



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 339**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/47** (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 3/04** (2006.01) **A61P 37/08** (2006.01)  
**A61P 11/06** (2006.01) **A61P 43/00** (2006.01)  
**C12N 9/99** (2006.01) **C07D 215/48** (2006.01)  
**A61K 31/4709** (2006.01) **A61P 35/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04719054 .1**

96 Fecha de presentación : **10.03.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1604665**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.12.2005**

54

Título: **Inhibidor de c-Kit cinasa.**

30

Prioridad: **10.03.2003 JP 2003-62823**  
**27.08.2003 JP 2003-302803**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.08.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.08.2011**

73

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

72

Inventor/es: **Yamamoto, Yuji;**  
**Watanabe, Tatsuo;**  
**Okada, Masayuki y**  
**Tsuruoka, Akihiko**

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 363 339 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Inhibidor de c-Kit cinasa

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a un inhibidor de la c-Kit cinasa, un agente terapéutico para una enfermedad causada por activación excesiva de la c-Kit cinasa que comprende un inhibidor de la c-Kit cinasa como ingrediente activo.

**Antecedentes de la técnica**

10 La transducción de señales intracelulares por el receptor tirosina cinasa contribuye a la proliferación, diferenciación y metabolismo de las células; como resultado, es responsable de varias enfermedades que incluyen los cánceres (Kolibaba K. S. y col., B.B.A. 1333, F217-F248, 1997; y Sheijen B. y col. Oncogene 21, 3314-3333, 2002).

La c-Kit cinasa, uno de los receptores tirosina cinasa, se une al SCF (factor celular germinal) que es un ligando específico para la cinasa. Esto provoca la dimerización de la cinasa misma y la posterior activación de la actividad cinasa. Por consiguiente, una diversidad de sustratos de la c-Kit cinasa en las células serán fosforilados (Blume-Jensen P. y col., EMBO J. 10, 4121-4128, 1991; y Lev S. y col., EMBO J., 10, 647-654, 1991).

15 La activación anormal de la c-Kit cinasa genera una señal de proliferación en ciertos tipos de células cancerosas (a continuación se describen ejemplos representativos), que es considerada la causa de la diferenciación cancerosa o transformación neoplásica.

20 (1) Leucemia mielógena aguda (LMA): se encontró expresión de c-Kit cinasa en una cantidad de pacientes (60-80%) que padecían leucemia mielógena aguda y la proliferación de blastocitos obtenidos de los pacientes era estimulada por el SCF. Además, en 13 de 18 pacientes se observó activación de la c-Kit cinasa sin estimulación por SCF. Entonces se pensó que las mutaciones activadoras de la c-Kit cinasa se presentaban en estos pacientes (Lev S. y col., EMBO J., 10, 647-654, 1991; Wang C y col., Leukemia 3, 699-702, 1989; Kanakura Y. y col., Leuk. Lymph. 10, 35-41, 1993; Ikeda H. y col., Blood, 78, 2962-2968, 1991; e Ikeda H. y col., Exp. Hematol. 21, 1686-1694, 1993).

25 (2) Leucemia de mastocitos o células cebadas: se presentó un informe que indicaba la presencia de mutaciones activadoras de la c-Kit cinasa en la línea celular de la leucemia de mastocitos que había desarrollado un paciente con mastocitosis (Furitsu T. y col., J. Clin. Invest., 92, 1736-1744, 1993).

30 (3) Cáncer de pulmón microcítico (CPM): mientras que se observó expresión de nivel alto c-Kit cinasa en más del 70% de las líneas celulares del CPM, los niveles de expresión de c-Kit cinasa en las líneas celulares de cáncer de pulmón no microcítico fueron bajos o por debajo del límite de detección. El SCF, ligando de la c-Kit cinasa, también se expresa en las líneas celulares del CPM. Esto sugiere que posiblemente se haya producido la promoción de la proliferación por vía autocrina (Hibi K. y col., Oncogene, 6, 2291-2296, 1991; y Sekido Y. y col., Cancer Res., 51, 2416-2419, 1991).

35 (4) GIST (del inglés GastroIntestinal Stromal Tumors, tumores del estroma gastrointestinal): se define al GIST como un tumor estromal que se desarrolla en el tracto GI y que expresa c-Kit cinasa. En aproximadamente la mitad de los GIST, se encontraron mutaciones activadoras de la c-Kit cinasa y estaban presentes en frecuencia elevada en GIST con alta malignidad. Esto sugiere la posibilidad de que la mutación sea un factor de pronóstico (Lasota J. y col., Am. J. Pathol., 157, 1091-1095, 2000; y Taniguchi M. y col., Cancer Res., 59, 4297-4300, 1999).

40 (5) Cáncer testicular: en el cáncer testicular, el carcinoma in situ (CIS), que es considerado una lesión precancerosa, progresa hasta formar tumores que se denominan "seminoma" y "no seminoma". Se presentaron informes de expresión de alto nivel de c-Kit cinasa en CIS y en seminoma (Stromeyer T. y col., Cancer Res., 51, 1811-1816) 1991. En los últimos años se ha publicado un informe sobre la expresión de c-Kit cinasa que experimentó una mutación activadora en seminoma (Tian Q. y col., Am. J. Pathol., 154, 1643-1647, 1999).

45 (6) Cáncer de ovario: se ha informado de la siguiente manera: en el epitelio ovárico normal, se expresó SCF pero no se observó expresión de c-Kit cinasa. Sin embargo, tanto la c-Kit cinasa como el SCF se expresaron en el tumor ovárico benigno en una etapa temprana de la diferenciación cancerosa; por el contrario, la expresión de c-Kit cinasa se redujo en el tumor ovárico maligno. Estos resultados sugieren que la c-Kit cinasa desempeñó un papel importante en el desarrollo del cáncer de ovario (Tonary A. T., Int. J. Cancer, 89, 242-250, 2000).

50 (7) Cáncer de mama: hubo un informe que indicó que la expresión de c-Kit cinasa se redujo en el cáncer de mama, en comparación con los tejidos normales circundantes (Natali P. y col., Int. J. Cancer, 52, 713-717, 1992). Sin embargo, en estudios posteriores, la expresión de c-Kit cinasa, que no se había detectado en el tejido normal, se observó en el cáncer de mama y también se detectó la expresión de SCF. Éstas sugieren que la estimulación autocrina promovió la proliferación (Hines S. J. y col., Cell Growth & Differentiation, 6, 769-779, 1995).

(8) Cáncer cerebral: se ha informado de la siguiente manera: se observó expresión de c-Kit cinasa en la línea celular y el tejido del glioblastoma que tenía el nivel más elevado de malignidad entre los cánceres cerebrales; y en la línea

celular del glioblastoma que expresa c-Kit cinasa, la estimulación con SCF promovió el crecimiento (Berdel W. E. y col., Cancer Res., 52, 3498-3502, 1992).

5 (9) Neuroblastoma: se ha informado de la siguiente manera: se presentó coexpresión de SCF y c-Kit cinasa en muchos casos de líneas celulares y en el tejido de muestras de neuroblastoma, muy conocido como el cáncer que se desarrolla en niños. El anticuerpo anti-c-Kit cinasa suprimió el crecimiento de la línea celular del neuroblastoma y, por consiguiente, el crecimiento estaba promovido por un mecanismo autocrino (Cohen P. S., Blood, 84, 3465-3472, 1994).

10 (10) Cáncer colorrectal: se observó coexpresión de c-Kit cinasa y de su ligando, SCF, en tejido de cáncer colorrectal, mientras que no se observó expresión de ninguno en el tejido mucosal normal. La estimulación con SCF promovió la proliferación de la línea celular del cáncer colorrectal. (Bellone G. y col., J. Cell. Physiol., 172,1-11, 1997).

15 Se informó que la activación de la c-Kit cinasa por estimulación con SCF era esencial para la proliferación y diferenciación de mastocitos (Hamel y col., J. Neuro-Onc., 35, 327-333, 1997; y Kitamura y col., Int. Arch. Aller. Immunol., 107, 54-56, 1995). Se pensó, por consiguiente, que la activación excesiva de la c-Kit cinasa era responsable de las anomalías inmunológicas (tales como la mastocitosis, el asma y la rinitis crónica) que tienen como causa la excesiva cantidad de mastocitos.

20 (1) Mastocitosis: mastocitosis es un término general para la patología de varias afecciones caracterizadas por el crecimiento excesivo de las células cebadas o mastocitos (Metcalf, J. Invest. Derm. 93, 2S-4S, 1991; y Golkar y col., Lancet, 349, 1379-1385, 1997). Lo siguiente se ha informado en pacientes con mastocitosis: 1) la excesiva expresión de c-Kit cinasa (Nagata y col., Mastocytosis Leuk., 12, 175-181, 1998); 2) un aumento en la cantidad de SCF soluble (Longley y col., New Engl. J. Med., 328, 1302-1307, 1993); y 3) mutaciones activadoras de c-Kit cinasa (Nagata y col., Mastocytosis Leuk., 12, 175-181, 1998; y Longley y col., Nat. Gen., 12, 312-314, 1996). Se cree que éstas activan de manera excesiva la c-Kit cinasa y de este modo provocan la mastocitosis.

25 (2) Alergia y asma: los mastocitos y los eosinófilos son células importantes en el desarrollo de la inflamación, alergia, asma y similares (Thomas y col., Gen. Pharmacol., 27, 593-597, 1996; y Metcalf y col., Physiol. Rev., 77, 1033-1079, 1997). Esto lo sugiere el informe de que los corticosteroides, que actualmente se cree que son más eficaces contra inflamaciones que incluyen rinitis crónica o alergia, disminuyen el número de células cebadas y eosinófilos circulantes e invasores (Naclerio y col., JAMA, 278, 1842-1848, 1997; y Meltzer, Aller., 52, 33-40, 1997). La activación de c-Kit cinasa como resultado de la estimulación con SCF no sólo resultó esencial para la diferenciación, supervivencia y proliferación de los mastocitos, también promovió la inducción de diversos factores provenientes de los mastocitos. Estos factores cumplen una función importante en la diferenciación, supervivencia e invasividad de los eosinófilos (Okayama y col., Int. Arch. Aller. Immunol., 114, 75-77, 1997; Okayama y col., Eur. J. Immunol., 28, 708-715, 1998; Metcalf y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 95, 6408-6421, 1998; Kay y col., Int. Arch. Aller. Immunol., 113, 196-199, 1997; Hogaboam y col., J. Immunol. 160, 6166-6171, 1998; y Luckas y col., J. Immunol. 156, 3945-3951, 1996). Por consiguiente, se pensó que la inhibición de la c-Kit cinasa puede suprimir los mastocitos y eosinófilos activados en los pacientes que padecen asma o alergias.

35 Como se estableció anteriormente, se cree que la c-Kit cinasa está implicada estrechamente en el desarrollo o en la transformación neoplásica de ciertos tipos de cáncer así como en las enfermedades para las cuales la cantidad excesiva de mastocitos se considera la causa. Los inhibidores de la c-Kit cinasa han sido considerados útiles como agentes terapéuticos para tales enfermedades.

#### 40 **Divulgación de la invención**

El problema a resolver por la invención es descubrir compuestos nuevos que exhiban actividad de inhibidor de la c-Kit cinasa y desarrollar un agente terapéutico para las enfermedades causadas por la c-Kit cinasa.

45 Se ha informado que los compuestos que tienen una estructura central indolina son los que muestran acción inhibidora de la c-Kit cinasa (documento WO 01/45689). También se presentó un informe con respecto a la acción inhibidora sobre la c-Kit cinasa por los compuestos que tienen una estructura central quinazolina (documento WO 01/47890). También se ha informado que un análogo (KRN633) posee acción inhibidora de la c-Kit cinasa (Kazuo Kubo y col., 22° Symposium on Medicinal Chemistry, Resúmenes, páginas 275-277, 2P-320, 2002). Recientemente, se ha autorizado Gleevec (STI571) en los EEUU, en Europa y Japón como agente terapéutico para GIST en base a la inhibición de c-Kit (Drugs, 63: 513-522, 2003).

50 Los inventores han informado que un compuesto representado por la siguiente fórmula general (I) inhibe la actividad cinasa del receptor de VEGF, y que también inhibe la formación de túbulos en células del endotelio vascular estimuladas por VEGF, FGF2 o HGF (documento WO 02/32872). Y, los inventores han descubierto que un compuesto representado por la siguiente fórmula general (I) inhibe no solo la VEGF cinasa sino también la c-Kit cinasa, y que tiene actividad inhibidora frente a la proliferación de células cancerosas que expresan c-Kit cinasa.

55 Específicamente, la invención se refiere al tema sujeto de las reivindicaciones adjuntas.

Se ha descubierto un compuesto que presenta potente actividad inhibidora de la c-Kit cinasa, por consiguiente

puede proporcionarse un agente terapéutico para suprimir la diferenciación cancerosa y la transformación neoplásica de ciertos tipos de cáncer, o un agente terapéutico para enfermedades que se considera que son causadas por la c-Kit cinasa, tales como la mastocitosis, la alergia o el asma.

### **Breve descripción de los dibujos**

5 La Fig. 1 es un gráfico que muestra los resultados de la inmunotransferencia de c-Kit cinasa fosforilada por estimulación con SCF.

La Fig. 2 es un gráfico que muestra la relación entre el número de días transcurridos tras el trasplante y el volumen tumoral cuando se transplantan células H-526 a un ratón atímico.

10 La Fig.3 es un gráfico que muestra el resultado de la inmunotransferencia de c-Kit cinasa fosforilada, c-Kit cinasa y  $\beta$ -actina cuando se transplantan células H-526 a un ratón atímico.

### **Mejor modo para llevar a cabo la invención**

A continuación se explicarán las formas de realización de la presente invención.

15 Varias de las fórmulas estructurales dadas para los compuestos a lo largo de la presente memoria descriptiva representarán un isómero específico por conveniencia, pero la invención no está limitada a tales isómeros específicos y abarca todos los isómeros y las mezclas de isómeros, incluyendo isómeros geométricos, isómeros ópticos derivados de carbonos asimétricos, estereoisómeros y tautómeros, implícitos por las estructuras de los compuestos. Además, los compuestos de la invención también incluyen los que han sido metabolizados en el cuerpo por oxidación, reducción, hidrólisis, conjugación o similar y que aún así presentan la actividad deseada, mientras que  
20 la invención además abarca todos los compuestos que son objeto de metabolismo tal como oxidación, reducción, hidrólisis, etc. en el cuerpo para producir los compuestos de la invención. Los solvatos, incluyendo los solvatos con agua, también están comprendidos en la invención.

La expresión "alquilo C<sub>1-6</sub>" como se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva se refiere a un alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 carbonos, y como ejemplos específicos pueden mencionarse metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, i-butilo, sec-butilo, t-butilo, n-pentilo, i-pentilo, sec-pentilo, t-pentilo, neopentilo, 1-metilbutilo, 2-metilbutilo, 1,1-dimetilpropilo, 1,2-dimetilpropilo, n-hexilo, i-hexilo, 1-metilpentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 1,1-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo, 3,3-dimetilbutilo, 1-etilbutilo, 2-etilbutilo, 1,1,2-trimetilpropilo, 1,2,2-trimetilpropilo, 1-etil-1-metilpropilo y 1-etil-2-metilpropilo, de preferencia metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, i-butilo, sec-butilo, t-butilo, n-pentilo, i-pentilo, sec-pentilo, t-pentilo, neopentilo, 1-metilbutilo, 2-metilbutilo, 1,1-dimetilpropilo, 1,2-dimetilpropilo, n-hexilo e i-hexilo, de más preferencia metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, i-butilo, sec-butilo, t-butilo, n-pentilo, i-pentilo, sec-pentilo, t-pentilo, neopentilo, 1-metilbutilo, 2-metilbutilo, 1,1-dimetilpropilo y 1,2-dimetilpropilo, de más preferencia aún metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, 1-butilo, sec-butilo y t-butilo, y de mayor preferencia metilo, etilo, n-propilo e i-propilo.

La expresión "cicloalquilo C<sub>3-8</sub>" como se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva se refiere a un alquilo cíclico de 3 a 8 carbonos, y como ejemplos específicos pueden mencionarse ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo, siendo de preferencia el ciclopropilo.

La expresión "alcoxi C<sub>1-6</sub>" como se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva se refiere a un sustituyente en el que el "alquilo C<sub>1-6</sub>" está unido a oxígeno, y como ejemplos específicos pueden mencionarse metoxi, etoxi, n-propoxi, i-propoxi, n-butoxi, i-butoxi, sec-butoxi, t-butoxi, n-pentiloxi, i-pentiloxi, sec-pentiloxi, t-pentiloxi, neopentiloxi, 1-metilbutoxi, 2-metilbutoxi, 1,1-dimetilpropoxi, 1,2-dimetilpropoxi, n-hexiloxi, i-hexiloxi, 1-metilpentiloxi, 2-metilpentiloxi, 3-metilpentiloxi, 1,1-dimetilbutoxi, 1,2-dimetilbutoxi, 2,2-dimetilbutoxi, 1,3-dimetilbutoxi, 2,3-dimetilbutoxi, 3,3-dimetilbutoxi, 1-etilbutoxi, 2-etilbutoxi, 1,1,2-trimetilpropoxi, 1,2,2-trimetilpropoxi, 1-etil-1-metilpropoxi y 1-etil-2-metilpropoxi, de preferencia metoxi, etoxi, n-propoxi, i-propoxi, n-butoxi, i-butoxi, sec-butoxi, t-butoxi, n-pentiloxi, i-pentiloxi, sec-pentiloxi, t-pentiloxi, neopentiloxi, 1-metilbutoxi, 2-metilbutoxi, 1,1-dimetilpropoxi, 1,2-dimetilpropoxi, n-hexiloxi e i-hexiloxi, de más preferencia metoxi, etoxi, n-propoxi, i-propoxi, n-butoxi, i-butoxi, sec-butoxi, t-butoxi, n-pentiloxi, 1-pentiloxi, sec-pentiloxi, t-pentiloxi, neopentiloxi, 1-metilbutoxi, 2-metilbutoxi, 1,1-dimetilpropoxi y 1,2-dimetilpropoxi, de más preferencia aún metoxi, etoxi, n-propoxi, i-propoxi, n-butoxi, i-butoxi, sec-butoxi y t-butoxi, y de mayor preferencia metoxi, etoxi, n-propoxi y i-propoxi.

La expresión "cicloalcoxi C<sub>3-8</sub>" como se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva se refiere a alcoxi cíclico de 3 a 8 carbonos, y como ejemplos específicos pueden mencionarse ciclopropoxi, ciclobutoxi, ciclopentiloxi y ciclohexiloxi, siendo de preferencia el ciclopropoxi.

Puede producirse un compuesto representado por la fórmula general (I) mediante el procedimiento que se describe en el documento WO 02/32872.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, la expresión "sal farmacológicamente aceptable" no se limita a un tipo de sal en particular, y como ejemplos de tales sales pueden mencionarse sales de adición de ácidos inorgánicos tales como clorhidrato, sulfato, carbonato, bicarbonato, bromhidrato y yodhidrato; sales de adición de ácidos

carboxílicos orgánicos tales como acetato, maleato, lactato, tartrato y trifluoroacetato; sales de adición de ácidos sulfónicos orgánicos tales como metanosulfonato, hidroximetanosulfonato, hidroxietanosulfonato, bencenosulfonato, toluenosulfonato y sales de taurina; sales de adición de aminas tales como sales de trimetilamina, sales de trietilamina, sales de piridina, sales de procaína, sales de picolina, sales de diciclohexilamina, sales de N,N'-dibenciletildiamina, sales de N-metilglucamina, sales de dietanolamina, sales de trietanolamina, sales de tris (hidroximetilamino)metano y sales de fenetilbencilamina; y sales de adición de aminoácidos tales como sales de arginina, sales de lisina, sales de serina, sales de glicina, aspartato y glutamato.

La dosis de un medicamento de acuerdo con la invención variará en función de la gravedad de los síntomas, de la edad, el sexo y el peso del paciente, de la forma de administración y el tipo de enfermedad, pero la administración será por lo general en el intervalo desde 100 µg hasta 10 g por día para adultos, de una vez o en dosis separadas.

No existen restricciones particulares sobre la forma de administración de un medicamento de acuerdo con la invención, y usualmente puede administrarse por vía oral o por vía parenteral mediante procedimientos convencionales.

Para la formulación también pueden utilizarse excipientes comunes, aglutinantes, agentes de brillo, agentes colorantes, correctores de sabor y similares y, si es necesario, estabilizantes, emulsivos, promotores de la absorción, tensioactivos y similares, con la inclusión de los componentes utilizados normalmente como materiales de partida para la formulación de preparaciones farmacéuticas por procedimientos comunes.

Ejemplos de tales componentes que pueden ser utilizados incluyen aceites animales y vegetales (aceite de soja, sebo de ternera, glicéridos sintéticos, etc.), hidrocarburos (parafina líquida, escualano, parafina sólida, etc.), aceites de ésteres (miristato de octildodecilo, miristato de isopropilo, etc.), alcoholes superiores (alcohol cetosteárico, alcohol behenílico, etc.), resinas de silicona, aceites de silicona, tensioactivos (ésteres de ácidos grasos y polioxietileno, ésteres de ácidos grasos y sorbitano, ésteres de ácidos grasos y glicerina, ésteres de ácidos grasos y polioxietilensorbitano, aceite de ricino hidrogenado y polioxietileno, copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno, etc.), polímeros solubles en agua (hidroxietil celulosa, ácido poliacrílico, polímero carboxivinílico, polietilenglicol, polivinilpirrolidona, metilcelulosa, etc.), alcoholes (etanol, isopropanol, etc.), alcoholes polihídricos (glicerina, propilenglicol, dipropilenglicol, sorbitol, etc.), azúcares (glucosa, sacarosa etc.), polvos inorgánicos (anhídrido silícico, silicato de magnesio y aluminio, silicato de aluminio, etc.), agua purificada y similares. Para ajustar el pH pueden utilizarse ácidos inorgánicos (ácido clorhídrico, ácido fosfórico, etc.), sales de metales alcalinos de ácidos inorgánicos (fosfato de sodio, etc.), bases inorgánicas (hidróxido de sodio, etc.), ácidos orgánicos (ácidos grasos inferiores, ácido cítrico, ácido láctico, etc.), sales de metales alcalinos de ácidos orgánicos (citrato de sodio, lactato de sodio, etc.) y bases orgánicas (arginina, etanolamina, etc.). Si es necesario, también pueden añadirse conservantes, antioxidantes y similares.

### [Ejemplos]

La presente invención se explicará a través de los siguientes ejemplos, pero estos ejemplos no son de ninguna manera limitantes de la invención.

#### [Ejemplo 1] Efecto sobre la proliferación celular estimulada por SCF

Se probó el efecto de los compuestos 1, 2, 3 y 4 sobre la proliferación de la línea celular de cáncer de pulmón microcítico H-526 que expresa c-Kit cinasa (adquirido de ATCC: CRL-5811).

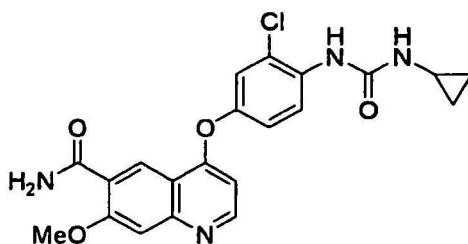
Compuesto 1: 4-(3-Cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolincarboxamida

Compuesto 2: 4-(3-Cloro-4-(etilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolincarboxamida

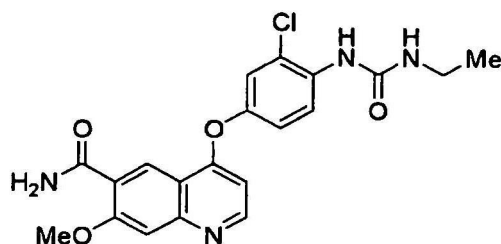
Compuesto 3: N6-Metoxi-4-(3-cloro-4-(((ciclopropilamino)carbonil)amino)fenoxi)-7-metoxi-6-quinolincarboxamida

Compuesto 4: N6-Metoxi-4-(3-cloro-4-(((etilamino)carbonil)amino)fenoxi)-7-metoxi-6-quinolincarboxamida

A continuación se presentan las estructuras de los Compuestos 1 a 4.

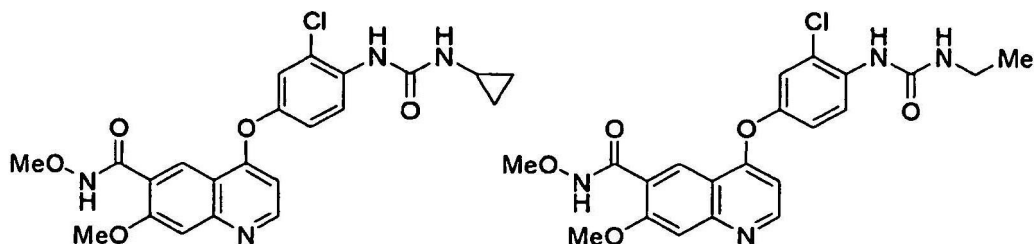


**Compuesto 1**



**Compuesto 2**

5

**Compuesto 3****Compuesto 4**

10

El Compuesto 1 se preparó mediante el procedimiento que se describe en el Ejemplo 368 del documento WO 02/32872. El Compuesto 2 se preparó mediante el procedimiento que se describe en el Ejemplo 583 del documento WO 02/32872. El Compuesto 3 se preparó mediante el procedimiento que se describe en el Ejemplo 417 del documento WO 02/32872. El compuesto 4 se preparó mediante el procedimiento que se describe en el Ejemplo 702 del documento WO 02/32872.

15

Se cultivaron células H-526 en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5% (37 °C) utilizando un medio RPMI1640 (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) que contenía FCS al 10% (adquirido de Cell Culture Technologies). Tras el cultivo, las células H-526 se lavaron tres veces con PBS y se suspendieron en medio RPMI1640 que contenía BSA al 0,1% (Sigma Corporation) (en lo sucesivo abreviado "BSA-RPMI1640" en el presente documento) a 1,0 x 10<sup>5</sup> células/ml. Se inocularon 50 µl de esta suspensión celular a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de base redonda, y la suspensión se cultivó en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5% (37 °C) durante la noche. Tras cultivar durante la noche, se añadió a cada pocillo 50 µl de BSA-RPMI1640 que contenía SCF 200 ng/ml (R&D Co., Ltd.) y 100 µl de BSA-RPMI1640 que contenía una sustancia de prueba diluida.

20

25

Al 7º día tras la adición de la sustancia de prueba, se añadieron 20 µl de Cell Counting Kit-8 (Dojin Laboratories) al pocillo y se cultivó en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5% (37 °C) durante aproximadamente 2 horas. Tras el desarrollo del color, se determinó la absorbancia de cada pocillo usando un lector de placas MTP-32 (Colona Electric Co., Ltd.) a una longitud de onda de medición de 450 nm y a una longitud de onda de referencia de 660 nm. A la absorbancia de cada pocillo se le restó la absorbancia del pocillo sin adición del SCF, y a continuación se determinó la relación de la absorbancia del pocillo con adición de la sustancia de prueba a la relación de la absorbancia del pocillo sin adición de la sustancia de prueba. Esta relación se utilizó para calcular la concentración de la sustancia de prueba necesaria para inhibir el 50% de la proliferación celular (CI<sub>50</sub>).

30

Por consiguiente, los Compuestos 1, 2, 3 y 4 inhibieron la proliferación celular estimulada por SCF como se muestra en la siguiente tabla, y se consideró que esos compuestos poseen actividad inhibitoria de c-Kit cinasa. Se demostró que la CI<sub>50</sub> del compuesto KRN633, que está descrito en Kazuo Kubo y col., 22º Symposium on Medicinal Chemistry, Resúmenes, páginas 275-277, 2P-320, 2002, era de 301 nM y el compuesto mostró sólo actividad débil en comparación con los Compuestos 1, 2, 3 y 4. STI571, inhibidor conocido de c-Kit cinasa, mostró una CI<sub>50</sub> de 190 nM.

[Tabla 1]

Compuesto	CI <sub>50</sub> (nM)
Compuesto 1	9,36
Compuesto 2	12,8
Compuesto 3	214
Compuesto 4	56,3

35

### [Ejemplo 2] Efecto del Compuesto 1 sobre la fosforilación de la c-Kit cinasa mediante la estimulación por SCF

Se probó el efecto del Compuesto 1 sobre la fosforilación de la molécula de c-Kit cinasa por estimulación con SCF en la línea celular de cáncer de pulmón microcítico H-526 que expresa c-Kit cinasa.

40

Se cultivaron las células H-526 en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5% (37 °C) usando un medio RPMI1640 que contenía FCS al 10%. Tras el cultivo, las células H-526 se lavaron tres veces con PBS y se suspendieron en un medio BSA-RPMI1640 a 5,0 x 10<sup>5</sup> células/ml. Se inoculó 1 ml de esta suspensión celular a cada pocillo de una placa de 24 pocillos y la suspensión se cultivó en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5% (37 °C) durante 6 horas. Tras 6 horas de cultivo, se añadió a cada pocillo 1 ml de BSA-RPMI1640 que contenía una sustancia de prueba diluida y se llevó a cabo el cultivo en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5% (37 °C) durante 1 hora. A continuación se realizó otro cultivo en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5% (37 °C) durante 5 minutos tras la adición de 10 µl de SCF (10 µg/ml, R&D Corporation). Tras cultivar durante 5 minutos, se lavaron las células con PBS y se añadieron 100 µl de tampón de carga de muestra SDS a las células para preparar una muestra de lisado celular. Después de tratar la muestra con

45

calor a 94 °C durante 10 minutos, se crioconservó a -20 °C.

A continuación se sometió la muestra de lisado celular, 20 µl, a electroforesis en un gradiente de gel de poliacrilamida del 4 al 20% (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.). Tras la electroforesis, la muestra se transfirió a una membrana de PVDF (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) durante 3 horas. La membrana transferida se sometió a inmunotransferencia utilizando un anticuerpo fosfo-c-Kit (Tyr719) (Cell Signaling Technology Inc.) como anticuerpo principal y un anticuerpo IgG anti-conejo, unido a HRP (Cell Signaling Technology Inc.) como anticuerpo secundario. Tras lavar la membrana, se desarrolló con un Super Signal (Pierce Biotechnology, Inc.).

Según se muestran los resultados en la Fig. 1, la c-Kit cinasa no se fosforiló (el carril del extremo izquierdo) en ausencia de SCF, y la adición del Compuesto 1 suprimió la fosforilación de la c-Kit cinasa que tendría lugar en presencia de SCF de una manera dependiente de la concentración. La actividad inhibidora de la fosforilación del compuesto STI571, que es un inhibidor conocido de la c-Kit cinasa, fue de aproximadamente una décima parte de la del Compuesto 1.

### [Ejemplo 3] Efecto del Compuesto 1 en el crecimiento del tumor H-526 transplantado a ratones atómicos

Se cultivaron células H-526 en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5% (37 °C) usando un medio RPMI1640 que contenía FCS al 10%. Tras recoger el medio de cultivo, las células H-526 se lavaron dos veces con PBS y se suspendieron en PBS a 5,0 x 10<sup>7</sup> células/ml. Se transplantó esta suspensión celular (0,1 ml) a la parte subcutánea del flanco derecho de ratones hembra Balb/c nu/nu de 6 semanas (adquiridos de Charles River Laboratories, Inc.). Tras el trasplante, se inició la administración de una sustancia de prueba en el momento en que el volumen del tumor alcanzó aproximadamente 150 mm<sup>3</sup>, y por consiguiente, la administración oral se realizó dos veces al día durante un período de 14 días. La sustancia de prueba se suspendió en una disolución de metilcelulosa al 0,5% (Wako Pure Chemical Industries Co., Ltd.) para administrar una dosis de 0,1 ml/10 g de peso corporal.

El volumen tumoral se midió con un calibre dos veces por semana durante el período de administración. Se midieron los diámetros corto y largo del tumor con un calibre y el volumen tumoral se calculó según la ecuación: 1/2 x diámetro largo x diámetro corto x diámetro corto. Aquí, el experimento se llevó a cabo en un grupo de 10 animales de control con vehículo (grupo al que se administró disolvente), así como en un grupo de 5 animales a los que se les administró una sustancia de prueba.

Según se muestran los resultados en la Figura 2, el Compuesto 1 suprimió el crecimiento del tumor de H-526 trasplantado al ratón atómico de una manera dependiente de la dosis. Por otra parte, STI571, un inhibidor de c-Kit cinasa conocido, mostró poco efecto antitumoral incluso cuando se administró en dosis de 160 mg/kg.

### 30 [Ejemplo 4] Efecto del Compuesto 1 sobre la fosforilación de c-Kit cinasa en el tumor de H-526 transplantado a ratones atómicos.

Se transplantó 0,1 ml de una suspensión de células H-526 preparada a una concentración de 5,0 x 10<sup>7</sup> células/ml, a la parte subcutánea del lado derecho de ratones Balb/c nu/nu hembras de 6 semanas (adquiridos de Charles River Laboratories, Inc.). A continuación se separaron los animales en un grupo de control con vehículo (grupo al que se administró disolvente) y un grupo al que se administró una sustancia de prueba en el momento en que el volumen del tumor alcanzó 300-1000 mm<sup>3</sup>: la sustancia de prueba se administró al último grupo. El tumor extirpado se colocó en un tampón de lisado celular (HEPES 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, glicerol al 10%, Tritón X-100 al 1%, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, EDTA 1 mM, NaF 100 mM, PMSF 1 mM, aprotinina 10 µg/ml, leupeptina 50 µg/ml, pepstatina A 1 µg/ml, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, β-glicerofosfato 25 mM y cóctel II inhibidor de fosfatasa) y se homogeneizó. Tras la centrifugación, se cuantificó la proteína del sobrenadante y se añadió tampón de carga de muestra 3 x SDS para preparar una muestra de lisado celular. Posteriormente, el lisado celular se calentó a 94 °C durante 10 minutos y se crioconservó a -20 °C.

La muestra de lisado celular que era equivalente a 30 µg de proteína se sometió a electroforesis en un gradiente de gel de poliacrilamida del 4 al 20% (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.). Tras la electroforesis, la muestra se transfirió a una membrana de PVDF (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) durante 3 horas. Con el fin de analizar c-Kit fosforilada, c-Kit y β-actina, se llevaron a cabo inmunotransferencias utilizando un anticuerpo fosfo-c-Kit (Tyr719) (Cell Signaling Technology Inc.), un anticuerpo anti c-Kit (Cell Signaling Technology Inc.) y un anticuerpo anti β-actina (Sigma) como anticuerpo principal y un anticuerpo IgG anti conejo, unido a HRP, (Cell Signaling Technology Inc.) como anticuerpo secundario. Tras lavar la membrana, se desarrolló con un Super Signal (Pierce Biotechnology, Inc.).

Según se muestran los resultados en la Fig. 3, el Compuesto 1 redujo la c-Kit fosforilada en el tejido tumoral cuando se administró a 30 o 100 mg/kg, pero c-Kit y β-actina permanecieron sin cambios. Mientras que el Compuesto 1 inhibió la fosforilación por completo cuando se administró a 30 o 100 mg/kg, STI571, inhibidor de c-Kit cinasa conocido, inhibió parcialmente la fosforilación incluso cuando se administró en dosis de 160 mg/kg.

55 Todos estos resultados mostraron que el Compuesto 1 inhibe la fosforilación de c-Kit in vivo, y se confirma que el Compuesto 1 inhibe la actividad de c-Kit cinasa in vivo y presenta actividad antitumoral.

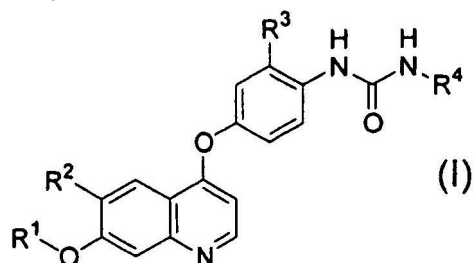
**Aplicabilidad industrial**

5 Se descubrió que un compuesto representado por la fórmula general (I) muestra una potente actividad inhibidora de c-Kit cinasa, e inhibe la proliferación de células cancerosas activadas por c-Kit cinasa in vitro e in vivo. Por lo tanto, se muestra que el compuesto representado por la fórmula general (I) tiene aplicación como agente contra el cáncer para cánceres con transformación neoplásica por activación de la c-Kit cinasa. Además, se sugiere que un inhibidor de la c-Kit cinasa que comprende como un ingrediente activo el compuesto representado por la fórmula general (I) es eficaz para enfermedades tales como la mastocitosis, la alergia y el asma, que se considera que están causadas por la c-Kit cinasa.

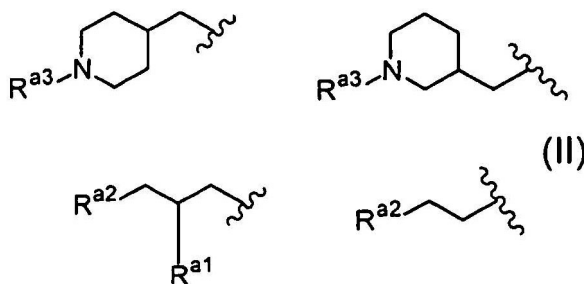


## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto para su uso en un procedimiento de tratamiento de un cáncer que expresa excesiva c-Kit cinasa o una c-Kit cinasa mutante seleccionado de la leucemia mielógena aguda, la leucemia de mastocitos, un cáncer de pulmón microcítico, tumores del estroma gastrointestinal (GIST), un cáncer testicular y el neuroblastoma, o para su uso es un procedimiento de tratamiento de la mastocitosis, la alergia o el asma, en el que dicho compuesto es un compuesto representado por la fórmula general (I), una de sus sales o un hidrato de los anteriores:



(en la que R<sup>1</sup> representa metilo, 2-metoxietilo o un grupo representado por las fórmulas (II):



(en las que R<sup>a3</sup> representa metilo, ciclopropilmetilo o cianometilo; R<sup>a1</sup> representa hidrógeno, flúor o hidroxilo; y R<sup>a2</sup> representa 1-pirrolidinilo, 1-piperidinilo, 4-morfolinilo, dimetilamino o dietilamino);

R<sup>2</sup> representa ciano o -CONHR<sup>a4</sup> (en el que R<sup>a4</sup> representa hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, cicloalquilo C<sub>3-8</sub>, alcoxi C<sub>1-6</sub> o cicloalcoxi C<sub>3-8</sub>);

R<sup>3</sup> representa hidrógeno, metilo, trifluorometilo, cloro o flúor; y

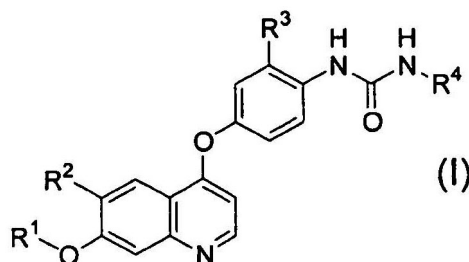
R<sup>4</sup> representa hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, ciclopropilo, 2-tiazolilo o 4-fluorofenilo).

2. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que R<sup>1</sup> representa metilo, R<sup>4</sup> representa metilo, etilo o ciclopropilo, R<sup>3</sup> representa hidrógeno, cloro o flúor y R<sup>2</sup> representa -CONHR<sup>a4</sup> (en el que R<sup>a4</sup> representa hidrógeno o metoxi).

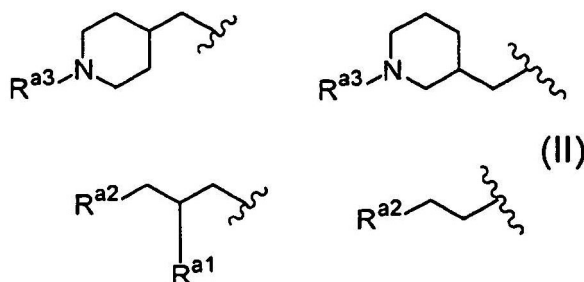
3. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

- (1) 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolincarboxamida,
- (2) 4-(3-cloro-4-(etilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolincarboxamida,
- (3) N6-metoxi-4-(3-cloro-4-(((ciclopropilamino)carbonil)amino)fenoxi)-7-metoxi-6-quinolincarboxamida y
- (4) N6-metoxi-4-(3-cloro-4-(((etilamino)carbonil)amino)fenoxi)-7-metoxi-6-quinolincarboxamida.

4. Uso de un compuesto representado por la fórmula general (I), una de sus sales un hidrato de los anteriores:



(en la que R<sup>1</sup> representa metilo, 2-metoxietilo o un grupo representado por las fórmulas (II):



5

(en las que  $R^{a3}$  representa metilo, ciclopropilmetilo o cianometilo;  $R^{a1}$  representa hidrógeno, flúor o hidroxilo; y  $R^{a1}$  representa 1-pirrolidinilo, 1-piperidinilo, 4-morfolinilo, dimetilamino o dietilamino);

10

$R^2$  representa ciano o  $-\text{CONHR}^{a4}$  (en el que  $R^{a4}$  representa hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo  $C_{3-8}$ , alcoxi  $C_{1-6}$  o cicloalcoxi  $C_{3-8}$ );

$R^3$  representa hidrógeno, metilo, trifluorometilo, cloro o flúor; y

15

$R^4$  representa hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, ciclopropilo, 2-tiazolilo o 4-fluorofenilo), para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer que expresa excesiva c-Kit cinasa o un mutante de c-Kit cinasa seleccionado de la leucemia mielógena aguda, la leucemia de mastocitos, un cáncer de pulmón microcítico, tumores del estroma gastrointestinal (GIST), un cáncer testicular y el neuroblastoma, o para su uso en un procedimiento de tratamiento de la mastocitosis, la alergia o el asma.

5. El uso según la reivindicación 4, en el que  $R^1$  representa metilo,  $R^4$  representa metilo, etilo o ciclopropilo,  $R^3$  representa hidrógeno, cloro o flúor y  $R^2$  representa  $-\text{CONHR}^{a4}$  (en el que  $R^{a4}$  representa hidrógeno o metoxi).

6. El uso según la reivindicación 4, en el que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

20

(1) 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolincarboxamida,

(2) 4-(3-cloro-4-(etilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolincarboxamida,

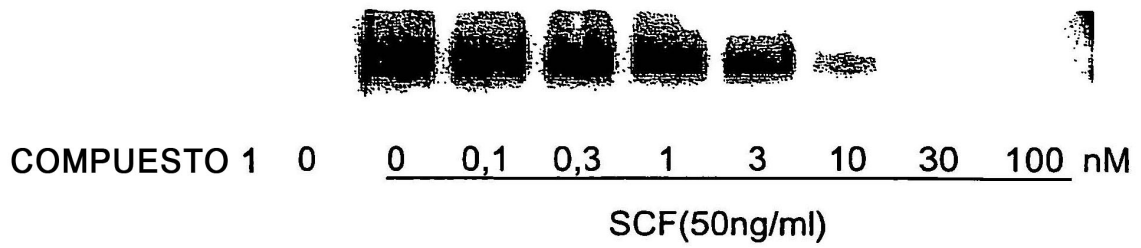
(3) N6-metoxi-4-(3-cloro-4-(((ciclopropilamino)carbonil)amino)fenoxi)-7-metoxi-6-quinolincarboxamida y

(4) N6-metoxi-4-(3-cloro-4-(((etilamino)carbonil)amino)fenoxi)-7-metoxi-6-quinolincarboxamida.

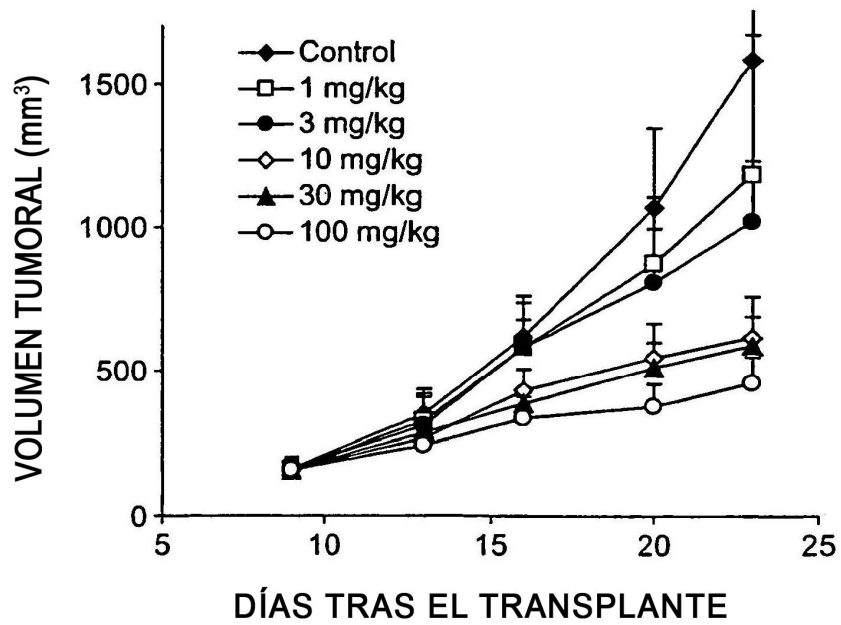
25

7. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un cáncer que expresa excesiva c-Kit cinasa o un mutante de c-Kit cinasa seleccionado de la leucemia mielógena aguda, la leucemia de mastocitos, un cáncer de pulmón microcítico, tumores del estroma gastrointestinal (GIST), un cáncer testicular y el neuroblastoma, o para su uso en un procedimiento de tratamiento de la mastocitosis, la alergia o el asma, que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como ingrediente activo.

**Fig.1**



**Fig.2**



**Fig.3**

