

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 739**

51 Int. Cl.:

A61K 31/44 (2006.01)

A61P 17/06 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2003 E 03707846 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2013 EP 1478358**

54 Título: **Sorafenib-tosilato para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por angiogénesis anormal**

30 Prioridad:

11.02.2002 US 354950 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.10.2013

73 Titular/es:

**BAYER HEALTHCARE LLC (100.0%)
555 WHITE PLAINS ROAD
TARRYTOWN, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

**DUMAS, JACQUES;
SCOTT, WILLIAM J.;
ELTING, JAMES y
HATOUM-MAKDAD, HOLIA**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 425 739 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

Sorafenib-tosilato para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por angiogénesis anormal.

Campo de la Invención

5 Esta invención se refiere a compuestos para tratamiento de enfermedades mediadas por el camino de transducción de señales inducidas por VEGF, caracterizadas por procesos anormales de angiogénesis o hiperpermeabilidad.

Antecedentes de la Invención

10 La vasculogénesis implica la formación *de novo* de vasos sanguíneos a partir de precursores de células endoteliales o angioblastos. Las primeras estructuras vasculares en el embrión se forman por vasculogénesis. La angiogénesis implica el desarrollo de capilares a partir de vasos sanguíneos existentes, y es el principal mecanismo por el cual se vascularizan órganos tales como el cerebro y el riñón. Mientras que la vasculogénesis está restringida al desarrollo del embrión, la angiogénesis puede ocurrir en el adulto, por ejemplo durante el embarazo, el ciclo femenino, o la curación de las heridas.

15 Un regulador importante de angiogénesis y vasculogénesis tanto en el desarrollo del embrión como en algunas enfermedades de dependencia angiogénica es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF; denominado también factor de permeabilidad vascular, VPF). VEGF representa una familia de isoformas de mitógenos existentes en formas homodímeras debido a remodelación alternativa del RNA. Las isoformas de VEGF son altamente específicas para las células endoteliales vasculares (para revisiones, véase: Farrara et al. *Endocr. Rev.* **1992**, 13, 18; Neufeld et al. *FASEB J.* **1999**, 13, 9).

20 La expresión de VEGF es inducida por hipoxia (Shweiki et al. *Nature* **1992**, 359, 843), así como por una diversidad de citoquinas y factores de crecimiento, tales como interleuquina-1, interleuquina-6, factor del crecimiento epidérmico y factor α y β del crecimiento transformante.

25 Hasta la fecha, se ha comunicado que VEGF y los miembros de la familia VEGF se fijan a una o más de tres tirosina-quinazas receptoras transmembranales (Mustonen et al. *J. Cell Biol.*, **1995**, 129, 895), el receptor-1 de VEGF (conocido también como flt-1 (tirosina-quinasa-1 similar a fms)), VEGFR-2 (conocido también como receptor que contiene el dominio de inserción de quinazas (KDR); el análogo murino de KDR es conocido como quinasa-1 de hígado fetal (flk-1)), y VEGFR-3 (conocido también como flt-4). Se ha demostrado que KDR y flt-1 tienen propiedades diferentes de transducción de señales (Walterberger et al. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 26988); Park et al. *Oncogene* **1995** 10, 135). Así, KDR sufre fosforilación fuerte de la tirosina dependiente de ligandos en células intactas, mientras que flt-1 exhibe una respuesta débil. Así pues, la fijación a KDR es un requisito crítico para la inducción del espectro total de respuestas biológicas mediadas por VEGF.

35 *In vivo*, VEGF juega un papel fundamental en la vasculogénesis, e induce angiogénesis y permeabilización de los vasos sanguíneos. La expresión descontrolada de VEGF contribuye al desarrollo de cierto número de enfermedades que se caracterizan por procesos anormales de angiogénesis y/o hiperpermeabilidad. La regulación de la cascada de transducción de señales mediadas por VEGF proporcionará por tanto un modo útil para controlar los procesos anormales de angiogénesis y/o hiperpermeabilidad.

40 La angiogénesis está considerado como un requisito previo absoluto para crecimiento de tumores más allá de aproximadamente 1-2 mm. El oxígeno y los nutrientes pueden ser suministrados a las células tumorales menores que este límite por difusión. Sin embargo, todos los tumores dependen de la angiogénesis para crecimiento continuado después que los mismos han alcanzado cierto tamaño. Las células tumorígenas dentro de las regiones hipóxicas de los tumores responden por estimulación de la producción de VEGF, que desencadena la activación de células endoteliales en reposo para estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos. (Shweiki et al. *Proc. Nat'l. Acad. Sci.*, **1995**, 92, 768). Adicionalmente, la producción de VEGF en regiones de tumor en las que no existe angiogénesis alguna puede transcurrir por el camino de transducción de señales ras (Grugel et al. *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270, 25915; Rak et al. *Cancer Res* **1995**, 55, 4575). Estudios de hibridación *in situ* han demostrado que el mRNA de VEGF está fuertemente regulado en sentido creciente en una gran diversidad de tumores humanos, que incluyen carcinomas de pulmón (Mattern et al. *Br. J. Cancer* **1996**, 73, 931), tiroides (Viglietto et al. *Oncogene* **1995**, 11, 1569), mama (Brown et al. *Human Pathol.* **1995**, 26, 86), tracto gastrointestinal (Brown et al. *Cancer Res.* **1993**, 53, 4727; Suzuki et al. *Cancer Res.* **1996**, 56, 3004), riñón y vejiga (Brown et al. *Am. J. Pathol.* **1993**, 1431, 1255), ovario (Olson et al. *Cancer Res.* **1994**, 54, 1255), y cervical (Guidi et al. *J. Nat'l Cancer Inst.* **1995**, 87, 12137), así como angiosarcoma (Hashimoto et al. *Lab. Invest.* **1995**, 73, 859) y varios tumores intracraneales (Plate et al. *Nature* **1992**, 359, 845; Phillips et al. *Int. J. Oncol.* **1993**, 2, 913; Berkman et al. *J. Clin. Invest.*, **1993**, 91, 153). Se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales neutralizantes para KDR son eficaces en el bloqueo de la angiogénesis de los tumores (Kim et al. *Nature* **1993**, 362, 841; Rockwell et al. *Mol. Cell. Differ.* **1995**, 3, 315).

55 La sobreexpresión de VEGF, por ejemplo en condiciones de hipoxia extrema, puede conducir a angiogénesis intracelular, dando como resultado la hiperproliferación de vasos sanguíneos, que conduce finalmente a ceguera. Una cascada de eventos de este tipo se ha observado para cierto número de retinopatías, que incluyen retinopatía dia-

bética, oclusión isquémica de la vena retinal, retinopatía de la premadurez (Aiello et al. *New Engl. J. Med.* **1994**, 331, 1480; Peer et al. *Lab. Invest.* **1995**, 72, 638), y degeneración macular relacionada con la edad (AMD; véase, Lopez et al. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1996**, 37, 855).

5 En la artritis reumatoide (RA), el crecimiento hacia dentro del pannus vascular puede estar mediado por la producción de factores angiogénicos. Los niveles de VEGF inmunorreactivo son altos en el fluido sinovial de los pacientes de RA, mientras que los niveles de VEGF eran bajos en el fluido sinovial de pacientes con otras formas de artritis o con enfermedad degenerativa de las articulaciones (Koch et al. *J. Immunol.* **1994**, 152, 4149). Se ha demostrado que el inhibidor de la angiogénesis AGM-170 previene la neovascularización de la articulación en el modelo de la artritis de la rata por colágeno (Peacock et al. *J. Exper. Med.* **1992**, 175, 1135).

10 Se ha demostrado también la expresión incrementada de VEGF en la piel psoriásica, así como trastornos bulosos asociados con la formación de ampollas subepidérmicas, tales como penfigoide buloso, eritema multiforme, y dermatitis herpetiforme (Brown et al. *J. Invest. Dermatol.* **1995**, 104, 744).

15 Dado que la inhibición de KDR conduce a inhibición de la angiogénesis y la permeabilización mediadas por VEGF, los inhibidores de KDR serán útiles en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por procesos anormales de angiogénesis y/o hiperpermeabilidad, con inclusión de las enfermedades arriba enumeradas.

Strumberg et al. (Proc. A.M.A.A.C.R.; marzo 2001, 42, 543) describe el compuesto de arilurea Bay 43-9006 como un agente potente para tratar enfermedades mediadas por raf, tales como el carcinoma hepatocelular.

Sumario de la Invención

20 La presente invención proporciona el compuesto tosilato de N-(4-cloro-3-(trifluorometil)fenil)-N'-(4-(2-(N-metilcarbamoil)-4-piridiloxi)fenil)urea para uso en el tratamiento de enfermedades mediadas por el camino de transducción de señales inducidas por VEGF.

Una persona con experiencia ordinaria en la técnica reconocerá que el compuesto utilizado en la invención puede existir en formas isómeras geométricas diferentes.

25 La formación de profármacos está bien conocida en la técnica a fin de mejorar las propiedades del compuesto padre; tales propiedades incluyen solubilidad, absorción, bioestabilidad y tiempo de liberación (véase "*Pharmaceutical Dosage Form and Drug Delivery Systems*" (6ª Edición), editado por Ansel et al., publicado por Williams & Wilkins, páginas 27-29 (1995). Los profármacos utilizados comúnmente de los compuestos de oxazolil-fenil-2,4-diaminopirimidina dados a conocer están diseñados para aprovechar la ventaja de las reacciones principales de biotransformación de fármacos y deben considerarse también dentro del alcance de la invención. Las reacciones principales de biotransformación de fármacos incluyen N-desalquilación, O-desalquilación, hidroxilación alifática, hidroxilación aromática, N-oxidación, S-oxidación, desaminación, reacciones de hidrólisis, glucuronidación, sulfatación y acetilación (véase *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (novena edición), editor Molinoff et al., publicado por McGraw-Hill, páginas 11-13, (1996).

30 La invención se refiere también al uso del compuesto para el tratamiento y prevención de enfermedades, por ejemplo, trastornos de angiogénesis en mamíferos por administración de este compuesto o una composición farmacéutica que comprende este compuesto.

40 El compuesto utilizado en la invención puede administrarse simultáneamente con otro agente inhibidor de la angiogénesis a un paciente con un trastorno de este tipo, en la misma formulación o, más típicamente, en formulaciones separadas y, a menudo, utilizando rutas de administración diferentes. La administración puede realizarse también secuencialmente, en cualquier orden.

El compuesto utilizado en la invención puede administrarse en tándem con otro agente inhibidor de la angiogénesis, en donde un compuesto de acuerdo con la invención puede administrarse a un paciente una vez al día o más durante hasta 28 días consecutivos con la administración simultánea o intermitente de otro agente inhibidor de la angiogénesis a lo largo del mismo periodo de tiempo total.

45 El compuesto utilizado en la invención puede administrarse a un paciente en una dosis oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, o parenteral que puede variar desde 0,1 a 200 mg/kg de peso corporal total y el agente adicional inhibidor de la angiogénesis puede administrarse a un paciente en una dosis intravenosa, intramuscular, subcutánea, o parenteral que puede variar desde 0,1 mg a 200 mg/kg de peso corporal del paciente.

50 Una realización de la presente invención es el tratamiento de enfermedades en humanos y/u otros mamíferos que están mediadas por el camino de transducción de señales inducidas por VEGF, que comprende administrar el compuesto utilizado en esta invención a un humano u otro mamífero.

Otra realización de esta invención es el tratamiento de enfermedades en humanos y/u otros mamíferos que se caracterizan por procesos anormales de angiogénesis o hiperpermeabilidad con el compuesto usado en esta invención a un humano u otro mamífero.

Otra realización de esta invención es el tratamiento de enfermedades en humanos y/u otros mamíferos que se caracterizan por procesos anormales de angiogénesis o hiperpermeabilidad, que no están mediadas por raf, que comprende administrar el compuesto utilizado en esta invención a un humano u otro mamífero.

- 5 Otra realización de esta invención es el tratamiento de enfermedades en humanos y/u otros mamíferos que se caracterizan por procesos anormales de angiogénesis o hiperpermeabilidad, que no están mediados por raf o mediadas por p38, que comprende administrar el compuesto usado en esta invención a un humano u otro mamífero.

Otra realización de esta invención es el tratamiento de enfermedades en humanos y/u otros mamíferos que se caracterizan por procesos anormales de angiogénesis o hiperpermeabilidad, que están mediadas por raf y/o mediadas por p38, que comprende administrar el compuesto usado en esta invención a un humano u otro mamífero.

- 10 Otra realización de esta invención es el tratamiento de una o más de las afecciones siguientes en humanos y/u otros mamíferos: crecimiento de tumores, retinopatía, con inclusión de retinopatía diabética, oclusión isquémica de la vena retinal, retinopatía de la premadurez y degeneración macular relacionada con la edad; artritis reumatoide, psoriasis, o trastorno buloso asociado con la formación de ampollas subepidérmicas, con inclusión de penfigoide buloso, eritema multiforme, o dermatitis herpetiforme, que comprende administrar el compuesto usado en esta invención a un humano u otro mamífero que presenta una o más de estas afecciones.

- 15 Otra realización de esta invención es el tratamiento de una o más de las afecciones siguientes en humanos y/u otros mamíferos: crecimiento de tumores, retinopatía, retinopatía diabética, oclusión isquémica de la vena retinal, retinopatía de la premadurez y degeneración macular relacionada con la edad; artritis reumatoide, psoriasis, trastorno buloso asociado con formación de ampollas subepidérmicas, penfigoide buloso, eritema multiforme, y dermatitis herpetiforme, en combinación con otra afección seleccionada del grupo constituido por:

- 25 fiebre reumática, resorción ósea, osteoporosis postmenopáusicas, sepsis, sepsis gram-negativa, choque séptico, choque endotóxico, síndrome de choque tóxico, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, enfermedad inflamatoria del intestino (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), reacción de Jarisch-Herxheimer, asma, síndrome de dificultad respiratoria de los adultos, enfermedad fibrótica pulmonar aguda, sarcoidosis pulmonar, enfermedad respiratoria alérgica, silicosis, pneumoconiosis de los mineros del carbón, lesión alveolar, insuficiencia hepática, enfermedad hepática durante inflamación aguda, hepatitis alcohólica grave, malaria (malaria por Plasmodium falciparum y malaria cerebral), diabetes mellitus no dependiente de insulina (NIDDM), insuficiencia cardíaca congestiva, deterioro después de enfermedad cardíaca, aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer, encefalitis aguda, lesión cerebral, esclerosis múltiple (desmielinación y pérdida de oligodendrocitos en la esclerosis múltiple),
- 30 cáncer avanzado, enfermedad maligna linfóide, pancreatitis, curación empeorada de las heridas en infección, inflamación y cáncer, síndromes mielodisplásicos, lupus eritematoso sistémico, cirrosis biliar, necrosis intestinal, lesión/toxicidad por radiación después de la administración de anticuerpos monoclonales, reacción de rechazo inverso (lesión isquemia-reperfusion y rechazos de aloinjertos de riñón, hígado, corazón, y piel), rechazo de aloinjerto pulmonar (bronquitis obliterante) o complicaciones debidas a sustitución total de cadera. Esto comprende
- 35 administrar el compuesto usado en esta invención a un humano u otro mamífero con una de las combinaciones de afecciones anteriores.

Otra realización de esta invención es el tratamiento de una o más de las afecciones siguientes en humanos y/u otros mamíferos:

- 40 crecimiento de tumores, retinopatía, retinopatía diabética, oclusión isquémica de la vena retinal, retinopatía de la premadurez, degeneración macular relacionada con la edad; artritis reumatoide, psoriasis, trastorno buloso asociado con formación de ampollas subepidérmicas, penfigoide buloso, eritema multiforme, y dermatitis herpetiforme,

en combinación con una enfermedad infecciosa seleccionada del grupo constituido por:

- 45 tuberculosis, infección de Helicobacter pylori durante la enfermedad de úlcera péptica, enfermedad de Chaga's resultante de infección de Trypanosoma cruzi, efectos de la toxina similar a Shiga resultante de infección de E. coli, efectos de la enterotoxina A resultante de infección de Staphylococcus, infección meningocócica, e infecciones de Borrelia burgdorferi, Treponema pallidum, citomegalovirus, virus de la gripe, virus de la encefalitis de Theiler, y virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). Éste comprende administrar el compuesto utilizado en esta invención a un humano u otro mamífero que presenta una combinación de una de las enfermedades infecciosas
- 50 anteriores y una de las enfermedades anteriores caracterizada por procesos anormales de angiogénesis o hiperpermeabilidad.

Se describen adicionalmente kits que comprenden dosis separadas de los dos agentes quimioterapéuticos mencionados en envases separados. Las combinaciones de agentes inhibidores de la angiogénesis pueden formarse también in vivo, v.g., en el cuerpo de un paciente.

- 55 Estos agentes inhibidores de la angiogénesis pueden administrarse en las formulaciones y regímenes convencionales en los que se conocen los mismos para utilización sola.

Las condiciones en un humano u otro animal que pueden tratarse por administración del compuesto utilizado en esta invención son las caracterizadas por procesos anormales de angiogénesis o hiperpermeabilidad. Las condiciones a

tratar incluyen crecimiento de tumores, retinopatía, con inclusión de retinopatía diabética, oclusión isquémica de la vena retinal, retinopatía de la premadurez y degeneración macular relacionada con la edad; artritis reumatoide, psoriasis, o un trastorno buloso asociado con formación de ampollas subepidérmicas, con inclusión de penfigoide buloso, eritema multiforme, y dermatitis herpetiforme.

5 Se incluye el tratamiento de combinaciones de las afecciones anteriores (crecimiento tumoral, retinopatía, retinopatía diabética, oclusión isquémica de la vena retinal, retinopatía de la premadurez, degeneración macular relacionada con la edad; artritis reumatoide, psoriasis, trastorno buloso asociado con formación de ampollas subepidérmicas, penfigoide buloso, eritema multiforme, y dermatitis herpetiforme, y otra afección seleccionada del grupo constituido por:

10 fiebre reumática, resorción ósea, osteoporosis postmenopáusica, sepsis, sepsis gram-negativa, choque séptico, choque endotóxico, síndrome de choque tóxico, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, enfermedad inflamatoria del intestino (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), reacción de Jarisch-Herxheimer, asma, síndrome de dificultad respiratoria de los adultos, enfermedad fibrótica pulmonar aguda, sarcoidosis pulmonar, enfermedad respiratoria alérgica, silicosis, pneumoconiosis de los mineros del carbón, lesión alveolar, insuficiencia hepática, enfermedad hepática durante inflamación aguda, hepatitis alcohólica grave, malaria (malaria por *Plasmodium falciparum* y malaria cerebral), diabetes mellitus no dependiente de insulina (NIDDM), insuficiencia cardíaca congestiva, deterioro después de enfermedad cardíaca, aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer, encefalitis aguda, lesión cerebral, esclerosis múltiple (desmielinación y pérdida de oligodendrocitos en la esclerosis múltiple), cáncer avanzado, enfermedad maligna linfóide, pancreatitis, curación empeorada de las heridas en infección, inflamación y cáncer, síndromes mielodisplásicos, lupus eritematoso sistémico, cirrosis biliar, necrosis intestinal, lesión/toxicidad por radiación después de la administración de anticuerpos monoclonales, reacción de rechazo inverso (lesión isquemia-reperfusión y rechazos de aloinjertos de riñón, hígado, corazón, y piel), rechazo de aloinjerto pulmonar (bronquitis obliterante) o complicaciones debidas a sustitución total de cadera.

25 Se proporciona también el tratamiento de combinaciones de las afecciones anteriores (crecimiento de tumores, retinopatía, retinopatía diabética, oclusión isquémica de la vena retinal, retinopatía de la premadurez, degeneración macular relacionada con la edad; artritis reumatoide, psoriasis, trastorno buloso asociado con formación de ampollas subepidérmicas, penfigoide buloso, eritema multiforme, y dermatitis herpetiforme) y una enfermedad infecciosa seleccionada del grupo constituido por:

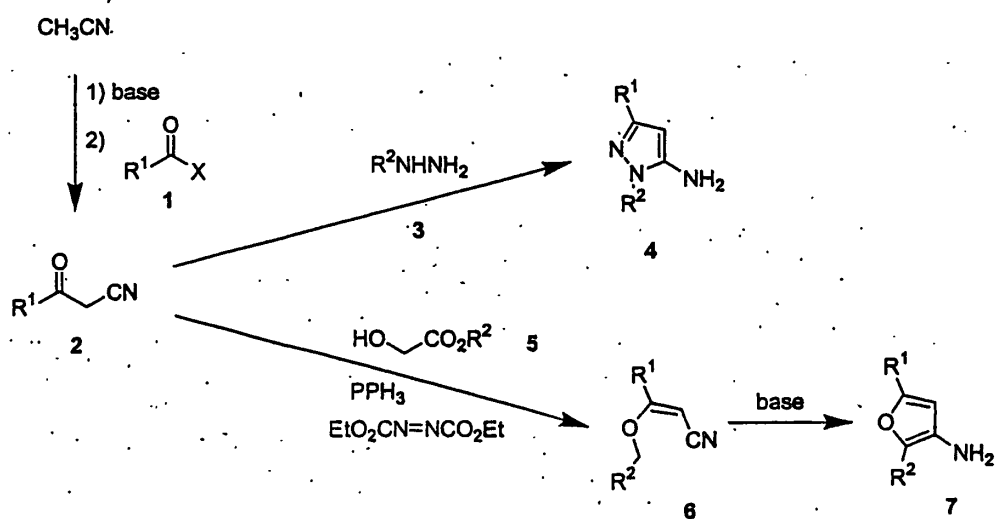
30 tuberculosis, infección de *Helicobacter pylori* durante la enfermedad de úlcera péptica, enfermedad de Chaga's resultante de infección de *Trypanosoma cruzi*, efectos de la toxina similar a Shiga resultante de infección de *E. coli*, efectos de la enterotoxina A resultante de infección de *Staphylococcus*, infección meningocócica, e infecciones de *Borrelia burgdorferi*, *Treponema pallidum*, citomegalovirus, virus de la gripe, virus de la encefalitis de Theiler, y virus de la inmunodeficiencia humana (HIV).

35 Los compuestos utilizados en esta invención pueden producirse de acuerdo con métodos químicos convencionales, y/o como se describe más adelante, a partir de material primas que están disponibles comercialmente o pueden producirse de acuerdo con métodos químicos convencionales rutinarios. Métodos generales para la preparación de compuestos se dan a continuación, y se ilustran específicamente en los ejemplos.

40 Las ureas descritas en esta memoria pueden prepararse por una diversidad de métodos simples conocidos en la técnica. Métodos generales para la formación de dichos compuestos pueden encontrarse en "*Advanced Organic Chemistry*", POR J. March, *John Wiley and Sons*, 1985 y en "*Comprehensive Organic Transformations*", por R. C. Larock, *VCH Publishers*, 1989). Sin embargo, se presentan los métodos preparativos generales siguientes para ayudar a un experto en la técnica en la síntesis de estos compuestos, presentándose ejemplos más detallados en la sección experimental que describe los ejemplos prácticos.

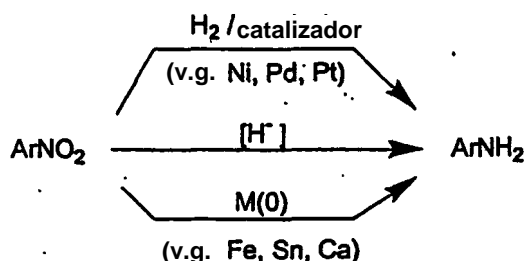
Métodos Preparativos Generales

45 Las aminas heterocíclicas pueden sintetizarse utilizando metodología conocida (Katritzky, et al. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, Pergamon Press: Oxford, RU (1984). March. *Advanced Organic Chemistry*, 3ª edición; John Wiley: Nueva York (1985)). Por ejemplo, como se muestra en el Esquema I, los 5-aminopirazoles sustituidos en la posición N-1 con restos arilo o heteroarilo pueden sintetizarse por la reacción de una α -cianocetona (**2**) con la aril- o heteroaril-hidrazina apropiada (**3**, R² = arilo o heteroarilo). La cianocetona **2**, a su vez, está disponible por la reacción del ion acetamidato con un acil-derivado apropiado, tal como un éster, un haluro de ácido, o un anhídrido de ácido. En los casos en que el resto R² ofrece estabilización adecuada del anión, los 2-aril- y 2-heteroaril-furanos pueden sintetizarse por una reacción de Mitsunobu de la cianocetona **2** con el alcohol **5**, seguida por ciclación catalizada por bases del enol-éter **6** para dar la furilamina **7**.



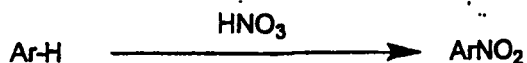
Esquema I. Métodos Generales Seleccionados para Síntesis de Aminas Heterocíclicas

- Las anilinas sustituidas se pueden generar utilizando métodos estándar (March, *Advanced Organic Chemistry*, 3ª edición; John Wiley: Nueva York (1985). Larock. *Comprehensive Organic Transformations*; VCH Publishers: Nueva York (1989)). Como se muestra en el Esquema II, las aril-aminas se sintetizan comúnmente por reducción de nitroarilos utilizando un catalizador metálico, tal como Ni, Pd, o Pt, y H₂ o un agente de transferencia de hidruro, tal como formiato, ciclohexadieno, o un borohidruro (Rylander, *Hydrogenation Methods*; Academic Press, Londres, RU (1985)). Los nitroarilos pueden reducirse también directamente utilizando una fuente de hidruro fuerte, tal como LiAlH₄ (Seyden-Penne. *Reductions by the Alumino- and Borohydrides in Organic Synthesis*; VCH Publishers: Nueva York (1991)), o utilizando un metal de valencia cero, tal como Fe, Sn o Ca, a menudo en medio ácido. Existen muchos métodos para la síntesis de nitroarilos (March. *Advanced Organic Chemistry*, 3ª edición; John Wiley: Nueva York (1985). Larock. *Comprehensive Organic Transformations*; VCH Publishers: Nueva York (1989)).

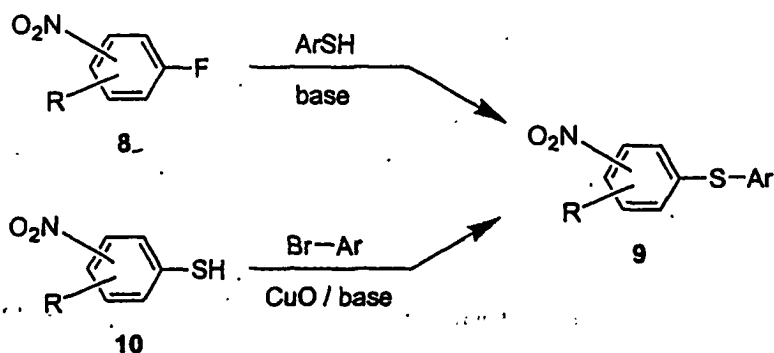


Esquema II Reducción de Nitroarilos a Arilaminas

- 15 Los nitroarilos se forman comúnmente por nitración aromática electrófila utilizando HNO₃, o una fuente alternativa de NO₂⁺. Los nitro-arilos pueden elaborarse ulteriormente antes de la reducción. Así, los nitroarilos sustituidos con

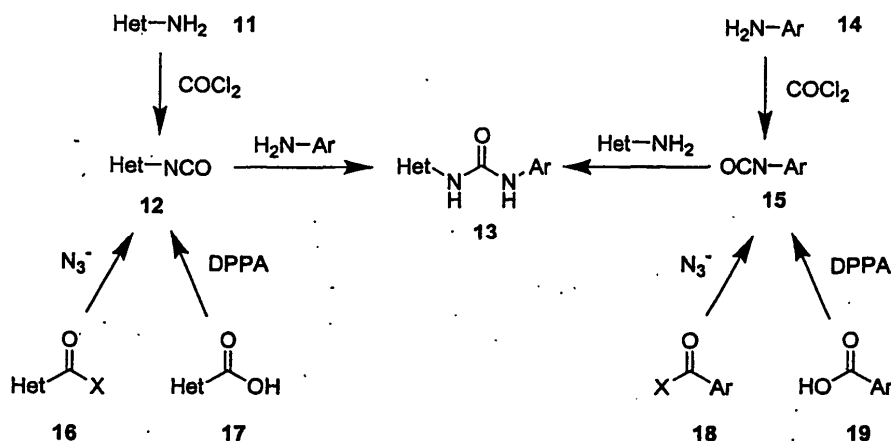


- 20 grupos lábiles potenciales (v.g. F, Cl, Br, etc.) pueden sufrir reacciones de sustitución por tratamiento con nucleófilos, tales como tiolato (ilustrado en el Esquema III) o fenóxido. Los nitroarilos pueden sufrir también reacciones de acoplamiento de tipo Ullman (Esquema III).



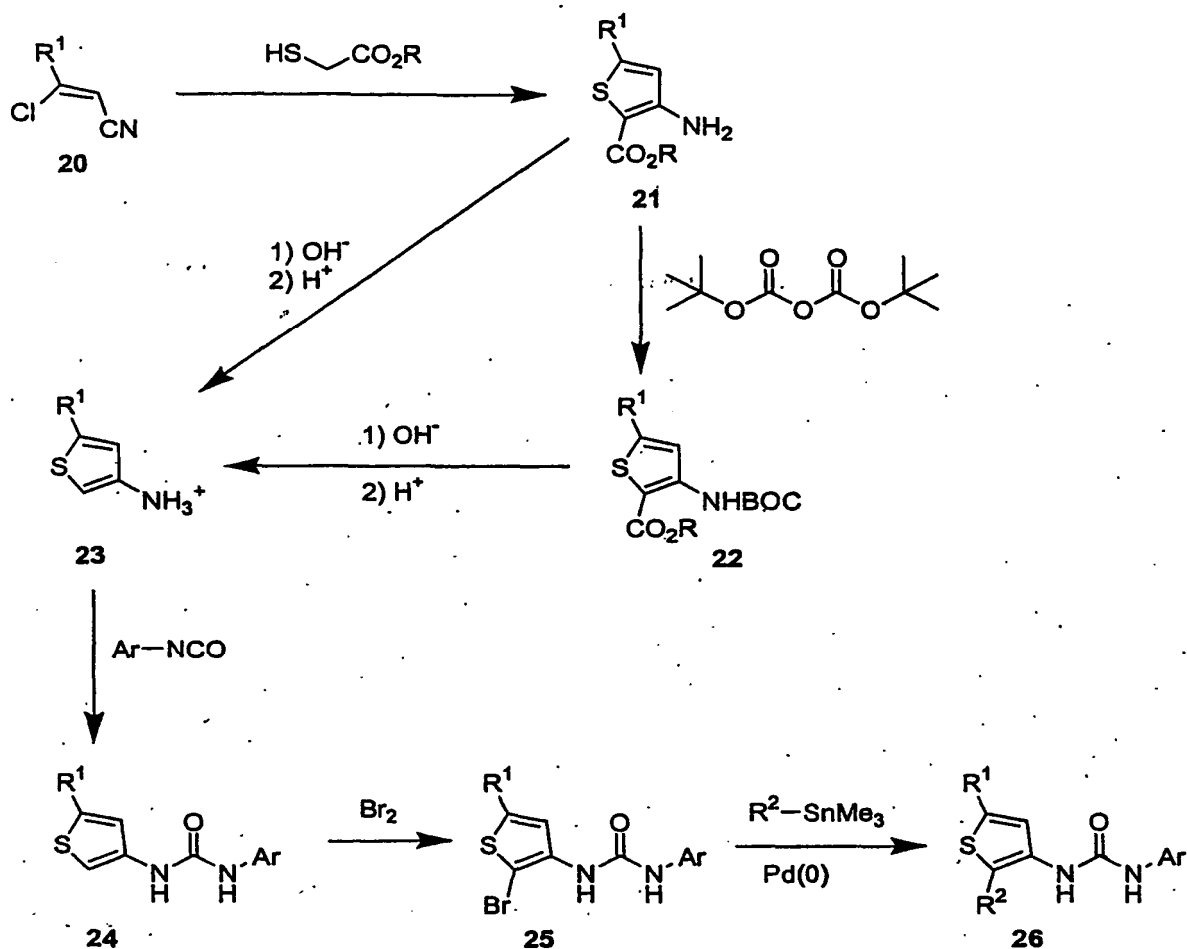
Esquema III Sustitución Aromática Nucleófila Seleccionada utilizando Nitroarilos

Como se muestra en el Esquema IV, la formación de ureas pueden implicar reacción de un heteroaril-isocianato (**12**) con una aril-amina (**11**). El heteroaril-isocianato pueden sintetizarse a partir de una heteroaril-amina por tratamiento con fosgeno o con un equivalente de fosgeno, tal como cloroformiato de triclorometilo (difosgeno), carbonato de bis(triclorometilo) (trifosgeno), o N,N'-carbonildiimidazol (CDI). El isocianato puede derivarse también de un derivado de ácido carboxílico heterocíclico tal como un éster, un haluro de ácido o un anhídrido por una transposición de tipo Curtius. Así, la reacción del derivado de ácido **16** con una fuente de acida, seguida por transposición proporciona el isocianato. El ácido carboxílico (**17**) correspondiente puede someterse también a transposiciones de tipo Curtius utilizando difenilfosforil-acida (DPPA) o un reactivo similar. Puede generarse también una urea por la reacción de un aril-isocianato (**15**) con una amina heterocíclica.



Esquema IV Métodos Seleccionados de Formación de Ureas (Het = heterociclo)

Por último, las ureas pueden manipularse ulteriormente utilizando métodos familiares para los expertos en la técnica. Por ejemplo, las 2-aril y 2-heteroariltienil-ureas están disponibles a partir de la correspondiente 2-halotienil-urea por reacciones de acoplamiento cruzado mediadas por metales de transición (ilustradas con 2-bromotiofeno **25**, Esquema V). Así, la reacción del nitrilo **20** con un éster α -tioacetato da el 3-amino-2-tiofenocarboxilato **21** sustituido en posición 5 (Ishizaki et al. JP 6.025.221). La descarboxilación del éster **21** puede realizarse por protección de la amina, por ejemplo como el *tert*-butoxi (BOC) carbamato (**22**), seguido por saponificación y tratamiento con ácido. Cuando se utiliza protección con BOC, la descarboxilación puede ir acompañada por desprotección, dando la sal de 3-tiofenoamonio sustituida **23**. Alternativamente, la sal de amonio **23** puede generarse directamente por saponificación del éster **21** seguida por tratamiento con ácido. Después de la formación de urea como se ha descrito arriba, la bromación proporciona el halotiofeno penúltimo **25**. El acoplamiento cruzado mediado por paladio del tiofeno **25** con un tributil- o trimetil-estaño apropiado (R^2 = arilo o heteroarilo) proporciona luego la 2-aril- o 2-heteroariltienil-urea deseada.



Esquema V Síntesis e Interconversión de Ureas

Por último, las ureas pueden manipularse ulteriormente utilizando métodos familiares para los expertos en la técnica.

5 El compuesto puede administrarse por vía oral, tópica, parenteral, por inhalación o pulverización o por vía vaginal, sublingual, o rectal en formulaciones de dosificación unitarias.

El término 'administración por inyección' incluye inyecciones intravenosas, intramusculares, subcutáneas y parenterales, así como el uso de técnicas de infusión. La administración dérmica puede incluir aplicación tópica o administración transdérmica. Pueden estar presentes uno o más compuestos en asociación con uno o más portadores no tóxicos farmacéuticamente aceptables y, en caso deseado, otros ingredientes activos.

10 Las composiciones propuestas para uso oral se pueden preparar de acuerdo con cualquier método adecuado conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas. Tales composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados del grupo constituido por diluyentes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes y agentes de preservación a fin de proporcionar preparaciones agradables al paladar. Las tabletas contienen el ingrediente activo en mezcla con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables que son adecuados para la fabricación de tabletas. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes de granulación y desintegrantes, por ejemplo, almidón de maíz, celulosa microcristalina, carboximetil-celulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o ácido alginico; y agentes aglomerantes, por ejemplo estearato de magnesio, ácido esteárico o talco y lubricantes/agentes tensioactivos tales como lauril-sulfato de sodio. Las tabletas pueden carecer de recubrimiento o pueden estar recubiertas por técnicas conocidas para retardar la desintegración y adsorción en el tracto gastrointestinal y proporcionar con ello una acción sostenida durante un periodo de tiempo más largo. Por

15 ejemplo, puede emplearse un material de retardo temporal tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. Estos compuestos se pueden preparar también en forma sólida, que se libera rápidamente.

25 Las formulaciones para uso oral pueden presentarse también como cápsulas de gelatina dura en las cuales el ingrediente activo está mezclado con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o

caolín, o como cápsulas de gelatina blanda en las cuales el ingrediente activo está mezclado con agua o con un medio aceitoso, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de parafina o aceite de oliva.

5 Las suspensiones acuosas contienen los materiales activos en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Tales excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropil-metilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacantos y goma arábica; agentes dispersantes o humectantes pueden ser un fosfátido existente naturalmente, por ejemplo, lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileno con ácidos grasos, por ejemplo poli(estearato de oxietileno), o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena

10 parciales derivados de ácidos grasos y hexitol tales como poli(monooleato de oxietileno-sorbitol), o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo poli(monooleato de etilensorbitán). Las composiciones acuosas pueden contener también uno o más conservantes, por ejemplo *p*-hidroxibenzoato de etilo o de *n*-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes saborizantes, y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

15 Los polvos y gránulos dispersables adecuados para preparación de una suspensión acuosa por adición de agua proporcionan el ingrediente activo en mezcla con un agente dispersante o humectante, agente de suspensión y uno o más conservantes. Agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados se ilustran por los ya mencionados anteriormente. También pueden estar presentes excipientes adicionales, por ejemplo, agentes edulcorantes, saborizantes y colorantes,.

20 El compuesto puede encontrarse también en la forma de formulaciones líquidas no acuosas, v.g., suspensiones aceitosas que pueden formularse por suspensión de los ingredientes activos en un aceite vegetal, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de cacahuete, o en un aceite mineral tal como aceite de parafina. Las suspensiones aceitosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Pueden añadirse agentes edulcorantes tales como los indicados anteriormente, y agentes

25 saborizantes para proporcionar preparaciones orales agradables al paladar. Estas composiciones pueden preservarse por la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico.

30 Las composiciones farmacéuticas pueden encontrarse también en la forma de emulsiones de aceite en agua. La fase aceitosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo aceite de oliva o aceite de cacahuete, o un aceite mineral, por ejemplo aceite de parafina o mixturas de éstos. Agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas existentes naturalmente, por ejemplo, goma arábica o goma tragacanto, fosfátidos existentes naturalmente, por ejemplo haba de soja, lecitina, y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de sorbitán, y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo poli(monooleato de oxietileno-sorbitán). Las emulsiones pueden contener también agentes edulcorantes y

35 Pueden formularse jarabes y elixires con agentes edulcorantes, por ejemplo glicerol, propileno-glicol, sorbitol o sacarosa. Tales formulaciones pueden contener también un demulcente, un conservante y agentes saborizantes y colorantes.

40 El compuesto puede formularse también en la forma de supositorios para administración rectal o vaginal del fármaco. Estas composiciones se pueden preparar por mezcla del fármaco con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a las temperaturas ordinarias pero líquido a la temperatura rectal o vaginal y por consiguiente fundirá en el recto o la vagina para liberar el fármaco. Tales materiales incluyen manteca de cacao y polietileno-glicoles.

45 El compuesto se puede administrar también por vía transdérmica utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo: Chien; "Transdermal Controlled Systemic Medications"; Marcel Dekker, Inc.; 1987. Lipp et al WO94/041157, 3 mar 94). Por ejemplo, una solución o suspensión del compuesto utilizado en la invención en un disolvente volátil adecuado que contiene opcionalmente agentes mejoradores de la penetración puede combinarse con aditivos adicionales conocidos por los expertos en la técnica, tales como materiales matriz y bactericidas. Después de la esterilización, la mixtura resultante puede formularse siguiendo procedimientos conocidos en formas de dosificación. Adicionalmente, por tratamiento con agentes emulsionantes y agua, una solución o suspensión del compuesto puede formularse en una loción o pomada.

50 Disolventes adecuados para procesamiento de sistemas de suministro transdérmico son conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen alcoholes inferiores tales como etanol o alcohol isopropílico, cetonas inferiores tales como acetona, ésteres de ácidos carboxílicos inferiores tales como acetato de etilo, éteres polares tales como tetrahidrofurano, hidrocarburos inferiores tales como hexano, ciclohexano o benceno, o hidrocarburos halogenados tales como diclorometano, cloroformo, triclorotrifluoroetano, o triclorofluoroetano. Disolventes adecuados pueden

55 incluir también mixturas de uno o más materiales seleccionados de alcoholes inferiores, cetonas inferiores, ésteres de ácidos carboxílicos inferiores, éteres polares, hidrocarburos inferiores, e hidrocarburos halogenados.

Materiales mejoradores de la penetración adecuados para sistema de suministro transdérmico son conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, monohidroxi- o polihidroxi-alcoholes tales como etanol, propileno-glicol

o alcohol bencílico, alcoholes grasos C₈-C₁₈ saturados o insaturados tales como alcohol laurílico o alcohol cetílico, ácidos grasos C₈-C₁₈ saturados o insaturados tales como ácido esteárico, ésteres grasos saturados o insaturados que tienen hasta 24 carbonos tales como metil-, etil-, propil-, isopropil-, n-butil-, sec-butil-, isobutil-, tercbutil- o monogliceril-ésteres de ácido acético, ácido caprónico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido esteárico, o ácido palmítico, o diésteres de ácidos dicarboxílicos saturados o insaturados con un total de hasta 24 carbonos tales como adipato de diisopropilo, adipato de diisobutilo, sebacato de diisopropilo, maleato de diisopropilo, o fumarato de diisopropilo. Materiales mejoradores de la penetración adicionales incluyen fosfatidil-derivados tales como lecitina o cefalina, terpenos, amidas, cetonas, ureas y sus derivados, y éteres tales como dimetil-isosorbida y dietilenglicol-monoetil-éter. Formulaciones mejoradoras de la penetración adecuadas pueden incluir también mixturas de uno o más materiales seleccionados de monohidroxi- o polihidroxi-alcoholes, alcoholes grasos C₈-C₁₈ saturados o insaturados, ácidos grasos C₈-C₁₈ saturados o insaturados, ésteres grasos saturados o insaturados que contienen hasta 24 carbonos, diésteres de ácidos dicarboxílicos saturados o insaturados con un total de hasta 24 carbonos, fosfatidil-derivados, terpenos, amidas, cetonas, ureas y sus derivados, y éteres.

Materiales aglomerantes adecuados para sistemas de suministro transdérmico son conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen poliacrilatos, siliconas, poliuretanos, polímeros de bloques, copolímeros estireno-butadieno, y cauchos naturales y sintéticos. También pueden utilizarse éteres de celulosa, polietilenos derivatizados, y silicatos como componentes de la matriz. Pueden añadirse aditivos adicionales, tales como resinas o aceites viscosos para aumentar la viscosidad de la matriz.

Para todos los regímenes de uso dados a conocer en esta memoria para el compuesto, el régimen diario de dosificación oral será preferiblemente de 0,01 a 200 mg/kg de peso corporal total. La dosis diaria para administración por inyección, con inclusión de inyecciones intravenosas, intramusculares, subcutáneas y parenterales, y el uso de técnicas de infusión será preferiblemente de 0,01 a 200 mg/kg de peso corporal total. El régimen de dosificación vaginal diario será preferiblemente de 0,01 a 200 mg/kg de peso corporal total. El régimen de dosificación rectal diario será preferiblemente de 0,01 a 200 mg/kg de peso corporal total. El régimen de dosificación tópica diario será preferiblemente de 0,1 a 200 mg administrados entre 1 y 4 veces al día. La concentración transdérmica será preferiblemente la requerida para mantener una dosis diaria de 0,01 a 200 mg/kg. El régimen diario de dosificación por inhalación será preferiblemente de 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal total. Estos regímenes de dosificación pueden alcanzarse con dosis múltiples en un solo día o en dosificaciones prolongadas, tales como las administradas sobre una base semanal o mensual.

Será apreciado por los expertos en la técnica que el método particular de administración dependerá de una diversidad de factores, todos los cuales se consideran rutinariamente cuando se administran productos terapéuticos. Será apreciado también por una persona experta en la técnica que el nivel específico de dosis para cualquier paciente dado dependerá de una diversidad de factores, que incluyen la actividad del compuesto específico a emplear, la edad del paciente, el peso corporal del paciente, el estado general de salud del paciente, el sexo del paciente, la dieta del paciente, el momento de administración, la ruta de administración, la tasa de excreción, combinaciones de fármacos, y la gravedad de la afección que se somete a terapia.

Será apreciado adicionalmente por una persona experta en la técnica que el uso óptimo de tratamiento, es decir, el modo de tratamiento y el número diario de dosis de un compuesto de esta invención administradas durante un número definido de días, puede ser determinado por los expertos en la técnica utilizando tests de tratamiento convencionales.

Se entenderá, sin embargo, que el nivel específico de dosis para cualquier paciente particular dependerá de una diversidad de factores, que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo, la dieta, el momento de administración, la ruta de administración, y la tasa de selección, la combinación de fármacos y la gravedad de la afección sometida a terapia.

Preparaciones específicas del compuesto utilizado en esta invención han sido ya descritas en la bibliografía de patentes, y pueden adaptarse. Por ejemplo, Miller S. et al, "Inhibition of p38 Kinase using Symmetrical and Unsymmetrical Diphenyl Ureas" *PCT Int. Appl.* WO 99 32463, Miller, S et al. "Inhibition of raf Kinase using Symmetrical and Unsymmetrical Substituted Diphenyl Ureas" *PCT Int. Appl.*, WO 99 32436, Dumas, J. et al., "Inhibition of p38 Kinase Activity using Substituted Heterocyclic Ureas" *PCT Int. Appl.*, WO 99 32111, Dumas, J. et al., "Inhibition of RAF Kinase Activity using Substituted Heterocyclic Ureas" *PCT Int. Appl.*, WO 99 32106, Dumas, J. et al., "Method for the Treatment of Neoplasm by Inhibition of raf Kinase using N-Heteroaryl-N'-(hetero)arylureas" *PCT Int. Appl.*, WO 99 32106, Dumas, J. et al., "Inhibition of p38 Kinase Activity using Aryl- and Heteroaryl-Substituted Heterocyclic Ureas" *PCT Int. Appl.*, WO 9932110, Dumas, J., et al., "Inhibition of raf Kinase using Aryl- and Heteroaryl-Substituted Heterocyclic Ureas" *PCT Int. Appl.*, WO 99 32455, Riedl, B., et al., "O-Carboxy Aryl Substituted Diphenyl Ureas as raf Kinase Inhibitors" *PCT Int. Appl.*, WO 00 42012, Riedl, B., et al., "O-Carboxy Aryl Substituted Diphenyl Ureas as p38 Kinase Inhibitors" *PCT Int. Appl.*, WO 00 41698.

Métodos para preparación de los compuestos utilizados en esta invención se describen también en las solicitudes de patente U.S. siguientes, algunas de las cuales corresponden a las solicitudes PCT indicadas anteriormente.

- 08/863.022, presentada en 23 de mayo, 1997;
 08/996.344, presentada en 22 de diciembre, 1997;
 08/996.343, presentada en 22 de diciembre, 1997;
 08/996.181, presentada en 22 de diciembre, 1997;
 5 08/995.749, presentada en 22 de diciembre, 1997;
 08/995.750, presentada en 22 de diciembre, 1997;
 08/995.751, presentada en 22 de diciembre, 1997;
 09/083.399, presentada en 22 de mayo, 1998;
 09/425.228, presentada en 22 de octubre, 1999;
 10 09/777.920, presentada en 7 de febrero, 2001;
 09/722.418, presentada en 28 de noviembre, 2000;
 09/838.285, presentada en 20 de abril, 2001;
 09/838.286, presentada en 20 de abril, 2001;
 09/458.548, presentada en 12 de enero, 2001;
 15 09/948.915, presentada en 10 de septiembre, 2001, y
 Número de Serie (número de expediente de agente: Bayer 34 V-1), presentada en 3 de diciembre, 2001.

El compuesto utilizado en esta invención puede producirse por métodos conocidos (o a partir de materias primas que, a su vez, pueden producirse a partir de compuestos conocidos), v.g. por los métodos preparativos generales indicados más adelante. La actividad de un compuesto dado para inhibir la actividad de angiogénesis puede
 20 ensayarse rutinariamente, v.g., de acuerdo con procedimientos descritos más adelante.

Sin más elaboración, se cree que un experto en la técnica puede, utilizando la descripción que antecede, emplear la presente invención en su máxima extensión. Los ejemplos que siguen deben interpretarse, por tanto, como meramente ilustrativos y no como limitantes del resto de la exposición en modo alguno, cualquiera que sea éste. Los ejemplos que siguen tienen únicamente propósitos ilustrativos y no deben entenderse, ni deberían considerarse en
 25 absoluto como limitantes de la invención.

EJEMPLOS

Todas las reacciones se llevaron a cabo en material de vidrio secado a la llama o secado al horno bajo una presión positiva de argón seco o nitrógeno seco, y se agitaron magnéticamente a no ser que se indique otra cosa. Los líquidos y soluciones sensibles se transfirieron por medio de jeringuilla o cánula, y se introdujeron en las vasijas de
 30 reacción a través de membranas de caucho. A no ser que se indique otra cosa, el término 'concentración a presión reducida' hace referencia al uso de un evaporador rotativo Buchi aproximadamente a 15 mm Hg.

Todas las temperaturas se indican en grados Celsius (°C) sin corregir. A no ser que se indique otra cosa, todas las partes y porcentajes se expresan en peso.

Se utilizaron reactivos y disolventes de grado comercial sin purificación ulterior.

35 La cromatografía en capa delgada (TDC) se realizó sobre placas de gel de sílice 60A F-254 de 250 µm Whatman® prerrrecubiertas con respaldo de vidrio. La visualización de las placas se efectuó por una o más de las técnicas siguientes: (a) iluminación ultravioleta, (b) exposición a vapor de yodo, (c) inmersión de la placa en una solución al 10% de ácido fosfomolibdico en etanol seguida por calentamiento, (d) inmersión de la placa en una solución de sulfato de cerio seguida por calentamiento, y/o (e) inmersión de la placa en una solución etanólica ácida de 2,4-
 40 dinitrofenilhidracina seguida por calentamiento. La cromatografía en columna (cromatografía flash) se realizó utilizando gel de sílice de 230-400 mallas EM Science®.

Los puntos de fusión (p.f.) se determinaron utilizando un aparato de punto de fusión Thomas-Hoover o un aparato automático de punto de fusión Mettler FP66 y están sin corregir. Los espectros de resonancia magnética nuclear (NMR) del protón (¹H) se midieron con un espectrómetro General Electric GN-omega 300 (300 MHz) con Me₄Si (δ 0,00) o disolvente protonado residual (CHCl₃ δ 7,26; MeOH δ 3,30; DMSO δ 2,49) como patrón. Los espectros NMR del carbono (¹³C) se midieron con un espectrómetro General Electric GN-omega 300 (75 MHz) con disolvente (CDCl₃ δ MeOD d₃; δ 49,0; DMSO-d₆ δ 39,5) como patrón. Los espectros de masas (MS) de baja resolución y los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se obtuvieron como espectros de masas por impacto de electrones (EI) o como espectros de masas por bombardeo de átomos rápidos (FAB). Los espectros de masas por impacto de
 50 electrones (EI-MS) se obtuvieron con un espectrómetro de masas Hewlett Packard 5989A equipado con una Sonda de Ionización Química con Desorción Vacumetrics para introducción de la muestra. La fuente de iones se mantuvo a 250°C. La ionización por impacto de electrones se realizó con energía electrónica de 70 eV y una corriente de atrapamiento de 300 µA. Los espectros de masas de ion secundario cesio líquido (FAB-MS), una versión actualizada del bombardeo de átomos rápidos, se obtuvieron utilizando un espectrómetro Kratos Concept 1-H.

55 Los espectros de masas de ionización química (CI-MS) se obtuvieron utilizando un motor MS Hewlett Packard (5989A) con metano como el gas reactivo (1 x 10⁻⁴ torr a 2,5 x 10⁻⁴ torr). La sonda de ionización química con desorción por inserción directa (DCI) (Vacumetrics, llc.) se incrementó desde 0 a 1,5 amperios en 10 segundos y se mantuvo a 10 amperios hasta que desaparecieron todas las trazas de la muestra (~ 1-2 min). Los espectros se

escanearon desde 50 a 800 amu a 2 s por escaneo. Los espectros de masas por electropulverización-HPLC (HPLC ES-MS) se obtuvieron utilizando un instrumento HPLC Hewlett Packard 1100 equipado con una bomba cuaternaria, un detector de longitud de onda variable, una columna C-18, y un espectrómetro de masas con atrapamiento de iones Finnigan LCQ con ionización por pulverización electrónica. Los espectros se escanearon desde 120 a 800 amu utilizando un tiempo de ionización variable de acuerdo con el número de iones en la fuente.

Los espectros de cromatografía de gases-masas selectivos de iones (GC-MS) se obtuvieron con un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 equipado con una columna de metil-silicona HP-1 (recubrimiento 0,33 mM; 25 m x 0,2 mm) y un Detector Selectivo de Masas Hewlett Packard 5971 (energía de ionización 70 eV).

Los análisis elementales fueron realizados por Robertson Microlit Labs, Madison NJ. Todos los compuestos exhibían espectros NMR, LRMS y análisis elemental o HRMS consistente con las estructuras asignadas.

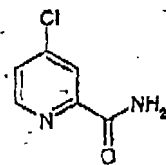
Lista de Abreviaturas y Acrónimos:

| | |
|-------------------|--|
| AcOH | ácido acético |
| anh | Anhidro |
| BOC | <i>tert</i> -butoxicarboxilo |
| conc | Concentrado |
| dec | Descomposición |
| DMPU | 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1h)-pirimidinona |
| DMF | <i>N,N</i> -dimetilformamida |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DPPA | difenilfosforil-acida |
| EtOAc | acetato de etilo |
| EtOH | etanol (100%) |
| Et ₂ O | Dietiléter |
| Et ₃ N | Trietilamina |
| <i>m</i> -CPBA | ácido 3-cloroperoxibenzoico |
| MeOH | Metanol |
| pet. éter | éter de petróleo (intervalo de ebullición 30-60°C) |
| THF | Tetrahidrofurano |
| TFA | ácido trifluoroacético |
| Tf | trifluorometanosulfonilo |

EJEMPLO A Comparativo

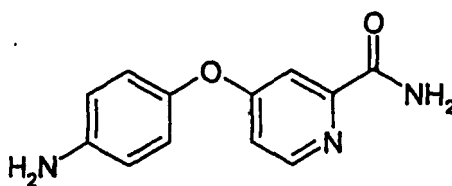
N-[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]-N'-[4-[2-carbamoil-(4-piridiloxi)]fenil]-urea.

15 Paso 1: Preparación de 4-cloro-2-piridinacarboxamida



A una mixtura agitada de hidrocloreto de 4-cloro-2-piridinacarboxilato de metilo (1,0 g, 4,81 mmoles) disuelto en amoníaco acuoso concentrado (32 ml) se añadió cloruro de amonio (96,2 mg, 1,8 mmoles, 0,37 equiv.) y la mixtura de reacción heterogénea se agitó a la temperatura ambiente durante 16 h. La mixtura de reacción se vertió en EtOAc (500 ml) y agua (300 ml). La capa orgánica se lavó con agua (2 x 300 ml) y una solución saturada de NaCl (1 x 300 ml), se secó (MgSO₄), y se concentró a vacío para dar 4-cloro-2-piridinacarboxamida como un sólido beige (604,3 mg, 80,3%): TLC (50% EtOAc / hexano) R_f 0,20; ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 8,61 (d, J = 5,4 Hz, ¹H), 8,20 (s ancho, ¹H), 8,02 (d, J = 1,8 Hz, ¹H), 7,81 (s ancho, ¹H), 7,76 a 7,73 (m, ¹H).

Paso 2: Preparación de 4-(4-aminofenoxi)-2-piridinacarboxamida

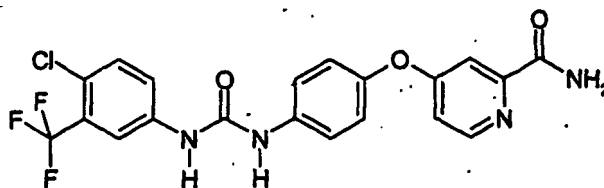


25

A 4-aminofenol (418 mg, 3,83 mmoles) en DMF anhidra (7,7 ml) se añadió *tert*-butóxido de potasio (447 mg, 3,98

mmoles, 1,04 equiv.) en una sola porción. La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 2 horas, y se añadió luego una solución de 4-cloro-2-piridinacarboxamida (600 mg, 3,83 mmoles, 1,0 equiv.) en DMF anhidra (4 ml). La mezcla de reacción se agitó a 80°C durante 3 días y se vertió en una mezcla de EtOAc y una solución saturada de NaCl. La capa orgánica se lavó secuencialmente con una solución saturada de NH₄Cl y a continuación una solución saturada de NaCl, se secó (MgSO₄), y se concentró a presión reducida. El producto bruto se purificó utilizando cromatografía MPLC (Biotage®; gradiente desde 100% EtOAc hasta seguido por 100% MeOH/50% EtOAc/40% hexano) para dar la 4-cloro-5-trifluorometilaniilina como un sólido pardo (510 mg, 58%). ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 8,43 (d, J = 5,7 Hz, ¹H), 8,07 (br s, ¹H), 7,66 (br s, ¹H), 7,31 (d, J = 2,7 Hz, ¹H), 7,07 (dd, J = 5,7 Hz, 2,7 Hz, ¹H), 6,85 (d, J = 9,0 Hz, 2 H), 6,62 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 5,17 (s ancho, 2H); HPLC EI-MS *m/z* 230 ((M+H)⁺).

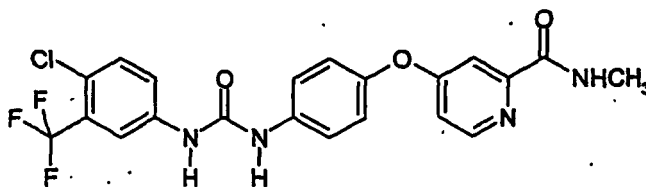
Paso 3: Preparación de N-[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]-N'-{4-[2-carbamoil-(4-piridiloxi)]fenil}-urea



Una mezcla de 4-cloro-5-trifluorometilaniilina (451 mg, 2,31 mmoles, 1,1 equiv.) y 1,1'-carbonil-diimidazol (419 mg, 2,54 mmoles, 1,2 equiv.) en dicloroetano anhidro (5,5 ml) se agitó bajo argón a 65°C durante 16 h. Una vez enfriada a la temperatura ambiente, se añadió una solución de 4-(4-aminofenoxi)-2-piridinacarboxamida (480 mg, 2,09 mmoles) en THF anhidro (4,0 ml), y la mezcla de reacción se agitó a 60°C durante 4 h. La mezcla de reacción se vertió en EtOAc, y la capa orgánica se lavó con agua (2 x) y una solución saturada de NaCl (1 x), se secó (MgSO₄), se filtró, y se evaporó a vacío. La purificación utilizando cromatografía MPLC (Biotage®; gradiente desde 100% EtOAc a 2% MeOH/EtOAc) dio N-[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]-N'-{4-[2-carbamoil-(4-piridiloxi)]fenil}-urea como un sólido blanco (770 mg, 82%); TLC (EtOAc) R_f 0,11, 100% acetato de etilo ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 9,21 (s, ¹H), 8,99 (s, ¹H), 8,50 (d, J = 5,6 Hz, ¹H), 8,11 (s, ¹H), 8,10 (s, ¹H), 7,69 (s ancho, ¹H), 7,64 (dd, J = 8,2 Hz, 2,1 Hz, ¹H), 7,61 (s, ¹H), 7,59 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,39 (d, J = 2,5 Hz, ¹H), 7,15 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 7,14 (m, ¹H); MS LC-MS (MH⁺ = 451), Análisis, calculado para C₂₀H₁₄ClF₃N₄O₃: C 53,29% H 3,13% N 12,43%, Encontrado: C 53,33% H 3,21% N 12,60%.

Ejemplo B

25 N-[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]-N'-{4-[2-N-metilcarbamoil-4-piridiloxi]fenil}-urea



Paso 1: Se sintetiza primeramente 4-cloro-N-metil-2-piridinacarboxamida a partir de cloruro de 4-cloropiridina-2-carbonilo por adición de sal HCl de cloruro de 4-cloropiridina-2-carbonilo (7,0 g, 32,95 mmoles) en porciones a una mezcla de una solución 2,0 M de metilamina en THF (100 ml) y MeOH (20 ml) a 0°C. La mezcla resultante se guarda a 3°C durante 4 h, y se concentra luego a presión reducida. Los sólidos prácticamente secos resultantes se suspenden en EtOAc (100 ml) y se filtran. El filtrado se lava con una solución saturada de NaCl (2 x 100 ml), se seca (Na₂SO₄) y se concentra a presión reducida para proporcionar 4-cloro-N-metil-2-piridinacarboxamida como un sólido amarillo cristalino.

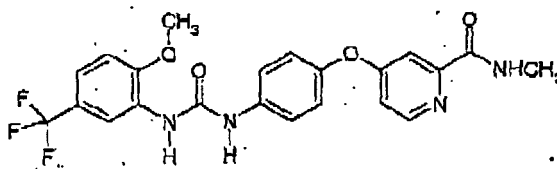
Paso 2: Una solución de 4-aminofenil (9,60 g, 88,0 mmoles) en DMF anhidra (150 ml) se trata con *tert*-butóxido de potasio (10,29 g, 91,7 mmoles) y la mezcla de color pardo rojizo se agita a la temperatura ambiente durante 2 horas. Los contenidos se tratan con 4-cloro-N-metil-2-piridinacarboxamida (15,0 g, 87,9 mmoles) del Paso 1 y K₂CO₃ (6,50 g, 47,0 mmoles) y se calientan luego a 80°C durante 8 h. La mezcla se enfría a la temperatura ambiente y se separa entre EtOAc (500 ml) y una solución saturada de NaCl (500 ml). La fase acuosa se extrae nuevamente con EtOAc (300 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavan con una solución saturada de NaCl (4 x 1000 ml), se secan (Na₂SO₄) y se concentran a presión reducida. Los sólidos resultantes se secan a presión reducida a 35°C durante 3 h para proporcionar 4-(2-(N-metilcarbamoil)-4-piridiloxi)anilina como un sólido de color pardo claro. ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 2,77 (d, J=4,8 Hz, 3H), 5,17 (br s, 2H), 6,64, 6,86 (AA'BB' cuartete, J=8,4 Hz, 4H), 7,06 (dd, J=5,5, 2,5 Hz, ¹H), 7,33 (d, J=2,5 Hz, ¹H), 8,44 (d, J=5,5 Hz, ¹H), 8,73 (br d, ¹H); HPLC ES-MS *m/z* 244 ((M+H)⁺).

Paso 3: Una solución de 4-cloro-3-(trifluorometil)fenil-isocianato (14,60 g, 65,90 mmoles) en CH₂Cl₂ (35 ml) se añade gota a gota a una suspensión de 4-(2-(N-metilcarbamoil)-4-piridiloxi)anilina del Paso 2; (16,0 g, 65,77 mmoles) en CH₂Cl₂ (35 ml) a 0°C. La mezcla resultante se agita a la temperatura ambiente durante 22 horas. Los sólidos amari-

llos resultantes se separan por filtración, se lavan luego con CH₂Cl₂ (2 x 30 ml) y se secan a presión reducida (aproximadamente 1 mm Hg) para proporcionar *N*-(4-cloro-3-(trifluorometil)fenil)-*N'*-(4-(2-(*N*-metilcarbamoil)-4-piridiloxi)fenil)-urea como un sólido blanquecino: p.f, 207-209°C; ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 2,77 (d, *J*=4,8 Hz, 3H), 7,16 (m, 3H), 7,37 (d, *J*=2,5 Hz, ¹H), 7,62 (m, 4H), 8,11 (d, *J*=2,5 Hz, ¹H), 8,49 (d, *J*=5,5 Hz, ¹H), 8,77 (br d, ¹H), 8,99 (s, ¹H), 9,21 (s, ¹H); HPLC, ES-MS *m/z* 465 ((M+H)+).

Ejemplo Comparativo C

N-[2-Metoxi-5-(trifluorometil)fenil]-*N'*-{4-[2-*N*-metilcarbamoil-4-piridiloxi]fenil}-urea



Paso 1: Se sintetiza primeramente 4-cloro-*N*-metil-2-piridinacarboxamida a partir de cloruro de 4-cloropiridina-2-carbonilo por adición de sal HCl de cloruro de 4-cloropiridina-2-carbonilo (7,0 g, 32,95 mmoles) en porciones a una mixtura de una solución 2,0 M de metilamina en THF (100 ml) y MeOH (20 ml) a 0°C. La mixtura resultante se guarda a 3°C durante 4 horas, y se concentra luego a presión reducida. Los sólidos resultantes, prácticamente secos, se suspenden en EtOAc (100 ml) y se filtran. El filtrado se lava con una solución saturada de NaCl (2 x 100 ml), se seca (Na₂SO₄) y se concentra a presión reducida para proporcionar 4-cloro-*N*-metil-2-piridinacarboxamida como un sólido cristalino amarillo.

Paso 2: Una solución de 4-aminofenol (9,60 g, 88,0 mmoles) en DMF anhidra (150 ml) se trata con *tert*-butóxido de potasio (10,29 g, 91,7 mmoles), y la mixtura de color pardo rojizo se agita a la temperatura ambiente durante 2 horas. Los contenidos se tratan con 4-cloro-*N*-metil-2-piridinacarboxamida (15,0 g, 87,9 mmoles) del Paso 1 y K₂CO₃ (6,50 g, 47,0 mmoles) y se calientan luego a 80°C durante 8 horas. La mixtura se enfría a la temperatura ambiente y se separa entre EtOAc (500 ml) y una solución saturada de NaCl (500 ml). La fase acuosa se extrae de nuevo con EtOAc (300 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavan con una solución saturada de NaCl (4 x 1000 ml), se secan (Na₂SO₄) y se concentran a presión reducida. Los sólidos resultantes se secan a presión reducida a 35°C durante 3 horas para proporcionar 4-(2-(*N*-metilcarbamoil)-4-piridiloxi)anilina como un sólido de color pardo claro. ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 2,77 (d, *J*=4,8 Hz, 3H), 5,17 (br s, 2H), 6,64, 6,86 (cuartete AA'BB', *J*=8,4 Hz, 4H), 7,06 (dd, *J*=5,5, 2,5 Hz, ¹H), 7,33 (d, *J*=2,5 Hz, ¹H), 8,44 (d, *J*=5,5 Hz, ¹H), 8,73 (br d, ¹H); HPLC ES-MS *m/z* 244 ((M+H)+).

Paso 3: A una solución de 2-metoxi-5-(trifluorometil)anilina (0,15 g) en CH₂Cl₂ anhidro (15 ml) a 0°C se añade CDI (0,13 g). La solución resultante se deja calentar a la temperatura ambiente durante una hora, se agita a la temperatura ambiente durante 16 horas, y se trata luego con 4-(2-(*N*-metilcarbamoil)-4-piridiloxi)anilina (0,18 g), procedente del Paso 2. La solución amarilla resultante se agita a la temperatura ambiente durante 72 h, y se trata luego con H₂O (125 ml). La mixtura acuosa resultante se extrae con EtOAc (2 x 150 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavan con una solución saturada de NaCl (100 ml), se secan (MgSO₄) y se concentran a presión reducida. El residuo se tritura (90% EtOAc/10% hexano). Los sólidos blancos resultantes se recogen por filtración y se lavan con EtOAc. El filtrado se concentra a presión reducida y el aceite residual se purifica por cromatografía en columna (gradiente desde 33% EtOAc/67% hexano a 50% EtOAc/50% hexano hasta 100% EtOAc) para dar *N*-(2-metoxi-5-(trifluorometil)fenil)-*N'*-(4-(2-(*N*-metilcarbamoil)-4-piridiloxi)fenil)-urea como un sólido de color canela claro: TLC (100% EtOAc) *R*_f 0,62; ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 2,76 (d, *J*=4,8 Hz, 3H), 3,96 (s, 3H), 7,1-7,6 and 8,4-8,6 (m, ¹H), 8,75 (d, *J*=4,8 Hz, ¹H), 9,55 (s, 1 H); FAB-MS *m/z* 461 (M+H)+.

EJEMPLOS BIOLÓGICOS

Ensayo de KDR (VEGFR2):

El dominio citosólico de quinasa de la quinasa KDR se expresó como una proteína de fusión 6His en células de insecto Sf9. La proteína de fusión del dominio de quinasa KDR se purificó en una columna de formación de quelatos Ni⁺⁺. Se recubrieron placas ELISA de 96 pocillos con 5 µl de tampón HEPES (poli(Glu4; Tyr1) 20 mM (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO) en 100 µl de tampón HEPES (HEPES 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, 0,02% Thimerosal) a 4°C durante una noche. Antes de utilizarla, la placa se lavó con HEPES, tampón NaCl, y las placas se bloquearon con 1% BSA, 0,1% Tween 20 en HEPES, tampón NaCl.

Los compuestos de test se diluyeron en serie en DMSO al 100% desde 4 mM a 0,12 µM, en diluciones semilogarítmicas. Estas diluciones se diluyeron ulteriormente 20 veces en H₂O para obtener soluciones compuestas en DMSO al 5%. Después de la carga de la placa de ensayo con 85 µl de tampón de ensayo (HEPES 20 mM, pH 7,5, KCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM, MnCl₂ 3 mM, 0,05% glicerol, 0,005% Triton X-100, 1 mM-mercaptoetanol, con o sin ATP 3,3 µM), se añadieron 5 µl de los compuestos diluidos a un volumen final de ensayo de 100 µl. Las concentraciones finales estaban comprendidas entre 10 µM y 0,3 mM en DMSO al 0,25%. El ensayo se inició por adición de 10 µl (30 ng) del dominio de la quinasa KDR.

5 El ensayo se incubó con compuesto de test o vehículo solo con agitación moderada a la temperatura ambiente durante 60 minutos. Los pocillos se lavaron y las fosfotirosinas (PY) se sondaron con una anti-fosfotirosina (PY), clon mAb 4G10 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). Los complejos PY/anti-PY se detectaron con un conjugado IgG anti-ratón/HRP lamersham International plc, Buckinghamshire, Inglaterra). La fosfotirosina se cuantificó por incubación con 100 µl de solución de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Kirkegaard and Perry, sustrato de peroxidasa TMB Microwell 1 Componente). Se detuvo el desarrollo de color por adición de 100 µl de solución de parada basada en HCl al 1% (Kirkegaard and Perry, Solución de Parada TMB 1 Componente).

10 Las densidades ópticas se determinaron espectrofotométricamente a 450 nm en un lector de placas de 96 pocillos, SpectraMax 250 (Molecular Devices). Los valores de DO de fondo (sin ATP en el ensayo) se sustrajeron de todas las DO y se calculó el porcentaje de inhibición de acuerdo con la ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{DO (control de vehículo)} - \text{DO (con compuesto)} \times 100}{\text{DO (control de vehículo)} - \text{DO (sin adición de ATP)}}$$

Los valores CI_{50} se determinaron con un programa de análisis de mínimos cuadrados utilizando concentración del compuesto frente a porcentaje de inhibición.

15 Los compuestos siguientes se testaron en el ensayo arriba descrito y se encontró que tenían un CI_{50} menor que 10 micromolar o exhibían una inhibición mayor que 30% a concentración 1 micromolar. Los nombres de los compuestos se generaron utilizando Nomenclator™ versión 3.0 y pueden diferir de los consignados en las Solicitudes de Patente.

| Entrada Núm. | Nombre |
|--------------|---|
| 1 | {3-[4-({3-(terc-butil)fenil]amino)carbonilamino)fenoxi]fenil}-N-metilcarboxamida |
| 11 | N-[2-metoxi-5-(trifluorometil)fenil]({3-[2-(N-metilcarbamoil)(4-piridiloxi)]fenil}amino)-carboxamida |
| 12 | 4-[3-({N-[2-metoxi-5-(trifluorometil)fenil]carbamoil}amino)fenoxi]piridina-2-carboxamida |
| 13 | N-[2-metoxi-5-(trifluorometil)fenil]({4-[2-(N-metilcarbamoil)(4-piridiloxi)]fenil}amino)-carboxamida |
| 14 | 4-[4-({N-[2-metoxi-5-(trifluorometil)fenil]carbamoil}amino)fenoxi]piridina-2-carboxamida |
| 16 | {4-[4-({N[2-metoxi-5-(trifluorometil)fenil]carbamoil}amino)-3-metilfenoxi](2-piridil)}-N-metilcarboxamida |
| 17 | (({2-cloro-4-[2-(N-metilcarbamoil)(4-piridiloxi)]fenil}amino)N-[2-metoxi-5-(trifluorometil)fenil]carboxamida |
| 19 | (({4-[2-(N-etilcarbamoil)(4-piridiloxi)]fenil}amino)-N-[2-metoxi-5-(trifluorometil)fenil]-carboxamida |
| 20 | (({3-cloro-4-[2-(N-metilcarbamoil)(4-piridiloxi)]fenil}amino)-N-[2-metoxi-5-(trifluorometil)fenil]carboxamida |
| 22 | 3-[4-({N-[2-metoxi-5-(trifluorometil)fenil]carbamoil}amino)fenoxi]benzamida |
| 24 | (({4-[2-(N,N-dimetilcarbamoil)(4-piridiloxi)]fenil}amino)-N-[2-metoxi-5-(trifluorometil)fenil]carboxamida |
| 27 | N-[2-metoxi-5-(trifluorometil)fenil]({4-[2-(N-metilcarbamoil)(4-piridiltio)]fenil}amino)carboxamida |
| 29 | N-(2-metoxi-5-(trifluorometil)fenil]({3-[2-(N-metilcarbamoil)(4-piridiltio)]fenil}amino)carboxamida |
| 31 | N-(2-metoxi-5-(trifluorometil)fenil]({4-[5-(N-(2-morfolin-4-iletil)carbamoil](3-piridiloxi)]fenil}amino)carboxamida |
| 32 | N-[2-metoxi-5-(trifluorometil)fenil]({4-[5-(N-metilcarbamoil)(3-piridiloxi)]fenil}amino)carboxamida |
| 34 | N-[2-metoxi-5-(trifluorometil)fenil]({4-[3-(N-(3-piridil)carbamoil)fenoxi]fenil}amino)carboxamida |

| | |
|----|---|
| 42 | {4-[4-({[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]amino}carbonilamino)fenoxi](2-piridil))-N-metil-carboxamida |
| 43 | 4-[4-({[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]amino}carbonilamino)fenoxi]piridina-2-carboxamida |
| 44 | 4-[3-({[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]amino}carbonilamino)fenoxi]piridina-2-carboxamida |
| 45 | {[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]amino}-N-{3-[2-(N-metilcarbamoil)(4-piridiloxi)]fenil} carboxamida |
| 47 | {[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]amino}-N-{2-metil-4-[2-(N-metilcarbamoil)(4-piridiloxi)]-fenil}-carboxamida |
| 49 | {4-[3-cloro-4-({[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]amino}carbonilamino)fenoxi](2-piridil))-N-metil-carboxamida |
| 51 | N-[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]({4-[2-(N-etilcarbamoil)(4-piridiloxi)]fenil}amino) carboxamida |
| 61 | {3-[4-({[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]amino}carbonilamino)fenoxi]fenil}-N-(2-morfolin-4-iletel)-carboxamida |
| 62 | {3-[4-({[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]amino}carbonilamino)fenoxi]fenil}-N-(2-piperidil-etil)-carboxamida |
| 65 | {4-[4-({[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]amino}carbonilamino)feniltio](2-piridil))-N-metil-carboxamida |
| 69 | {[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]amino}-N-{3-[2-(N-metilcarbamoil)(4-piridiltio)]fenil} carboxamida |
| 70 | {4-[4-({[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]amino}carbonilamino)fenoxi](2-piridil))-N-(2-morfolin-4-iletel)carboxamida |
| 72 | {5-[4-({[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]amino}carbonilamino)fenoxi](3-piridil))-N-metil-carboxamida |
| 75 | N-[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]({4-[3-(N-(3-piridil)carbamoil)fenoxi]fenil}amino) carboxamida |
| 84 | {4-[4-({[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]amino}carbonilamino)fenoxi](2-piridil))-N-(2-hidroxietil)carboxamida |
| 87 | {4-[4-({[4-bromo-3-(trifluorometil)fenil]amino}carbonilamino)-2-clorofenoxil(2-pyidil))-N-metil-carboxamida |
| 88 | N-[4-bromo-3-(trifluorometil)fenil]({4-[2-(N-etilcarbamoil)(4-piridiloxi)]fenil}amino) carboxamida |
| 89 | {[4-bromo-3-(trifluorometil)fenil]amino}-N-{3-[2-(N-metilcarbamoil)(4-piridiloxi)]fenil} carboxamida |
| 90 | {[4-bromo-3-(trifluorometil)fenil]amino}-N-{4-metil-3-[2-(4-metilcarbamoil)(4-piridiloxi)]-fenil}-carboxamida |
| 93 | {[4-bromo-3-(trifluorometil)fenil]amino}-N-{3-[2-(N-metilcarbamoil)(4-piridiltio)]fenil} carboxamida |
| 94 | {4-[4-({[4-bromo-3-(trifluorometil)fenil]amino}carbonilamino)fenoxi](2-piridil))-N-{2-morfolin-4-iletel}carboxamida |
| 95 | N-[4-cloro-2-metoxi-5-(trifluorometil)fenil]({4-[2-(N-metilcarbamoil)(4-piridiloxi)]-fenil}-amino)-carboxamida |
| 96 | N-[4-cloro-2-metoxi-5-(trifluorometil)fenil]({2-cloro-4-[2-(N-metilcarbamoil)(4-piridiloxi)]-fenil}-amino)carboxamida |

| | |
|----|---|
| 97 | N-[4-cloro-2-metoxi-5-(trifluorometil)fenil]({3-cloro-4-[2-(N-metilcarbamoil)(4-piridiloxil)-fenil]-amino)carboxamida |
| 98 | N-[4-cloro-2-metoxi-5-(trifluorometil)fenil]({3-[2-(N-metilcarbamoil)(4-piridiloxi)]-fenil}-amino)-carboxamida |
| 99 | N-[4-cloro-2-metoxi-5-(trifluorometil)fenil]({4-(2-(N-etilcarbamoil)(4-piridiloxi))fenil}-amino)carboxamida |

Ensayo mecánico de células - Inhibición de la fosforilación de 3T3 KDR:

5 Células NIH3T3 que expresan el receptor KDR de longitud total se cultivan en DMEM (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY) suplementado con suero de ternero recién nacido al 10%, bajo en glucosa, 25 mM/l de piruvato de sodio, hidroxloruro de piridoxina y 0,2 mg/ml de G 418 (Life Technologies Inc., Grand Island, NY). Las células se mantienen en matraces T75 recubiertos con colágeno I (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA). En una atmósfera de 5% CO₂ unificada, a 37°C.

10 Se extienden 15.000 células en cada pocillo de una placa de 96 pocillos recubierta con colágeno I en el medio de crecimiento DMEM. Seis horas después, se lavan las células y el medio se reemplaza con DMEM sin suero. Después de cultivo durante una noche para dejar en reposo las células, se reemplaza el medio por solución salina de Dulbecco tamponada con fosfato (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY) con 0,1% de albúmina bovina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Después de añadir diversas concentraciones (0-300 nM) de los compuestos de test a las células en concentración final de 1% de DMSO, se incuban las células a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la estimulación de VEGF, se retira el tampón y las células se lisan por adición de 15 150 µl de tampón de extracción (Tris 50 mM, pH 7,8, suplementado con 10% glicerol, BGP 50 mM, EDTA 2 mM, NaF 10 mM, NaVO₄ 0,5 mM, y 0,3% de TX-100) a 4°C durante 30 minutos.

20 Para evaluar la fosforilación del receptor, se añaden 100 microlitros de cada lisado de células a los pocillos de una placa ELISA recubierta previamente con 300 ng de anticuerpo C20 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA). Después de 60 minutos de incubación, la placa se lava y se sonda el KDR fijado respecto a fosfotirosina utilizando un clon 4G10 mAb anti-fosfotirosina (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). La placa se lava y los pocillos se incuban con conjugado IgG anti-ratón/HRP (Amersham International plc, Buckinghamshire, Inglaterra) durante 60 minutos. Se lavan los pocillos y se cuantifica la fosfotirosina por adición de 100 µl por pocillo de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Kirkegaard y Perry, Solución de Parada TMB 1 Componente).

25 Se determinan las densidades ópticas (DO) espectrofotométricamente a 450 nm en un lector de placas de 96 pocillos (SpectraMax 250, Molecular Devices). Se sustraen los valores DO de fondo (sin VEGF añadido) de todas las DO y se calcula el porcentaje de inhibición de acuerdo con la ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{DO (control de VEGF)} - \text{DO (con compuesto de test)}}{\text{DO (control de VEGF)} - \text{DO (sin adición de VEGF)}} \times 100$$

30 Se determinan los valores CI_{50s} sobre algunos de los materiales ilustrativos con un programa de análisis de mínimos cuadrados utilizando concentración del compuesto frente a porcentaje de inhibición.

Modelo de Angiogénesis Matrigel®:

35 Preparación de Tabletas Matrigel y Fase *in vivo*: Matrigel® (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA) es un extracto de membrana basal de un tumor murino compuesto primeramente de laminina, colágeno IV y proteoglicano de sulfato de heparano. El mismo se proporciona como un líquido estéril a 4°C, pero forma rápidamente un gel sólido a 37°C.

40 El líquido Matrigel a 4°C se mezcla con células de tumor humano SK-MEL2 que se transfectan con un plásmido que contiene el gen murino VEGF con un marcador seleccionable. Las células tumorales se cultivan *in vitro* bajo selección y las células se mezclan con Matrigel líquido frío a una ratio de 2 x 10⁶ por 0,5 ml. Se implantan 0,5 ml subcutáneamente cerca de la línea media abdominal utilizando una aguja de calibre 25. Los compuestos de test se dosifican como soluciones en Etanol/Ceremaphor EL/solución salina (12,5%:12,5%:75%) a 30, 100, y 300 mg/kg por vía oral una vez al día comenzando el día de implantación. Los ratones se sacrifican por eutanasia 12 días después de la implantación y los pelets de Matrigel se recogen para análisis del contenido de hemoglobina.

45 Ensayo de hemoglobina: los pelets de Matrigel se ponen en 4 volúmenes (peso/volumen) de Tampón de Lisis a 4°C (Tris 20 mM de pH 7,5, EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, 1% Triton X-100 [EM Science, Gibbstown, N.J.], y cóctel completo de inhibidor de proteasas exento de EDTA [Mannheim, Alemania]) y se homogeneizan a 4°C. Los homogeneizados se incuban en hielo durante 30 minutos con agitación mediante sacudidas y se centrifugan a 14 K x g durante 30 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se transfieren a tubos de microcentrífuga enfriados y se guardan a 4°C para el ensayo de hemoglobina.

5 Se suspende hemoglobina de ratón (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en agua tratada en autoclave (BioWhittaker, Inc., Walkersville, MD) a 5 mg/ml. Se genera una curva estándar a partir de 500 microgramos/ml hasta 30 microgramos/ml en Tampón de Lisis (véase arriba). Se añaden muestras de la curva estándar y del lisado a 5 microlitros/pocillo por duplicado a una placa de 96 pocillos de poliestireno. Utilizando el Kit de Hemoglobina Sigma Plasma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) se reconstituye el sustrato de TMB en 50 ml de solución de ácido acético a la temperatura ambiente. Se añaden a cada pocillo 100 microlitros de sustrato, seguidos por 100 microlitros/pocillo de Solución de Peróxido de Hidrógeno a la temperatura ambiente. La placa se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos.

10 Se determinan espectrofotométricamente las densidades ópticas a 600 nm en un lector de placas de 96 pocillos, Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Se sustraen de todos los pocillos las lecturas de fondo del Tampón de Lisis.

El contenido total de hemoglobina de la muestra se calcula de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$\text{Hemoglobina Total} = (\text{Volumen del Lisado de Muestra}) \times (\text{Concentración de Hemoglobina})$$

15 La hemoglobina media total de las muestras Matrigel sin células se sustrae de cada muestra de hemoglobina total de Matrigel con células. El porcentaje de inhibición se calcula de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\text{Hemoglobina Total Media de los Lisados de Tumor Tratados con Fármaco}) \times 100}{(\text{Hemoglobina Total Media de los Lisados de Tumor No Tratados})}$$

20 Los ejemplos que anteceden pueden repetirse con éxito similar sustituyendo las sustancias reaccionantes descritas genérica o específicamente y/o las condiciones de operación de esta invención en lugar de los utilizados en los ejemplos que anteceden.

REIVINDICACIONES

1. El compuesto tosilato de N-(4-cloro-3-(trifluorometil)fenil)-N'-(4-(2-(N-metilcarbamoil)-4-piridiloxi)fenil)urea para uso en el tratamiento de enfermedades mediadas por el camino de la transducción de señales inducidas por VEGF.
- 5 2. Compuesto según la reivindicación 1, en donde el camino de transducción de señales inducidas por VEGF se caracteriza por procesos anormales de angiogénesis o hiperpermeabilidad.
3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde el compuesto se administra simultáneamente con otro agente inhibidor de la angiogénesis, en la misma formulación o en formulaciones separadas.
- 10 4. Compuesto según la reivindicación 2, en donde la enfermedad no está mediada por raf o mediada por p-38.
5. Compuesto según la reivindicación 2, en donde la enfermedad está mediada por raf y/o mediada por p-38.
6. Compuesto según las reivindicaciones 1 ó 2, en donde las enfermedades incluyen crecimiento de tumores, retinopatía, retinopatía diabética, oclusión isquémica de la vena retinal, retinopatía de la premadurez y degeneración macular relacionada con la edad; artritis reumatoide, psoriasis, trastorno buloso asociado con formación de ampollas subepidérmicas, penfigoide buloso, eritema multiforme, y dermatitis herpetiforme.
- 15 7. Compuesto según las reivindicaciones 1 ó 2, en donde la enfermedad es crecimiento de tumor, retinopatía, retinopatía diabética, oclusión isquémica de la vena retinal, retinopatía de la premadurez, degeneración macular relacionada con la edad; artritis reumatoide, psoriasis, trastorno buloso asociado con formación de ampollas subepidérmicas, penfigoide buloso, eritema multiforme, y dermatitis herpetiforme, en combinación con otra afección seleccionada del grupo constituido por:
 - 20 fiebre reumática, resorción ósea, osteoporosis postmenopáusica, sepsis, sepsis gram-negativa, choque séptico, choque endotóxico, síndrome de choque tóxico, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, enfermedad inflamatoria del intestino (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), reacción de Jarisch-Herxheimer, asma, síndrome de dificultad respiratoria de los adultos, enfermedad fibrótica pulmonar aguda, sarcoidosis pulmonar, enfermedad respiratoria alérgica, silicosis, pneumoconiosis de los mineros del carbón, lesión alveolar, insuficiencia hepática, enfermedad hepática durante inflamación aguda, hepatitis alcohólica grave, malaria (malaria por Plasmodium falciparum y malaria cerebral), diabetes mellitus no dependiente de insulina (NIDDM), insuficiencia cardíaca congestiva, deterioro después de enfermedad cardíaca, aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer, encefalitis aguda, lesión cerebral, esclerosis múltiple (desmielinación y pérdida de oligodendrocitos en la esclerosis múltiple),
 - 25 cáncer avanzado, enfermedad maligna linfoide, pancreatitis, curación empeorada de las heridas en infección, inflamación y cáncer, síndromes mielodisplásticos, lupus eritematoso sistémico, cirrosis biliar, necrosis intestinal, lesión/toxicidad por radiación después de la administración de anticuerpos monoclonales, reacción de rechazo inverso (lesión isquemia-reperfusión y rechazos de aloinjertos de riñón, hígado, corazón, y piel), rechazo de aloinjerto pulmonar (bronquitis obliterante) o complicaciones debidas a sustitución total de cadera.
 - 30
- 35 8. Compuesto según las reivindicaciones 1 ó 2, en donde la enfermedad es crecimiento de tumor, retinopatía, retinopatía diabética, oclusión isquémica de la vena retinal, retinopatía de la premadurez, degeneración macular relacionada con la edad; artritis reumatoide, psoriasis, trastorno buloso asociado con formación de ampollas subepidérmicas, penfigoide buloso, eritema multiforme, y dermatitis herpetiforme, en combinación con una enfermedad infecciosa seleccionada del grupo constituido por:
 - 40 tuberculosis, infección de Helicobacter pylori durante la enfermedad de úlcera péptica, enfermedad de Chaga's resultante de infección de Trypanosoma cruzi, efectos de la toxina similar a Shiga resultante de infección de E. coli, efectos de la enterotoxina A resultante de infección de Staphylococcus, infección meningocócica, e infecciones de Borrelia burgdorferi, Treponema pallidum, citomegalovirus, virus de la gripe, virus de la encefalitis de Theiler, y virus de la inmunodeficiencia humana (HIV).
 - 45