

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 216**

21 Número de solicitud: 201630539

51 Int. Cl.:

A61K 31/416 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22

Fecha de presentación:

27.04.2016

43

Fecha de publicación de la solicitud:

28.11.2017

Fecha de concesión:

04.09.2018

45

Fecha de publicación de la concesión:

11.09.2018

56

Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2017/070261

73

Titular/es:

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (75.0%)
Avda. de la Constitucion, 18
41071 Sevilla (Sevilla) ES y
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (25.0%)

72

Inventor/es:

PÉREZ SIMÓN, José Antonio;
BARBADO GONZÁLEZ, María Victoria;
MEDRANO DOMÍNGUEZ, Maite;
CAMPILLO MARTÍN, Nuria Eugenia;
PÁEZ PROSPER, Juan Antonio y
GONZÁLEZ NARANJO, Pedro José

74

Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

54

Título: **Derivados del indazol para el tratamiento del gammapatías monoclonales.**

57

Resumen:

Uso de una serie de compuestos indazólicos y sus derivados en la elaboración de un medicamento para su administración, sólo o en combinación con otro principio activo adecuado en el tratamiento de las gammapatías monoclonales, y más concretamente en el mieloma múltiple (MM).

ES 2 644 216 B1

DESCRIPCIÓN

Derivados del indazol para el tratamiento del gammapatías monoclonales.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se encuentra dentro del campo de la medicina y la farmacia, y se refiere al uso de nuevos compuestos y sus derivados farmacéuticamente aceptables en la elaboración de un medicamento para la prevención, alivio, mejora y/o tratamiento de gammapatías monoclonales en general, y en particular del mieloma múltiple (MM).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El mieloma múltiple (MM) es la segunda neoplasia hematológica más frecuente. En los últimos años, las mejoras terapéuticas presentadas por fármacos inmunomoduladores e inhibidores del proteasoma, entre otros agentes, han permitido un progreso notable en el control de esta enfermedad. Sin embargo, todavía se considera incurable. Por lo tanto, se están dedicando grandes esfuerzos para descubrir nuevos fármacos para mejorar el arsenal terapéutico disponible en la actualidad.

Los cannabinoides son los componentes activos de *Cannabis sativa* (marihuana). El interés terapéutico de los cannabinoides surgió después del descubrimiento de un sistema de control fisiológico endocannabinoide en humanos, basado en los receptores cannabinoides (CBs), llamados CB1 y CB2. Mientras que CB1 es extremadamente abundante en el sistema nervioso central (SNC), CB2 está casi exclusivamente presente en las células hematopoyéticas e inmunes, que también expresan CB1 aunque en un grado mucho menor. Algunos subconjuntos de células hematopoyéticas muestran altos niveles de CB2, en particular las células B, precursores de células plasmáticas. A pesar de esta información, el efecto de los cannabinoides en el sistema hematopoyético se ha investigado en menor grado que en el SNC, y muchas características de la función de CB2 y su regulación siguen estando poco caracterizadas.

Cada vez hay más pruebas que apoyan que los cannabinoides podrían ser útiles en el tratamiento de enfermedades como el glaucoma, osteoporosis, esclerosis múltiple, dolor, trastornos cardiovasculares y neurodegenerativas, tales como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson. Además, se utilizan para mitigar los vómitos asociados con el tratamiento del cáncer. Uno de los intereses terapéuticos más apasionantes de la

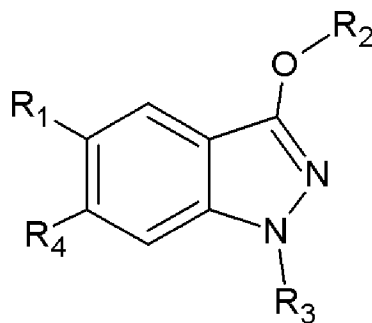
investigación de cannabinoides es su potencial actividad antitumoral. En este sentido, algunos cannabinoides inhiben la proliferación de varias células tumorales, tales como líneas celulares de glioma, tanto in vitro como in vivo. Este efecto parece estar mediado por la modulación de varias vías de señalización implicadas en la proliferación celular, la supervivencia y la apoptosis.

La tasa de incidencia del MM es de 4-5 por 100.000 habitantes y año. La edad de aparición se sitúa alrededor de los 65 años y aunque en los últimos años se ha expandido el arsenal terapéutico con el desarrollo de nuevas moléculas como los inhibidores de proteosomas o los fármacos inmunomoduladores (IMiDs), que se han venido a sumar a los tratamientos clásicos como melfalán y prednisona, además del trasplante de progenitores hematopoyéticos, el mieloma múltiple es considerado aún una enfermedad incurable.

Así, con los tratamientos disponibles hasta la fecha, la supervivencia a cinco años para el mieloma múltiple es aún baja, especialmente si se compara con otros tipos de cáncer. Además, hay que tener en cuenta los efectos secundarios de los tratamientos. Por esta razón, existe la necesidad de proporcionar tratamientos alternativos a los actuales, que no afecten a la viabilidad de las células normales, incluyendo las células hematopoyéticas de donantes sanos en los casos posteriores al trasplante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Un **primer aspecto** de la invención se refiere al uso de un compuesto, de ahora en adelante compuesto de la invención, de fórmula general (I):



(I)

25

donde R1 y R4 son miembros del grupo formado por hidrógeno, halógeno, nitro o amino.

5 R2 es un miembro del grupo formado por propilo, butilo, pentilo, ciclohexilmetilo, fenetilo, naftilmetilo, heterocicloalquilo, amina primaria secundaria o terciaria, o bencilo sustituido en donde el grupo fenilo puede contener 1 o 2 sustituyentes del grupo formado por alquilo, hidroxilo, metoxi, nitro, amino o halógeno.

10 R3 es un miembro del grupo formado por metilo, etilo, propilo, pentilo cicloalquilmetilo, cicloalquiletilo, dialquilaminoetilo, heterocicloalquiletilo, cicloalquilcarbonilo (grupo carbonilo unido a cicloalquilo), heteroarilcarbonilo (grupo carbonilo unido a heteroarilo), arilcarbonilo (grupo carbonilo unido a arilo) opcionalmente sustituido, o aralquilcarbonilo (grupo carbonilo unido a aralquilo) opcionalmente sustituido;

15 o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones, en la elaboración de un medicamento para la prevención, alivio, mejora y/o tratamiento de una gammapatía monoclonal. Más preferiblemente se refiere al uso de un compuesto de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una gammapatía monoclonal.

En una realización preferida de este aspecto de la invención:

20 R1 es un miembro del grupo formado por hidrógeno o amino;
R2 es un miembro del grupo formado por 4-metoxibencilo, 1-naftilmetilo, 2-naftilmetilo, heterocicloalquilo, diisopropilamino, dimetilamino, dietilamino, piperidinilo, morfolinilo, o pirrodinilo;
R3 es un miembro del grupo formado por piperidinoetilo, morfolinoetilo, pirrolidiniletilo, diisopropilaminoetilo, arilo opcionalmente sustituido, aralquilo
25 opcionalmente sustituido, 2-tienilo, o 4-cloro-3-piridilo;
R4 es hidrógeno.

En otra realización preferida:

30 R1 es un miembro del grupo formado por hidrógeno o amino;
R2 es un miembro del grupo formado por 4-metoxibencilo, 1-naftilmetilo o 2-naftilmetilo;
R3 es un miembro del grupo formado por piperidinoetilo, morfolinoetilo, pirrolidiniletilo o diisopropilaminoetilo;

R4 es un miembro del grupo formado por hidrógeno.

En una realización aún más preferida el compuesto de la invención se selecciona de la lista que consiste en:

- 5 3-(2-naftilmetoxi)-1-(2-piperidinoetil)indazol,
3-(1-naftilmetoxi)-1-(2-piperidinoetil)indazol,
1-(ciclohexilmetil)-3-(ciclohexilmetoxi)indazol,
1-metil-3-(2-naftilmetoxi)indazol, 1-(2-ciclohexiletil)-3-(2-naftilmetoxi)indazol,
1-metil-3-(3,4-dimetilbenciloxi)indazol,
- 10 3-(2-naftilmetoxi)-5-nitro-1-(2-piperidinoetil)indazol,
3-(2-naftilmetoxi)-5-nitro-1-pentilindazol,
1-metil-3-(2-naftilmetoxi)-5-nitroindazol,
1-metil-5-nitro-3-(fenetoxi)indazol,
5-nitro-1-pentil-3-(pentiloxi)indazol,
- 15 3-(3,4-dimetilbenciloxi)-1-(2-morfolinoetil)-5-nitroindazol,
1-metil-3-(1-naftilmetoxi)-5-nitroindazol,
1-(2-morfolinoetil)-3-(2-naftilmetoxi)-5-nitroindazol,
3-(3,4-dimetilbenciloxi)-1-metil-5-nitroindazol,
3-(1-naftilmetoxi)-1-(2-(1-pirrolidinil)etil)-5-nitroindazol,
- 20 1-(ciclohexilmetil)-3-(3,4-dimetilbenciloxi)-5-nitroindazol,
5-bromo-3-(2-naftilmetoxi)-1-(2-piperidinoetil)indazol,
1-(2-(diisopropilamino)etil)-3-(4-metoxibenciloxi)indazol,
5-amino-3-(2-naftilmetoxi)-1-(2-piperidinoetil)indazol,
3-(4-metoxibenciloxi)-5-nitro-1-pentilindazol,
- 25 3-(2-naftilmetoxi)-5-nitro-1-propilindazol,

o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, así como cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, la gammapatía monoclonal se selecciona de entre mieloma múltiple, leucemia de células plasmáticas, 5 macroglobulinemia de Waldeström, amiloidosis, o cualquiera de sus combinaciones. En una realización aún más preferida la gammapatía monoclonal es el mieloma múltiple.

Un **segundo aspecto** de la presente invención, se refiere al uso de una composición, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende o consiste en un compuesto de la invención, o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos 10 farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones, para la elaboración de un medicamento para la prevención, alivio, mejora y/o tratamiento de una gammapatía monoclonal. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición además comprende uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, o consiste en un compuesto de la invención y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En otra 15 realización preferida la composición además comprende otro principio activo. En una realización más preferida el otro principio activo se selecciona de la lista que consiste en prednisona, dexametasona, doxorubicina, plerixafor, ciclofosfamida, factor estimulante de colonias de granulocitos, melfalan, talidomida, lenalidomida, pomalidomida, bortezomib, carfilzomib, ixazomib, daratumumab, isatuximab, MOR202, elotuzumab, células madre 20 autólogas (sASCT), células madre alogénicas, o cualquiera de sus combinaciones. En una realización aún más preferida el otro principio activo es dexametasona. En otra realización aún más preferida el otro principio activo es melfalán. En otra realización preferida, el otro principio activo es bortezomib. En otra realización preferida, el otro principio activo es lenalinomida o talidomida.

25 En otra realización preferida de este segundo aspecto de la invención la gammapatía monoclonal se selecciona de entre el mieloma múltiple, leucemia de células plasmáticas, macroglobulinemia de Waldeström, amiloidosis, o cualquiera de sus combinaciones. En una realización más preferida la gammapatía monoclonal es el mieloma múltiple.

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere a una preparación combinada, de ahora en adelante preparación combinada de la invención, que comprende o consiste en: 30

- a) Un componente A que es un compuesto (compuesto de la invención) o una composición (composición de la invención) tal y como se define en la presente invención, y
- b) un componente B que es un principio activo que se selecciona de la lista que 35 consiste en prednisona, dexametasona, doxorubicina, plerixafor, ciclofosfamida,

factor estimulante de colonias de granulocitos, melfalan, talidomida, lenalidomida, pomalidomida, bortezomib, carfilzomib, ixazomib, daratumumab, isatuximab, MOR202, elotuzumab, células madre autólogas (sASCT), células madre alogénicas, o cualquiera de sus combinaciones.

5 En una realización aún más preferida el principio activo de (b) es dexametasona. En otra realización aún más preferida el principio activo de (b) es melfalán. En otra realización preferida la preparación combinada de la invención comprende además excipientes farmacéuticamente aceptables. En otra realización preferida la preparación combinada de la invención comprende, como principios activos, únicamente los anteriormente citados,
10 aunque pueda comprender otros excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables.

Un cuarto aspecto se refiere al uso de la preparación combinada de la invención en la elaboración de un medicamento para su uso simultáneo, separado o secuencial en terapia. Una realización preferida de este aspecto se refiere al uso de la preparación combinada de la invención donde los componentes A (a) y B (b) se administran de forma simultánea,
15 separada o secuencial para la prevención, alivio, mejora y/o tratamiento de una gammapatía monoclonal.

En otra realización más preferida la gammapatía monoclonal se selecciona de entre el mieloma múltiple, leucemia de células plasmáticas, macroglobulinemia de Waldeström, amiloidosis, o cualquiera de sus combinaciones. En una realización aún más preferida la
20 gammapatía monoclonal es el mieloma múltiple.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. El tratamiento con diferentes compuestos indazólicos reduce la viabilidad celular en diferentes líneas celulares de mieloma. (A) Análisis de la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT en U266, RPMI-LR5, U266-LR7, MM1.S, MM1.R y RPMI después de la
25 incubación con WIN-55 (0-50 μ M) durante 18 h vs. el control (CNT). (B) Viabilidad celular determinada por citometría de flujo utilizando anexina V/7-ADD en líneas celulares U266 y RPMI tras la exposición a WIN-55 (0-50 μ M) durante 18 h. El DotPlots que se muestra a la izquierda corresponde a un análisis representativo para U266 en condiciones control (izquierda) y tras la incubación con 50 μ M WIN-55; y el gráfico de barras, en la derecha de la
30 figura, corresponde al análisis cuantitativo resultante del análisis citométrico de las líneas U266 y RPMI. (C) Análisis de la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT en las seis líneas celulares de mieloma después del tratamiento con diferentes compuestos indazólicos de la familia PGN: PGN-6, -17, -34, y -72, probados a las dosis indicadas durante 18 h. Los

datos representan la media \pm s.d. de tres experimentos por triplicado. La significación estadística *: $p=0.05$ respecto a las condiciones control (sin tratar, CNT). Véase la tabla 2 para los valores de IC50. (D) Viabilidad celular después del tratamiento con WIN-55 a largo plazo, 48 y 72 horas, en las líneas celulares de mieloma más resistente y más sensible, U266 y RPMI. En la izquierda, viabilidad celular determinada mediante ensayo MTT a las 48 horas (gráfico superior) y a las 72 horas (gráfico inferior). A la derecha del panel, viabilidad celular analizada mediante citometría de flujo a las 48 horas (gráfico superior) y a las 72 horas (gráfico inferior). Los datos representan la media \pm s.d. de tres experimentos independientes por triplicado.

10 **Figura 2.** Efecto selectivo de WIN-55 sobre las células mielomatosas de pacientes, mientras que las células normales de individuos sanos no se ven afectadas. (A) Células de la médula ósea (células BM) aisladas obtenidas a partir de 6 pacientes MM fueron tratadas con WIN-55 (0-50 μ M) durante 18 h. Las diferentes poblaciones de BM fueron teñidas con 7AAD y una combinación adecuada de anticuerpos para identificar células granulomonocíticas (CD64+), linfocíticas (CD45+) y mielomatosas (CD38+). El panel superior muestra el gráfico de puntos de citometría (DotPlot) representativo de un paciente que corresponde a las condiciones control (CNT, izquierda) y células BM tratadas con 50 μ M de WIN-55 (W50, a la derecha). El panel inferior muestra el gráfico correspondiente a los datos obtenidos a partir del análisis cuantitativo de las células BM de todos los pacientes con MM (n=6). (B) Células sanguíneas periféricas (células PB) de donantes sanos fueron clasificadas inmunomagnéticamente usando microperlas de CD34+, CD3+ y CD19+ para el aislamiento de células madre hematopoyéticas, células T y células B, respectivamente. El panel superior muestra la viabilidad celular de las células madre hematopoyéticas (CD34+), linfocitos T (CD3+) y células B (CD19+) después del tratamiento con WIN-55 (0-50 μ M) durante 18 h analizadas mediante el ensayo de MTT. El panel inferior muestra la viabilidad celular en linfocitos T (LT, CD3+) y las células B (LB, CD19+) después del tratamiento con dos compuestos indazólicos de la familia PNG, PGN-6 y -17. Los datos representan la media \pm s.d. de tres experimentos por triplicado. La significación estadística *: $p=0.05$ respecto a las condiciones control (CNT, sin tratar).

30 **Figura 3.** El efecto antiproliferativo de WIN-55 está mediado principalmente por mecanismos de apoptosis dependiente de caspasas y por la ruta de señalización de transducción Akt. U266, la línea celular más resistente, fue tratada con 50 μ M de WIN-55 en los tiempos indicados. (A) Western-blot de formas PARP (completa FULL y escindida CL) y Casp-3, -9, -2 y -8 enteras (PRO, pro-form) y escindidas (CL, cleaved). (B) Western-blot de las proteínas de la familia Bcl-2, Bak, Bax, Bcl-xL y Mcl-1. (C) Viabilidad celular de las líneas celulares

U266 y RPMI después de la incubación con el inhibidor de pan-caspasa ZVAD-FMK (PC) y/o WIN-55 (W) durante 18 horas a las concentraciones indicadas, analizada mediante ensayo de MTT. Los datos representan la media \pm s.d. de tres experimentos independientes por triplicado. La significación estadística *: $p=0.05$ respecto a las células tratadas con 20 μ M de WIN-55 para U266 y 10 μ M para la línea celular RPMI. (D) Efecto del compuesto de la invención sobre las vías de señalización Akt, -Erk, -JNK y -p38 evaluado mediante Western blot de extractos de células U266 incubadas con 50 μ M de WIN-55 en los tiempos indicados. Se utilizó tubulina como control de carga.

Figura 4. WIN-55 induce la síntesis de las ceramidas en las células MM. (A) Detección inmunohistoquímica de ceramida en células U266 sin tratar (CNT, izquierda) y después del tratamiento con 50 μ M de WIN-55 durante 6 horas (WIN, a la derecha). (B) Western-blot de SPT, el enzima limitante de la velocidad de la síntesis de ceramidas, en las células U266 tratadas con 50 μ M de WIN-55 durante los tiempos indicados. (C) Niveles de expresión de PARP evaluados mediante Western blot en células tratadas con WIN-55 (WIN) y con/sin 50 μ M de Fumonisina B1 (FB1). (D) Análisis de la viabilidad celular usando el ensayo de MTT en células U266 (izquierda) y RPMI (derecha) tratadas con WIN-55 (W), Fumonisina B1 (FB1) o una combinación de ambas durante 18 h, en las dosis indicadas. Los datos representan la media \pm s.d. de tres experimentos independientes por triplicado. La significación estadística *: $p=0.05$ respecto a las células tratadas con 20 μ M de WIN-55 para U266 y 10 μ M para la línea celular RPMI. Se utilizó tubulina como control de carga.

Figura 5. WIN-55 atenúa la respuesta de estrés del retículo endoplásmico basal en las células U266 y promueve una pérdida temprana del potencial de membrana mitocondrial. (A) Western-blot de las proteínas implicadas en la respuesta a proteínas desplegadas (Unfolded Protein Response, UPR), como CHOP, ATF-4, p-IRE1 y XBP-1s y XBP-1u después del tratamiento con 50 μ M de WIN-55 en los puntos de tiempo especificados. (B) Pérdida del potencial de membrana mitocondrial en las células U266 después del tratamiento con 50 μ M de WIN-55 en los tiempos indicados, como control (CNT) se empleó medio de incubación con DMSO < 0.15% y como control positivo de la pérdida de potencial se empleó CCCP. Los datos representan la media \pm s.d. de tres experimentos independientes por triplicado. (C) Viabilidad celular determinada mediante ensayo MTT después del tratamiento con WIN-55 y/o antagonistas cannabinoides específicos de CB2: PGN-8, PGN-37 y PGN-70 a 100 μ M para U266 y 50 μ M para RPMI. Los datos representan la media \pm s.d. de tres experimentos independientes por triplicado. La significación estadística *: $p=0.05$ respecto a las células tratadas con 20 μ M de WIN-55 para U266 (W20) y 10 μ M para la línea celular RPMI (W10). (D) Patrón de expresión del receptor CB2 en varias líneas

celulares y células primarias de individuos sanos (células madre hematopoyéticas, linfocitos T y células B) determinada por Western blot. La banda en 40 kDa corresponde a la forma monomérica completa del receptor CB2 y la banda en 30 kDa a la forma truncada. Se utilizó tubulina como control de carga.

5 **Figura 6.** WIN-55 sinergiza con otros agentes anti-mieloma. Determinación de la viabilidad celular en U266, U266-LR7, RPMI y RPMI-LR5 usando el ensayo de MTT, después del tratamiento con una dosis fija de WIN-55 (W; 20 μ M para U266, U266-LR7 y RPMI-LR5, y 10 μ M para RPMI), que estaba por debajo del IC50 correspondiente a cada línea celular probada según Tabla 2, en combinación con concentraciones crecientes de dexametasona
10 (DEX, entre 5 μ M y 20 μ M) (panel A) o melfalán (MPH, entre 1 μ M y 4 μ M para las líneas U266 y U266-LR7; y entre 0.05 μ M y 0.5 μ M para las líneas RPMI y RPMI-LR5) (panel B). Los asteriscos indican los valores de los Índice de combinación (IC) correspondiente a la combinación y que se muestran debajo de cada gráfico.

Figura 7. WIN-55 inhibe considerablemente el crecimiento tumoral en ratones NGS in vivo.
15 5x10⁶ células U266 se inocularon por vía subcutánea en el flanco interescapular y los ratones se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos (n=10) para recibir 5 mg/kg i.p. de WIN-55 cada 24 horas, cada 48 horas, y el vehículo (<0,15% de DMSO en el medio) como grupo de control positivo. El diámetro de los tumores se midió cada dos días y el volumen se estimó como el volumen de la elipse. El gráfico muestra la evolución del volumen del tumor
20 para los días indicados. La significación estadística se definió como p \leq 0.05 y el asterisco indica el primer día en el que las diferencias fueron estadísticamente significativas para cada dosis, día 13 para el grupo tratado cada 24 horas y día 16 para el grupo tratado cada 48 horas. Los ratones del grupo control (CNT) fueron sacrificados en el día 19 por motivos éticos. Los datos representan la media \pm s.d. de volumen de todos los ratones en cada
25 grupo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención describen por primera vez el uso de los compuestos indazólicos de la presente invención para la prevención, alivio, mejora y/o tratamiento de
30 gammapatías monoclonales, y más concretamente, del mieloma múltiple. El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia que se caracteriza por la proliferación clonal de células plasmáticas malignas en la médula ósea y se asocia con presencia de componente monoclonal o proteína M en sangre y/o suero.

Las mejoras terapéuticas presentadas por fármacos inmunomoduladores como lenalidomida, e inhibidores del proteosoma como bortezomib entre otros agentes, han permitido un progreso notable en el control de esta enfermedad. Sin embargo, todavía se considera incurable. Con el objetivo de lograr una terapia eficaz frente a esta enfermedad, los autores de la presente invención han desarrollado y probado compuestos de naturaleza indazólica de origen sintético que ejercen un efecto antitumoral.

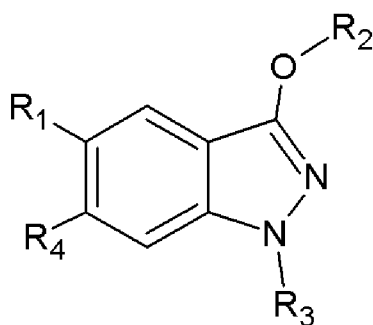
Concretamente se demuestra que los diferentes compuestos estudiados inducen una apoptosis selectiva en líneas celulares de mieloma y en las células plasmáticas en primer estadio de malignidad de pacientes con MM, sin afectar a la viabilidad de las células normales de donantes sanos, incluyendo células madre hematopoyéticas. Este efecto antiproliferativo está mediado por la activación de las caspasas, principalmente la caspasa 2, y se evita parcialmente por un inhibidor pan-caspasa. La apoptosis inducida por compuestos de naturaleza indazólica se correlacionó con un aumento de la expresión de Bax y Bak y una disminución de Bcl-xL y Mcl-1. Además, el tratamiento con los compuestos indazólicos indujo una respuesta bifásica de Akt/PKB y aumentó significativamente los niveles de ceramida en células MM. Sorprendentemente, el bloqueo de la síntesis de ceramida impidió la apoptosis inducida por los compuestos indazólicos, lo que indica que las ceramidas desempeñan un papel clave en el efecto pro-apoptótico de dichos compuestos en células MM. Además, el bloqueo del receptor de cannabinoides CB2 también inhibió la apoptosis por los compuestos indazólicos. El compuesto WIN-55 aumentó la actividad anti-mieloma de la dexametasona y el melfalán superando la resistencia celular a melfalán *in vitro*. Por último, la administración del cannabinoide WIN-55 a ratones modelo de plasmacitoma suprimió significativamente el crecimiento del tumor *in vivo*.

En conjunto, los datos sugieren que estos compuestos indazólicos pueden ser considerados como agentes terapéuticos en el tratamiento de una gammapatía monoclonal, y en concreto del mieloma múltiple.

Así, la presente invención se refiere al uso de derivados de indazol en la elaboración de un medicamento para la prevención, alivio, mejora y/o tratamiento de una gammapatía monoclonal, preferiblemente el mieloma múltiple.

30 *USO MÉDICO DEL COMPUESTO DE LA INVENCION*

Por tanto, un **primer aspecto** de la invención se refiere al uso de un compuesto, de ahora en adelante compuesto de la invención, de fórmula general (I):



(I)

donde

- R1 y R4 son miembros del grupo formado por hidrógeno, halógeno, nitro o amino.
- 5 - R2 es un miembro del grupo formado por propilo, butilo, pentilo, ciclohexilmetilo, fenetilo, naftilmetilo, heterocicloalquilo, amina primaria secundaria o terciaria, o bencilo sustituido en donde el grupo fenilo puede contener 1 o 2 sustituyentes del grupo formado por alquilo, hidroxilo, metoxi, nitro, amino o halógeno.
- R3 es un miembro del grupo formado por metilo, etilo, propilo, pentilo
- 10 cicloalquilmetilo, cicloalquiletilo, dialquilaminoetilo, heterocicloalquiletilo, cicloalquilcarbonilo (grupo carbonilo unido a cicloalquilo), heteroarilcarbonilo (grupo carbonilo unido a heteroarilo), arilcarbonilo (grupo carbonilo unido a arilo) opcionalmente sustituido, o aralquilcarbonilo (grupo carbonilo unido a aralquilo) opcionalmente sustituido;
- 15 o cualquiera de sus sales, preferiblemente cualquier sal farmacéuticamente aceptable, ésteres, tautómeros, polimorfos, hidratos farmacéuticamente aceptables, o un isómero, profármacos, derivados, solvatos o análogos, o cualquiera de sus combinaciones, de ahora en adelante compuesto de la invención, en la elaboración de un medicamento para la prevención, alivio, mejora y/o tratamiento de una gammapatía monoclonal. Alternativamente,
- 20 se refiere al compuesto de la invención para su uso en la prevención, alivio, mejora y/o tratamiento de una gammapatía monoclonal.

En una realización preferida de este aspecto de la invención:

- R1 es un miembro del grupo formado por hidrógeno o amino;
- 25 - R2 es un miembro del grupo formado por 4-metoxibencilo, 1-naftilmetilo, 2-naftilmetilo, heterocicloalquilo, diisopropilamino, dimetilamino, dietilamino, piperidinilo, morfolinilo, o pirrodinilo;

- R3 es un miembro del grupo formado por piperidinoetilo, morfolinoetilo, pirrolidiniletilo, diisopropilaminoetilo, arilo opcionalmente sustituido, aralquilo opcionalmente sustituido, 2-tienilo, o 4-cloro-3-piridilo;
- R4 es hidrógeno.

5

En otra realización preferida:

- R1 es un miembro del grupo formado por hidrógeno o amino;
- R2 es un miembro del grupo formado por 4-metoxibencilo, 1-naftilmetilo o 2-naftilmetilo;
- 10 - R3 es un miembro del grupo formado por piperidinoetilo, morfolinoetilo, pirrolidiniletilo o diisopropilaminoetilo;
- R4 es hidrógeno.

15 En una realización aún más preferida el compuesto de la invención se selecciona de la lista que consiste en:

- 3-(2-naftilmetoxi)-1-(2-piperidinoetil)indazol,
3-(1-naftilmetoxi)-1-(2-piperidinoetil)indazol,
1-(ciclohexilmetil)- 3-(ciclohexilmetoxi)indazol,
1-metil-3-(2-naftilmetoxi)indazol,
20 1-(2-ciclohexiletil)-3-(2-naftilmetoxi)indazol,
1-metil-3-(3,4-dimetilbenciloxi)indazol,
3-(2-naftilmetoxi)-5-nitro-1-(2-piperidinoetil)indazol,
3-(2-naftilmetoxi)-5-nitro-1-pentilindazol,
1-metil-3-(2-naftilmetoxi)-5-nitroindazol,
25 1-metil-5-nitro-3-(fenetoxi)indazol,
5-nitro-1-pentil-3-(pentiloxi)indazol,
3-(3,4-dimetilbenciloxi)-1-(2-morfolinoetil)-5-nitroindazol,
1-metil-3-(1-naftilmetoxi)-5-nitroindazol,

1-(2-morfolinoetil)-3-(2-naftilmetoxi)-5-nitroindazol,
 3-(3,4-dimetilbenciloxi)-1-metil-5-nitroindazol,
 3-(1-naftilmetoxi)-1-(2-(1-pirrolidinil)etil)-5-nitroindazol,
 1-(ciclohexilmetil)-3-(3,4-dimetilbenciloxi)-5-nitroindazol,
 5 5-bromo-3-(2-naftilmetoxi)-1-(2-piperidinoetil)indazol,
 1-(2-(diisopropilamino)etil)-3-(4-metoxibenciloxi)indazol,
 5-amino-3-(2-naftilmetoxi)-1-(2-piperidinoetil)indazol,
 3-(4-metoxibenciloxi)-5-nitro-1-pentilindazol,
 3-(2-naftilmetoxi)-5-nitro-1-propilindazol,

10 o cualquiera de sus sales, preferiblemente cualquier sal farmacéuticamente aceptable, ésteres, tautómeros, polimorfos, hidratos farmacéuticamente aceptables, o un isómero, profármacos, derivados, solvatos o análogos, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, la gammapatía monoclonal se selecciona de la lista que consiste en mieloma múltiple, leucemia de células plasmáticas,
 15 macroglobulinemia de Waldeström, amiloidosis, o cualquiera de sus combinaciones. En una realización más preferida la gammapatía monoclonal es el mieloma múltiple.

En esta memoria, cuando se hace mención al término “sales o solvatos farmacéuticamente y/o fisiológicamente aceptables” se refiere a cualquier sal, éster, solvato farmacéuticamente aceptables, o cualquier otro compuesto que, en su administración, es capaz de proporcionar
 20 (directa o indirectamente) un compuesto tal y como los descritos en el presente documento. No obstante, se observará que las sales farmacéuticamente inaceptables también caen dentro del alcance de la invención, ya que éstas pueden ser útiles para la preparación de sales farmacéuticamente aceptables. La preparación de sales, profármacos y derivados puede ser llevada a cabo mediante métodos conocidos en el estado de la técnica.

25 Por ejemplo, las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos proporcionados en el presente documento son sintetizadas a partir del compuesto de la invención, mediante métodos químicos convencionales. En general, tales sales son preparadas, por ejemplo, reaccionando las formas ácidas o básicas libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o el ácido apropiados en agua, o en un disolvente orgánico, o en
 30 una mezcla de ambos. En general, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de

etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Ejemplos de las sales de adición ácidas incluyen sales de adición de ácidos minerales tales como, por ejemplo, hidrocloreuro, hidrobromuro, hidroyoduro, sulfato, nitrato, fosfato, y sales de adición de ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, acetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, malato, mandelato, metanosulfonato y p-toluensulfonato.

Ejemplos de sales de adición alcalinas incluyen sales inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, calcio, amonio, magnesio, aluminio y litio, y sales alcalinas orgánicas tales como, por ejemplo, etilendiamina, etanolamina, N,N dialquilenetanolamina, glucamina y sales aminoácidas básicas.

Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I) pueden incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples, incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención, es decir, el término isómero también se refiere a cualquier mezcla de isómeros, como diastereómeros, racémicos, etc., incluso a sus isómeros ópticamente activos o las mezclas en distintas proporciones de los mismos. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran los profármacos de los compuestos de fórmula (I). El término "prodroga" o "profármaco" tal como aquí se utiliza incluye cualquier derivado de un compuesto de fórmula (I) -por ejemplo y no limitativamente: ésteres (incluyendo ésteres de ácidos carboxílicos, ésteres de aminoácidos, ésteres de fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, etc.), carbamatos, amidas, etc.- que al ser administrado a un individuo puede ser transformado directa o indirectamente en dicho compuesto de fórmula (I) en el mencionado individuo. Ventajosamente, dicho derivado es un compuesto que aumenta la biodisponibilidad del compuesto de fórmula (I) cuando se administra a un individuo o que potencia la liberación del compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico. La naturaleza de dicho derivado no es crítica siempre y cuando pueda ser administrado a un individuo y proporcione el compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico de un individuo. La preparación de dicho profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

Tal como aquí se utiliza, el término "derivado" incluye tanto a compuestos farmacéuticamente aceptables, es decir, derivados del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento o composiciones alimentarias, como

derivados farmacéuticamente no aceptables, ya que éstos pueden ser útiles en la preparación de derivados farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos de la invención pueden estar en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos. En este sentido, el término "solvato", tal como aquí se utiliza, incluye tanto solvatos farmacéuticamente aceptables, es decir, solvatos del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como solvatos farmacéuticamente no aceptables, los cuales pueden ser útiles en la preparación de solvatos o sales farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del solvato farmacéuticamente aceptable no es crítica siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el solvato es un hidrato. Los solvatos pueden obtenerse por métodos convencionales de solvatación conocidos por los expertos en la materia.

Para su aplicación en terapia, los compuestos de fórmula (I), sus sales, profármacos o solvatos, se encontrarán, preferentemente, en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, es decir, que tiene un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y portadores, y no incluyendo material considerado tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para el principio activo son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente superiores al 70%, y todavía más preferiblemente superiores al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95% de compuesto de fórmula (I), o de sus sales, solvatos o profármacos.

Derivados o profármacos especialmente preferidos son aquellos que incrementan la biodisponibilidad de los compuestos de la invención cuando éstos son administrados al sujeto (por ejemplo, permitiendo que un compuesto administrado oralmente sea absorbido más rápidamente acelerando su paso a la sangre) o que mejoran el suministro del compuesto a un compartimento biológico (por ejemplo, el cerebro o el sistema linfático) respecto al compuesto inicial.

COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA Y FORMA FARMACÉUTICA DE LA INVENCION

Un **segundo aspecto** de la presente invención, se refiere al uso de una composición, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende o consiste en un compuesto de la invención, en la elaboración de un medicamento para la prevención, alivio, mejora y/o tratamiento de una gammapatía monoclonal, preferiblemente el tratamiento del mieloma

múltiple. Alternativamente se refiere a la composición de la invención para su uso en la prevención, alivio, mejora y/o tratamiento de una gammapatía monoclonal.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición además comprende uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

5 Preferiblemente la composición de la invención es una composición farmacéutica que comprende como único principio activo un compuesto de la invención, aunque puede comprender uno o más excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. En otra realización preferida la composición además comprende otro principio activo. En una realización más preferida el otro principio activo se selecciona de la lista que consiste en
10 prednisona, dexametasona, doxorubicina, plerixafor, ciclofosfamida, factor estimulante de colonias de granulocitos, melfalan, talidomida, lenalidomida, pomalidomida, bortezomib, carfilzomib, ixazomib, daratumumab, isatuximab, MOR202, elotuzumab, células madre autólogas (sASCT), células madre alogénicas, o cualquiera de sus combinaciones. En una realización aún más preferida el otro principio activo es dexametasona. En otra realización
15 aún más preferida el otro principio activo es melfalán. En otra realización preferida, el otro principio activo es bortezomib. En otra realización preferida, el otro principio activo es lenalinomida o talidomida.

En otra realización preferida de este segundo aspecto de la invención la gammapatía monoclonal se selecciona de entre el mieloma múltiple, leucemia de células plasmáticas,
20 macroglobulinemia de Waldeström, amiloidosis, o cualquiera de sus combinaciones. En una realización más preferida la gammapatía monoclonal es el mieloma múltiple.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

25 En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad del agente o compuesto capaz de desarrollar la acción terapéutica determinada por sus propiedades farmacológicas, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o
30 trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

Los compuestos descritos en la presente invención, sus sales, profármacos y/o solvatos así como las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden ser utilizados junto con otros fármacos, o principios activos, adicionales para proporcionar una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición
35 farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición

separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), o una sal, profármaco o solvato del mismo.

5 Como se emplea aquí, el término "principio activo", "substancia activa", "substancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" ó "ingrediente farmacéuticamente activo" significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista
10 que proporciona la actividad específica o el efecto.

Otro aspecto de la invención se refiere a una forma farmacéutica, de ahora en adelante forma farmacéutica de la invención, que comprende el compuesto de la invención o la composición de la invención.

15 En esta memoria se entiende por "forma farmacéutica" la mezcla de uno o más principios activos con o sin aditivos que presentan características físicas para su adecuada dosificación, conservación, administración y biodisponibilidad.

En otra realización preferida de la presente invención, las composiciones y formas farmacéuticas de la invención son adecuadas para la administración oral, en forma sólida o líquida. Las posibles formas para la administración oral son tabletas, cápsulas, siropes o
20 soluciones y pueden contener excipientes convencionales conocidos en el ámbito farmacéutico, como agentes agregantes (p.e. sirope, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto o polivinil pirrolidona), rellenos (p.e. lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina), disgregantes (p.e. almidón, polivinil pirrolidona o celulosa microcristalina) o un surfactante farmacéuticamente aceptable como el lauril sulfato de sodio. Otras formas
25 farmacéuticas pueden ser los sistemas coloidales, dentro de los cuales se incluyen nanoemulsiones, nanocápsulas y nanopartículas poliméricas.

Las composiciones para administración oral pueden ser preparadas por métodos los convencionales de Farmacia Galénica, como mezcla y dispersión. Las tabletas se pueden recubrir siguiendo métodos conocidos en la industria farmacéutica.

30 Las composiciones y formas farmacéuticas se pueden adaptar para la administración parenteral, como soluciones estériles, suspensiones, o liofilizados de los productos de la invención, empleando la dosis adecuada. Se pueden emplear excipientes adecuados, como agentes tamponadores del pH o surfactantes.

Las formulaciones anteriormente mencionadas pueden ser preparadas usando métodos convencionales, como los descritos en las Farmacopeas de diferentes países y en otros textos de referencia.

5 El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales.

10 La administración de los compuestos, composiciones o formas farmacéuticas de la presente invención puede ser realizada mediante cualquier método adecuado, como la infusión intravenosa y las vías oral, tópica o parenteral. La administración oral es la preferida por la conveniencia de los pacientes y por el carácter crónico de las enfermedades a tratar.

15 La cantidad administrada de un compuesto de la presente invención dependerá de la relativa eficacia del compuesto elegido, la severidad de la enfermedad a tratar y el peso del paciente. Sin embargo, los compuestos de esta invención serán administrados una o más veces al día, por ejemplo 1, 2, 3 ó 4 veces diarias, con una dosis total entre 0.1 y 1000 mg/Kg/día. Es importante tener en cuenta que puede ser necesario introducir variaciones en la dosis, dependiendo de la edad y de la condición del paciente, así como modificaciones en la vía de administración.

20 Los compuestos y composiciones de la presente invención pueden ser empleados junto con otros medicamentos en terapias combinadas. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición o de otra composición diferente, para su administración al mismo tiempo o en tiempos diferentes.

PREPARACIÓN COMBINADA DE LA INVENCIÓN Y USOS

25 Un **tercer aspecto** de la invención se refiere a una preparación combinada, de ahora en adelante preparación combinada de la invención, que comprende o consiste en:

- a) Un componente A que es un compuesto (compuesto de la invención) o una composición (composición de la invención) tal y como se define en la presente invención, y
- b) Un componente B que es un principio activo que se selecciona de la lista que
30 consiste en prednisona, dexametasona, doxorubicina, plerixafor, ciclofosfamida, factor estimulante de colonias de granulocitos, melfalan, talidomida, lenalidomida, pomalidomida, bortezomib, carfilzomib, ixazomib, daratumumab, isatuximab,

MOR202, elotuzumab, células madre autólogas (sASCT), células madre alogénicas, o cualquiera de sus combinaciones.

5 En una realización aún más preferida el principio activo de (b) es dexametasona. En otra realización aún más preferida el principio activo de (b) es melfalán. En otra realización preferida, el otro principio activo es bortezomib. En otra realización preferida, el otro principio activo es lenalinomida o talidomida.

10 En otra realización preferida la preparación combinada de la invención comprende además excipientes farmacéuticamente aceptables. En otra realización preferida la preparación combinada de la invención comprende, como principios activos, únicamente los anteriormente citados, aunque pueda comprender otros excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables.

15 Un **cuarto aspecto** se refiere al uso de la preparación combinada de la invención donde los componentes (a) y (b) se administran de forma simultánea, separada o secuencial para la prevención, alivio, mejora y/o tratamiento de una gammapatía monoclonal. Alternativamente se refiere a la preparación combinada de la invención para su uso simultáneo, separado o secuencial en terapia.

20 Una realización preferida de este aspecto se refiere al uso de la preparación combinada de la invención en la elaboración de un medicamento para su uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de una gammapatía monoclonal. Alternativamente se refiere a la preparación combinada de la invención para su uso simultáneo, separado o secuencial.

En otra realización preferida de este aspecto la gammapatía monoclonal se selecciona de entre el mieloma múltiple, leucemia de células plasmáticas, macroglobulinemia de Waldenström, amiloidosis, o cualquiera de sus combinaciones. En una realización más preferida la gammapatía monoclonal es el mieloma múltiple.

25 El término "tratamiento" tal como se entiende en la presente invención se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de una enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano) que incluye:

- (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- 30 (ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología;
- (iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

El término "prevención" tal como se entiende en la presente invención consiste en evitar la aparición de la enfermedad, es decir, evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición patológica.

- 5 Los compuestos de la invención pueden estar en una forma cristalina como compuestos libres o solvatos, y se pretende que ambas formas estén dentro del alcance de la presente invención. Los métodos de solvatación se conocen generalmente en la técnica. Solvatos adecuados son los solvatos farmacéuticamente aceptables. En una realización particular el solvato es un hidrato.
- 10 Los compuestos de la invención o sus sales o solvatos están preferiblemente en forma farmacéuticamente aceptable o en forma substancialmente pura. Como forma farmacéuticamente aceptable se entiende, inter alia, que tienen un nivel farmacéuticamente aceptable de pureza, excluyendo aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y excipientes, y sin incluir ningún material considerado tóxico a niveles de dosificación
- 15 normales. Los niveles de pureza para el compuesto de la invención están preferiblemente por encima del 50%, más preferiblemente por encima del 70%, y aún más preferiblemente por encima del 90%.

En una realización preferida está por encima del 95% del compuesto de la invención, o de sus sales, solvatos o profármacos.

- 20 Los compuestos de la presente invención pueden incluir enantiómeros dependiendo de la presencia de centros quirales, o isómeros dependiendo de la presencia de enlaces múltiples (por ejemplo, Z, E). Los isómeros, enantiómeros o diastereómeros individuales y mezclas de los mismos están dentro del alcance de la presente invención. Cuando un compuesto se dibuja con estereoquímica explícita, se tiene la intención de representar la estructura
- 25 racémica con la estereoquímica relativa, así como los enantiómeros en diferentes grados de pureza. En cualquier caso, los enantiómeros y los diastereoisómeros de los compuestos representados con una estereoquímica particular también forman parte de los compuestos de la invención.

- Dichas composiciones pueden tener uno o más agentes indazólicos. Dichos agentes
- 30 indazólicos se podrían combinar en proporciones iguales o diferentes, y podrían formar parte de la misma formulación o podrían formularse en formulaciones diferentes para su administración secuencial, conjunta o simultánea.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se administran por vía tópica, transdérmica, oral, nasal, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, enteral o

parenteral. Ejemplos ilustrativos de administración tópica o transdérmica incluye, aunque no se limita, iontoforesis, sonoforesis, electroporación, presión mecánica, gradiente de presión osmótica, cura oclusiva, microinyecciones, inyecciones sin agujas mediante presión, parches microeléctricos y cualquier combinación de ellas. Ejemplos ilustrativos de formas farmacéuticas de administración por vía oral incluyen comprimidos, cápsulas, granulados, soluciones, suspensiones, etc., y pueden contener los excipientes convencionales, tales como aglutinantes, diluyentes, desintegrantes, lubricantes, humectantes, etc., y pueden ser preparadas por métodos convencionales. Las composiciones farmacéuticas también pueden ser adaptadas para su administración parenteral, en forma de, por ejemplo, soluciones, suspensiones o productos liofilizados, estériles, en la forma de dosificación apropiada; en este caso, dichas composiciones farmacéuticas incluirán los excipientes adecuados, tales como tampones, tensioactivos, etc. En cualquier caso, los excipientes se elegirán en función de la forma farmacéutica de administración seleccionada. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos y de su preparación puede encontrarse en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 10 Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

Tanto las composiciones de la presente invención, así como la preparación combinada pueden formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, pueden estar, sin limitarse, en disolución acuosa estéril o en fluidos biológicos, tal como suero. Las disoluciones acuosas pueden estar tamponadas o no tamponadas y tienen componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, y similares, y nutrientes incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas y minerales. Alternativamente, las composiciones pueden prepararse para su administración en forma sólida. Las composiciones pueden combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo, pero sin limitarse a, aglutinantes tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes tales como ácido algínico o almidón de maíz; lubricantes tales como estearato de magnesio, deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina; o agentes aromatizantes tales como menta o salicilato de metilo.

Tales composiciones o preparaciones combinadas y/o sus formulaciones puede administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse a, intraperitoneal, intravenoso, intramuscular, subcutáneo, intratecal, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal o dérmico.

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo, o tolerancia del mamífero. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de agente o agentes indazólicos que produzcan el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dichos profármacos, derivados o análogos y el efecto terapéutico a conseguir. Los "adyuvantes" y "vehículos farmacéuticamente aceptables" que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia.

Debe enfatizarse que el término "preparación combinada" o también denominada "yuxtaposición", en esta memoria, significa que los componentes de la preparación combinada no necesitan encontrarse presentes como unión, por ejemplo en una composición, para poder encontrarse disponibles para su aplicación separada o secuencial. De esta manera, la expresión "yuxtapuesta" implica que no resulta necesariamente una combinación verdadera, a la vista de la separación física de los componentes.

Otro aspecto se refiere a un método de tratamiento de una gammapatía monoclonal, que comprende la administración de un compuesto de la invención, o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones, tal como se ha definido anteriormente.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición además comprende uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. Preferiblemente la composición de la invención es una composición farmacéutica que comprende como único principio activo un compuesto de la invención, aunque puede comprender uno o más excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. En otra realización preferida la composición además comprende otro principio activo. En una realización más preferida el otro principio activo se selecciona de la lista que consiste en prednisona, dexametasona, doxorubicina, plerixafor, ciclofosfamida, factor estimulante de colonias de granulocitos, melfalan, talidomida, lenalidomida, pomalidomida, bortezomib, carfilzomib, ixazomib, daratumumab, isatuximab, MOR202, elotuzumab, células madre autólogas (sASCT), células madre alogénicas, o cualquiera de sus combinaciones. En una realización aún más preferida el otro principio activo es dexametasona. En otra realización aún más preferida el otro principio activo es melfalán. En otra realización preferida, el otro principio activo es bortezomib. En otra realización preferida, el otro principio activo es lenalinomida o talidomida.

En otra realización preferida de este segundo aspecto de la invención la gammapatía monoclonal se selecciona de entre el mieloma múltiple, leucemia de células plasmáticas,

macroglobulinemia de Waldeström, amiloidosis, o cualquiera de sus combinaciones. En una realización más preferida la gammapatía monoclonal es el mieloma múltiple.

METODO DE PREPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE LA INVENCIÓN

5 La preparación de derivados de éteres de indazol a utilizar según la invención se describe en European Journal of Medicinal Chemistry 2014, 73, 56-72 (EJMC-2014) y en la patente PCT/ES2010/000400.

Los compuestos han sido preparados en varias etapas de acuerdo a los procedimientos descritos en EJMC-2014. La primera consiste en la protección del nitrógeno de la posición 1
10 de los derivados de indazol mediante la reacción de cloroformiato de etilo. La segunda etapa consiste en la introducción del grupo R₂. El tercer paso consiste en la desprotección del nitrógeno de la posición 1 e introducción del sustituyente R₃ por reacción con los correspondientes haluros, donde R₁, R₂ y R₃ tienen la significación antes mencionada.

En la patente (PCT/ES2010/000400) se reivindican estos derivados de indazol para el
15 tratamiento, la prevención o la mejora del glaucoma, del asma bronquial y bronquitis crónica, de las alergias tales como la dermatitis de contacto o la conjuntivitis alérgica, de la artritis, del dolor, de las enfermedades asociadas a los trasplantes de órganos, de los desórdenes motores asociados al síndrome de Tourette, a la enfermedad de Parkinson o a la corea de Huntington, de la esclerosis múltiple, de la emesis y otros efectos tóxicos o indeseables
20 asociados a quimioterapia anticancerosa y del apetito.

En el artículo (EJMC-2014) se describen estos derivados de éteres de indazol como potenciales fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los
25 expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

EJEMPLOS DE LA INVENCIÓN

Los ejemplos muestran que los compuestos de la invención ejercen un efecto pro-apoptótico sobre las células MM, sin afectar a la viabilidad de las células sanas, interaccionando

selectivamente con los receptores CB2, desencadenando la actividad pro-apoptótica a través de la ruta de caspasa-2, aumentando los reguladores pro-apoptóticos y disminuyendo los anti-apoptóticos, aumentando la síntesis *de novo* de la ceramida, y disminuyendo el potencial de membrana mitocondrial.

- 5 Además, estos nuevos compuestos inhiben el crecimiento tumoral *in vivo*, y aumentan la susceptibilidad a fármacos anti-mieloma tales como dexametasona y melfalán.

Por lo tanto, esta invención representa una terapia muy prometedora frente al mieloma múltiple y enfermedades relacionadas.

10 Ejemplo 1. Materiales y métodos

Declaración de Ética.

Toda la investigación que implica muestras de animales o humanos fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario Virgen del Rocío, y se llevó a cabo de conformidad con la Declaración de Helsinki.

15 Cultivos celulares de mieloma múltiple y células del paciente.

Los estudios *in vitro* se llevaron a cabo utilizando seis líneas celulares de MM humano diferentes, U266, RPMI8226, MM1S, MM1R, U266-LR7 y RPMI-LR5. Para los ensayos ex vivo, se utilizaron células primarias humanas de donantes sanos y pacientes con MM (Tabla 1). Las líneas celulares de MM humanos U266, RPMI8226 y MM1.S se adquirieron de ATCC
20 y las líneas U266-LR7, RPMI-LR5 y MM1.R fueron amablemente proporcionados por el Dr. Enrique Ocio (Hospital Universitario de Salamanca, España). Las células primarias se obtuvieron a partir de aspirados de médula ósea (BM) o muestras de sangre periférica (PB), y las células mononucleares (PBMCs) se aislaron por centrifugación Ficoll-Hypaque y se lavaron dos veces en tampón fosfato salino (PBS) que contiene 1% de BSA. Las células
25 madre hematopoyéticas, y los linfocitos B y T se aislaron de donantes sanos de PB por separación inmunomagnética positiva utilizando microperlas MACS CD34+, CD19+ y CD3+ humanas respectivamente. Las células plasmáticas de MM se obtuvieron a partir de la médula ósea de pacientes (BM) con una infiltración de células de más del 30% (Tabla 1). Las células plasmáticas de MM se identificaron usando CD138+ y luego se distinguieron de
30 las otras poblaciones celulares por citometría de flujo utilizando una combinación adecuada de anticuerpos: anticuerpos anti-humano CD64-FITC, CD34-PE, CD56-APC, CD38-APC-H7, y CD45-Pacific Blue (BD Biosciences, San Jose, CA). Todas las líneas celulares se

cultivaron en RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% y 1% de penicilina/estreptomicina, como se recomienda por el proveedor. Para las células primarias humanas, la concentración de FBS era de hasta 20%.

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes de los que se obtuvo las células plasmáticas de mieloma primario. UPN: número de paciente único (unique patient number); del = deleción; t = traslocación; amp = amplificación.

ID.PACIENTE	CITOGENÉTICA	RESPUESTA en la primera línea
UPN-1	IgH traslocado (14q32)	Primaria refractaria
UPN-2	t(4;14)	Respuesta parcial
UPN-3	del(17p)p53	Primaria refractaria
UPN-4	t(11;14)	Muerte en el diagnóstico
UPN-5	del(13q14), del(17p)p53, hipodiploidia	Respuesta parcial
UPN-6	amp(1q), trisomía del 7	Enfermedad refractaria

Medicamentos y tratamientos.

10 Los agonistas cannabinoides WIN-55, 212-2 mesilato (mesylate) se adquirieron de Tocris Bioscience. Los agonistas indazólicos PGN-6, -17, -34 y -72 y los antagonistas selectivos de CB2 PGN-8, -37 y -70 fueron sintetizados y amablemente proporcionados por la Dra. Nuria Campillo del Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid. Fumonisina B1 (FB1) se obtuvo de Enzo Life Sciences, Z-VAD (OMe)-FMK (inhibidor de pan-caspasa) de Abcam y TMRE
 15 (tetrametilrodamina metil éster perclorato), de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Los agentes anti mieloma dexametasona y melfalán (melphalan) fueron proporcionados por el departamento farmacéutico del Hospital Universitario Virgen del Rocío.

Western blot y anticuerpos.

Los extractos de Western blot se realizaron después de 0, 2, 6, 18 y 24 h. Las células se
 20 lisaron de acuerdo con Gilbert et al., 2002. (*J Immunol Methods*. 2002, 271:185-201),

añadiendo un 2% de ASB-14 (Calbiochem, Beeston, Reino Unido) al tampón de lisis isotónico. La concentración de proteína se determinó por Pierce® Microplate BCA Protein Assay kit-Agente Reductor compatible (Pierce, Rockford, IL). Las muestras se sometieron a SDS/PAGE en geles premoldeados AnykD (Bio Rad, Hercules, CA) y se transfirieron a membranas de PVDF utilizando Trans-Blot® Turbo™ System (Bio-Rad). Las membranas se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpo primario en tampón Tris salino con 0.05% de Tween20 (TTBS) después con el anticuerpo secundario adecuado, y se sometieron a la detección por quimioluminiscencia. Como condición control, las células se trataron con DMSO (<0,15%) en medio RPMI 1640 de Gibco (Gaithersburg, MD).

5

10 Los anticuerpos para la caspasa-2, -8, -9, la caspasa-3 activa, -p-Akt (phospho T308), p-Erk (T202 + Y204), -p-p38MAPK (phospho T180 + Y182), -p-JNK (phospho T183 + Y185), -SPT, y los receptores CB1 y CB2 eran de Abcam, anti-MCL-1 y -Bcl-xL eran de Santa Cruz Biotechnology, anti-PARP era de Cell Signaling Technology, anti-Bax y -Bak eran de BD Biosciences. Anti-beta-tubulina era de Sigma-Aldrich. Todos los anticuerpos secundarios

15 utilizados conjugados con peroxidasa (HRP) eran de Jackson ImmunoResearch, y producidos en burro para evitar la posible reactividad cruzada cuando se realizaron varias pruebas.

Análisis de la viabilidad celular.

Las líneas celulares de MM y las células primarias se expusieron a diferentes dosis de compuestos indazólicos y la viabilidad se evaluó a las 18, 48 y 72 h. Los pretratamientos con el inhibidor de la síntesis ceramida (FB1), pan-caspasa (ZVAD-FMK) y los antagonistas de CBs (PGN-8, PGN-37 y PGN-70) se realizaron durante 30 minutos y luego se incubaron las células con el compuesto indazólico WIN-55 hasta 18 h. La viabilidad celular se determinó usando el ensayo de MTT Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japón) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

20

25

La viabilidad celular de las líneas celulares de MM y células primarias de donantes sanos de PB también se evaluó por citometría de flujo usando 7-AAD/Anexina V. Las células de médula ósea (BM) de pacientes se analizaron usando 7-AAD con una combinación de anticuerpos monoclonales contra antígenos asociados a mieloma (anti-CD56-APC, anti-CD45-Pacific Blue, y anti-CD38-APC-H7 [BD Biosciences]) y los anticuerpos para discriminar la población granulomonocítica (anti-CD64-FITC) y linfocítica (anti-CD45-Pacific Blue). Las células se adquirieron mediante el citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences) y se analizaron usando Infinicyt™ Software (Cytognos, España).

30

La evaluación de la sinergia del compuesto indazólico WIN-55 con otros agentes antimieloma, como la dexametasona y melfalán, se realizó evaluando la viabilidad celular mediante ensayo de MTT. La potencia de la combinación se cuantificó con el software Calculusyn (Biosoft, Ferguson, MO), que se basa en el método de Chou Talalay y calcula un índice de combinación (IC) con la siguiente interpretación: IC>1: efecto antagonista, IC=1: efecto aditivo y IC<1: efecto sinérgico.

Análisis del potencial transmembrana mitocondrial.

Las líneas celulares U266 fueron expuestas a 50 μ M de WIN-55 durante 15, 30, 45 y 60 min. La pérdida de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) se calculó empleando TRME (tetramethylrhodamine-ethyl-ester-perchlorate) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y CCCP (2-[2-(3-Chlorophenyl) hydrazinylydene] propanedinitrile) fue utilizado como un control para inducir la pérdida de $\Delta\psi_m$.

Inmunofluorescencia.

Las células tratadas durante 6 h con compuestos indazólicos se recogieron y colocaron en portaobjetos. La tinción de inmunofluorescencia se realizó como se ha descrito previamente por Vielhaber et al. 2001 (Glycobiology. 2001,11:451-7) usando anti-ceramida como anticuerpo primario. El anticuerpo de la ceramida se obtuvo de Sigma-Aldrich y el secundario conjugado con Alexa-488 de Abcam. Como condición control, las células se trataron con DMSO (<0,15%) en medio RPMI 1640 de Gibco (Gaithersburg, MD).

Xenoinjertos de MM.

Los ratones "NOD/scid/IL-2R gammae null" (NGS) fueron adquiridos de Charles River (Francia). Los xenoinjertos de tumores fueron inducidos por la inyección subcutánea de 5×10^6 células de U266 mezclados con 100 μ l de Matrigel (BD Biosciences) en ratones de 8 semanas de edad. Cuando los tumores se hicieron palpables (> 0,5 cm), los ratones se asignaron al azar en los siguientes grupos (10 ratones por grupo), los cuales recibían i.p.: 1) 5 mg/kg WIN-55 cada 24 horas, 2) 5 mg/kg WIN-55 cada 48 horas, y 3) vehículo. Dos grupos se dejaron libres de tumor y sirvieron como control negativo, recibiendo el tratamiento cada 24 ó 48 horas, respectivamente. El crecimiento del tumor se evaluó diariamente midiendo los dos diámetros bisectores del tumor con un calibre o pie de rey digital. El volumen se calculó usando la siguiente fórmula: volumen= longitud x (anchura) e2 x 0,4 mm³. Los animales se sacrificaron cuando la longitud o la anchura del tumor alcanzaron los 2 cm.

Estadística.

A menos que se indique lo contrario, se muestra un experimento representativo de al menos tres experimentos independientes. Para todos los análisis estadísticos, los datos se analizaron mediante la prueba t de Student con el programa SPSS con una significación estadística $P \leq 0,05$. También se determinaron las medias y desviaciones estándar. La sinergia se calculó usando R como se describe en el software Calculusyn; un índice de combinación (IC) <1 indica sinergia, y >1 indica antagonismo.

10 Ejemplo 2. Los compuestos indazólicos de la invención tienen un efecto anti-proliferativo altamente selectivo en las células MM.

En primer lugar, se evaluó el efecto de diferentes compuestos indazólicos de la invención sobre la proliferación y la viabilidad celular de varias líneas celulares de MM mediante el ensayo de MTT y citometría de flujo. Se encontró que la incubación con WIN-55, que es un compuesto indazólico no selectivo, redujo significativamente la viabilidad celular de todas las líneas celulares de MM en comparación con células control no tratadas a las 18h (Figura 1). El patrón de sensibilidad mostrado en el ensayo MTT (Figura 1A y Tabla 2) varió de U266, siendo esta línea celular la más resistente ($IC_{50}=17.24 \mu M$), a RPMI, que fue la más sensible ($IC_{50}=11.66 \mu M$). También confirmó la disminución de la viabilidad celular por citometría de flujo para las dos líneas celulares antes mencionadas (Figura 1B), y se obtuvieron valores de IC_{50} similares a los obtenidos mediante ensayo de MTT para U266 ($IC_{50} = 18.51$) y RPMI ($IC_{50} = 12.66$). El análisis de la viabilidad celular mediante el ensayo MTT y citometría de flujo a tiempos más largos, 48 y 72 h, también mostraron resultados similares (Figura 1D).

Además, todas las líneas celulares de MM se trataron con seis compuestos indazólicos diferentes, PGN-6, -17, -34, y -72, que se caracterizan por su mayor selectividad por el receptor CB2 en comparación con WIN-55. Como se muestra en la Figura 1C, estos compuestos de la familia PGN indujeron un efecto antiproliferativo variable pero significativo en las diferentes líneas celulares MM (Tabla 2).

El efecto de los compuestos indazólicos se examinó más ampliamente *ex vivo* en células plasmáticas de mieloma (CPM) de seis pacientes con MM por citometría de flujo usando WIN-55. Después del tratamiento, las CPMs (CD38+) mostraron una disminución significativa de la viabilidad celular de 70 a 85% a 20 y 50 μM respectivamente (Figura 2A). Por el contrario, la viabilidad celular de las subpoblaciones de células normales analizadas,

incluyendo granulomonocitos (CD64+) y linfocitos (CD45+), obtenidas a partir de médula ósea de pacientes, apenas se vió afectada. Sólo la dosis más alta probada, 50 μ M, indujo un efecto antiproliferativo sobre la población linfocítica (CD45+). Por esta razón, se aislaron las dos poblaciones linfocíticas principales, las células B (CD19+) y las células T (CD3+)

5 obtenidas a partir de individuos sanos y luego se analizó su viabilidad por separado; como se muestra en la Figura 2B, el efecto antiproliferativo observado en la población linfocítica se debió principalmente al efecto en las células B (CD19+). Además, se ha probado el efecto de WIN-55 en las células madre hematopoyéticas (CD34+) de donantes sanos y, sorprendentemente, la viabilidad de las células madre hematopoyéticas no se vió afectada

10 por el tratamiento con el/los compuestos indazólicos de la invención (Figura 2B). Por último, también se evaluó el efecto de dos de los compuestos indazólicos PNG, PGN-6 y PGN-17; éstos no afectaron la viabilidad de los linfocitos a las dosis a las que se observó un importante efecto antiproliferativo sobre líneas celulares de MM.

Estos resultados indican que los compuestos indazólicos de la invención tienen un efecto

15 pro-apoptótico muy selectivo sobre las células mielomatosas, mientras que la viabilidad de las células sanas, incluyendo las células precursoras hematopoyéticas, no se ve afectada.

Tabla 2. Valores de concentración inhibitoria de los compuestos indazólicos testados.

Los valores de concentración inhibitoria 50 (IC50) de diferentes compuestos indazólicos (enumerados en la parte superior) probados en todas las líneas celulares de mieloma

20 (enumerados a la izquierda), calculados a partir de los datos de viabilidad celular obtenidos mediante el ensayo MTT después de la exposición a cada uno de los compuestos indazólicos en cada línea celular durante 18 h a diferentes dosis (0-50 μ M). Los valores IC50 de los compuestos indazólicos más eficaces para cada línea celular aparecen resaltados en negrita. En la parte inferior de la tabla aparecen los valores IC50 medios

25 correspondientes a cada uno de los compuestos indazólicos.

	WIN-55	PGN8	PGN17	PGN34	PGN72
U266	17.24	25.38	20.85	26.95	21.18
U266-LR7	17.21	78.18	50.98	17.8	20.55
MM1S	13.64	27.88	44.59	17.10	24.78
MM1R	12.85	18.58	20.48	21.01	28.89
RPM1	11.85	14.44	18.87	15.41	19.58
RPM1-LR5	18.07	13.72	21.85	23.20	41.37
IC50 average	14.64	28.85	28.7	20.22	25.88

Ejemplo 3. El efecto de los compuestos indazólicos de la invención está mediado por mecanismos apoptóticos.

- 5 Para evaluar si el efecto antiproliferativo de WIN-55 está mediado por mecanismos apoptóticos, se analizó la expresión de PARP, caspasas y otras proteínas pro/anti-apoptóticas (familia Bcl-2) en la línea celular MM más resistentes, U266. El tratamiento con compuestos de la invención indujo una disminución de la expresión de la forma completa de PARP (full) de manera tiempo-dependiente, con un aumento concomitante de la expresión
- 10 del fragmento 89kDa (CL_85kDa), que se pudo detectar a las 2 horas de la exposición (Figura 3A). Además, se evaluó la activación de la caspasa-3 usando un anticuerpo que reconoce sus formas escindidas de 17 kDa (CL_17kDa) y 12 kDa (CL_12kDa), respectivamente. La expresión de ambas formas escindidas aumentó con el tiempo, en paralelo a la fragmentación de PARP. Esto indicó que el efecto anti-proliferativo de WIN-55
- 15 era consistente con una inducción de la activación de la caspasa 3. Con el fin de saber cuál de las principales vías de apoptosis (extrínseca, intrínseca o asociada al estrés del retículo endoplásmico) fue activada por el compuesto indazólico, se evaluó la expresión de las principales caspasas iniciadoras, las caspasas -9 (Casp-9), -8 (Casp-8) y -2 (Casp-2), respectivamente. Como se muestra en la Figura 3A, la expresión de las tres pro-caspasas
- 20 (PRO) disminuyó después de 2 h de exposición a los compuestos indazólicos de la invención, pero sólo en el caso de Casp-2 se detectó un fuerte aumento en la expresión de todas las formas escindidas con el tiempo (CL_32 kDa, CL_18 kDa, CL_14 kDa). Por lo tanto, el procesamiento y la activación de Casp-2 fueron mucho más notables que lo observado para Casp-8 y -9. Con el fin de dilucidar los mecanismos implicados en la
- 25 apoptosis inducida por los compuestos de la invención, se analizaron a continuación varias proteínas de la familia Bcl-2, como Mcl-1, Bcl-xL, Bax y Bak involucrados en el proceso de

apoptosis. El análisis de Western blot (Figura 3B) mostró un notable incremento de los reguladores pro-apoptóticos Bak y Bax, mientras que los niveles de expresión de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-xL, y Mcl-1, disminuyeron con el tiempo. También se confirmó que el efecto pro-apoptótico de WIN-55 está mediado por la activación de caspasas, incubando las células tratadas con WIN-55 con/sin el inhibidor pan-caspasa Z-VAD-FMK. Como se muestra en la Figura 3C, el inhibidor de pan-caspasa previno la apoptosis inducida por compuestos de la invención tanto en la línea celular más resistente como en la más sensible, es decir, U266 y RPMI, cuando eran co-tratadas a concentraciones subóptimas, es decir, por debajo de sus respectivos valores de IC50 (Figura 3C). Estos resultados muestran que el efecto de los compuestos de la invención en las células MM está mediado, al menos en parte, por mecanismos apoptóticos, siendo la ruta Casp-2 la más fuertemente activada.

Ejemplo 4. Vías de señalización diana de los compuestos de la invención en células mielomatosas.

Con el fin de explorar qué vías de señalización están implicadas principalmente en la apoptosis inducida por compuestos de la invención, se evaluaron diversos parámetros:

Perfil de expresión de JNK-, Erk1/2-, p38-MAPK- y Akt- fosforilados.

El tratamiento con el compuestos de la invención sobreexpresó ligeramente p-JNK y p-ERK1/2, mientras que disminuyó la expresión moderadamente de p-p38-MAPK con el tiempo de incubación. Curiosamente, WIN-55 indujo una sobreexpresión significativa de p-Akt (fosfo-T308) en los puntos de tiempo tempranos, mientras que en tiempos posteriores los niveles de expresión mostraron un descenso (Figura 3D). De acuerdo con estos resultados, WIN-55 modula ligeramente diferentes vías de señalización implicadas en el equilibrio de la supervivencia/muerte; sin embargo, la ruta de Akt está fuertemente modulada y muestra una respuesta bifásica, con una activación a corto plazo y una regulación a la baja a largo plazo.

Síntesis *de novo* de ceramidas

La síntesis *de novo* de ceramidas está implicada en la apoptosis inducida por los compuestos de la invención. Por tanto, se evaluó la expresión de ceramidas mediante inmunofluorescencia en células MM expuestas a WIN-55, y se detectó un aumento notable de la expresión de ceramidas en células U266 tratadas con el compuesto de la invención en comparación con células no tratadas (Figura 4A). Además, el nivel de expresión de la

serina-palmitoiltransferasa (SPT), la enzima limitante de la velocidad en la síntesis *de novo* de la ceramida, aumentó en células U266 tras la incubación con WIN-55 (Figura 4B). Se observó un aumento moderado de SPT a las 2 horas después del tratamiento, que alcanzó su nivel máximo a las 18h. Para confirmar la implicación de este fosfolípido en la apoptosis inducida por el compuesto de la invención, las células MM se preincubaron con la fumonisina B1 (FB1), un inhibidor de la síntesis de ceramidas. Como se muestra en la Figura 4C, el bloqueo farmacológico de la síntesis de ceramidas previno notablemente la fragmentación de PARP inducida por WIN-55 en las células U266. Además, FB1 invierte significativamente el efecto inducido por el compuesto indazólico en ambas líneas celulares U266 y RPMI (más resistente y sensible respectivamente) tal como se evaluó mediante ensayos de MTT (Figura 4D). Estos datos confirmaron que la ceramida juega un papel clave en la apoptosis inducida por compuestos de la invención en células MM.

Respuesta al estrés del retículo endoplásmico y $\Delta\psi_m$

El compuesto de la invención probado atenúa la respuesta al estrés del retículo endoplásmico en células mielomatosas e induce una pérdida temprana del potencial de membrana mitocondrial. Dado que las células mielomatosas tienen el retículo endoplásmico muy desarrollado, son propensas a que dicho orgánulo sufra estrés. Por ello, evaluamos el efecto de WIN-55 sobre la expresión de determinadas proteínas marcadoras del estrés del retículo endoplásmico en células U226. Al contrario de lo que cabía esperar, encontramos una disminución leve pero sostenida de la expresión de proteínas marcadores de estrés del retículo endoplásmico CHOP, ATF-4, p-IRE1 y XBP-1s (“forma spliced”) en comparación con el control, y un ligero aumento del nivel de XBP-1u (forma “unspliced”), que indica la falta de saturación del estrés del retículo, en células tratadas con el/los compuestos de la invención en comparación con las células control. Esta observación sugiere que el compuesto de la invención probado disminuye o, al menos, no sobrecarga/satura la respuesta a proteínas desplegadas (Unfolded Protein Response, UPR) la cual se activa en condiciones de estrés del retículo endoplasmático en las células MM (Figura 5A).

Es importante destacar que la pérdida de potencial de la membrana mitocondrial es un punto de no retorno en la apoptosis. Por ello, se analizaron los cambios en $\Delta\psi_m$ en células MM tratadas con el/los compuestos de la invención. Se observó un notable descenso del $\Delta\psi_m$ en las células U266 a los 15 minutos de incubación, que continuó decreciendo ligeramente con el tiempo (Figura 5B).

Ejemplo 5. El efecto de los compuestos de la invención sobre las células MM está mediado por los receptores CB2

Para saber si el efecto pro-apoptótico de WIN-55 está mediado a través del receptor CB2, se evaluó el efecto de WIN-55 después del tratamiento con tres diferentes antagonistas selectivos de CB2, PGN-8, -37 y -70. Como se muestra en la Figura 5C, la pre-incubación de células con todos los antagonistas de CB2 testados (PGN-8, PGN-37 y PGN-70) inhibió notablemente el efecto pro-apoptótico inducida por WIN-55 tanto en la línea celular más resistente como en la más sensible, U266 y RPMI. Estos resultados confirman que el efecto de WIN-55 está mediado por CB2.

A continuación se evaluó la expresión de CB2 en diferentes líneas celulares MM, así como en células hematopoyéticas normales de individuos sanos. CB2 exhibe principalmente una banda a 40 kDa, en consonancia con el peso del monómero CB2, y otra banda a 30 kDa que corresponde a la forma truncada (Figura 5D). El nivel de expresión de la banda de 40 kDa se detectó con fuerza en las líneas celulares más sensibles a WIN-55, MM1R y RPMI, así como en los linfocitos (LB y LT), mientras que casi no fué inmunorreactivo en las líneas celulares más resistentes, U266 y MM1S, y en las células madre hematopoyéticas (CD34+). Por el contrario, se observaron los niveles más altos de expresión del receptor CB2 truncado en la línea celular más sensible, es decir, RPMI y en las células B (LB).

Ejemplo 6. WIN-55 potencia la eficacia de los agentes anti-mieloma

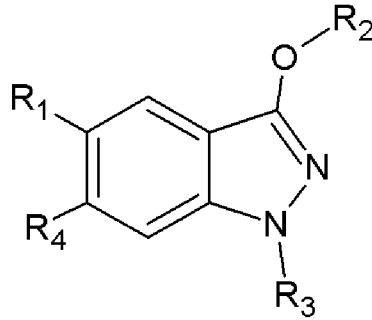
Las terapias anti-mieloma consisten en combinaciones de fármacos con diferentes mecanismos de acción. Por esta razón, se analizó el efecto del compuesto de la invención WIN-55 en una doble combinación con dexametasona y melfalán, no sólo en las líneas celulares U266 y RPMI, sino también en sus correspondientes resistentes a melfalán, U266-LR7 y RPMI-LR5. El índice de combinación (IC) obtenido a partir del análisis de los datos de viabilidad celular indica que WIN-55 tuvo un efecto sinérgico tanto con dexametasona (DEX) como con melfalán (MPH) (ver Figura 6). La dosis de combinación de WIN-55 fue subóptima de acuerdo con el IC₅₀ para cada línea celular, es decir 20µM para U266, U266-LR7 y RPMI-LR5, y 10 µM para RPMI. En todos los casos, la combinación con dexametasona o melfalán resultó en una respuesta sinérgica, incluso en las líneas celulares resistentes a melfalán U266-LR7 y RPMI-LR5. Los resultados del estudio indican que el compuesto de la invención WIN-55 en combinación con dexametasona o melfalán, no sólo actúa de forma sinérgica, sino que también supera la resistencia en líneas celulares MM.

Ejemplo 7. La administración de compuestos indazólicos inhibe el crecimiento tumoral *in vivo*.

Por último, se analizó el efecto antitumoral de los compuestos de la invención *in vivo*, utilizando un modelo de xenoinjerto de MM humano en el ratón inmunodeficiente NOD/SCID (NSG). Para este fin se utilizó la línea celular MM más resistentes *in vitro*. Se observó una pérdida notable y progresiva del volumen del tumor después de la administración de compuestos de la invención en comparación con sus correspondientes tratados con vehículo (Figura 7).

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de fórmula general (I):



5

(I)

donde

R1 y R4 son miembros del grupo formado por hidrógeno, halógeno, nitro o amino.

10

R2 es un miembro del grupo formado por propilo, butilo, pentilo, ciclohexilmetilo, fenetilo, naftilmetilo, heterocicloalquilo, amina primaria secundaria o terciaria, o bencilo sustituido en donde el grupo fenilo puede contener 1 o 2 sustituyentes del grupo formado por alquilo, hidroxilo, metoxi, nitro, amino o halógeno.

15

R3 es un miembro del grupo formado por metilo, etilo, propilo, pentilo cicloalquilmetilo, cicloalquiletilo, dialquilaminoetilo, heterocicloalquiletilo, cicloalquilcarbonilo (grupo carbonilo unido a cicloalquilo), heteroarilcarbonilo (grupo carbonilo unido a heteroarilo), arilcarbonilo (grupo carbonilo unido a arilo) opcionalmente sustituido, o aralquilcarbonilo (grupo carbonilo unido a aralquilo) opcionalmente sustituido;

20

o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones, en la elaboración de un medicamento para la prevención, alivio, mejora y/o tratamiento de una gammapatía monoclonal.

2. El uso del compuesto según la reivindicación 1, donde:

25

R1 es un miembro del grupo formado por hidrógeno o amino;

R2 es un miembro del grupo formado por 4-metoxibencilo, 1-naftilmetilo, 2-naftilmetilo, heterocicloalquilo, diisopropilamino, dimetilamino, dietilamino, piperidinilo, morfolinilo, o pirrodinilo;

5 R3 es un miembro del grupo formado por piperidinoetilo, morfolinoetilo, pirrolidiniletilo, diisopropilaminoetilo, arilo opcionalmente sustituido, aralquilo opcionalmente sustituido, 2-tienilo, o 4-cloro-3-piridilo;

R4 es hidrógeno.

3. El uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde:

10 R1 es un miembro del grupo formado por hidrógeno o amino;

R2 es un miembro del grupo formado por 4-metoxibencilo, 1-naftilmetilo o 2-naftilmetilo;

R3 es un miembro del grupo formado por piperidinoetilo, morfolinoetilo, pirrolidiniletilo o diisopropilaminoetilo;

15 R4 es hidrógeno.

4. El uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el

compuesto se selecciona de la lista que consiste en: 3-(2-naftilmetoxi)-1-(2-

20 piperidinoetil)indazol, 3-(1-naftilmetoxi)-1-(2-piperidinoetil)indazol, 1-(ciclohexilmetil)-

3-(ciclohexilmetoxi)indazol, 1-metil-3-(2-naftilmetoxi)indazol, 1-(2-ciclohexiletíl)-3-(2-

naftilmetoxi)indazol, 1-metil-3-(3,4-dimetilbenciloxi)indazol, 3-(2-naftilmetoxi)-5-nitro-

1-(2-piperidinoetil)indazol, 3-(2-naftilmetoxi)-5-nitro-1-pentilindazol, 1-metil-3-(2-

naftilmetoxi)-5-nitroindazol, 1-metil-5-nitro-3-(fenetoxi)indazol, 5-nitro-1-pentil-3-

25 (pentiloxi)indazol, 3-(3,4-dimetilbenciloxi)-1-(2-morfolinoetil)-5-nitroindazol, 1-metil-3-

(1-naftilmetoxi)-5-nitroindazol, 1-(2-morfolinoetil)-3-(2-naftilmetoxi)-5-nitroindazol, 3-

(3,4-dimetilbenciloxi)-1-metil-5-nitroindazol, 3-(1-naftilmetoxi)-1-(2-(1-pirrolidinil)etil)-5-

nitroindazol, 1-(ciclohexilmetil)-3-(3,4-dimetilbenciloxi)-5-nitroindazol, 5-bromo-3-(2-

naftilmetoxi)-1-(2-piperidinoetil)indazol, 1-(2-(diisopropilamino)etil)-3-(4-

30 metoxibenciloxi)indazol, 5-amino-3-(2-naftilmetoxi)-1-(2-piperidinoetil)indazol, 3-(4-

metoxibenciloxi)-5-nitro-1-pentilindazol, 3-(2-naftilmetoxi)-5-nitro-1-propilindazol, o

cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente

aceptables, o cualquiera de sus combinaciones.

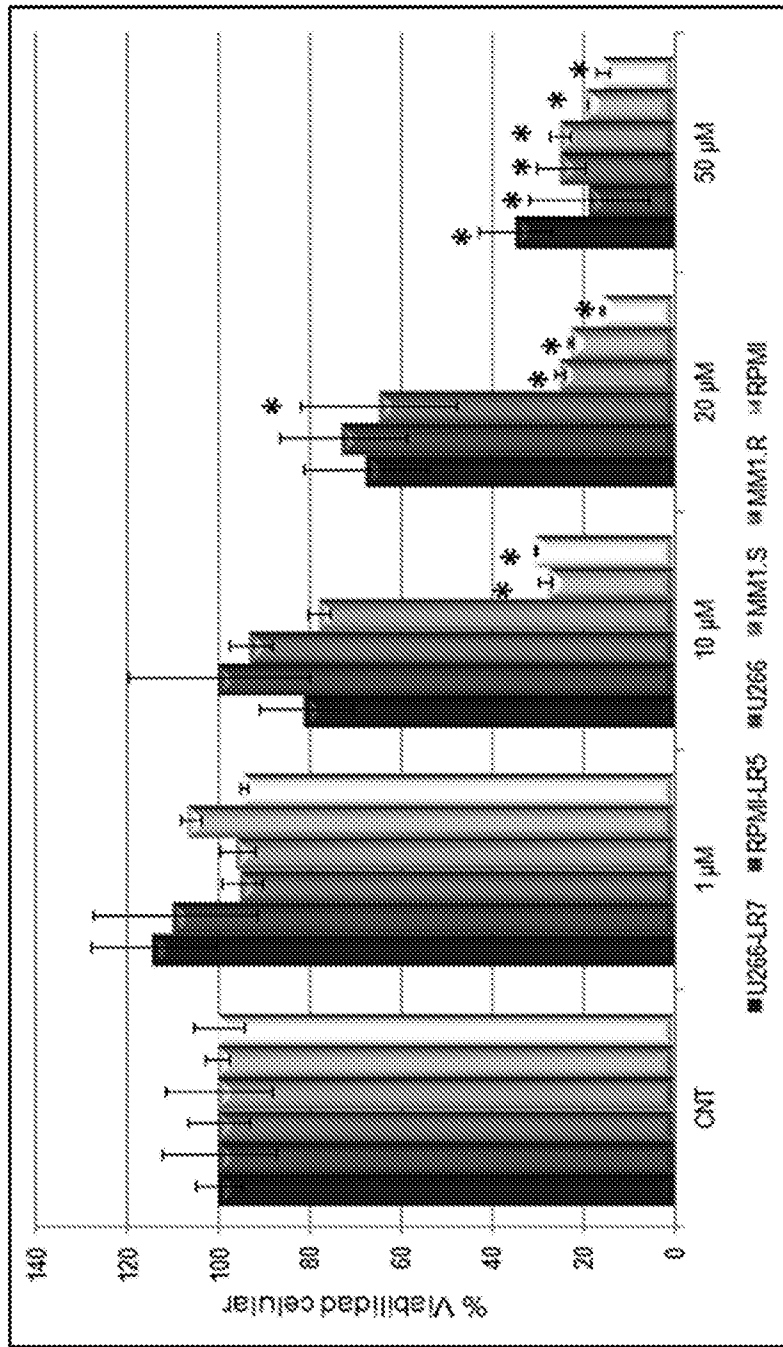
5. El uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la

35 gammapatía monoclonal se selecciona de entre mieloma múltiple, leucemia de

células plasmáticas, macroglobulinemia de Waldeström, amiloidosis, o cualquiera de sus combinaciones.

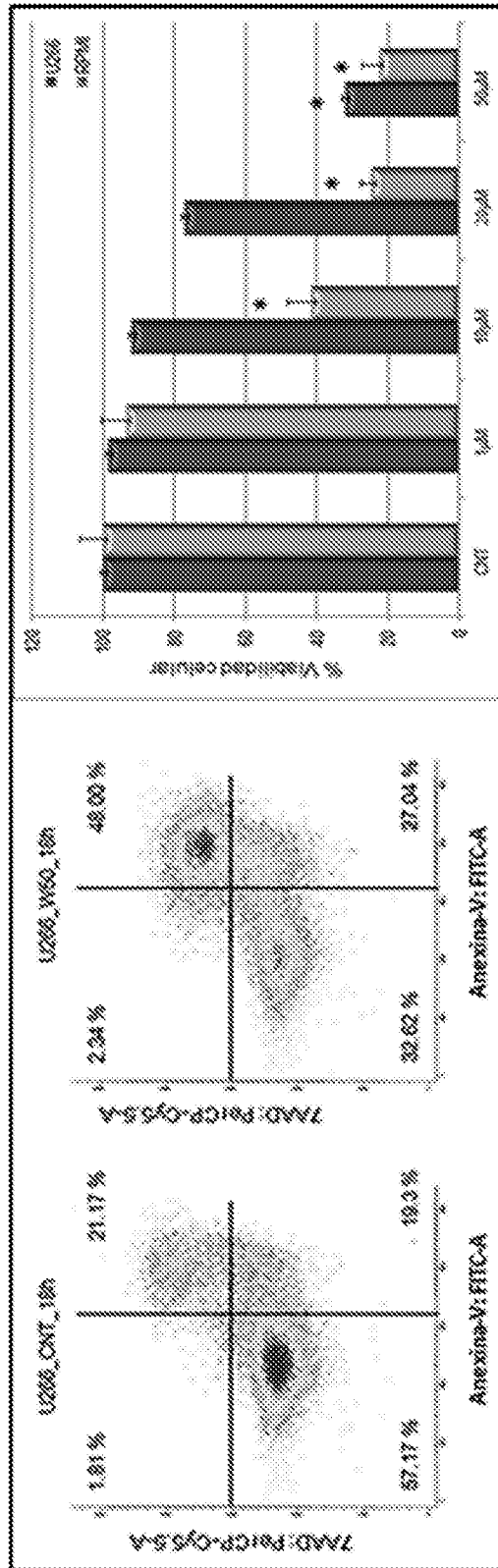
- 5 6. El uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la gammapatía monoclonal es el mieloma múltiple.
7. Uso de una composición que comprende o consiste en un compuesto tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones, en la elaboración de un medicamento para la prevención, alivio, mejora y/o tratamiento de una gammapatía monoclonal.
- 10 8. Uso de una composición según la reivindicación 7, donde la composición además comprende uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
9. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, donde la composición además comprende otro principio activo.
- 15 10. Uso de una composición según la reivindicación anterior, donde el otro principio activo se selecciona de la lista que consiste en prednisona, dexametasona, doxorubicina, plerixafor, ciclofosfamida, factor estimulante de colonias de granulocitos, melfalan, talidomida, lenalidomida, pomalidomida, bortezomib, carfilzomib, ixazomib, daratumumab, isatuximab, MOR202, elotuzumab, células madre autólogas (sASCT), células madre alogénicas, o cualquiera de sus combinaciones.
- 20 11. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 9-10, donde el otro principio activo es dexametasona.
12. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 9-10, donde el otro principio activo es melfalán.
- 25 13. El uso de una composición según la reivindicación 7-12, donde la gammapatía monoclonal se selecciona de entre el mieloma múltiple, leucemia de células plasmáticas, macroglobulinemia de Waldeström, amiloidosis, o cualquiera de sus combinaciones.
- 30 14. Uso de una composición según la reivindicación 7-13, donde la gammapatía monoclonal es el mieloma múltiple.

15. Una preparación combinada que comprende o consiste en:
- a) Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 7-14, y
 - b) Un principio activo que se selecciona de la lista que consiste en prednisona, dexametasona, doxorubicina, plerixafor, ciclofosfamida, factor estimulante de colonias de granulocitos, melfalan, talidomida, lenalidomida, pomalidomida, bortezomib, carfilzomib, ixazomib, daratumumab, isatuximab, MOR202, elotuzumab, células madre autólogas (sASCT), células madre alogénicas, o cualquiera de sus combinaciones.
- 5
- 10 16. La preparación combinada según la reivindicación 15, donde el principio activo de (b) es dexametasona.
17. La preparación combinada según la reivindicación 15, donde el principio activo de (b) es melfalán.
- 15 18. El uso de una preparación combinada según cualquiera de las reivindicaciones 15-17, donde los componentes (a) y (b) se administran de forma simultánea, separada o secuencial para la prevención, alivio, mejora y/o tratamiento de una gammapatía monoclonal.
- 20 19. El uso de una preparación combinada según la reivindicación 18, donde la gammapatía monoclonal se selecciona de entre el mieloma múltiple, leucemia de células plasmáticas, macroglobulinemia de Waldeström, amiloidosis, o cualquiera de sus combinaciones.
20. El uso de una preparación combinada según cualquiera de las reivindicaciones 18-19, donde la gammapatía monoclonal es el mieloma múltiple.



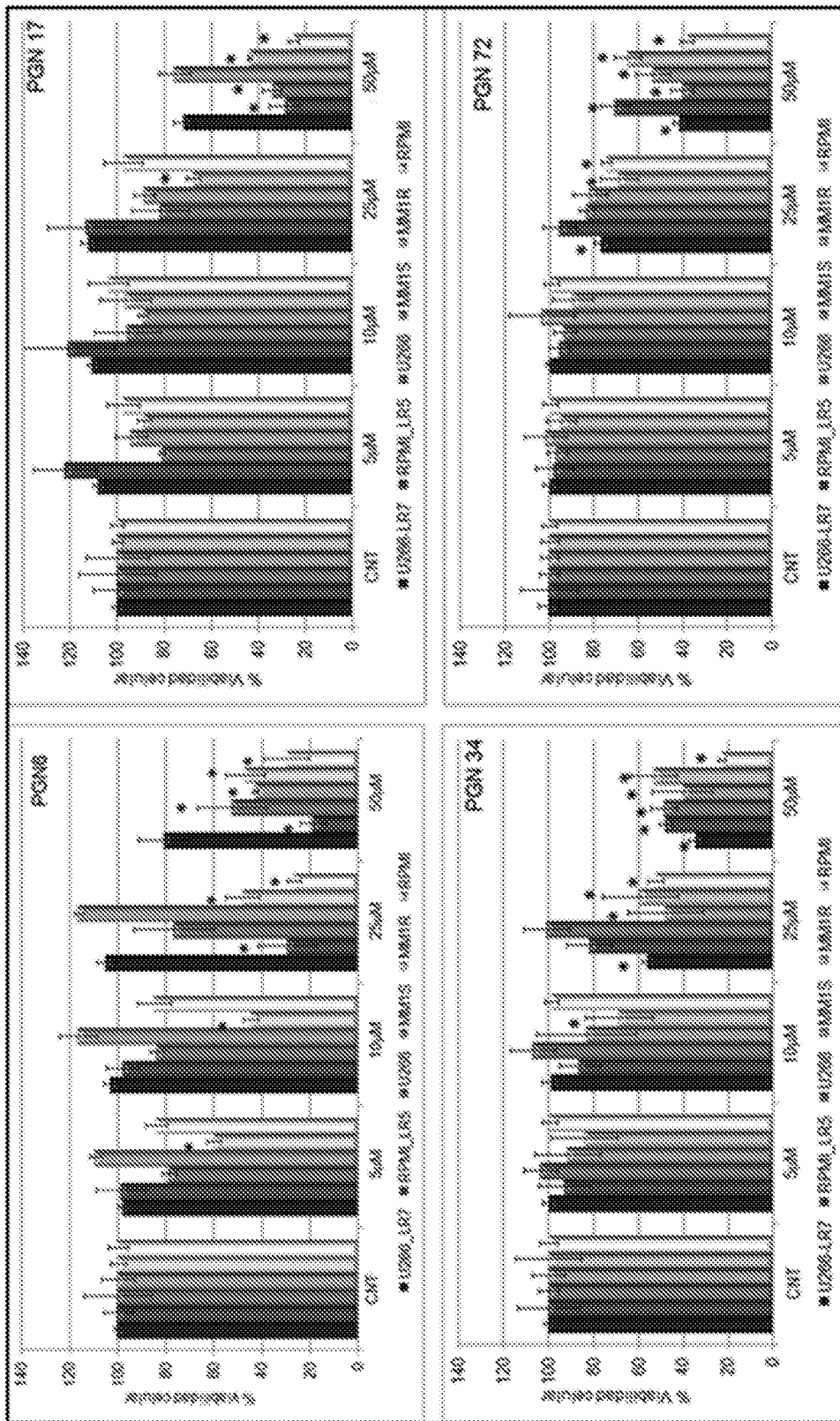
A

Fig. 1



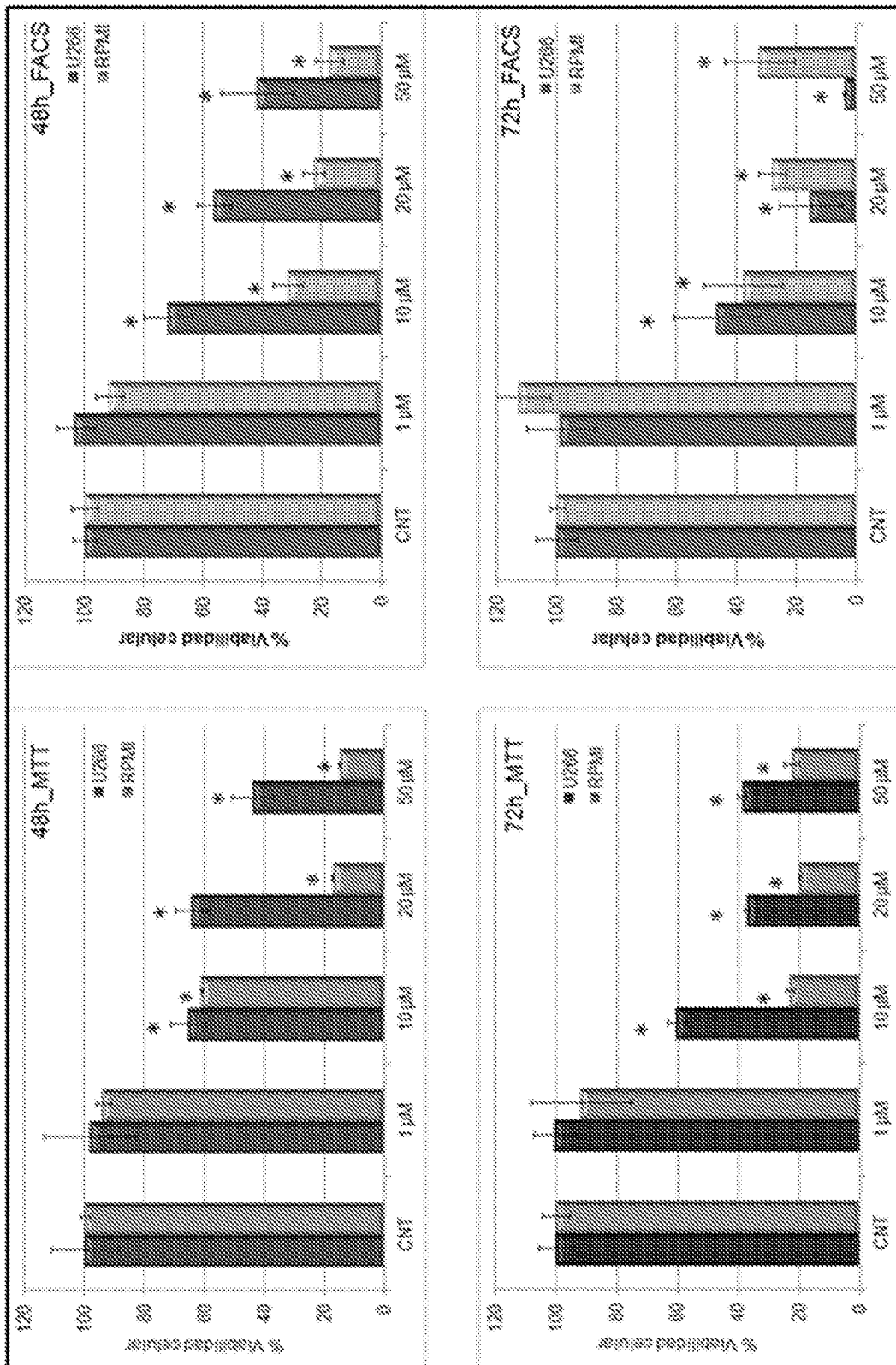
B

Fig. 1 (cont.)



C

Fig. 1 (cont.)



D

Fig. 1 (cont.)

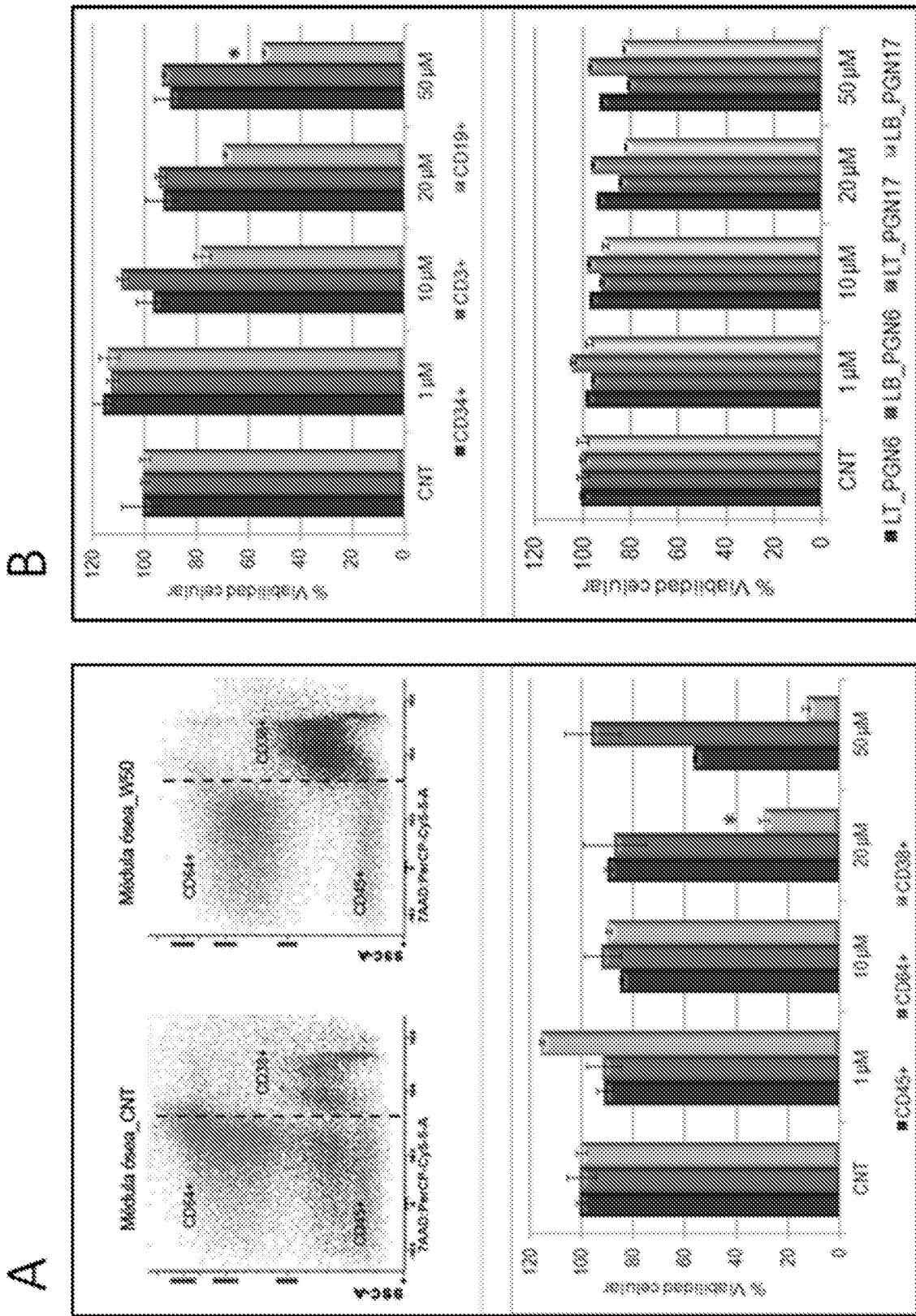
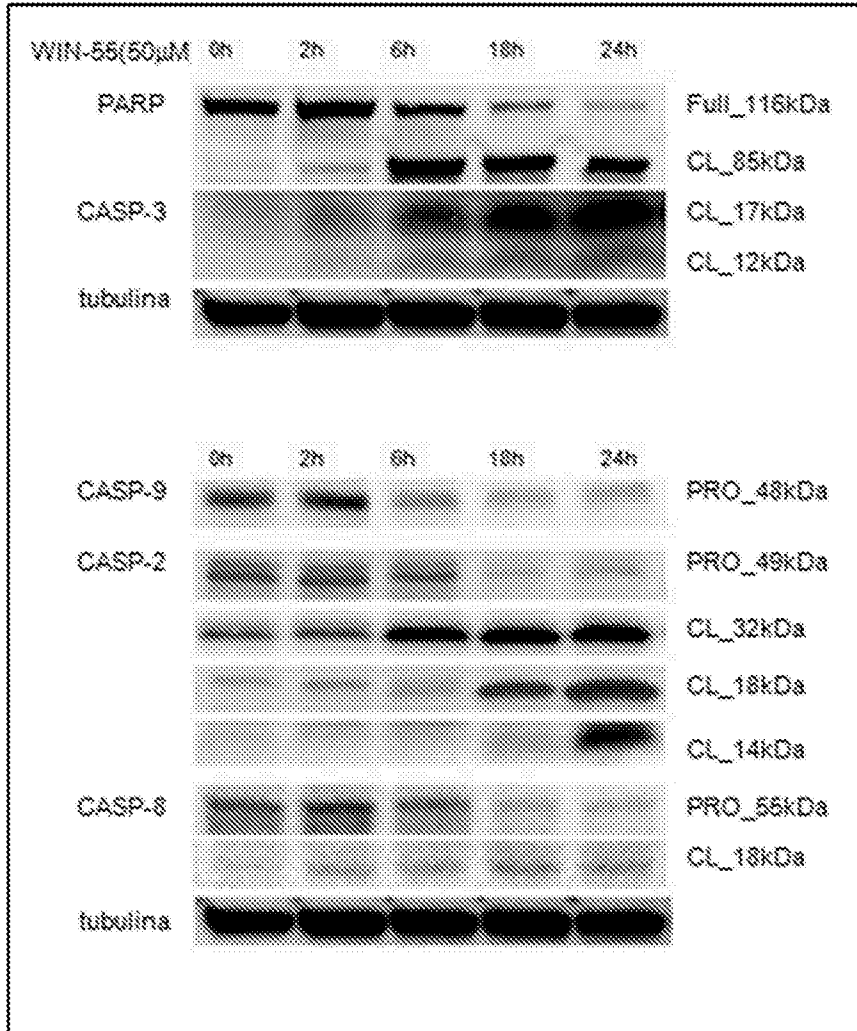


Fig. 2

A



B

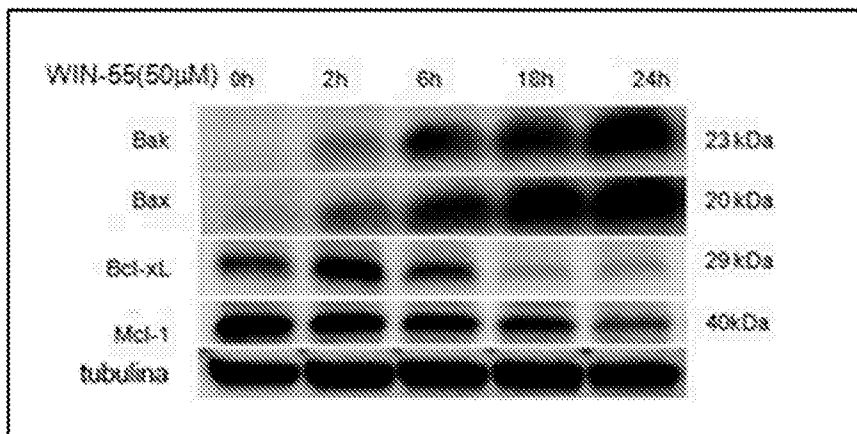


Fig. 3

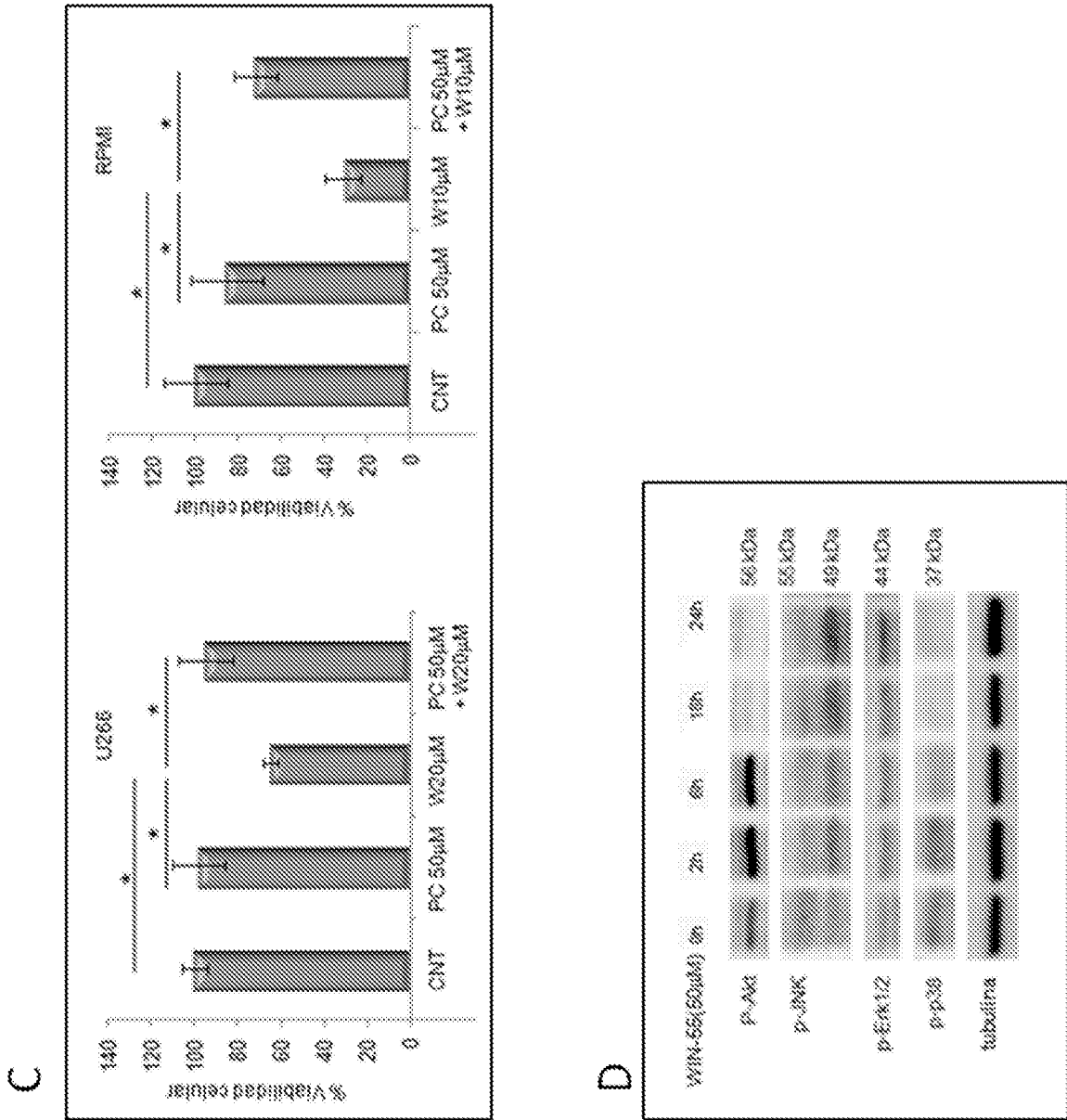


Fig. 3 (cont.)

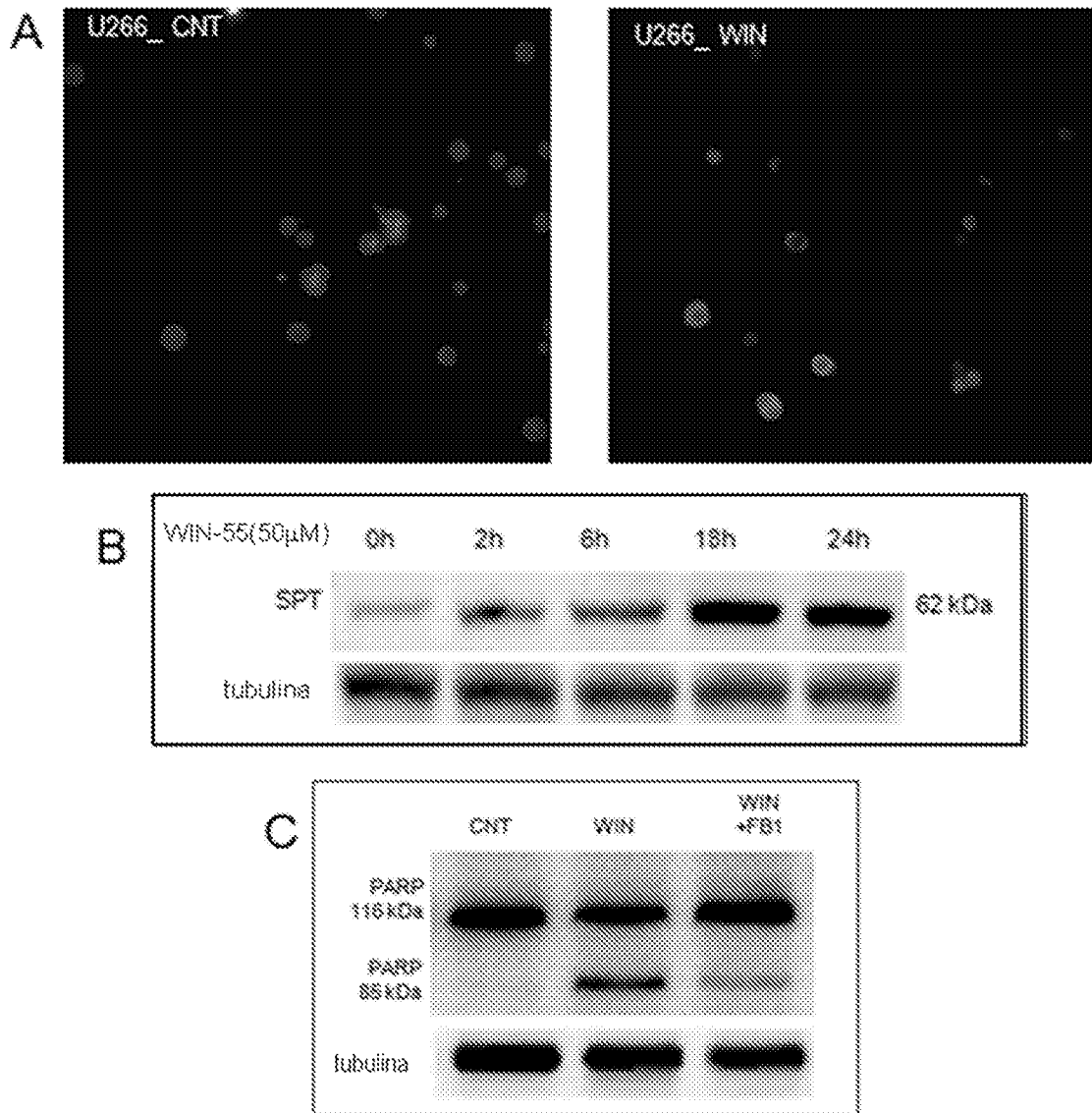


Fig. 4

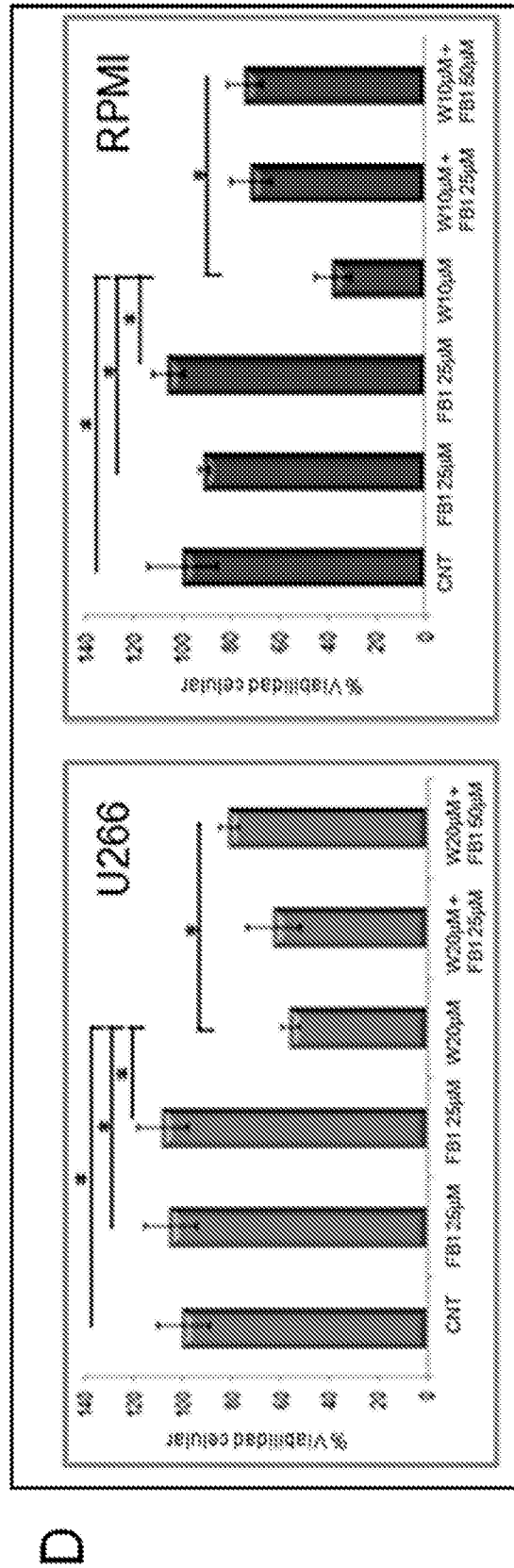


Fig. 4 (cont.)

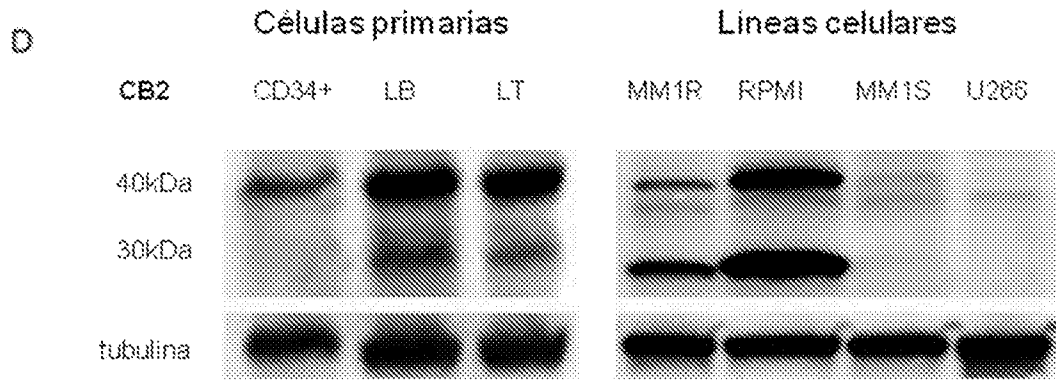


Fig. 5 (cont.)

A

DEXAMETASONA

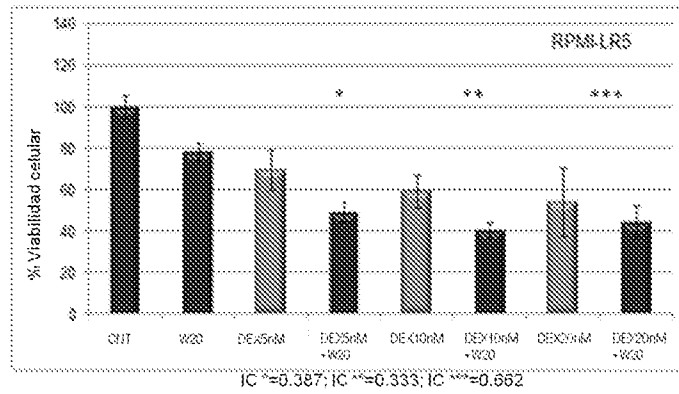
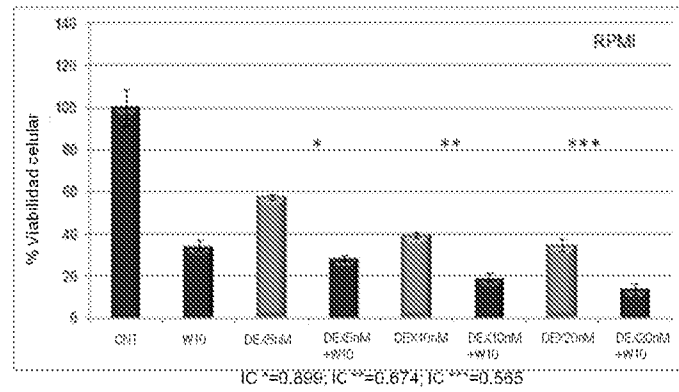
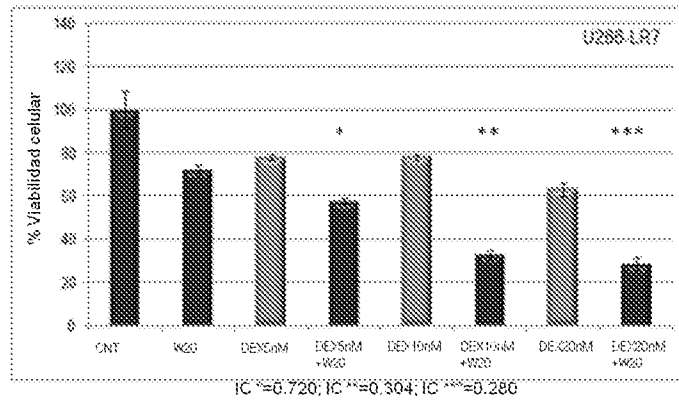
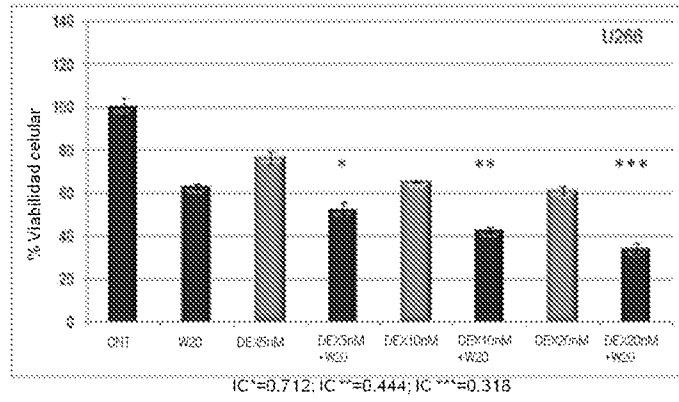


Fig. 6

B
MELFALAN

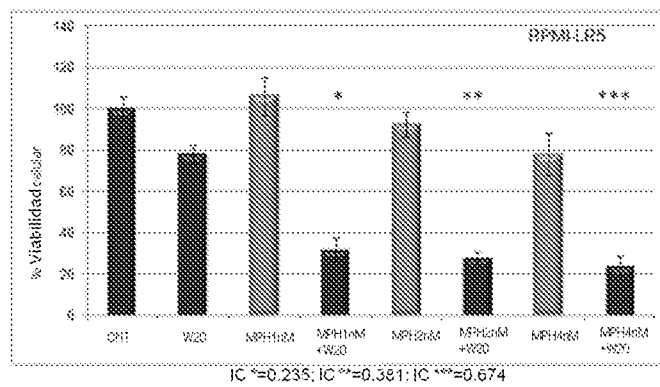
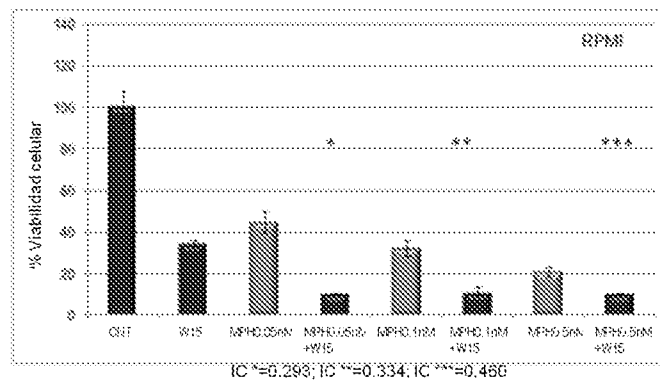
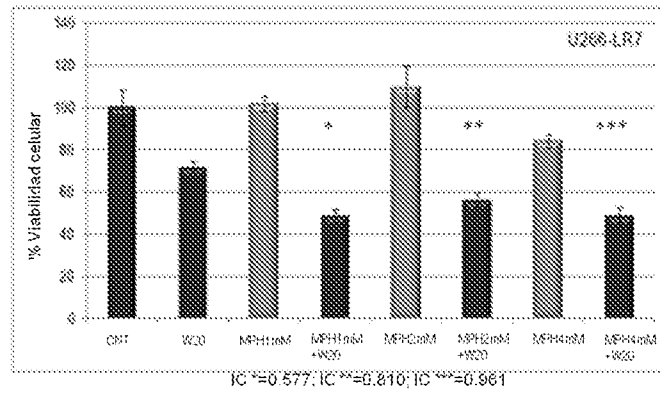
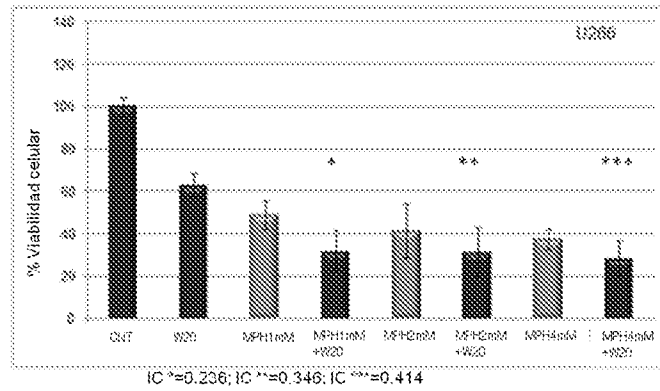


Fig. 6 (cont.)

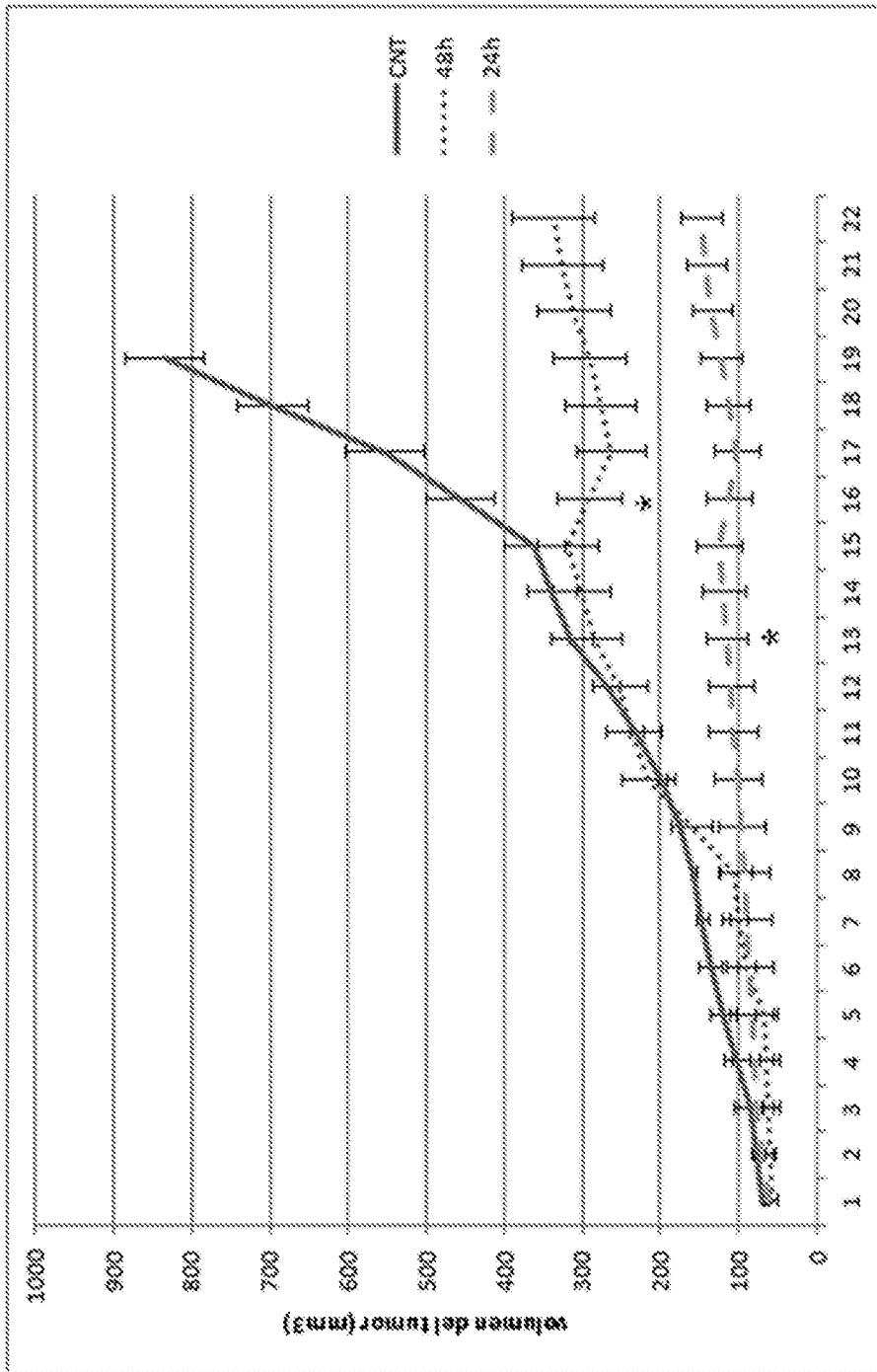


Fig. 7