



No. 12-059362- -00000-0000

Fecha: 2012-04-11 15:34:46

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra: 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 86



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE N° _____

54. TÍTULO

USO DE N-(4-((3-(2-AMINO-4-PIRIMIDINIL)-2-PIRIDINIL)OXI)FENIL)-4-(4-METIL-2-TIENIL)-
1-FTALAZINAMINA EN EL TRATAMIENTO DE CÁNCER RESISTENTE AL AGENTE
ANTIMITÓTICO.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____ A61K 31/502

71. SOLICITANTE _____ AMGEN INC.

DOMICILIO _____ Thousand Oaks, California, Estados Unidos de América

74. APODERADO _____ DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C. _____



No. 12-059362- -00000-0000

Fecha: 2012-04-11 15:34:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 86

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE:

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **AMGEN INC.**

Dirección: One Amgen Center Drive,
Thousand Oaks, California 91320, Estados
Unidos de América.

Nacionalidad o domicilio: Thousand Oaks,
California, Estados Unidos de América

Lugar de Constitución: California, Estados
Unidos de América

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)

Nombre: **DILIA MARÍA RODRÍGUEZ
D'ALEMAN**

Dirección: Carrera 11 No. 86-53, piso 6

Teléfono: 6 181088 Fax: 6350824

E-mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número 41.654.882
TP 20824 CSJ

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: **VER HOJA ANEXA**

Dirección:

Nacionalidad o domicilio:

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2010/048247 Fecha 09 de septiembre de 2010

Publicación Internacional No. WO 2011/031842 A1 Fecha 17 de marzo de 2011

6 TÍTULO (54)

USO DE N-(4-((3-(2-AMINO-4-PIRIMIDINIL)-2-PIRIDINIL)OXI)FENIL)-4-(4-METIL-2-TIENIL)- 1-FTALAZINAMINA EN EL TRATAMIENTO DE CÁNCER RESISTENTE AL AGENTE ANTIMITÓTICO.

7 Clasificación Internacional (51) A61K 31/502

8 Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

Estados Unidos de América

(32) Fecha

11 de septiembre de 2009

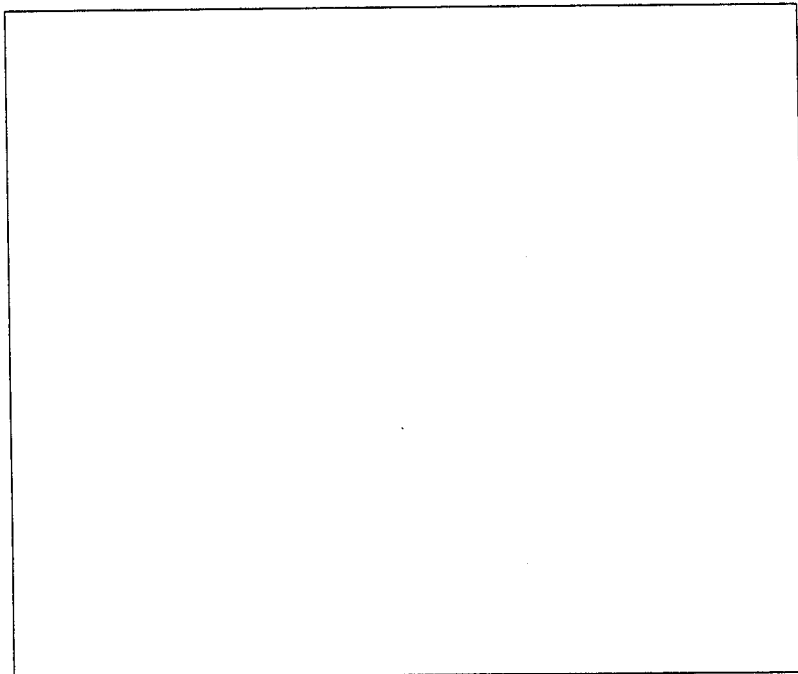
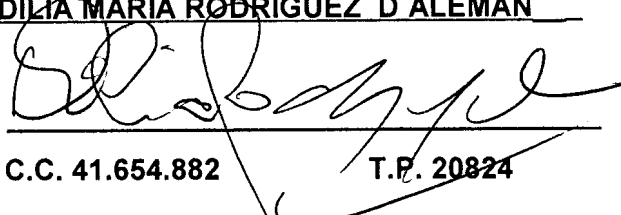
(31) Número de Solicitud

61/241.527

9 Comprobante de pago No. 12-28227

Fecha 21 de marzo de 2012

- ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones Regla 4.17
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros

11 FIGURA CARACTERÍSTICA**12 Solicito la concesión de la patente**NOMBRE : DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMANFIRMA: 

C.C. 41.654.882

T.P. 20824

ANEXO

INVENTORES

1.) PAYTON, Marc
(149 S. Dewey Avenue, Newbury Park, California 91320, Estados Unidos de América);

2.) KENDALL, Richard
(3246 Rickey Court, Thousand Oaks, California 91360, Estados Unidos de América).

• 000002

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 0028227	
				Bogotá D.C., Marzo 21 de 2012 - 17:10:32	
RECIBIDO DE : CLARKE MODET			NI 830.008.643		
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325109562	20/03/2012	66.900.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO	
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1136 CANCELACION REGISTRO MARCARIO POR NO USO Y/O VULGARIZAC	710.000.00	710.000.00	
				\$710.000.00	
=====					
SON: **SETECIENTOSDIEZ MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***					
Responsable: _____					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 12-059362- -00000-0000 Fecha: 2012-04-11 15:34:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONAL Act. 411 PRESENTACION Folios: 86					
. 000003					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240 Marzo 21 de 2012 - 17:10:45					
P- 3284					

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a métodos para usar el compuesto,

N-(4-((3-(2-amino-4-pirimidinil)-2-piridinil)oxi)fenil)-4-(4-metil-2-tienil)-1-ftalazinamina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para tratar cánceres, incluyendo tumores sólidos, que se han vuelto resistentes a tratamiento con agentes quimioterapéuticos, incluyendo agentes anti-mitóticos tales como taxanos, y/o otros agentes anti-cáncer, incluyendo agentes inhibidores de aurora cinasa. La invención también incluye métodos para tratar cánceres refractarios para tales tratamientos al administrar una composición farmacéutica, que comprende el compuesto para un sujeto con cáncer.

. 000004

5

USO DE N-(4-((3-(2-AMINO-4-PIRIMIDINIL)-2-PIRIDINIL)OXI)FENIL)-4-
(4-METIL-2-TIENIL)-1-FTALAZINAMINA EN EL TRATAMIENTO DE CÁNCER
RESISTENTE AL AGENTE ANTIMITÓTICO

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al uso de N-(4-((3-(2-amino-4-pirimidinil)-2-piridinil)oxi)fenil)-4-(4-metil-2-tienil)-1-ftalazinamina para tratar cánceres, incluyendo tumores sólidos, que se han vuelto resistentes al tratamiento con agentes antimitóticos y/u otros agentes quimioterapéuticos.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El cáncer es una de las enfermedades que afectan más ampliamente a la humanidad, y una causa líder de muerte a nivel mundial. Solo en los Estados Unidos de América, el cáncer es la segunda causa líder de muerte, superada sólo por la enfermedad cardiaca. El cáncer se caracteriza a menudo por la desregulación de los procesos celulares normales o la proliferación celular no regulada. Las células que se han transformado en células cancerosas tienden a proliferar en una forma incontrolada y no regulada lo que conduce a, en algunos casos, metástasis o la propagación del cáncer. La desregulación de la proliferación celular podría resultar de la modificación de uno o más genes, responsables de las trayectorias celulares que controlan el progreso del ciclo celular. O podrían resultar de modificaciones del ADN (incluyendo pero no limitado a mutaciones, amplificaciones, reordenamientos, eliminaciones, y el silenciamiento del gen epigenético) en uno o más reguladores de

. 000005

punto de control del ciclo celular que permiten que la célula se mueva desde una fase del ciclo celular a otra sin control. Otra forma es que las modificaciones en la maquinaria celular pudieran resultar en errores mitóticos que no estén debidamente detectados o reparados, y la célula pudiera permitirse que se mueva a través del ciclo celular sin control.

La mitosis es el proceso por el cual la célula eucariótica segrega sus cromosomas duplicados en dos núcleos hijos idénticos. Generalmente, viene seguido de inmediato por la citocinesis, que divide los núcleos, citoplasma, organelos y las membranas celulares en dos células hijas que contienen proporciones aproximadamente iguales de estos componentes celulares. La mitosis y la citocinesis definen conjuntamente la fase mitótica (M) del ciclo celular - la división de la célula madre en dos células hijas, genéticamente idénticas entre sí y a su célula progenitora.

El proceso de la mitosis es complejo y altamente regulado. La secuencia de eventos se divide en fases distintas, que corresponden a la realización de un conjunto de actividades y el comienzo de la siguiente. Estas etapas son profase, prometafase, metafase, anafase y telofase. Durante el proceso de la mitosis se condensan y se adhieren cromosomas duplicados a las fibras que jalarán a las cromátidas hermanas a lados opuestos de la célula. La célula se divide entonces en la citocinesis, para producir dos células hijas idénticas. Los errores en la mitosis o bien puede matar una célula por apoptosis o causar mal segregación de los cromosomas que puede conducir al cáncer.

Normalmente, los puestos de control del ciclo celular se

. 000006

activan si se detectan errores en el ADN (por ejemplo, daño en el ADN). Si estos errores en el genoma no pueden ser reparados, la célula normalmente experimenta la apoptosis. Sin embargo, si la célula se permite moverse a través de su ciclo celular y avanzar sin control, entonces se pueden acumular más mutaciones con el tiempo. Estas modificaciones de genes se pueden acumular y llevar eventualmente a la progenie de células a características neoplásicas premalignas o malignas (por ejemplo proliferación descontrolada) a través de la adaptación.

Los agentes antimitóticos son agentes contra el cáncer que inhiben la función de los microtúbulos. Los microtúbulos son polímeros de proteína formados por heterodímeros de α -tubulina y β -tubulina que juegan un papel importante en la formación del aparato eje mitótico y la citocinesis al final de la mitosis. Los agentes contra el cáncer que atacan los microtúbulos representan un enfoque probado para intervenir en la proliferación de células cancerosas.

Se han desarrollado varias clases de agentes antimitóticos como agentes contra el cáncer. Los taxanos son la clase más prominente de agente antimitótico que incluye paclitaxel (taxol) y docetaxel (taxotere). Los alcaloides vinca son una clase de agentes que desestabilizan el microtúbulo que incluye vincristina, vinblastina, vindesina, y vinorelbina. Otra clase emergente incluye las epotilonas (ixabepilona). Estos agentes antimitóticos actúan para prevenir la proliferación de células de cáncer ya sea al estabilizar o desestabilizar los microtúbulos. Esta inhibición directa de microtúbulos resulta en el paro celular y muerte a través de apoptosis o catástrofe mitótica. El

paclitaxel fue el primer compuesto de la serie de taxano en ser descubierto. El docetaxel, un análogo estructural de paclitaxel, se descubrió más tarde. El paclitaxel y docetaxel se usan comúnmente para tratar una variedad de malignidades humanas, que incluyen cáncer de ovarios, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pulmonar, cáncer gástrico, cáncer del esófago, cáncer de próstata, y sarcoma de Kaposi relacionado con SIDA. El efecto colateral primario de los taxanos es mielosupresión, neutropenia primaria, mientras que otros efectos colaterales incluyen edema periférico, y neurotoxicidad (neuropatía periférica).

La resistencia a los taxanos es un factor que complica el tratamiento del cáncer con éxito y se asocia a menudo con el incremento en la expresión del gen *mdr-1* codificado y su producto, la P-glicoproteína (P-gp). Otros mecanismos documentados de resistencia adquirida a los taxanos incluyen mutaciones de tubulina, sobreexpresión, amplificación, y el cambio de isotipo). Las mutaciones en α - o β -tubulina inhiben la unión de los taxanos en el lugar correcto en los microtúbulos; esto hace al fármaco ineficaz. Además, algunas células resistentes también muestran aurora cinasa incrementada, una enzima que promueve la terminación de la mitosis.

Los alcaloides vinca (Vincas; también referidos como alcaloides de plantas), son capaces de unirse a la subunidad de β -tubulina de microtúbulos, lo que bloquea su capacidad para polimerizarse con la subunidad de α -tubulina para formar microtúbulos completos. Esto causa que se detenga el ciclo celular en metafase, lo que lleva a muerte celular apoptótica

debido, en ausencia de un eje mitótico intacto, a que los cromosomas duplicados no se alinean a lo largo de la placa de división. La investigación ha identificado alcaloides vinca asimétricos diméricos: vinblastina, vincristina, vinorelbina, y vindesina, cada uno de los cuales es útil en el tratamiento de cáncer, incluyendo cánceres de vejiga y testículos, sarcoma de Kaposi, neuroblastoma y enfermedad de Hodgkin, y carcinoma pulmonar y cáncer de mama. Los principales efectos colaterales de los alcaloides vinca son que pueden causar neurotoxicidad y mielosupresión en pacientes.

La resistencia a los alcaloides vinca puede ocurrir rápidamente en modelos experimentales. Los efectos antitumorales de alcaloides vinca se pueden bloquear en líneas de células resistentes a múltiples fármacos que sobreexpresan transportadores de eflujo de fármaco mediado por el transportador del casete unido a ATP (ABC) tal como P-gp y MRP1. Otras formas de resistencia se originan de mutaciones en β -tubulina lo que impide la unión de los inhibidores a su objetivo.

Otros agentes quimioterapéuticos incluyen inhibidores de topoisomerasa, tales como irinotecano y topotecano (inhibidores de tipo I) y amsacrina, etoposido, fosfato de etoposido y tenoposido (inhibidores de tipo II). Los inhibidores de topoisomerasa afectan la síntesis de ADN y, en particular, trabajan para prevenir la transcripción y replicación del ADN.

Aún otra clase de agentes quimioterapéuticos son la clase de antibióticos de antraciclina que incluyen daunorubicina, doxorubicina, idarubicina, epirubicina, y mitoxantrona. Hoy en día, las antraciclinas se usan para tratar un gran número de

cánceres incluyendo linfomas, leucemias, y cánceres uterinos, de ovarios, pulmón y mama. Las antraciclinas trabajan al formar radicales libres de oxígeno que rompen las hebras de ADN por ello inhibiendo la síntesis y función de ADN. Uno de los efectos
5 colaterales principales de las antraciclinas es que pueden dañar las células del músculo cardíaco lo que lleva a toxicidad cardíaca.

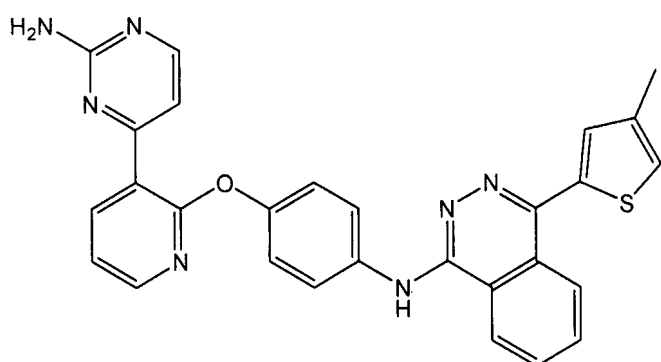
La resistencia a agentes anticáncer, incluyendo, sin limitación, agentes quimioterapéuticos y agentes antimetabólicos,
10 se ha vuelto una desventaja principal en el tratamiento del cáncer. Tal resistencia ha resultado en que los pacientes tengan más resistencia cruzada a los efectos de muchos fármacos diferentes. Más particularmente, es un problema la resistencia a fármacos múltiples. Además, tal resistencia a tratamiento
15 anticáncer lleva inevitablemente a la muerte del paciente. En consecuencia, el desarrollo de resistencia a fármacos se mantiene como un problema con todas las terapias anticáncer y, en consecuencia, permanece la necesidad de identificar un tratamiento para cánceres que ya no sean receptivos, o sólo sean
20 marginalmente efectivos, a tratamientos de cáncer, incluyendo, tratamiento tradicional con agentes quimioterapéuticos, tales como taxanos y alcaloides vinca, así como agentes anticáncer que experimentan pruebas clínicas para enfoque regulador.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona el uso del compuesto, N-(4-((3-(2-amino-4-pirimidinil)-2-piridinil)oxi)fenil)-4-(4-metil-2-tienil)-1-ftalazinamina (también referido en la presente como

. 000010

"AMG 900" o "el compuesto") y formas de sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para el tratamiento de cánceres avanzados, incluyendo tumores sólidos y células de cáncer, que son resistentes a agentes antimitóticos aprobados por el gobierno, de estándar de cuidado tales como taxanos, incluyendo paclitaxel y docetaxel y otros agentes quimioterapéuticos, incluyendo doxorubicina y otros agentes a administrarse en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer. El AMG 900 tiene una estructura química de:



La invención proporciona además el uso de una composición farmacéutica que comprende este compuesto, o una forma de sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para tratamiento terapéutico, profiláctico, agudo o crónico del cáncer y células de cáncer en pacientes que se han tratado previamente con agentes quimioterapéuticos, incluyendo agentes anti-mitóticos. En una modalidad, la invención proporciona el uso de AMG 900 en la fabricación de medicamentos y composiciones farmacéuticas para métodos de tratamiento del cáncer en sujetos quienes se han tratado previamente con agentes antimitóticos, incluyendo inhibidores del eje mitótico y agentes anti-microtubulina, u otros fármacos usados en quimioterapia de cáncer (también referido en la presente como agentes quimioterapéuticos), incluyendo doxorubicina, daunorubicina, dactinomicina, colcicina.

. 000011

vinblastina, vincristina, etoposido y mitoxantrona. En otra modalidad, la invención proporciona un método para tratar tipos de tumor resistente al taxano, incluyendo cáncer pulmonar de célula no pequeña, cáncer de mama, y cáncer de próstata refractario de hormona en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto una cantidad de dosificación efectiva de AMG 900 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para tratar el tumor resistente al taxano.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 es una gráfica que describe los efectos de AMG 900 y Taxol en Líneas de Células MES-SA y MES-SA Dx5, valores EC_{50} de p-Histona H3;

La Figura 2 es una gráfica que describe los efectos de AMG 900 y Taxol en Líneas de Célula resistentes al Taxol NCI-H460 Precursor y NCI-H460, valores EC_{50} del contenido de ADN de Ciclo Celular;

La Figura 3 es una gráfica que describe el efecto de Líneas de Células Resistentes al Taxol AMG 900 y Taxol en MDA-MB-231 y MDA-MB-231, valores EC_{50} del contenido de ADN de Ciclo Celular;

La Figura 4 es una gráfica que ilustra cómo AMG 900 Inhibe el crecimiento de tumores de xenoinjerto MES-SA Dx5 establecidos; y

La Figura 5 es una gráfica que describe los efectos del Tratamiento de AMG 900 y Taxol en el Crecimiento de Xenoinjertos resistentes al NCI-H460-Taxol establecidos.

La Figura 6A es una gráfica que describe los efectos de AMG 900 en HCT116 precursor, Figura 6B líneas de célula HCT116

• 000012

resistentes a AZD1152 y Figura 6C líneas de células resistentes al Paclitaxel.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 El AMG 900, un inhibidor de Aurora cinasa, se ha encontrado que proporciona una ventaja sorprendente e inesperada sobre los agentes terapéuticos de cáncer de estándar de cuidado actuales que se dirigen a la tubulina (tal como paclitaxel, ixabepilona, y alcaloides vinca) y otros agentes quimioterapéuticos (tal como
10 doxorubicina), incluyendo AZD1152, en ensayos clínicos humanos. Particularmente, AMG 900 entrega eficacia para inhibir o hacer más lento el progreso o crecimiento de tumores que han desarrollado resistencia cruzada a agentes anti-mitóticos a través de una variedad de mecanismos propuestos, incluyendo por
15 ejemplo, a través del eflujo de fármaco mediado por el transportador del casete unido a ATP (ABC), amplificación o modificación del gen de tubulina, o alteraciones estructurales en proteína de tubulina α y β . Además, el AMG 900 ataca células proliferantes en la fase G₂M del ciclo celular y por lo tanto no
20 es posible que cause la neuropatía periférica apreciada con antimitóticos que atacan los microtúbulos.

DEFINICIONES

Las siguientes definiciones debieran ayudar además en el entendimiento del alcance de la invención descrita en la presente.

Los términos "cáncer" y "canceroso" cuando se usa en la presente se refiere a o describe la condición fisiológica en

5 sujetos que se caracteriza típicamente por crecimiento celular no regulado. Los ejemplos del cáncer incluyen, sin limitación, carcinoma, linfoma, sarcoma, blastoma y leucemia. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen carcinoma de célula
5 escamosa, cáncer pulmonar, cáncer pancreático, cáncer cervical, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon, y cáncer de cabeza y cuello. Aunque el término "cáncer" como se usa en la presente no se limita a ninguna forma específica de la enfermedad, se considera que los métodos de la invención serán
10 particularmente efectivos para cánceres, en un sujeto, que se han vuelto resistentes en algún grado al tratamiento con agentes anti-cáncer, incluyendo sin limitación agentes quimioterapéuticos, agentes antimitóticos, antraciclinas y similares, y para cánceres que han recaído después del
15 tratamiento con tal agentes anti-cáncer.

El término "agente quimioterapéutico" cuando se usa en la presente se refiere al tratamiento de un cáncer al eliminar células cancerosas. Este término adicionalmente se refiere a fármacos antineoplásicos usados para tratar cáncer o una
20 combinación de estos fármacos en un régimen de tratamiento estandarizado. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, sin limitación, agentes alquilantes tales como cisplatina, carboplatina, oxaliplatina; alcaloides incluyendo alcaloide vincas (los ejemplos incluyen vincristina, vinblastina, vinorelbina y vindesina) y taxanos (ejemplos incluyen paclitaxel (Taxol) y docetaxel); inhibidores de topoisomerasa tales como irinotecano, topotecano, amsacrina, etoposido, fosfato de etoposido y teniposido; y varios agentes antineoplásicos tales

000014

como dactinomicina, doxorubicina, epirubicina, bleomicina y otros.

El término "que comprende" se pretende que este abierto, incluyendo los componentes indicados pero no excluye otros
5 elementos.

El término "resistente a múltiples fármacos" cuando se usa en la presente se refiere a células de cáncer resistentes a múltiples fármacos de estructuras químicas diferentes y/o resistentes a fármacos dirigidos en objetivos diferentes.

10 El término "refractario" cuando se usa aquí se pretende que se refiera a, sin rendirse a, resistente o sin respuesta a tratamiento, estímulos (terapia) o cura, incluyendo resistencia a agentes curativos terapéuticos múltiples. "Refractario" cuando se usa en la presente en el contexto de caracterizar un cáncer o
15 tumor se pretende que se refiera al cáncer o tumor que no responde o que tiene una resistencia o respuesta disminuida al tratamiento con uno o más agentes anticáncer. El tratamiento típicamente es continuo, prolongado y/o repetitivo durante un periodo de tiempo que resulta en el cáncer o tumor que desarrolla
20 resistencia o se vuelve resistente a tal tratamiento muy similar.

El término "sujeto" como se usa en la presente se refiere a cualquier mamífero, incluyendo humanos y animales, tales como vacas, caballos, perros y gatos. De esta manera, la invención puede usarse en pacientes humanos así como en sujetos y pacientes veterinarios. En una modalidad de la invención, el sujeto es un humano.

La frase "terapéuticamente efectivo" se pretende que cuantifique la cantidad del compuesto (AMG 900), que alcanzará

una reducción en tamaño o severidad del cáncer o tumor durante el
tratamiento del cáncer por terapias convencionales de cáncer
antimitóticas, mientras que reduce o evita efectos colaterales
adversos asociados con terapias de cáncer anti-mitóticas
5 convencionales.

Los términos "tratar", "tratado" y "tratamiento" como se usa
en la presente se refiere a terapia, incluyendo sin limitación,
terapia curativa, terapia profiláctica, y terapia preventiva. El
tratamiento profiláctico generalmente constituye ya sea la
10 prevención del inicio de trastornos totalmente o retardar el
inicio de una fase pre-clínicamente evidente de trastornos en los
individuos.

El término "sales farmacéuticamente aceptables" abarca sales
usadas comúnmente para formar sales de metal alcalinas y para
15 formar sales de adición de ácidos libres o bases libres. La
naturaleza de la sal no es crítica, con la condición de que sea
farmacéuticamente aceptable. Las sales de adición ácidas
farmacéuticamente aceptables apropiadas del compuesto pueden
prepararse a partir de un ácido inorgánico o de un ácido
20 orgánico. Los ejemplos de tales ácidos inorgánicos incluyen, sin
limitación, ácido clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico,
carbónico, sulfúrico y fosfórico. Los ejemplos de ácidos
orgánicos incluyen, sin limitación clases alifáticas,
cicloalifáticas, aromáticas, arilalifáticas, heterocíclicas,
carboxílicas y sulfónicas de ácidos orgánicas, los ejemplos de
los cuales son ácidos fórmico, acético, adípico, butírico,
propiónico, succínico, glicólico, glucónico, láctico, málico,
tartárico, cítrico, ascórbico, glucurónico, maleico, fumárico,

pirúvico, aspártico, glutámico, benzoico, antranílico, mesílico,
 4-hidroxibenzoico, fenilacético, mandélico, embónico (pamoico),
 metansulfónico, etansulfónico, etandisulfónico, bencensulfónico,
 pantoténico, 2-hidroxietansulfónico, toluensulfónico,
 5 sulfanílico, ciclohexilaminosulfónico, canfórico,
 canforsulfónico, diglucónico, ciclopentanpropiónico,
 dodecilsulfónico, glucoheptanoico, glicerofosfónico, heptanoico,
 hexanoico, 2-hidroxi-etansulfónico, nicotínico, 2-
 naftalensulfónico, oxálico, palmoico, pectínico, persulfúrico, 2-
 10 fenilpropiónico, pícrico, piválico, propiónico, succínico,
 tartárico, tiociánico, mesílico, undecanoico, esteárico,
 algénico, β -hidroxibutírico, salicílico, galactárico y
 galacturónico.

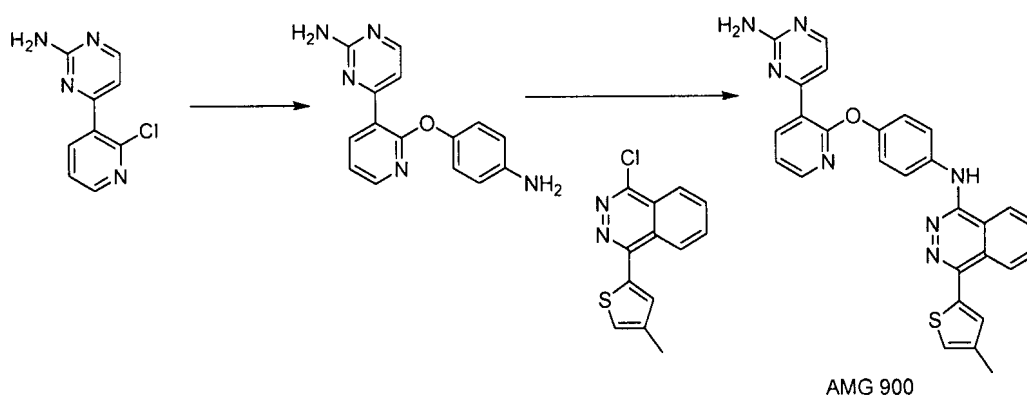
Las sales de adición base farmacéuticamente aceptables
 15 apropiadas del compuesto incluyen, sin limitaciones, sales
 metálicas tales como sales hechas de aluminio, calcio, litio,
 magnesio, potasio, sodio y zinc, o sales hechas de bases
 orgánicas que incluyen aminas primarias, secundarias, terciarias
 y aminas sustituidas que incluyen aminas cíclicas tales como
 20 cafeína, arginina, dietilamina, N-etil piperidina, aistidina,
 glucamina, isopropilamina, lisina, morfolina, N-etil morfolina,
 piperazina, piperidina, trietilamina, trimetilamina. Todas las
 sales contempladas en la presente pueden prepararse por medios
 convencionales a partir de los compuestos correspondientes al
 hacer reaccionar, por ejemplo, el ácido o base apropiado con el
 compuesto.

El AMG 900, N-(4-((3-(2-amino-4-pirimidinil)-2-
 piridinil)oxi)fenil)-4-(4-

. 000017

metil-2-tienil)-1-ftalazinamina, puede prepararse por el procedimiento análogo al que se describe en la publicación PCT WO2007087276, Métodos de Ejemplo A1 o A2 en la página 70 pero usando 1-cloro-4-(4-metil-2-tienil)ftalazina como el material de partida, en conjunto con Ejemplos 15 (página 50), 25 (página 55) y 30 (página 59). Estos procedimientos también se describen en la Patente E.U.A. No. 7,560,551, cuya especificación se incorpora en la presente para referencia en su totalidad. Específicamente, AMG 900 puede prepararse como se describe en el Ejemplo 1 enseguida.

Ejemplo 1



Síntesis de N-(4-((3-(2-amino-4-pirimidinil)-2-piridinil)oxi)fenil)-4-(4-metil-2-tienil)-1-ftalazinamina (AMG 900)

Etapa 1: 4-(2-cloropiridin-3-il)pirimidin-2-amina

En un matraz de fondo redondo de 500 mL purgado con argón colocado en un baño de isopropanol, se agregó metal de sodio (3.40g, 148mmol) lentamente al metanol (180mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente (TA) por alrededor de 30 minutos. A esto se le agregó clorohidrato de guanidina (12.0 mL, 182 mmol) y la mezcla se agitó a TA por 30 minutos, seguido por la adición de (E)-1-(2-cloropiridin-3-il)-3-(dimetilamino)prop-2-en-1-ona (12.0 g, 57.0 mmol), anexando condensador de aire, se mueve la reacción

. 000018

19

a un baño de aceite, donde se calentó hasta alrededor de 50 °C por 24 h. Aproximadamente la mitad del metanol se evaporó bajo presión reducida y los sólidos se filtraron bajo vacío, luego se lavaron con bicarbonato de sodio saturado (NaHCO_3) y H_2O , se seca al aire para proporcionar 4-(2-cloropiridin-3-il)pirimidin-2-amina como sólido blanco opaco. MS m/z = 207 $[\text{M}+1]^+$. Calculado para $\text{C}_9\text{H}_7\text{ClN}_4$: 206.63.

Etapas 2: 4-(2-(4-aminofenoxi)piridin-3-il)pirimidin-2-amina

A un tubo resellable se le agregó 4-aminofenol (1.3 g, 12 mmol), carbonato de cesio (7.8 g, 24 mmol), y DMSO (16 ml, 0.75 M). La mezcla se calentó hasta 100 °C por 5 minutos, y luego se agregó 4-(2-cloropiridin-3-il)pirimidin-2-amina (2.5 g, 12 mmol), y la mezcla de reacción se calentó hasta 130 °C durante la noche. Una vez completada, como se juzga por LCMS, la mezcla de reacción se permitió enfriar hasta TA y se diluyó con agua. Se filtró el precipitado resultante, y el sólido se lavó con agua y éter de dietilo. El sólido se tomó entonces en 9:1 CH_2Cl_2 :MeOH y se pasa a través de una almohadilla de gel de sílice con 9:1 CH_2Cl_2 :MeOH como eluyente. El solvente se concentró *in vacuo* para proporcionar el producto deseado, 4-(2-(4-aminofenoxi)piridin-3-il)pirimidin-2-amina. MS m/z = 280 $[\text{M}+1]^+$. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}$: 279.30.

Etapas 3: 1-Cloro-4-(4-metiltiofen-2-il)ftalazina

La 1,4-dicloroftalazina (1.40 g, 7.03 mmol), ácido 4-metiltiofen-2-ilborónico (999 mg, 7.03 mmol), y $\text{PdCl}_2(\text{DPPF})$ (721 mg, 985 μmol) se agregaron en un tubo sellado. El tubo se purgó con Argón. Luego se agregaron carbonato de sodio (2.0 M en agua) (7.74 ml, 15.5 mmol) y 1,4-dioxano (35.2 ml, 7.03 mmol). El tubo

. 000018

se selló, se agitó a TA por 5 min, y se coloca en un baño de aceite precalentado a 110 °C. Después de 1 h, la LC-MS muestra un producto y subproducto (acoplamiento doble), y dicloroftalazina de material de partida. La reacción se enfrió hasta TA, se filtra a través de una almohadilla de celite con la ayuda de acetato de etilo (EtOAc), se concentra, y se carga en una columna. El producto se purificó por cromatografía de columna usando Hex para remover la mancha superior, luego 80:20 hexanos:EtOAc para recolectar el producto. Se obtuvo el producto, 1-cloro-4-(4-metiltiofen-2-il)ftalazina como sólido amarillo. La LC-MS muestra que el producto se contaminó con una cantidad pequeña de dicloroftalazina y subproducto bisacoplado. MS m/z = 261 $[M+1]^+$. Calculado para $C_{13}H_9ClN_2S$: 260.12.

Etapas 4: N-(4-((3-(2-amino-4-pirimidinil)-2-piridinil)oxi)fenil)-4-(4-metil-2-tienil)-1-ftalazinamina

A la 4-(2-(4-aminofenoxi)piridin-3-il)pirimidin-2-amina y 1-cloro-4-(4-metil-2-tienil)ftalazina se le agregó tBuOH. La mezcla resultante se calentó a 100 °C en un tubo sellado por 16 horas. La reacción se diluyó con éter de dietilo y carbonato de sodio saturado y agitado vigorosamente. Los sólidos resultantes se filtraron y se lavaron con agua, éter de dietilo y se secaron al aire para proporcionar N-(4-((3-(2-amino-4-pirimidinil)-2-piridinil)oxi)fenil)-4-(4-metil-2-tienil)-1-ftalazinamina como un sólido blanco opaco. MS m/z = 504 $[M+H]^+$. Calculado para $C_{28}H_{21}N_7OS$: 503.58.

Método LC-MS:

Se corrieron muestras en un sistema LC-MSD modelo Agilent 1100 con una columna de fase inversa de Agilent Technologies XDB-

. 000020

C₈ (3.5 μ) (4.6 x 75 mm) a 30 °C. La velocidad de flujo fue constante y está en el intervalo desde alrededor de 0.75 mL/min hasta alrededor de 1.0 mL/min.

La fase móvil usa una mezcla de solvente A (H₂O/0.1% HOAc) y solvente B (AcCN/0.1% HOAc) con un periodo de tiempo de 9 min para un gradiente desde 10% hasta 90% de solvente B. El gradiente se siguió por un periodo de 0.5 min para regresar a 10% de solvente B y una re-equilibrio de 2.5 min 10% de solvente B (mojado) de la columna.

También pueden usarse otros métodos para sintetizar AMG 900. Se conocen en la técnica muchas transformaciones químicas sintéticas, así como metodologías de grupo protector, útiles para sintetizar AMG 900. La literatura de transformación química orgánica útil incluye, por ejemplo, R. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers (1989); T.W. Greene and P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª edición, John Wiley and Sons (1999); L. Fieser and M. Fieser, Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1994); A. Katritzky and A. Pozharski, Handbook of Heterocyclic Chemistry, 2ª edición (2001); M. Bodanszky, A. Bodanszky, The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1984); J. Seyden-Penne, Reductions by the Alumino- and Borohydrides in Organic Synthesis, 2ª edición, Wiley-VCH, (1997); y L. Paquette, editor, Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1995).

Se probó AMG 900 por su capacidad para reducir o inhibir el progreso del tumor en varias líneas celulares (*in-vitro*) y tipos de tumor sólido múltiples (*in-vivo*), algunos de los cuales se han

expuesto previamente a y desarrollado resistencia a agentes antimitóticos de estándar de cuidado, incluyendo taxanos y alcaloides vinca, así como a otros agentes quimioterapéuticos. Los siguientes Ejemplos y datos resultantes ilustrarán la capacidad de AMG 900 para tratar cáncer, incluyendo cáncer resistente a las terapias actualmente de estándar de cuidado, incluyendo agentes antimitóticos, tales como paclitaxel, y otros fármacos usados en conjunto con quimioterapia, tal como doxorubicina. A menos que se indique de otra manera, la forma de base libre de AMG 900 se usó en los Ejemplos descritos de aquí en adelante.

Ejemplo 2

Para investigar si la supresión inducida por AMG 900 de proliferación celular que inhibe la actividad de aurora cinasa A y B, se evaluó *in vitro* el efecto antiproliferativo de AMG 900 usando 32 líneas de células de tumor humano. Como se muestra en la Tabla 1 y Tabla 2, AMG 900 exhibe actividad antiproliferativa a través de tanto las líneas de célula de tumor sólido y hematológico. Esta actividad antiproliferativa se apreció con concentraciones de AMG 900 en el intervalo nanomolar bajo (valores EC_{50} 1 hasta 5 nM). De forma importante, cuatro de estas líneas de célula de tumor sólido sensible a AMG 900 (HCT15, MES-SA Dx5, 769P, y SNU449) son resistentes a paclitaxel y otros agentes quimioterapéuticos. Las células de cáncer resistentes a múltiples fármacos de estructuras químicas diferentes y/u resistentes a fármacos dirigidos en objetivos diferentes se llaman "resistente a múltiples fármacos". Un mecanismo prominente

de resistencia a múltiples fármacos (MDR) utilizado por células de cáncer es un eflujo de fármaco mediado por una familia de transportadores de casete enlazados a ATP (ABC), tales como el producto de gen *mdr-1*, glicoproteína P (P-gp). Por ejemplo, la

5 línea de célula uterina humana resistente a la doxorubicina MES-SA Dx5, expresa P-gp y es resistente (30- a 1200 veces sobre la línea precursora) a un número de agentes quimioterapéuticos incluyendo daunorubicina, dactinomicina, colcicina, vinblastina, vincristina, paclitaxel, etoposido, y mitoxantrona. Para

10 investigar además la actividad de AMG 900 en células que expresan MDR, se probaron tres líneas de célula de tumor resistente a taxol y se comparan a su línea celular precursora respectiva. Como se muestra en Figuras 1-3, y Tabla 3, AMG 900 mantiene potencia en todas las tres líneas de célula de tumor sensible y

15 resistente al taxol alineado con valores $EC_{50} < 2$ nM. Taxol muestra una pérdida importante de potencia (10 hasta 100 veces) en las sublíneas de tumor que expresan P-gp comparado con líneas precursoras. En conjunto estos datos indican que AMG 900 inhibe la fosforilación de histona H3 (un sustrato próximo de aurora

20 cinasa B) y bloquea la división celular de líneas de célula de tumor resistente a paclitaxel y otros agentes quimioterapéuticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales de Prueba

Artículo de prueba: AMG 900

Formulación: DMSO

Fuente: Amgen

Inc.

. 000023

Reactivos Críticos

Soluciones de Lavado y Fijado

5	1X PBS	Solución salina amortiguada en fosfato de Dulbecco, Cat# 14090-144, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA 92008
	H ₂ O destilada (d)	Cat# 2F7115, Baxter Health care Corp., Deerfield, IL 60015
10	90 % Metanol en dH ₂ O	Alcohol metílico, Cat# 3041-10, Mallinckrodt Chemicals, Phillipsburg, NJ 08865
15	Solución Amortiguadora de Lavado (en 1XPBS) - análisis FACS 1% BSA 0.2% Triton X-100	Cat# 810111, Qty 50 mL, ICN Biomedicals Inc. Aurora, OH 44202 Cat# 9284, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63178
20	Solución Amortiguadora de Lavado - Cellomics 1X PBS suero de cabra normal al 1% 1% Tween-20	Solución salina amortiguada en fosfato de Dulbecco, Cat# 14090-144, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA 92008 Cat# G-9023-10 mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63178 Cat#P-1379, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63178
	Solución Amortiguadora Ácida (en dH₂O) HCL 2N 0.5% Triton X-100	Ácido Clorhídrico al 37 %, Cat# JT953000, # Lote no disponible, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63178 Cat# 9284, # Lote no disponible, 500 mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63178

. 000024

5	Fijación	en	
	Formaldehído	2X	
	(en 1X PBS)	-	
	Cellomics		Cat#F1635-500mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63178
	Formaldehído	al	Cat# 85191, Fluka/Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63178
	20%,		
	glutaraldehído	al	
	0.024%		

Reactivos

10	Yoduro de propidio/Solución amortiguadora de teñido ARNsa	de	PI/ARNsa, Cat# 550825, 100mL, Becton Dickinson, San Jose, CA 95131
	DMSO, sulfóxido de dimetilo	de	Cat# D2650, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63178
15	Anticuerpo anti-fosfo-Histona H3 (Ser10) (p-Histona H3), marcador de mitosis		Cat# 06-570, Upstate Cell Signaling Solutions, Lake Placid, NY 12946
	Anticuerpo anti-conejo de cabra Alexa Flour 488	IgG de	Cat # A11001, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA 92008
20	Triclorohidrato Hoechst 33342, trihidrato		Cat# H3570, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA 92008
	Conjugado anti-bromodeoxiuridina, IgG1 de ratón, PRB-1 monoclonal, Alexa Fluor 647 (anti-BrdU, Alexa-647)		Cat# A21305, # Lote54656A, Invitrogen Corp. Carlsbad, CA 92008
	Conjugado anticuerpo anti-	FITC	100 pruebas, Cat# 559341, # Lote 60509, BD Pharmingen, San Diego,

. 000025

	activo de conejo Caspasa-3 monoclonal (anti- Caspasa-FITC)	CA 92121
5	Reactivo de etiquetado BrdU (concentración madre no especificada)	Cat#00-0103, Zymed Laboratories, Carlsbad, CA 92008
	1X Tripsina-EDTA, 0.5%	Cat# 25300-054, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA 92008
10	1X Verseno	Cat# 15040-066, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA 92008
	Medio McCoy's 5A, (+)L-Glut	Cat# 16600-082 Invitrogen Corp., Carlsbad, CA 92008
	Medio RPMI 1640 (+) L-Glut.	Cat# 11875-093, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA 92008
15	DMEM, alta glucosa, (+) 4.5 g/L D-glucosa, (+)L-Glut.	Cat# 11965-092 Invitrogen Corp., Carlsbad, CA 92008
	FBS, suero de bovino fetal, origen - Australia	Cat# 10099-141, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA 92008
20	Taxol (Paclitaxel)	Cat# T7402, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63178
	Vinblastina	Cat# V1377, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63178

Equipo de laboratorio, Suministros, Software

Centrífuga de mesa refrigerada	Allegra X-15R Centrifuge, Beckman Coulter, Fullerton, CA 92834
software GraFit v5	Erithacus Software, Horley Surrey,

000026

	RH6 9YJ, UK
software XLfit 4.2	Excel, Microsoft Inc., USA
GraphPad Prism v5	GraphPad Software, Inc. 2236 Avenida de la Playa, La Jolla, CA 92037
5 Citómetro de flujo	Becton Dickinson LSRII Flow Cytometer, BD Biosciences, San Jose, CA 95131
10 Placa de cultivo de tejido de 96 pozos, fondo plano con tapa de evaporación baja, estéril	Cat# 3595, # de Lote no disponible, Corning Incorp. Life Sciences, Lowell MA 01851
15 Placa de cultivo de tejido de 12 pozos, fondo plano con tapa de evaporación baja, estéril	Cat# 353043, # de Lote no disponible, BD Labware, Franklin Lakes, NJ 07417
15 Placa de cultivo de tejido de 6 pozos, fondo plano con tapa de evaporación baja, estéril	Cat# 353046, # de Lote no disponible, BD Labware, Franklin Lakes, NJ 07417
20 Tiras de tubo PCR usadas para teñido FACS	Cat# 20170-004, # Lote 711C7-7074, tubo de tira de 0.2 mL para PCR, VWR Intl., West Chester, PA 19380.
Tubos Eppendorf de 1.5mL	Cat# 20901-551, # Lote no disponible, VWR Intl., West Chester, PA 19380
Placas Packard View-96	Cat#-6005182, # Lote No disponible, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA 02451
Lavador de placa ELX405	Cat# ELX405HT, BioTek, Winooski, VT 05404
DW multigoteo (de pozo profundo)	Cat# 5840177, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA 02454
Barrido de	Cellomics-Thermo Fisher Inc.

000027

configuración	Waltham, MA 02454
Cellomics VTi	

Métodos

La actividad de AMG 900 se evaluó *in vitro* en líneas de tumor resistente al fármaco y precursoras derivadas de tejidos uterinos, de mama, y pulmón. Se evaluaron los puntos finales de ciclo celular y p-Histona H3 por citometría de flujo y formación de imagen celular de alto contenido, respectivamente.

Célula Humana y Cultivo Celular

Se obtuvieron líneas de célula de tumor humano de la American Type Culture Collection (Manassas, VA) a menos que se indique de otra manera. Todas las células se mantienen a 37 grados Celsius en una atmósfera de CO₂ al 5%. Se obtuvo una línea de célula CAL51 (ACC 302) derivada de tumor de mama de DSMZ (GmbH). Se obtuvieron líneas de célula HCT-116_JH (genotipo p21+/+) y HCT-116_JH (genotipo p21-/-) derivadas de tumor de colon bajo licencia de John Hopkins University Genetics Resources Core Facility.

Líneas de célula de tumor humano con Media de cultivo Correspondiente

Línea de célula de tumor		Origen	Condiciones de crecimiento de cultivo de tejido
			(todos los medios contienen 1x de glutamina)
HCT-116_JH (genotipo p21 +/+)		Colon	McCoy's 5A, 10% FBS + L-glutamina
HCT-116_JH (genotipo p21 -/-)		Colon	McCoy's 5A, 10% FBS + L-glutamina
HCT-15		Colon	RPMI 1640, 10% FBS + L-glutamina
HT29		Colon	McCoy's 5A, 10% FBS + L-glutamina

000028

	SW-620	Colon	RPMI 1640, 10% FBS + L-glutamina
	SW480	Colon	RPMI 1640, 10% FBS + L-glutamina
	HOP-92	Pulmón	RPMI 1640, 10% FBS + L-glutamina
	HOP-62	Pulmón	RPMI 1640, 10% FBS + L-glutamina
	NCI-H460	Pulmón	RPMI 1640, 10% FBS + L-glutamina
	A549	Pulmón	Ham's F12K +10% FBS+ L-glutamina
5	PC-3	Próstata	RPMI 1640, 10% FBS + L-glutamina
	DU-145	Próstata	RPMI 1640, 10% FBS + L-glutamina
	BT-549	Mama	RPMI 1640, 10% FBS + L-glutamina
	BT-474	Mama	RPMI 1640, 10% FBS + L-glutamina
	MDA-MB-231	Mama	RPMI 1640, 10% FBS + L-glutamina
	T47D	Mama	RPMI 1640, 10% FBS + L-glutamina
	MCF-7 p53(+)	Mama	RPMI 1640, 10% FBS + L-glutamina
	MCF-7 p53(-)	Mama	RPMI 1640, 10% FBS + L-glutamina
10	CAL51	Mama	DMEM+ +10% FBS+ 1XNEAA + L-glutamina
	SK-OV-3	Ovarios	McCoy's 5A, 10% FBS + L-glutamina
	MES-SA/Dx5	Uterino	McCoy's 5A, 10% FBS + L-glutamina
	MES-SA	Uterino	McCoy's 5A, 10% FBS
			MEM, 10% FBS, Na Piruvato 1mM, NEAA
	SK-MEL-2	Piel	0.1mM + L-glutamina
	A498	Renal	MEM, 10% FBS, 1x NEAA + L-glutamina
	769P	Renal	RPMI 1640, 10% FBS + L-glutamina
15	CAKI-1	Renal	McCoy's 5A, 10% FBS + L-glutamina
	SK-HEP-1	Hígado	MEM, 10% FBS, 1x NEAA + L-glutamina
			RPMI 1640, 10% FBS, HEPES 10 mM, Na
	SNU449	Hígado	Piruvato 1mM + L-glutamina
	K562	Leucemia	RPMI 1640, 10% FBS + L-glutamina
	MOLT-4	Leucemia	RPMI 1640, 10% FBS + L-glutamina
	HL-60	Leucemia	RPMI 1640, 10% FBS + L-glutamina
	Jurkat	Leucemia	RPMI 1640, 10% FBS + L-glutamina
20	U266-B1	Mieloma	RPMI 1640, 15% FBS + L-glutamina
	RPMI-8226	Mieloma	RPMI 1640, 20% FBS + L-glutamina
	NCI-H460 taxol-r	Pulmón	RPMI 1640, 10% FBS, 75 nM Taxol
	MDA-MB-231(F11)-luc	Mama	DMEM, 10% FBS
	MDA-MB-231(F11)-luc taxol-r	Mama	DMEM, 10% FBS, 50 nM Taxol

Panel de Línea de Célula de Tumor Sólido tratada con AMG 900:

Ensayo Antiproliferativo (ArrayScan VTi)

Se sembraron células de tumor en una placa de 96 pozos Packard View en 100 µL de medio completo apropiado a una densidad de 3000 o 5000 células/pozo dependiendo de la cinética de

crecimiento de línea celular (ampliamente definido como lento vs. rápido). Se realizaron todas las diluciones usando estación de trabajo Biomek FX. Las células del día siguiente se trataron con AMG 900 (intervalo de dosis de 11 puntos 0.156 hasta 0.0003 μM) con una concentración de DMSO final de 0.12% en el medio. Después de 24 horas, se removi6 el medio que contiene compuesto y las células se lavaron con medio completo. La células se incubaron entonces en 100 μL de medio completo fresco (sin compuesto) por 48 horas. Después de 48 horas, las células se fijaron al agregar 100 μL de solución amortiguadora de fijación a 100 μL de medio completo. Las células se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos. La solución amortiguadora de fijación se aspiró y las células se permeabilizaron entonces en 100 μL de Solución Amortiguadora de Lavado por 30 minutos a temperatura ambiente seguido por la adición de 100 μL de solución amortiguadora de teñido de ADN e incuba a temperatura ambiente por 30 minutos en la oscuridad. A continuación, las células se lavaron con 100 μL de Solución Amortiguadora de Lavado y almacenan en 100 μL 1x PBS a 4 grados Celsius hasta el análisis. Se obtuvieron los datos celulares por barrido de las placas de 96 pozos en un sistema de formación de imagen ArrayScan VTi (Cellomics). Se realizó la cuantificación de área nuclear de célula individual e intensidad con base en fluorescencia de pigmento de ADN Hoechst 33342. Se estableció un umbral en el área nuclear con base en el pozo de control tratado con DMSO para cuantificar el número de núcleos de tamaño normal a partir de residuos de núcleo y células poliprolides. Este valor umbral se aplicó para enumerar el número de núcleos normales en seis campos de imagen/pozo usando una

. 000030

magnificación de 10x. Se calcularon las curvas de concentración de dosis y valores EC_{50} usando una ecuación de 4 parámetros.

Panel de Línea Celular Hematológica Tratada con AMG 900:

Evaluación de Contenido de ADN de Ciclo Celular Multiparámetros

5 (Citometría de Flujo)

Se sembraron células de tumor en una placa de 96 pozos profunda de 300 μ L en 150 μ L de medio completo apropiado a una densidad de 100,000 células/pozo. Las células se trataron con AMG 900 (intervalo de dosis de 10 puntos 0.156 hasta 0.0003 μ M) con una concentración de DMSO final de 0.2% en el medio. Dos horas antes del tiempo de cosechado, las células se pulsaron con BrdU a la concentración final de 1:100 en el medio. Después de 48 horas, 100 μ L de medio se removió de cada pozo con un pipeteador de pozos múltiples. Luego las células se transfirieron a tiras de tubo de PCR en 200 μ L de medio. Se centrifugaron las células a 2000 rpm a 18°C por 4 minutos y se aspiró el sobrenadante. Las células se fijaron entonces en 200 μ L de metanol al 90% enfriado en hielo y se almacena a -20°C por al menos 24 horas antes de teñir el anticuerpo y ADN. Las células fijadas se centrifugaron a 2000 rpm por 4 minutos para remover el metanol al 90%. Las células se lavaron con 200 μ L de Solución Amortiguadora de Lavado y luego se tratan con 100 μ L Solución Amortiguadora Ácida a temperatura ambiente por 1 hora en la oscuridad. Las células se lavaron dos veces con 200 μ L de Solución Amortiguadora de Lavado (hasta que el pH fue 7.0, confirmado con papel de pH). Las células se incubaron con un cóctel de anticuerpo anti-BrdU-Alexa 647 (3 μ g/mL) y anti-Caspase 3-FITC (20 μ l/pozo) en Solución Amortiguadora de Lavado por 2 horas a temperatura ambiente en la

000031

oscuridad. Las células teñidas se centrifugaron y se lavaron con 200 µL de Solución Amortiguadora de Lavado. Las células se contratiñeron con 200 µL de yoduro de propidio (PI) durante la noche a 4°C en la oscuridad. Se adquirieron y analizaron datos por citometría de flujo (LSRII). Una puerta de umbral se aplicó de acuerdo con el contenido de ADN, BrdU, y Poblaciones positivas/negativas de Caspasa 3 con base en control de DMSO y grupos tratados con fármaco inferior/superior. Se representaron los datos como un porcentaje de SubG1 el contenido de ADN, el contenido de ADN 4N+, BrdU, y poblaciones positivas escindidas de Caspasa 3. Las curvas de respuesta a la concentración y valores EC₅₀ se calcularon usando una ecuación de 4 parámetros.

Líneas de Células MES-SA Dx5 y MES-SA Tratadas con AMG 900 o Paclitaxel (taxol): Ensayo de p-Histona H3 (ArrayScan VTi)

Se colocaron células MES-SA Dx5 y MES-SA a una densidad de 10,000 células/pozo en placa de 96 pozos en medio completo y se cultiva por 24 horas. Las células del día siguiente se trataron con AMG 900 o taxol sobre un intervalo de concentración de 10 puntos (1.25 µM hasta 0.0024 µM) por 24 horas con una concentración de DMSO final de 0.1% en el medio. Las células se lavaron y fijaron al agregar 100 µL de Solución Amortiguadora de Fijación en Formaldehído 2X por 10 minutos y temperatura ambiente. Las células se lavaron y permeabilizan con 100 µL de Solución Amortiguadora de Lavado por 15 minutos. Las células se inmunotiñieron con anticuerpo p-Histona H3 (5 µg/mL) e incubó a temperatura ambiente por 2 horas. Las células se lavaron en 100 µL de Solución Amortiguadora de Lavado. A continuación, las células se incubaron con un anticuerpo conjugado a alexa-488

. 000032

anti-conejo de cabra (1.5 µg/mL) en Solución Amortiguadora de Lavado suplementado con pigmento de ADN Hoechst (1 µg/mL) e incubaba a temperatura ambiente en la oscuridad por 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con 100 µL de Solución Amortiguadora de Lavado. Las placas de 96 pozos se analizaron en un ArrayScan VTi (Cellomics) usando un algoritmo de bioaplicación (TargetActivation.V2). El porcentaje de objetos de p-Histona H3+ (suma de 6 campos de imagen/pozo con un objetivo 10x) fueron usados para generar curvas de respuesta a la concentración y valores EC₅₀ usando una ecuación de 4 parámetros.

Líneas de célula resistente a NCI-H460 precursor y Taxol tratadas con AMG 900 o Paclitaxel (taxol): Ensayo de Contenido de ADN en Ciclo Celular (Citometría de flujo)

Se sembraron células NCI-H460 precursora y NCI-H460 resistente a taxol a una densidad de 500,000 células/pozo en una placa de 6 pozos en 2 mL de medio completo apropiado. Las células del día siguiente se trataron con AMG 900 o taxol sobre intervalo de concentración de 6 puntos con una concentración de DMSO final de 0.05% en el medio. Después de 24 horas, las células se pulsaron con BrdU (dilución 1:100) y cosecharon. Las células se centrifugaron a 1600 rpm por 4 minutos y el sobrenadante se aspiró. Las células se lavaron en 1x PBS y fijaron en 900 µL de metanol al 90% enfriado en hielo y se almacena a -20°C. Las células fijadas se centrifugaron a 2000 rpm por 4 minutos para remover el metanol al 90%. Las células se lavaron con 200 µL de Solución Amortiguadora de Lavado y tiñeron con 200 µL de yoduro de propidio (PI) durante la noche a 4°C en la oscuridad. Se adquirieron y analizaron datos por citometría de flujo (LSRII).

. 000033

Una puerta de umbral se aplicó de acuerdo con el contenido de ADN +4N (igual que $\geq 4N$) y poblaciones positivas SubG1 con base en grupos de control tratados con DMSO y tratados con fármaco inferior/superior. Se representaron los datos como un porcentaje de ADN +4N y subpoblaciones de SubG1 positivo. El contenido de ADN +4N (igual que $\geq 4N$) o valores EC_{50} celulares SubG1 se calcularon usando una ecuación de 4 parámetros.

Líneas celulares MDA-MB-231 (F11)-luc precursora y resistente a Taxol tratadas con AMG 900 o Paclitaxel (taxol): Ensayo de contenido de ADN en Ciclo Celular (Citometría de flujo)

Se sembraron células MDA-MB-231(F11)-luc precursora y resistente a taxol a una densidad de 250,000 células/pozo en una placa de 12 pozos en 1 mL en el medio apropiado, por duplicado. Las células del día siguiente se trataron con AMG 900 o taxol sobre un intervalo de concentración de 10 puntos con una concentración de DMSO final de 0.1% en medio libre de taxol. Después de 24 horas, las células se cosecharon con 1x tripsina-EDTA y transfieren a tubos PCR. Las células se centrifugaron a 2000 rpm por 4 minutos y el sobrenadante se aspiró. Las células se fijaron en 200 μ L de metanol al 90% enfriado en hielo y se almacena a -20°C por al menos 24 horas. Las células fijadas se centrifugaron a 2000 rpm por 4 minutos para remover metanol al 90%. Las células se lavaron con Solución Amortiguadora de Lavado y tiñeron con 200 μ L de yoduro de propidio (PI) por 30 minutos a 4°C en la oscuridad. Se agregó 400 μ L adicionales de PI antes de la adquisición de los datos. Se adquirieron y analizaron datos por citometría de flujo (LSRII). Una puerta de umbral se aplicó de acuerdo con el contenido de ADN +4N (igual que $\geq 4N$) con base

. 000034

en grupos DMSO de control y tratados con fármaco inferior/superior. Se representaron los datos como porcentaje de control para poblaciones positivas de contenido de ADN +4N. Los valores EC₅₀ celulares de contenido de ADN +4N se asignaron usando ecuación de 4 parámetros.

Tabla 1. Proliferación Celular que Inhibe In Vitro

AMG 900 de Tipos de Tumor Sólido Múltiples

Línea de célula de tumor	Origen	AMG 900 EC ₅₀ (µM)
HCT 116_JH_p21-/-	Colon	0.001
HCT 116_JH_p21+/+	Colon	0.001
HCT15*	Colon	0.002
HT29	Colon	0.005
SW620	Colon	0.002
SW480	Colon	0.002
HOP-92	Pulmón	0.002
HOP-62	Pulmón	0.002
NCI-H460	Pulmón	0.001
A549	Pulmón	0.001
PC3	Próstata	0.002
DU145	Próstata	0.002
BT549	Mama	0.004
MDA-MB-231	Mama	0.002
T47D	Mama	0.005
MCF7-p53+	Mama	0.001
MCF7-p53-	Mama	0.003
CAL51	Mama	0.002
SK-OV-3	Ovarios	0.002
MES-SA Dx5*	Uterino	0.001
SK-MEL-2	Piel	0.002
A498	Riñón	0.001
769P*	Riñón	0.002
CAKI-1	Riñón	0.001
SK-HEP-1	Hígado	0.001
SNU449*	Hígado	0.002

. 000035

*líneas de célula de tumor resistentes a Paclitaxel (Gyorffy et al, 2006;

Harker, G.A. et al. Multidrug (Pleiotropic) Resistance in Doxorubicin-selected Variants of Human Sarcoma Cell Line MES-SA.

5 Cancer Research 1985: 45: 4091-4096;

Szakacs, G. et al. Predicting drug sensitivity and resistance: Profiling ABC transporter genes in cancer cells. Cancer Cell 2004: 6: 129-137;

Szakacs, G. et al. Targeting multi-drug resistance in cancer.

10 Nat. Rev. Drug Discovery 2006: 5: 219-234

**Tabla 2. División Celular en Bloque In Vitro de AMG 900 en
varios Tipos de Tumor Hematológico**

15	Línea de célula de tumor	Origen	AMG 900 EC₅₀ (µM)
	HL-60	Leucemia promielocítica	0.002
	K562	Leucemia mieloide crónica	0.001
	MOLT-4	Leucemia de célula T	0.002
	Jurkat	Leucemia de célula T	0.001
20	RPMI-8226	Mieloma múltiple	0.002
	U266-B1	Mieloma múltiple	0.002

Las células se trataron con AMG 900 por 48 horas (sin retirar del compuesto). Se realizó el análisis basado en citometría de flujo usando múltiples puntos finales (escisión de caspas 3, BrdU, SubG1, y contenido de ADN +4N (contenido de ADN ≥4N)). Se generaron los valores EC₅₀ usando el punto final del contenido de ADN +4N. Los valores EC₅₀ reportados representan curva de respuesta a la dosis de 10 puntos sencilla.

Tabla 3. AMG 900 In Vitro Mantiene la Potencia en Líneas de Célula de Tumor Resistente a Paclitaxel

Origen	Línea de Célula de Tumor		AMG 900 EC ₅₀ (μM) @ 24 horas	Paclitaxel EC ₅₀ (μM) @ 24 horas
Uterino ^a	MES-SA	Línea precursora	<0.002	0.01
	MES-SA Dx5 ¹	Doxorubicina	<0.002	>1.25
Mama ^b	MDA-MB-231	Línea precursora	0.001	0.002
	MDA-MB-231-Taxol-r ²	Paclitaxel	0.001	0.095
Pulmón ^c	NCI-H460	Línea precursora	0.001	0.01
	NCI-H460-Taxol-r ²	Paclitaxel	0.001	>0.1

Resistencia (r), definida como una pérdida de ≥10 veces de potencia (valor EC₅₀) en la sublínea comparado con la línea precursora.

^aAnálisis de p-Histona H3 basado en celómicos. Los valores EC₅₀ reportados representan un experimento sencillo con una respuesta a dosis de 10 puntos.

^bAnálisis de contenido de ADN basado en citometría de flujo. Se generaron los valores EC₅₀ con el punto final del contenido de ADN apropiado (contenido de ADN ≥4N (AMG 900) y Sub G₁ (paclitaxel)). Los valores EC₅₀ representan un experimento sencillo realizado por duplicado con respuesta a la dosis de 10 puntos. Las líneas de célula MDA-MB-231 contienen un transgen que expresa tanto proteína fluorescente verde como proteína de luciferasa.

^cAnálisis de contenido de ADN basado en citometría de flujo. Se generaron los valores EC₅₀ con el punto final de contenido de

ADN apropiado (contenido de ADN $\geq 4N$ (AMG 900) y Sub G₁ (paclitaxel)). Los valores EC₅₀ representan un experimento sencillo realizado con una respuesta a la dosis de 6 puntos.

¹Se estableció la sublínea resistente al fármaco múltiple, MES-SA Dx5, a partir de la línea de célula MES-SA precursora al hacer crecer células en la presencia de concentraciones incrementadas de doxorubicina. La línea de célula MES-SA Dx5 sobreexpresa P-gp (Harker et al, 1985).

²Se derivaron las sublíneas resistentes al paclitaxel MDA-MB-231-Taxol-r y NCI-H460-Taxol-r a partir de su respectiva línea precursora al hacer crecer células en presencia de concentraciones incrementadas de paclitaxel. Ambas sublíneas son positivas para P-gp por citometría de flujo.

Se trataron líneas de célula de tumor uterino con control (DMSO), AMG 900 o paclitaxel (taxol) sobre un intervalo de dosis de 10 puntos (0.0024 hasta 1.25 μM) por 24 horas. Las células se fijaron entonces y tiñeron con anticuerpo p-Histona H3 y contratiñeron con un pigmento de ADN (Hoechst). Se realizó el análisis basado en formación de imágenes (ArrayScan VTi) para medir el porcentaje de células positivas en p-Histona H3. Las curvas de respuesta a la dosis representan ya sea concentraciones de AMG 900 o taxol agrupadas contra células positivas en p-Histona H3 como un porcentaje de control tratado con DMSO (POC). Los valores EC₅₀ se calcularon por modelo de ajuste de 4 parámetros.

Se trataron líneas de célula de tumor de pulmón con control (DMSO), AMG 900 o taxol sobre un intervalo de dosis de 6 puntos por 24 horas. Se realizó el análisis de ciclo celular basado en

. 000038

citometría de flujo para medir el porcentaje de contenido de ADN $\geq 4N$ o contenido de ADN SubG1 en células positivas. Las curvas de respuesta a la dosis para AMG 900 representan la concentración de fármaco agrupada contra el porcentaje de contenido de ADN $\geq 4N$ en células positivas. Las curvas de respuesta a la dosis para taxol representan la concentración de fármaco agrupada contra el porcentaje del contenido de ADN SubG1 en células positivas. Los valores EC_{50} se calcularon por modelo de ajuste de 4 parámetros.

Se trataron líneas de célula de tumor de mama con control (DMSO), AMG 900 o taxol sobre un intervalo de dosis de 10 puntos por 24 horas. Se realizó el análisis de ciclo celular basado en citometría de flujo para medir el porcentaje de contenido de ADN $\geq 4N$ o contenido de ADN SubG1 en células positivas. Las curvas de respuesta a la dosis para AMG 900 representa la concentración de fármaco agrupada contra el porcentaje del contenido de ADN $\geq 4N$ en células positivas. Las curvas de respuesta a la dosis para taxol representa la concentración de fármaco agrupada contra el porcentaje de contenido de ADN SubG1 en células positivas. Los valores EC_{50} se calcularon por modelo de ajuste de 4 parámetros.

Ejemplo 3

Para investigar si la supresión inducida por AMG 900 de actividad de aurora cinasa inhibe la proliferación celular, se evaluó la eficacia antiproliferativa de AMG 900 *in-vivo* en modelos de xenoinjerto de cáncer humano múltiple, incluyendo modelos de cáncer de mama, colon, leucemia, pulmón, pancreático, y uterino, que crecen en ratones sin pelo atímicos. Se les administraron a los ratones AMG 900 oralmente a 3.75, 7.5, o 15 mg/kg BID por 2 días consecutivos por semana o 3 mg/kg BID

. 000039

cada día por la duración del estudio iniciando cuando se establecieron los tumores. Los reactivos, soluciones, equipo, formulación AMG 900, mediciones y cálculo de volumen de tumor generalmente fueron como se describe en el Ejemplo 4 enseguida.

5 Se encontró que AMG 900 inhibe significativamente el crecimiento de tumor en todos los modelos de xenoinjerto probados comparado con el grupo de control de vehículo (Tabla 4).

Tabla 4. AMG 900 Inhibe el Crecimiento de Múltiples Modelos de Xenoinjerto

<i>in vitro</i> sensible al Paclitaxel	Origen del tumor	Línea celular	AMG 900 %TGI*
Si	Colon	HCT 116	83
No	Colon	HCT15	51
Si	Colon	Colo 205	58
Si	Pulmón	NCI-H460	85
No	Pulmón	NCI-H460-Taxol-r	66
No	Uterino	MES-SA Dx5	73
Si	Uterino	MES-SA	86
Si	Leucemia	HL60	68
Si	Mama	MDA-MB-231	82
ND	Páncreas	MiaPaCa2	62

(TGI) inhibición del crecimiento de tumor, *%TGI tomado de el programa de dosis ya sea intermitente o continuo con base en la mejor respuesta de eficacia.

(ND) No determinado, Resistencia (r), definida como una pérdida de potencia de ≥10 veces (valor EC50) comparado con líneas de célula de tumor sensibles al taxano.

Se probó el efecto de AMG 900 en la línea celular resistente a múltiples fármacos MES-SA Dx5 que crece in vivo como un

xenoinjerto tumor. Se les administraron a los ratones AMG 900 oralmente a 15 mg/kg BID por 2 días consecutivos por semana o 3.0 mg/kg BID cada día por la duración del estudio. Se inicio la dosificación cuando se establecieron los tumores (10 días después del implante de tumor). El tratamiento con AMG 900 resulta en una inhibición del crecimiento de tumor estadísticamente importante usando ambas dosis y programas de AMG 900 comparado con el grupo de control de vehículo (Figura 4; $p < 0.0001$, prueba post hoc de Dunnett). También se alcanzó sorprendentemente una inhibición de crecimiento de tumor comparable en los 2 otros modelos resistentes al fármaco (HCT15 y NCI-H460-Taxol-r [resistente]) usando programas de tratamiento similares (ver Tabla 4).

Se inyectaron subcutáneamente células resistentes a múltiples fármacos, MES-SA Dx5 (2×10^6) en el flanco derecho de ratones sin pelo atímicos hembra. Los tumores se midieron dos veces por semana. El tratamiento inicia en el día 10 cuando los tumores fueron $\sim 100 \text{ mm}^3$. Los ratones se dosificaron PO con AMG 900 (BID) ya sea intermitentemente o continuamente. A todos los grupos se les proporcionaron complementos nutricionales en una base diaria a lo largo del estudio para mantener el peso corporal. Los datos representan media $\pm$ SEM para cada grupo ($n = 10$ por grupo). Los valores P corresponden a diferencia estadística entre grupos tratados con vehículo y AMG 900 determinada por RMANOVA seguido por prueba después de Dunnett. La flecha significa inicio de la dosificación.

Ejemplo 4

Para investigar si la supresión inducida por AMG 900 de actividad de aurora cinasa inhibe la proliferación celular, la eficacia antitumor de AMG 900 se evaluó *in vivo* contra xenoinjertos de tumor resistentes a NCI-H460-taxol en ratones sin pelo atímicos. Los ratones se dosificaron PO con AMG 900 (BID) ya sea intermitentemente o continuamente. Los ratones se dosificaron IP con paclitaxel (taxol) 5 días/semana. Se usó un compuesto Amgen interno como un control positivo en este estudio (datos no mostrados). Los tumores se midieron dos veces por semana. El tratamiento inicia en el día 12 cuando los tumores se establecieron. A todos los grupos se les proporcionaron complementos nutricionales en una base diaria a lo largo del estudio para mantener el peso corporal.

Animales y Tejidos

20	Especie/Cepa:	Sin pelo atímico
	Número/Sexo:	125/hembras
	Peso Medio:	20 - 30 gramos en el día de selección aleatoria
	Tipo de tejido:	Resistente a taxol NCI-H460
	Fuente:	Banco de Células Farmacológicas Amgen
	Estado de la enfermedad del sujeto:	Ratones que portan tumor
	Cuidado animal:	Instalaciones AMALAR

Materiales de Prueba

000042

Artículo de prueba: AMG 900
Fabricante: Amgen Inc.

Artículo de prueba: Taxol
Fabricante: Bristol-Myers Squibb

5

Formulación de Reactivos Críticos

Compuesto de prueba: AMG 900
Concentración de reserva: 1.5, 0.3 mg/mL
Formulado: Semanalmente, usado dentro de
7 días
Vehículo: HPMC al 2%/TW80 al 1% pH2.2
Dosis (10 mL/kg en peso corporal individual): Intervalo de dosis: 0.20-0.30
mL
Ruta de administración: PO

15

Compuesto de prueba: Taxol
Concentración de reserva: 6 mg/mL
Formulado: Adquirido de Burt's Pharmacy
Fabricante: Bristol-Meyer's
Squibb
Vehículo: Solución Salina
Dosis (10 mL/kg en peso corporal individual): Intervalo de dosis: 0.20-0.30
mL
Ruta de administración: IP

20

Formulaciones

Se formuló AMG 900 (base libre) en suspensión a concentraciones de 1.5 y 0.3 mg/mL. El volumen dosificado fue equivalente a 10 mL/kg. Se adquirió Taxol (Bristol Meyers Squibb) comercialmente de Burt's Pharmacy (Newbury Park, CA) y

. 000043

diluyó diariamente de concentración de reserva de 6 mg/mL hasta 1.25 mg/mL de solución de trabajo.

Protocolo de tratamiento

Grupo	n	Ruta	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Programa
1	10	PO	Vehículo	-	BID 7 días/ semana x 3 semanas
2	10	PO	AMG 900	3	BID 7 días/ semana x 3 semanas
3	10	PO	AMG 900	15	BID 2 días ENCENDIDO/5 día APAGADO/ semana x 3 semanas
4	10	IP	Taxol	12.5	QD 5 días/ semana x 2 semanas

La duración de la fase de dosificación para AMG 900 fue tres semanas, y dos semanas para el grupo taxol. Los tumores se midieron con un calibrador digital y los ratones se pesaron dos veces por semana. Los volúmenes de tumor se calcularon como sigue: Volumen del Tumor (mm^3) = $[(W^2 \times L)/2]$ donde el ancho (A) se define como el más pequeño de las 2 mediciones y longitud (L) se define como el más largo de las 2 mediciones. La inhibición de tumor se calculó como sigue: Primero; tomar [volumen del tumor inicial menos volumen del tumor final] para control y todos los grupos de tratamiento; segundo, tomar el cambio en el volumen del tumor tratado dividido por el volumen del tumor de control, menos uno y luego multiplicar por 100. La Tabla 5 y Figura 5 de adelante describen el volumen del tumor y resultados de la inhibición del crecimiento de tumor.

000044

Tabla 5. Resumen de los Datos del Volumen del Tumor

Grupo	Medio	SE	% de inhibición	Media
Vehículo (HPMC) PO BID 7 días	1680	215	0.0	1749.7
AMG 900 3mpk PO BID 7 días	771	104	60.4	715.6
AMG 900 15mpk PO BID 2 días	689	107	65.7	612.5
Taxol 12.5mpk IP QD 5 días	1383	283	19.7	1072.0

La Figura 5 ilustra los efectos de AMG 900 y tratamiento con Taxol en el crecimiento de tumores resistentes a H460-taxol establecidos. Se inyectaron subcutáneamente células (2×10^6 por animal) en el flanco derecho de ratones sin pelo hembras ($n = 10$ por grupo). Los tumores se midieron dos veces por semana. El tratamiento inicia 12 días después del implante de tumor (*flecha*) cuando los tumores fueron aproximadamente 170 mm^3 . Los ratones se dosificaron PO o IP una vez o dos veces diariamente durante 3 semanas. Los datos representan media $\pm$ SE para cada grupo. Los valores *P (no se muestran) corresponden a la diferencia estadística entre grupos tratados con vehículo y AMG 900 o Taxol analizados con ANOVA de Sheffe de medición repetida con el paso del tiempo usando STATview. Los días programados enlistados en la leyenda representan días/semana. A todos los grupos se les proporcionaron complementos nutricionales a lo largo del estudio.

Como la Figura 5 ilustra, el tratamiento de ratones que portan el tumor con AMG 900 que significativamente inhibe el crecimiento del tumor cuando se administra ya sea continuamente (3 mg/kg BID durante 7 días (60% de inhibición, $p = 0.0003$)) o

intermitentemente (15 mg/kg BID durante 2 días ENCENDIDO/5 días APAGADO/semana (66% de inhibición, $p < 0.0001$)). Taxol falla en inhibir significativamente el crecimiento del tumor cuando se dosifican en 12.5 mg/kg IP durante 5 días/semana durante dos
5 ciclos de dosificación (20% de inhibición, $p = 0.5399$) en este experimento.

Fue sorprendente e inesperado encontrar que AMG 900 permanece activo en líneas celulares de tumor que son resistentes a tres inhibidores de aurora cinasa bien caracterizados: AZD1152; 10 VX-680 (comúnmente también referido como MK-0457); y PHA-739358 (Danusertib). Los inhibidores usados para estos experimentos son compuestos publicados y caracterizados en la literatura. Por ejemplo, ver *Expert Opinion Investigational Drugs* (2009) 18 (4) páginas 379-398; *Expert Opinion Therapeutic Patents*, (2009) 19
15 (3), páginas 321-356. Un seguridad detallada, tolerabilidad y perfil pK, incluyendo estructura química, de Danusertib (PHA-739358) en fase I en paciente con tumores sólidos avanzados o metastáticos está disponible en Steeghs et al, *Journal of Clinical Oncology*, 27, 2009.

20 Los datos presentados a continuación indican la actividad de AMG 900 en líneas celulares resistentes a Taxol comparados con la capacidad de los tres inhibidores de aurora cinasa bien conocidos, mencionados arriba para inhibir la fosforilación de histona H3 en las mismas células resistentes a Taxol.

. 000046

Ejemplo 5

Tres inhibidores de aurora cinasa (AZD1152, MK-0457, y PHA-739358) se evaluaron en un subconjunto de líneas celulares de tumor MDR que expresan ya sea transportadores de eflujo de fármaco P-gp o BCRP. De modo inesperado, AMG 900 que inhibe p-histona H3 o induce poliploidía a través de todas las líneas celulares probadas independiente del estado de P-gp o BCRP con valores IC_{50} o EC_{50} uniformes (2 hasta 3 nmol/L). Por el contrario, los otros inhibidores de aurora cinasa fueron menos potentes en una o más de las líneas celulares MDR comparadas con las líneas celulares de tumor sensibles igualadas, como se muestra en la Tabla 6 enseguida.

15 **Materiales y Métodos**

Materiales de Compuesto: Las estructuras moleculares para los siguientes compuestos: Paclitaxel y Docetaxel, MLN8054, MK-0457, AZD1152 y PHA-739358, están disponibles en el dominio público. Los materiales se adquirieron de de fuentes comerciales, donde son aplicables, como fueron los Taxanos.

Líneas Celulares: Las líneas celulares de tumor se obtuvieron de la Colección de Cultivo de Tipo Americano (ATCC) a menos que se especifique de otra manera. Las líneas celulares MDA-MB-231-PTX y NCI-H460-PTX se establecieron al hacer crecer las células en presencia de concentraciones incrementadas de paclitaxel durante un periodo de 6 meses. La línea celular resistente a HCT116 AZD1152 se estableció al hacer crecer las células en presencia de AZD1152 en 80 nmol/L.

. 000047

Animales: Todos los procedimientos experimentales se condujeron de acuerdo con las regulaciones del Comité de Cuidado y Uso Animal Institucional y Departamento de Agricultura de E.U.A.. Se alojaron ratones sin pelo atímicos hembras de cuatro hasta seis semanas de edad (Harlan Sprague Dawley) en jaulas esterilizadas y mantuvieron bajo condiciones asépticas. El laboratorio aloja los animales proporcionándoles ciclos de luz y oscuridad alternados (12 horas cada uno) y cumplen los estándares de la Asociación para Evaluación y Acreditación de las especificaciones del Cuidado Animal de Laboratorio. Se ofrecieron alimento, agua, y complementos nutricionales *ad libitum*. Todos los fármacos se administraron basados en el peso corporal individual de cada ratón.

Ensayos de formación de imágenes celulares basados en fluorescencia: Todos los ensayos celulares de contenido alto se realizaron en un Lector ArrayScan VTi HCS (Cellomics). Las líneas celulares de tumor se trataron con AMG 900, AZD1152, MK-0457, o PHA-739358 (intervalo de concentración variado basado en potencia). Las células se prepararon para tinción intracelular con un anticuerpo anti-p-histona H3 Ser¹⁰ como se describe previamente (1). Se realizó detección con un anticuerpo IgG-alexa-568 anti-conejo y DAPI. Los niveles celulares de p-histona H3 se analizaron usando algoritmo V2 de Activación Objetivo (Cellomics) para determinar el porcentaje de células positivas. Para los ensayos que forman imágenes, las curvas de concentración-respuesta y valores IC₅₀ y EC₅₀ correspondientes se calcularon usando el porcentaje de células afectadas contra el control DMSO.

- 000048

Ensayo de formación de colonias:. Las células de tumor se trataron con AMG 900, paclitaxel o AZD1152 (0.5, 5, 50 nmol/L) durante 48 horas, lavaron dos veces con medio completo, y las células se volvieron a colocar en placas a una densidad de 5000 células por pozo en medio completo libre de fármaco. Las células se hicieron crecer hasta que los pozos de control DMSO fueron confluentes. Las células se tiñeron con pigmento violeta cristal (Sigma), lavaron con agua destilada, y formaron en imagen usando un escáner digital (Hewlett-Packard).

10 Ensayo con contenido de ADN $\geq$ 4N: Las células de tumor se trataron con AMG 900, AZD1152, MK-0457, o PHA-739358 (concentración de intervalo variado basado en potencia) durante 24 horas y procesado durante el análisis de ciclo celular (sólo tinción de ADN) como se describe previamente (1). Las células se
15 analizaron en un citómetro de flujo LSRII usando software BD FACS Diva. Las curvas de concentración-respuesta y valores EC_{50} correspondientes se calcularon usando el porcentaje de células con contenido de ADN $\geq$ 4N contra el control DMSO.

Tinción de superficie celular P-gp y BCRP: La expresión de
20 superficie celular de P-gp (ABCB1) y BCRP (ABCG2) se determinaron por tinción de células vivas en hielo durante 30 minutos con anticuerpos P-gp conjugado por FITC (BD Bioscience) o BCRP conjugado por APC (Millipore). Se usaron anticuerpos de isotipo igualados (BD Bioscience) como controles así como la tinción de viabilidad de 7-aminoactinomicina D (BD Biosciences) para excluir las células muertas. Las células se analizaron en un citómetro de flujo LSRII usando software BD FACS Diva.

Análisis del gen de aurora cinasa: Se aislaron ARN total y

• 000049

ADN genómico de peletizados de célula HCT116 congelados (tres subclones de célula resistentes a AZD1152 y un control de célula precursor) usando métodos de extracción de ácido nucleico estándares. El ARN total se usó para generar cADN (kit Advantage RT-PCR, Clontech). La amplificación por PCR de transcritos del gen aurora-A y B de longitud completa se realizaron usando el kit de plantilla larga de polimerasa expandida (Roche). Los pares de cebador PCR incluidos: aurora-A (GCTTGTTACTTATTACAGCTAGAGGCATCATG y TCAAGGATTTCTCCCCCTGCACGATTC), aurora-B (TCTCCTCCCCCTTTCTCTCTAAGGATG y ACCCGAGTGAATGACAGGGACCATC). Siete exones de aurora-C se amplificaron usando el mismo kit PCR como se describe arriba de ADN genómico usando siete conjuntos de cebador basados en los intrones de flanco 5' y 3' ((AACAGCCATCCAGAGGGTTCAGGAAG y CCACACACCCAGTCTGTTCTTCATCC), (AAGGGGAGCATTGGCATCCCTGACTTTC y GTATTTGGGGAAAATGCTGGGCTCAGAC), (ACCAGGCAGTGACGGTGGCATCATATG y TGACAGCCACAAACAGAGCTCCCAC), (GGTAAGTGTTCACCTCAGACGGAAATTG y CATTAAACTGGGTCATTCCTAACTGGTACTCAG), (CTCAATGAAAGCTGGGGAAGGAGAATTTCC y AGAGGCATTGATAGTGGAACCTCACATC), y (ACAGTGAGACTTACAGACGCATCCTCAAG y AGGAGAGCTCCCTGAACACACACAAAG)). Los productos de ADN por PCR se subclonaron en el vector pCR2.1 de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante (Invitrogen). Los plásmidos purificados que contienen los productos del gen aurora-A, B, y C se sometieron a procesamiento por secuencia de ciclo dideoxi usando cebadores del vector de flanco. Las reacciones procesadas por secuencia se corrieron en Analizadores de ADN 3730x1 (Applied Biosystems), y las secuencias de salida se analizaron usando software Sequencher

. 000050

(Gene Codes Corporation).

La Tabla 6 ilustra como AMG 900 muestra potencia uniforme a través de las líneas celulares de tumor resistentes a múltiples fármacos.

5

Tabla 6-A

10

Designación de línea celular	Estado P-gp	Ensayo p-histona H3, valor IC ₅₀ (nmol/L)			
		AMG900	AZD1152	MK-0457	PHA-739358
Precursor NCI-H460	-	3	131	123	510
Resistente al NCI-H460 PTX paclitaxel	+	3	>500	468	>1250
Precursor MDA-MB-231	-	2	16	43	49
Resistente a MDA-MB-231 PCT paclitaxel	+	3	>500	277	>1250

15

Línea celular	Estado BCRP	Ensayo de contenido de ADN ≥			
		AMG900	AZD1152	MK-0457	PHA-739358
U226-B1	-	2	12	46	67
RPMI8226	+	3	865	162	>1250

20

Nota: El origen de la línea celular NCI-H460-PTX es el pulmón; la línea celular MDA-MB-231-PTX es la mama, la línea celular MES-SA Dx5 es el útero, y las células RPMI-8226 son de mieloma múltiple.

Se condujeron experimentos similares con líneas celulares adicionales como se muestra en la tabla 6-B enseguida.

Tabla 6-B

EC ₅₀ celular (nM)		AMG 900	AZD1152 -HQPA	PHA- 739358	MK- 0457
Línea celular	Origen				
MCF-7	Mama	1	11	68	27

5

NCI-H460-PTX*	Pulmón	3	>500	>1250	468
HCT15*	Colon	2	>625	>1250	908
MES-SA Dx5*	Uterino	2	>500	>1250	>1250
MDA-MB-231-PTX*	Mama	3	>500	>1250	277
SNU499*	Hígado	2	>1250	>1250	ND
769P*	Riñón	4	703	>1250	ND
RPMI-8226**	Mieloma múltiple	3	865	>1250	162

10 Nota: Estado del transportador ABC (* = P-gp+; ** = P-gp- y/o BCRP+)

ND = no determinado

Ejemplo 6

15 Además, AMG 900 se evaluó *in vivo* contra células HCT-116 adaptadas para crecer en presencia de AZD1152, un inhibidor selectivo de aurora cinasa B. Este experimento también emite alguna luz en mecanismos alternativos posibles de resistencia a inhibidores de aurora cinasa. De esta manera, se adaptaron
20 células HCT116 para crecer en presencia de AZD1152. La actividad de AMG 900 luego se evaluó en las líneas celulares resistentes a AZD1152 y precursoras HCT116.

El AMG 900 se encontró sorpresivamente para encontrar poliploidía e inhibir la formación de colonias de una sublínea HCT116 adaptada para crecer en presencia de AZD1152. Los valores EC₅₀ de contenido de ADN ≥ 4N celular para AMG 900 fueron 2 y 5 nmol/L comparados con 34 y 672 nmol/L durante AZD1152, respectivamente (Figura 6-A). El AMG 900 inhibe la formación de

colonias en ambas líneas celulares HCT116 en concentraciones ≥ 5 nmol/L, mientras que la sublínea variante fue insensible a AZD1152 en 50 nmol/L (Figura 6-B). Ambas de las líneas celulares HCT116 fueron igualmente sensibles a paclitaxel y fueron negativas para expresión P-gp y BCRP (Figura 6-C). De forma interesante, la sublínea variante HCT116 esconde una mutación sin sentido en un alelo del gen aurora-B (TGG $\rightarrow$ TTG; W221L), mientras que no se detectaron mutaciones en los genes aurora-A y C. Estos resultados sugieren que AMG 900 mantiene la actividad en células de tumor que son resistentes a AZD1152 y, más particularmente, células de tumor que portan una mutación heterocigótica en aurora-B que puede ser responsable para resistencia a AZD1152. De esta manera, los datos positivos inesperados indican la capacidad sorprendente de MAG 900 para permanecer eficaces al tratar células tumor que se han vuelto resistentes a AZD1152.

Métodos:

Fig. 6-A: Las líneas celulares HCT116 se trataron con concentraciones incrementadas de AMG 900 o AZD1152 durante 24 horas. Se usó citometría de flujo para evaluar la acumulación de células con contenido de ADN $\geq 4N$ expresado como un porcentaje del control tratado por DMSO (POC). Las curvas de concentración-respuesta y valores EC_{50} calculados se determinaron de dos experimentos independientes (barras, $\pm SD$).

Fig. 6-B: Se realizó el ensayo de formación de colonias con líneas celulares HCT116 (precursoras y resistentes a AZD1152). Las células se trataron con DMSO, AMG 900, AZD1152, o paclitaxel

. 000053

en las concentraciones indicadas durante 48 horas y se volvieron a colocar en placas en medio completo que carece del inhibidor. Después de que las células tratadas con DMSO alcanzan confluencia, las células se tiñeron con violeta cristal y formación de imágenes (pozos duplicados).

Fig. 6-C: La extensión de expresión P-gp y BCRP en la superficie celular de líneas celulares HCT116 (precursoras y resistentes a AZD1152) co-teñidas con anticuerpos P-gp conjugados con ficoeritrina (PE) y BCRP conjugados con aloficocianina (APC) se evaluaron y analizaron por citometría de flujo. Los controles de isotipo se usaron para cada línea celular para establecer fluorescencia de fondo. Las líneas celulares MES-SA-Dx5 y RPMI 8226 se usaron como controles positivos para la expresión P-gp y BCRP, respectivamente.

Animales:

Ratones sin pelo atímicos hembra (Harlan Sprague Dawley) de 5-6 semanas de edad se recibieron y alojaron en jaulas esterilizadas. Se suministraron agua de osmosis inversa y alimento esterilizado en el autoclave ad libitum. Todos los estudios animales se realizaron bajo un protocolo IACUC interno y cumplen todas las especificaciones AAALAC.

Ensayos farmacodinámicos (Detección de fosfo-Histona H3):

Los ratones con tumores de xenoinjerto HCT 116 o Colo 205 humanos establecidos se administraron una dosis oral sencilla de control (vehículo solo) o AMG 900 en la dosificación indicada (n=3 animales por grupo). En 3 o 6 horas, tumor, médula ósea o tejido de piel se recolectaron para evaluación farmacodinámica (niveles de p-histona H3). El plasma también se recolectó para

- 000054

análisis de farmacocinética.

Citometría de Flujo (FCM): Los tumores se disociaron en una suspensión celular sencilla y fijaron en metano al 90% a -20°C durante al menos 24 horas. Las células luego se tiñeron con anticuerpos anti-p-histona H3 (ser-10) y anti-citoqueratina y contratiñeron con yoduro de propidio. Los datos se adquirieron en citometría de flujo LSRII que corre el software FACSDiva. Las células de tumor positivas de médula ósea y citoqueratina en la fase G2M del ciclo celular se evaluaron para p-histona H3. Las células de médula ósea y tumor se recolectaron de los ratones tratados con vehículo para servir como los controles de línea basal p-histona H3. La importancia estadística se determinó por análisis ANOVA de una vía.

Citometría de Exploración Láser (LSC, por sus siglas en inglés): Las secciones en triplicado de muestras de tejido FFPE (piel y tumor) se tiñeron usando anticuerpo anti-p-histona H3 seguido por un IgG anti-conejo de cabra conjugado alexa-633. Los portaobjetos se montaron con Prolong Gold anti-apagado que incluye pigmento de ADN Hoechst33342. Las imágenes se capturaron en el LSC usando un objetivo 40x (en resolución de pixel 0.5µ). El número de eventos de p-histona H3 se determinaron basados en un umbral fluorescente rojo definido. Sólo eventos más grandes que 20 µm² se contaron. Los eventos de contorno se reubicaron a una galería de imagen para verificar la exactitud de la segmentación. Los datos se analizaron usando SAS V9.3 con ajuste de Dunnett aplicado. Todas las pruebas estadísticas se evaluaron en alfa = 0.05 de nivel de importancia.

Aspirados de Aguja Fina (FNA, por sus siglas en inglés): Los

. 000055

aspirados de tumor se recolectaron al insertar una aguja de calibre 25 a través de una incisión pequeña en la piel que rodea el tumor en un patrón predeterminado y consistente (3x), luego se expulsaron en paraformaldehído al. Las células se hicieron girar en portaobjetos para microscopio y tiñeron con anticuerpos específicos para EpCAM (marcador de tumor epitelial, Alexa Flúor 488) y pHH3 (marcador de mitosis, Alexa Flúor 647) y contratiñeron con DAPI (contenido de ADN). Se usó un iCyte LSC (láseres 405 nm, 488 nm, 633 nm, filtros PMT: 450/40, 530/30, 650/LP) para capturar imágenes de campo de magnificación 40x y para cuantificar EpCAM, pHH3 y contenido de ADN. La integridad de la población se verificó al reubicar imágenes de células en galerías. Los números de EpCAM, se reportaron células positivas en G2M. Los datos se representaron como un error media +/- estándar del medio (SEM). La importancia estadística se determinó usando ANOVA seguido por análisis después de Dunnett Bonferroni.

Concentración de AMG 900 en Plasma (ensayo farmacocinético):

Se extrajeron muestras de plasma (50 µL) por adición de una mezcla de solvente (metanol al 90%, agua al 10% con ácido trifluoroacético 0.01%) para aislar el analito y precipitar las proteínas de plasma. Las concentraciones AMG 900 en muestras extraídas se determinaron por LC-EM/EM usando cromatografía líquida de fase inversa en una columna analítica Varian Pursuit PFP (2.0 x 30 mm, 5 micron) con ácido fórmico al 0.1% en agua (fase móvil A) y acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1% (fase móvil B).

Modelos de Xenoinjerto:

Los ratones se inyectaron subcutáneamente con 2×10^6

- 000056

células de tumor de color HCT 116 humano. Cuando los tumores se establecieron (aproximadamente 200 mm³), los ratones se eligieron aleatoriamente en grupos de tratamiento experimentales (n = 10) y trataron oralmente con AMG 900 en 1.5, 2.25 o 3 mg/kg cada día o, 3.75, 7.5 o 15 mg/kg intermitentemente durante la duración del experimento. A los ratones se les proporcionaron complementos nutricionales en una base diaria. Los volúmenes de tumor y los pesos corporales se registraron dos veces por semana usando calibrador y escala digital analítica, respectivamente. Los datos del tumor se representaron por Volumen del Tumor medio +/- SEM. La importancia estadística para la inhibición del crecimiento de tumor se determinó por mediciones repetidas ANOVA (RMANOVA) seguido por análisis post-hoc Scheffe.

Ejemplo 7

El efecto *in-vivo* de AMG 900 en crecimiento de tumor se evaluó además en un panel de xenoinjerto humanos de cinco tipos de tumor diferentes (mama, colon, pulmón, pancreático, y uterino), incluyendo tres modelos de xenoinjerto MDR. Los ratones que portan tumores establecidos se administraron oralmente AMG 900 en 15 mg/kg b.i.d. durante 2 días consecutivos por semana durante 3 semanas o en 3 mg/kg b.i.d. cada día durante 3 semanas. El porcentaje máximo de inhibición del crecimiento de tumor (TGI) se repite, en la Tabla 7 enseguida, para cada modelo de xenoinjerto. El porcentaje de TGI se calculó como la diferencia entre el cambio en control tratado con vehículo y volúmenes de tumor tratados con AMG 900 durante el periodo del estudio. La inhibición del crecimiento de tumor estadísticamente

. 000057

importante comparado con el control tratado con vehículo se determinó por RMANOVA seguido por pruebas post-hoc Scheffe o Dunnett y se indica por asteriscos (* $P < 0.005$, ** $P < 0.0005$).

AMG 900 muestra actividad antitumor importante en todos los 9 modelos de xenoinjerto (50 hasta 97% de inhibición del crecimiento de tumor (TGI) comparado con el grupo de control tratado con vehículo. De forma importante, AMG 900 fue activo en los modelos de xenoinjerto MES-SA-Dx5 (TGI al 84%, $P < 0.0001$) y NCI-H460-PTX (TGI al 66%, $P < 0.0001$) que fueron resistente a ya sea Docetaxel o Paclitaxel administrado en su dosis tolerada máxima respectiva.

De esta manera, AMG 900 inhibe el crecimiento de xenoinjertos de tumor humano múltiples *in vivo*, incluyendo modelos resistentes a múltiples fármacos y fármacos antimitóticos estándares de cuidado. Específicamente, los datos muestran que AMG 900 sorpresivamente inhibe la actividad de aurora-B en tumores HCT116 y suprime el crecimiento de xenoinjertos múltiples representativos de diversos tipos de tumor.

Tabla 7

Modelo de tumor	Origen	TGI máximo (%)
MDA-MB-231	Mama	82**
COLO 205	Colon	73*
HCT-15 (MDR)	Colon	50*
HCT116	Colon	85**
NCI-H460	Pulmón	85**
NCI-H460-PTX (MDR)	Pulmón	65**
MiaPaCa2	Páncreas	60**

MES-SA	Uterino	87**
MES-SA-Dx5 (MDR)	Uterino	84**

Referencias: Payton M, Chung G, Yakowec P, et al. Discovery y evaluation of dual CDK1 y CDK2 inhibitors. Cancer Res 2006;66:4299-4308.

INDICACIONES

Los mecanismos por los cuales los tumores desarrollan resistencia a inhibidores de aurora cinasa es probable que difieran para agentes diferentes. Mientras que un entendimiento más claro de las fuerzas moleculares que conducen los fenotipos de cáncer debe proporcionar la base para medicinas o terapias molecularmente dirigidas que puedan explotar susceptibilidades genéticas o epigenéticas identificables para una terapia dada, esto también es crucial para entender la base genética para resistencia a la terapia. Este entendimiento genético puede proporcionar un filtro adicional con el cual estratificar una población prospectiva de pacientes. Por ejemplo, la evidencia genética publicada sugiere que el inhibidor de aurora cinasa, AZD1152, que actualmente está experimentando evaluación clínica, y potencialmente otro compuesto clínico, VX-680, puede ser relativamente ineficaz en células de tumor que sobreexpresan MDR1 o BCRP. Las mutaciones del dominio de aurora cinasa B que emergen durante la selección de la línea de carcinoma de colon defectuosa en la reparación de ADN, HCT116, pueden llevar a la resistencia. Estas mutaciones de dominio catalítico se encontraron también ser suficientes para hacer células resistentes a AZD1152 y VX-680 que indican que la resistencia a

estos agentes puede ocurrir independientemente de MDR. *The Pharmacogenomics Journal*, (2009) 9, página 90-102.

La presente invención proporciona un compuesto, AMG 900, un inhibidor de aurora cinasa, que posee la capacidad de tratar
5 cánceres que se han vuelto refractarios a agentes tradicionales, quimioterapéuticos como estándares de cuidado, que incluyen agentes antimitóticos, tales como taxanos (paclitaxel y docetaxel) y alcaloide vincas. Además, AMG 900 tiene la capacidad de tratar cánceres que son resistentes a otros agentes que
10 inhiben la aurora cinasa, incluyendo pero no limitado a AZD 1152, VX-680 y PHA-739358. Generalmente, tales tumores desarrollan resistencia como un resultado de tratamiento previo y/o prolongado con agentes anti-cáncer. En consecuencia, en una modalidad de la invención, se proporciona un método para tratar
15 cáncer en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto una cantidad de dosificación efectiva del compuesto N-(4-((3-(2-amino-4-pirimidinil)-2-piridinil)oxi)fenil)-4-(4-metil-2-tienil)-1-ftalazinamina, en donde el cáncer del sujeto se trató previamente con un agente anti-cáncer. En otra modalidad, el
20 agente anti-cáncer es un agente quimioterapéutico. En otra modalidad, el agente quimioterapéutico es un agente antimitótico o una antraciclina. Aún en otra modalidad, el agente quimioterapéutico es un agente seleccionado del grupo que consiste de taxol, docetaxel, vincristina, vinblastina, vindesina, y vinorelbina, daunorubicina, doxorubicina, idarubicina, epirubicina, y mitoxantrono. Aún en otra modalidad, el agente anti-cáncer es AZD1152, PHA-739358, MK-0457 o una combinación de los mismos.

. 000060

Como tal, AMG 900 puede usarse para tratar trastornos de proliferación celular, incluyendo crecimiento celular no controlado y regulación del ciclo celular aberrante, que también se ha tratado previamente con terapias estándares de cuidado con taxanos.

Para este fin, AMG 900 es útil para, pero no se limita a, la prevención o tratamiento de cáncer incluyendo, por ejemplo, varios tumores sólidos y hematológicamente derivados, tales como carcinomas, incluyendo, sin limitación, cáncer de la vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón (incluyendo cáncer de pulmón de célula pequeña), esófago, vesícula biliar, ovarios, páncreas, estomago, cérvico, tiroides, próstata, útero y piel (incluyendo carcinoma de célula escamosa); tumores hematopoyéticos de linaje de linfoide (incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de célula B, linfoma de célula T, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, linfoma de célula vellosa y linfoma de Burkett); tumores hematopoyéticos de linaje mieloide (incluyendo leucemias mielogenosas agudas y crónicas (AML y CML), síndrome mielodisplástico y leucemia promielocítica); tumores de origen mesenquimal (incluyendo fibrosarcoma y rabdomiosarcoma, y otros sarcomas, por ejemplo tejido y hueso suave); tumores del sistema nervioso central y periférico (incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas); y otros tumores (incluyendo melanoma, seminoma, teratocarcinoma, osteosarcoma, atrofoderma pigmentos, queratocantoma, cáncer folicular de tiroides y sarcoma de Kaposi), donde tales cánceres han recaído o se han vuelto refractarios. Los cánceres, tales como cáncer de próstata, cáncer

. 000061

de ovarios, cáncer de pulmón, cáncer de mama, colangiocarcinoma u otros tipos de cáncer, que se han vuelto refractarios a tratamiento anti-cáncer, tal como con hormonas, también pueden tratarse con AMG 900.

5 En una modalidad, la invención proporciona un método para tratar uno o más cánceres seleccionados del grupo que consiste de cáncer uterino, cáncer de mama, cáncer pulmonar incluyendo cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de piel, cáncer de riñón, cáncer de hígado, 10 leucemias incluyendo leucemia promielocítica, leucemia mieloide crónica y leucemia de célula T, mieloma múltiple, cáncer de ovarios y cáncer de médula ósea en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto una cantidad de dosificación efectiva de AMG 900, en donde el cáncer del sujeto se ha tratado previamente 15 con y vuelto refractario a uno o más agentes quimioterapéuticos seleccionados del grupo que consiste de doxorubicina, daunorubicina, dactinomicina, colquicina, vinblastina, vincristina, paclitaxel, docetaxel, etoposido y mitoxantrona. En otra modalidad, la invención proporciona un método para tratar 20 uno o más cánceres seleccionados del grupo que consiste de cáncer de la vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, pulmón de célula no pequeña, cabeza y cuello, esofágico, gástrico, ovarios, páncreas, estomago, cérvico, tiroides y próstata o un linfoma o leucemia. AMG 900 también es útil para tratar tumores sólidos avanzados, incluyendo sin limitaciones, tumores de la vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, pulmón de célula no pequeña, cabeza y cuello, esofágico, gástrico, ovarios, páncreas, estomago, cérvico, tiroides y próstata.

. 000062

La invención también proporciona un método para el tratamiento de tumores sólidos, sarcomas (especialmente sarcoma de Ewing y osteosarcoma), retinoblastoma, rabdomiosarcomas, neuroblastoma, malignidades hematopoyéticas, incluyendo leucemia y linfoma, efusiones pleurales o pericardiales inducidas por tumor, y ascitos malignos.

Además de ser útiles para tratamiento humano, el compuesto también es útil para tratamiento veterinario de animales de compañía, animales exóticos y animales de granja, incluyendo mamíferos, roedores, y similares. Por ejemplo, animales que incluyen caballos, perros, y gatos pueden tratarse similarmente con AMG 900 para cánceres refractarios para tratamientos de quimioterapia de cáncer estándares de cuidado.

FORMULACIONES

AMG 900 puede administrarse al sujeto con cáncer como una composición farmacéutica, que comprende el compuesto (que es el ingrediente farmacéutico activo o API de la invención), N-(4-((3-(2-amino-4-pirimidinil)-2-piridinil)oxi)fenil)-4-(4-metil-2-tienil)-1-ftalazinamina, en asociación con uno o más portadores, diluyentes y/o adyuvantes no tóxicos, farmacéuticamente aceptables (colectivamente referidos en la presente como materiales de "excipiente"). AMG 900, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede procesarse de acuerdo con métodos convencionales de farmacia para producir las composiciones medicinales y farmacéuticas para administración a pacientes, incluyendo humanos y otros mamíferos.

La composición farmacéutica puede administrarse al sujeto por cualquier vía adecuada, adaptada para tal vía, y en una dosis

. 000063

efectiva para el tratamiento de cáncer refractario pretendido. La composición, o API, puede, por ejemplo, administrarse oralmente, mucosalmente, tópicamente, rectalmente, pulmonarmente tal como por rocío de inhalación, o parenteralmente incluyendo técnicas intravascularmente, intravenosamente, intraperitonealmente, subcutáneamente, intramuscularmente de forma intraesternal e infusión, en formulaciones de unidad de dosificación que contienen portadores, adyuvantes, y vehículos farmacéuticamente aceptables convencionales.

Para administración oral, la composición farmacéutica puede estar en la forma de, por ejemplo, un comprimido, capsula, suspensión o líquido. La composición farmacéutica se hace preferiblemente en la forma de una unidad de dosificación que contiene una cantidad particular del ingrediente activo. Los ejemplos de tales unidades de dosificación son comprimidos o cápsulas. Por ejemplo, estos pueden contener una cantidad de ingrediente activo desde alrededor de 1 hasta 2000 mg, y típicamente desde alrededor de 1 hasta 500 mg. Una dosis diariamente adecuada para un humano u otro mamífero puede variar ampliamente dependiendo de la afección del paciente y otros factores, pero, una vez de nuevo, puede determinarse usando métodos y prácticas de rutina.

La cantidad del API (AMG 900) que se administra y el régimen de dosificación para tratar la afección de cáncer refractario dependen de una variedad de factores, incluyendo la edad, peso, sexo y afección médica del sujeto, el tipo de enfermedad, la severidad del cáncer, la vía y frecuencia de administración, y las propiedades físicas y químicas de AMG 900 o su forma

. 000064

particular, incluyendo la forma de sal específica. De esta manera, un régimen de dosificación puede variar. Una dosis diariamente de alrededor de 0.01 hasta 500 mg/kg, ventajosamente entre alrededor de 0.01 y alrededor de 50 mg/kg, más
5 ventajosamente alrededor de 0.1 y alrededor de 30 mg/kg y aún más ventajosamente entre alrededor de 0.1 mg/kg y alrededor de 25 mg/kg el peso corporal puede ser apropiada. En una modalidad, la invención proporciona un método para tratar cáncer en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto AMG 900 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una cantidad de
10 dosificación efectiva en el intervalo desde alrededor de 0.5 mg/kg hasta alrededor de 25 mg/kg, en donde el cáncer del sujeto es refractario para tratamiento con un agente anti-mitótico. En otra modalidad, la invención proporciona un método para tratar
15 cáncer en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto AMG 900 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una cantidad de dosificación efectiva en el intervalo desde alrededor de 1.0 mg/kg hasta alrededor de 20 mg/kg, en donde el cáncer del sujeto es refractario para tratamiento con estándar de agente
20 quimioterapéutico de cuidado, incluyendo un anti-mitótico. Aún en otra modalidad, la invención proporciona un método para tratar cáncer en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto AMG 900 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una cantidad de dosificación efectiva en el intervalo desde alrededor de 3.0 mg/kg hasta alrededor de 15 mg/kg, en donde el cáncer del sujeto es refractario para tratamiento con un agente anti-mitótico. La dosis puede administrarse diariamente en una hasta cuatro dosis por día.

. 000065

Para propósitos terapéuticos, AMG 900 puede combinarse con uno o más adyuvantes o "excipientes" apropiados para la vía indicada de administración. Si se administran en una base por dosis, AMG 900 puede mezclarse con lactosa, sacarosa, polvo de almidón, ésteres de celulosa de ácidos alcanoicos, ésteres de alquil celulosa, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, óxido de magnesio, sales de sodio y calcio de ácidos fosfórico y sulfúrico, gelatina, goma acacia, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, y/o alcohol de polivinilo, para formar la formulación final. Por ejemplo, AMG 900 y los excipientes pueden comprimirse o encapsularse por métodos conocidos y aceptados por administración conveniente. Los ejemplos de formulaciones adecuadas incluyen, sin limitación, píldoras, comprimidos, cápsulas de gel de cubierta suave y dura, trociscos, formas oralmente disolubles y formulaciones de liberación retardada o controlada de las mismas. Particularmente, las formulaciones de cápsula o comprimido pueden contener uno o más agente de liberación controlada, tales como hidroxipropilmetil celulosa, como una dispersión con los APIs.

En el caso de psoriasis y otras afecciones de la piel, puede ser preferible aplicar una preparación tópica del AMG 900 al área afectada dos hasta cuatro veces al día. Las formulaciones adecuadas para administración tópica incluyen preparaciones líquidas o semi-líquidas adecuadas para penetración a través de la piel (por ejemplo, linimentos, lociones, ungüentos, cremas, pastas, suspensiones y similares) y gotas adecuadas para administración al ojo, oído, o nariz. Una dosis tópica adecuada del ingrediente activo es 0.1 mg hasta 150 mg administrado una

. 000066

hasta cuatro, preferiblemente una hasta dos veces al día. Para administración tópica, el API puede comprender desde 0.001% hasta 10% p/p, *por ejemplo*, desde 1% hasta 2% en peso de la formulación, aunque puede comprender tanto como 10% p/p, pero
5 preferiblemente no más de 5% p/p, y más preferiblemente desde 0.1% hasta 1% de la formulación.

Cuando se formula en un ungüento, AMG 900 puede emplearse con ya sea parafínico o una base de ungüento miscible al agua. Alternativamente, puede formularse en una crema con una base de
10 crema aceite en agua. Si se desea, la fase acuosa de la base de crema puede incluir, por ejemplo al menos 30% p/p de un alcohol polihídrico tal como propilenglicol, butan-1,3-diol, manitol, sorbitol, glicerol, polietilen glicol y mezclas de los mismos. La formulación tópica puede incluir deseablemente un compuesto,
15 que aumenta la absorción o penetración del ingrediente activo a través de la piel u otras áreas afectadas. Los ejemplos de tales potenciadores de penetración dérmica incluyen DMSO y análogos relacionados.

AMG 900 también puede administrarse por dispositivo
20 transdérmico. Preferiblemente la administración transdérmica se realizará usando un parche ya sea del reservorio y tipo de membrana porosa o de una variedad de matriz sólida. En cualquier caso, AMG 900 se suministra continuamente del reservorio o microcápsulas a través de una membrana en el adhesivo permeable de agente activo, que está en contacto con la piel o mucosa del recipiente. Si AMG 900 se absorbe a través de la piel, un flujo controlado y predeterminado de AMG 900 se administra al recipiente. En el caso de microcápsulas, el agente encapsulado

000067

también puede funcionar como la membrana.

La fase aceitosa de las emulsiones puede constituirse de ingredientes conocidos en una manera conocida. Aunque la fase puede comprende meramente un emulsificador, puede comprender una mezcla de al menos un emulsificador con una grasa o un aceite o con tanto una grasa como un aceite. Preferiblemente, un emulsificador hidrofílico se incluye junto con un emulsificador lipofílico que actúa como un estabilizador. También se prefiere para incluir tanto un aceite como una grasa. Juntos, los emulsificadores con o sin estabilizadores hacen la así llamada cera emulsificadores, y la cera junto con el aceite y grasa hacen la así llamada base de ungüento emulsificada, que forma la fase dispersada aceitosamente de las formulaciones de crema. Los emulsificadores y estabilizadores de emulsión adecuados para uso en la formulación incluyen, por ejemplo, Tween 60, Span 80, alcohol de cetoestearilo, alcohol de miristilo, gliceril monoestearato, sulfato lauril de sodio, gliceril diestearato solo o con una cera, u otros materiales bien conocidos en la técnica.

La elección de aceites o grasas adecuadas para la formulación está basada al alcanzar las propiedades cosméticas deseadas, ya que la solubilidad del API en la mayoría de los aceites probables para usarse en formulaciones de emulsión farmacéutica es muy baja. De esta manera, la crema debe preferiblemente ser un producto no grasoso, no teñido y lavable con consistencia adecuada para evitar el escape de tubos u otros recipientes. Pueden usarse ésteres alquilo mono o dibásicos, de cadena recta o ramificada tales como di-isoadipato, estearato de isocetilo, diéster de propilen glicol de ácidos grasos de coco,

000068

miristato de isopropilo, oleato de decilo, palmitato de isopropilo, estearato de butilo, palmitato de 2-etilhexilo o una mezcla de ésteres de cadena ramificada. Estos pueden usarse solos o en combinación dependiendo de las propiedades requeridas.

5 Alternativamente, pueden usarse lípidos de punto de alta fusión tales como parafina suave blanca y/o parafina líquida u otros aceites minerales.

10 Las formulaciones adecuadas para administración tópica al ojo también incluyen gotas para ojos en donde los ingredientes activos se disuelven o suspenden en el portador adecuado, especialmente un solvente acuoso para AMG 900. AMG 900 está preferiblemente presente en tales formulaciones en una concentración de 0.5 hasta 20%, ventajosamente 0.5 hasta 10% y particularmente alrededor de 1.5% p/p.

15 Las formulaciones para administración parenteral pueden estar en la forma de soluciones o suspensiones de inyección estériles isotónicas acuosas o no acuosas. Estas soluciones y suspensiones pueden prepararse de polvos o gránulos estériles usando uno o más de los portadores o diluyentes mencionados para
20 uso en las formulaciones para administración oral o al usar otros agentes de dispersión o humectantes adecuados y agentes de suspensión. Por ejemplo AMG 900 puede disolverse en agua, polietilen glicol, propilen glicol, etanol, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de ajonjolí, alcohol de bencilo, cloruro de sodio, goma de tragacanto, y/o varias soluciones amortiguadoras. Otros adyuvantes y modos de administración son bien y ampliamente conocidos en la técnica farmacéutica. AMG 900 también puede

administrarse por inyección como una composición con portadores adecuados incluyendo solución salina, dextrosa, o agua, o con ciclodextrina (esto es Captisol), solubilización de cosolvente (esto es propilen glicol) o solubilización micelar (esto es Tween 5 80).

La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o solvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo como una solución en 1,3-butandiol. Entre los vehículos y solventes 10 aceptables que pueden emplearse son agua, solución de Ringer, y solución de cloruro de sodio isotónica. Además, aceites estériles, fijos son convencionalmente empleados como un solvente o medio de suspensión. Para este propósito cualquier aceite fijo blando puede emplearse, incluyendo mono o diglicéridos 15 sintéticos. Además, ácidos grasos tales como ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables.

Para administración pulmonar, la composición farmacéutica puede administrarse en la forma de un aerosol o con un inhalador que incluye aerosol de polvo seco.

20 Los supositorios para administración rectal del fármaco pueden prepararse al mezclar el fármaco con un excipientes no irritante adecuado tal como manteca de cacao y polietilen glicoles que son sólidas a temperaturas ordinarias pero líquidas a la temperatura rectal y por lo tanto se fundirán en el recto y liberan el fármaco.

Las composiciones farmacéuticas pueden someterse a operaciones farmacéuticas convencionales tales como esterilización y/o pueden contener adyuvantes convencionales,

. 000070

tales como conservadores, estabilizadores, agentes humectantes, emulsificadores, soluciones amortiguadoras etc. Los comprimidos y píldoras pueden adicionalmente prepararse con recubrimientos entéricos. Tales composiciones también pueden comprender adyuvantes, tales como agentes humectantes, emulsificadores, saborizantes, y de perfume.

COMBINACIONES

Aunque el AMG 900 puede dosificarse o administrarse como el agente farmacéutico activo único, también puede usarse en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos y/o antimitóticos. Cuando se administra como una combinación, AMG 900 puede formularse como composiciones separadas que se administran simultáneamente o secuencialmente en diferentes tiempos, o AMG 900 puede darse como una composición sencilla.

La frase "co-terapia" (o "terapia de combinación"), al definir el uso de AMG 900 de la presente invención y otro agente quimioterapéutico, pretende abarcar la administración de cada agente en una manera secuencial en un régimen que proporcionará efectos benéficos de la combinación de fármaco, y se pretende también para abarcar co-administración de estos agentes en una manera sustancialmente simultánea, tal como en una cápsula sencilla que tiene una relación fija de estos agentes activos o en cápsulas múltiples, separadas para cada agente.

Específicamente, la administración de AMG 900 puede estar en conjunto con agente quimioterapéutico adicional, incluyendo terapias antimitóticas, conocidas para aquellas experimentadas en la técnica en la prevención o tratamiento de cáncer. La invención

. 000071

no se limita en la secuencia de administración, esto es, AMG 900 puede administrarse ya sea antes de, simultánea con o después de la administración del agente anticáncer o anti-mitótico conocido.

Lo anterior es meramente ilustrativo de la invención y no se pretende para limitar la invención para los usos descritos. Las variaciones y cambios, que son de rutina para alguien experimentado en la técnica, se pretenden para estar dentro del alcance y naturaleza de la invención, que se definen en las reivindicaciones anexas. Todas las referencias, patentes, solicitudes y publicaciones mencionadas, se incorporan en la presente como referencia en su totalidad, como si aquí se escribieran.

NOVEDAD DE LA INVENCION

Habiendo descrito la presente invención, se considera como novedad, y por lo tanto se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes:

000072

REIVINDICACIONES

1. El uso del compuesto N-(4-((3-(2-amino-4-pirimidinil)-2-piridinil)oxi)fenil)-4-(4-metil-2-tienil)-1-ftalazinamina o una
5 sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para tratamiento de
cáncer en un sujeto, en donde el cáncer del sujeto es refractario
para tratamiento con un agente anti-cáncer.

2. El uso del compuesto de conformidad con la
reivindicación 1 en donde el agente anti-cáncer es un agente
10 quimioterapéutico.

3. El uso del compuesto de conformidad con la
reivindicación 2 en donde el agente quimioterapéutico es un
agente seleccionado del grupo que consiste de un agente
antimitótico y una antraciclina.

15 4. El uso del compuesto de conformidad con la
reivindicación 2 en donde el agente quimioterapéutico es un
agente seleccionado del grupo que consiste de taxol, docetaxel,
vincristina, vinblastina, vindesina, y vinorelbina,
daunorubicina, doxorubicina, idarubicina, epirubicina, y
20 mitoxantrona.

5. El uso del compuesto de conformidad con la
reivindicación 1 en donde el agente anti-cáncer es AZD1152, PHA-
739358, MK-0457 o una combinación de los mismos.

6. El uso de conformidad con cualquiera de las
reivindicaciones 1-5 en donde el cáncer es uno o más de (a) un
tumor sólido o hematológicamente derivado seleccionado de cáncer
de la vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, cáncer de
pulmón de célula pequeña, esófago, vesícula biliar, ovarios,

000073

páncreas, estómago, cérvico, tiroides, próstata y piel, (b) un tumor hematopoyético de linaje linfoide seleccionado de leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de célula B, linfoma de celular T, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, linfoma de célula vellosa y linfoma de Burkett, (c) un tumor hematopoyético de linaje mieloide seleccionado de leucemias mielogenosas agudas y crónicas, síndrome mielodisplástico y leucemia promielocítica (d) un tumor de origen mesenquimal seleccionado de fibrosarcoma y rabdomiosarcoma, (e) un tumor del sistema nervioso central y periférico seleccionado de astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannoma, o (f) un melanoma, seminoma, teratocarcinoma, osteosarcoma, xenoderoma pigmentoso, queratocantoma, cáncer folicular de tiroides o sarcoma de Kaposi.

7. El uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en donde el cáncer es uno o más de un tumor sólido seleccionado de cáncer de la vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, pulmón de célula no pequeña, cabeza y cuello, esofágico, gástrico, ovarios, páncreas, estómago, cérvico, tiroides y próstata o un linfoma o leucemia.

8. El uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en donde el cáncer es cáncer de próstata, cáncer de ovarios, cáncer de mama, colangiocarcinoma, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica o una combinación de los mismos.

9. El uso del compuesto N-(4-((3-(2-amino-4-pirimidinil)-2-piridinil)oxi)fenil)-4-(4-metil-2-tienil)-1-ftalazinamina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para la preparación

000074

de un medicamento para el tratamiento de cáncer refractario a tratamiento con un agente anti-cáncer.

10. El uso del compuesto de conformidad con la reivindicación 9 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer
5 seleccionado de cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer de cabeza y cuello, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer de ovarios, cáncer pancreático, cáncer de estomago, cáncer cervico, cáncer de tiroides, cáncer de próstata, linfoma, leucemia, mieloma múltiple o una combinación de los mismos, en
10 donde el cáncer es refractario para tratamiento con un agente anti-cáncer.

11. El uso del compuesto de conformidad con la reivindicación 9 para reducir el tamaño de un tumor sólido en un sujeto, en donde el tumor del sujeto se trató previamente con un agente quimioterapéutico
15 seleccionado del grupo que consiste de paclitaxel, docetaxcel, doxorubicina y un alcaloide vinca.

12. El uso del compuesto de conformidad con la reivindicación 9 en donde el agente anti-cáncer es un agente quimioterapéutico seleccionado del grupo que consiste de un agente antimitótico y una antraciclina.

20 13. El uso del compuesto de conformidad con la reivindicación 9 en donde el agente anti-cáncer es un agente quimioterapéutico seleccionado del grupo que consiste de taxol, docetaxel, vincristina, vinblastina, vindesina, y vinorelbina, daunorubicina, doxorubicina, idarubicina, epirubicina, y mitoxantrona.

14. El uso del compuesto de conformidad con la reivindicación 9 en donde el agente anti-cáncer es AZD1152, PHA-739358, MK-0457 o una combinación de los mismos.

000075

LISTADO DE SECUENCIAS

<110>	Payton, Marc Kendall, Richard	
<120>	USO DE N-(4-((3-(2-AMINO-4-PIRIMIDINIL)-2-PIRIDINIL)OXI)FENIL)-4-(4-METIL-2-TIENIL)-1-FTALAZINAMINA EN EL TRATAMIENTO DE CÁNCER RESISTENTE AL AGENTE ANTIMITÓTICO	
<130>	A-1507-US-NP	
<140>	12/878,539	
<141>	2011-09-09	
<150>	61/241,527	
<151>	2009-09-11	
<160>	16	
<170>	PatentIn versión 3.5	
<210>	1	
<211>	32	
<212>	ADN	
<213>	Mus musculus	
<400>	1 gcttgttact tattacagct agagggcatca tg	32
<210>	2	
<211>	27	
<212>	ADN	
<213>	Mus musculus	
<400>	2 tcaaggattt ctccccctgc acgattc	27
<210>	3	
<211>	27	
<212>	ADN	
<213>	Mus musculus	
<400>	3 tctcctcccc ctttctctct aaggatg	27
<210>	4	
<211>	25	
<212>	ADN	
<213>	Mus musculus	
<400>	4 acccgagtga atgacaggga ccatc	25
<210>	5	
<211>	26	
<212>	ADN	
<213>	Mus musculus	
<400>	5 aacagccatc cagaggggttc aggaag	26
<210>	6	

<211>	26	
<212>	ADN	
<213>	Mus musculus	
<400>	6	
ccacacaccc agtctgttct tcatcc		26
<210>	7	
<211>	28	
<212>	ADN	
<213>	Mus musculus	
<400>	7	
aaggggagca ttggcatccc tgactttc		28
<210>	8	
<211>	28	
<212>	ADN	
<213>	Mus musculus	
<400>	8	
gtatttgggg aaaatgctgg gctcagac		28
<210>	9	
<211>	27	
<212>	ADN	
<213>	Mus musculus	
<400>	9	
accaggcagt gacggtggca tcatatg		27
<210>	10	
<211>	25	
<212>	ADN	
<213>	Mus musculus	
<400>	10	
tgacagccac aaacagagct cccac		25
<210>	11	
<211>	29	
<212>	ADN	
<213>	Mus musculus	
<400>	11	
ggtaagtgtt ccacctcaga cggaaattg		29
<210>	12	
<211>	33	
<212>	ADN	
<213>	Mus musculus	
<400>	12	
cattaaactg ggtcattcct aactgg tact cag		33
<210>	13	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Mus musculus	

000077

<400> 13	
ctcaatgaaa gctggggaag gagaatttcc	30
<210> 14	
<211> 29	
<212> ADN	
<213> Mus musculus	
<400> 14	
agaggcattg atagtggaaa cctcacatc	29
<210> 15	
<211> 29	
<212> ADN	
<213> Mus musculus	
<400> 15	
acagtgagac ttacagacgc atcctcaag	29
<210> 16	
<211> 27	
<212> ADN	
<213> Mus musculus	
<400> 16	
aggagagctc cctgaacaca cacaaag	27

Figura 1

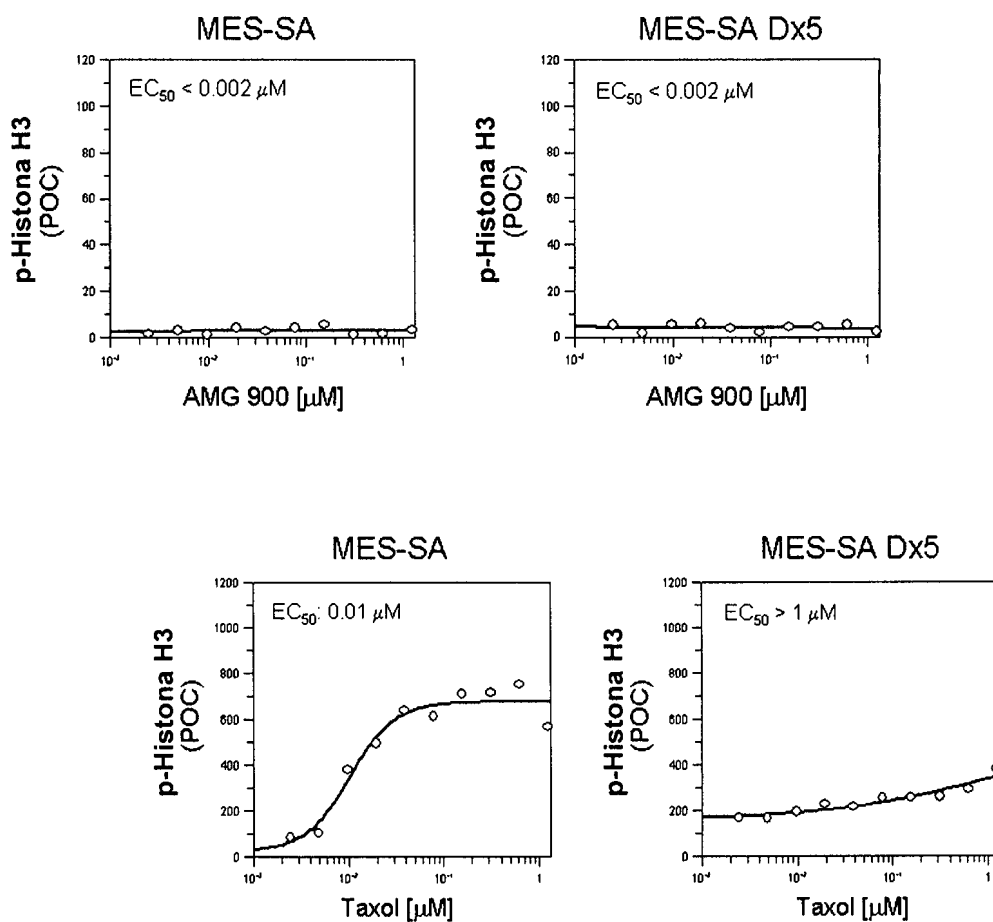


Figura 2

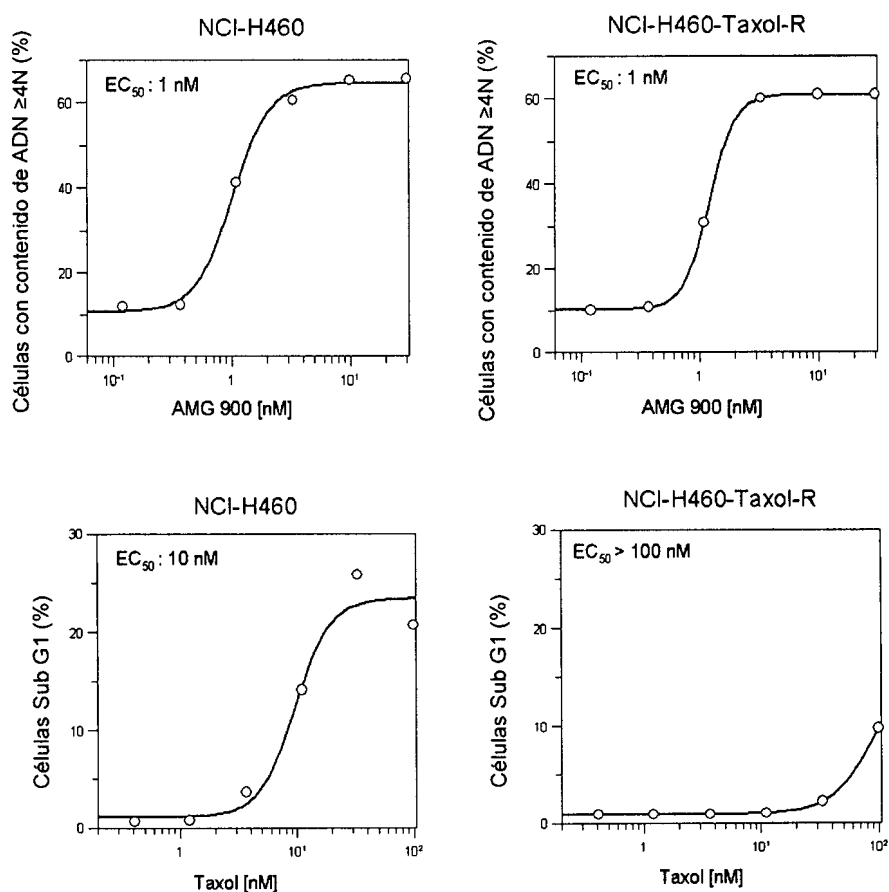
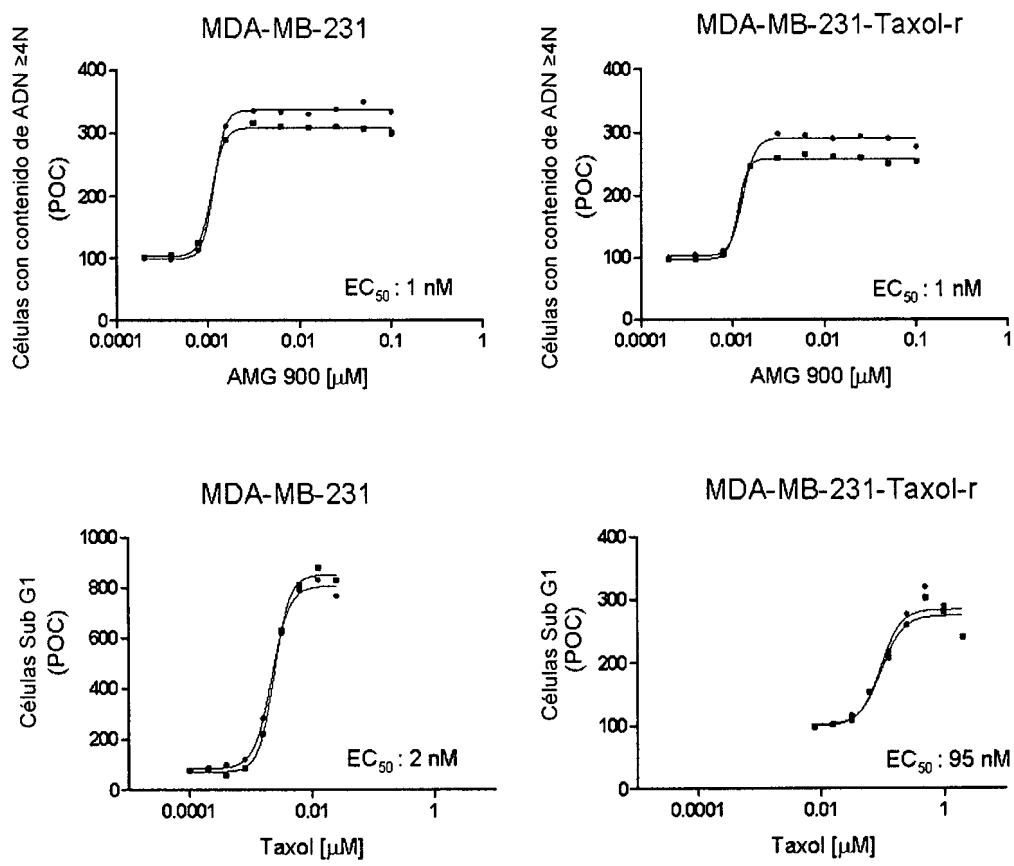


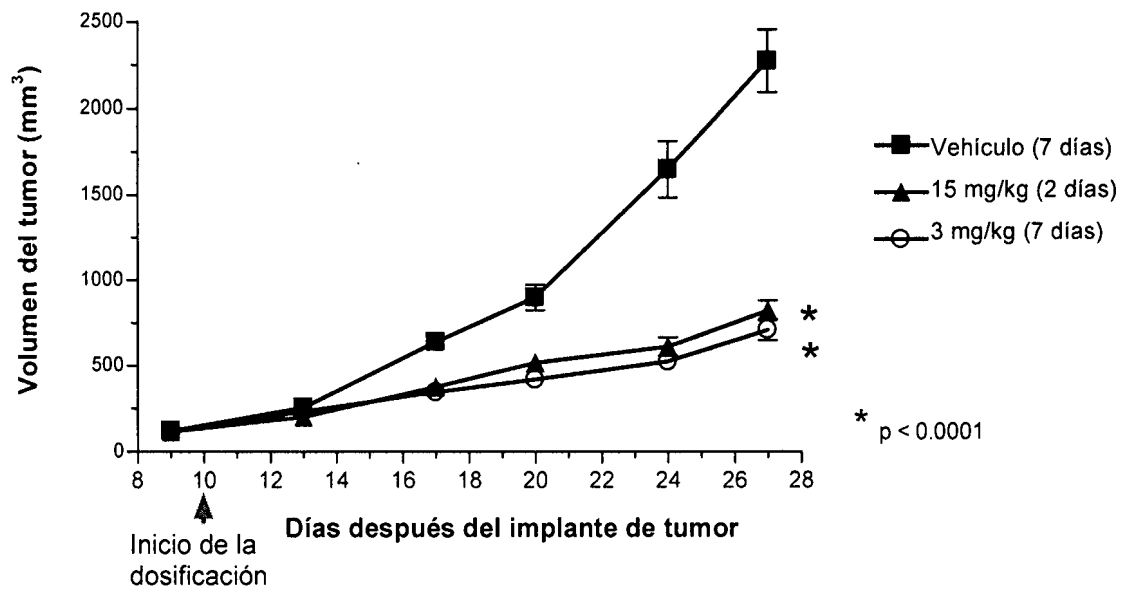
Figura 3



82

4 / 7

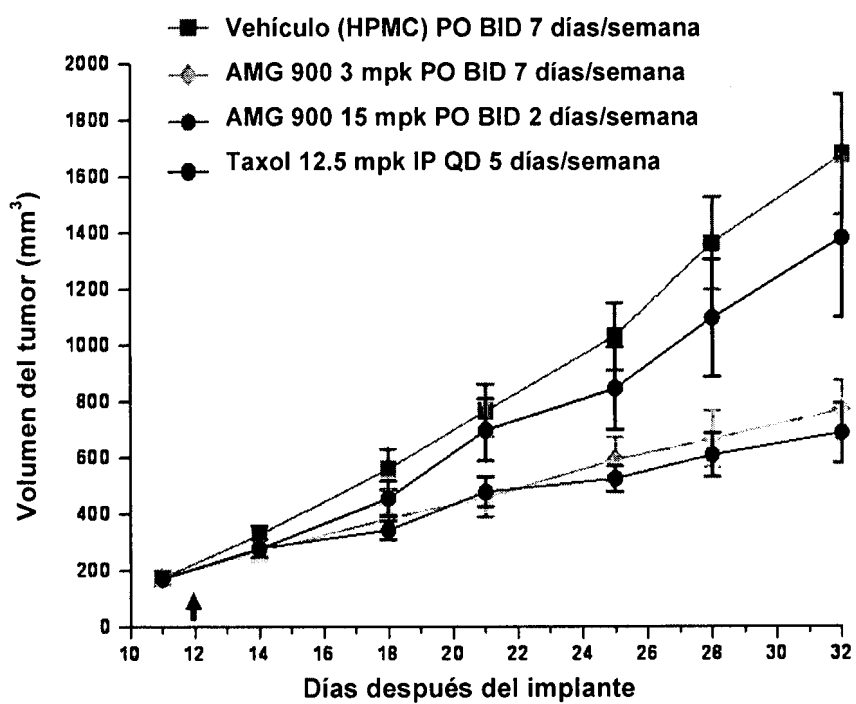
Figura 4



000082

5 / 7

Figura 5



000083

FIGURA 6A

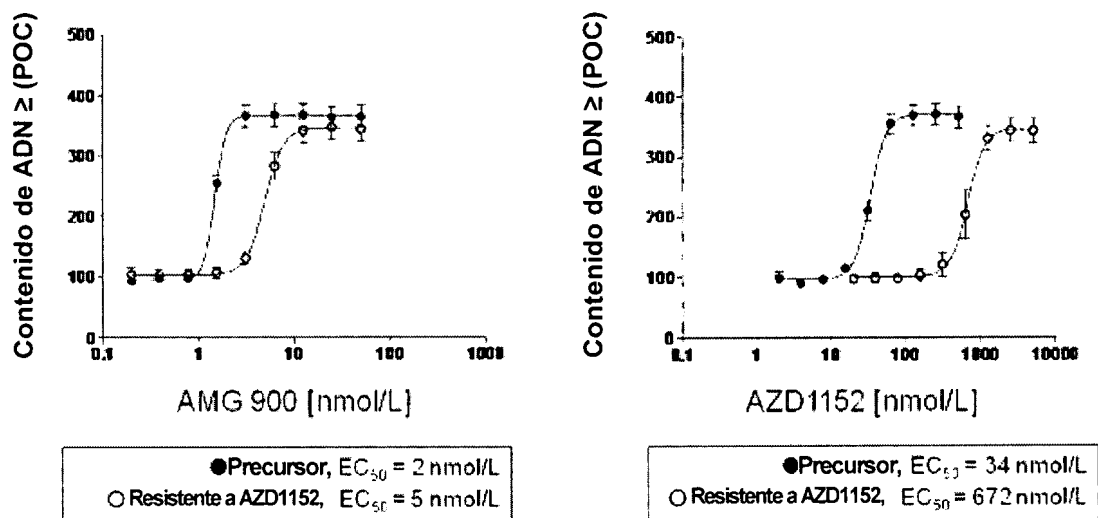


FIGURA 6B

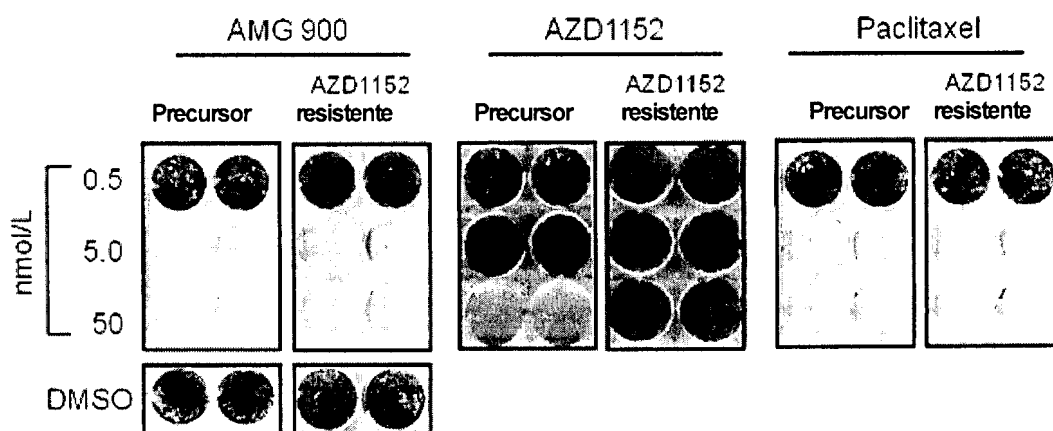
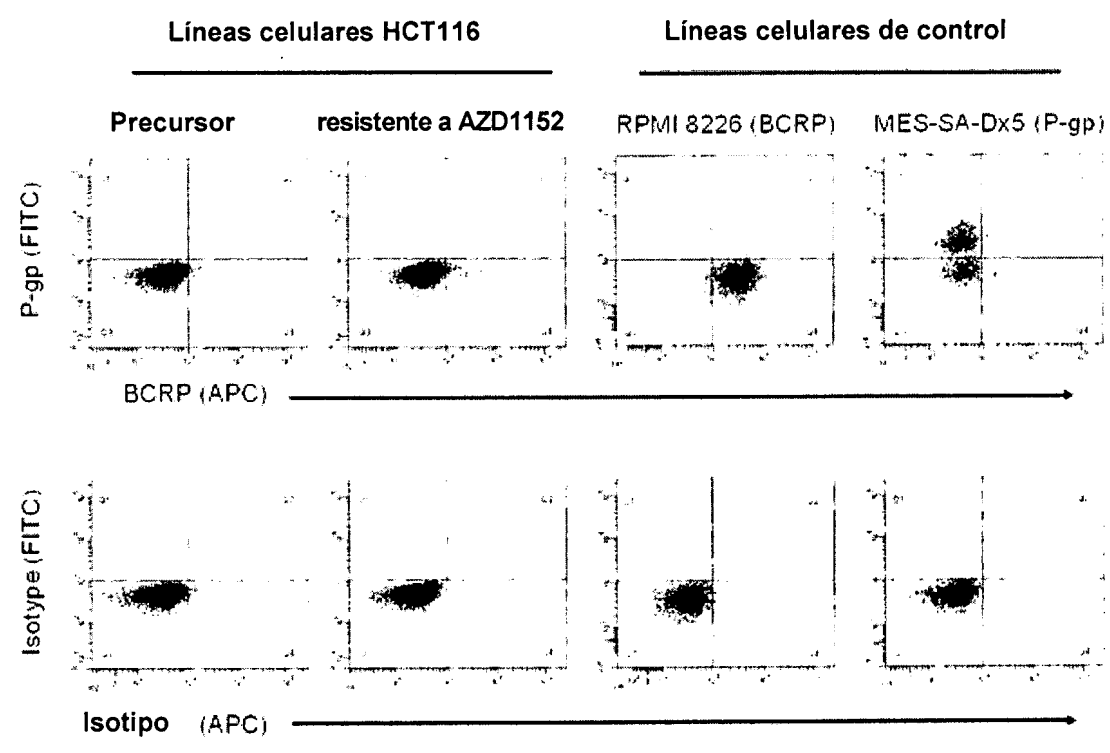


FIGURA 6C



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
17 March 2011 (17.03.2011)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2011/031842 A1

- (51) International Patent Classification:
A61K 31/502 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2010/048247
- (22) International Filing Date:
9 September 2010 (09.09.2010)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/241,527 11 September 2009 (11.09.2009) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): AM-
GEN INC. [US/US]; One Amgen Center Dr., Thousand
Oaks, California 91320 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): PAYTON, Marc
[US/US]; 149 S. Dewey Avenue, Newbury Park, Califor-
nia 91320 (US). KENDALL, Richard [US/US]; 3246
Rickey Court, Thousand Oaks, California 91360 (US).
- (74) Agent: REDDY, G. Prabhakar; One Amgen Center Dr.,
Thousand Oaks, California 91320 (US).

- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— with international search report (Art. 21(3))



WO 2011/031842 A1

000086

(54) Title: N-4 (- ((3- (2 -AMINO-4 PYRIMIDINYL) -2 -PYRIDINYL) OXY) PHENYL) -4- (4-METHYL-2-THIENYL) -1-PHTHALAZINAMINE FOR USE IN THE TREATMENT OF ANTIMITOTIC AGENT RESISTANT CANCER

(57) Abstract: The present invention relates to methods of using the compound, N-4-((3-(2-amino-4-pyrimidinyl)-2-pyridinyl)oxy)phenyl)-4-(4-methyl-2-thienyl)-1-phthalazinamine or a pharmaceutically acceptable salt thereof, to treat cancers, including solid tumors, which have become resistant to treatment with chemotherapeutic agents, including anti-mitotic agents such as taxanes, and/or other anti-cancer agents, including aurora kinase inhibiting agents. The invention also includes methods of treating cancers refractory to such treatments by administering a pharmaceutical composition, comprising the compound to a cancer subject.



No. 12-059362- -00000-0000

Fecha: 2012-04-11 15:34:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 86

Industria y Comercio
 SUPERINTENDENCIA

PATENTE DE INVENCION ☐MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐