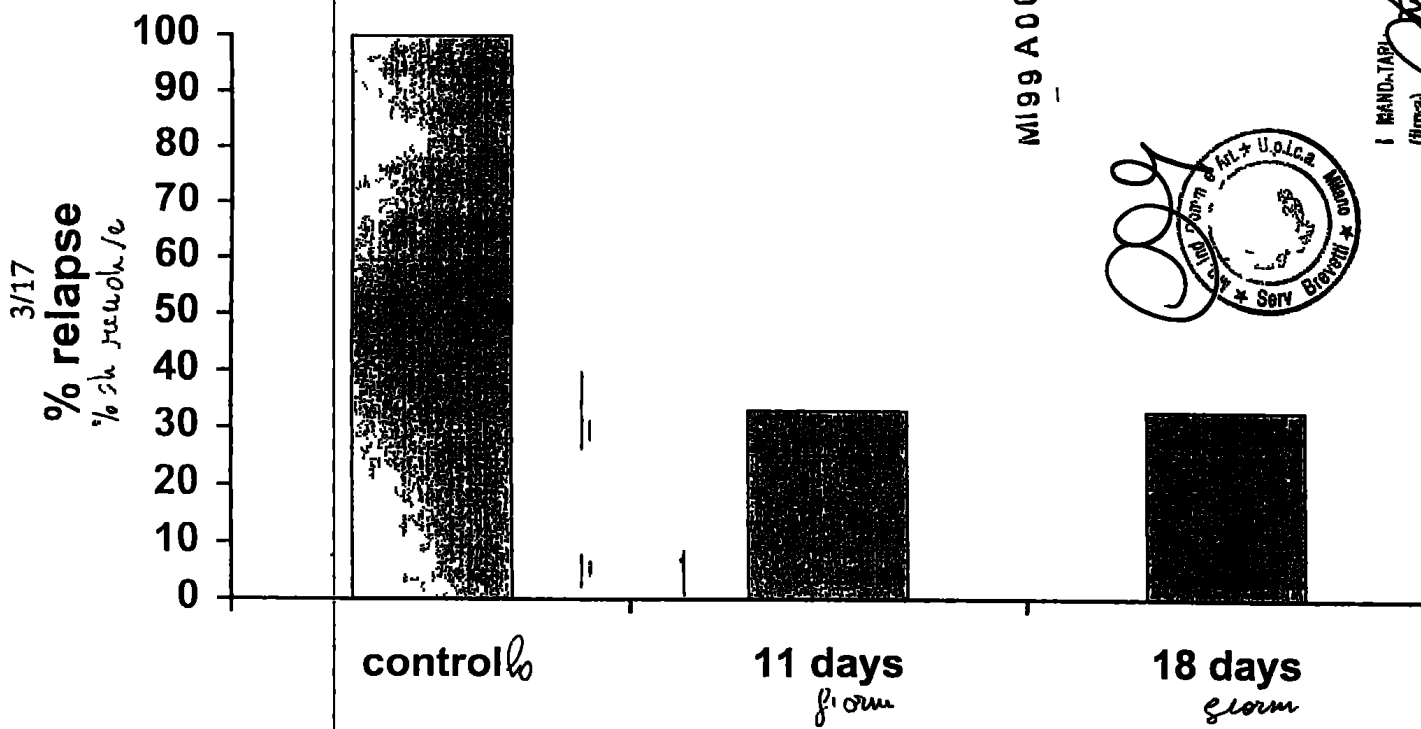


Fig 1B

I MANDATAR
(signature)
(last name + first name)

382

380



MI99 A002 Z11

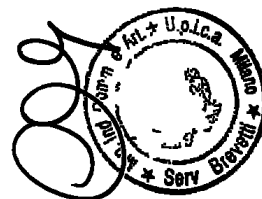


Fig. 1C

1 RAND. TAP
(Time)
(1/2 sec per gli altri)

383

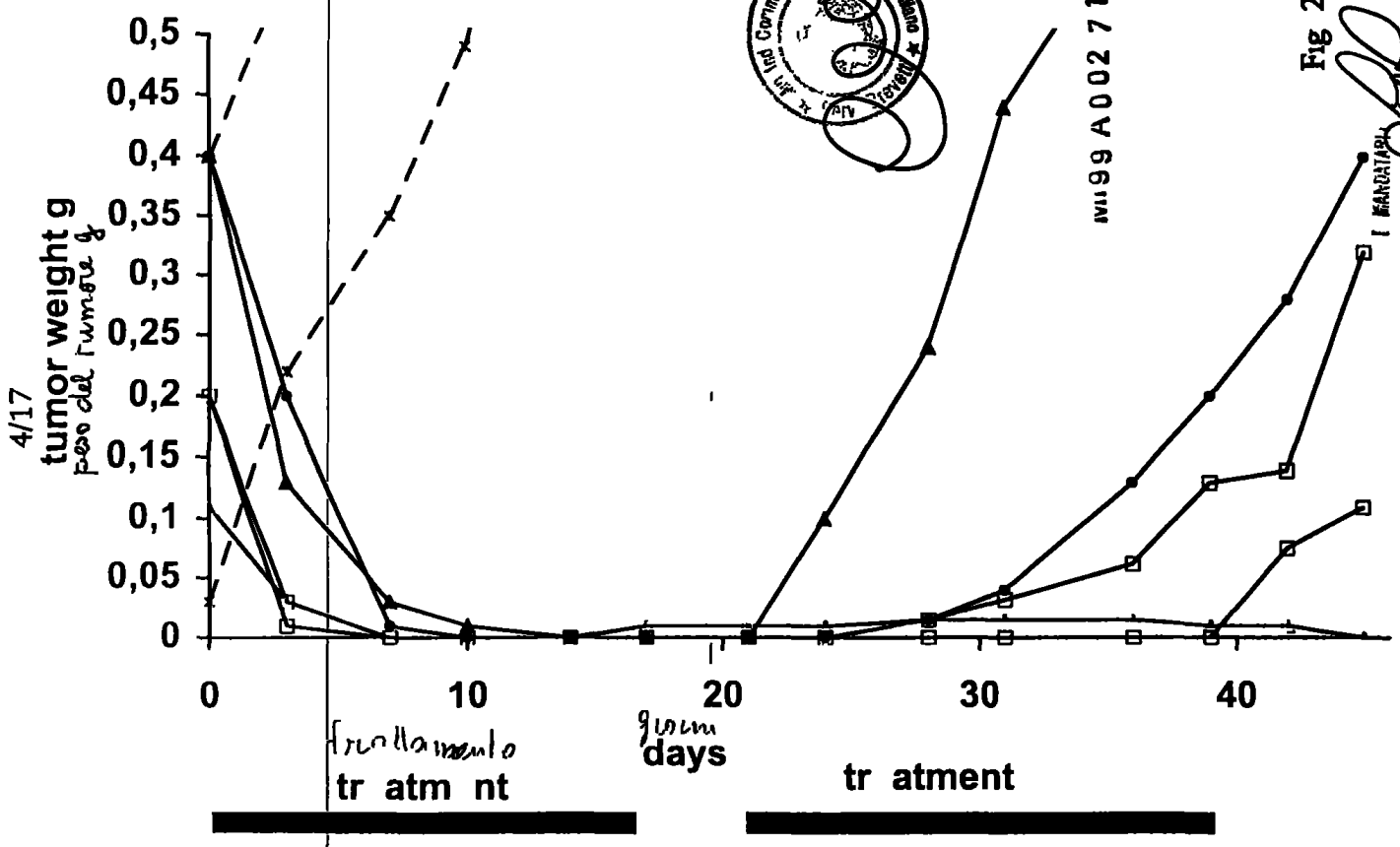
381



W199 A002711

Fig 2

[Signature]
1. MANDATARI
(firma)
1. MANDATARI
(firma)



384

11

382

MI99 A002 711



lines parentale

□ KU 812

parental line

topo KU tumore con 1 re attiv

● KU mice 1

relapsed tumor

topo KU con tumore con 2 re attiv

▲ KU mice 2

relapsed tumor

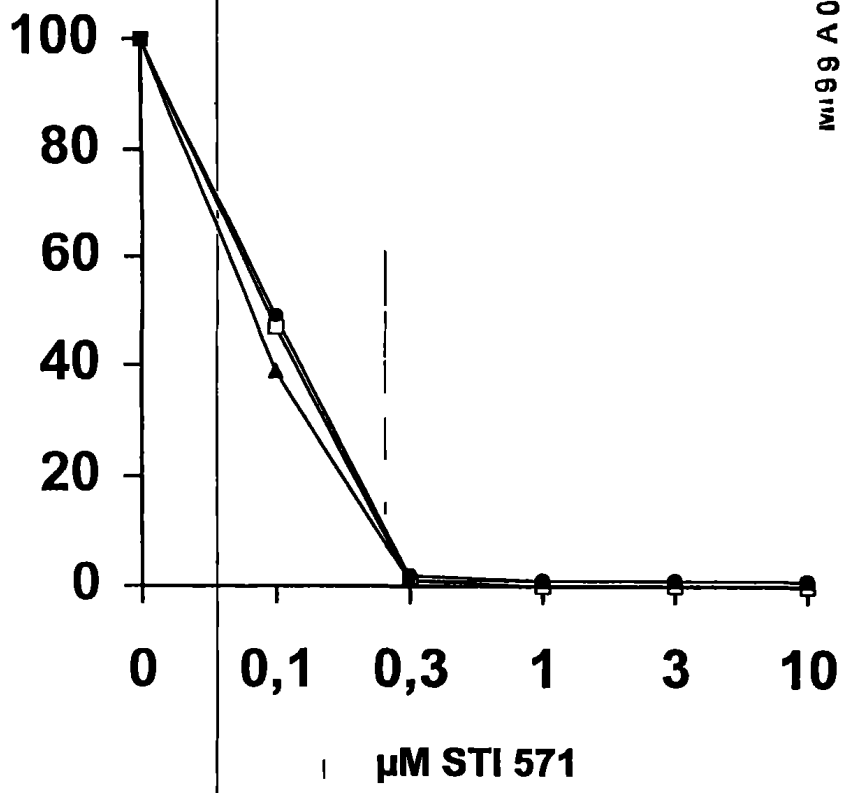
Fig 3

I MANDARIN

(film)

(copy ad a per gli altri)

^{51}Cr relapsed control
% of control

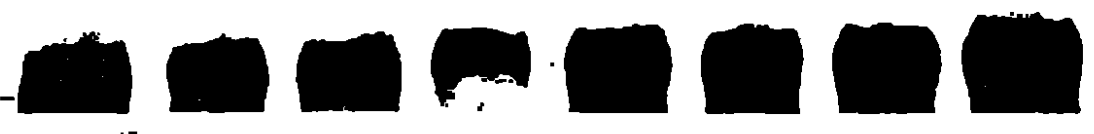
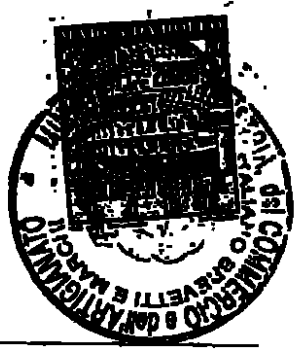


6/17

Rel	Ctrl	Rel	Ctrl	R I	Ctrl	Rel	Ctrl
n.t.	n.t.	2 h	2 h	4 h	4 h	6 h	6 h



anti - ptyr



anti - abl

MI 99 A 002 711

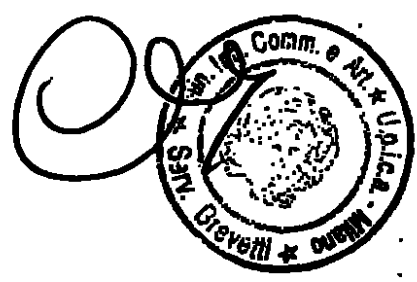


Fig. 4

I MANDATARI
(firma)
(per se e per gli altri)

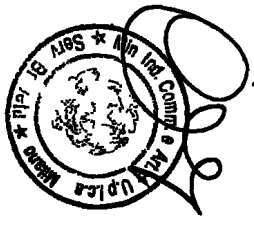
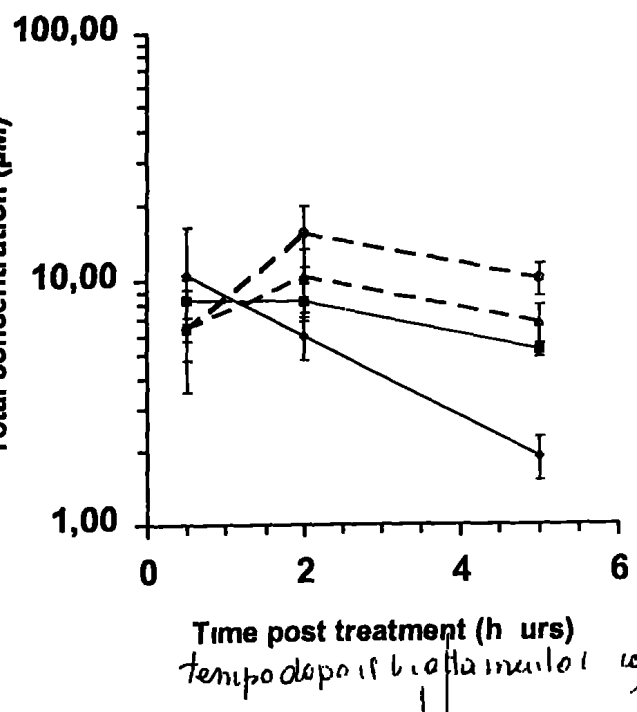


Fig. 5
MANDARINI
(Ritiro)
(per la per gli altri)

11720046611

Concentrazione Totale (μM)
Total concentration (μM)



- gruppo di controllo del plasma
- Plasma control group (1 treatment) (trattamento unico)
- Plasma CGP (repeated treatment) (trattamento ripetuto)
- gruppo di controllo del tumore
- Tumor control group (one treatment) (trattamento unico)
- Tumor CGP (repeated treatment) (trattamento ripetuto)

7/17

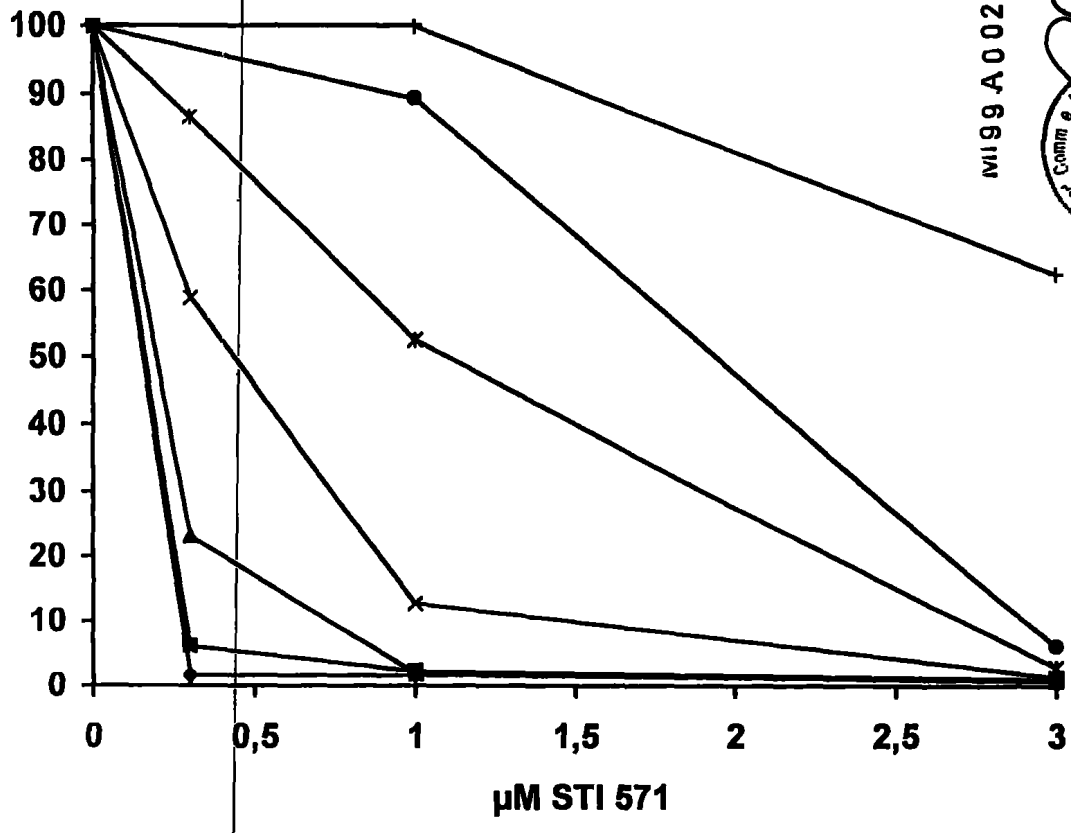
387

387

11

385

8/17
% c ntrol



MI 99 A 002 71 1

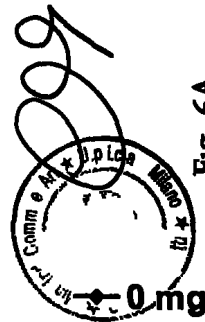


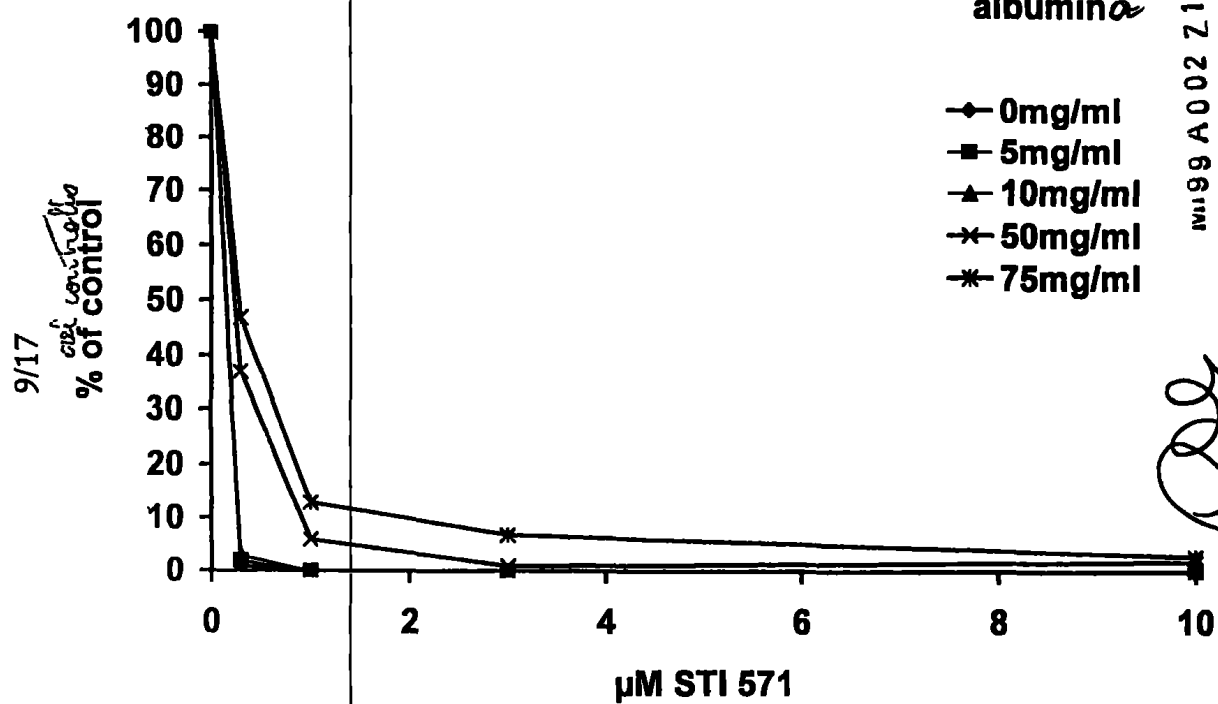
Fig 6A

MANDATARI
(titres)
(per 10 e per pti altri)

~~200~~

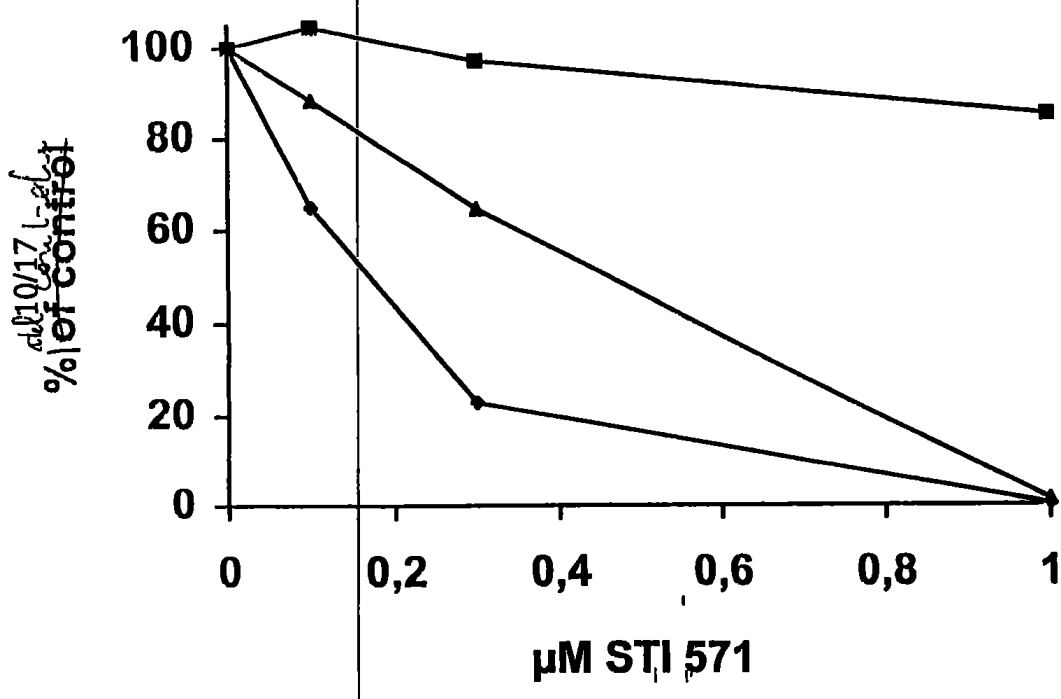
[] **NON DATARE**
 (Firma)
 (Firma)

W199A002Z11





proliferation serum (alpha1 1150-130)



MI 99 A 002 711

- 0% serum
- 15% serum (alpha1 1150 μg/ml)
- 15% serum (alpha1 130 μg/ml)

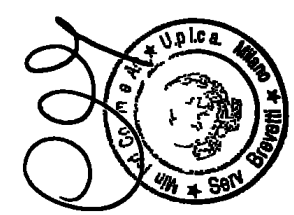
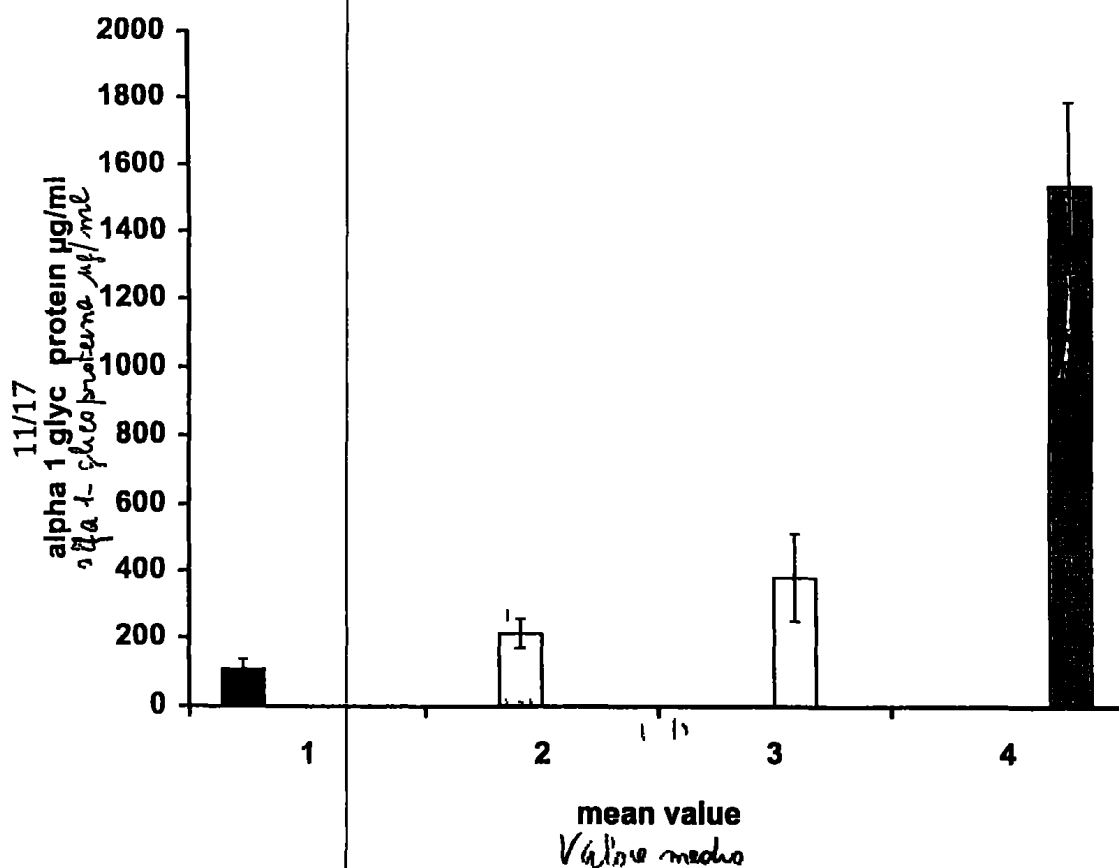


Fig. 7
MANDATARI (firma)
(per sé e per gli altri)

326

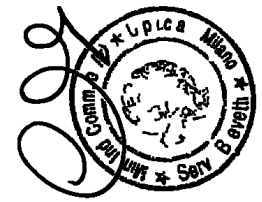
380

11 20 11 20 11 20



- topo 8A
- ctrl mice (11)
 - pretreated mice (8)
 - mice 8 day after tumor injection (6)
 - bearing tumor mice (>1g) (7)
- topo de portar tumor

11/17 11/17 11/17



1 2 3 4

12/17



alpha
alpha-1
glycoproteina

MI 99 A 002 71.1.



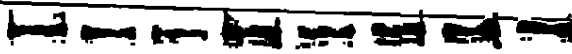
Fig. 8B

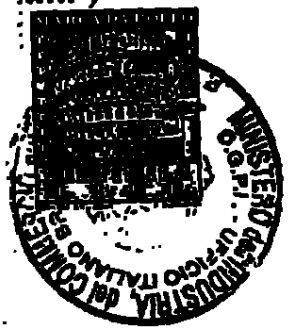
MANDATARI
(firma)

[Signature]
(per sé e per gli altri)

14/17

391 ~~393~~

STI571	-	+	+	-	-	+	+	-
1. ^{91-glyc, acida} 31 acid-glyc.	+	+	-	-	+	+	-	-
Erythromycin	+	+	+	+	-	-	-	-
Anti-phospho Tyr ¹⁰³²⁰								
Anti-Abl								



M199 A002 Z11

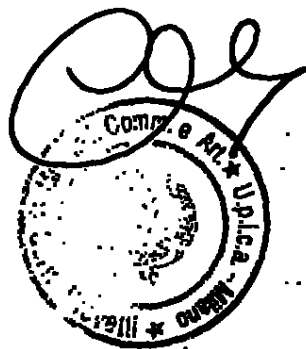
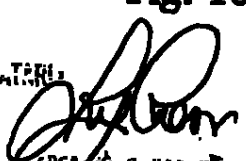


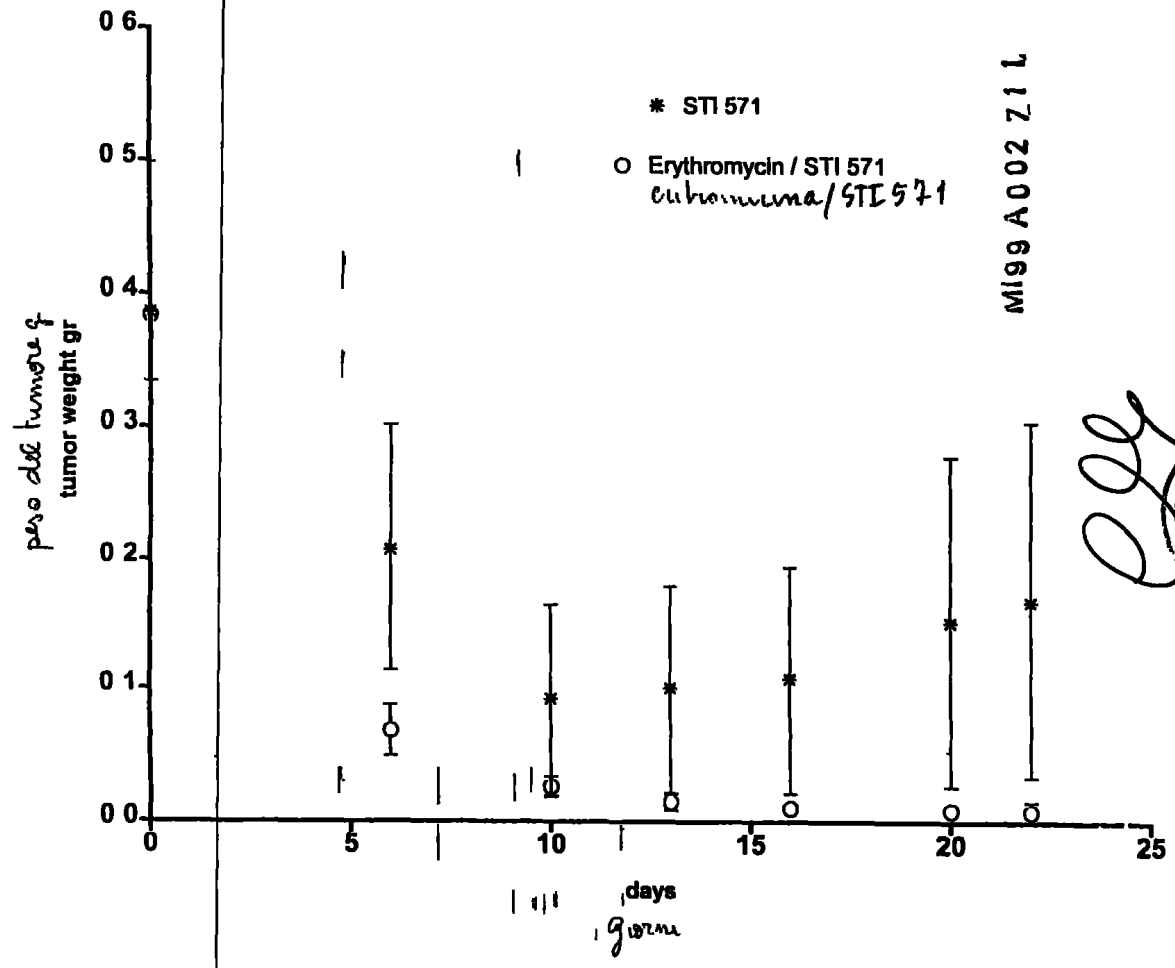
Fig. 10

1. BENDATELLI
(firmato)

(per sé e per gli altri)

394

392

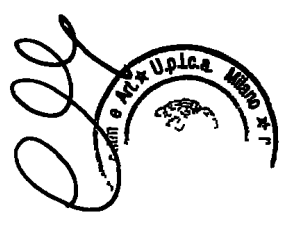
15/17



MI99 A 002 Z 1 L

Fig 11A

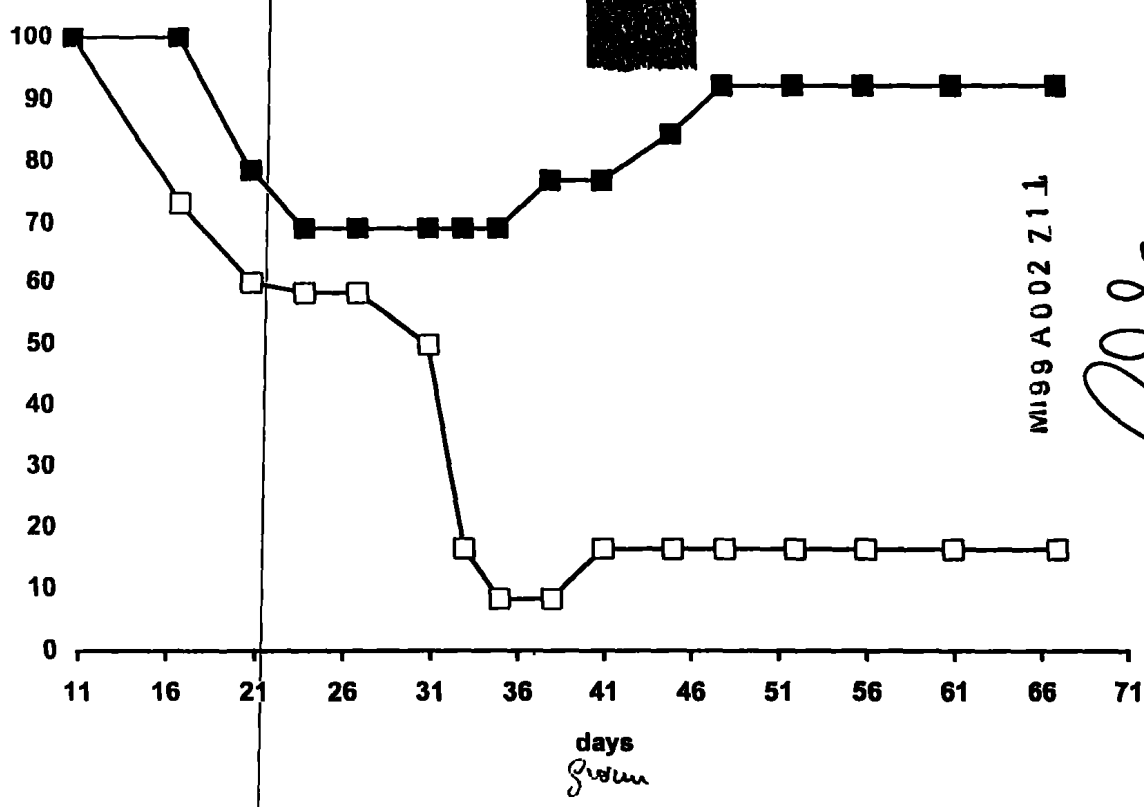
BRUNDA ABRI
(true)
1984 06 14, P 284



% di topiche portano tumore

16/17

%bearing tumor mice



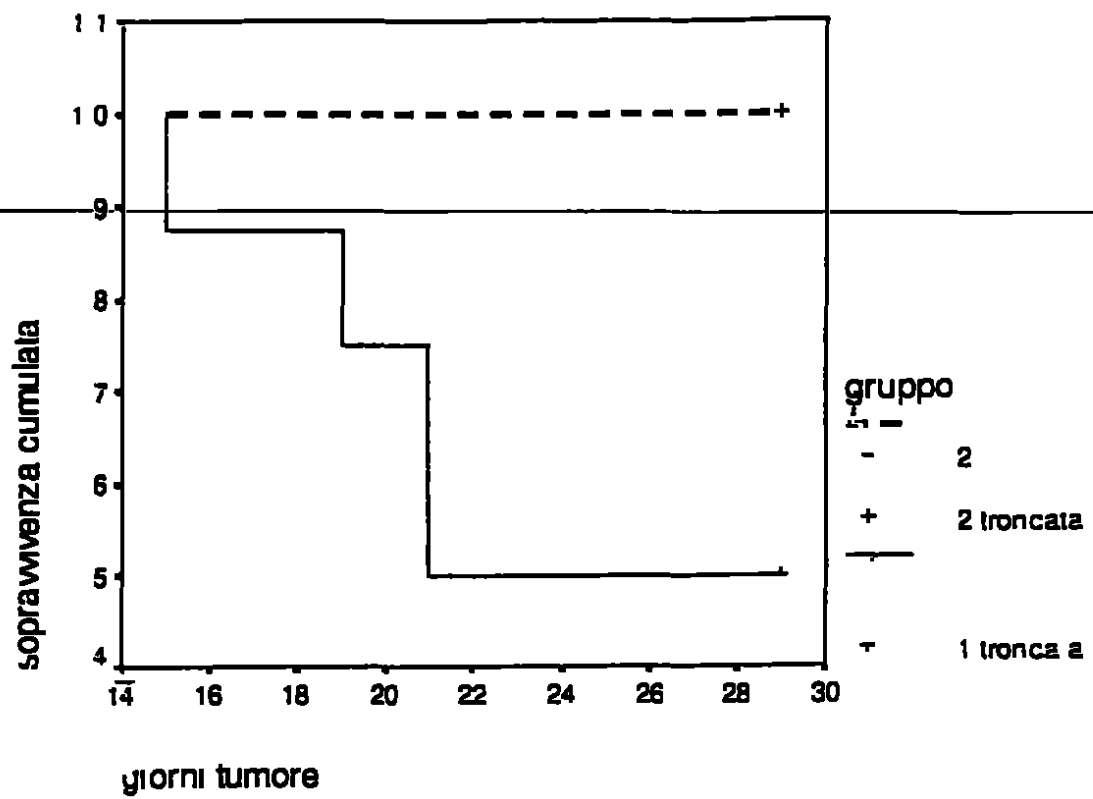
MI99 A002 Z11



Fig 11B

I MANDATARI:
(firma)
per la e per gli altri

Funzioni di sopravvivenza



MI99 A002 Z11



Fig 12

I MANDATARI
(firma)

(per sé e per gli altri)