

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 702**

51 Int. Cl.:
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09717380 .1**
96 Fecha de presentación: **02.03.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2254882**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2010**

54 Título: **Uso de (3-trifluorometilsulfoni)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-il-amino)-fenil]benzamida contra el cáncer de mama, el glioma y la angiogénesis**

30 Prioridad:
04.03.2008 US 42240

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.11.2012

73 Titular/es:
NATCO PHARMA LIMITED (100.0%)
Natco House Road No. 2 Banjara Hills
Hyderabad 500 033, Andhra Pradesh, IN

72 Inventor/es:
KOMPELLA, AMALA KISHAN;
ADIBHATLA KALI SATYA, BHUJANGA RAO;
RACHAKONDA, SREENIVAS y
VENKAIAH CHOWDARY, NANNAPANENI

74 Agente/Representante:
UNGRÍA LÓPEZ, Javier

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).

ES 2 391 702 T3

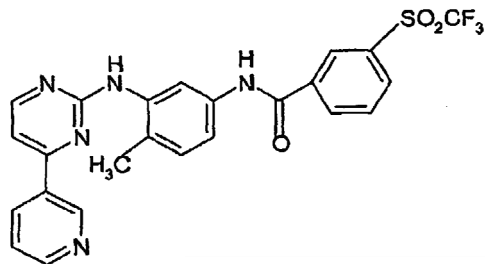
DESCRIPCIÓN

Uso de (3-trifluorometilsulfonyl)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-il-amino)-fenil]benzamida contra el cáncer de mama, el glioma y la angiogénesis.

Esta solicitud se está presentando el 2 de Marzo de 2009, como una solicitud de Patente Internacional PCT a nombre de Natco Pharma Limited, una corporación nacional India, solicitante para la denominación en todos los países excepto los Estados Unidos, y Amala kishan Kompella, un ciudadano de India, Bhujanga rao Adibhatla Kali Satya, un ciudadano de India, Sreenivas Rachakonda, un ciudadano de India, y Nannapaneni Venkaiah Chowdary, un ciudadano de India, solicitantes para la denominación de los Estados Unidos solamente, y reivindica prioridad para la Solicitud de Patente de Utilidad de los Estados Unidos Núm. de Serie 12/042.240 presentada el 4 de Marzo de 2008.

Campo de la Invención

Esta invención hace referencia a un compuesto de (3-trifluorometilsulfonyl)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-il-amino)fenil]benzamida (fórmula (I)) para su uso en el tratamiento del cáncer de mama, el glioma o la angiogénesis. El compuesto de fórmula (I) se puede preparar mediante un procedimiento, partiendo de 4-metil-3-nitro-anilina (fórmula (II)) a través de intermedios (3-trifluorometilsulfonyl)-N-[4-metil-3-nitrofenil]-benzamida (fórmula (III)), (3-trifluorometilsulfonyl)-N-[3-amino-4-metilfenil]-benzamida (fórmula (IV)) y (3-trifluorometilsulfonyl)-N-[3-guanidino-4-metilfenil]-benzamida (fórmula (V)). Los procedimientos para la preparación de estos intermedios se comentan más abajo. El compuesto de (fórmula (I)), también conocido como AN-024, es:



Fórmula-1
Código de desarrollo: AN-024

Antecedentes de la Invención

La preparación de (3-trifluorometilsulfonyl)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-il-amino)-fenil]-benzamida de fórmula (I), y el uso de la misma, especialmente como agente anti-tumoral, se describen en el Ejemplo 13 del documento US 2007/0232633, que se publicó el 4 de Octubre de 2007, y en las correspondientes solicitudes de otros numerosos países (PCT/IN 2005/000243).

Compendio de la Invención

La presente invención se refiere a la (3-trifluorometilsulfonyl)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-il-amino)-fenil]-benzamida de fórmula (I), que es un agente antiproliferativo (p. ej., anti-tumoral), para uso en el tratamiento del cáncer de mama, el glioma o la angiogénesis.

Un procedimiento para la preparación del compuesto de fórmula (I) incluye (como se muestra en el Esquema 1 de más abajo):

- (1) (a) Proporcionar cloruro de (3-trifluorometilsulfonyl)benzoilo (fórmula (VI)) o prepararlo mediante métodos convencionales;
- (2) (b) Condensar 4-metil-3-nitro-anilina (fórmula (II)) con el compuesto de fórmula (VI) de alrededor de 30 a alrededor de 40°C en disolvente clorohidrocarbonado con adición de álcali acuoso para obtener (3-trifluorometilsulfonyl)-N-[4-metil-3-nitrofenil]-benzamida (fórmula (III))
- (3) (c) Reducir el compuesto de fórmula (III) con cloruro estannoso/HCl conc. de alrededor de 0 a alrededor de 5°C durante alrededor de 3 a alrededor de 4 horas para obtener la (3-trifluorometilsulfonyl)-N-[3-amino-4-metilfenil]-benzamida (fórmula (IV));
- (4) (d) Condensar el compuesto de fórmula (IV) con solución de cianuro de alrededor de 90 a alrededor de 95°C en disolvente n-butanol para obtener (3-trifluorometilsulfonyl)-N-[3-guanidino-4-metilfenil]-benzamida (fórmula (V));
- (5) (e) Condensar el compuesto de fórmula (V) con un compuesto de fórmula (VII) en presencia de base a temperatura de reflujo para obtener el compuesto de fórmula (I).

Un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (III) incluye:

- (1) (a) Proporcionar cloruro de (3-trifluometilsulfonyl)benzoilo (fórmula (VI)); o prepararlo mediante métodos convencionales;
- (2) (b) Condensar 4-metil-3-nitro-anilina (fórmula (II)) con el compuesto de fórmula (VI) de alrededor de 30 a alrededor de 40°C en un disolvente clorohidrocarbonado con adición de álcali acuoso para obtener (3-trifluorometilsulfonyl)-N-[4-metil-3-nitrofenil]-benzamida (fórmula (III)).

Un procedimiento para la preparación de (3-trifluorometilsulfonyl)-N-[3-amino-4-metilfenil]benzamida (fórmula (IV)) incluye:

- (1) (a) Proporcionar cloruro de (3-trifluometilsulfonyl)benzoilo (fórmula (VI)); o prepararlo mediante métodos convencionales;
- (2) (b) Condensar la 4-metil-3-nitro-anilina (fórmula (II)) con el compuesto de fórmula (VI) de alrededor de 30 a alrededor de 40°C en un disolvente clorohidrocarbonado con adición de álcali acuoso para obtener (3-trifluorometilsulfonyl)-N-[4-metil-3-nitrofenil]-benzamida (fórmula (III));
- (3) (c) Reducir el compuesto de fórmula (III) con cloruro estannoso/HCl conc. de alrededor de 0 a alrededor de 5°C durante alrededor de 3 a alrededor de 4 horas para obtener (3-trifluorometilsulfonyl)-N-[3-amino-4-metilfenil]-benzamida (fórmula (IV)).

Un procedimiento para la preparación de hidrocloreuro de N-{2-(4-metilpiperazinometil)benzoilamido}-5-metil-guanidina (fórmula (V)) incluye:

- (1) (a) Proporcionar cloruro de (3-trifluometilsulfonyl)benzoilo (fórmula (VI)); o prepararlo mediante métodos convencionales;
- (2) (b) Condensar la 4-metil-3-nitro-anilina (fórmula (II)) con el compuesto de fórmula (VI) de alrededor de 30 a alrededor de 40°C en un disolvente clorohidrocarbonado con adición de álcali acuoso para obtener (3-trifluorometilsulfonyl)-N-[4-metil-3-nitrofenil]-benzamida (fórmula (III));
- (3) (c) Reducir el compuesto de fórmula (III) con cloruro estannoso/HCl conc. de alrededor de 0 a alrededor de 5°C durante alrededor de 3 a alrededor de 4 horas para obtener (3-trifluorometilsulfonyl)-N-[3-amino-4-metilfenil]-benzamida (fórmula (IV));
- (4) (d) Condensar el compuesto de fórmula (IV) con cianamida acuosa de alrededor de 90 a alrededor de 95°C en disolvente n-butanol para obtener (3-trifluorometilsulfonyl)-N-[3-guanidino-4-metilfenil]-benzamida (fórmula (V)).

Breve Descripción de las Figuras

Figura 1. Se trataron células K562 con diferentes concentraciones de AN024 (1-10 µg/ml). Los productos lisados celulares se recogieron y se realizó el análisis de transferencia western por medio de los protocolos convencionales. Se determinaron los niveles de expresión de BCR-Abl, Crk y Stat5A^{694/699} (Ejemplo 1).

Figura 2. Reducción del agrandamiento esplénico en ratones carentes de sistema inmunitario a los que se ha implantado K562 mediante dosificación oral de AN-024 e Imatinib (Ejemplo 2). El agrandamiento esplénico se determinó mediante inspección visual y se determinó que los ratones de control mostraban un bazo agrandado indicativo de la localización celular de K562. Las células tratadas con AN024 no mostraron agrandamiento esplénico mientras los ratones tratados con Imatinib mostraron un ligero agrandamiento esplénico.

Figuras 3A y 3B. Disminución de la expresión de luciferasa en ratones carentes de sistema inmunitario a los que se han implantado células de leucemia humana K562 luc y tratados con AN024 o Imatinib (Ejemplo 4). El AN024 a una concentración de 1 mg/kg no indujo un descenso en la expresión de la luciferasa, mientras concentraciones de 5 mg/kg, 10 mg/kg, y 20 mg/kg ocasionaron un descenso en la expresión de luciferasa. La administración de Imatinib a una concentración de 1 mg/kg no indujo un descenso en la expresión de luciferasa, mientras 10 mg/kg y 20 mg/kg mostraron un retraso en la expresión de luciferasa.

Figuras 4A, 4B, y 4C. Estas figuras ilustran los resultados de estudios análogos a los ilustrados en las Figuras 3A y 3B pero empleando el fármaco de control Dasatinib. La Fig. 4A (Ejemplo 6) es una representación gráfica del descenso en el recuento de blastocitos mediante la administración oral (or) de Dasatinib en ratones carentes de sistema inmunitario a los que se han implantado células mutantes Baf3 (wt, T315I, M351T y E255K). La Fig. 4B (Ejemplo 6) es una representación gráfica del descenso en el recuento de blastocitos mediante la administración oral (or) de Imatinib en ratones carentes de sistema inmunitario a los que se han implantado células mutantes Baf3 (wt, T315I, M351T y E255K). La Fig. 4C (Ejemplo 6) es una representación gráfica del descenso en el recuento de blastocitos mediante la administración oral (or) de AN-024 en ratones carentes de sistema inmunitario a los que se han implantado células mutantes Baf3 (wt, T315I, M351T y E255K).

Figura 5A y 5B. Análisis de invasión en matrigel *in vitro* de células de glioma 4910, 5310 y U87 y células de cáncer de mama MDAMB231 y ZR71 en presencia de concentraciones especificadas de AN-024, con y sin radiación (Ejemplo 7).

Figura 5C. Análisis angiogénico *in vitro* de células de glioma 4910, 5310 y U87 y células de cáncer de mama MDAMB231 y ZR71 en presencia de concentraciones especificadas de AN-024, con y sin radiación (Ejemplo 7).

Figura 5D. Análisis de transferencia western de células de glioma 4910, 5310 y U87 y células de cáncer de mama MDAMB231 y ZR71 en presencia de concentraciones especificadas de AN-024, con y sin radiación (Ejemplo 7).

Figura 6A. Expresión de luciferasa de ratones a los que se ha implantado K562 luc después del tratamiento con AN024, AN019 o imatinib.

Figura 6B. Número de animales curados después del tratamiento con AN024 o AN019 el día 58. El tratamiento con fármaco se detuvo el día 42, los animales continuaron mostrando efecto curativo después del tratamiento con AN024 y AN019 después de la retirada del tratamiento con el fármaco (Ejemplo 8).

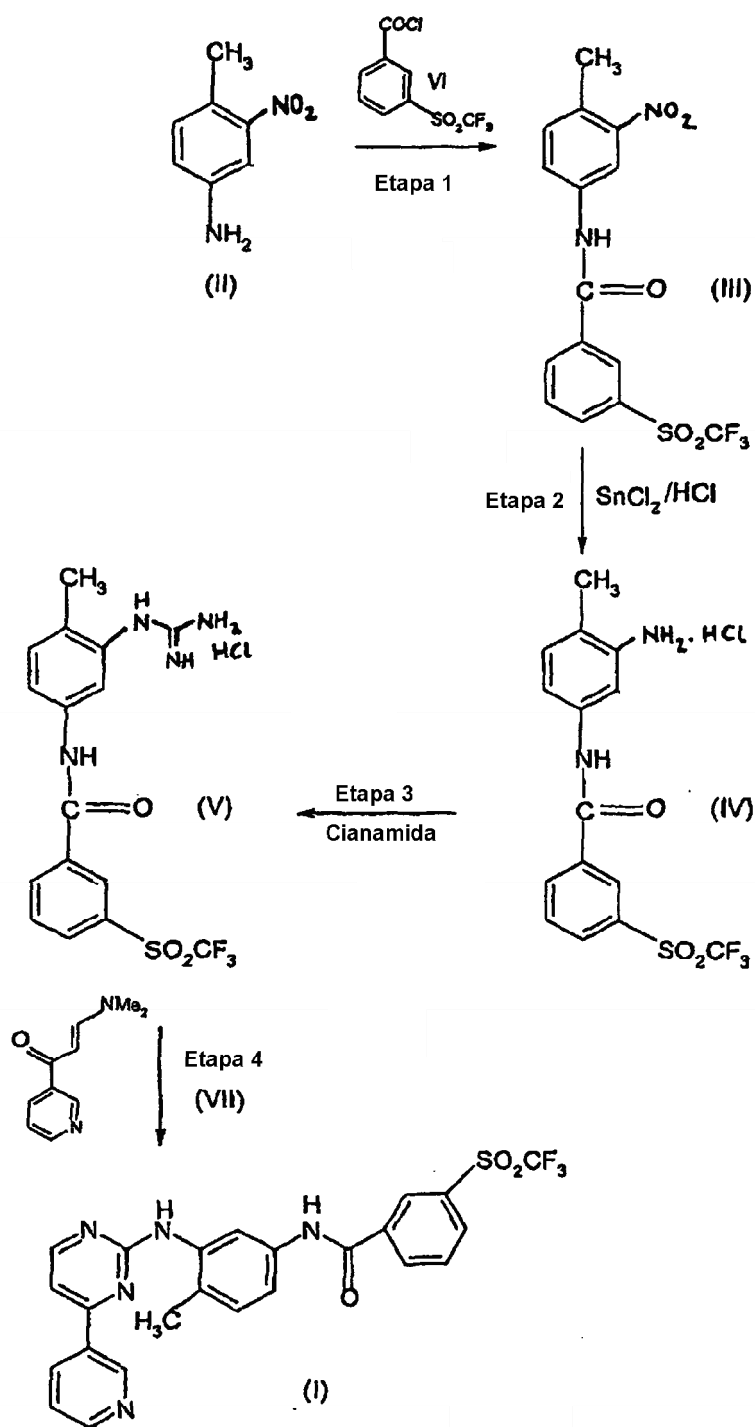
Figura 6C. Recuento de blastocitos de frotis sanguíneos tomados de animales en el día indicado. El tratamiento con fármaco se retiró el día 42. AN024 y AN019 mostraron eficacia después de la retirada del tratamiento con fármaco. Se encontró que Imatinib no era eficaz (Ejemplo 8).

Figura 7A. Análisis semicuantitativo de tumores intracraneales en ratones carentes de sistema inmunitario después del tratamiento con TMZ, AN024 o AN019 con o sin radiación (5Gy) (Ejemplo 9).

Figura 7B. Representaciones gráficas de ratones carentes de sistema inmunitario que muestran la ausencia de tumores intracraneales después del tratamiento con fármaco con AN-024 y sin tratamientos de radiación (Ejemplo 9).

Preparación del Compuesto de Fórmula (I)

El esquema de reacción para la preparación del compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la presente invención se muestra en el esquema 1.



Esquema 1

5 En la etapa 1, el álcali puede ser hidróxido de sodio o hidróxido de potasio, por ejemplo, hidróxido de potasio. Esta reacción se puede llevar a cabo en un hidrocarburo clorado tal como cloruro de metileno o cloroformo, por ejemplo, cloroformo. La temperatura puede estar en el intervalo de alrededor de 30 a alrededor de 40°C.

La reducción en la etapa 2 se puede efectuar empleando 6 moles de cloruro estannoso en medio de HCl conc. El disolvente utilizado en la etapa 3 puede ser n-butanol. La etapa 4 de la presente invención se puede llevar a cabo empleando hidróxido de sodio en presencia de n-butanol.

En este aspecto se mencionan las descripciones de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 11/714.565, presentada el 5 de Marzo de 2007 (Publicación de los Estados Unidos Núm. US 2007/0232633, publicada el 4 de Octubre de 2007) y la Solicitud PCT Núm. PCT/IN 2005/000243, presentada el 19 de Julio de 2005 (Publicación PCT Núm. WO 2006/027795, publicada el 16 de Marzo de 2006).

Las realizaciones de la presente invención se describen en los ejemplos ofrecidos más abajo, que se proporcionan solamente para ilustrar la invención y por lo tanto no se debe considerar que limitan el alcance de la invención.

Ejemplo

Se encontró que un compuesto de fórmula I (indicado mediante el código de desarrollo (AN-024)) mostraba una actividad anti-proliferativa (p. ej., anti-tumoral) eficaz. Esta actividad anti-proliferativa es superior a la de algunos fármacos aprobados existentes de esta clase. El código de desarrollo AN-019 hace referencia a otro compuesto de la misma clase descrito en otro lugar por los autores de la presente invención. La eficacia biológica y la actividad de AN-024 se han comparado con los fármacos aprobados como el mesilato de Imatinib y el Dasatinib para que sirvan como controles positivos en este estudio. El "mesilato de Imatinib" se ha abreviado como "Imatinib" en este estudio.

Ejemplo 1 – Establecimiento de la Actividad Anti-CML de AN-024 en Ratones Carentes de Sistema Inmunitario a los que se han Implantado Células k562 (Figura-1)

Estudios *in vitro* con AN-024

Se determinaron los niveles de expresión de BCR-Abl, Crk y fosfo Stat5A^{694/699} mediante análisis de transferencia western en células K562 tratadas con diferentes concentraciones de AN024 (1, 2,5, 5 o 10 µg/ml) durante 12h. Se observó que los niveles de proteínas BCR-Abl, Crk y fosfo Stat5A^{694/699} disminuyeron de una manera dependiente de la dosis.

Análisis de Transferencia Western

Se trataron células K562 con 1, 2,5, 5, o 10 µg/ml de AN024. Después de 12 h, se recogieron las células y se prepararon productos lisados de células totales en tampón de extracción que contenía Tris [0,1 M, pH 7,5], Triton-X114 (1,0%), EDTA (10 mM), aprotinina, y fluoruro de fenilmetilsulfonilo. Se separaron 10 µg de proteína de estas muestras en condiciones no reductoras mediante SDS-PAGE al 12% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell, Keene, NH). Las membranas se sondearon durante 2 h con anticuerpos contra BCR-Abl, Crk y fosfo Stat5A^{694/699} por medio de los protocolos convencionales. Las membranas se lavaron con posterioridad tres veces con PBS para separar el exceso de anticuerpos primarios, se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con HRP apropiados según se requiriera, y después se revelaron de acuerdo con el protocolo de quimioluminiscencia intensificada (Amersham, Arlington Heights, IL).

Análisis de crecimiento celular con MTT

Se trataron células K562 con diferentes concentraciones de AN024 (1, 2,5, 5, o 10 µg/ml) durante 24 h, después de lo cual se llevó a cabo el análisis con MTT para determinar el índice proliferativo de las células tratadas. El análisis se llevó a cabo mediante los protocolos convencionales de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Chemicon Temecula, CA). Se midió la densidad óptica a 570 nm y se representó gráficamente. La absorbancia fue directamente proporcional al número de células presente y al número de células viables determinadas.

AN024 inhibió la actividad quinasa BCR-Abl de una manera dependiente de la dosis.

La Figura 1 ilustra los resultados de este ensayo. Se trataron células K562 con diferentes concentraciones de AN024 (1-10 µg/ml). Los productos lisados celulares se recogieron y se llevó a cabo el análisis por transferencia Western mediante los protocolos convencionales. Se determinaron los niveles de expresión de BCR-Abl, Crk y Stat5A^{694/699}.

Ejemplo 2 – Inyecciones con AN024 en Ratones Carentes de Sistema Inmunitario a los que se habían Implantado Células K562 No Demostraron Agrandamiento Esplénico ni Expresión de Crk (Figura-2)

Se trataron ratones carentes de sistema inmunitario a los que se habían implantado células K562 con inyecciones de Imatinib o AN024 por vía ip. Los ratones se sacrificaron después de observar una disminución en el porcentaje del índice de crecimiento de la leucemia (LGI) y se recogió el bazo. Se determinó el agrandamiento esplénico mediante inspección visual y se determinó que los ratones de control mostraban un bazo agrandado indicativo de la localización celular de K562. Las células tratadas con AN024 no mostraron agrandamiento alguno del bazo mientras los ratones tratados con Imatinib mostraron un ligero agrandamiento del bazo. Estos resultados se muestran en la Figura 2.

Las secciones en parafina de bazo inmunosondeado para determinar la presencia de la proteína Crk mostraron una fuerte localización de la expresión de Crk acompañada de aumento de la densidad celular indicativa de la localización de K562 en los ratones de control. Los ratones tratados con AN-024 solo mostraron un nivel de expresión basal de Crk comparable al del control negativo. Los ratones tratados con Imatinib indicaron regiones de expresión localizada de la expresión de Crk, indicativa de las células K562 en el bazo. Los ratones de control también desarrollaron tumores subcutáneos al azar que mostraban expresión de Crk, indicativa de la presencia de células K562.

A partir de estos resultados resulta evidente que el tratamiento con AN024 causó la regresión del LGI en ratones carentes de sistema inmunitario. Los ratones tratados con Imatinib también mostraron una reducción significativa en el LGI pero retardada en los ratones tratados con AN-024. Los ratones tratados tanto con AN024 como con Imatinib no mostraron anomalías fisiológicas, fenotípicas, o de comportamiento. Los ratones de control mostraron la presencia de tumores subcutáneos al azar con pérdida de dígitos acompañada de manchas rojizas bajo la piel y un ligero agrandamiento del abdomen. A partir de estos resultados, resulta evidente que AN-024 parece prometedor como fármaco terapéutico para el tratamiento de la leucemia.

(Ejemplo 3 – Estudios *in Vivo* Utilizando Líneas Celulares CML Murinas Resistentes a Imatinib Baf3

Para determinar la actividad anti-leucémica *in vivo* de AN019 y AN024, se implantaron intraperitonealmente células de leucemia murina Baf3 en ratones carentes de sistema inmunitario (Wt, T315I, M351T y E225K), y 15 días después de la implantación los ratones se trataron con Imatinib (10 mg/kg), AN019 (20 mg/kg) y AN024 (20 mg/kg) mediante gavage oral o inyecciones ip. Se obtuvieron frotis de sangre a través de la vena de la cola o a través de la vena femoral cada 6 días y se contaron los blastocitos y de representaron gráficamente.

Los frotis de sangre de ratones a los que se habían implantado Baf3 Wt tratados con Imatinib (10 mg/kg), AN019 (20 mg/kg) o AN024 (20 mg/kg) fueron similares a los controles normales después de 42 días.

Los frotis de sangre de los ratones a los que se habían implantado Baf3T315I tratados con Imatinib (10 mg/kg), AN019 (20 mg/kg) o AN024 (20 mg/kg) mostraron un descenso significativo en el recuento de blastocitos en ratones tratados con AN024 y AN019. Los ratones tratados con dosificación oral de Imatinib no mostraron un descenso en el recuento de blastocitos y fueron similares a los controles no tratados y a los ratones a los que se habían implantado Baf3M351T.

Los ratones a los que se habían implantado Baf3E255K también se comportaron de un modo similar a los ratones en los que se habían implantado Baf3M351T y Baf3T315I.

Los ratones carentes de sistema inmunitario en los que se habían implantado células mutantes Baf3 Wt, E255K, T315I, y M351T se trataron con Imatinib, AN019 y AN024 (oralmente e ip). En resumen, los ratones se trataron con Imatinib (10 mg/kg), AN019 (20 mg/kg) y AN024 (20 mg/kg) mediante gavage oral o inyecciones ip 15 días después de la implantación. Se controlaron diariamente la hinchazón abdominal y el descenso en la actividad, se realizaron frotis con sangre tomada de la vena de la cola o la vena femoral cada 6 días y se tiñeron con H y E como para los protocolos convencionales. Cuarenta y dos días después de la implantación, los ratones se sacrificaron y se recogieron los bazos. Se determinó el agrandamiento esplénico y se correlacionó con el recuento de blastocitos del frotis de sangre.

Resultados

Determinación Microscópica del Recuento de Blastocitos

Se tomó sangre de la vena de la cola o de la vena femoral cada 6 días de los ratones a los que se habían implantado células Baf3 hasta el día 42. A los 15 días de la implantación, se administraron a los ratones los tratamientos con Imatinib, AN019 y AN024 (oralmente e ip) como se ha descrito anteriormente. Se advirtió que en los ratones a los que se habían implantado Baf3Wt, se observaba un descenso progresivo en el recuento de blastocitos en todas las condiciones de tratamiento. Baf3M351T, T315I y E225K no respondieron bien a los tratamientos con Imatinib. La administración oral de Imatinib no tuvo un efecto significativo en los ratones en los que se habían implantado Baf3M351T, T315I y E225K. Los tratamientos intraperitoneales globales con AN024 y AN019 fueron significativamente mejores al disminuir el recuento de blastocitos en todos los ratones en los que se habían implantado Baf3.

El tratamiento con AN019 en ratones en los que se habían implantado Baf3Wt indujo una regresión completa de los blastocitos leucémicos y fue comparable a los controles no tratados. Los tratamientos intraperitoneales fueron superiores a los tratamientos orales. El tratamiento con AN019 en ratones en los que se habían implantado Baf3 M351T, T315I y E225K mostraron un descenso significativo en el recuento de blastocitos y fue comparable al de 12 días después de la implantación en ratones tratados ip a los 42 días; los ratones tratados ip mostraron una mayor

regresión de los blastocitos que los ratones tratados oralmente. El tratamiento con AN024 en ratones en los que se habían implantado Baf3 M351T, T315I y E225K mostró un descenso significativo en el recuento de blastocitos y fue superior al tratamiento con AN019 el día 42; Los ratones tratados ip mostraron una regresión mayor de los blastocitos que los ratones tratados oralmente.

Ejemplo 4 – Respuesta de Ratones Carentes de Sistema Inmunitario en los que se han Implantado Células Leucémicas Humanas K562 Normales/Luc Con Una Dosis baja de AN024, AN019 e Imatinib (Figuras 3A y 3B)

Administración oral de AN019, AN024 e Imatinib

mg/kg	K562 luc			K562 normal		
	AN024	AN019	Imatinib	AN024	AN019	Imatinib
1	5	5	5	5	5	5
5	5	5	5	5	5	5
10	5	5	5	5	5	5
20	5	5	5	5	5	5
Total=120 animales						

Se implantaron células K562 (1×10^6) normales/luc a través de la vena de la cola en ratones carentes de sistema inmunitario (nu/nu). Se utilizaron cinco ratones por grupo y se dividieron en 24 grupos + 2 de control. En todos los grupos se implantaron células K562 normales/luc. De los 24 grupos, 12 se utilizaron para estudios con luciferasa mientras los otros 12 se utilizaron para estudios de recuento en frotis de sangre.

Los fármacos se administraron mediante gavage oral como se ha sugerido previamente (goma de acacia al 2% y SLS al 2% en una suspensión acuosa).

Resultados

La administración oral de AN024 (1, 5, 10 y 20 mg/kg) en ratones carentes de sistema inmunitario en los que se habían implantado células de leucemia humana K562 luc dieron como resultado una regresión de la leucemia a concentraciones superiores. Una concentración de AN024 de 1 mg/kg no indujo un descenso en la expresión de luciferasa, mientras las concentraciones de 5 mg/kg, 10 mg/kg, y 20 mg/kg ocasionaron un descenso en la expresión de luciferasa.

La administración oral de Imatinib (1, 5, 10 y 20 mg/kg) en ratones carentes de sistema inmunitario en los que se habían implantado células de leucemia humana K562 luc dieron como resultado la regresión de la leucemia a concentraciones superiores. La administración de Imatinib a una concentración de 1 mg/kg no indujo un descenso en la expresión de luciferasa, mientras 10 mg/kg y 20 mg/kg mostraron un retraso en la expresión de luciferasa. La regresión de la leucemia fue muy pronunciada en los animales tratados con AN-024 y mejor que la del Imatinib. Estos resultados se ilustran en las Figuras 3A y 3B.

Ejemplo 5 - Determinación de la Eficacia (D_e) y la Penetración Temporal del Fármaco

Determinación de la eficacia del fármaco (D_e)

La eficacia del fármaco es determinó utilizando la ecuación, $D_e =$

$$\left[\frac{\sum \text{vivos}}{\sum \text{luc}} - \frac{\sum \text{vivos}_c}{\sum \text{luc}_c} \right] \div \sum \text{vivos}_{c-\text{Inicial}} \times 100$$

Donde:

Σ vivos = número total de ratones vivos por concentración al final del recuento de fotones durante los tiempos de los experimentos, Σ luc = número total de ratones vivos que muestran expresión de luciferasa por concentración al final del experimento y c representa recuento de fotones con el tiempo de los animales no tratados de control y $\Sigma_{c-inicial}$ representa el número inicial de animales en el control al comienzo del recuento de fotones durante los tiempos de los experimentos. Los resultados se representan gráficamente como el porcentaje de eficacia del fármaco (Tabla 1).

Resultados

La Tabla 1 muestra la eficacia del fármaco a diferentes concentraciones de Imatinib, AN019 y AN024 según se determina a partir de los estudios *in vivo*. A partir de la Tabla 1 resulta evidente que AN019 se comportó de una manera dependiente de la dosis, mientras que Imatinib y AN024 no, y fueron eficaces a bajas concentraciones.

Tabla 1

Fármaco	5 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg	40 mg/kg
D _e Imatinib	10,00	32,00	13,33	8,00
D _e AN019	25,82	78,20	83,40	85,20
D _e AN024	30,00	85,00	87,00	90,00

Determinación de la penetrancia temporal del fármaco (T_p)

La penetrancia temporal se calculó aplicando la siguiente ecuación, T_p=.

$$\frac{\left(\frac{P}{n}\right)_a - \left(\frac{P}{n}\right)_{ter}}{\left(\frac{P}{n}\right)_a - \left(\frac{P}{n}\right)_b}$$

Donde:

P = recuentos de fotones el día 'a', el día 'ter', o el día 'b' donde 'a' es el día en el que se detuvo el tratamiento con fármaco y 'ter' es el día en el que terminó el experimento y 'b' es el día en el que P es mínimo después del día a pero antes del día 'ter'.

n = número de animales vivos cuando se midió P.

Los valores más altos indican mayor eficacia del fármaco después de detener el tratamiento con fármaco, es decir la penetrancia del fármaco a lo largo del tiempo.

Resultados

Para determinar la penetrancia temporal de AN019, AN024 e Imatinib, se implantaron células K562luc en ratones carentes de sistema inmunitario. Se tomaron imágenes de los animales a intervalos de 6 días post-trasplante. El tratamiento con fármaco (AN019 20 mg/kg, AN024 24 mg/kg e Imatinib 10 mg/kg) se inició 15 días post-implantación por medio de inyecciones ip diarias. El tratamiento con fármaco se detuvo el día 35 y se tomaron imágenes de los animales hasta el día 45, y se calculó como se describe en los métodos.

Mediante la aplicación de la ecuación para la penetrancia temporal, los valores de T_p se determinaron como:

AN019 = 2,0

AN024 = 2,4

Imatinib = 0,8

Estos valores de T_p indican que AN024 tenía actividad sobre los controles no tratados y resultó mejor que A019 para determinar la actividad a lo largo del tiempo después de la retirada del tratamiento con fármaco.

Ejemplo 6 - Efecto de Dasatinib sobre Ratones Carentes de Sistema Inmunitario a los que se Había Implantado Baf3 en Comparación con AN024, AN019 e Imatinib (Figuras 4A, 4B, y 4C)

El Ejemplo 3 demostró la eficacia de AN024 y AN019 en el tratamiento de la leucemia cuando se comparó con Imatinib utilizando líneas celulares mutantes Baf3 (wt, T315I, M351T y E255K). En la presente memoria, los autores de la presente invención utilizaron Dasatinib como fármaco de control para determinar la respuesta de las células mutantes Baf3 al tratamiento cuando se comparó con AN024 e Imatinib.

Método

El diseño experimental se proporciona en forma tabular a continuación:

	Tratamiento ↓, línea celular implantada →	Wt	T315I	M351T	E255K
Controles.					
(realizado previamente)					
Dasatinib	oral	5	5	5	5
(10 mg/kg)	ip	5	5	5	5

Se implantaron intraperitonealmente células mutantes Baf3 (wt, T315I, M351T o E255K) en ratones carentes de sistema inmunitario. Quince días después la implantación, los ratones se trataron oralmente o intraperitonealmente con 10 mg/kg de Dasatinib durante 27 días. Se extrajo sangre de la vena femoral o de la vena de la cola cada 6 días y se determinó el recuento de blastocitos y se representó gráficamente.

Resultados

El sexto día, los frotis de sangre de ratones carentes de sistema inmunitario a los que se habían implantado células mutantes Baf3 (wt, T315I, M351T o E255K) mostraron recuentos de blastocitos normales, y los recuentos de blastocitos aumentaron progresivamente como se observa el día 12. El tratamiento con Dasatinib comenzó el día 15 post-implantación. Los tratamientos con Dasatinib no resultaron mejor que con Imatinib. El día 42, la terminación del experimento, los ratones a los que se habían implantado células wt mostraron una respuesta significativa a Dasatinib, indicando que los tratamientos ip fueron superiores a los orales. Los ratones a los que se habían implantado células T315I y M351T se comportaron de un modo similar a los controles sin disminución significativa del recuento de blastocitos. A los ratones a los que se les habían implantado E255K les fue solo un poco mejor que a los que se les habían implantado células T315I en respuesta al tratamiento con Dasatinib. El tratamiento global con Dasatinib únicamente causó retraso en el progreso de la leucemia sin efecto curativo significativo. El recuento de blastocitos fue mucho menor en el grupo tratado con AN-024 indicando la superioridad y el potencial de este compuesto en el tratamiento de la leucemia mejor que el Imatinib y el Dasatinib. Estos resultados se ilustran en las Figuras 4A, 4B, y 4C.

Ejemplo 7 – Estudios *In vitro* de Líneas Celulares de Glioma y Cáncer de Mama (Figuras 5A-5D) Materiales y Métodos

Para determinar el efecto de AN019, AN024 y Temozolomida (TMZ) con o sin radiación sobre las células de glioma y de cáncer de mama, las células se trataron a las dosis especificadas y se determinaron la invasión, la angiogénesis y los cambios en ciertas moléculas de señalización.

Análisis de Invasión en Matrigel

Se evaluó la invasividad *in vitro* de las células de glioma 4910, 5310 y U87 y de las células de cáncer MDAMB231 y ZR71 en presencia de concentraciones especificadas de los compuestos utilizando un análisis de la cámara de Boyden modificado. Las células se trataron con estos compuestos durante 48 h. Se suspendieron 1×10^6 células en 600 μ l de medio sin suero con un suplemento de BSA al 0,2% y se colocaron en el compartimento superior de las cámaras Transwell (Coming Costar Fischer Scientific Núm. Cat. 07-200-158, Pittsburgh PA) revestidas con Matrigel (0,7 mg/ml). El compartimento inferior de la cámara se cargó con 200 μ l de medio con suero y se permitió que las células migraran durante 24 h. Después de la incubación, las células se fijaron y se tiñeron con Hema-3 y se cuantificaron como se ha descrito previamente (Mohanam et al. 1993). Se tomaron imágenes de las células migradas microscópicamente para determinar la reducción de la invasividad inducida por los compuestos de esta invención.

Análisis angiogénico

Las angiogénesis *in vitro* de las células de glioma 4910, 5310 y U87 y de las células de cáncer de mama MDAMB231 y ZR71 en presencia de concentraciones especificadas de compuestos se determinaron como sigue, se sembraron células (2×10^4 /pocillo) en portaobjetos con cámara de 8 pocillos y se trataron con diversas concentraciones de compuestos de ensayo. Después de un período de incubación de 24 h, se retiró el medio

acondicionado y se añadió a 4×10^4 células endoteliales dérmicas humanas (monocapa en portaobjetos con cámara de 8 pocillos) y se permitió que las células endoteliales dérmicas humanas crecieran durante 72 h. Las células se fijaron a continuación en formaldehído al 3,7% y se tiñeron con H y E y se fotografiaron.

5 Análisis mediante transferencia Western

El análisis de transferencia Western de las células de glioma 4910, 5310 y U87 y de las células de cáncer de mama MDAMB231 y ZR71 en presencia de concentraciones especificadas de compuestos se evaluaron por ejemplo mediante protocolos convencionales. Las células se trataron con AN019, AN024 o Temozolomida a las concentraciones especificadas. Veinticuatro horas después del tratamiento, las células se recogieron y los productos lisados celulares se extrajeron. Cantidades iguales de proteínas se fraccionaron mediante SDS-PAGE. Las proteínas fraccionadas se aplicaron sobre membranas de nailon y se inmunosondearon para determinar AKT, ERK y Pi3k. Los productos aislados de proteínas de células de cáncer de mama se inmunosondearon adicionalmente para determinar EGFR, ErbB1, ErbB2 y ErbB3.

Resultados

Análisis de invasión en matrigel

Se evaluó la invasividad *in vitro* de las células de glioma 4910, 5310 y U87 y las células de cáncer MDAMB231 y ZR71 en presencia de concentraciones especificadas de los compuestos utilizando un análisis de la cámara de Boyden modificado. Las células se trataron con estos compuestos durante 48 h. La Tabla 2 muestra los resultados de los estudios del análisis de invasión en matrigel *in vitro* de las células de glioma 4910, 5310 y U87 y de las células de cáncer de mama MDAMB231 y ZR71 en presencia de concentraciones especificadas de los compuestos, con y sin radiación.

El cambio en la invasividad de diversas líneas celulares se proporciona en la Tabla 2. A partir del análisis de invasión resulta evidente que AN019 y AN024 fueron los más eficaces para inhibir la invasión en la mayoría de las células, con y sin radiación.

Tabla 2

Línea celular	Fármaco	-Radiación % Invasión	+Radiación % Invasión	± Cambio en la invasión después de la radiación
ZR-71	Temozolomida	70%	65%	-5%
	AN024	48%	45%	-3%
	AN019	33%	19%	-14%
MDA-MB-231	Temozolomida	62%	149%	-13%
	AN024	43%	47%	+4%
	AN019	45%	15%	-30%
4910	Temozolomida	95%	73%	-22%
	AN024	56%	39%	-17%
	AN019	42%	15%	-27%
5310	Temozolomida	50%	63%	+13%
	AN024	27%	32%	+5%
	AN019	5%	6%	+1%
U87	Temozolomida	90%	93%	+3%
	AN024	53%	29%	-24%
	AN019	18%	18%	0%

La Figura 5A ilustra los resultados de el análisis de invasión en matrigel *in vitro* de células de glioma 4910, 5310 y U87 y células de cáncer de mama MDAMB231 y ZR71 en presencia de concentraciones especificadas de AN-024, con y sin radiación.

La Figura 5B ilustra los resultados del análisis de invasión en matrigel *in vitro* de células de glioma 4910, 5310 y U87 y células de cáncer de mama MDAMB231 y ZR71 en presencia de concentraciones especificadas de AN-024, con y sin radiación.

5 Análisis angiogénico

A partir de los experimentos de análisis de la angiogénesis se observa que AN019 y AN024 fueron los más eficaces para inhibir la angiogénesis.

10 El tratamiento con Temozolomida causó una inhibición completa de la angiogénesis en células ZR-71, mientras en células MDA-MB-231 solo se observó una ligera inhibición en las condiciones de control con un aumento de la inhibición después de la radiación. Las células de xenoinjerto de Glioma 4910 mostraron inhibición significativa de la angiogénesis con y sin radiación. En el caso de las células 5310 se observó inhibición de la angiogénesis en condiciones de control, mientras que la angiogénesis resultó promovida después del tratamiento de radiación. Las
15 células de glioma U87 mostraron patrones de inhibición similares con y sin radiación.

El tratamiento con AN024 causó una completa inhibición de la angiogénesis en células ZR-71, mientras en células MDA-MB-231 solo se observó una ligera inhibición en los tratamientos de control y con radiación. Las células de xenoinjerto de glioma 4910 mostraron una inhibición significativa de la angiogénesis con y sin radiación. En el caso
20 de las células 5310 se observó inhibición de la angiogénesis en condiciones de control, mientras que la angiogénesis resultó inhibida adicionalmente después del tratamiento con radiación. Las células de glioma U87 mostraron un retraso significativo en la angiogénesis con aumento de la inhibición después de la radiación.

El tratamiento con AN019 causó la completa inhibición de la angiogénesis en células ZR-71, mientras en células MDA-MB-231 se observó una ligera inhibición en los tratamientos de control y con radiación. Las células 4910 de xenoinjerto de glioma mostraron una inhibición de la angiogénesis similar a la de las células MDA-MB-231 con un aumento de inhibición angiogénica después de la radiación. En el caso de las células 5310 la inhibición de la angiogénesis fue superior en condiciones de control que después del tratamiento con radiación. Las células de glioma U87 mostraron un retraso de la angiogénesis similar significativo con y sin radiación.
30

La Figura 5C ilustra los resultados obtenidos a partir del análisis angiogénico *in vitro* de células de glioma 4910, 5310 y U87 y células de cáncer de mama MDAMB231 y ZR71 en presencia de concentraciones especificadas de AN-024, con y sin radiación.

35 Análisis de transferencia Western

El análisis mediante transferencia Western de las células de glioma 4910, 5310 y U87 y de las células de cáncer de mama MDAMB231 y ZR71 en presencia de concentraciones especificadas de compuestos de esta invención reveló
40 que las células U87 no mostraron un cambio significativo en los niveles de AKT o PI3k con y sin radiación, mientras que se observó un ligero descenso en los niveles de ERK en las células tratadas con AN024 y el descenso aumentó después de la radiación. Las células 4910 se comportaron de un modo similar a las células U87 con un descenso de los niveles de AKT después del tratamiento con AN024 y el descenso de los niveles de AKT aumentó después de la radiación. En el caso de las células 5310 no fue observable una diferencia significativa en la expresión de ERK mientras que el tratamiento con AN019 causó un descenso de los niveles de expresión de AKT. Los niveles de PI3k
45 fueron casi indetectables en las células tratadas con AN019 sin radiación pero reaparecieron después del tratamiento con radiación. En el caso de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 no se observó un cambio significativo en AKT, ERK o PI3k, mientras que en el caso de ZR71 AN019 el tratamiento causó un descenso de los niveles de AKT, que aumentó después de la radiación. El tratamiento con AN024 no mostró ningún cambio significativo en condiciones no irradiadas, mientras que después de la radiación las células tratadas con AN024
50 mostraron un descenso de la expresión de AKT. Los niveles de PI3k estuvieron ausentes en los tratamientos con AN019 con y sin radiación. El tratamiento con AN024 causó el descenso de los niveles de PI3k después de la radiación. Los niveles de pAKT no cambian significativamente en ninguno de los tratamientos con o sin radiación, mientras que los niveles de pERK se redujeron significativamente especialmente en células tratadas con AN019 con y sin radiación, AN024 también mostró reducción de los niveles de pERK pero en un grado inferior que AN019. Los
55 tratamientos con Temozolomida con y sin radiación no mostraron ningún cambio significativo en los niveles de pAKT de perk.

La Figura 5D ilustra los resultados del análisis mediante transferencia Western de células de glioma 4910, 5310 y U87 y de células de cáncer de mama MDAMB231 y ZR71 en presencia de concentraciones especificadas de AN-024, con y sin radiación.
60

Ejemplo 8 – Estudio de Supervivencia Leucémica (Figuras 6A-6C)

Se implantaron intraperitonealmente células que expresan luciferasa K562 a ratones carentes de sistema inmunitario; los ratones se escanearon utilizando Xenogeny IVIS Image Station después de que inyecciones ip de luciferina determinaran las implantaciones. El tratamiento con fármaco comenzó como en los estudios previos el día 15 después de la implantación. A los animales se les administró el tratamiento hasta el día 42, después de lo cual se detuvo el tratamiento con el fármaco y se determinó la supervivencia de los animales según las regulaciones para el cuidado de animales. Se observó que los animales de control desarrollaron leucemia y que la mortalidad se había producido los días 34 y 35, puesto que por las regulaciones a los autores de la presente invención se les había recomendado sacrificar a los 8 animales restantes el día 35. El tratamiento con fármaco se retiró el día 42 post-implantación y se determinó la supervivencia de los animales.

Los animales tratados con AN024 mostraron mortalidad el día 38, los animales muertos en una inspección adicional no mostraron agrandamiento esplénico y se determinó que la causa de la muerte era distinta de la leucemia, no se pudieron tomar frotis de sangre del animal muerto. De los 10 animales utilizados 8 animales no mostraron signos de leucemia el día 55.

Los animales tratados con AN019 no mostraron ninguna mortalidad y 7 de los 10 animales mostraron una ausencia completa de síntomas de leucemia.

Los animales tratados con Imatinib mostraron recurrencia de los síntomas leucémicos después de la retirada del tratamiento y mostraron mortalidad los días 55, 56, 57 y 58. Los animales supervivientes muestran presencia de síntomas leucémicos.

La Figura 6A ilustra la cantidad de expresión de luciferasa de K562luc obtenida de ratones implantados después del tratamiento con AN024, AN019 o imatinib.

La Figura 6B ilustra el número de animales curados después del tratamiento con AN024 o AN019 el día 58. El tratamiento con fármaco se detuvo el día 42, los animales continuaron mostrando el efecto curativo después del tratamiento con AN024 y AN019 después de la retirada del tratamiento con fármaco.

La Figura 6C ilustra el recuento de blastocitos de frotis de sangre tomada de animales el día indicado. El tratamiento con fármaco se retiró el día 42. AN024 y AN019 mostraron eficacia después de la retirada del tratamiento con fármaco.

Ejemplo 8A – Estudios de DE₅₀, DL₅₀, DTM e Índice Terapéutico

La tabla siguiente resume la DE₅₀, DL₅₀, DTM (Dosis Tolerada Máxima) citada anteriormente y el índice terapéutico de los compuestos de la presente invención en comparación con Imatinib. Métodos empleados por J. Pharmacol. Exp. Ther., (1949), 96: 96-113.

Sustancia Experimental	DL ₅₀ (po)	DE ₅₀ (po)	DTM	Índice Terapéutico* - DL ₅₀ /DE _{50La}
	Ratones (mg/Kg)	Ratones (mg/Kg)	Ratones (mg/Kg)	
Mesilato de Imatinib	949	12	250	78,9
AN-019	1133	11,5	500	98,5
AN-024	1440	10	500	144
*Ratones Leucémicos (K562)				

Ejemplo 9 – Estudios de Radiación de Gliomas (Figuras 7A y 7B)

Se implantaron intracranalmente células de xenoinjerto de glioma humano 4910 (1x10⁶ células) en ratones carentes de sistema inmunitario. Diez días después de la implantación los ratones se trataron con AN019, AN024 o temozolomida con o sin radiación (5Gy/semana). El experimento finalizó el día 40 post-implantación.

A partir de los resultados se observó que 100% de los animales de control desarrollaron tumores intracraneales y la radiación sola tuvo un efecto muy pequeño sobre la reducción del tamaño del tumor. Los animales tratados con TMZ sola mostraron una reducción de los tumores intracraneales mostrando 3 de 10 animales una completa ausencia de tumores. El tratamiento con radiación combinado con administración de TMZ causó una regresión adicional del tamaño del tumor mostrando los animales menos síntomas de presión intracraneal (dorso arqueado), en este caso 2 de los 10 animales no mostraron tumor intracraneal observable.

Los animales tratados con AN024 sin radiación mostraron presencia de tumores intracraneales pero los tumores estuvieron bien definidos y no mostraron bordes difusos como se observaron en los controles o los tratamientos con TMZ, 3 de 10 animales se curaron. Después del tratamiento con radiación 7 de 10 animales se curaron, los animales que mostraron la presencia de tumores mostraron tumores extirpables quirúrgicamente.

Los animales tratados con AN019 solo mostraron tumores similares a los de los animales tratados con AN024 y en este caso con y sin radiación 6 de 10 animales se curaron. Se observó que después de la radiación el tamaño del tumor se redujo significativamente.

La Figura 7A ilustra los resultados obtenidos a partir del análisis semicuantitativo de tumores intracraneales en ratones carentes de sistema inmunitario después del tratamiento con TMZ, AN024 o AN019 con o sin radiación (5Gly).

La Figura 7B muestra representaciones gráficas de ratones carentes de sistema inmunitario que muestran ausencia de tumores intracraneales después del tratamiento con fármaco con AN-024 y sin tratamientos con radiación.

Los aspectos preparativos y otros aspectos de los compuestos para su uso en la presente invención se han ilustrado en los siguientes ejemplos.

Ejemplo-10

(a) Preparación de (3-trifluorometilsulfonil)-N-[4-metil-3-nitrofenil]-benzamida (fórmula (III)):

Una solución de 336 gr (6 moles) de hidróxido de potasio en 1040 ml de agua se añadió lentamente a una suspensión de 22,8 gr (0,15 moles) de 4-metil-3-nitroanilina de fórmula (II) y 163,5 gr (0,6 moles) de cloruro de (3-trifluorometilsulfonil)benzoilo de fórmula (VI) en 380 ml de cloroformo a 30 a 40°C durante 3 a 4 horas. A continuación la capa de cloroformo se separó y se lavó con agua. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y el disolvente se eliminó a vacío para obtener el compuesto de fórmula (III). Se añadieron 180 ml de éter isopropílico al residuo y se filtró.

Rendimiento : 42 gr (90,6%)

Pureza : 98,5% (mediante HPLC)

El IR y el RMN fueron coincidentes con la estructura propuesta.

(b) Preparación de la (3-trifluorometilsulfonil)-N-[3-amino-4-metilfenil]-benzamida (fórmula (IV)):

Una suspensión de 42,6 gr (0,11 moles) de (3-trifluorometilsulfonil)-N-[4-metil-3-nitrofenil]-benzamida de fórmula (III) obtenida de la etapa (a) en 100 ml ácido clorhídrico conc. se añadió lentamente a una solución de 145,9 gr (0,65 moles) de cloruro estannoso en 390 ml ácido clorhídrico conc. de 0 a 5°C durante un período de 30 minutos. El grueso de la reacción se llevó a temperatura ambiente y se mantuvo durante 2 horas. Se añadió lentamente una solución acuosa de hidróxido de sodio al 50% al grueso de la reacción de 30 a 40°C, el producto se extrajo en cloroformo (2 x 500 ml), se lavó con agua (2 x 500 ml). A la capa de cloroformo se le proporcionó un tratamiento con carbón activado (4 gr), se filtró y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se eliminó mediante destilación y el residuo se disolvió en 250 ml de acetona tratada con hidrócloruro de alcohol isopropílico y se agitó a temperatura ambiente durante 3 a 4 horas. La sal hidrócloruro de fórmula (IV) se filtró y se lavó con acetona secada a 50-60°C a vacío.

Rendimiento: 25 gr (61%)

El IR y el RMN fueron coincidentes con la estructura propuesta.

(c) Preparación de (3-trifluorometilsulfonil)-N-[3-guanidino-4-metilfenil]-benzamida HCl (fórmula (V)):

Una solución de 2,2 gr (0,52 moles) de cianamida en 2 ml agua se añadió a una suspensión de 10,25 gr (0,026 moles) de (3-trifluorometilsulfonil)-N-[3-amino-4-metilfenil]-benzamida de fórmula (IV) obtenida a partir de la etapa b en 65 ml de n-butanol a 90°C durante 10 minutos. La reacción se mantuvo a 90-92°C durante 1 hora y se filtró. Se secó a 60-70°C a vacío.

Rendimiento: 6,1 gr (61 %)

El IR y el RMN fueron coincidentes con la estructura propuesta.

(d) Preparación de (3-trifluorometilsulfonil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3il-pirimidin-2ilamino)-fenil]-benzamida (fórmula (I)):

Una mezcla de 7,8 gr (0,018 moles) de hidrócloruro de (3-trifluorometilsulfonil)-N-[3-guanidino-4-metilfenil]-benzamida de fórmula (V) de la etapa (c) 3,1 gr (0,018 moles) de 3-dimetilamino-1-piridin-3-il-propenona (fórmula VII) y 0,7 gr (0,018 moles) de escamas de hidróxido de sodio en 60 ml n-butanol se calentó a 110°C durante 7 horas. El disolvente se eliminó mediante destilación y el residuo se trató con 75 ml de agua y se filtró. El compuesto filtrado

se disolvió en 75 ml de cloroformo y se proporcionó un tratamiento con carbono. la capa de cloroformo se lavó con una solución de hidrosulfito de sodio al 5% (50 ml) y a continuación con agua. El disolvente se eliminó mediante destilación y el compuesto de fórmula (I) se precipitó añadiendo una mezcla de 10 ml de cloroformo y 50 ml de acetato de etilo al residuo. El sólido se filtró y se lavó con acetato de etilo, se secó a 50-60°C a vacío.

5 Rendimiento : 5 gr (56%)

MR: 214-218°C

El IR y el RMN fueron coincidentes con la estructura propuesta.

10 Se encontró que el compuesto de fórmula era un agente antitumoral útil según se evidenció mediante todos los ensayos biológicos.

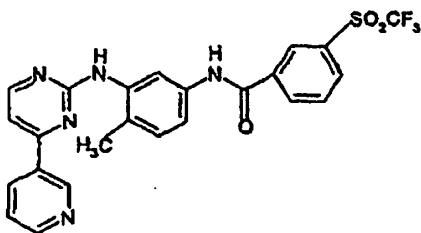
15 Según se utiliza en la presente memoria, el término "alrededor de" hace referencia a la variación en una cantidad o intervalo que es convencional para el campo de la química orgánica, por ejemplo, la variación típica que se produce en las temperaturas o los tiempos medidos en situaciones en el mundo real en el laboratorio de química orgánica, con el aumento a escala, o en la instalación de producción, o al evaluar los agentes anti-proliferativos. Cualquier intervalo o cantidad utilizados en la descripción de la presente invención que estén modificados por el término "alrededor de" son también a parte de la invención si no están modificados por el término alrededor de. Por ejemplo, la mención de "alrededor de 10 a alrededor de 20" también incluye mención de "10 a 20".

20 Se debe observar que, según se utiliza en esta memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen los referentes en plural a no ser que el contenido dicte claramente lo contrario. De este modo, por ejemplo, la referencia a una composición que contiene "un compuesto" incluye una mezcla de dos o más compuestos. También se debe observar que el término "o" se emplea generalmente en su sentido incluyendo "y/o" a no ser que el contenido dicte claramente lo contrario.

25 Todas las publicaciones y solicitudes de patente en esta memoria son indicativas del nivel de conocimiento práctico normal en la técnica a la que pertenece esta invención.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):



Fórmula (I) (Código de desarrollo AN-024)

para su uso en el tratamiento del cáncer de mama, el glioma o la angiogénesis.

2. El uso de un compuesto de fórmula (I), como se define en la reivindicación 1, en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento del cáncer de mama, el glioma o la angiogénesis.

3. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), como se define en la reivindicación 1, y un excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento del cáncer de mama, el glioma o la angiogénesis.

FIG. 1

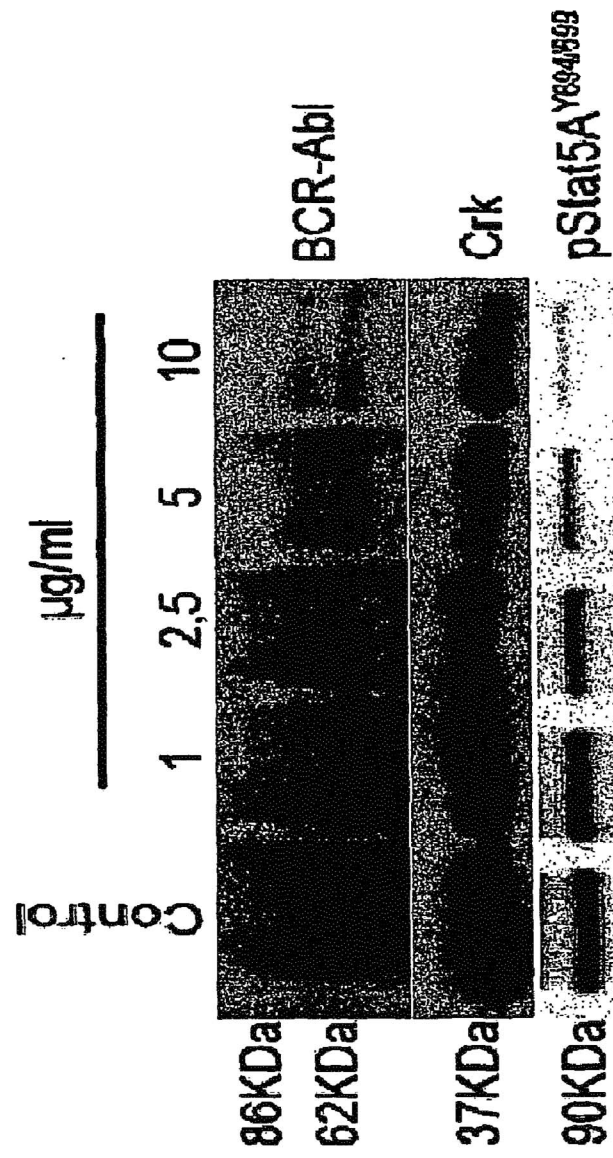


FIG. 2

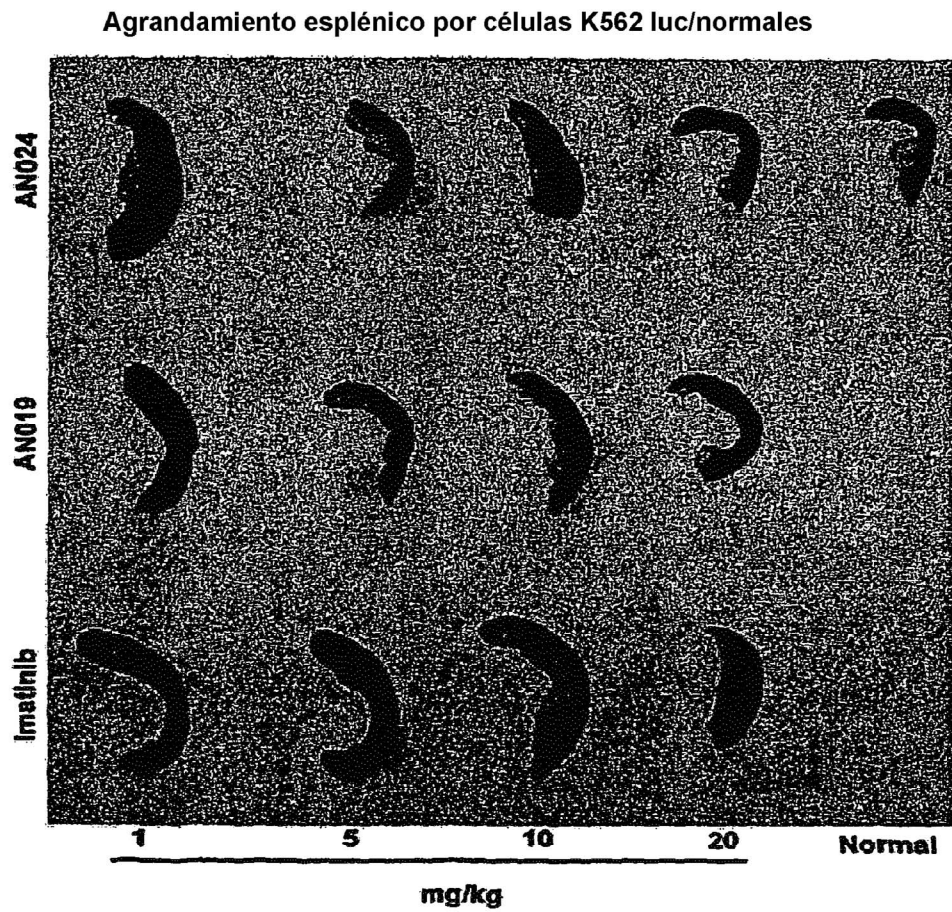


FIG. 3A

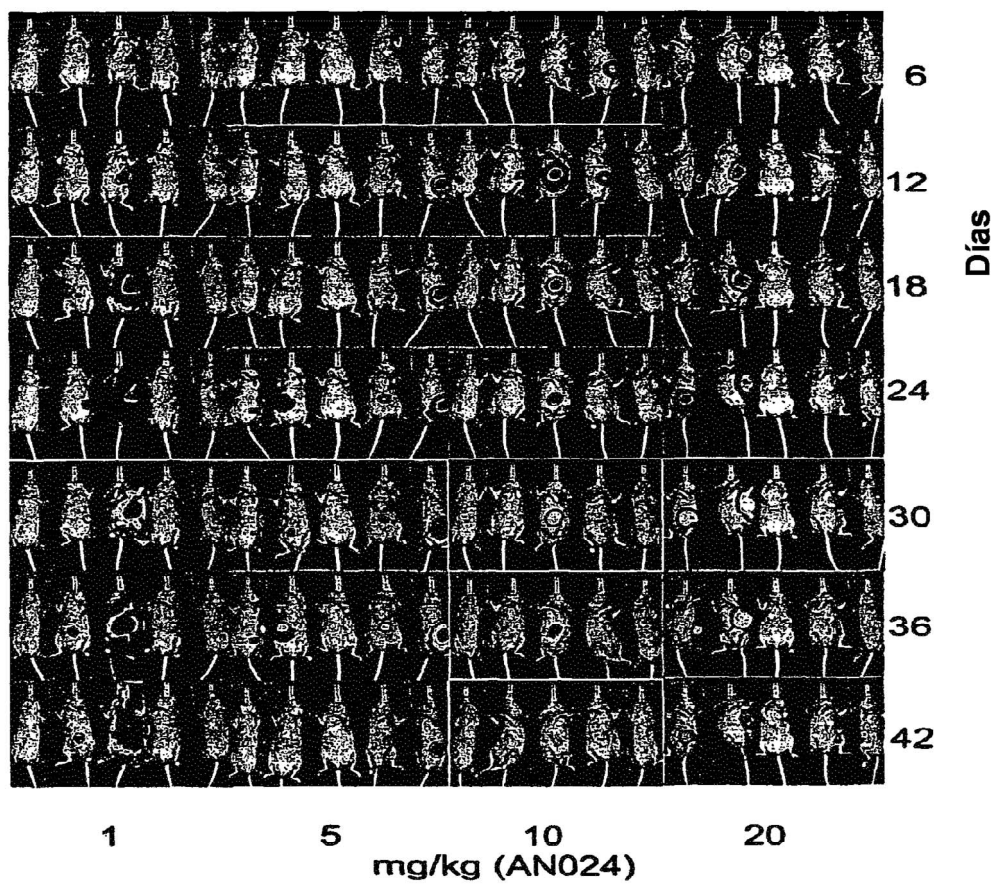
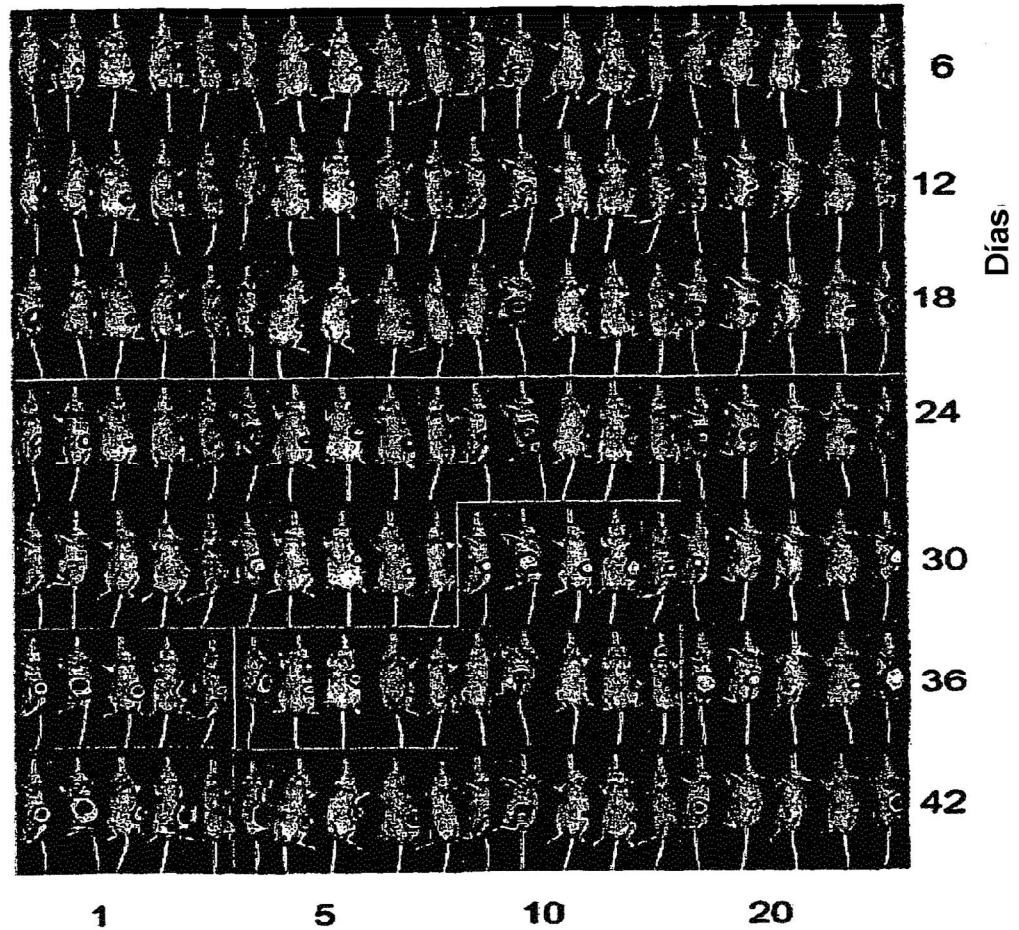


FIG. 3B



mg/kg (Imatinib)
 Figura 8. La figura muestra la intensidad de expresión de luciferasa de células K562 luc implantadas en ratones carentes de sistema inmunitario seguido de tratamiento oral de Imatinib.

FIG. 4A

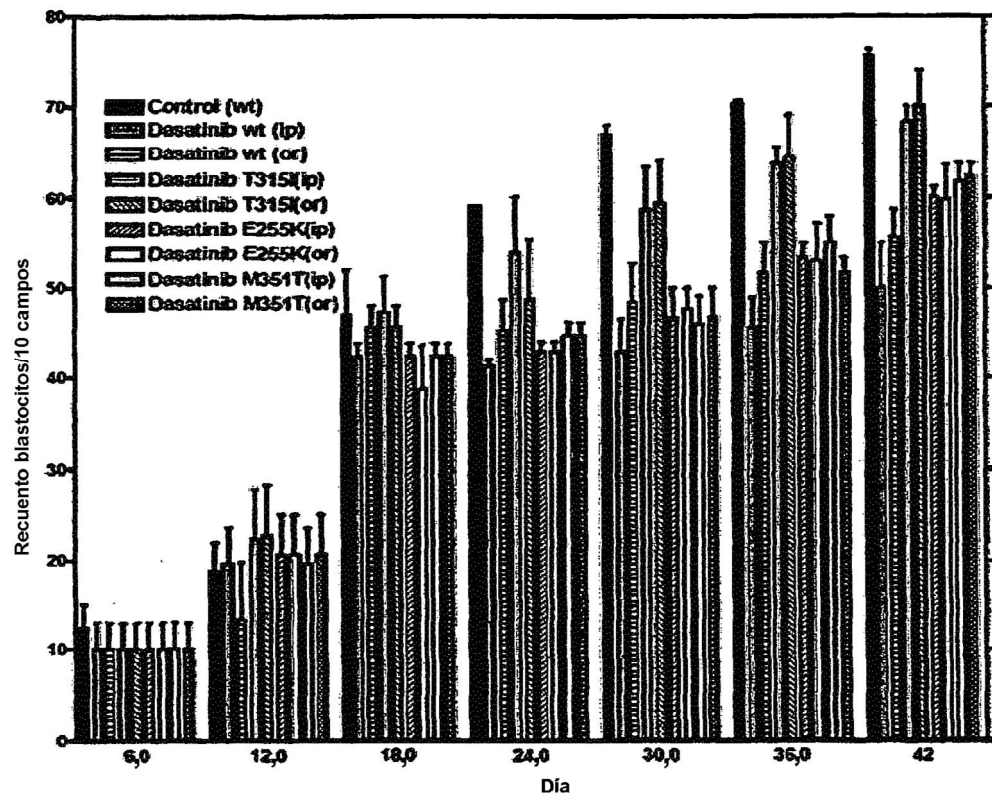


FIG. 4B

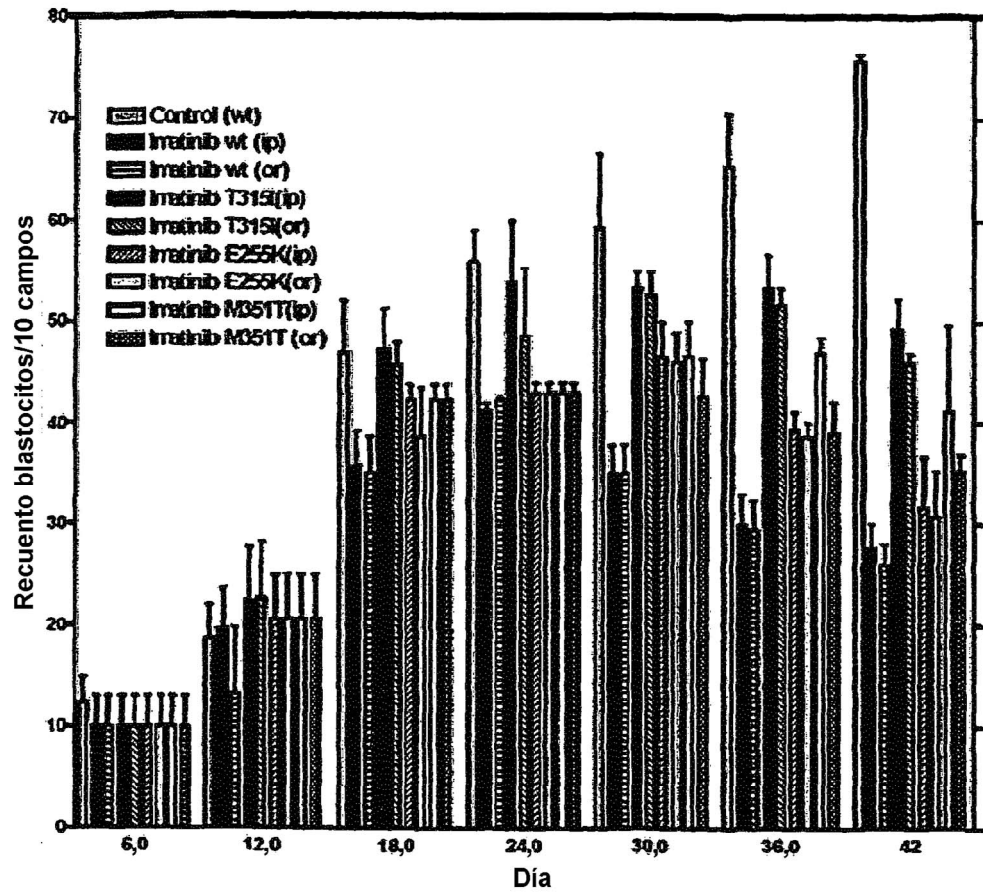


FIG. 4C

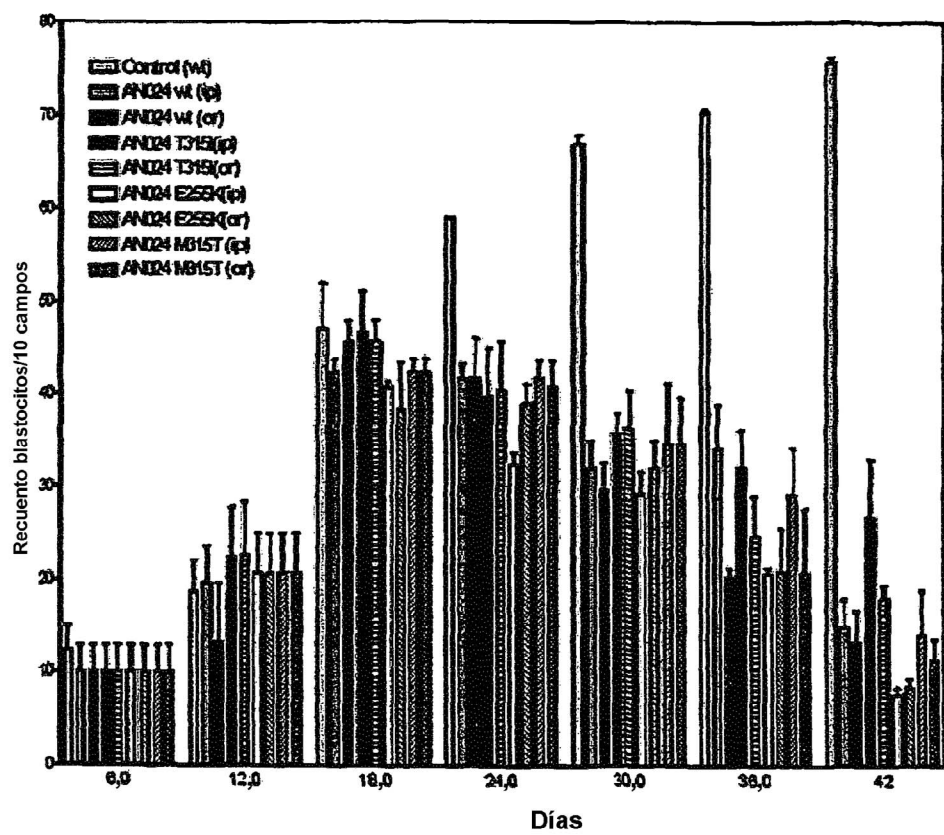
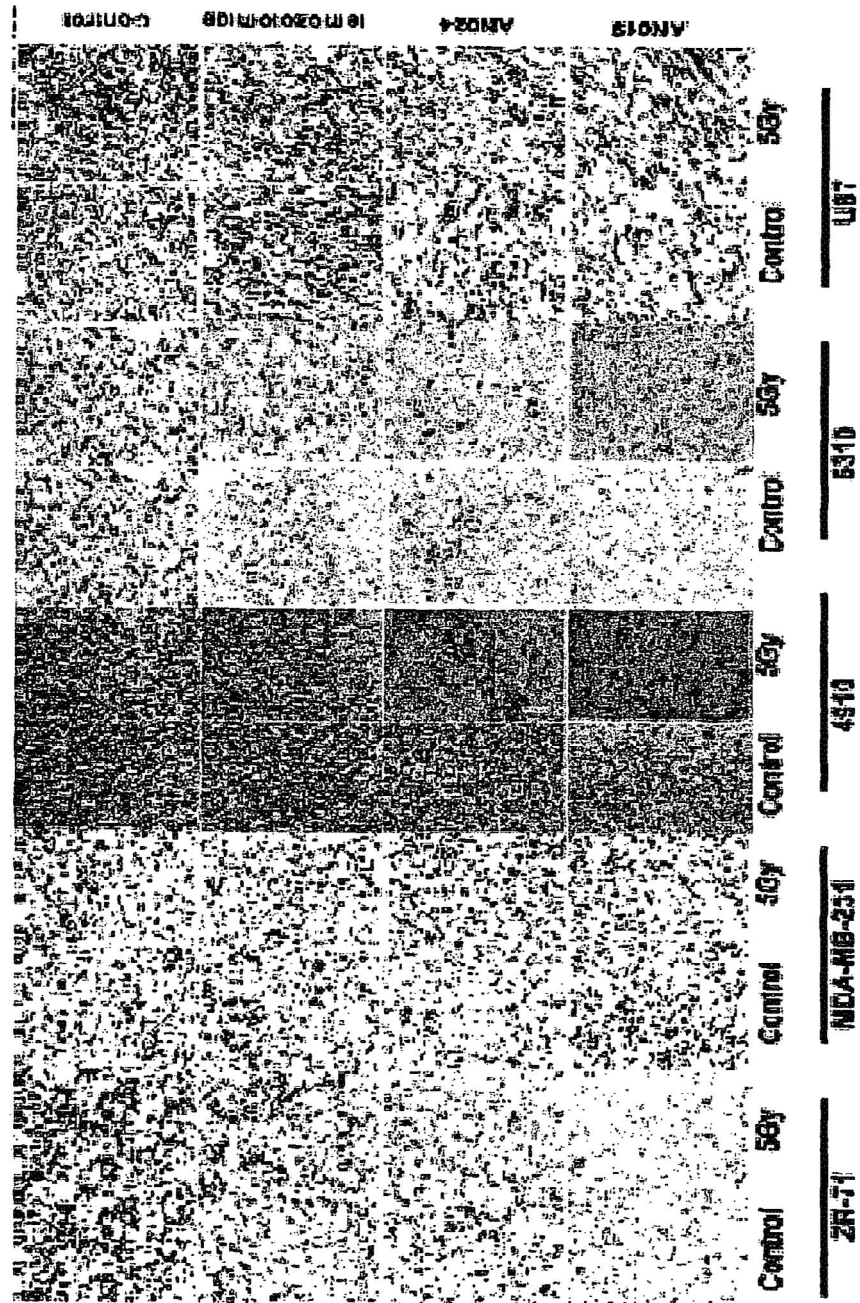


FIG. 5A



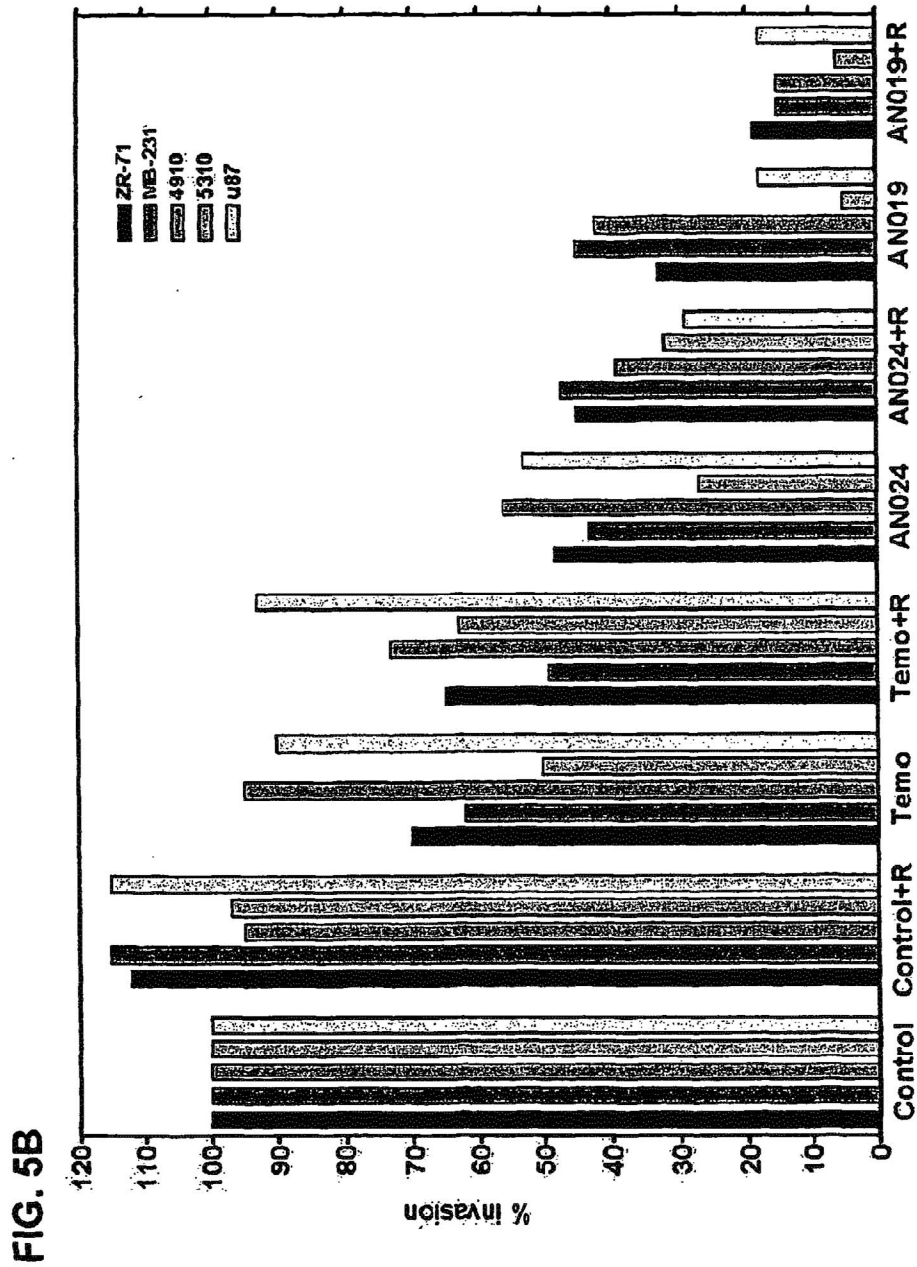


FIG. 5C

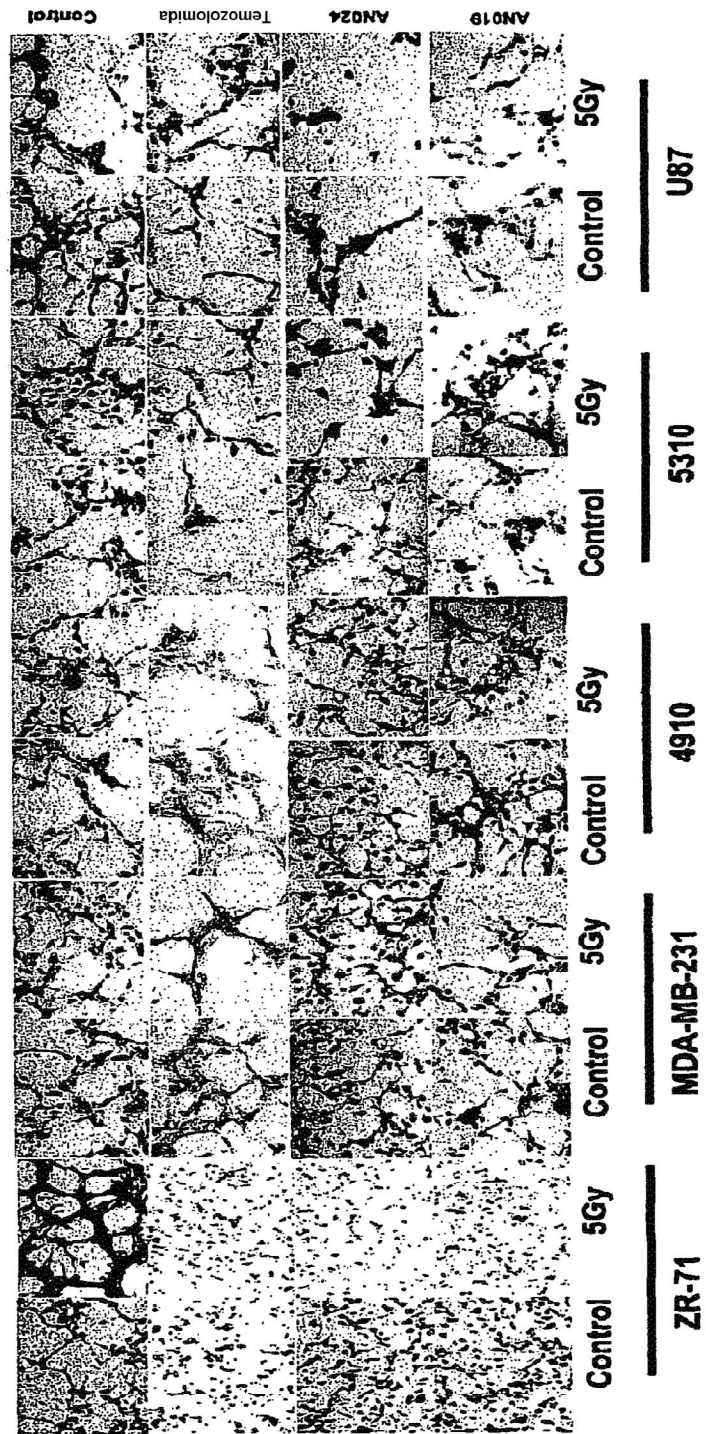


FIG. 5D

Análisis de transferencia Western

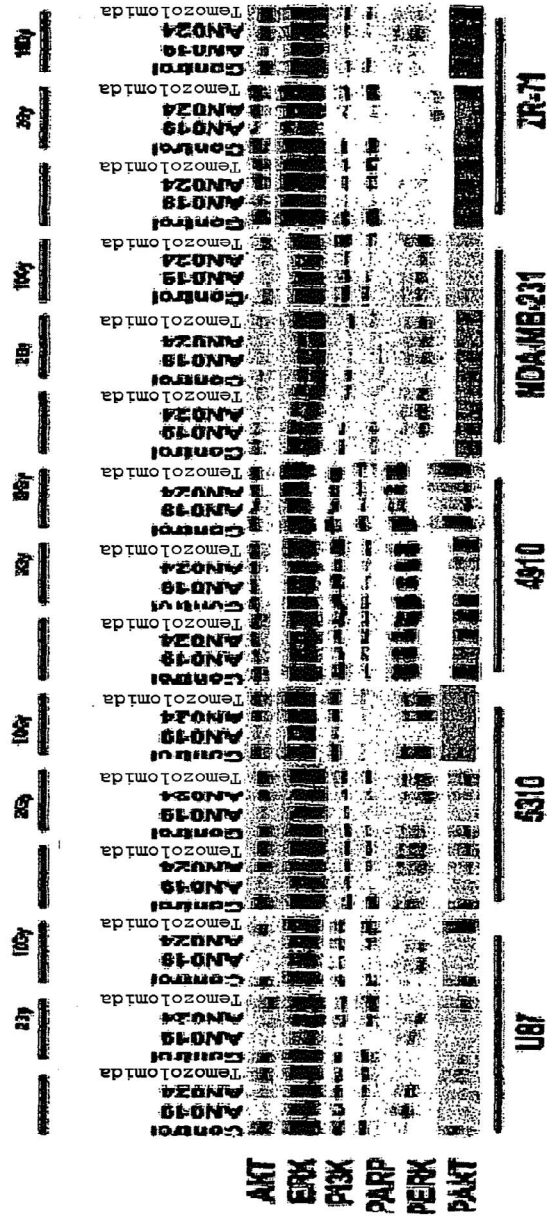


FIG. 6A

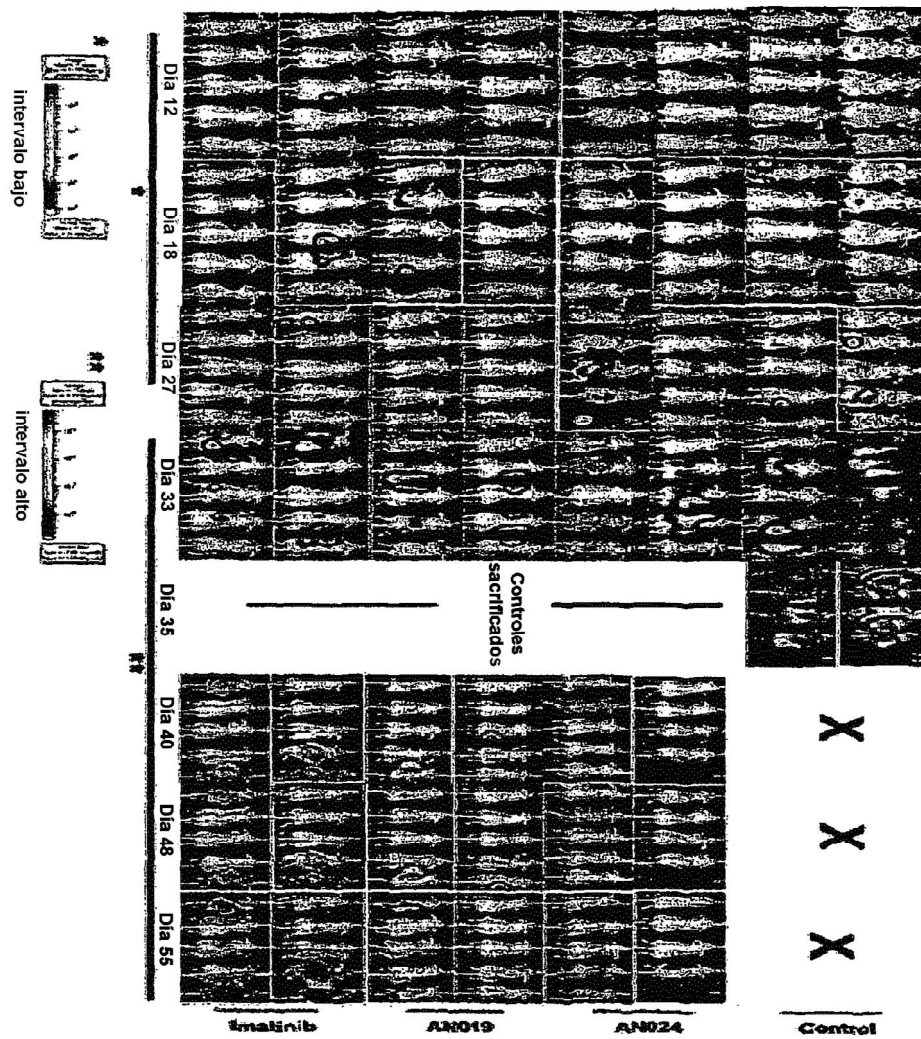


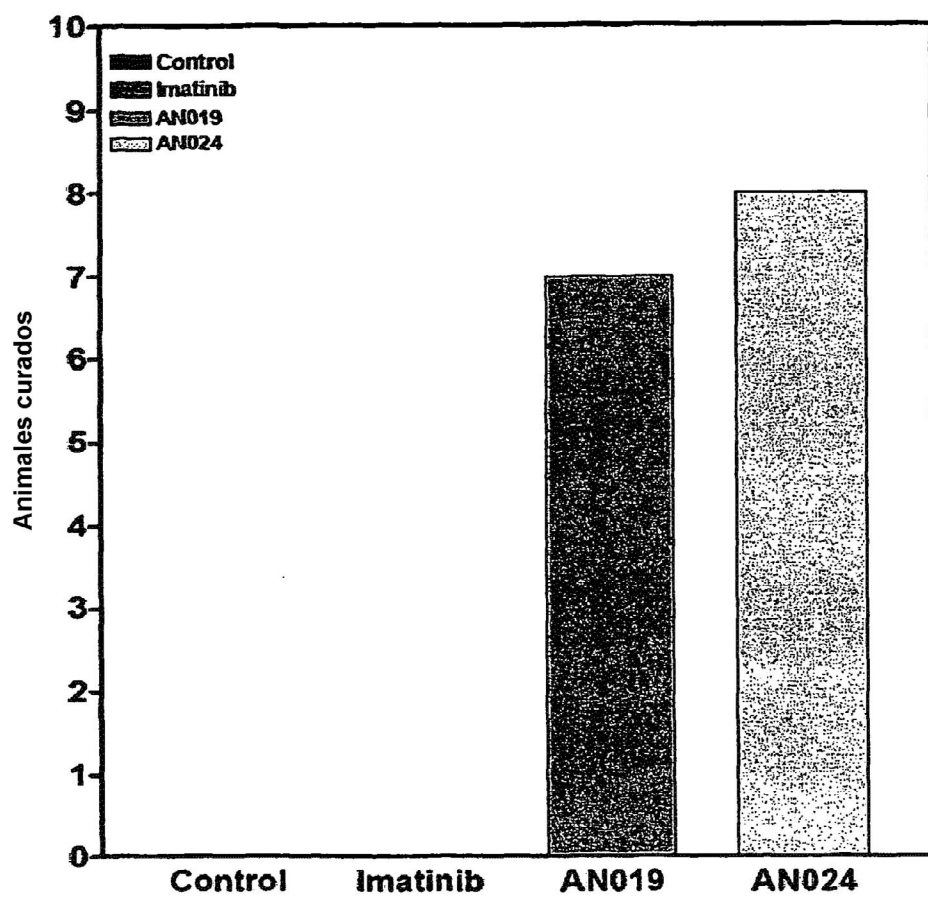
FIG. 6B

FIG. 6C

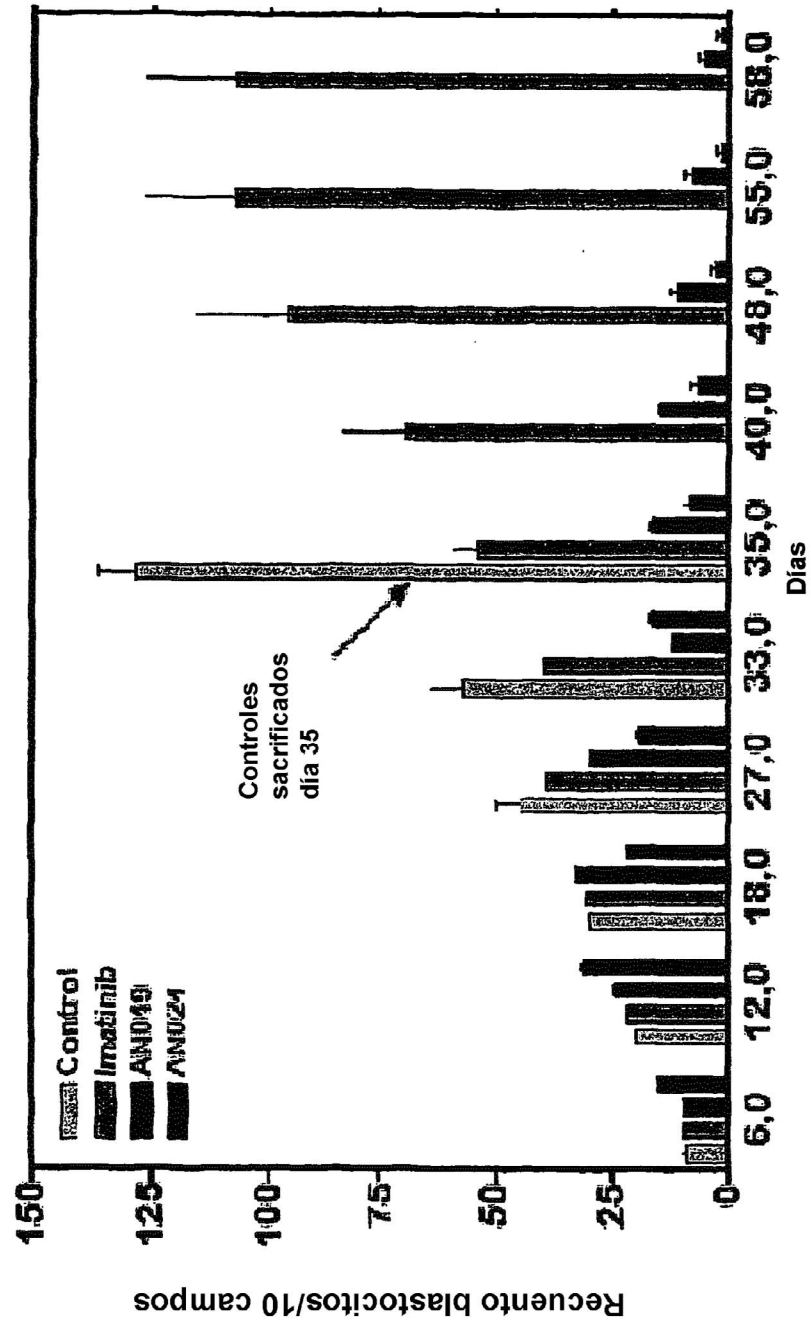


FIG. 7A

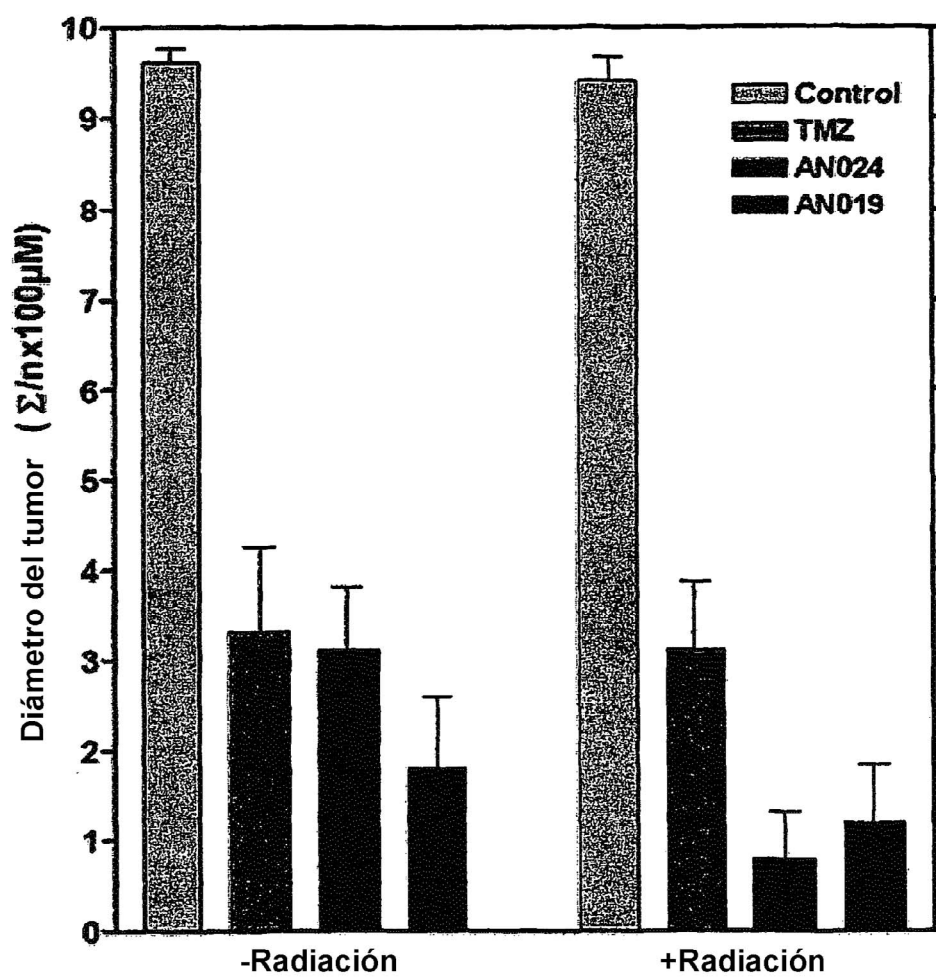


FIG. 7B

