

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 693**

51 Int. Cl.:

C07D 513/04 (2006.01)

A61K 31/433 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09756109 .6**

96 Fecha de presentación: **18.11.2009**

97 Número de publicación de la solicitud: **2365977**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.09.2011**

54

Título: **Un derivado de triazolotiadiazol como inhibidor de la proteína-quinasa c-Met**

30

Prioridad:

19.11.2008 US 116033 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:

27.12.2012

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:

27.12.2012

73

Titular/es:

**VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED
(100.0%)
130 Waverly Street
Cambridge, MA 02139, US**

72

Inventor/es:

**LAUFFER, DAVID;
LI, PAN;
SHANNON, DEAN y
LIANG, JIANGLIN**

74

Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 393 693 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

Un derivado de triazolotiadiazol como inhibidor de la proteína-quinasa c-Met.

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere a inhibidores selectivos de c-Met. La invención proporciona también composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden un inhibidor de c-Met y métodos de utilización de las composiciones en el tratamiento de diversos trastornos proliferativos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 El factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF), conocido también como factor de dispersión, es un factor multifuncional de crecimiento que aumenta la transformación y el desarrollo de tumores por inducción de mitogénesis y motilidad celular. Adicionalmente, HGF promueve metástasis por estimulación de la motilidad celular e invasión a través de diversos caminos de señalización. Con objeto de producir efectos celulares, HGF tiene que fijarse a su receptor, c-Met una tirosina-quinasa receptora. c-Met, una proteína heterodímera ampliamente expresada que comprende una subunidad α de 50 kilodaltons (kDa) y una subunidad alfa de 145 kDa (Maggiora et al., J. Cell. Physiol., 173: 183-186, 1997), está sobreexpresada en un porcentaje importante de cánceres humanos y se amplifica durante la transición entre los tumores primarios y las metástasis. Los diversos cánceres en los cuales está implicada la sobreexpresión de c-Met incluyen, pero sin carácter limitante, adenocarcinoma gástrico, cáncer renal, carcinoma de pulmón microcítico, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de cerebro, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, y cáncer de mama. c-Met está implicada también en la aterosclerosis y la fibrosis pulmonar.

20 Se ha reconocido recientemente que la prolongación del intervalo QT cardiaco inducida por fármacos causa efectos secundarios adversos o fatales en muchas situaciones clínicas. El canal cardiaco de potasio hERG (gen humano relacionado con el éter- α -go-go) codifica la subunidad α del componente rápido de la corriente rectificadora tardía I_{Kr} en el corazón, que contribuye notablemente a la repolarización terminal en los miocitos ventriculares humanos. Véase Dennis et al., Biochemical Society Transactions 35(5): 1060-1063 (2007). Se ha demostrado que la inhibición del canal de potasio hERG puede conducir a una prolongación del intervalo QT, considerado ampliamente como un factor de riesgo crítico para la arritmia de "torsades de pointes" (TdP). Así pues, la superación de la fijación de hERG se ha convertido en un escollo fundamental en el desarrollo de fármacos.

30 Además del conocimiento de la posibilidad de la prolongación de QT inducida por fármacos, el metabolismo de los agentes farmacológicos por la actividad de citocromo P450 es también importante, particularmente en terapias que pueden implicar una combinación de tales agentes. Las enzimas del citocromo P450 catalizan la oxidación de muchos compuestos terapéuticos y tienen un papel importante en la extensión y duración de los efectos de los fármacos, por catabolizar los fármacos a metabolitos inactivos o por bio-activación de profármacos a sus formas activas. Los agentes anti-cáncer exhiben una gran variación de respuesta entre individuos, debido en parte a variabilidad farmacocinética. Véase Scipture et al., Lancet Oncology 6:780-789 (2005). El sitio más importante de metabolismo mediado por el citocromo P450 es el hígado, donde estas enzimas están expresadas ubicuamente. Existen también pruebas de que tiene lugar metabolismo en los tumores y que la presencia de estas enzimas en los tumores puede tener efecto deseable o adverso sobre la eficacia de los agentes quimioterapéuticos, dependiendo de la isoforma presente y el agente citotóxico administrado. Así, el desarrollo de agentes antitumorales que tengan perfiles favorables de metabolismo de los fármacos es también una meta en el descubrimiento de fármacos. WO 2007/064797 se refiere a triazolotiadiazoles, triazolopiridazinas, y triazolotiadiazinas útiles como inhibidores de la tirosina-quinasa c-Met, composiciones de los mismos, y el uso de estas composiciones en el tratamiento de trastornos proliferativos.

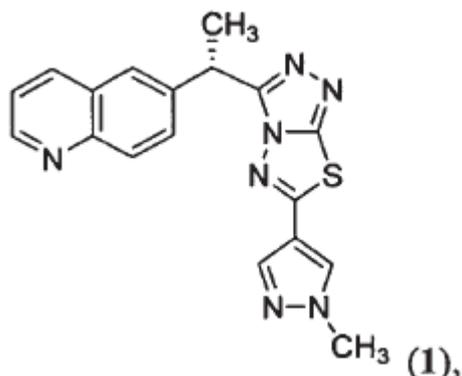
40 WO 2007/138472 se refiere a derivados de triazolopiridazina útiles como inhibidores de la tirosina-quinasa c-Met, composiciones de los mismos, y al uso de estas composiciones en el tratamiento del crecimiento celular anormal.

45 De acuerdo con ello, existe una gran necesidad de desarrollar compuestos útiles como inhibidores del receptor de la proteína-quinasa c-Met. En particular, los compuestos preferidos deberían tener afinidad alta para el receptor de c-Met y exhibir actividad funcional como antagonistas, mostrando al mismo tiempo poca afinidad para otros receptores de quinasas. Adicionalmente, es deseable proporcionar antagonistas del receptor de c-Met que tengan poca o ninguna fijación de hERG y perfiles farmacocinéticos/farmacodinámicos favorables.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

50 Se ha encontrado que la 6-((S)-1-(6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazol-3-il)etil)quinolina (compuesto **1**) y composiciones farmacéuticamente aceptables de la misma son eficaces en la inhibición de c-Met. En particular, el compuesto **1** inhibe selectivamente la actividad de c-Met en ensayos biológicos, tales como, por ejemplo, la inhibición de la actividad de c-Met en células que se sabe sobreexpresan este receptor. Adicionalmente, el compuesto **1** ha exhibido una actividad mínima del canal de potasio asociado con hERG. Además, el compuesto **1** tiene propiedades farmacocinéticas adecuadas, como se evidencia por su comportamiento en modelos animales y en ensayos *in vitro*, particularmente en estudios de metabolismo que implican isozimas del citocromo P450.

De acuerdo con ello, la invención caracteriza el compuesto siguiente:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La invención proporciona también una forma cristalina del compuesto 1.

- 5 La invención proporciona también composiciones farmacéuticas que incluyen el compuesto 1, en cualquier forma, y un portador, adyuvante, o vehículo farmacéuticamente aceptable. Adicionalmente, la invención proporciona métodos de tratamiento o alivio de la gravedad de una enfermedad, afección, o trastorno proliferativo en un paciente que incluye el paso de administrar al paciente una dosis terapéuticamente eficaz de compuesto 1, o una composición farmacéutica del mismo.

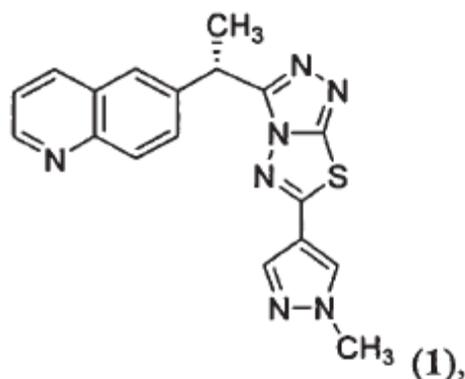
10 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCÓN

Definiciones y Terminología General

- 15 Como se utiliza en esta memoria, se aplicarán las definiciones siguientes a no ser que se indique otra cosa. Para los propósitos de esta invención, los elementos químicos se identifican de acuerdo con la Tabla Periódica de los Elementos, Versión CAS, y el Handbook of Chemistry and Physics, 75th Ed. 1994. Adicionalmente, principios generales de Química Orgánica se describen en "Organic Chemistry," Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, y "March's Advanced Organic Chemistry," 5th Ed., Smith, M.B. y March, J., eds. John Wiley & Sons, New York: 2001.

Descripción del Compuesto de la Invención

En un primer aspecto, la invención caracteriza el compuesto siguiente:



20

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 25 En otro aspecto, la invención caracteriza una forma cristalina del compuesto 1. En una realización, el compuesto cristalino 1 se caracteriza por uno o más de los picos siguientes a 20°C en un patrón de difracción de rayos X (escala 2-theta): desde 6,2 a 6,4 (v.g., aproximadamente 6,3), 9,1 a 9,3 (v.g., aproximadamente 9,2), 11,4 a 11,6 (v.g., aproximadamente 11,5), 13,2 a 13,4 (v.g., aproximadamente 13,3), 13,7 a 13,9 (v.g., aproximadamente 13,8), 14,1 a 14,3 (v.g., aproximadamente 14,2), 14,7 a 14,9 (v.g., aproximadamente

14,8), 16,1 a 16,3 (v.g., aproximadamente 16,2), 18,1 a 18,3 (v.g., aproximadamente 18,2), 18,6 a 18,8 (v.g., aproximadamente 18,7), y 19,7 a 19,9 (v.g., aproximadamente 19,8).

Composiciones, Formulaciones, y Administración de los Compuestos de la Invención

5 En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende compuesto **1** o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la cantidad de compuesto en una composición de esta invención es tal que es eficaz para inhibir de manera que puede medirse c-Met en una muestra biológica o en un paciente. Preferiblemente, la composición de esta invención está formulada para administración a un paciente que se encuentra en necesidad de dicha composición. Muy preferiblemente, la composición de esta invención está formulada para administración oral a un
10 paciente.

El término "paciente", como se utiliza en esta memoria, significa un animal, preferiblemente un mamífero, y muy preferiblemente un humano.

15 Se apreciará también que el compuesto **1** puede existir en forma libre para tratamiento, o en caso apropiado, como una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. De acuerdo con la presente invención, una sal farmacéuticamente aceptable incluye, pero sin carácter limitante, sales, ésteres, sales de tales ésteres, o cualquier otro aducto o sal farmacéuticamente aceptable que, después de administración a un paciente que se encuentra en necesidad de ello, es capaz de proporcionar, directa o indirectamente, el compuesto **1** como se describe de otro modo en esta memoria, o un metabolito o residuo del mismo.

20 Como se utiliza en esta memoria, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" hace referencia a aquellas sales que son, dentro del alcance de un criterio médico razonable, adecuadas para uso en contacto con los tejidos de los humanos y animales inferiores sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica y análogas excesivas.

25 Sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, S.M. Berge et al., describen en detalle sales farmacéuticamente aceptables en J. Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19, 1977. Las sales farmacéuticamente aceptables del compuesto **1** incluyen las derivadas de ácidos y bases inorgánicos y orgánicos adecuados. Ejemplos de sales de adición de ácido no tóxicas farmacéuticamente aceptables son sales de un grupo amino formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido perclórico o con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido oxálico, ácido maleico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico o ácido malónico, o por utilización de otros métodos empleados en la técnica tales como intercambio iónico. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen adipato, alginato, ascorbato,
30 aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, canforato, canfosulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, formiato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, gluconato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hidroyoduro, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, p-toluenosulfonato, undecanoato, valerato, y análogos. Sales derivadas de bases apropiadas incluyen sales de metal alcalino, metal alcalinotérreo, amonio y N^+ (C_{1-4} alquilo)₄.

40 Como se ha descrito arriba, las composiciones farmacéuticamente aceptables de la presente invención comprenden adicionalmente un portador, adyuvante, o vehículo farmacéuticamente aceptable que, como se utiliza en esta memoria, incluye cualquiera y la totalidad de disolventes, diluyentes, u otros vehículos líquidos, adyuvantes de dispersión o suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, aglomerantes sólidos, lubricantes y análogos, según sean adecuados para la forma de presentación particular deseada. En Remington: The Science and Practice of Pharmacy, edición 21^a, 2005, ed. D.B. Troy, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, y Enciclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick y J. C. Boilan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York, se describen diversos portadores utilizados en la formulación de composiciones farmacéuticamente aceptables y técnicas conocidas para la preparación de las mismas. Excepto en la medida en que cualquier medio portador convencional sea incompatible con el compuesto **1**, por ejemplo por producir un efecto biológico indeseable o interactuar de algún otro modo de manera deletérea con cualquier o cualesquiera otros componentes de la composición farmacéuticamente aceptable, se contempla que su
50 uso está dentro del alcance de la invención.

Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin carácter limitante, cambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, seroproteínas, tales como seroalbúmina humana, sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, o sorbato de potasio, mixturas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrólitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinil-pirrolidona, poliacrilatos, ceras, polímeros de bloques polietileno-polioxipropileno, lanolina, azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados tales como carboximetil-celulosa sódica, etil-celulosa y acetato de celulosa;

tragacanto pulverizado; malta, gelatina, talco, excipientes tales como manteca de cacao y ceras de supositorios; aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de algodón; aceite de cártamo; aceite de sésamo; aceite de oliva; aceite de maíz y aceite de soja; glicoles; tales como un propilenglicol o polietilenglicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tampón tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua exenta de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico, y soluciones tampón de fosfato, así como otros lubricantes compatibles no tóxicos tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de desprendimiento, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, saborizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes pueden estar presentes también en la composición de acuerdo con el criterio del formulador.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse por vía oral, parenteral, por pulverización de inhalación, o por vías tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o por un depósito implantado. El término "parenteral" como se utiliza en esta memoria incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intra-sinovial, intraesternal, intratecal, intraocular, intrahepática, intralesional e intracraneal. Preferiblemente, las composiciones se administran por vía oral, intraperitoneal o intravenosa. Formas inyectables estériles de las composiciones de esta invención pueden ser suspensiones acuosas u oleaginosas. Estas suspensiones pueden formularse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica que utilizan agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentran agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, se emplean convencionalmente aceites fijos como disolvente o medio de suspensión.

Para este propósito, puede emplearse cualquier aceite fijo no irritante con inclusión de mono- o diglicéridos sintéticos. Ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados glicéridos son útiles en la preparación de inyectables, como lo son aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones de aceite pueden contener también un alcohol de cadena larga como diluyente o dispersante, tal como carboximetil-celulosa o agentes dispersantes similares que se utilizan comúnmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables que incluyen emulsiones y suspensiones. Otros agentes tensioactivos utilizados comúnmente, tales como Tweens, Spans y otros agentes emulsionantes o mejoradores de la biodisponibilidad que se utilizan comúnmente en la fabricación de formas de dosificación sólidas, líquidas u otras farmacéuticamente aceptables pueden utilizarse también para los propósitos de formulación.

Las composiciones farmacéuticamente aceptables de esta invención pueden administrarse por vía oral en cualquier dosis oralmente aceptable que incluye, pero sin carácter limitante, cápsulas, tabletas, suspensiones acuosas o soluciones. En el caso de las tabletas para uso oral, portadores utilizados comúnmente incluyen lactosa y almidón de maíz. Se añaden también típicamente agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para administración oral en forma de cápsula, ingredientes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se requieren suspensiones acuosas para uso oral, el ingrediente activo se combina con agentes emulsionantes y agentes de suspensión. En caso deseado, pueden añadirse también ciertos agentes edulcorantes, saborizantes o colorantes.

Alternativamente, las composiciones farmacéuticamente aceptables de esta invención se pueden administrar en la forma de supositorios para administración rectal. Éstos pueden prepararse por mezcla del agente con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a la temperatura ambiente pero líquido a la temperatura rectal y por consiguiente fundirá en el recto para liberar el fármaco. Tales materiales incluyen manteca de cacao, cera de abejas y polietilenglicoles.

Las composiciones farmacéuticamente aceptables de esta invención pueden administrarse también tópicamente, en especial cuando la diana de tratamiento incluye áreas u órganos fácilmente accesibles por aplicación tópica, con inclusión de enfermedades de los ojos, la piel, o el tracto intestinal inferior. Formulaciones tópicas adecuadas se preparan fácilmente para cada una de estas áreas u órganos.

La aplicación tópica para el tracto intestinal inferior puede efectuarse en una formulación de supositorio rectal (véase arriba) o en una formulación de enema adecuada. También pueden utilizarse parches transdérmicos tópicos.

Para aplicaciones tópicas, las composiciones farmacéuticamente aceptables pueden formularse en un ungüento adecuado que contenga el componente activo suspendido o disuelto en uno o más portadores. Portadores para administración tópica del compuesto 1 incluyen, pero sin carácter limitante, aceite mineral, petrolatum líquido, petrolatum blanco, propilenglicol, polioxietileno, compuestos de polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, las composiciones farmacéuticamente aceptables pueden formularse en una loción o crema adecuada que contenga los componentes activos suspendidos o disueltos en uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Portadores adecuados incluyen, pero sin carácter limitante, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

Para uso oftálmico, las composiciones farmacéuticamente aceptables pueden formularse, v.g., como suspensiones micronizadas en solución salina estéril isotónica ajustada en pH u otra solución acuosa, o, preferiblemente, como soluciones en solución salina estéril ajustada en pH isotónica u otra solución acuosa, sea con o sin un conservante tal como cloruro de benzalconio. Alternativamente, para usos oftálmicos, las composiciones farmacéuticamente aceptables pueden formularse en un ungüento tal como petrolatum. Las composiciones farmacéuticamente aceptables de esta invención pueden administrarse también por aerosol nasal o inhalación. Tales composiciones se preparan de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica y se pueden preparar como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de absorción para mejorar la biodisponibilidad, fluorocarbonos, y/u otros agentes convencionales solubilizantes o dispersantes.

Muy preferiblemente, las composiciones farmacéuticamente aceptables de esta invención se formulan para administración oral.

Formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen, pero sin carácter limitante, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes utilizados comúnmente en la técnica tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceites de algodón, cacahuete, maíz, germen de trigo, oliva, ricino, y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mixturas de los mismos. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales pueden incluir también adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, saborizantes, y perfumantes.

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles se pueden formular de acuerdo con la técnica conocida utilizando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril puede ser también una solución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentran agua, solución de Ringer, U.S.P. y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, se emplean convencionalmente aceites estériles fijos como disolvente o medio de suspensión. Para este propósito se puede emplear cualquier aceite fijo no irritante con inclusión de mono- o diglicéridos sintéticos. Adicionalmente, se utilizan en la preparación de inyectables ácidos grasos tales como ácido oleico.

Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, por filtración a través de un filtro que retenga las bacterias, o por incorporación de agentes esterilizantes en la forma de composiciones estériles sólidas que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su utilización.

Con objeto de prolongar el efecto del compuesto **1**, a menudo es deseable ralentizar la absorción de este compuesto por inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede realizarse por el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con baja solubilidad en agua. La velocidad de absorción del compuesto **1** depende entonces de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño de los cristales y la forma cristalina. Alternativamente, la disolución o suspensión del compuesto **1** en un vehículo aceitoso conduce a la absorción retardada de una forma del compuesto administrada por vía parenteral. Formas inyectables de depósito se obtienen por formación de matrices de microencapsulación del compuesto **1** en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la ratio de compuesto a polímero y la naturaleza del polímero particular empleado, la velocidad de liberación del compuesto puede controlarse. Ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Se preparan también formulaciones inyectables de tipo depósito por atrapamiento del compuesto **1** en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los tejidos corporales.

Las composiciones para administración rectal o vaginal son preferiblemente supositorios que se pueden preparar por mezcla de compuesto **1** con excipientes o portadores no irritantes adecuados tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera de supositorios que son sólidos a la temperatura ambiente pero líquidos a la temperatura del cuerpo y por consiguiente fundirán en el recto o la cavidad vaginal y liberarán el compuesto activo.

Formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen cápsulas, tabletas, píldoras, polvos, y gránulos. En tales formas de dosificación sólidas, el compuesto activo está mezclado con al menos un excipiente o portador inerte farmacéuticamente aceptable tal como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o a) cargas o extendedores tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y ácido silícico; b) aglomerantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa, y goma arábiga; c) humectantes tales como glicerol; d) agentes desintegrantes tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos, y carbonato de sodio; e) agentes retardantes de la disolución tales como parafina; f) aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario; g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; h) absorbentes tales como caolín y arcilla bentonítica, e i) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril-sulfato de

sodio, y mixturas de los mismos. En el caso de cápsulas, tabletas y píldoras, la forma de dosificación puede comprender también agentes tampón.

5 Pueden emplearse también composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina con relleno blando y duro utilizando excipientes tales como lactosa o azúcar de leche así como polietilen-glicoles de peso molecular alto y análogos. Las formas de dosificación sólidas de tabletas, grageas, cápsulas, píldoras, y gránulos se pueden preparar con recubrimientos y envolturas tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. Las mismas pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y pueden tener también una composición tal que las mismas liberen el o los ingredientes activos única, o preferentemente, en una parte determinada del tracto intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Ejemplos de 10 composiciones incrustantes tales que pueden utilizarse incluyen sustancias polímeras y ceras. Pueden emplearse también composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina con relleno blando y duro utilizando excipientes tales como lactosa o azúcar de leche así como polietilen-glicoles de peso molecular alto y análogos.

15 Los compuestos activos pueden encontrarse también en una forma micro-encapsulada con uno o más excipientes como se ha indicado arriba. Las formas sólidas de dosificación de tabletas, grageas, cápsulas, píldoras, y gránulos se pueden preparar con recubrimientos y envolturas tales como recubrimientos entéricos, recubrimientos de control de la liberación y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. En tales formas sólidas de dosificación, el compuesto activo puede mezclarse con al menos un diluyente inerte tal como sacarosa, lactosa o almidón. Tales formas de dosificación pueden comprender también, como ocurre en la práctica normal, 20 sustancias adicionales distintas de diluyentes inertes, v.g., lubricantes para fabricación de tabletas y otros adyuvantes de fabricación de tabletas tales como estearato de magnesio y celulosa microcristalina. En el caso de cápsulas, tabletas y píldoras, las formas de dosificación pueden comprender también agentes tampón. Las mismas pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y pueden tener una composición tal que las mismas liberen el o los ingredientes activos única o preferentemente en una determinada parte del tracto intestinal, opcionalmente, de 25 manera retardada. Ejemplos de composiciones incrustantes que pueden utilizarse incluyen sustancias polímeras y ceras.

Formas de dosificación para administración tópica o transdérmica del compuesto **1** incluyen ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, sprays, inhaladores o parches. El componente activo se mezcla en condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable y cualesquiera conservantes o tampones 30 necesarios que puedan ser requeridos. Se contemplan también como comprendidas dentro del alcance de esta invención formulaciones oftálmicas, gotas para los oídos, y gotas oculares. Adicionalmente, la presente invención contempla el uso de parches transdérmicos, que tienen la ventaja adicional de proporcionar al cuerpo un suministro controlado del compuesto **1**. Tales formas de dosificación pueden producirse por disolución o dispensación del compuesto **1** en el medio apropiado. Pueden utilizarse también mejoradores de la absorción para aumentar el flujo 35 del compuesto **1** a través de la piel. La velocidad puede controlarse proporcionando una membrana de control de la velocidad o por dispersión del compuesto **1** en una matriz de polímero o gel.

El compuesto **1** se formula preferiblemente en forma de dosis unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La expresión "forma de dosis unitaria" como se utiliza en esta memoria, hace referencia a una 40 unidad físicamente discreta de agente apropiada para el paciente a tratar. Se comprenderá, sin embargo, que el uso total diario de compuesto **1** y las composiciones que comprenden el compuesto **1** será decidido por el médico encargado del tratamiento dentro del alcance de un criterio médico razonable. El nivel específico de dosis efectivo para cualquier paciente u organismo particular dependerá de una diversidad de factores que incluyen el trastorno que se esté tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta del paciente; el 45 momento de administración, la ruta de administración, y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos utilizados en combinación o coincidentes con el compuesto específico empleado, y factores análogos bien conocidos en las técnicas médicas.

La cantidad de compuesto **1** que puede combinarse con los materiales portadores para producir una composición en una forma de dosificación simple variará dependiendo del hospedador tratado y el modo particular de administración. 50 Preferiblemente, las composiciones deberían formularse de tal modo que pueda administrarse una dosis comprendida entre 0,01 y 100 mg/kg de peso corporal/día del inhibidor a un paciente que recibe estas composiciones. En un ejemplo, las composiciones se formulan de tal manera que la dosis del compuesto **1** es de 5 a 30 mg/kg de peso corporal/día.

55 Dependiendo de la afección o enfermedad particular, a tratar o prevenir, pueden estar presentes también en las composiciones de esta invención agentes terapéuticos adicionales, que se administran normalmente para tratar o prevenir dicha afección. Como se utilizan en esta memoria, los agentes terapéuticos adicionales que se administran normalmente para tratar o prevenir una enfermedad o afección particular se conocen como "apropiados para la enfermedad o afección que se esté tratando". Ejemplos de agentes terapéuticos adicionales se proporcionan más adelante.

La cantidad de agente terapéutico adicional presente en las composiciones de esta invención no será mayor que la cantidad que se administraría normalmente en una composición que comprenda dicho agente terapéutico como el único agente activo. Preferiblemente, la cantidad de agente terapéutico adicional en las composiciones descritas en esta memoria variará desde aproximadamente 50% a 100% de la cantidad normalmente presente en una composición que comprenda dicho agente como el único agente terapéuticamente activo.

Usos del Compuesto 1 y Composiciones que Comprenden el Compuesto 1

De acuerdo con una realización, la invención se refiere a un método de inhibición de la actividad de la proteína-quinasa c-Met en una muestra biológica que comprende el paso de poner en contacto dicha muestra biológica con el compuesto **1**, o una composición que comprende dicho compuesto. El término "muestra biológica", como se utiliza en esta memoria, significa una muestra exterior a un organismo vivo e incluye, sin limitación, cultivos de células o extractos de los mismos; material procedente de biopsias obtenido de un mamífero o extractos de los mismos; y sangre, saliva, orina, heces, semen, lágrimas, u otros fluidos corporales o extractos del mismo. La inhibición de la actividad de quinasa en una muestra biológica es útil para una diversidad de propósitos conocidos por una persona con experiencia en la técnica. Ejemplos de tales propósitos incluyen, pero sin carácter limitante, almacenamiento de un espécimen biológico y ensayos biológicos. En una realización, el método de inhibición de la actividad de quinasa en una muestra biológica está limitado a métodos no terapéuticos.

El término "c-Met" es sinónimo de "c-MET", "cMet", "MET", "Met" u otras designaciones conocidas por una persona con experiencia en la técnica.

De acuerdo con otra realización, la invención se refiere a un método de inhibición de la actividad de la quinasa c-Met en un paciente que comprende el paso de administrar a dicho paciente el compuesto **1**, o una composición que comprende dicho compuesto.

El término "enfermedad mediada por c-Met" o "afección mediada por c-Met", como se utiliza en esta memoria, significa cualquier estado de enfermedad u otra afección deletérea en la cual se sabe que c-Met juega un papel. Los términos "enfermedad mediada por c-Met" o "afección mediada por c-Met" significan también aquellas enfermedades o afecciones que son aliviadas por tratamiento con un inhibidor de c-Met. Tales afecciones, incluyen, sin limitación, cáncer renal, gástrico, de colon, de cerebro, de mama, prostático, de hígado, pancreático, o de pulmón, glioblastoma, aterosclerosis, o fibrosis pulmonar.

En un aspecto, la presente invención caracteriza un método de tratamiento de un trastorno proliferativo en un paciente que comprende el paso de administrar al paciente una dosis terapéuticamente eficaz de compuesto **1** o una composición que comprende el compuesto **1**.

De acuerdo con una realización, el trastorno proliferativo es cáncer, tal como, por ejemplo, cáncer renal, gástrico, de colon, de cerebro, de mama, de hígado, prostático, y pulmonar, o un glioblastoma.

En otra realización, la presente invención se refiere a un método de tratamiento o alivio de la gravedad de carcinoma hepatocelular en un paciente que se encuentra en necesidad de ello, que comprende administrar a dicho paciente el compuesto **1** o una composición del mismo.

En otra realización, el trastorno proliferativo es policitemia vera, trombocitemia esencial, mielofibrosis idiopática crónica, metaplasia mieloide con mielofibrosis, leucemia mieloide crónica (CML), leucemia mielomonocítica crónica, leucemia eosinofílica crónica, síndrome hipereosinofílico, enfermedad sistémica de los mastocitos, CML atípico, o leucemia mielomonocítica juvenil.

En otra realización, el trastorno proliferativo es aterosclerosis o fibrosis pulmonar.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de inhibición de metástasis tumorales en un paciente que se encuentra en necesidad de ello, que comprende administrar a dicho paciente el compuesto **1** o una composición del mismo.

Dependiendo de la afección, o enfermedad particular a tratar, pueden estar presentes también en las composiciones de esta invención agentes terapéuticos adicionales que se administran normalmente para tratar dicha afección. Como se utiliza en esta memoria, los agentes terapéuticos adicionales que se administran normalmente para tratar una enfermedad o afección particular, se conocen como "apropiados para la enfermedad, o afección, que se esté tratando".

En una realización, agentes quimioterapéuticos u otros agentes anti-proliferativos pueden combinarse con el compuesto **1** para tratar enfermedades proliferativas y cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos conocidos incluyen, pero sin carácter limitante, agentes alquilantes, tales como, por ejemplo, ciclofosfamida, lomustina, busulfán-procarbazona, ifosfamida, altretamina, melfalán, fosfato de estramustina, hexametilmelamina, mecloretamina, tiotepa, estreptozocina, clorambucil, temozolomida, dacarbazina, semustina, o carmustina; agentes de platino, tales como, por ejemplo, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, ZD-0473 (AnorMED), espiroplatino, lobaplatino (Aetema); carboxifalatoplatino, satraplatino (Johnson Matthey), tetraplatino BBR-3464, (Hoffmann-La

Roche), ormiplatino, SM-11355 (Sumitomo), iproplatino, o AP-5280 (Access); antimetabolitos, tales como, por ejemplo, azacitidina, tomudex, gemcitabina, trimetrexato, capecitabina, desoxicoformicina, 5-fluorouracilo, fludarabina, floxuridina, pentostatina, 2-clorodesoxiadenosina, raltitrexed, 6-mercaptopurina, hidroxiaurea, 6-tioguanina, decitabina (SuperGen), citarabina, clofarabina, (Bioenvision), 2-fluorodesoxicidina, irofulveno (MGI-Pharma), metotrexato, DMDC (Hoffmann-La Roche), idatrexato, o etinilcicidina (Taiho); inhibidores de topoisomerasas, tales como, por ejemplo, amsacrina, rubitecán (SuperGen), epirrubicina, mesilato de hexatecán (Daiichi), etoposido, quinamed (ChemGenex), teniposido, mitoxantrona, gimatecán (Sigma-Tau), irinotecán (CPT-11), diflomotecán (Beaufour-Ipsen), 7-etil-10-hidroxi-camptotecina, TAS-103 (Taiho), topotecán, elsamitrucina (Spectrum), dexrazoxanet (TopoTarget), J-107088 (Merck & Co), pixantrona (Novuspharma), BNP-1350 (BioNumerik), análogos de rebecamicina (Exelixis), CKD-602 (Chong Kun Dang), BBR-3576 (Novuspharma), o KW-2170 (Kyowa Hakko); antibióticos antitumorales, tales como, por ejemplo, dactinomicina (Actinomicina D), amonafide, doxorubicina (adriamicina), azonafide, desoxirrubicina, antrapirazol, valrubicina, oxantrazol, daunorubicina (daunomicina), losoxantrona, epirrubicina, bleomicina sulfato (blenoxano), terarrubicina, ácido bleomicínico, idarrubicina, bleomicina A, rubidazona, bleomicina B, plicamicina, mitomicina C, porfiromicina, MEN-10755 (Menarini), cianomorfolinodoxorubicina, GPX-100 (Gem Pharmaceuticals), o mitoxantrona (novantrona), agentes antimetabólicos, tales como, por ejemplo paclitaxel, SB 408075 (GlaxoSmithKline), docetaxel, E7010 (Abbott), colchicinas, PG-TXL (Cell Therapeutics), vinblastina, IDN 5109 (Bayer), vincristina A, 105972 (Abbott), vinorelbina, A 204197 (Abbott), vindesina LU 223651 (BASF), dolastatina 10 (NCI), D 24851 (ASTAMedica), rizoxina (Fujisawa) ER-86526 (Eisai), mivobulina (Warner-Lambert), combretastatina A4 (BMS), cematodina (BASF), isohomohalichondrina-B (PharmaMar), RPR 109881A (Aventis), ZD 6126 (AstraZeneca), TXD 258 (Aventis), PEG-paclitaxel (Enzon), epotilona B (Novartis), AZ10992 (Asahi), T 900607 (Tularik), IDN-5109 (Indena), T138067 (Tularik), AVLB (Prescient Neuropharma), criptoficina 52 (Eli Lilly), azaepotilona B (BMS), vinflunina (Fabre), BNP-7787 (BioNumerik), auristatina PE (Teikoku Hormone), CA-4 profármaco (OXiGENE), BMS 247550 (BMS), dolastatina-10 (NIH), BMS 184476 (BMS), CA-4 (OXiGENE), BMS 188797 (BMS), o taxoprexina (Protarga); inhibidores de las aromatasas, tales como, por ejemplo, aminoglutetimida, exemestano, letrozol, atamestano (BioMedicines), anastrozol, YM-511 (Yamanouchi), o formestano; inhibidores de la timidilato-sintasa, tales como, por ejemplo, pemetrexed (Eli Lilly), nolatrexed (Eximias), ZD-9331 (BTG), o CoFactor™ (BioKeys); antagonistas del DNA, tales como, por ejemplo, trabectedina (PharmaMar), mafosfamida (Baxter International), glufosfamida (Baxter International), apaziquona (Spectrum Pharmaceuticals), albúmina + ³²P (Isotope Solutions), 06 bencilguanina (Paligent), timentacina (NewBiotics), o edotreotida (Novartis); inhibidores de la farnesiltransferasa, tales como, por ejemplo, arglabina (NuOncology Labs), tipifarnib (Johnson & Johnson), lonafarnib (Schering-Plough), alcohol perillílico (DOR BioPharma), o BAY-43-9006 (Bayer); inhibidores Pump, tales como, por ejemplo, CBT-1 (CBA Pharma), zosuquidar trihidrocloruro (Eli Lilly), tariquidar (Xenova), biricodar dicitrato (Vertex), o MS-209 (Schering AG); inhibidores de Histona-acetiltransferasa, tales como, por ejemplo, tacedinalina (Pfizer), pivaloiloximetil-butirato (Titan), SAHA (Aton Pharma), depsipéptido (Fujisawa), o MS-275 (Schering AG); inhibidores de metaloproteinasas, tales como, por ejemplo, Neovastat (Aetema Laboratories), CMT-3 (CollaGenex), marimastat (British Biotech), o BMS-275291 (Celltech); inhibidores de ribonucleosido-reductasas, tales como, por ejemplo, maltolato de galio (Titan), tezacitabina (Aventis), triapina (Vion), o didox (Molecules for Health); agonistas/antagonistas de TNF alfa, tales como, por ejemplo, virulizina (Lorus Therapeutics), revimid (Celgene), CDC-394 (Celgene), entanercept (Immunex Corp.), infliximab (Centocor, Inc.), o adalimumab (Abbott Laboratories); antagonistas del receptor de endotelina A, tales como, por ejemplo, atrasentán (Abbott) YM-598 (Yamanouchi) o ZD-4054 (AstraZeneca); agonistas del receptor de ácido retinoico, tales como, por ejemplo, fenretinida (Johnson & Johnson), alitretinoína (Ligand) o LGD-1550 (Ligand); inmuno-moduladores, tales como, por ejemplo, terapia con Interferón Dexosome (Anosys), oncófago (Antigenics), pentrix (Australian Cancer Technology), GMK (Progenics), ISF-154 (Tragen), vacuna de adenocarcinoma (Biomira), vacuna del cáncer (Intercell), CTP-37 (AVI BioPharma), norelina (Biostar), IRX-2 (Immuno-Rx), BLP-25 (Biomira), PEP-005 (Peplin Biotech), MGV (Progenics), vacunas Synchronovax (CTL Immuno), beta-aletina (Dovetail), vacuna del melanoma (CTL Immuno), terapia CLL (Vasogen), o vacuna p21 RAS (GemVax); agentes hormonales y antihormonales, tales como, por ejemplo, estrógenos, prednisona, estrógenos conjugados, metilprednisolona, etinilestradiol, prednisolona, clortrianiseno, aminoglutetimida, idenestrol, leuprolida, hidroxiprogesterona caproato, goserelina, medroxiprogesterona, leuporelina, testosterona, bicalutamida, testosterona propionato, fluoximesterona, flutamida, metiltestosterona, octreotida, dietilstilbestrol, nilutamida, megestrol, mitotano, tamoxifeno, P-04 (Novogen), toremofme, 2-metoxiestradiol (EntreMed), dexametasona, o arzoxifeno (Eli Lilly); agentes fotodinámicos, tales como, por ejemplo, talaporfina (Light Sciences), Pd-bacteriofeoforbida (Yeda), Theralux (Theratechnologies), lutecio-texafirina (Pharmacyclics), motexafin-gadolinio (Pharmacyclics), o hipericina; e inhibidores de tirosina-quinasas, tales como, por ejemplo, imatinib (Novartis), kahalida F (PharmaMar), leflunomida (Sugen/Pharmacia), CEP-701 (Cephalon), ZD1839 (AstraZeneca), CEP-751 (Cephalon), erlotinib (Oncogen Science), MLN518 Millenium), canerininb (Pfizer), PKC412 (Novartis), escualamina (Genaera), fenoxodiol, SU5416 (Pharmacia), trastuzumab (Genentech), SU6668 (Pharmacia), C225 (ImClone), ZD4190 (AstraZeneca), rhu-Mab (Genentech), ZD6474 (AstraZeneca), MDX-H210

(Medarex), vatalanib (Novartis), 2C4 (Genentech), PKI166 (Novartis), MDX-447 (Medarex), GW2016 (GlaxoSmithKline), ABX-EGF (Abgenix), EKB-509 (Wyeth), IMC-1C11 (ImClone), o EKB-569 (Wyeth).

5 Dichos agentes adicionales pueden administrarse por separado de la composición que contiene el compuesto **1**, como parte de un régimen de dosificación múltiple. Alternativamente, tales agentes pueden formar parte de una forma de dosificación simple, mezclada junto con el compuesto **1** en una sola composición. Si se administran como parte de un régimen de dosificación múltiple, los dos agentes activos pueden administrarse simultáneamente, secuencialmente o dentro de cierto periodo de tiempo de uno a otro, normalmente dentro de 5 horas uno de otro.

10 La cantidad de ambos, el compuesto **1** y el agente terapéutico adicional (en aquellas composiciones que comprenden un agente terapéutico adicional como se ha descrito arriba) que puede combinarse con los materiales portadores para producir una forma de dosificación simple variará dependiendo del hospedador tratado y del modo de administración particular. Preferiblemente, las composiciones de esta invención deberían formularse de tal modo que pueda administrarse una dosis comprendida entre 0,01 y 100 mg/kg de peso corporal/día de compuesto **1**. En un ejemplo, las composiciones se formulan de tal manera que la dosis del compuesto **1** es de 5 a 30 mg/kg de peso corporal/día.

15 En aquellas composiciones que comprenden un agente terapéutico adicional, dicho agente terapéutico adicional y el compuesto **1** pueden actuar de modo sinérgico. Por tanto, la cantidad de agente terapéutico adicional en tales composiciones será menor que la requerida en una monoterapia que utilice únicamente dicho agente terapéutico. En tales composiciones, puede administrarse una dosis comprendida entre 0,01 y 100 mg/kg de peso corporal/día del agente terapéutico adicional.

20 La cantidad de agente terapéutico adicional presente en las composiciones de esta invención no será mayor que la cantidad que se administraría normalmente en una composición que comprenda dicho agente terapéutico como el único agente activo. Preferiblemente, la cantidad de agente terapéutico adicional en las composiciones descritas en esta memoria estará comprendida entre aproximadamente 50% y 100% de la cantidad normalmente presente en una composición que comprenda dicho agente como el único agente terapéuticamente activo.

25 El compuesto **1**, o composiciones farmacéuticas del mismo, pueden incorporarse también en composiciones para recubrimientos de un dispositivo médico implantable, tales como prótesis, válvulas artificiales, injertos vasculares, dilatadores y catéteres. Los dilatadores vasculares, por ejemplo, se han utilizado para vencer la restenosis (re-estrechamiento de la pared del vaso después de una lesión). Sin embargo, los pacientes que utilicen dilatadores u otros dispositivos implantables corren el riesgo de formación de coágulos o activación de las plaquetas. Estos efectos indeseables pueden evitarse o mitigarse por pre-recubrimientos del dispositivo con una composición farmacéuticamente aceptable que comprenda un inhibidor de las quinasas. Recubrimientos adecuados y la preparación general de dispositivos recubiertos implantables se describen en las patentes U.S. 6.099.562; 5.886.026; y 5.304.121. Los recubrimientos son típicamente materiales polímeros biocompatibles tales como un polímero de hidrogel, polimetildisiloxano, policaprolactona, polietilenglicol, ácido poliláctico, etileno-acetato de vinilo, y mixturas de los mismos. Los recubrimientos pueden estar cubiertos opcionalmente por una capa superior adecuada de fluorosilicona, polisacáridos, polietilenglicol, fosfolípidos o combinaciones de los mismos a fin de impartir características de liberación controlada en la composición. Dispositivos implantables recubiertos con el compuesto **1** son otra realización de la presente invención.

40 Con objeto de que la invención descrita en esta memoria pueda comprenderse más plenamente, se proporcionan los ejemplos siguientes. Debe entenderse que estos ejemplos se dan únicamente para propósitos ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes de esta invención en modo alguno.

Preparación del Compuesto 1

Las definiciones siguientes describen términos y abreviaturas utilizados en esta memoria:

Salmuera	una solución saturada de NaCl en agua
BSA	seroalbúmina bovina
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESMS	electrospray-espectrometría de masas
EtOAc	acetato de etilo
EtOH	alcohol etílico
FB	base libre
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
LCMS	cromatografía líquida-espectrometría de masas
Me	Metilo
MeOH	Metanol
Ph	Fenilo
RT	temperatura ambiente
TCA	ácido tricloroacético
THF	Tetrahidrofurano

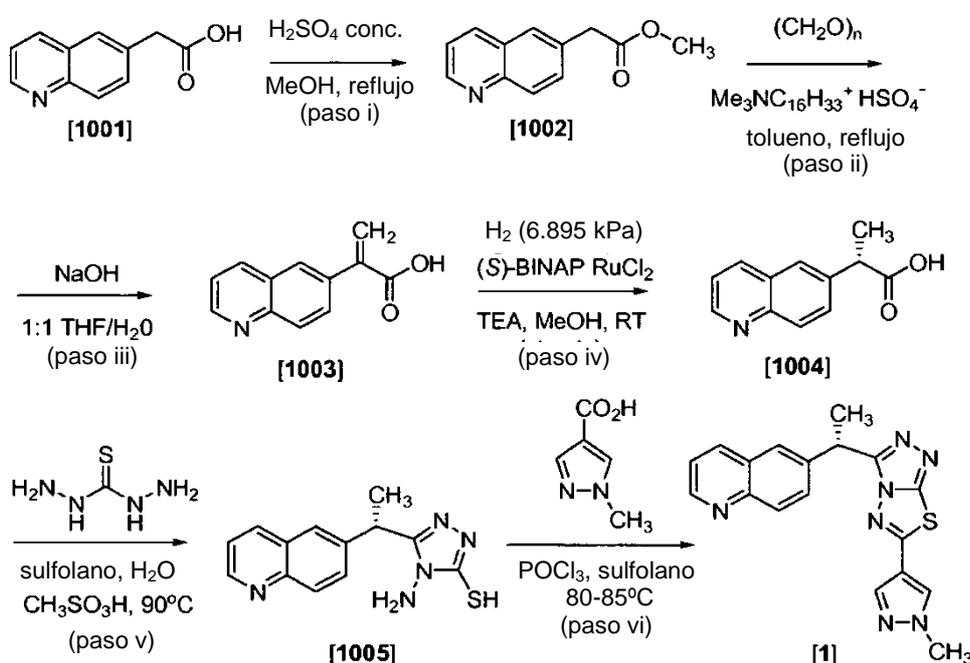
TFA ácido trifluoroacético

Como se utilizan en esta memoria, otras abreviaturas, símbolos y convenciones son consistentes con las utilizadas en la literatura científica actual. Véase, v.g., Janet S. Dodd, ed., The ACS Style Guide: A Manual for Authors and Editors, 2nd Ed., Washington, D.C.: American Chemical Society, 1997.

- 5 Como se utiliza en esta memoria, el término "R_T (min)" re refiere al tiempo de retención en la HPLC, en minutos, asociado con un compuesto. A no ser que se indique otra cosa, el método HPLC utilizado para obtener el tiempo de retención consignado es como sigue: columna: columna Zorbax SB C18, 3,0 x 150 mm; gradiente: 10-90% acetonitrilo/agua (0,1% TFA), 5 minutos; caudal 1,0 ml/minuto; y detección: 254 & 214 nm.

Procedimiento de Síntesis

- 10 El compuesto **1** puede prepararse por el método siguiente, como se muestra en el Esquema 1 y se ilustra en el Ejemplo 1.



Esquema 1

- 15 Ejemplo 1. Preparación de 6-((S)-1-(6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]tiadiazol-3-il)etil)quinolina (compuesto **1**).

Como se muestra en el paso i del Esquema 1, se añadió gota a gota ácido sulfúrico concentrado (206 ml, 3,868 moles) a una solución de ácido 2-(quinolin-6-il)acético (compuesto **1001**, 658,2 g, 3,516 moles, Okeanos Tech Co., número de catálogo OK-J-05024) en 6,5 litros de metanol. Durante la adición, se observó una ligera exotermia. Una vez completada la adición, se agitó la reacción a reflujo durante 4 horas. Después de enfriar, se eliminaron las materias volátiles a presión reducida, se diluyó el residuo resultante con 4 litros de acetato de etilo, se enfrió en un baño de hielo, se trató con NaOH 2 N (2,1 litros, 1,2 equivalentes) hasta que se alcanzó un pH de 4, y se trató luego con bicarbonato de sodio saturado hasta que se alcanzó un pH de 8. Se separaron las capas y la capa acuosa se extrajo dos veces con acetato de etilo. Los materiales orgánicos combinados se lavaron con bicarbonato de sodio saturado, se lavaron luego con agua, se lavaron posteriormente con salmuera, se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron, y se evaporaron a presión reducida para proporcionar 2-(quinolin-6-il)acetato de metilo como un aceite pardo claro (compuesto **1002**, 696,8 g, rendimiento 98%); ESMS (M+1), 202, 14; ¹H NMR (300,0 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,90 (1H, dd, *J* = 1,7, 4,2 Hz), 8,14-8,10 (1H, m), 8,08 (1H, d, *J* = 8,7 Hz), 7,72 (1H, d, *J* = 1,4 Hz), 7,65 (1H, dd, *J* = 2,0, 8,7 Hz), 7,40 (1H, dd, *J* = 4,2, 8,3 Hz), 3,83 (2H, s), 3,73 (3H, s).

- 30 Como se muestra en el paso ii del Esquema 1, se pusieron 2-(quinolin-6-il)acetato de metilo (82 g, 407,5 mmol), paraformaldehído (25,89 g, 862,1 mmoles), K₂CO₃ (101,4 g, 733,5 mmoles), e hidrogenosulfato de hexadecil(trimetil)amonio (15,55 g, 40,75 mmoles) en tolueno (1,6 litros) y se calentaron a reflujo durante 2 horas hasta que el material de partida se hubo consumido por completo, tal como se monitorizó por HPLC. La mezcla de

reacción se enfrió utilizando un baño de hielo y agua y se filtró a través de tierra de diatomeas. El filtrado se lavó con 1 litro de agua y la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró, y se evaporó a presión reducida para proporcionar 2-(quinolin-6-il)acrilato de metilo como un aceite claro e incoloro (75,0 g). Este material se utilizó inmediatamente sin purificación ulterior en la reacción siguiente.

- 5 De acuerdo con lo anterior, como se muestra en el paso iii del Esquema 1, se disolvió 2-(quinolin-6-il)acrilato de metilo (75,0 g) en una solución que contenía hidróxido de sodio (65,2 g, 1,63 moles) en 1,1 litros de tetrahidrofurano y 1,1 litros de agua. La reacción se agitó a la temperatura ambiente durante una noche. Se separó la capa orgánica y la capa acuosa se lavó con 500 ml de tolueno. La capa acuosa se enfrió luego con un baño de hielo y se acidificó por adición gota a gota de HCl concentrado hasta que se alcanzó un pH de 4,5 (aproximadamente 125 ml de HCl
10 concentrado, 1,508 moles), dando como resultado un precipitado blanco. Una vez completada la adición, la reacción se agitó durante 0,5 horas más a 5°C. El precipitado se recogió por filtración a vacío, se lavó con agua, se lavó con metil-t-butil-éter, y se secó a vacío para proporcionar el ácido 2-(quinolin-6-il)acrilico (compuesto **1003**, 36,2 g): ESMS (M+1), 200,06; ¹H NMR (300,0 MHz, DMSO-d₆) δ 13,01 (1H, s), 8,91 (1H, dd, J = 1,8, 4,2 Hz), 8,40 (1H, d, J = 7,5 Hz), 8,07 (1H, d, J = 1,8 Hz), 8,01 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,84 (1H, dd, J = 1,9, 8,9 Hz), 7,55 (1H, dd, J = 1,2, 8,4 Hz), 6,39 (1H, d, J = 0,9 Hz), 6,17 (1H, d, J = 0,9 Hz).

- Como se muestra en el paso iv del Esquema 1, se pusieron ácido 2-(quinolin-6-il)acrilico (84,5 g, 424 mmoles), metanol (422 ml), y trietilamina (118 ml) en un matraz cilíndrico de vidrio de 2 litros bajo nitrógeno. La solución se desoxigenó por borboteo de una corriente de nitrógeno a través de la solución durante 1 hora. Se añadió a la solución dicloro[(S)-(-)-2,2'-bis(difenilfosfina)-1,1'-binaftil]-rutenio (II) (710 mg, 0,848 mmoles) y el recipiente de vidrio
20 se puso en un reactor Parr de alta presión de acero inoxidable y se agitó durante 16 horas a la temperatura ambiente bajo 1000 psi (6.895 kPa) de hidrógeno gaseoso. Transcurrido este tiempo, se retiró la atmósfera de hidrógeno, se añadió un agente de barrido de rutenio (Silicycle®-DMT, 8,78 g, 6 equivalentes), y la mixtura se agitó a la temperatura ambiente durante 16 horas más. Se filtró la mixtura y el filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar un aceite pardo viscoso, que se disolvió en 170 ml de agua. La solución acuosa se acidificó por
25 adición gota a gota de HCl 6 N hasta que se alcanzó un pH de 4-5. El precipitado resultante se recogió por filtración a vacío, se lavó con agua, se lavó con metil-t-butil-éter, y se secó en un horno de vacío a 50°C durante una noche para proporcionar ácido (S)-2-(quinolin-6-il)propanoico (compuesto **1004**, 68,6 g) como un sólido pardo rojizo: ESMS (M+1), 202,19; ¹H NMR (300,0 MHz, DMSO-d₆) δ 12,42 (1H, br,s), 8,87 (1H, dd, J = 1,7, 4,2 Hz), 8,35 (1H, d, J = 7,6 Hz), 7,98 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,87 (1H, d, J = 1,7 Hz), 7,71 (1H, dd, J = 2,0, 8,7 Hz), 7,52 (1H, dd, J = 4,2, 8,3 Hz), 3,91 (1H, q, J = 7,1 Hz), 1,48 (3H, d, J = 7,1 Hz). Se recogió una segunda cosecha de producto cristalino (11,5 g) para un rendimiento global de 94%. El análisis por cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) utilizando una columna quiral Whelk-O® eluyendo con (30% MeOH/0,2% dietilamina) en CO₂, exhibió 91% de exceso enantiomérico (ee) del isómero S deseado.

- Como se muestra en el paso v del Esquema 1, se suspendieron ácido (S)-2-(quinolin-6-il)propanoico (50 g, 248,5 mmoles) y 1,3-diaminotiourea (29,02 g, 273,4 mmol) en una mixtura de tetrametileno-sulfona (sulfolano, 38 ml) y agua (57 ml). Se añadió a la mixtura ácido metanosulfónico (35,5 ml, 546,7 mmoles), con lo cual se disolvieron totalmente los sólidos. La temperatura de reacción se aumentó lentamente hasta 90°C y la reacción se calentó a 90°C durante 40 horas, pasado cuyo tiempo se comprobó por análisis HPLC un 68% de conversión del material de partida en el producto. La mixtura de reacción se enfrió en un baño de hielo y se añadió agua (75 ml), seguida por la
40 adición cuidadosa de bicarbonato de sodio saturado (500 ml) hasta que se alcanzó un pH de 8. El precipitado fino resultante de color púrpura se recogió por filtración a vacío, se lavó con agua, bicarbonato de sodio saturado, agua, y metil-t-butil-éter, respectivamente. El producto se secó en un horno de vacío a 55°C durante 2 días para proporcionar 6-((S)-1-(5-mercapto-4-amino-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)etil)quinolina (compuesto **1005**, 43 g): ESMS (M+1), 272,09; ¹H NMR (300,0 MHz, DMSO-d₆) δ 13,65 (1H, br s), 8,86 (1H, dd, J = 1,8, 8,4 Hz), 8,34 (1H, d, J = 7,5 Hz), 7,98 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,84 (1H, dd, J = 1,7, 13,7 Hz), 7,82 (1H, d, J = 1,5 Hz), 7,70 (1H, dd, J = 1,8, 8,7 Hz), 7,50 (1H, dd, J = 1,8, 8,7 Hz), 5,44 (2H, s), 4,57 (1H, q, J = 7,2 Hz), 1,65 (3H, d, J = 7,2 Hz). El producto tenía una pureza de 92% por análisis ¹H NMR, siendo las impurezas principales compuesto **1004** y sulfolano. El análisis por HPLC quiral demostró 92% de ee (ChiralPak® AD-H, 70% de iso-propanol/hexanos; tiempo de retención: 4,98 min para el enantiómero S, 12,33 min para el enantiómero R). El producto se utilizó tal cual en el paso siguiente sin purificación
50 ulterior.

- El compuesto **1004** pudo recuperarse del filtrado acuoso por ajuste de su pH a 5, recogida de cualquier material precipitado, y extracción del filtrado restante con acetato de etilo (3 veces). Los materiales orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron, y se evaporaron a presión reducida para proporcionar un aceite oscuro, que se recogió en 90 ml de acetato de etilo y se calentó a reflujo durante 0,5 horas. El enfriamiento dio como
55 resultado un precipitado adicional que, cuando se combinó con el precipitado recogido previamente, dio como resultado la recuperación del compuesto **1004** como un sólido blanco (7 g).

- Como se muestra en el paso vi del Esquema 1, se disolvieron 6-((S)-1-(5-mercapto-4-amino-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)etil)quinolina (123,0 g, 453,3 mmoles) y ácido 1-metil-1*H*-pirazol-4-carboxílico (60,03 g, 476,0 mmoles, Aldrich Chemical Co. Cat. No. 682063) en POCl₃ (1,23 litros) y sulfolano (246 ml) y se agitaron durante 18 horas a 83°C. Las materias volátiles se evaporaron a presión reducida y el residuo se sometió adicionalmente a destilación azeotrópica con tolueno dos veces más a presión reducida. El aceite resultante se vertió lentamente en una mezcla agitada

hielo-agua y la solución acuosa se extrajo con diclorometano para eliminar cualquier cantidad residual de sulfolano. La solución acuosa se trató con bicarbonato de sodio saturado (3,2 litros) hasta que se alcanzó un pH de 7. El aceite resultante se separó por decantación y se disolvió en una pequeña cantidad de metanol, extrayéndose la capa acuosa restante con diclorometano (4 veces). Los extractos orgánicos combinados y la solución metanólica del aceite se combinaron y se lavaron con bicarbonato de sodio saturado, agua, y salmuera, respectivamente. Las materias orgánicas se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron, y se evaporaron a presión reducida para proporcionar el producto bruto como un aceite pardo espeso. El producto se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de diclorometano hasta 5% de metanol en diclorometano. Las fracciones que contenían el producto se evaporaron a presión reducida para proporcionar un sólido amarillo, que se purificó ulteriormente por cristalización en diclorometano (300 ml) y metil-terc-butil-éter (300 ml) para proporcionar 6-((S)-1-(6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]tiadiazol-3-il)etil)quinolina (compuesto **1**, 62,8 g, rendimiento 38%) como un sólido amarillo claro: ESMS (M+1), 362,38; ¹H NMR (300,0 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,87 (1H, dd, J=1,7, 4,3 Hz); 8,54 (1H, s); 8,36 (1H, br, d, J=8,3Hz); 8,03 (1H, s); 8,00 (1H, d, J=8,3 Hz); 7,92 (1H, d, J=1,7 Hz); 7,80 (1H, dd, J=1,9, 8,8 Hz); 7,52 (1H, dd, J=4,2, 8,2 Hz); 4,90 (1H, q, J=7,2 Hz); 3,90 (3H, s); 1,86 (3H, d, J=7,2Hz). El análisis por HPLC quiral mostró 99+% ee (ChiralPak® AD-H, 70% etanol/hexanos).

Ejemplo 2. Cristalización del compuesto **1** (base libre)

Se añadieron al compuesto **1** (906 mg) 40 ml de acetonitrilo y 10 ml de metanol. Se disolvió el sólido en un baño de agua caliente a aproximadamente 90°C. La solución se filtró y se dejó evaporar lentamente a la temperatura ambiente durante 4 horas. Precipitaron gradualmente cristales. Las aguas madres se decantaron y el sólido se secó a la temperatura ambiente a un vacío de 4 mmHg durante una noche.

Se cargaron aproximadamente 10 mg de compuesto **1**, base libre (FB) cristalina en un vial provisto de una varilla de agitación magnética. Se añadieron aproximadamente 150 µl de disolvente a cada vial. Si el compuesto **1** se disolvía por completo, se añadió más sólido al vial y se continuó agitando la suspensión resultante a la temperatura ambiente. La solución de 4 días se separó por filtración utilizando filtros centrífugos y se diluyó en metanol para obtener datos de solubilidad por análisis HPLC. Los resultados del estudio de solubilidad se muestran en la Tabla 1. Los datos de difracción de rayos X de los cristales en la suspensión se recogieron después de 4 y 14 días. Todas las formas que se mantenían cristalinas exhibían un patrón de difracción de rayos X que incluía los picos siguientes (escala theta): desde 6,2 a 6,4 (v.g., aproximadamente 6,3), 9,1 a 9,3 (v.g., aproximadamente 9,2), 11,4 a 11,6 (v.g., aproximadamente 11,5), 13,2 a 13,4 (v.g., aproximadamente 13,3), 13,7 a 13,9 (v.g., aproximadamente 13,8), 14,1 a 14,3 (v.g., aproximadamente 14,2), 14,7 a 14,9 (v.g., aproximadamente 14,8), 16,1 a 16,3 (v.g., aproximadamente 16,2), 18,1 a 18,3 (v.g., aproximadamente 18,2), 18,6 a 18,8 (v.g., aproximadamente 18,7), y 19,7 a 19,9 (v.g., aproximadamente 19,8).

Tabla 1. Solubilidad del compuesto **1** en diferentes disolventes tal como se midió por HPLC

Disolvente	Factor de dilución	AUC	Conc. FB (mg/mL)
Agua	200	50,93	0,15
Nitrometano	2000	1090,09	44,43
Acetonitrilo	2000	250,84	9,76
Metanol	2000	1008,12	41,04
Etanol	200	10197,90	42,06
Acetona	200	3467,41	14,26
IPA	200	1932,85	7,92
MEK	200	3461,35	14,24
2-Metil-THF	200	2201,18	9,03
DME	200	3901,62	16,06
EtOAc	200	1767,01	7,24
DCM	2000	2833,34	116,43
MTBE	200	87,41	0,30
Cumeno	200	625,29	2,52

(continuación)			
Disolvente	Factor de dilución	AUC	Conc. FB (mg/mL)
Dioxano	200	8915,48	36,76
Ciclohexano	200	2,64	-0,05
Glicerol	200	182,30	0,69
Diyodometano	2000	1974,38	80,95
Etilenglicol	200	8570,55	35,34
Alcohol bencílico	2000	8767,90	361,55
DMSO	2000	1653,73	67,71

- 5 Se seleccionó para estudio un cristal incoloro con dimensiones en forma de agujas largas delgadas de 0,5 x 0,05 x 0,05 mm³. La difracción de cristales simples se realizó en un difractómetro Bruker APEX II CCD a la temperatura ambiente con radiación Cu K α . Se tomaron fotos de oscilación alrededor del eje ω en ángulos 4ϕ . Los datos se indexaron, se integraron, y se escalaron con software APEX. Se resolvieron las estructuras se refinaron con el paquete SHELX-TL. Los datos cristalográficos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Datos de los cristales para el compuesto 1

Temperatura	298 K	
Longitud de onda	1,54178 Å	
Sistema cristalino	Ortorrómico	
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	
Dimensiones de la celdilla unitaria	a = 4,4317 (2) Å	$\alpha = 90^\circ$
	b = 13,4692 (6) Å	$\beta = 90^\circ$
	c = 28,9709 (13) Å	$\gamma = 90^\circ$
Volumen	1729,32 (13) Å ³	
Z	4	
Densidad (calculada)	1,388 mg/m ³	
Coeficiente de absorción 1,806 mm ⁻¹	1,806 mm ⁻¹	
F (000)	752	
Tamaño del cristal	0,50 x 0,05 x 0,05 mm ³	
Intervalo theta para recogida de datos	3,05 a 52,98°	
Rangos de índice	-4 ≤ h ≤ 4, -13 ≤ k ≤ 13, -29 ≤ l ≤ 29	
Reflexiones recogidas	9497	
Reflexiones independientes	2007 [R(int) = 0,0210]	
Complejidad hasta theta = 52,98°	99,8%	
Transmisión máxima y mínima	0,9151 y 0,4654	
Método de afino	mínimos cuadrados de matriz completa en F ²	
Datos/restricciones/parámetros	2007/0/237	
Bondad de ajuste en F ²	0,512	
Índices R finales [I > 2 sigma (I)]	R = 0,0217, wR2 = 0,0629	
Índices R (todos los datos)	R1 = 0,0237, wR2 = 0,0666	
Parámetro absoluto de estructura	0,035(17)	
Diferencia máxima entre pico y hueco	0,094 y -0,126 e.Å ⁻³	

10 Ejemplo 3. Formación de sal del compuesto 1

La base libre del compuesto 1 se disolvió en etanol para producir una solución de concentración 0,02 mmol/ml. Se añadieron soluciones básicas y ácidas a viales separados que contenían la solución y los disolventes se evaporaron luego a la temperatura ambiente a vacío (presión de 4 mmHg). Se añadieron individualmente 2-propanol (IPA) y etanol a viales separados para redissolver los sólidos y se intentó la cristalización del sólido en cada vial por evaporación lenta a la temperatura ambiente. Los sólidos resultantes se caracterizaron por estudios de difracción de rayos X. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

- 15

Tabla 3.

Solución ácida	Forma de sal de IPA	Forma de sal de etanol
Ácido clorhídrico	amorfa	amorfa
Ácido sulfúrico, ratio 2:1 molar	sal cristalina	sal cristalina
Ácido p-toluenosulfónico	amorfa	Amorfa
Base libre	FB cristalina	FB cristalina
Ácido metanosulfónico	amorfa	amorfa
Ácido bencenosulfónico	sal cristalina	amorfa
Ácido maleico	amorfa	amorfa
L-prolina	amorfa	amorfa
Ácido fosfórico	sal cristalina	sal cristalina
Ácido L-aspártico	FB cristalina	FB cristalina
Ácido L-glutámico	amorfa	FB cristalina
Ácido L(+)-tartárico	amorfa	amorfa
Ácido fumárico	FB cristalina	FB cristalina
Ácido cítrico	amorfa	amorfa
Ácido D-glucurónico	amorfa	amorfa

nsayo biológico del Compuesto 1

Ejemplo 4. Ensayo de inhibición de la quinasa c-Met

5 El compuesto **1** se cribó respecto a su capacidad para inhibir la quinasa c-Met utilizando un ensayo radiométrico estándar. Resumidamente, en este ensayo de quinasas se investiga la transferencia del fosfato ^{33}P terminal en ^{33}P -ATP al sustrato poliE4Y. El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pocillos hasta un volumen final de 100 μl por pocillo que contenía 0,5 nM de c-Met, 100 mM HEPES (pH 7,5), 10 mM MgCl_2 , 25 mM NaCl, 0,01% BSA, 1 mM DTT, 0,5 mg/ml de poliE4Y, y 35 μM de ATP. De acuerdo con ello, los compuestos de la invención se disolvieron en DMSO para obtener soluciones stock iniciales de concentración 10 mM. Se hicieron luego diluciones seriadas en DMSO para obtener las soluciones finales para el ensayo. Se añadió a cada pocillo una parte alícuota de 1,5 μl de DMSO o inhibidor en DMSO seguido por la adición de ^{33}P -ATP, y finalmente la adición de c-Met y poliE4Y (obtenido de Sigma). Después de 20 min, la reacción se escindió con 50 μl de ácido tricloroacético (TCA) al 30% que contenía 4 mM de ATP. La mezcla de reacción se transfirió a las placas de filtro GF de 0,66 mm (Coming) y se lavó 3 veces con 5% TCA. Después de la adición de 50 μl de escintilador de alta eficiencia Ultimate GoldTM (Packard Bioscience), se sometieron las muestras a conteo en un Contador de Escintilación y Luminiscencia de Microplacas Packard TopCount NXT (Packard Bioscience). Se calcularon los valores K_i utilizando macros Microsoft Excel Solver para ajustar los datos al modelo cinético para inhibición competitiva de la fijación fuerte. El valor K_i para el compuesto **1** es $0,024 \pm 0,008 \mu\text{M}$.

20 Ejemplo 5. Inhibición de la actividad de c-Met en células de carcinoma gástrico Snu5

El compuesto **1** se cribó también en cuanto a su capacidad para inhibir la señal inducida por luciferasa en una línea de células Snu5 modificada por ingeniería genética. Snu5 [obtenida de la American Type Culture Collection (número de catálogo CRL-5973)] es un carcinoma gástrico humano que se sabe sobreexpresa c-Met, que es constitutivamente activo. La línea de células se sometió a transducción con el retrovirus pCLPCX, que contiene un constructo genético constituido por elementos de respuesta al promotor 6xAP1 y un gen de luciferasa que tiene una secuencia C-terminal Pest (señal proteolítica de la ortinitina-descarboxilasa de ratón, que reduce la vida media de la luciferasa). El c-Met constitutivamente activo activa los caminos celulares (principalmente la quinasa MAP), dando como resultado una transcripción inducida por AP-1 de luciferasa-Pest y la traducción en el producto final, cuya actividad es cuantificable como una lectura de quimioluminiscencia después de la adición de luciferina (Steady-Glo de Promega). La luminiscencia residual está fuertemente correlacionada con la inhibición de c-Met. Se obtuvo una línea de células estable por selección de la nueva línea de células Snu5-AP1-Luc-Pest con puromicina. Se cultivaron las células en medio completo [medio Iscove's (Invitrogen) que contenía 10% de suero bovino fetal (FBS, Hyclone) y penicilina/gentamicina (Invitrogen)]. Los compuestos de la invención se disolvieron en DMSO para producir soluciones stock 10 mM iniciales. Se hicieron luego diluciones seriadas en DMSO y se transfirieron a medio completo para hacer una solución 10 x. Las células Snu5-AP1-Luc-Pest se sometieron a conteo y se diluyeron a 200.000 células/ml de solución. Se añadieron las células (90 μl) a cada pocillo en una placa de 96 pocillos negra con fondo claro (Costar). Se añadieron luego a las células 10 μl de la solución 10x del compuesto por triplicado. Las placas se incubaron en una incubadora a 37°C/5% CO_2 . Después de 6 horas, se añadieron a cada pocillo 50 μl del reactivo Steady-Glo (Promega) y se pusieron en un aparato de sacudidas de placas durante 5 minutos para asegurar que las células se lisaban por completo. Se leyó la placa en un Contador de Escintilación y Luminiscencia de Líquidos Microbeta 1450 (Perkin-Elmer). Se calculó la CI_{50} utilizando un ajuste de 4 parámetros con empleo del software de gráficos Prism (GraphPad). El valor CI_{50} para el compuesto **1** es $0,023 \pm 0,012 \mu\text{M}$.

Ejemplo 6. Ensayo de inhibición de hERG

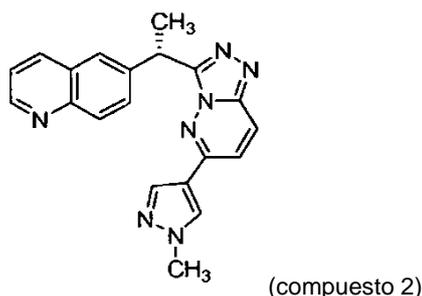
El canal de potasio cardiaco, (hERG), es responsable de una corriente rectificadora tardía rápida (I_{Kr}) en el ventrículo humano. La inhibición de I_{Kr} es la causa más común de prolongación del potencial de acción cardiaco por fármacos no cardiacos. El aumento de la duración del potencial de acción causa una prolongación del intervalo QT que ha sido asociada a una arritmia ventricular peligrosa, la "torsade de pointes". Se determinó la fijación de hERG utilizando un estudio comparativo del bloqueo de hERG para evaluar el efecto de un compuesto de test dado sobre los canales hERG clonados expresados en células de mamífero. Véase Brown y Rampe, *Pharmaceutical News* 7, 15-20, 2000; Rampe et al., *FEBS Lett.*, 417, 28-32, 1997; Weirich y Antoni, *Basic Res. Cardiol.* 93(suplemento 1), 125-132, 1998; y Yap y Cain, *Clin. Exp. Allergy*, 29 (suplemento 3), 174-181, 1999.

- 10 Se suministraron los compuestos de test en solución salina fisiológica tamponada con HEPES (HB-PS) + 0,3% sulfóxido de dimetilo (DMSO). Cada compuesto de test se aplicó a células de riñón embrionario humano (HEK293, obtenidas de ChanTest Corp., Cleveland, OH) que expresaban hERG ($n \geq 3$, donde n = el número de células) a concentraciones suficientes para determinar un valor CI_{50} . Se expusieron las células al compuesto de test durante el tiempo necesario para alcanzar el bloqueo de estado estacionario, pero no más de 10 minutos. El control positivo (cisaprida 90 nM) se aplicó a dos células ($n \geq 2$). Las células expuestas a hERG se transfirieron luego a la cámara de registro y se sometieron a fijación con solución HB-PS. La solución de pipeteado para registros de células enteras incluía aspartato de potasio (130 mM), $MgCl_2$ (5 mM), EGTA (5 mM), ATP (4 mM), y HEPES (10 mM) a un pH ajustado a 7,2 con KOH. Se midieron el comienzo y el bloqueo del estado estacionario de la corriente hERG debida al compuesto de test utilizando un patrón de pulsos con amplitudes fijas (despolarización: + 20 mV durante 2 segundos; repolarización: -50 mV durante 2 segundos), repetidos a intervalos de 10 segundos, a partir de un potencial de retención de -80 mV. Se midió la corriente máxima de cola durante el paso de 2 segundos hasta -50 mV. Se mantuvo un estado estacionario durante al menos 30 segundos antes de aplicar el compuesto de test o compuesto de control positivo. Las corrientes de pico cola se midieron hasta que se alcanzó un nuevo estado estacionario.
- 25 Los datos se adquirieron y se analizaron utilizando el paquete de programas pCLAMP (Versión 8.2) (MDS-AT, Sunnyvale, CA). Resumidamente, el estado estacionario obtenido antes y después de la aplicación del compuesto se utilizó para calcular el porcentaje de corriente inhibido en cada concentración. Los datos concentración-respuesta se ajustaron a la ecuación siguiente:

$$\% \text{ inhibición} = \{1 - 1/[1 + ([Conc]/CI_{50})^N]\} * 100, \text{ donde}$$

- 30 [Conc] es la concentración de cada solución de compuesto testada, CI_{50} es la concentración del compuesto de test que producía la inhibición semi-máxima, N es el coeficiente de Hill, y % inhibición es el porcentaje de la corriente de potasio de hERG inhibido para cada concentración del compuesto. Los ajustes por mínimos cuadrados no lineales se resolvieron con el complemento Solver para Microsoft Excel 2000 (Microsoft, Redmond, WA)

- 35 Se encontró que el compuesto 1 inhibía hERG con un parámetro CI_{50} de 110 μM , en tanto que el compuesto 2 (véase a continuación) inhibía hERG con un parámetro CI_{50} de 13 μM :



Ejemplo 7. Ensayos de inhibición del citocromo P450

- La estabilidad del compuesto 1 se evaluó en las isoformas del citocromo P450 (CYP) humano expresado en baculovirus cDNA-células de insecto CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 y CYP3A4. De acuerdo con ello, las isoformas del citocromo recombinante humano P450 a una concentración final de 50 pmoles de CYP/ml se incubaron en tampón de fosfato (pH 7,4) con 2,0 mM NADPH y compuesto 1 a concentraciones 1 μM y 10 μM del compuesto. La toma de muestras se realizó a los 0 y 120 minutos, y la cantidad de compuesto remanente se evaluó por análisis LC/MS/MS. Los resultados se proporcionan en la Tabla 4 y se expresan como el porcentaje de compuesto remanente después de un periodo de incubación de 120 minutos comparado con la cantidad de compuesto presente en el minuto 0 ($n = 3$ en dos estudios separados), junto con la desviación estándar (SDEV) para cada estudio. Como se indica en los resultados tabulados, el compuesto 1 es metabolizado por ambas isoformas CYP2C19 y CYP3A4, en tanto que el compuesto 2 es metabolizado sustancialmente sólo por la isoforma CYP3A4. El enfrentamiento de la isoforma CYP2C19 con una concentración mayor (10 μM) de compuesto 1 no alteraba sus capacidades metabólicas para metabolizar el compuesto 1, lo que sugería una capacidad relevante en la

metabolización del compuesto **1** *in vivo*. Los resultados *in vitro* indican que el metabolismo parcial del compuesto **1** por más de una isoforma del citocromo P450 durante 120 minutos reduciría el potencial para la interacción fármaco-fármaco con fármacos co-administrados *in vivo*.

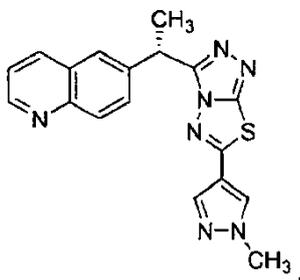
Tabla 4. Metabolismo de los Compuestos **1** y **2** en isozimas CYP humanas recombinantes

Isoforma CYP (% restante ± SDEV)	Compuesto 1 (1 µM)	Compuesto 1 (10 µM)	Compuesto 2 (1 µM)	Compuesto 2 (10 µM)
CYP1A2	113 ± 7,2% 79 ± 9,6%	96,7 ± 4,3% 86 ± 7,8%	91,4 ± 9,1% 87 ± 6,4%	97 ± 1,3% 89 ± 4,7%
CYP2B6	91,7 ± 10,4% 93 ± 5,4%	101 ± 1,4% 99 ± 4,8%	83,1 ± 3,8% 91 ± 1,5%	99,9 ± 4,2% 93 ± 13,5%
CYP2C9	128 ± 22,5% 96 ± 2,2%	101 ± 4,4% 101 ± 8,5%	74,3 ± 23,3% 95 ± 2,8%	91,6 ± 6,2% 118 ± 3,1%
CYP2C 19	34,9 ± 12,3% 12 ± 2,1%	40,3 ± 2,2% 34 ± 3,3%	83,7 ± 1,1% 152 ± 23,2%	86,1 ± 5,7% 100 ± 14,6%
CYP2D6	102 ± 3,6% 125 ± 44,2%	94,7 ± 4,4% 130 ± 11%	96,4 ± 8,7% 247 ± 122%	101 ± 3,4% 142 ± 60%
CYP2E1	109 ± 19% 164 ± 54,8%	109 ± 5,6% 111 ± 1,1%	95,6 ± 7,0% 210 ± 93,4%	99,9 ± 4,6% 129 ± 10,9%
CYP3A4	13,6 ± 2,6% 48 ± 17,4%	31,8 ± 2,1% 56 ± 14%	14,3 ± 0,7% 60 ± 29%	55,5 ± 2,6% 114 ± 1,7%

5

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde dicho compuesto es cristalino.
3. El compuesto de la reivindicación 2, en donde dicho compuesto **se caracteriza por** uno o más de los picos siguientes en un patrón de difracción de rayos X: 6,3, 9,2, 11,5, 13,3, 13,8, 14,2, 14,8, 16,2, 18,2, 18,7, y 19,8.
4. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 5. La composición de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende adicionalmente un agente quimioterapéutico o anti-proliferativo, un agente anti-inflamatorio, un agente para el tratamiento de la aterosclerosis, o un agente para el tratamiento de la fibrosis pulmonar.
6. Un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, o una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto, para uso en el tratamiento o alivio de la gravedad de un trastorno proliferativo en un paciente.
- 15 7. El compuesto o la composición para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicho trastorno es cáncer metastásico.
8. El compuesto o la composición para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicho trastorno es un glioblastoma; un carcinoma gástrico; o un cáncer seleccionado de cáncer de colon, mama, próstata, cerebro, hígado, páncreas o pulmón.
- 20 9. El compuesto o la composición para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho trastorno es carcinoma hepatocelular.