

SOLVATO DE N-{3-[3-CICLOPROPIL-5-(2-FLUORO-4-YODOFENILAMINO)-6,8-DIMETIL-2,4,7-TRIOXO-3,4,6,7-TETRAHIDRO-2H-PIRIDO[4,3-D]PIRIMIDIN-1-IL]-FENIL}-CICLOPROPANOCARBOXAMIDA-SULFÓXIDO DE DIMETILO COMO UN INHIBIDOR DE MEK1/2

Campo de la Invención

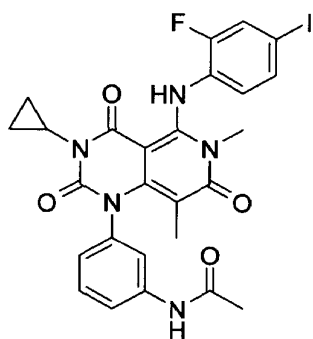
Esta invención se refiere a nuevos derivados de pirido[4,3-d]pirimidin-2,4,7-triona, específicamente solvato de N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]-fenil}-ciclopropanocarboxamida-sulfóxido de dimetilo, el cual es atractivo como fármaco para el tratamiento de trastornos causados por la proliferación adversa de células, particularmente como agente antitumoral. Más específicamente, esta invención se refiere a un inhibidor de MEK1, MEK2 y MEK1/2 que es atractivo como fármaco antitumoral, el cual se puede usar para el tratamiento de melanomas malignos.

Antecedentes de la Invención

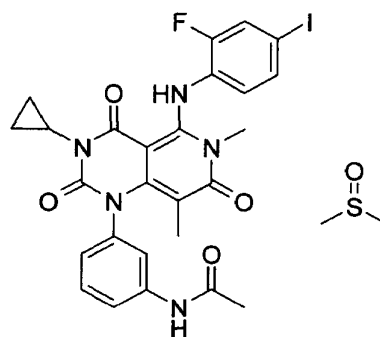
Existen inhibidores de MEK1, MEK2 y MEK1/2 bien conocidos, la estructura de los cuales incluye 1H,6H-pirido[4,3-d]pirimidin-2,4,7-triona [WO 2005/121142, WO

2012/088033, USA 7378423], el fármaco más avanzado es Mekinist (Trametinib-sulfóxido de dimetilo, GSK1120212) [H. Abe, S. Kikuchi, K. Hayakawa y colaboradores, ACS Med. Chem. Lett. 2011, 2, 320-324]. El GSK1120212 es un
 5 inhibidor eficiente de MEK1/2, el cual muestra eficiencia más alta contra u-MEK1/2 antes de la activación de C-Raf (u-MEK1: IC_{50} = 0.7 nM) en comparación con uno pre-activado (pp-MEK1: IC_{50} = 14.9 nM) [http://clincancerres.aacrjournals.org/content/17/5/989.full].

10



15

Trametinib**Mekinist (GSK1120212)**

Sin embargo, el Trametinib y el Mekinist son prácticamente insolubles en medios acuosos entre pH = 2 y
 20 pH = 8. El Trametinib y el Mekinist también son muy ligeramente solubles en solventes orgánicos que incluyen solventes sumamente polares (escasamente solubles en solventes apróticos calientes).

Esto es porque los compuestos, los cuales pueden
 25 demostrar perfiles de eficiencia favorables con respecto a

MEK1, MEK2 y MEK1/2, y solubilidad alta en solventes acuosos u orgánicos, aún están en auge. Debido a la biodisponibilidad mejorada se espera que estos compuestos sean más adecuados como agentes terapéuticos contra el

5 cáncer.

Además de eso, aunque el Mekinist tiene una baja toxicidad oral en dosis individuales ($LD_{50} > 2000$ mg/kg para ratones), se observa pérdida de peso crítica o algunas veces incluso muertes de animales durante la administración

10 a un nivel de dosis alto a largo plazo. De esta manera, una búsqueda de productos con toxicidad en una dosificación más baja a largo plazo de este grupo sigue siendo muy importante.

15 Sumario de la Invención

El objetivo de la presente invención es crear inhibidores novedosos de MEK1, MEK2 y MEK1/2 los cuales tienen toxicidad más baja en una dosificación a largo

plazo.

20 Este objetivo se alcanza por medio del compuesto novedoso solvato de N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]-fenil}-ciclopropanocarboxamida-sulfóxido de dimetilo de la

25 fórmula 1.

Descripción Detallada de la Invención

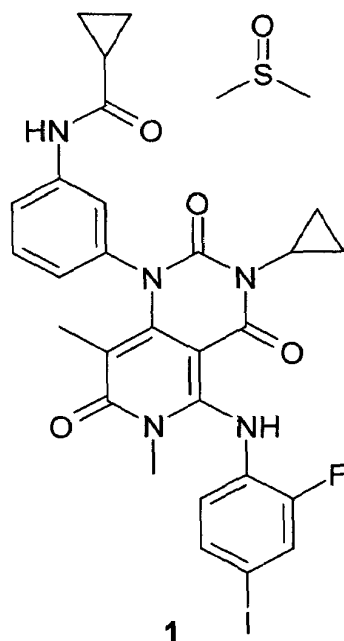
Los solicitantes encontraron inesperadamente que el compuesto novedoso solvato de N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]-fenil}-ciclopropanocarboxamida-sulfóxido de dimetilo de la fórmula 1 es comparable a el Trametinib en eficiencia para MEK1, MEK2 y MEK1/2 al no ser tóxico en una dosificación a largo plazo.

Por lo tanto, el compuesto novedoso solvato de N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]-fenil}-ciclopropanocarboxamida-sulfóxido de dimetilo de la fórmula 1 puede ser particularmente útil en el tratamiento de trastornos que involucran MEK1, MEK2 y MEK1/2, por ejemplo en el tratamiento del cáncer que incluye melanomas malignos.

El tema de esta invención es el solvato de N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]-fenil}-ciclopropanocarboxamida-sulfóxido de dimetilo de la fórmula 1.

5

10



El tema de esta invención también es un inhibidor de MEK1, MEK2 y MEK1/2 que comprende el compuesto de la fórmula 1.

La ventaja del compuesto novedoso de la fórmula 1 es una solubilidad más alta en medios orgánicos, lo cual puede proporcionar una variedad más amplia de formulaciones adecuadas y puede hacer posible una biodisponibilidad más alta y otros parámetros farmacocinéticos. De esta manera, por ejemplo, la solubilidad del compuesto de la fórmula 1 en sulfóxido de dimetilo es más de 2 veces más grande que aquella del Trametinib. La solubilidad en una mezcla de 4% de sulfóxido de dimetilo y 96% de aceite vegetal también es más alta. La solubilidad del compuesto de la fórmula 1 en varios medios en comparación con aquella del Trametinib se proporciona en la Tabla 1.

Tabla 1. Solubilidad del compuesto de la fórmula 1 y
Trametinib en varios medios

Compuesto	Solubilidad en agua (mg/mL)	Solubilidad en sulfóxido de dimetilo (mg/mL)	Solubilidad en una mezcla de 4 % de sulfóxido de dimetilo y 96% de aceite de maíz (mg/mL)
Compuesto de la fórmula 1	< 1	47	7
Trametinib	< 1	22	3

La actividad inhibitoria del compuesto novedoso de la fórmula 1 es comparable con la actividad inhibitoria del Trametinib con respecto a MEK1, el valor experimental es $IC_{50} = 8.02 \text{ nM}$ ($IC_{50} = 8.14 \text{ nM}$ para Trametinib).

La toxicidad en una dosificación de curso
significativamente más baja en comparación con el prototipo (Mekinist, complejo con sulfóxido de dimetilo de Trametinib) es una ventaja absoluta del compuesto novedoso de la fórmula 1. Los estudios de eficiencia en el modelo de xenoinjerto de melanoma humano A375 mostraron que el
compuesto de la fórmula 1 inhibe el crecimiento de tumores y causa la regresión de tumores de una manera dependiente de la dosis. La eficacia del compuesto de la fórmula 1 es comparable con aquella del Mekinist, el compuesto de la fórmula 1 que es menos tóxico: el tratamiento experimental
por Mekinist dio por resultado una pérdida de peso crítica

y muerte de dos animales, mientras que el compuesto de la fórmula 1 no causó muertes de animales incluso en dosis más altas.

El estudio de actividad antitumoral del compuesto de la fórmula 1 contra Mekinist se llevó a cabo en ratonas desnudas NMRI. Después de la formación de tumores, los animales se subdividieron en grupos de modo que el tamaño promedio de tumor en el grupo fuera $\sim 150 \text{ mm}^3$. Los animales fueron tratados con los productos de prueba durante 21 días. Los pesos de los animales en grupos experimentales que recibieron el compuesto de la fórmula 1 en dosis hasta de y que incluían 3 mg/kg no fueron significativamente diferentes de aquellos de los animales en el grupo de control (Figura 1). El tratamiento por medio de una dosis de 10 mg/kg del compuesto de la fórmula 1 dio por resultado pérdida del peso corporal de los animales, la cual se observó por todo el estudio desde la primera administración, pero no fue mayor que 20% en comparación con la fecha del inicio del tratamiento. Sin embargo, la administración intragástrica de 3 mg/kg de Mekinist durante 9 días dio por resultado una pérdida crítica de peso corporal y la muerte de dos animales que creó la necesidad de detener el tratamiento en este grupo durante 3 días para la recuperación del peso.

La dinámica del crecimiento de tumores se muestra

en la Figura 2. La administración intragástrica de 0.3 mg/kg del compuesto de la fórmula 1 no tuvo efecto sobre el crecimiento de tumores, mientras que una inhibición significativa del crecimiento de tumores se observó en todos los otros grupos. También, la regresión de tumores se observó en tres de ocho animales que recibieron 1 mg/kg del compuesto de la fórmula 1, y en 7/8 y 8/8 animales que recibieron 3 y 10 mg/kg del compuesto de la fórmula 1, respectivamente. La administración intragástrica de 3 mg/kg de Mekinist también causó regresión en 100% de los animales en el grupo.

De esta manera, el compuesto de la fórmula 1 exhibió la inhibición y regresión del crecimiento de tumores dependientes de la dosis, no causó muerte de los animales y redujo moderadamente el peso de los animales únicamente en una dosis estudiada máxima.

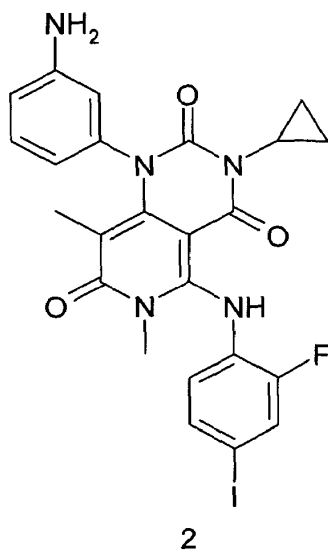
El tema de esta invención también es un inhibidor de MEK1, MEK2 y MEK1/2 que comprende el compuesto de la fórmula 1. Este inhibidor se usa preferiblemente para el tratamiento del cáncer que incluye melanomas malignos en un paciente.

El tema de esta invención también es un método de producción del compuesto de la fórmula 1, el cual consiste en la interacción de 1-(3-aminofenil)-3-ciclopropil-5-((2-fluoro-4-yodofenil)amino)-6,8-dimetilpirido[4,3-

d]pirimidin-2,4,7(1H,3H,6H)-triona de la fórmula 2 o su sal con ácido ciclopropilcarboxílico o su derivado activado (por ejemplo, cloroanhídrido o un éster o anhídrido activado respectivo de este ácido) en un solvente, por ejemplo, CH_2Cl_2 , tetrahidrofurano, N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida o N-metilpirrolidona con la obtención adicional de un solvato cristalino del producto terminado por medio del enfriamiento lento de una solución saturada caliente en sulfóxido de dimetilo.

10

15



El tema de esta invención es un ingrediente activo para la preparación de composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que comprenden el compuesto de la fórmula 1.

El tema de esta invención es una composición farmacéutica que exhibe propiedades inhibitorias de MEK1, MEK2 y MEK1/2 y que contiene una cantidad terapéuticamente

efectiva del compuesto de la fórmula 1 como ingrediente activo, y excipientes farmacéuticamente aceptables.

La composición farmacéutica puede estar en la forma adecuada para el uso oral (por ejemplo, tabletas, 5 pastillas, cápsulas duras o suaves, suspensiones acuosas u oleosas, emulsiones, polvos o gránulos dispersables, jarabes o elíxires), para el uso tópico (por ejemplo, cremas, ungüentos, geles, soluciones o suspensiones acuosas u oleosas), para inhalaciones (por ejemplo, polvo fino o 10 aerosol líquido), para insuflación (por ejemplo, polvo fino) o para

administración parenteral (por ejemplo, solución acuosa u oleosa estéril para la inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular de dosis, o supositorios para la 15 administración rectal).

La composición farmacéutica se puede obtener por medio de métodos usuales usando excipientes farmacéuticos convencionales bien conocidos. De esta manera la composición farmacéutica hecha expresamente para la 20 administración oral puede contener, por ejemplo, uno o varios colorantes, edulcorantes, saborizantes y/o conservadores.

Usualmente los compuestos de la fórmula 1 se administran a un paciente como una dosis individual de 5- 25 5000 mg/m² del área de la superficie corporal, es decir

aproximadamente 0.1-100 mg/kg que proporciona en general una dosis terapéuticamente efectiva. Usualmente una forma de dosificación individual, tal como una tableta o cápsula, contiene, por ejemplo, 1-250 mg de ingrediente activo. Una
5 dosis diaria siempre varía dependiendo del paciente, la ruta de administración específica y la gravedad del trastorno que está bajo tratamiento. Por lo tanto, el doctor, el cual realiza el tratamiento del paciente específico, puede determinar una dosis óptima. En esta
10 descripción el término "terapia" incluye "profilaxis".

El compuesto de la fórmula 1 con actividad inhibitoria para MEK1, MEK2 y MEK1/2 se puede usar para el tratamiento de enfermedades o condiciones médicas relacionadas con la actividad de MEK1, MEK2 y MEK1/2, por
15 ejemplo, en el tratamiento del cáncer. Los tipos de cáncer, los cuales pueden ser susceptibles al tratamiento usando el compuesto de la fórmula 1 o sus sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables incluyen (sin limitación) melanomas malignos.

20 El tema de esta invención también es un fármaco para el tratamiento de una enfermedad relacionada con MEK1, MEK2 y MEK1/2 que incluye una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de la fórmula 1. Una de las versiones de esta invención es que este fármaco está hecho
25 expresamente para el tratamiento de una enfermedad

relacionada con MEK1, MEK2 y MEK1/2 y que comprende el cáncer.

El tema de esta invención también es un método para el tratamiento de una enfermedad relacionada con MEK1, MEK2 y MEK1/2 que incluye el uso del compuesto de la fórmula 1 como se definiera anteriormente. Una de las versiones de esta invención es el tratamiento de una enfermedad relacionada con MEK1, MEK2 y MEK1/2 y que comprende el cáncer.

De acuerdo con otro aspecto de esta invención se propone que el compuesto de la fórmula 1 se use, como se definiera anteriormente, para la preparación de un fármaco para el tratamiento de cáncer al mezclar una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de la fórmula 1 con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con otro aspecto de esta invención, también se propuso un método para obtener un efecto anticancerígeno en un paciente que necesita este tratamiento, el cual incluye la administración de una cantidad efectiva del compuesto de la fórmula 1 al paciente.

De acuerdo con otro aspecto de esta invención también se propuso un método de tratamiento de una persona que sufre una enfermedad en la cual la inhibición de MEK1/2 es útil; el método incluye los pasos de administración de

una cantidad efectiva del compuesto de la fórmula 1 al paciente que necesita este tratamiento. Particularmente, la enfermedad en la cual la inhibición de MEK1, MEK2 y MEK1/2 es útil es el cáncer.

5 En cualquiera de los aspectos o versiones mencionados en este documento, donde el cáncer es indicado en un sentido general, el cáncer se puede seleccionar de un tumor cerebral (neuroglioma con un componente de astroglioma maligno y oligodendrogliomas, etcétera), cáncer
10 esofágico, cáncer estomacal, cáncer hepático, cáncer pancreático, cáncer colorrectal (cáncer de colon, cáncer rectal, etcétera), cáncer pulmonar (cáncer pulmonar de células no pequeñas, cáncer pulmonar de células pequeñas, células escamosas de cáncer primario y metastásico,
15 etcétera), cáncer de riñón, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer de piel, neuroblastoma, sarcoma, osteocondroma, osteoma, osteosarcoma, seminoma, tumores extragonadales, tumor testicular, cáncer uterino (cáncer cervical, cáncer endometrial, etcétera), cáncer de cabeza y
20 tumor de cuello (seno maxilar, cáncer laríngeo, cáncer faríngeo, cáncer de lengua, cáncer intraoral, etcétera), mieloma múltiple, linfoma maligno (reticulosarcoma, linfosarcoma, enfermedad de Hodgkin, etcétera), policitemia verdadera, leucemia (leucemia mieloide aguda, leucemia
25 mieloide crónica, leucemia linfocítica aguda, leucemia

linfocítica crónica, etcétera), bocio, cáncer pélvico, tumor ureteral, tumor de vejiga, cáncer de vesícula biliar, cáncer de conductos biliares, melanoma maligno, tumor pediátrico (sarcoma de Ewing, tumor de Wilms, 5 rabdomiosarcoma, sarcoma vascular), cáncer testicular embrionario, neuroblastoma, retinoblastoma, hepatoblastoma, nefroblastoma, etcétera) y ese tipo de cosas.

El tratamiento de enfermedades cancerosas descritas anteriormente se puede usar como monoterapia o 10 puede incluir cirugía general o terapia de radiación, o quimioterapia, o inmunoterapia además del compuesto de acuerdo con esta invención. Esta quimioterapia se puede introducir de manera simultánea, sucesiva o separada, y puede incluir adicionalmente uno o más agentes 15 antitumorales de las siguientes categorías: fármacos antiproliferativos/anticancerosos y sus combinaciones usadas en la oncología médica; agentes citostáticos; agentes anti-invasión; inhibidores de factores de crecimiento; agentes antiangiogénicos; agentes vasculares; 20 antagonistas de receptores de endotelina dañinos; terapias antisentido; planteamientos de terapias génicas; y planteamientos de inmunoterapia (J).

De esta manera, esta invención propone una composición farmacéutica que incluye el compuesto de la 25 fórmula 1 y una sustancia antitumoral adicional, como se

definió anteriormente, para el tratamiento concomitante del cáncer.

Esta invención propone una composición farmacéutica que incluye el compuesto de la fórmula 1 y una
5 sustancia antitumoral adicional, como se definió anteriormente, para el tratamiento combinado del cáncer.

El término "tratamiento concomitante" usado en relación con una terapia combinada deberá ser interpretado como la administración simultánea, separada o sucesiva.

10 La invención propone el uso del compuesto de la fórmula 1 y una sustancia antitumoral adicional para el tratamiento concomitante del cáncer.

Breve Descripción de los Dibujos

15 Esta invención es soportada por los dibujos.

Figura 1. Dinámica del cambio de peso corporal de los animales durante el tratamiento por medio de fármacos que se encuentran bajo estudio.

Figura 2. Dinámica del crecimiento de tumores de
20 melanoma humano A375 en un modelo de xenoinjerto durante el tratamiento con Mekinist y el compuesto de la fórmula 1.

Ejemplos de la Invención

Esta invención se describirá con mayor detalle
25 usando ejemplos específicos. Los siguientes ejemplos se

proporcionan como ilustraciones y no se proponen para ninguna limitación de la invención. Los expertos en este campo de la técnica pueden entender fácilmente varios parámetros que no son cruciales, los cuales pueden ser
 5 cambiados o modificados para proporcionar esencialmente los mismos resultados.

Ejemplo 1. Método de preparación del solvato de N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-
 10 d]pirimidin-1-il]-fenil}-ciclopropanocarboxamida-sulfóxido de dimetilo.

Agregar cloruro de ciclopropilcarbonilo (182 mg, 1.74 mmol) a la solución de 1-(3-aminofenil)-3-ciclopropil-5-[(2-fluoro-4-yodofenil)amino]-6,8-dimetilpirido[4,3-
 15 d]pirimidin-2,4,7(1H,3H,6H)-triona de la fórmula 2 (500 mg, 0.87 mmol) y diisopropiletilamina (225 mg, 1.74 mmol) en 5 mL de dimetilformamida a temperatura ambiente y mezclar la masa de reacción durante toda la noche. Tras la terminación de la reacción evaporar el solvente bajo vacío, disolver el
 20 residuo en 5 mL de diclorometano y lavar sucesivamente con una solución acuosa saturada con carbonato ácido de sodio y una solución acuosa saturada con cloruro de sodio. Separar la capa orgánica y secar sobre sulfato de sodio anhidro durante toda la noche, filtrar y evaporar el producto
 25 filtrado bajo vacío. Aislar el producto por medio de la

cromatografía con evaporación instantánea de gel de sílice usando diclorometano y una mezcla de diclorometano y acetato de etilo (1:1) como efluente. Disolver el producto crudo (250 mg) en 1.3 mL de sulfóxido de dimetilo a 70°C y
 5 mezclar la solución durante 1 hora, luego enfriar a temperatura ambiente y mezclar durante toda la noche. Filtrar el producto precipitado, lavar con diclorometano sobre el filtro y secar bajo alto vacío a 40-50°C durante 2 horas. Obtener el solvato de N-{3-[3-ciclopropil-5-(2-
 10 fluoro-4-yodofenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[4,3-d]pirimidin-1-il]-fenil}-ciclopropanocarboxamida-sulfóxido de dimetilo (130 mg, 48%) como un polvo cristalino de color blanco.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): 0.79 (m, 2H), 0.86 (m,
 15 2H), 1.05 - 1.15 (m, 4H), 1.44 (s, 3H), 1.5 (m, 1H), 2.62 (s, 6H), 2.74 (m, 1H), 3.21 (s, 3H), 6.7 (t, 1H), 7.03 (m, 1H), 7.31 - 7.4 (m, 2H), 7.45 (d, 1H), 7.53 (d, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 11.3 (s, 1H).

Ejemplo 2. Determinación de la solubilidad
 20 termodinámica del prototipo del compuesto de la fórmula 1 y Trametinib. Mezclar 5 mg del compuesto que se encuentra bajo estudio con 1 mL de amortiguador universal (Pion Ltd), pH = 2.0; 4.0 o 7.0 durante 15 minutos a 25°C. Usar cantidades adicionales de las sustancias hasta que la
 25 solución se vuelva turbia. Incubar frasquitos con la

solución durante 24 horas a 25°C con mezcla para lograr el equilibrio entre la solución saturada y el producto precipitado. Tras el equilibrio filtrar 200 µL de la solución (por duplicado) a través de una placa de filtro de 5 96 pocillos (Millipore) para separar el producto precipitado. Determinar las concentraciones de los compuestos en el producto filtrado por medio de la espectrofotometría usando una curva de calibración estándar. Llevar a cabo la medición del espectro de 10 absorción óptica del substrato y representar gráficamente la curva de calibración en la longitud de onda seleccionada (que corresponde usualmente a la absorción máxima de la sustancia $\lambda_{\max}$). Calcular la concentración de la sustancia en el producto filtrado (es decir, solubilidad) por medio 15 de la siguiente ecuación:

$$\text{Solubilidad} = (OD_{\lambda_{\max}} \text{ producto filtrado} - OD_{\lambda_{\max}} \text{ blanco}) / \text{Pendiente} \times 1.67 \times \text{Dilución de producto filtrado,}$$

donde:

$OD_{\lambda_{\max}} \text{ producto filtrado}$ = absorbancia del 20 producto filtrado:

$OD_{\lambda_{\max}} \text{ blanco}$ = absorbancia de la solución en blanco sin la sustancia;

Pendiente = pendiente de la curva de calibración;

1.67 = factor de dilución para el producto 25 filtrado en acetonitrilo;

Dilución del producto filtrado = factor de dilución para el producto filtrado en el amortiguador.

Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Ejemplo 3. Ensayo. Las sustancias se sometieron a prueba por el efecto sobre la actividad de la cinasa MEK1 usando la plataforma de detección Z'-LYTE^{MR} (Life Technologies). La concentración de DMSO en la mezcla de reacción fue 1%. Diluir 100 nL de hundimientos por 100 veces de las sustancias que se encuentran bajo estudio en DMSO al 100% en 2.4 μ L de amortiguador de cinasa (50 mM de HEPES pH 7.5, BRIJ-35 al 0.01%, 10 mM de $MgCl_2$, 1 mM de EGTA) y agregar a 5 μ L de una mezcla de Substrato/Cinasa 2 veces (MEK1/MARK1 inactivado (ERK2)/Ser/Thr03, contenido final 0.08-0.31 ng de MEK1, 105 ng de MARK1 inactivado (ERK2) y 2 μ M de Ser/Thr03) en una placa de 384 pocillos (negra, volumen pequeño manufacturada por Corning, kat. #3676). Pre-incubar las sustancias con cinasas durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de eso, agregar 2.5 μ L de solución de ATP 4 veces para iniciar la reacción (la concentración final de ATP en la mezcla de reacción es 100 μ M). Después de 30 segundos de incubación en un agitador incubar la reacción durante 60 minutos a temperatura ambiente. Luego agregar 5 μ L del Reactivo B (Life Technologies) diluido como 1:1024 e incubar durante 60 minutos más a temperatura ambiente. Medir la fluorescencia

con excitación a 400 nM y la emisión a 445 nM y 520 nM. Calcular el grado de fosforilación del substrato peptídico por medio de la siguiente ecuación (relación de emisión baja significa que el péptido está fosforilado, es decir la actividad de cinasa no es inhibida y relación de emisión alta significa que el péptido no está fosforilado, es decir la actividad de cinasa es inhibida).

Calcular el % de fosforilación como sigue:

$$10 \quad \left\{ 1 - \frac{(Relación\ de\ Emisión \times F_{100\%}) - C_{100\%}}{(C_{0\%} - C_{100\%}) + [Relación\ de\ Emisión \times (F_{100\%} - F_{0\%})]} \right\} \Bigg| *100,$$

Calcular el % de inhibición como sigue:

$$15 \quad \left\{ 1 - \frac{\%Phos_{Muestra}}{\%Phos_{0\% \text{ de Ctl de Inhibición}}} \right\} *100,$$

donde:

$C_{100\%}$ = señal de emisión de cumarina promedio, 100% de control de fosforilación;

$C_{0\%}$ = señal de emisión de cumarina promedio, 0% de control de fosforilación;

$F_{100\%}$ = señal de emisión de fluoresceína promedio, 100% de control de fosforilación;

$F_{0\%}$ = señal de emisión de fluoresceína promedio, 0% de control de fosforilación.

25 **Ejemplo 4.** Estudio de eficiencia en el modelo de

xenoinjerto de melanoma humano. El estudio se llevó a cabo en ProQinase GmbH Freiburg, Breisacher Str. 117, D-79106 Freiburg, Alemania.

Las células de melanoma humano A375 se cultivaron en frasquitos con medio de DMEM con la adición de FBS al 10% en una atmósfera húmeda que contenía 95% de aire y 5% de CO₂ a 37°C. Las células cancerosas se pasaron a animales después de un período de adaptación. Con ese fin las células se recolectaron usando TrypLE Express^{MR} (Invitrogen), se lavaron y se suspendieron en PBS estéril hasta la concentración final de 3×10^7 células/mL. Esta suspensión de células se inyectó por vía subcutánea (SC) en los flancos izquierdos de los ratones (3×10^6 células o 100 µL por ratón).

Cuando el tamaño promedio del tumor alcanzó 100-200 mm³, los animales se dividieron en grupos experimentales y el tratamiento con los fármacos de prueba se inició. Los productos se administraron diariamente por vía intragástrica, mientras que el grupo de control recibió el solvente. Las dosis de productos experimentales se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Dosis de productos en el estudio de eficiencia en el modelo de xenoinjerto de melanoma humano

Grupo	Sustancias	Dosis, mg/kg	Número de animales
1	Solvente	10 mL/kg	10
2	Mekinist	3.0	8
3	Compuesto de la fórmula 1	0.1	8
4	Compuesto de la fórmula 1	0.3	8
5	Compuesto de la fórmula 1	1.0	8
6	Compuesto de la fórmula 1	3.0	8
7	Compuesto de la fórmula 1	10.0	8

Parámetros clave medidos:

La medición de tumores implantados por vía subcutánea se llevó a cabo 2 veces a la semana iniciando desde el día de introducción de las células. El volumen del tumor (mm³) se determinó por medio de la ecuación:

$$V = L \times W^2/2,$$

donde L corresponde al diámetro máximo del tumor y W al diámetro mínimo del tumor (mm). Las mediciones se llevaron a cabo usando un calibrador con corredera.

El estudio incluyó el cálculo de valores de inhibición de crecimiento de tumores:

$$T/C = V_{exp}/V_{ctrl} \times 100 \%,$$

donde:

V_{ctrl} = volumen promedio de los tumores en el grupo de control;

V_{exp} = volumen promedio de los tumores en el grupo experimental.

5 También, la salud y el comportamiento de los animales se supervisó, los números de resultados letales y las regresiones de tumores se registraron:

$$\text{Regresión} = (V_{ini} - V_{fin}) / V_i \times 100 \%,$$

donde:

10 V_{ini} = volumen inicial de los tumores al inicio del tratamiento;

V_{fin} = volumen de los tumores al final del tratamiento.

La medición de los pesos de los animales se llevó
15 a cabo 3 veces a la semana.

Tabla 3. Parámetros de inhibición de tumores después de 21 días de tratamiento (T/C)

Grupo	Sustancias	Dosis, mg/kg	Número de Animales	V_{prom} , mm ³	T/C, %
1	Solvente	-	8	2112.0	
2	Mekinist	3.0	6	21.1	1.0
3	Compuesto de la fórmula 1	0.3	7	834.3	39.5
4	Compuesto de la fórmula 1	1.0	7	140.5	6.7
5	Compuesto de la fórmula 1	3.0	8	84.5	4.0
6	Compuesto de la fórmula 1	10.0	8	26.1	1.2

La Figura 2 muestra la dinámica del crecimiento de tumores de melanoma A375 en un modelo de xenoinjerto durante el tratamiento con Mekinist y el compuesto de la fórmula 1.

5 El compuesto de la fórmula 1 exhibió una inhibición del crecimiento de tumores dependiente de la dosis y una regresión comparable a la intensidad del efecto de Mekinist. Sin embargo, a diferencia del Mekinist, el compuesto de la fórmula 1 no causó muertes de animales en
10 ninguna de las dosis estudiadas (el tratamiento con Mekinist dio por resultado una pérdida de peso crítica y dos muertes de animales) y solo redujo moderadamente el peso de los animales en la dosis máxima estudiada. Esto asume menos toxicidad del compuesto de la fórmula 1 en
15 comparación con Mekinist sin pérdida de eficacia del tratamiento de melanoma.

Ejemplo 5. Preparación del fármaco en tabletas. Mezclar 1600 mg de almidón, 1600 mg de lactosa molida, 400 mg de talco y 1000 mg del inhibidor de la fórmula 1, y
20 comprimir en una barra. Moler esta barra en gránulos y tamizar recolectando gránulos de malla 14-16. Comprimir estos gránulos en tabletas de formas adecuadas (500 mg cada una).

Ejemplo 6. Preparación del fármaco en cápsulas.
25 Mezclar el inhibidor de la fórmula 1 con lactosa (2:1).

Verter esta mezcla en polvo en cápsulas de gelatina de un tamaño adecuado (600 mg cada una).

Ejemplo 7. Preparación del fármaco como una composición para inyecciones intramusculares, intraperitoneales o subcutáneas. Mezclar 500 mg del inhibidor de la fórmula 1 con 300 mg de clorobutanol, 2 mL de propilenglicol y 100 mL de agua para inyección. Filtrar la solución y verter en ampolletas de 1 mL, las cuales luego son selladas.

10

Aplicabilidad industrial

Los expertos en este campo de la técnica pueden entender fácilmente varios parámetros no cruciales, los cuales pueden ser cambiados o modificados para proporcionar los mismos resultados. Varias modificaciones de la invención, además de aquellas descritas en este documento, serían evidentes para los expertos en este campo de la técnica a partir de la descripción proporcionada anteriormente.

20