

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 799**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/4184** (2006.01)

**A61K 31/4425** (2006.01)

**A61K 31/497** (2006.01)

**A61K 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2006 E 06752445 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2013 EP 1885187**

54 Título: **Métodos para tratar cáncer resistente a los fármacos**

30 Prioridad:

**13.05.2005 US 680722 P**

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

**30.01.2014**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)  
Lichtstrasse, 35  
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**MICHELSON, GLENN C.;  
CHAN, VIVIEN W.;  
HEISE, CARLA C.;  
WIESMANN, MARION y  
DAWES, TIMOTHY D.**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 440 799 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

Métodos para tratar cáncer resistente a los fármacos

Campo de la invención

5 Esta invención pertenece generalmente a compuestos y composiciones para su uso en el tratamiento de cáncer resistente a los fármacos, los usos correspondientes también se reivindican. Más específicamente, la invención pertenece a compuestos de bencimidazolil quinolinona sustituidos por 4-amino tales como compuestos 4-amino-5-fluoro-3-[5-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona de fórmula II y formulaciones farmacéuticas que comprenden tales compuestos para su uso en el tratamiento de cáncer resistente a los fármacos y pacientes con cáncer resistente a los fármacos.

10 Antecedentes de la invención

Una variedad de compuestos y composiciones químicas ha sido reportada como que tiene actividad contra uno o más receptores de tirosina cinasa del factor de crecimiento endotelial (VEGF-RTK). Ejemplos incluyen derivados de quinolina tales como los descritos en WO 98/13350, derivados de aminonicotinamida (véase, por ejemplo WO 01/55114), compuestos antisentido (véase, por ejemplo WO 01/52904), peptidomiméticos (véase, por ejemplo WO 01/52875), derivados de quinazolina (véase, por ejemplo Patente EUA No. 6,258,951) anticuerpos monoclonales (véase, por ejemplo EP 1 086 705 A1), varios 5,10,15,20-tetraaril-porfirinas y 5,10,15-triaril-corroles (véase, por ejemplo WO 00/27379), derivados de ácido heterocíclico alcanosulfónico y alcano carboxílicos (véase, por ejemplo DE19841985), derivados de oxindolilquinazolina (véase, por ejemplo WO 99/10349), derivados 1,4-diazaantracina (véase, por ejemplo Patente EUA No. 5,763,441), y derivados de cinolina (véase, por ejemplo WO 97/34876), y varios compuestos indazol (véase, por ejemplo WO 01/02369 y WO 01/53268).

La síntesis de derivados de 4-hidroxi quinolona y 4-hidroxi de quinolina se describe en un número de referencias. Por ejemplo, Ukrainets *et al.* ha descrito la síntesis de 3-(bencimidazol-2-il)-4-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolina. Ukrainets, I. *et al.*, Tetrahedron Lett. 42, 7747-7748 (1995); Ukrainets, I. *et al.*, Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinii, 2,239-241(1992). Ukrainets también ha descrito la síntesis, actividad anticonvulsiva y antitiroidea de otras 4-hidroxi quinolonas y análogos tio tales como 1H-2-oxo-3-(2-bencimidazolil)-4-hidroxiquinolina. Ukrainets, I. *et al.*, Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinii, 1, 105-108 (1993); Ukrainets, I. *et al.*, Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinii, 8, 1105-1108 (1993); Ukrainets, I. *et al.*, Chem. Heterocyclic Comp. 33, 600-604, (1997).

La síntesis de varios derivados de quinolina se describe en WO 97/48694. Aquellos compuestos se describen como capaces de unir a los receptores de la hormona nuclear y son útiles para la estimulación de la proliferación de osteoblasto y crecimiento del hueso. Los compuestos también se describen como siendo útiles en el tratamiento o prevención de enfermedades asociadas con las familias del receptor de la hormona nuclear.

Se describen en WO 92/18483 varios derivados de quinolina en los cuales el anillo de benceno de la quinolina se sustituye con un grupo de azufre. Se describen estos compuestos como siendo útiles en las formulaciones farmacéuticas y como medicamentos.

35 Se han descrito derivados de quinolona y coumarina como que tienen uso en una variedad de aplicaciones no relacionadas a las formulaciones médicas y farmacéuticas. Las referencias que describen la preparación de los derivados de quinolona para el uso en las composiciones fotopolimerizables o para las propiedades luminescentes incluyen: Patente EUA No. 5,801,212 emitidas a Okamoto *et al.*; JP 8-29973; JP 7-43896; JP 6-9952; JP 63-258903; EP 797376; y DE 23 63 459.

40 Un gran número de los compuestos de quinolinona sustituidos que incluyen compuestos de bencimidazolil quinolinona y compuestos de bencimidazolil quinolinona sustituidos por 4-amino tales como 4-amino-5-fluoro-3-[5-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-quinolin-2(1H)-ona han sido recientemente descritos en las referencias tales como WO 02/22598 y WO 2004/043389. Tales compuestos se describen como que inhiben VEGF-RTKs. Tales compuestos también se describen en las solicitudes de patente de los Estados Unidos publicadas U.S. 2002/0107392 y U.S. 2003/0028018 y Patente EUA Nos. 6,605,617, 6,774,237, y 6,762,194. Compuestos Heterocíclicos relacionados a bencimidazolil quinolinonas se han descrito recientemente en WO 02/18383, U.S. 2002/0103230, y Patente EUA No. 6,756,383. Otros de tales compuestos se describen junto con nuevos usos de tales compuestos que inhiben serina/treonina cinasas y tirosina cinasas se describen en WO 2004/018419, y U.S. 2004/0092535, presentadas el 19 de agosto del 2003, y que reclama la prioridad de cada una de las siguientes solicitudes provisionales: Solicitud Provisional Norteamericana No. 60/405,729 presentada el 23 de agosto del 2002; Solicitud Provisional Norteamericana No. 60/426,107 presentada el 13 de noviembre del 2002; Solicitud Provisional Norteamericana No. 60/426,226 presentada el 13 de noviembre del 2002; Solicitud Provisional Norteamericana No. 60/426,282 presentada el 13 de noviembre del 2002; Solicitud Provisional Norteamericana No. 60/428,210 presentada el 21 de noviembre del 2002; Solicitud Provisional Norteamericana No. 60/460,327 presentada el 3 de

abril del 2003; Solicitud Provisional Norteamericana No. presentada el 3 de abril del 2003; Solicitud Provisional Norteamericana No. 60/460,493 presentada el 3 de abril del 2003; Solicitud Provisional Norteamericana No. 60/478,916 presentada el 16 de junio del 2003; y Solicitud Provisional Norteamericana No. 60/484,048 presentada el 1 de julio del 2003. Aún otros compuestos, método para su síntesis, sales de ácido láctico de los mismos, y usos de los mismos se describen en las siguientes solicitudes de patentes presentadas el 5 de noviembre del 2004: Solicitud de Patente Norteamericana No. 10/983,174 (US 7,825,132), Solicitud de Patente Norteamericana No. 10/982,757; y Solicitud de Patente Norteamericana No. 10/982,5423.

El documento US 2004/092535 describe métodos de inhibición de varias enzimas y de tratamiento de varios estados que incluyen administrar a un sujeto un compuesto de estructura I o IB, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un tautómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero.

Diversos compuestos novedosos han sido recientemente encontrados útiles en el tratamiento de cáncer. Por ejemplo, Gleevec® (mesilato de imatinib) es un compuesto que ha mostrado recientemente actividad significativa en un número de cánceres diferentes. Gleevec se hizo primero disponible para pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (CML) en mayo del 2001. De acuerdo al sitio web de Novartis, Gleevec se indica para el tratamiento de pacientes adultos recientemente diagnosticados con cromosoma Philadelphia-positivo (Ph+) CML en fase crónica. Se limita el seguimiento. Gleevec también se indica para el tratamiento de pacientes con pH+ CML en crisis blástica, fase acelerada, o en fase crónica después del fallo de la terapia de interferón-alfa. Gleevec también se indica para el tratamiento de pacientes pediátricos con fase crónica pH+ CML cuya enfermedad ha recurrido después del trasplante de célula madre o los que son resistentes en la terapia de interferón-alfa. Gleevec ha sido aprobado para el uso en pacientes con otros cánceres tales como Tumores Estromales Gastrointestinal (GIST). Por ejemplo, el 1 de febrero del 2002, la aprobación de Novartis otorgada por FDA de Gleevec para el tratamiento de pacientes con GIST maligno no extraíble y/o metastático KIT (CD117) positivo.

Otros nuevos fármacos experimentales que actualmente están siendo probados para la eficiencia en el tratamiento de cáncer incluyen BAY43-9006 (sorafenib) y brostalicina. Se le ha otorgado a BAY 43-9006 el estado de fármaco huérfano para el tratamiento de carcinoma de célula renal por la Administración de Alimentos y Fármacos de los estados Unidos (FDA). Está siendo evaluada BAT 43-9006 para el tratamiento de carcinoma de célula renal metastática, una forma avanzada de cáncer de riñón. Una designación similar ha sido otorgada en la Unión Europea por el Comité para los productos Medicinales Huérfanos (COMP) de la Agencia de Medicinas Europea (EMA). BAY43-9006 es una cinasa RAF novedosa e inhibidor VEGFR que se pretenden para prevenir el crecimiento del tumor combinando dos actividades anticancerígenas: inhibición de proliferación celular tumoral y angiogénesis tumoral. brostalicina (PNU-166196) es una  $\alpha$ -bromoacrilica sintética, ligante de hendidura menor de ADN de segunda generación estructuralmente relacionada a distamicina A, actualmente en pruebas de Fase II en Europa y los Estados Unidos. El compuesto muestra actividad antitumoral amplia en modelos en los modelos preclínicos y reduce drásticamente la mielotoxicidad *in vitro* en las células progenitoras hematopoyéticas comparada con aquellas de otros ligantes de hendidura menor. La brostalicina mostró una actividad 3 veces más elevada en las células de leucemia de murino L1210 resistentes al melfalan que en la línea parental ( $CI_{50} = 0,46$  y  $1,45$  ng/mL, respectivamente) bajo condiciones en las cuales la citotoxicidad de agentes antitumorales convencionales era ya sea no afectada o reducida.

Aunque avances significantes se han hecho en el desarrollo de composiciones farmacéuticas para tratar cáncer, se requieren nuevos métodos para tratar cáncer. Especialmente necesarias son las composiciones y compuestos farmacéuticos para el uso en la preparación de composiciones farmacéuticas que son útiles para tratar cáncer resistente a los fármacos y pacientes con cánceres resistentes a los fármacos. También necesarias son las composiciones farmacéuticas y los compuestos que pueden administrarse a pacientes con cánceres resistentes a los fármacos en conjunto con agentes anti-cáncer conocidos.

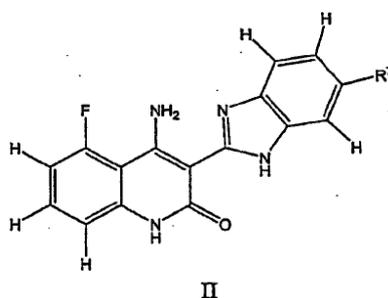
#### Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula II, un tautómero del compuesto, una sal del compuesto, una sal del tautómero, una mezcla de los mismos, o una composición farmacéutica que comprende el compuesto, el tautómero, la sal del compuesto, la sal del tautómero, o la mezcla

para su uso en el tratamiento de cáncer resistente a los fármacos, en el que el cáncer resistente a los fármacos es resistente a mesilato de imatinib (Gleevec), BAY43-9006, brostalicina, erlotinib (Tarceva), gefitinib (Iressa) o vatalanib (PTK-787), o

para su uso en el tratamiento de cáncer resistente a los fármacos inhibiendo una cinasa seleccionada de ABL (T315I) o FLT3 (D835Y) en un paciente con cáncer resistente a los fármacos,

en el que el compuesto de fórmula II tiene la siguiente fórmula:



en donde R<sup>7</sup> es un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido seleccionado de un grupo piperidinilo sustituido o no sustituido, grupo piperazinilo, o grupo morfolinilo

5 En un aspecto adicional la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula II, un tautómero del compuesto, una sal del compuesto, una sal del tautómero, una mezcla de los mismos, o una composición farmacéutica que comprende el compuesto, el tautómero, la sal del compuesto, la sal del tautómero, o la mezcla

para su uso en el tratamiento de cáncer resistente a los fármacos, en el que el cáncer resistente a los fármacos es resistente a mesilato de imatinib (Gleevec), BAY43-9006, brostalicina, erlotinib (Tarceva), gefitinib (Iressa) o vatalanib (PTK-787), o

10 para su uso en el tratamiento de cáncer resistente a los fármacos inhibiendo una cinasa seleccionada de ABL (T315I) o FLT3 (D835Y) en un paciente con cáncer resistente a los fármacos,

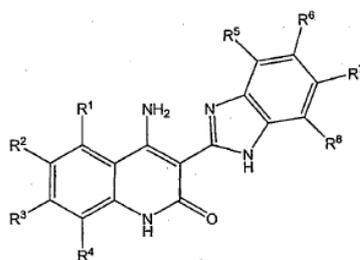
en el que el compuesto se administra conjuntamente con un fármaco anti-cáncer seleccionado de mesilato de imatinib (Gleevec), BAY43-9006, brostalicina, lenalidomida (Revlimid), talidomida (Thalomid), docetaxel (Taxotere), erlotinib (Tarceva), vatalanib (PTK-787), VEGF-trap, fenretidina, bortezomib, bevacizumab (Avastin), pertuzumab y/o rituximab.

En otra modalidad la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula II, un tautómero del compuesto, una sal del compuesto, una sal del tautómero, o una mezcla de los mismos para la preparación de un medicamento para tratar cáncer resistente a los fármacos en el que el cáncer resistente a los fármacos es resistente a mesilato de imatinib (Gleevec), BAY43-9006, brostalicina, erlotinib (Tarceva), gefitinib (Iressa) o vatalanib (PTK-787) o para tratar cáncer resistente a los fármacos inhibiendo una cinasa seleccionada de ABL (T315I) o FLT3 (D835Y) en un paciente con cáncer resistente a los fármacos.

El uso de un compuesto de fórmula II, un tautómero del compuesto, una sal del compuesto, una sal del tautómero, o una mezcla de los mismos para la preparación de un medicamento para tratar cáncer resistente a los fármacos es una modalidad adicional de la presente invención, en el que el cáncer resistente a los fármacos es resistente a mesilato de imatinib (Gleevec), BAY43-9006, brostalicina, erlotinib (Tarceva), gefitinib (Iressa) o vatalanib (PTK-787) o para tratar cáncer resistente a los fármacos inhibiendo una cinasa seleccionada de ABL (T315I) o FLT3 (D835Y) en un paciente con cáncer resistente a los fármacos, en el que el compuesto se administra conjuntamente con un fármaco anti-cáncer seleccionado de mesilato de imatinib (Gleevec), BAY43-9006, brostalicina, lenalidomida (Revlimid), talidomida (Thalomid), docetaxel (Taxotere), erlotinib (Tarceva), vatalanib (PTK-787), VEGF-trap, fenretidina, bortezomib, bevacizumab (Avastin), pertuzumab y/o rituximab.

Una composición terapéutica también es contenido de la presente invención, que comprende: fármaco anti-cáncer y un compuesto de fórmula II, un tautómero del compuesto, una sal del compuesto, una sal del tautómero, o una mezcla de los mismos como una preparación combinada para el uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de cáncer resistente a los fármacos en el que el cáncer resistente a los fármacos es resistente a mesilato de imatinib (Gleevec), BAY43-9006, brostalicina, erlotinib (Tarceva), gefitinib (Iressa) o vatalanib (PTK-787) o en el tratamiento de cáncer resistente a los fármacos inhibiendo una cinasa seleccionada de ABL (T315I) o FLT3 (D835Y) en un paciente con cáncer resistente a los fármacos.

Como referencia, se describe un compuesto de fórmula I, un tautómero del compuesto, una sal del compuesto, una sal del tautómero, una mezcla de los mismos, o una composición farmacéutica que comprende el compuesto, el tautómero, la sal del compuesto, la sal del tautómero, o la mezcla. El compuesto de fórmula I tiene la siguiente fórmula:



I

en donde:

5  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ , y  $R^4$  pueden ser los mismos o diferentes y se seleccionan independientemente de los grupos de H, Cl, Br, F, I,  $-OR^{10}$ , grupos  $-NR^{11}R^{12}$ , grupos alquilo sustituido o no sustituido primario, secundario, o terciario, grupos arilo sustituido o no sustituido, grupos alquenilo sustituido o no sustituido, grupos alquinilo sustituido o no sustituido, grupos heterociclilo sustituido o no sustituido, o grupos heterocicliil alquilo sustituido o no sustituido;

10  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$ , y  $R^8$  pueden ser los mismos o diferentes y se seleccionan independientemente de H, Cl, Br, F, I, grupos  $-OR^{13}$ , grupos  $-NR^{14}R^{15}$ , grupos  $-SR^{16}$ , grupos alquilo sustituido o no sustituido primario, secundario, o terciario, grupos arilo sustituido o no sustituido, grupos alquenilo sustituido o no sustituido, grupos alquinilo sustituido o no sustituido, grupos heterociclilo sustituido o no sustituido, grupos heterocicliil alquilo sustituido o no sustituido, grupos alcoxi alquilo sustituido o no sustituido, grupos ariloxi alquilo sustituido o no sustituido, o grupos heterocicliiloxi alquilo sustituido o no sustituido;

15  $R^{10}$  y  $R^{13}$  pueden ser los mismos o diferentes y se seleccionan independientemente de grupos alquilo sustituido o no sustituido, grupos arilo sustituido o no sustituido, grupos heterociclilo sustituido o no sustituido, grupos heterocicliil alquilo sustituido o no sustituido, grupos alcoxi alquilo sustituido o no sustituido, grupos ariloxi alquilo sustituido o no sustituido, o grupos heterocicliiloxi alquilo sustituido o no sustituido;

$R^{11}$  y  $R^{14}$  pueden ser los mismos o diferentes y se seleccionan independientemente de grupos alquilo sustituido o no sustituido, grupos arilo sustituido o no sustituido, o grupos heterociclilo sustituido o no sustituido;

20  $R^{12}$  y  $R^{15}$  pueden ser los mismos o diferentes y se seleccionan independientemente de grupos alquilo sustituido o no sustituido, grupos arilo sustituido o no sustituido, o grupos heterociclilo sustituido o no sustituido; y

$R^{16}$  se selecciona de los grupos alquilo sustituido o no sustituido, grupos arilo sustituido o no sustituido, o grupos heterociclilo sustituido o no sustituido.

Objetos adicionales, características y ventajas de la invención serán aparentes a partir de la siguiente descripción detallada.

#### 25 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una imagen explorada que muestra las imágenes bioluminescentes de cuerpo completo (BLI) obtenidas utilizando un sistema de creación de imagen IVIS (Xenogen) de ratones SCID-beige después de una inyección intravenosa con células KMS-11-luc.

30 La figura 2 es una gráfica que muestra que ratones SCID-beige inyectados con células KMS-11-luc y tratados con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (20 mg/kg/d) exhiben una cantidad de cuenta de fotón media significativamente más baja que aquellos tratados con vehículo.

35 La figura 3 es una imagen explorada de BLIs de cuerpo completo I obtenida utilizando un sistema de creación de imagen IVIS (Xenogen) de ratones SCID-beige después de la inyección intravenosa con células KMS-11-luc. Las BLIs a la izquierda son de ratones tratados con vehículo y las BLIs a la derecha son de ratones tratados con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (compuesto, 20 mg/kg/d).

La figura 4 es una gráfica que compara el porcentaje de supervivencia de ratones SCID-beige intravenosamente inyectados con células KMS-11-luc y luego tratados con cualquier vehículo (diamantes) o con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (triángulos, 20 mg/kg/d).

40 Las figuras 5-7 son gráficas que muestran que 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (compuesto 1) modula la expresión FLT3 objeto y demuestra efectos anti-proliferativos contra

células MV4;11 y RS4;11. En la figura 5, MV4;11 (▲) o RS4;11 (en presencia del ligando FLT3) (■) se incubaron con diluciones seriales del compuesto 1. La viabilidad de la célula se determinó por el ensayo MTS después de un periodo de 72 horas de incubación. Los valores  $CE_{50}$  se calcularon utilizando regresión no lineal. En la figura 6, el suero fetal MV4;11 (ITD) o en la Figura 7, Las células RS4;11 (WT) se incubaron con un incremento de concentración del Compuesto 1 durante 3 horas previo a la célula lisis. Las células RS4;11 se estimularon con ligando FLT3 (100 ng/ml) durante 15 minutos, como se indica. Las células lisadas completas se inmunoprecipitaron con anticuerpo FLT3 anti-humano, resuelto por SDS-PAGE. Las inmunoabsorciones se probaron con anticuerpo anti-fosotirosina (carril superior). Las membranas se cortaron en tiras y reexaminaron con anti-FLT3 para demostrar carga igual de FLT3 (carril inferior). Se reportaron cambios en pFLT3 como porcentaje de inicio (sin tratamiento) utilizando densitometría.

Las figuras 8 y 9 son gráficas que muestran la inhibición dependiente de dosis de la fosforilación de ERK y STAT5 mediada por FLT3 en células MV4;11 por 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (compuesto 1). Células MV4;11 (desprovistas de suero) se incubaron con varias concentraciones del Compuesto 1 durante 3 horas y el pERK intracelular (Figura 8) se detectó por transferencia Western y pSTAT5 (figura 9) se determinó utilizando citometría de flujo. Los cambios en pERK o pSTAT5 se reportan como porcentaje de inicio (sin tratamiento) utilizando densitometría.

La figura 10 es una gráfica que muestra que 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (compuesto 1) inhibe la producción autocrina de VEGF por células MV4;11 *in vitro*. Células MV4;11 AML cultivadas en medio que contiene 10% de FBS se incubaron con o sin 0,001, 0,01, 0,1, 0,5 y 1  $\mu$ M del compuesto 1 durante 48 horas. Los sobrenadantes se analizaron por los niveles de VEGF humano (normalizados por el contenido de proteína celular).

La figura 11 es una gráfica que muestra que 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (compuesto 1) inhibe la fosforilación de FLT3 y STAT5 en xenoinjertos tumorales en ratones SCID-NOD. Ratones SCID-NOD que portan tumores MV4;11 s.c. (300  $mm^3$ ; n= 3 ratones/grupo) se trataron ya sea con vehículo o 10 mg/kg del compuesto 1 durante 5 días. Los tumores se extirparon en el día 5 a 4, 8, 24, y 48 h después de la dosificación, se pulverizaron y de inmediato se congelaron en forma instantánea (-70°C). Para modulación de pFLT3 o pSTAT5: lisados tumorales se inmunoprecipitaron con anticuerpo ya sea anti-FLT3 humano o anti-STAT5, se resolvieron por SDS-PAGE. Las inmunoabsorciones se examinaron con el anticuerpo antifosotirosina apropiado (carril superior). Las membranas se cortaron en tiras y se reexaminaron ya sea con anti-FLT3 o anti-STAT5 para la determinación de proteína FLT3 o STAT5 total como controles de carga (carril inferior). Cada carril representa un tumor por separado.

Las figuras 12-16 son gráficas que muestran la actividad antitumoral de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (compuesto 1) en un modelo de xenoinjerto subcutáneo de tumores leucémicos MV4;11 o RS4;11 humanos en ratones SCID-NOD. Células (Figura 12) MV4;11 o (Figura 13) RS4;11 se implantaron s.c. en el flanco derecho de ratones SCID-NOD (n=10 ratones/grupo). En los estudios con MV4;11, Vehículo (◇) o Compuesto 1 a dosis de 1 (●), 5 (▲), o 30 (■) mg/kg/d durante 15 días se administraron oralmente cuando los tumores eran de ~ 300  $mm^3$ . En los estudios con RS4;11, vehículo (◇) o compuesto 1 a dosis de 10 (▲), 30 (■), 100 (◆) o 150 (●) mg/kg/d durante 8 días se administraron oralmente cuando los tumores eran de ~ 300  $mm^3$ . (Figura 14) Efecto de los regímenes de dosificación diaria, intermitente y cíclica del Compuesto 1 sobre la eficacia de tumores MV4;11. El compuesto 1 se administró oralmente a una dosis de 30 mg/kg ya sea diariamente (■), cada tercer día/q.o.d. (●) o cíclico 7 días sí/7 días no (X). (Figura 15) El compuesto 1 induce regresión de tumores MV4;11 grandes. Los tumores MV4;11s.c. (n=10 ratones/grupo) se situaron en 300 (▲), 500 (■) o 1000 (●)  $mm^3$ . Los tumores tratados con vehículo (◆) se midieron a un volumen tumoral máximo de 2000  $mm^3$  (en la figura 16 se muestra solamente hasta 1000  $mm^3$ ). El compuesto 1 se administró oralmente a 30 mg/kg/d (primer ciclo). La dosificación se discontinuó después de 50 días, y la durabilidad de las respuestas se monitoreó en lo sucesivo. (Figura 16) Los tumores MV4;11 recurrentes después del pretratamiento con 30 mg/kg/d x 50 días se trataron nuevamente con 30 mg/kg/d (segundo ciclo). En el panel AD, los datos se expresan como volumen tumoral medio  $\pm$  SE (n = 10 ratones/grupo), el panel E ilustra los volúmenes tumorales de ratones individuales (n = 10).

Las figuras 17-19 son gráficas que muestran la apoptosis/necrosis tumoral y la inhibición de la proliferación celular de tumores MV4;11 o RS4;11 en ratones SCID-NOD tratados con 30 mg/kg de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (compuesto 1). (Figura 17) Respuestas tempranas de tumores MV4;11 con tratamiento de 30 mg/kg del compuesto 1. Ratones SCID-NOD que portan tumores MV4;11 s.c. (n= 3-5 /grupo) se trataron ya sea con vehículo (a-e) o el 30 mg/kg/d del compuesto 1 durante 5 días (f-j). Los tumores se extirparon en los días 2-5. Los tumores embebidos en parafina se tiñeron ya sea con hematoxilina y eosina (día 1 para a, f) o se inmunotiñeron con Ki67 (día 5 para b, g), pERK (día 5 para c, h), caspasa-3 desdoblada (día 5 para d, i) o PARP (día 5 para e, j) (con contra-tinción de hematoxilina). La figura 17 ilustra secciones representativas de n= 3 tumores tratados individuales. (Figura 18) Inmunohistoquímica de tumores RS4;11 después del tratamiento de 30 mg/kg del compuesto 1. Tumores RS4;11 (n= 3-5 /grupo) se trataron ya sea con Vehículo (a-c) o el 30 mg/kg/d del compuesto 1 (d-f). Los tumores se extirparon a los 9 días. Los tumores embebidos en parafina se tiñeron ya sea con hematoxilina y eosina (a, d) o se inmunotiñeron con Ki67 (b, e), o

pERK (c, f). La figura 18 ilustra secciones representativas de n= 3 tumores tratados individuales. (Figura 19) Ratones SCID-NOD que portan tumores MV4;11 s.c. (n= 3-5 /grupo) se trataron ya sea con vehículo o 30 mg/kg/d del compuesto 1. Los tumores tratados con vehículo se extirparon en el día 15 y los tumores tratados con el compuesto 1 se extirparon en el día 89 (50 dosis diarias del Compuesto 1 + 39 días sin tratamiento). Los tumores embebidos en parafina se tiñeron ya sea con hematoxilina y eosina o se inmunotiñeron con Ki67 (con contra-tinción de hematoxilina). (a) Vehículo (H&E, día 15); (b) vehículo (Ki67, día 15); (c) compuesto 1, respuesta parcial (H&E, día 89); (d) compuesto 1, respuesta parcial (Ki67, día 89) y (e) compuesto 1, respuesta completa (H&E, día 89). Las flechas en c, d apuntan hacia áreas de células viables dispersas en el tejido necrótico/cicatrizante. La figura 19 ilustra secciones representativas de n= 3-5 tumores tratados. La magnificación de las imágenes tal y como se capturan se indica en las figuras.

Las Figuras 20 y 21 son gráficas que muestran que 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (compuesto 1) prolonga la supervivencia de ratones SCID-NOD que portan células MV4;11 intravenosas. Ratones SCID-NOD irradiados se implantaron con MV4;11 ( $1 \times 10^7$  células, i.v.), i.v. Los tratamientos se iniciaron en el día 23, consistiendo ya sea de vehículo (♦) o 20 mg/kg del compuesto 1 oral administrados diariamente (▲) o programados 7 días sí/7 días no (■) desde los días 23 - 98. Los ratones que produjeron como respuesta signos tempranos de parálisis de extremidades posteriores o condición de salud deficiente se sacrificaron. La figura 20 ilustra el porcentaje de supervivencia Kaplan-Meier vs. diagramas de tiempo (n= 10-12 ratones/grupo). (Figura 21) Evaluación citométrica de flujo o histopatológica de la BM después de la inoculación i.v. de células MV4;11. Los tratamientos consistieron ya sea de vehículo (a-c) o 20 mg/kg/d del compuesto 1 (d-f; días 23-98). Se recolectaron fémures en el día 51 (a-d) o día 167 (e, f), se aisló la BM y se analizó por % de células MV4;11 humanas utilizando citometría de flujo (a,d). Las células de BM se tiñeron con anticuerpo ya sea anti-HLAA,B,C humano-FITC (tiñe el epítipo en el MHC-I humano, línea continua) o de control de isotipo (línea punteada). El porcentaje de células injertadas se identificó después de activación periódica apropiada, y tinción positiva para anti-HLA-A,B,C humano (marcador). Especímenes de BM de ratones tratados con vehículo (día 51) o tratados con el compuesto 1 (día 167) se tiñeron histoquímicamente con H&E (b, e) o se inmunotiñeron con una anticuerpo anti-mitocondria humana (c, f) el cual tiñe las células MV4;11 humanas en la BM de ratón. Magnificación 400x; las flechas apuntan hacia células MV4;11 identificadas (b, c).

La figura 22 es un esquema que muestra cómo los compuestos de la invención inhiben selectivamente las tirosina cinasas de receptor de clase III, IV, y V (véase también la Tabla de Actividad de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona contra varias RTK).

Las figuras 23a y 23b son gráficas que esquematizan el volumen tumoral como una función de los días de tratamiento con vehículo y con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona. Estas gráficas muestran que el tratamiento con el compuesto 1 ocasionó regresión y/o estabilización de la enfermedad en 90-100% de los animales con grandes xenoinjertos de colon establecidos (los xenoinjertos de tumor de colon humano KM12L4A en ratones desnudos se dosificaron diariamente con el compuesto 1 cuando los tumores alcanzaron  $500 \text{ mm}^3$  (23a) o  $1000 \text{ mm}^3$  (23b)).

La figura 24 son imágenes de PET-CT exploradas de un paciente humano del sexo femenino con GIST refractario a imatinib tratado con el compuesto 1 (CHIR258).

Las figuras 25a y 25b son gráficas de  $C_{\max}$  (ng/mL) medias versus dosis y AUC medias ( $O, t_{\text{last}}$  (ng\*h/mL) que muestra que el plasma expuesto incrementa proporcionalmente cuando el compuesto 1 es administrado.

La figura 26 es una imagen explorada de una transferencia Western que muestra que 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona inhibe la fosforilación de ERK basal en leucocitos de sangre periférica (PBL). Las muestras de control positivo son células de sangre de un donador normal idénticamente procesado en las muestras clínicas.

#### 45 Descripción detallada de la invención

Los compuestos de fórmula II actúan como antagonistas del receptor de tirosina cinasas, y, más particularmente, como inhibidores de funciones de PDGFR $\alpha$  y PDGFR $\beta$ , bFGF y/o VEGF-RTK. Dichos compuestos también tienen potente actividad con respecto a otra tirosina cinasa y también con respecto a varias serina/treonina cinasas. Tal como se define anteriormente, los compuestos de fórmula II pueden formularse dentro de las formulaciones farmacéuticas que son útiles, en el tratamiento de pacientes con cánceres resistentes a los fármacos, por ejemplo reduciendo la proliferación capilar.

Las siguientes abreviaciones y definiciones son utilizadas a través de esta aplicación:

“AML” es una abreviación que significa leucemia mieloide aguda.

- “ALS” es una abreviación que significa esclerosis lateral amiotrófica.
- “AD” es una abreviación que significa enfermedad de Alzheimer.
- “APP” es una abreviación que significa proteína precursora amiloide.
- “ASCT” es una abreviación que significa trasplante de célula madre análoga.
- 5 “BM” es una abreviación que significa médula ósea.
- “bFGF” es una abreviación que significa factor de crecimiento de fibroblasto.
- “FGFR1”, también referida como bFGFR, es una abreviación que significa tirosina cinasa que interactúa con el factor de crecimiento de fibroblasto FGF.
- “Cdc 2” es una abreviación que significa ciclo 2 de división celular.
- 10 “Cdk 2” es una abreviación que significa cinasa 2 dependiente de ciclina.
- “Cdk 4” es una abreviación que significa cinasa 4 dependiente de ciclina
- “Chk 1” es una abreviación que significa cinasa 1 punto de control.
- “CK1<sub>ε</sub>” es una serina/treonina cinasa que significa caseína cinasa 1 (épsilon).
- 15 “c-ABL” es una abreviación para una tirosina cinasa que significa un producto oncogén originalmente aislado del virus de leucemia Abelson.
- “C-Kit” también conocido como factor de receptor de célula madre o receptor del factor de crecimiento de célula cebada.
- “FGF” es una abreviación para el factor de crecimiento de fibroblasto que interactúa con FGFR1.
- 20 “FGFR3” es una abreviación que significa el receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblasto de tirosina cinasa que algunas veces es expresado en cánceres de mieloma-tipo múltiple.
- “Flk-1” es una abreviación que significa tirosina cinasa 1 de hígado fetal, también conocida como tirosina cinasa de dominio de cinasa-inserto o KDR (humano), también conocido como receptor-2 de factor de crecimiento endotelial vascular o VEGFR2 (KDR (humano), Flk-1 (ratón)).
- 25 “FLT-1” es una abreviación que significa tirosina cinasa 1 similar a fms, también conocida como receptor-1 del factor de crecimiento endotelial vascular o VEGFR1.
- “FLT-3” es una abreviación que significa cinasa-3 de tirosina similar a fms, también conocida como célula madre tirosina cinasa 1 (STK 1).
- “FLT-4” es una abreviación que significa tirosina cinasa-4 similar a fms, también conocida como VEGFR3.
- “Fyn” es una abreviación que significa oncogén cinasa FYN relacionada a SRC, FGR, YES.
- 30 “GSK-3” es una abreviación que significa sintasa cinasa 3 de glicógeno.
- “PAR-1” es una abreviación que significa una cinasa también conocida como cinasa asociada desordenada, también conocida como HDAK.
- “Lck” es una abreviación que significa tirosina cinasa de proteína de linfocito específico.
- 35 “MEK1” es una abreviación que significa una serina treonina cinasa en la MAPK (proteína cinasa activada por Mitogen) trayectoria de transducción de señal en un módulo que se forma de la Raf-MEK1-ERK. MEK1 fosforila ERK (cinasa regulada extracelular).
- “MM” es una abreviación que significa mieloma múltiple.

“NEK 2” es una abreviación que significa cinasa relacionada a NIM-A.

“NIM-A” es una abreviación que se representa porque nunca entra en mitosis.

“PDGF” es una abreviación que significa factor de crecimiento derivado de plaquetas. PDGF interactúa con tirosina cinasas PDGFR $\alpha$  y PDGFR $\beta$ .

5 “Rsk2” es una abreviación que significa cinasa 2 S6 ribosómica.

“Raf” es una serina/treonina cinasa en la trayectoria de transducción de señal MAPK.

“RTK” es una abreviación que significa el receptor de tirosina cinasa.

“Tie-2” es una abreviación que significa tirosina cinasa con dominios de homología Ig y EGF.

“VEGF” es una abreviación que significa factor de crecimiento endotelial vascular.

10 “VEGF-RTK” es una abreviación que significa receptor de factor de crecimiento endotelial vascular tirosina cinasa.

Generalmente, la referencia a un cierto elemento tal como hidrógeno o H significa incluir todos los isótopos de ese elemento. Por ejemplo, si un grupo R se define para incluir hidrógeno o H, también incluye deuterio y tritio.

La frase “alquilo no sustituido” se refiere a grupos alquilo que no contienen átomos heterogéneos. De este modo la frase incluye grupos alquilo de cadena lineal tales como metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo y similares. La frase también incluye isómeros de cadena ramificada de grupos alquilo de cadena lineal, que incluyen pero no se limitan a, lo siguiente lo cual se proporciona a modo de ejemplo:

15 -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), -CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -C(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>),  
 -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,  
 -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>,  
 20 -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); y otros. La frase también incluye grupos alquilo cíclicos tales como grupos cicloalquilo tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, y ciclooctilo y tales anillos sustituidos con grupos alquilo de cadena lineal o ramificada como se definen en lo anterior. La frase también incluye grupos alquilo policíclicos tales como, pero no limitados a, adamantilo norbornilo, y biciclo[2.2.2]octilo y tales anillos sustituidos con grupos alquilo de cadena lineal o ramificada como se definen en lo anterior. De este modo, la frase grupos alquilo no sustituido incluyen grupos alquilo primarios, grupos alquilo secundarios, y grupos alquilo terciarios. Grupos alquilo no sustituido pueden unirse a uno o más átomo(s) de carbono, átomo(s) de oxígeno, átomo(s) de nitrógeno, y/o átomo(s) de azufre en el compuesto principal. Grupos alquilo preferidos no sustituido incluyen grupos alquilo de cadena lineal o ramificada y grupos alquilo cíclicos que tienen 1 a 20 átomos de carbonos. Más grupos alquilo no sustituido preferido tienen de 1 a 10 átomos de carbonos mientras que aún grupos más preferidos tienen de 1 a 5 átomos de carbonos. Grupos alquilo no sustituido más preferidos incluyen grupos alquilo de cadena lineal o ramificada que tienen de 1 a 4 o de 1 a 3 átomos de carbonos e incluyen metilo, etilo, propilo, y -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

La frase “alquilo sustituido” se refiere a un grupo alquilo no sustituido como se define en lo anterior en los que uno o más enlaces a un carbono/carbonos o hidrógeno(s) se reemplazan por un enlace en átomos sin hidrógeno y sin carbonos tales como, pero no limitados a, un átomo de halógeno en haluros tales como F, Cl, Br, y I; un átomo de oxígeno en grupos tales como grupos hidroxilo, grupos alcoxi, grupos ariloxi, y grupos éster; un átomo de azufre en grupos tales como grupos tiol, grupos sulfuro de alquilo y arilo, grupos sulfona, grupos sulfonilo, y grupos sulfóxido; un átomo de nitrógeno en grupos tales como aminas, amidas, alquilamina, dialquilaminas, arilaminas, alquilarilaminas, diarilaminas, N-óxidos, imidas, y enaminas; un átomo de silicio en grupos tales como en grupos trialquilsililo, grupos dialquilarilsililo, grupos alquildiarilsililo, y grupos triarilsililo; y otros átomos heterogéneos en varios otros grupos. Grupos alquilo sustituidos también incluyen grupos en los cuales uno o más enlaces en un átomo(s) de carbono o hidrógeno se reemplaza por un enlace en un heteroátomo tal como oxígeno en carbonilo, carboxilo, y grupos éster; nitrógeno en grupos tales como iminas, oximas, hidrazonas, y nitrilos. Grupos alquilo sustituidos preferidos incluyen, entre otros, grupos alquilo en los cuales uno o más enlaces a un átomo de carbono o hidrógeno se reemplazan por uno o más enlaces en los átomos de flúor. Un ejemplo de un grupo alquilo sustituido es el grupo trifluorometilo y otros grupos alquilo que contienen el grupo trifluorometilo. Otros grupos alquilo incluyen aquellos en los cuales uno o más se enlaza a un átomo de carbono o hidrógeno se reemplaza por un enlace en un átomo de oxígeno de modo que el grupo alquilo sustituido contiene un grupo hidroxilo, alcoxi, ariloxi, o heterociclioxi. Aún otros grupos alquilo incluyen grupos alquilo que tienen un grupo amina, alquilamina, dialquilamina, arilamina, (alquilo)(aril)amina, diarilamina, heterocicliamina, (alquilo)(heterocicli)amina, (aril)(heterocicli)amina, o grupo diheterocicliamina.

La frase “arilo no sustituido” se refiere a grupos arilo que no contiene átomos heterogéneos. De este modo, a

manera de ejemplo, la frase incluye, pero no se limita a, grupos tales como fenilo, bifenilo, antraceno, y naftilo. Aunque la frase "arilo no sustituido" incluye grupos que contienen anillos condensados tales como naftaleno, esto no incluye grupos arilo que tienen otros grupos tales como alquilo o grupos halo unidos a uno de los miembros en el anillo, como grupos arilo tales como toloilo se consideran aquí que son grupos arilo sustituidos como se describe en lo siguiente. Un grupo arilo no sustituido preferido es fenilo. En algunas modalidades, grupos arilo no sustituido tienen de 6 a 14 átomos de carbonos. Grupos arilo no sustituido pueden unirse a uno o más átomos de carbono, átomos de oxígeno, átomos de nitrógeno, y/o átomos de azufre en el compuesto principal.

La frase "grupo arilo sustituido" tiene el mismo significado con respecto a grupos arilo no sustituido que los grupos alquilo sustituidos contenidos con respecto a los grupos alquilo no sustituido. Sin embargo, un grupo arilo sustituido también incluye grupos arilo en los cuales uno de los carbonos aromáticos se une a uno de los átomos que no son carbono o que no son hidrógeno descritos anteriormente y también incluyen grupos arilo en los cuales uno o más carbonos aromáticos del grupo arilo se une a un grupo alquilo, alqueno, o alquino sustituido o no sustituido como se define aquí. Esto incluye configuraciones de enlace en las cuales dos átomos de carbonos de grupo arilo se unen a dos átomos de un grupo alquilo, alqueno, o alquino para definir un sistema de anillo fusionado (por ejemplo, dihidronaftilo o tetrahidronaftilo). De este modo, la frase "arilo sustituido" incluye, pero no se limita a grupos tales como toloilo, e hidroxifenilo entre otros.

La frase "alqueno no sustituido" se refiere a grupos de cadena lineal o ramificada y cíclicos tales como aquellos descritos con respecto a grupos alquilo no sustituido como se definen en lo anterior, excepto que al menos un enlace doble existe entre dos átomos de carbono. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a vinilo,  $-\text{CH}=\text{C}(\text{H})(\text{CH}_3)$ ,  $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{C}(\text{H})_2$ ,  $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{C}(\text{H})(\text{CH}_3)$ ,  $-\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)=\text{CH}_2$ , ciclohexeno, ciclohexadieno, ciclohexadieno, butadieno, pentadieno, y hexadieno entre otros. En algunas modalidades, grupos alqueno no sustituido tienen de 2 a 8 átomos de carbonos.

La frase "alqueno sustituido" tiene el mismo significado con respecto a grupos alqueno no sustituido que los grupos alquilo sustituidos tuvieron con respecto a grupos alquilo no sustituido. Un grupo alqueno sustituido incluye grupos alqueno en los cuales un átomo que no es carbono o que no es hidrógeno se unen a un doble carbono unido a otro carbono y aquellos en los cuales uno del átomo que no es carbono o que no es hidrógeno se une a un carbono no involucrado en un doble enlace a otro carbono.

La frase "alquino no sustituido" se refiere a grupos de cadena lineal o ramificada tales como aquellos descritos con respecto a grupos alquilo no sustituido como se definen en lo anterior, excepto que al menos un enlace triple existe entre dos átomos de carbono. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a  $-\text{C}\equiv\text{C}(\text{H})$ ,  $-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_3)$ ,  $-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ ,  $-\text{C}(\text{H}_2)\text{C}\equiv\text{C}(\text{H})$ ,  $-\text{C}(\text{H})_2\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_3)$ , y  $-\text{C}(\text{H})_2\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)$  entre otros. En algunas modalidades, grupos alquino no sustituido tienen de 2 a 8 átomos de carbono.

La frase "alquino sustituido" tiene el mismo significado con respecto a grupos alquino no sustituido que los grupos alquilo sustituidos tuvieron con respecto a grupos alquilo no sustituido. Un grupo alquino sustituido incluye grupos alquino en los cuales un átomo que no es carbono o que no es hidrógeno se une a un triple carbono unido a otro carbono y aquellos en los cuales un átomo que no es carbono o que no es hidrógeno se une a un carbono no involucrado en un triple enlace a otro carbono.

La frase "heterociclilo no sustituido" se refiere tanto a compuestos de anillo aromático y no aromático incluyendo compuestos de anillo monocíclico, bicíclico y policíclico tales como, pero no limitados a, quinuclidilo, que contienen 3 o más miembros en el anillo de los cuales uno o más es un heteroátomo tal como, pero no limitado a, N, O, y S. Aunque la frase "heterociclilo no sustituido" incluye anillos heterocíclicos condensados tales como bencimidazolilo, no incluyen grupos heterociclilo que tienen otros grupos tales como grupos alquilo o halo unidos a uno de los miembros en el anillo como los compuestos tales como 2-metilbencimidazolilo son grupos heterociclilo sustituidos. Ejemplos de grupos heterociclilo incluyen, pero no se limitan a: anillos de 3 a 8 miembros insaturados que contienen 1 a 4 átomos de nitrógeno tales como, pero no limitados a, pirrolilo, pirrolinilo, imidazolilo, pirazolo, piridinilo, dihidropiridinilo, pirimidilo, pirazinilo, piridazinilo, triazolilo (por ejemplo, 4H-1,2,4-triazolilo, 1H-1,2,3-triazolilo, 2H-1,2,3-triazolilo etc.), tetrazolilo, (por ejemplo, 1H-tetrazolilo, 2H tetrazolilo, etc.); anillos de 3 a 8 miembros saturados que contienen 1 a 4 átomos de nitrógeno tales como, pero no limitados a, pirrolidinilo, imidazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo; grupos heterocíclicos insaturados condensados que contienen 1 a 4 átomos de nitrógeno tales como, pero no limitados a, indolilo, isoindolilo, indolinilo, indolizino, bencimidazolilo, quinolilo, isoquinolilo, indazolilo, benzotriazolilo; anillos de 3 a 8 miembros insaturados que contienen 1 a 2 átomos de oxígeno y 1 a 3 átomos de nitrógeno tales como, pero no limitados a, oxazolilo, isoxazolilo, oxadiazolilo (por ejemplo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,3,4-oxadiazolilo, 1,2,5-oxadiazolilo, etc.); anillos de 3 a 8 miembros saturados que contienen 1 a 2 átomos de oxígeno y 1 a 3 átomos de nitrógeno tales como, pero no limitados a, morfolinilo; grupos heterocíclicos condensados insaturados que contienen 1 a 2 átomos de oxígeno y 1 a 3 átomos de nitrógeno, por ejemplo, benzoxazolilo, benzoxadiazolilo, benzoxazinilo (por ejemplo, 2H-1,4-benzoxazinilo etc.); anillos de 3 a 8 miembros insaturados que contienen 1 a 3 átomos de azufre y 1 a 3 átomos de nitrógeno tales como, pero no limitados a, tiazolilo, isotiazolilo, tiadiazolilo (por ejemplo, 1,2,3-tiadiazolilo, 1,2,4-tiadiazolilo, 1,3,4-tiadiazolilo, 1,2,5-tiadiazolilo, etc.); anillos de 3 a 8 miembros saturados que contienen 1 a 2 átomos de azufre y 1 a 3 átomos de nitrógeno tales como, pero no

limitados a, tiazolodinitilo; anillos de 3 a 8 miembros saturados e insaturados que contienen 1 a 2 átomos de azufre tales como, pero no limitados a, tienilo, dihidroditinilo, dihidroditionilo, tetrahidrotiofeno, tetrahidrotiopirano; anillos heterocíclicos condensados insaturados que contienen 1 a 2 átomos de azufre y 1 a 3 átomos de nitrógeno tales como, pero no limitados a, benzotiazolilo, benzotiadiazolilo, benzotiazinilo (por ejemplo, 2H-1,4-benzotiazinilo, etc.), dihidrobenzotiazinilo (por ejemplo, 2H-3,4-dihidrobenzotiazinilo, etc.), anillos de 3 a 8 miembros insaturados que contienen átomos de oxígeno tales como, pero no limitados a, furilo; anillos heterocíclicos condensados insaturados que contienen 1 a 2 átomos de oxígeno tales como benzodioxolilo (por ejemplo, 1,3-benzodioxoilo, etc.); anillos de 3 a 8 miembros insaturados que contienen un átomo de oxígeno y 1 a 2 átomos de azufre tales como, pero no limitados a, dihidrooxatiinilo; anillos de 3 a 8 miembros saturados que contienen 1 a 2 átomos de oxígeno y 1 a 2 átomos de azufre tales como 1,4-oxatiano; anillos condensados insaturados que contienen 1 a 2 átomos de azufre tales como benzotienilo, benzoditiinilo; y anillos heterocíclicos condensados insaturados que contienen un átomo de oxígeno y 1 a 2 átomos de oxígeno tales como benzoxatiinilo. El grupo heterociclilo también incluye aquellos descritos anteriormente en los cuales uno o más átomos S en el anillo tienen doble enlace a uno o dos átomos de oxígeno (sulfóxidos y sulfonas). Por ejemplo, grupos heterociclilo incluyen óxido de tetrahidrotiofeno, y 1,1-dióxido de tetrahidrotiofeno. Los grupos heterociclilo preferidos contienen 5 ó 6 miembros en el anillo. Grupos heterociclilo más preferidos incluyen morfolina, piperazina, piperidina, pirrolidina, imidazol, pirazol, 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol, tetrazol, tiofeno, tiomorfolina, tiomorfolina en la cual el átomo de S de la tiomorfolina se une uno o más átomos de O, pirrol, homopiperazina, oxazolidin-2-ona, pirrolidin-2-ona, oxazol, quinuclidina, tiazol, isoxazol, furano, y tetrahidrofurano.

La frase "heterociclilo sustituido" se refiere a un grupo heterociclilo no sustituido como se define en lo anterior en el cual uno o más de los miembros en el anillo se une a un átomo que no es hidrógeno tal como se describe anteriormente con respecto a grupos alquilo sustituidos y grupos arilo sustituidos. Ejemplos, incluyen, pero no se limitan a, 2-metilbencimidazolilo, 5-metilbencimidazolilo, 5-clorobenzotiazolilo, grupos N-alquil piperazinilo tales como 1-metil piperazinilo, piperazin-N-óxido, N-óxidos de N-alquil piperazina, 2-fenoxi-tiofeno, y 2-cloropiridinilo entre otros. Además, los grupos heterociclilo sustituidos también incluyen grupos heterociclilo en los cuales el enlace al átomo que no es hidrógeno es un enlace a un átomo de carbono que es parte de arilo sustituido y no sustituido, aralquilo sustituido y no sustituido, o grupo heterociclilo no sustituido. Ejemplos incluyen pero no se limitan a 1-bencilpiperidinilo, 3-fenitiomorfolinilo, 3-(pirrolidin-1-il)-pirrolidinilo, y 4-(piperidin-1-il)-piperidinilo. Grupos tales como N-grupo alquilo piperazina sustituidos tales como N-metil piperazina, grupos morfolina sustituidos, y grupos piperazin N-óxido tales como piperazina N-óxido y N-alquil piperazina N-óxidos son ejemplos de algunos grupos heterociclilo sustituidos. Grupos tales como grupos piperazina sustituidos tales como grupos piperazina sustituidos con N-alquilo tales como N-metil piperazina y similares, grupos morfolina sustituidos, grupos N-óxido de piperazina, tales como grupos N-óxido de piperazina y grupo N-óxido de N-alquil piperazina son ejemplos de algunos grupos heterociclilo sustituidos que son especialmente adecuados como grupos R<sup>6</sup> o R<sup>7</sup>.

La frase "heterociclilalquilo no sustituido" se refiere a grupos alquilo no sustituido como se definen en lo anterior en los cuales un enlace de hidrógeno o carbono del grupo alquilo no sustituido se reemplaza con un enlace a un grupo heterociclilo como se definen en lo anterior. Por ejemplo, metilo (-CH<sub>3</sub>) es un grupo alquilo no sustituido. Si un átomo de hidrógeno del grupo metilo se reemplaza por un enlace a un grupo heterociclilo, tal como si el carbono del metilo se une al carbono 2 de la piridina (uno de los carbonos unidos al N de la piridina) o 3 ó 4 carbonos de la piridina, entonces el compuesto es un grupo heterociclilalquilo no sustituido.

La frase "heterociclilalquilo sustituido" tiene el mismo significado con respecto a grupos heterociclilalquilo no sustituido que los grupos aralquilo sustituidos tuvieron con respecto a grupos aralquilo no sustituido. Sin embargo, un grupo heterociclilalquilo sustituido también incluye grupos en los cuales un átomo que no es hidrógeno se une a un heteroátomo en el grupo heterociclilo del grupo heterociclilalquilo tal como, pero no limitado a, un átomo de nitrógeno en el anillo piperidina de un grupo piperidinilalquilo. Además, un grupo heterociclilalquilo sustituido también incluye grupos en los cuales un enlace de carbono o un enlace de hidrógeno de la parte alquilo del grupo se reemplaza por un enlace a un grupo arilo sustituido y no sustituido o aralquilo sustituido y no sustituido. Ejemplos incluyen pero no se limitan a fenil-(piperidin-1-il)-metilo y fenil-(morfolin-4-il)-metilo.

La frase "alcoxi no sustituido" se refiere a un grupo hidroxilo (-OH) en el cual el enlace al átomo de hidrógeno se reemplaza por un enlace a un átomo de carbono de un grupo alquilo no sustituido de otra forma como se definen en lo anterior.

La frase "alcoxi sustituido" se refiere a un grupo hidroxilo (-OH) en el cual el enlace al átomo de hidrógeno se reemplaza por un enlace a un átomo de carbono de un grupo alquilo sustituido de otra forma como se definen en lo anterior.

La frase "heterocicliloxi no sustituido" se refiere a un grupo hidroxilo (-OH) en el cual el enlace al átomo de hidrógeno se reemplaza por un enlace a un átomo en el anillo de un grupo heterociclilo no sustituido de otra forma como se definen en lo anterior.

La frase "heterocicliloxi sustituido" se refiere a un grupo hidroxilo (-OH) en el cual el enlace al átomo de hidrógeno se reemplaza por un enlace a un átomo en el anillo de un grupo heterociclilo sustituido de otra forma como se definen

en lo anterior.

La frase "ariloxialquilo no sustituido" se refiere a un grupo alquilo no sustituido como se definen en lo anterior en el cual un enlace de carbono o enlace de hidrógeno se reemplaza por un enlace en a un átomo de oxígeno el cual está unido a un grupo arilo no sustituido como se definen en lo anterior.

- 5 La frase "ariloxialquilo sustituido" se refiere a un grupo ariloxialquilo no sustituido como se definen en lo anterior en el cual un enlace a un grupo carbono o hidrógeno del grupo alquilo del grupo ariloxialquilo se une a un átomo que no es carbono y que no es hidrógeno como se describe en lo anterior con respecto a grupos alquilo sustituidos o en los cuales el grupo arilo del grupo ariloxialquilo es un grupo arilo sustituido como se define en lo anterior.

- 10 La frase "heterociciloxialquilo no sustituido" se refiere a un grupo alquilo no sustituido como se define en lo anterior en el cual un enlace de carbono o enlace de hidrógeno se reemplaza por un enlace a un átomo de oxígeno el cual se une a un grupo heterocicilo no sustituido como se define en lo anterior.

- 15 La frase "heterociciloxialquilo sustituido" se refiere a un grupo heterociciloxialquilo no sustituido como se define en lo anterior en el cual un enlace a un grupo carbono o hidrógeno del grupo alquilo del grupo heterociciloxialquilo se une a un átomo que no es carbono y que no es hidrógeno como se describe en lo anterior con respecto a grupos alquilo sustituidos o en los cuales el grupo heterocicilo del grupo heterociciloxialquilo es una grupo heterocicilo sustituido como se define en lo anterior.

- 20 La frase "heterocicilalcoxi no sustituido" se refiere a un grupo alquilo no sustituido como se define en lo anterior en el cual un enlace de carbono o enlace de hidrógeno se reemplaza por un enlace a un átomo de oxígeno el cual se une al compuesto principal, y en el cual otro enlace carbono o hidrógeno del grupo alquilo no sustituido se une a un grupo heterocicilo no sustituido como se define en lo anterior.

- 25 La frase "heterocicilalcoxi sustituido" se refiere a un grupo heterocicilalcoxi no sustituido como se define en lo anterior en el cual un enlace a un grupo carbono o hidrógeno del grupo alquilo del grupo heterocicilalcoxi se une a un átomo que no es carbono y que no es hidrógeno como se describe en lo anterior con respecto a grupos alquilo sustituidos o en los cuales el grupo heterocicilo del grupo heterocicilalcoxi es un grupo heterocicilo sustituido como se define en lo anterior. Además, un grupo heterocicilalcoxi sustituido también incluye grupos en los cuales un enlace de carbono o un enlace de hidrógeno a la porción alquilo del grupo puede sustituirse con uno o más heterociclos sustituidos y no sustituido adicionales. Ejemplos incluyen pero no se limitan a pirid-2-il-morfolin-4-ilmetilo y 2-pirid-3-il-2-morfolin-4-iletilo.

- 30 La frase "alcoxialquilo no sustituido" se refiere a un grupo alquilo no sustituido como se define en lo anterior en el cual un enlace de carbono o enlace de hidrógeno se reemplaza por un enlace a un átomo de oxígeno el cual se une a un grupo alquilo no sustituido como se define en lo anterior.

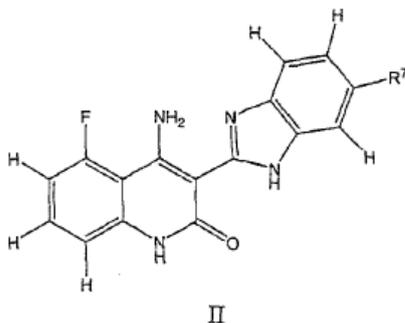
- 35 La frase "alcoxialquilo sustituido" se refiere a un grupo alcoxialquilo no sustituido como se define en lo anterior en el cual un enlace a un grupo carbono o hidrógeno del grupo alquilo y/o el grupo alcoxi del grupo alcoxialquilo se une a un átomo que no es carbono y no es hidrógeno como se describe anteriormente con respecto a grupos alquilo sustituidos.

- 40 El término "protegido" con respecto a grupos hidroxilo, grupos amina, y grupos sulfhidrilo se refiere a formas de estas funcionalidades las cuales están protegidas de una reacción indeseable con un grupo protector conocido a aquellos expertos en la técnica tales como aquellos establecidos en Protective Groups in Organic Synthesis, Greene, T.W.; Wuts, P. G. M., John Wiley & Sons, New York, NY, (3ª Edición, 1999) el cual puede agregarse o eliminarse utilizando los procedimientos establecidos en esto. Ejemplos de grupos hidroxilo protegidos incluyen, pero no se limitan a, ésteres de sililo tales como aquellos obtenidos mediante la reacción de un grupo hidroxilo con un reactivo tal como, pero no limitado a, *t*-butildimetil-clorosilano, trimetilclorosilano, triisopropilclorosilano, trietilclorosilano; éteres de metilo y etilo sustituidos tales como, pero no limitados a éter de metoximetilo, éter de metitiometilo, éter de benciloximetilo, éter de *t*-butoximetilo, éter 2-metoxietoximetilo, éteres de tetrahidropiraniolo, éter de 1-etoxietilo, éter de alilo, éter de bencilo; ésteres tales como, pero no limitados a, benzoilformiato, formiato, acetato, tricloroacetato, y trifluoroacetato. Ejemplos de grupos amina protegidos incluyen, pero no se limitan a, amidas tales como, formamida, acetamida, trifluoroacetamida, y benzamida; imidas, tales como ftalimida, y ditiosuccinimida; y otros. Ejemplos de grupos sulfhidrilo protegidos incluyen, pero no se limitan a, tioéteres tales como S-bencil tioéter, y S-4-picolil tioéter; derivados S-metilo sustituidos tales como hemitio, ditio y aminotio acetales; y otros.

- 50 Una "sal farmacéuticamente aceptable" incluye una sal con una base inorgánica, base orgánica, ácido inorgánico, ácido orgánico, o ácido amino básico o ácido. Como sales de bases inorgánicas, la invención incluye, por ejemplo, metales alcali tales como sodio o potasio; metales de tierra alcalina tales como calcio y magnesio o aluminio; y amoniaco. Como sales de bases orgánicas, la invención incluye, por ejemplo, trimetilamina, trietilamina, piridina, picolina, etanolamina, dietanolamina, y trietanolamina. Como sales de ácidos inorgánicos, la presente invención

5 incluye, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido borhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, y ácido fosfórico. Como sales de ácidos orgánicos, la presente invención incluye, por ejemplo, ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico, ácido metanosulfónico, ácido benenosulfónico, y ácido p-toluenosulfónico. Como sales de aminoácidos básicos, la presente invención incluye, por ejemplo, arginina, lisina y ornitina. Aminoácidos ácidos incluyen, por ejemplo, ácido aspártico y ácido glutámico.

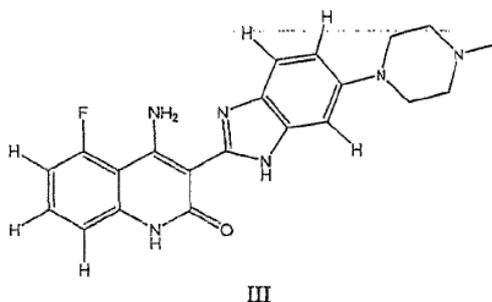
10 Tal como se definió en lo anterior, el compuesto de fórmula II, un tautómero del compuesto, una sal del compuesto, una sal del tautómero, una mezcla de los mismos, o una composición farmacéutica que comprende el compuesto, el tautómero, la sal del compuesto, la sal del tautómero, o la mezcla es útil en el tratamiento de un paciente con cáncer con cáncer resistente a los fármacos. El compuesto de fórmula II tiene la siguiente fórmula:



en donde:

15  $R^7$  es un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido seleccionado de un grupo piperidinilo sustituido o no sustituido, grupo piperazinilo o grupo morfolinilo. En algunas de estas modalidades,  $R^7$  es un grupo N-alkil piperazinilo sustituido o no sustituido. En algunas de las modalidades,  $R^7$  es un grupo N-alkil piperazinilo sustituido o no sustituido y el grupo alquilo de N-alkil piperazinilo comprende de 1 a 4 átomos de carbono.

20 En algunas modalidades de la invención, al sujeto se le administra un compuesto de fórmula III, un tautómero del compuesto, una sal del compuesto, una sal de tautómero, una mezcla de los mismos, o una composición farmacéutica que comprende el compuesto, el tautómero, la sal del compuesto, la sal del tautómero, o la mezcla, en el el compuesto de fórmula III tiene la siguiente fórmula:



25 Un fármaco anti-cáncer seleccionado de Gleevec, BAY43-9006, brostalicina, lenalidomida (Revlimid), talidomida (Thalomid), docetaxel (Taxotere), erlotinib (Tarceva), vatalinib (PTK-787), VEGF-trap, fenretidina, bortezomib, bevacizumab (Avastin), pertuzumab, y/o rituximab, puede administrarse conjuntamente con un compuesto de fórmula II, un tautómero del compuesto, una sal del compuesto, una sal del tautómero, una mezcla de los mismos, o una composición farmacéutica que comprende el compuesto, el tautómero, la sal del compuesto, la sal del tautómero, o la mezcla, en el que el compuesto de fórmula I tiene la estructura y las propiedades mostradas en lo anterior.

30 En una modalidad de la presente invención, se administra al sujeto un compuesto de fórmula III, un tautómero del compuesto, una sal del compuesto, una sal del tautómero, una mezcla de los mismos, o una composición farmacéutica que comprende el compuesto, el tautómero, la sal del compuesto, la sal del tautómero, o la mezcla, en el que el compuesto de fórmula III tiene la fórmula mostrada en lo anterior.

En algunas modalidades de la presente invención, el compuesto, el tautómero, la sal del compuesto, la sal del tautómero, la mezcla, o la composición farmacéutica se administra al sujeto después de que el fármaco anti-cáncer

haya sido administrado al sujeto. En otras modalidades, el compuesto, el tautómero, la sal del compuesto, la sal del tautómero, la mezcla, o la composición farmacéutica se administran al sujeto antes que el fármaco anti-cáncer haya sido administrado al sujeto. En aún otras modalidades, el compuesto, el tautómero, la sal del compuesto, la sal del tautómero, la mezcla, o la composición farmacéutica se administran al sujeto al mismo tiempo que al menos algunos de los fármacos anti-cáncer se administran al sujeto.

En algunas modalidades, un estado de enfermedad estable se logra y/u ocurre una reducción en el tamaño del tumor en el sujeto después de la administración del compuesto, el tautómero, la sal del compuesto, la sal del tautómero, la mezcla, o la composición farmacéutica.

Tal como se define en lo anterior, la invención proporciona composiciones terapéuticas. Tales composiciones incluyen un fármaco anti-cáncer y un compuesto de fórmula II, un tautómero del compuesto, una sal del compuesto, una sal del tautómero, o una mezcla de los mismos. Tales composiciones terapéuticas y equipos pueden incluir los componentes como una preparación combinada para el uso simultáneo, separado, o secuencial en el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer resistente a los fármacos. En algunas modalidades, el fármaco anti-cáncer incluido en los equipos y composiciones terapéuticas es un fármaco anti-cáncer diferente al cáncer que es resistente al fármaco. En otras modalidades, el fármaco anti-cáncer incluido en los equipos y composiciones terapéuticas es el cáncer que es resistente al fármaco anti-cáncer. Por ejemplo, si un paciente es refractario a Gleevec, entonces un equipo o composición puede incluir uno o más compuestos de la fórmula II y/o III en adición al fármaco anti-cáncer tal como Iressa. Alternativamente, si un paciente es refractario a Gleevec, el equipo o composición pueden incluir uno o más compuestos de la fórmula II y/o III y Gleevec. El propósito para la inclusión de Gleevec es que la resistencia del fármaco en un paciente no puede conocerse hasta que el fármaco se administra al paciente. Adicionalmente, la resistencia en un cierto fármaco puede desarrollarse durante el tratamiento. Equipos pueden incluir uno, dos, tres, o más diferentes fármacos anti-cáncer en adición a los compuestos de la invención.

En algunas modalidades de los equipos y composiciones terapéuticas,  $R^7$  es un grupo N-alkil piperazinilo sustituido o no sustituido. En algunas de las modalidades,  $R^7$  es un grupo N-alkil piperazinilo sustituido o no sustituido y el grupo alquilo del N-alkil piperazinilo comprende de 1 a 4 átomos de carbono.

En algunas modalidades de los equipos y composiciones terapéuticas, el compuesto de fórmula II, el tautómero del compuesto, la sal del compuesto, la sal del tautómero, o la mezcla de los mismos es un compuesto de fórmula III, un tautómero del compuesto de fórmula III, una sal del compuesto de fórmula III, una sal del tautómero del compuesto de fórmula III, o una mezcla de los mismos, en donde el compuesto de fórmula III tiene la fórmula mostrada en lo anterior.

En algunas modalidades de las composiciones terapéuticas y equipos, el fármaco anti-cáncer y el compuesto, el tautómero, la sal del compuesto, la sal del tautómero, la mezcla, o la composición farmacéutica se proporcionan como una sola composición. En otras modalidades, el fármaco anti-cáncer y el compuesto, el tautómero, la sal del compuesto, la sal del tautómero, la mezcla, o la composición farmacéutica se proporcionan separadamente como partes de un equipo.

En el tratamiento definido en lo anterior de cáncer resistente a los fármacos inhibiendo una cinasa,  $R^7$  es preferiblemente un grupo N-alkil piperazinilo sustituido o no sustituido. En algunas de las modalidades,  $R^7$  es un grupo N-alkil piperazinilo sustituido o no sustituido y el grupo alquilo del N-alkil piperazinilo comprende de 1 a 4 átomos de carbono.

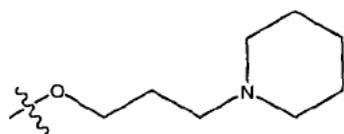
En el tratamiento definido en lo anterior de cáncer resistente a los fármacos inhibiendo una cinasa, se administra preferiblemente al sujeto un compuesto de fórmula III, un tautómero del compuesto, una sal del compuesto, una sal del tautómero, una mezcla de los mismos, o una composición farmacéutica que comprende el compuesto, el tautómero, la sal del compuesto, la sal del tautómero, o la mezcla, en donde el compuesto de fórmula III tiene la fórmula mostrada en lo anterior.

En algunas modalidades para inhibir una cinasa, el cáncer es resistente a mesilato de imatinib (Gleevec), BAY43-9006, brostalicina, lenalidomida (Revlimid), talidomida (Thalomid), docetaxel (Taxotere), erlotinib (Tarceva), gefitinib (Iressa), vatalinib (PTK-787), VEGF-trap, fenretidina, bortezomib, o un anticuerpo monoclonal general. En algunas modalidades, el cáncer del paciente con cáncer se selecciona de tumor estromal gastrointestinal, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple, carcinoma de célula renal, cáncer de pulmón de células que no son pequeñas, o síndrome hipereosinofílico (HES).

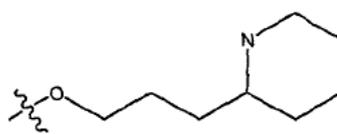
En algunas modalidades mencionadas,  $R^1$  se selecciona de H, Cl, Br, F, o I. En algunas de las modalidades,  $R^1$  es F. En algunas modalidades,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  son todos H. En algunas de las modalidades,  $R^1$  es F y cada una de  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  es H.

En otras modalidades mencionadas, al menos uno de  $R^6$  o  $R^7$  es un grupo heterociclilo sustituido o no sustituido. En

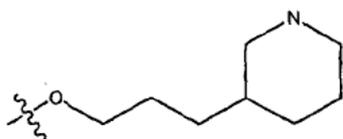




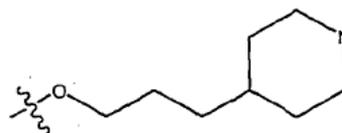
VI



VII

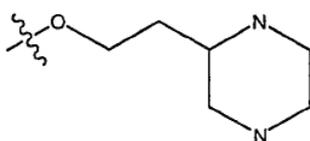


VIII

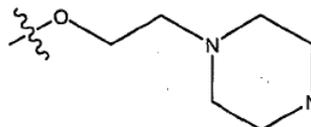


IX

5 La estructura VI es un ejemplo de un grupo  $-\text{O}(\text{CH}_2)_3$  (N-piperidinilo) o  $-\text{O}(\text{CH}_2)_3$  (1-piperidinilo). La estructura VII es un ejemplo de un grupo  $-\text{O}(\text{CH}_2)_3$ -(2-piperidinilo). La estructura VIII es un ejemplo de un grupo a  $-\text{O}(\text{CH}_2)_3$ -(3-piperidinilo). La estructura IX es un ejemplo de un grupo  $-\text{O}(\text{CH}_2)_3$ -(4-piperidinilo). Cuando el grupo heterociclilo es una piperazina y q es 1 para un grupo  $-\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_q$  (heterociclilo), las siguientes estructuras son posibles y se prefieren:

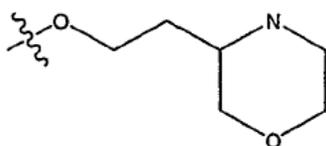


X

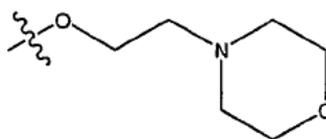


XI

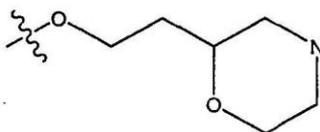
10 La estructura X es un ejemplo de un grupo  $-\text{O}(\text{CH}_2)_2$ -(2-piperazinilo), y la estructura XI es un ejemplo de un grupo  $-\text{O}(\text{CH}_2)_2$ -(1-piperazinilo) o  $-\text{O}(\text{CH}_2)_2$ -(N-piperazinilo). Cuando el grupo heterociclilo es una morfolina y q es 1 para el grupo  $-\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_q$  (heterociclilo), las siguientes estructuras son posibles y se prefieren:



XII



XIII

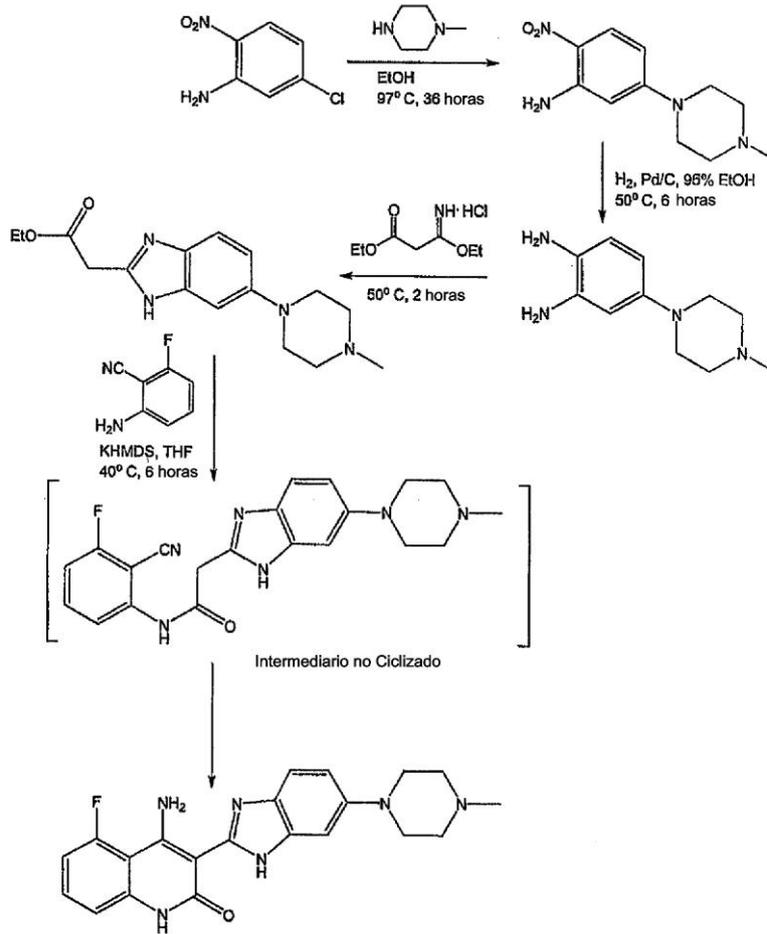


XIV

15 La estructura XII es un ejemplo de un grupo  $-\text{O}(\text{CH}_2)_2$ -(3-morfolinilo), la estructura XIII es un ejemplo de un grupo  $-\text{O}(\text{CH}_2)_2$ -(4-morfolinilo) o grupo  $-\text{O}(\text{CH}_2)_2$ -(N-morfolinilo), y la estructura XIV es un ejemplo de un grupo  $-\text{O}(\text{CH}_2)_2$ -(2-morfolinilo). Se observará que cuando el grupo es una pirrolidina, y q es 1, la estructuras disponible incluyen  $-\text{O}(\text{CH}_2)_2$ -(1-pirrolidinilo) o  $-\text{O}(\text{CH}_2)_2$ -(N-pirrolidinilo),  $-\text{O}(\text{CH}_2)_2$ -(2-pirrolidinilo), y  $-\text{O}(\text{CH}_2)_2$ -(3-pirrolidinilo).

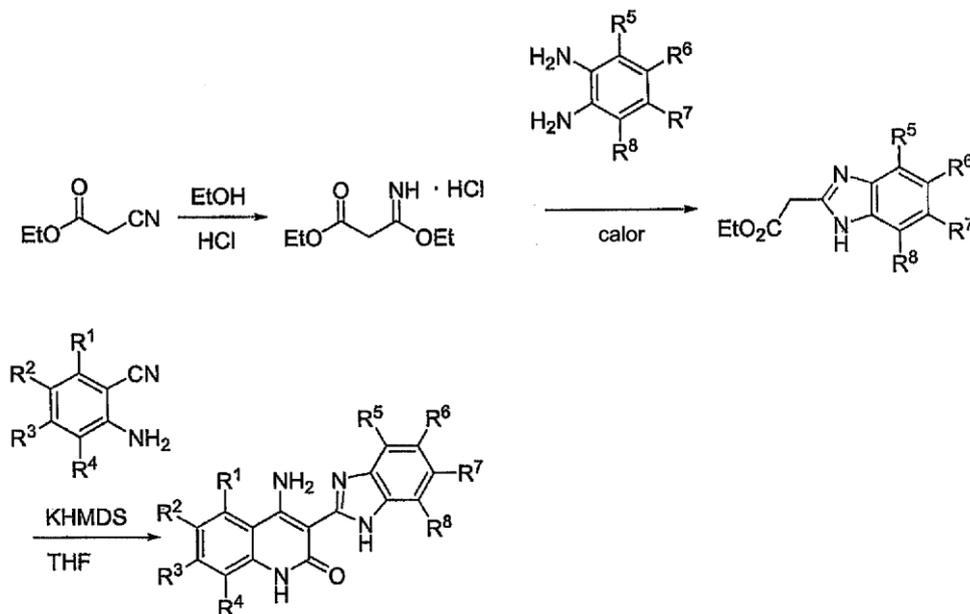
El esquema 1 representa una ruta sintética ejemplar para la síntesis de un compuesto bencimidazolil quinolinona y no debe interpretarse como que limita la invención en ninguna forma.

Esquema 1



- 5 El esquema 2 representa otro método para sintetizar un compuesto. Aquellos expertos en la técnica entenderán que la selección de un diaminobenceno sustituido y no sustituido y un antranilonitrilo sustituido o no sustituido se permite para la síntesis de una amplia variedad de compuestos. Aquellos expertos en la técnica también reconocerán que ciertos grupos pueden necesitar protegerse utilizando grupos de protección normal para la reacción de ciclización final. La ruta sintética extremadamente versátil permite una plétora de compuestos que tienen la fórmula III para prepararse fácilmente por una ruta sintética altamente convergente.
- 10

Esquema 2



Compuestos de la estructura 1 se sintetizan fácilmente utilizando los procedimientos descritos en la siguiente sección de se describen en los siguientes documentos: Patente de EUA No. 6,605,617, Solicitud de Patente de EUA publicada No. 2004/0092535, Solicitud de Patente de EUA No. 10/983,174, Solicitud de Patente de EUA publicada No. 2004/0220196, Solicitud de Patente de EUA No. 10/982,757, y Solicitud de Patente de EUA No. 10/982,543.

Los compuestos de la estructura 1, tautómeros de los compuestos, sal farmacéuticamente aceptable de los compuestos, sal farmacéuticamente aceptables de los tautómeros, y mezclas de los mismos pueden utilizarse para preparar medicamentos, que pueden utilizarse para los propósitos aquí descritos, y pueden utilizarse para tratar varias condiciones biológicas descritas en la presente. Los compuestos, sales, tautómeros, sales de los tautómeros, y mezclas de los mismos de la invención son particularmente útiles para tratar pacientes que tienen cáncer el cual es resistente a uno o más otros fármacos anti-cáncer tales como Gleevec, BAY43-9006, y brostalicina.

Formulaciones farmacéuticas pueden incluir cualquiera de los compuestos, tautómeros, o sales de cualquiera de las modalidades descritas anteriormente en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable tal como aquellos descritos aquí. Tales formulaciones pueden incluir un fármaco anti-cáncer diferente tal como, pero no limitado a, Gleevec, BAY43-9006, o brostalicina.

La invención actual también proporciona composiciones que pueden prepararse mezclando uno o más compuestos de la invención actual, o tautómeros de sal farmacéuticamente aceptable, de los mismos, o mezclas de los mismos con portadores farmacéuticamente aceptables, excipiente, aglutinante, diluyente, o similares para tratar o mejorar los desórdenes relacionados a tumores ya con metástasis. Las composiciones de la invención pueden utilizarse para crear formulaciones usadas para tratar tumores ya con metástasis como se describe aquí. Tales composiciones pueden estar en la forma de, por ejemplo, gránulos, polvos, tabletas, cápsulas, jarabe, supositorios, inyecciones, emulsiones, elixires, suspensiones o soluciones. Las composiciones actuales pueden formularse por varias rutas de administración, por ejemplo, por administración oral, por administración nasal, por administración rectal, inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyección intramuscular, o inyección intraperitoneal. Las siguientes formas de dosificación se dan a manera de ejemplo y no deben interpretarse como que limitan la invención actual.

Para administración oral, bucal, y sublingual, polvos, suspensiones, gránulos, tabletas, píldoras, cápsulas, cápsulas de gel, y comprimidos son aceptables como formas de dosificación sólida. Estas pueden prepararse, por ejemplo, al mezclar uno o más compuestos de la presente invención, sales farmacéuticamente aceptables, tautómeros, o mezclas de los mismos, con al menos un aditivo tal como un almidón u otro aditivo. Los aditivos adecuados son sacarosa, lactosa, azúcar de celulosa, manitol, maltitol, dextrano, almidón, agar, alginatos, quitinas, quitosanos, pectinas, goma de tragacanto, goma arábiga, gelatinas, colágenos, caseína, albúmina, polímeros sintéticos o semi-sintéticos o glicéridos. Opcionalmente, la formas de dosificación oral pueden contener otros ingredientes para ayudar en la administración, tales como un diluyente inactivo, o lubricantes tales como estearato de magnesio, o conservantes tales como parabeno o ácido sórbico, o anti-oxidantes tales como ácido ascórbico, tocoferol o cisteína, un agente desintegrante, aglutinantes, espesantes, reguladores de pH, edulcorantes, agentes saborizantes o agentes aromatizantes. Las tabletas y las píldoras pueden tratarse además con materiales de revestimiento

adecuados conocidos en la técnica.

5 Las formas de dosificación líquidas para la administración oral pueden ser en la forma de emulsiones, jarabes, elíxires, suspensiones y soluciones farmacéuticamente aceptables, que pueden contener un diluyente inactivo, tal como agua. Las formulaciones y medicamentos farmacéuticos pueden prepararse como suspensiones o soluciones líquidas utilizando un líquido estéril, tal como, pero no limitados a, un aceite, agua, un alcohol, y combinaciones de éstos. Los tensioactivos, agentes de suspensión y agentes de emulsificación farmacéuticamente adecuados pueden agregarse por administración oral o parenteral.

10 Como se observa en lo anterior, las suspensiones pueden incluir aceites. Tales aceites incluyen, pero no se limitan a, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz y aceite de oliva. La preparación de suspensión puede contener también ésteres de ácidos grasos tales como oleato de etilo, miristato de isopropilo, glicéridos de ácido graso y glicéridos de ácido graso acetilado. Las formulaciones de suspensión pueden incluir alcoholes, tales como, pero no limitado a, etanol, alcohol de isopropilo, alcohol de hexadecilo, glicerol y propilenglicol. Éteres, tales como pero no limitados a, poli(etilenglicol), hidrocarburos de petróleo tales como aceite mineral y petrolato; y agua puede también usarse en formulaciones de suspensión.

15 Para la administración nasal, las formulaciones y medicamentos farmacéuticos pueden ser un atomizador o aerosol que contienen un solvente o solventes apropiados y opcionalmente otros compuestos tales como, pero no limitados a, estabilizadores, agentes antibacterianos, antioxidantes, modificadores de pH, tensioactivos, modificadores de biodisponibilidad y combinaciones de estos. Un propulsor para una formulación en aerosol puede incluir aire comprimido, nitrógeno, dióxido de carbono, o un solvente de baja ebullición basado en hidrocarburo.

20 Las formas de dosificación inyectable generalmente incluyen suspensiones acuosas o suspensiones oleosas, que pueden prepararse utilizando un agente de dispersión o agente humectante y un agente de suspensión. Las formas inyectables pueden estar en fase de solución o en la forma de una suspensión, la cual se prepara con un solvente o diluyente. Los solventes o vehículos adecuados, incluyen agua esterilizada, solución de Ringer, o una solución salina acuosa isotónica. Alternativamente, pueden emplearse aceites estériles como solventes o agentes de suspensión. Preferiblemente, el aceite o ácido graso es no volátil, incluyendo aceites naturales o sistémicos, ácidos  
25 grados, mono-, di-, o tri-glicéridos.

30 Para la inyección, la formulación y/o medicamento farmacéutico puede ser un polvo adecuado para la reconstitución con una solución apropiada como la descrita en lo anterior. Ejemplos de éstos incluyen, pero no se limitan a, polvos secados por congelamiento, secado rotario o secado por rociado, polvos amorfos, gránulos, precipitados, o en partículas. Para la inyección, las formulaciones pueden contener opcionalmente estabilizadores, modificadores de pH, tensioactivos, modificadores de biodisponibilidad y combinaciones de éstos.

35 Para la administración rectal, las formulaciones y medicamentos farmacéuticos pueden estar en la forma de un supositorio, un ungüento, un enema, una tableta o una crema para la liberación del compuesto en los intestinos, flexión sigmoidea y/o recto. Los supositorios rectales se preparan al mezcla uno o más compuestos de la presente invención, o sales o tautómeros farmacéuticamente aceptables del compuesto, con vehículos adecuados, por ejemplo, manteca de cacao o polietilenglicol, que está presente en una fase sólida a temperaturas de almacenamiento normal, y presente en una fase líquida a aquellas temperaturas adecuadas para liberar un fármaco dentro del cuerpo, tal como en el recto. Aceites pueden emplearse también en la preparación de formulaciones del tipo de gelatina suave y supositorios. El agua, salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcar relacionadas, y los  
40 glicerol pueden emplearse en la preparación de formulaciones de suspensión que pueden contener también agentes de suspensión tales como pectinas, carbómeros, celulosa de metilo, hidroxipropilcelulosa o carboximetilcelulosa, así como reguladores de pH y conservadores.

45 Excepto aquellas formas de dosificación representadas descritas en lo anterior, los excipientes y portadores farmacéuticamente aceptables son conocidos generalmente por aquellos expertos en la técnica y están así incluidos en la presente invención. Tales excipientes y portadores se describen, por ejemplo, en "Remingtons Pharmaceutical Sciences" Mack Pub. Co., New Jersey (1991).

Las formulaciones de la invención pueden designarse como de acción escasa, de liberación rápida, acción prolongada, y liberación sostenida como se describe en lo siguiente. De este modo, las formulaciones farmacéuticas pueden formularse también para liberación controlada o para liberación lenta.

50 Las presentes composiciones pueden comprender también, por ejemplo, micelas o liposomas, o alguna otra forma encapsulada o puede administrarse en una forma de liberación extensa para proporcionar un almacenaje y/o efecto de entrega prolongado. Por consiguiente, las formulaciones y medicamentos farmacéuticos pueden comprimirse dentro de bolitas o cilindros e implantarse intramuscular o subcutáneamente como inyecciones de depósito o como implantes tales como stents. Tales implantes pueden emplear materiales de inserción conocidos tales como  
55 silicones y polímeros biodegradables.

Las dosificaciones específicas pueden ajustarse dependiendo de las condiciones de la enfermedad, la edad, peso, corporal, condiciones de salud general, sexo, y dieta del sujeto, intervalos de dosis, rutas de administración, velocidad de excreción, y combinaciones de fármacos. Cualquiera de las formas de dosificación anteriores que contienen cantidades efectivas está dentro de los límites de experimentación de rutina y por consiguiente, dentro del alcance de la presente invención.

Una dosis terapéuticamente efectiva puede variar dependiendo de la ruta de administración y forma de dosis. El compuesto o compuestos preferidos de la presente invención es una formulación que exhibe un alto índice terapéutico. El índice terapéutico es proporción de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos que pueden expresarse como la relación entre LD<sub>50</sub> y ED<sub>50</sub>. El LD<sub>50</sub> es la dosis letal para 50% de la población y el ED<sub>50</sub> es la dosis terapéuticamente efectiva en 50% de la población. El LD<sub>50</sub> y ED<sub>50</sub> se determinan por procedimientos farmacéuticos en cultivos de célula animal o animales experimentales.

“Tratar” dentro del contexto de la presente invención, significa un alivio de los síntomas asociados con un trastorno o enfermedad, o interrupción de progreso o agravamiento adicional de aquellos síntomas, o prevención o profilaxis de la enfermedad o trastorno. Por ejemplo, dentro del contexto para tratar pacientes con un tumor hematológico ya con metástasis, el tratamiento exitoso puede incluir una reducción en la proliferación de vasos capilares que alimentan el tumor o tumores o tejido enfermo, una mejoría de los síntomas relacionados en un crecimiento canceroso o tumor, proliferación de vasos capilares, o tejido enfermo, una interrupción en la proliferación capilar, o una interrupción en la progresión de una enfermedad tal como cáncer o en el crecimiento de células cancerosas. El tratamiento puede incluir también administrar las formulaciones farmacéuticas de la presente invención en combinación con otras terapias. Por ejemplo, los compuestos y formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse antes, durante, o después de procedimiento quirúrgico y/o terapia de radiación. Los compuestos de la invención pueden administrarse también junto con otros fármacos anti-cáncer tales como, pero no limitados a, Gleevec, BAY43-9006, y brostalicina y fármacos utilizados en terapia antisentido y génica. Las combinaciones apropiadas pueden determinarse por aquellos de experiencia en las técnicas de oncología y medicina.

Un “estado de enfermedad estable” como se utiliza con respecto a tratamiento cáncer significa una discontinuación en el crecimiento del cáncer. Esto puede algunas veces visualizarse utilizando un método de exploración tal como la tomografía de emisión de positrones (PET) como se muestra en las figuras.

Las formulaciones farmacéuticas y medicamentos de acuerdo a la invención incluyen el compuesto de la estructura II o tautómeros, sales, o mezclas de los mismos en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. De este modo, los compuestos de la invención pueden usarse para preparar medicamentos y formulaciones farmacéuticas. Tales medicamentos y formulaciones farmacéuticas pueden utilizarse en el método de tratamiento descrito aquí.

Los compuestos y formulaciones de la presente invención son particularmente adecuados para el uso en terapia de combinación como ha sido mostrado que exhiben efecto sinérgico cuando se utilizan en combinación con fármacos anti-cáncer tales como, pero no limitados a, camptotecina, doxorubicina, cisplatino, irinotecan (CPT-11), agentes de alquilación, inhibidores de topoisomerasa I y II, y tratamiento de radiación. Además, los compuestos de la invención pueden utilizarse en combinación con fármacos anti-cáncer tales como Gleevec, BAY43-9006, y brostalicina, y encuentran particular uso en pacientes con cáncer que son resistentes a estos fármacos anti-cáncer. Por lo tanto, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que incluyen el compuesto de estructura II y tautómeros, sales, y/o mezclas de los mismos en combinación con un fármaco anti-cáncer. La invención también proporciona el uso de los compuestos, tautómeros, sales, y/o mezclas en la creación de tales formulaciones y medicamentos y el uso de los compuestos para tratar pacientes con cáncer.

En algunas modalidades, la invención proporciona composiciones terapéuticas que comprenden, fármaco anti-cáncer y un compuesto, un tautómero, una sal del compuesto, una sal del tautómero, o una mezcla de los mismos de cualquier modalidad de la invención como una preparación combinada para el uso simultáneo, separado, o secuencial en el tratamiento de un paciente. En algunas de las modalidades, el paciente es un paciente con cáncer que es resistente a al menos un fármaco anti-cáncer, seleccionado de Gleevec, BAY43-9006, o brostalicina. En algunas de las modalidades, el fármaco anti-cáncer y el compuesto, el tautómero, la sal del compuesto, la sal del tautómero, o la mezcla de los mismos se proporcionan como una sola composición. En otras modalidades, el fármaco anti-cáncer y el compuesto, el tautómero, la sal del compuesto, la sal del tautómero, o la mezcla de los mismos se proporcionan separadamente como partes de un equipo. Tales equipos pueden además incluir instrucciones para el uso.

Los compuestos de la invención pueden usar o tratar una variedad de sujetos. Los sujetos adecuados incluyen animales, tales como mamíferos y humanos. Mamíferos adecuados incluyen, pero no se limitan a, primates tales como, pero no limitados a lémur, simios, y monos; roedores tales como rata, ratones, y conejillos de indias; conejos y liebres, vacas, caballos, cerdos, cabras, ovejas, marsupiales; y carnívoros tales como felinos, perros y ursinos. En algunas modalidades, el sujeto o paciente es un humano. En otras modalidades, el sujeto o paciente es un roedor tal como a ratón o una rata. En algunas modalidades, el sujeto o paciente es un animal diferente a un ser humano y en

algunas de las modalidades, el sujeto o paciente es un mamífero diferente al humano.

### Ejemplos

Las siguientes abreviaciones se utilizan en los ejemplos:

	EtOH:	Etanol
5	H <sub>2</sub> O:	Agua
	HCl:	Ácido clorhídrico
	HPLC:	Cromatografía líquida de alto rendimiento
	KHMDS:	bis(trimetilsilil)amida de potasio
	LiHMDS:	bis(trimetilsilil)amida de litio
10	NaHMDS:	bis(trimetilsilil)amida de sodio
	NaOH:	Hidróxido de sodio
	N <sub>2</sub> :	Nitrógeno
	TBME:	t-Butil metil éter
	THF:	Tetrahidrofurano

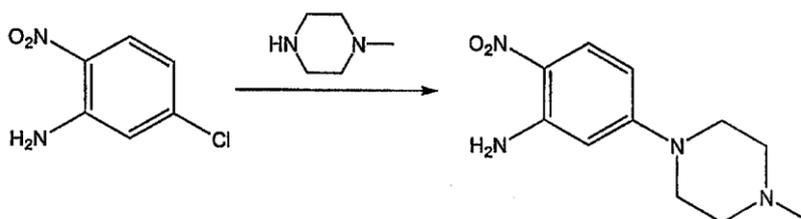
15 La nomenclatura para los compuestos de los ejemplos se proporcionó utilizando el software ACD Name versión 5.07 (14 de noviembre de 2001) disponible de Advanced Chemistry Development, Inc., software de marca Cheminnovation NamExpert + Nomenclator™ disponible de Cheminnovation Software, Inc., y AutoNom versión 2.2 disponible en el paquete de software ChemOffice® Ultra versión 7.0 disponible de CambridgeSoft Corporation (Cambridge, MA). Algunos de los compuestos y materiales de inicio se mencionan utilizando la nomenclatura IUPAC  
20 convencional.

Varios materiales de inicio pueden obtenerse a partir de las fuentes comerciales y prepararse por métodos conocidos por un experto en la técnica.

### Ejemplo 1

Síntesis de 5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitroanilina

25 Procedimiento A



Se colocaron en un matraz de 2000 ml adaptado con un condensador 5-cloro-2-nitroanilina (500 g, 2,898 moles) y 1-  
metilpiperzina (871 g, 8,693 moles) y se purgó con N<sub>2</sub>. El matraz se colocó en un baño de aceite a 100°C y se  
30 calentó hasta que la 5-cloro-2-nitroanilina reaccionó completamente (normalmente durante la noche) como se  
determina por HPLC. Después que la HPLC confirmó la desaparición de la 5-cloro-2-nitroanilina, la mezcla de  
reacción se vertió directamente (aún caliente) en 2500 ml de agua a temperatura ambiente con agitación mecánica.  
La mezcla resultante se agitó hasta que alcanzó la temperatura ambiente y luego se filtró. El sólido amarillo así  
obtenido se agregó a 1000 ml de agua y se agitó durante 30 minutos. La mezcla resultante se filtró, y el sólido  
35 resultante se lavó con TBME (500 ml, 2X) y luego se secó bajo vacío durante una hora utilizando un dique de  
caucho. El sólido resultante se transfirió a una bandeja de secado y se secó en un horno al vacío a 50°C hasta un

peso constante para producir 670 g (97,8%) del compuesto del título como un polvo amarillo.

#### Procedimiento B

Se agregó 5-cloro-2-nitroanilina (308,2 g, 1,79 moles) a un matraz de fondo redondo de 5000 ml de 4 cuellos adaptado con un agitador aéreo, un condensador, una entrada de gas, un embudo de adición y una sonda termométrica. El matraz se purgó entonces con N<sub>2</sub>. Se agregaron 1-metilpiperazina (758,1 g, 840 ml, 7,57 moles) y etanol de pureza 200 (508 ml) al matraz de reacción con agitación. El matraz se purgó de nuevo con N<sub>2</sub>, y la reacción se mantuvo bajo N<sub>2</sub>. El matraz se calentó en un manto de calentamiento a una temperatura interna de 97°C (+/-5°C) y se mantuvo a esa temperatura hasta que la reacción se completó (normalmente alrededor de 40 horas) como se determina por HPLC. Después que la reacción se completó, el calentamiento se suspendió y la reacción se enfrió a una temperatura interna de aproximadamente 20°C a 25°C con agitación, y la reacción se agitó durante 2 a 3 horas. Los cristales de semilla (0,20 g, 0,85 mmoles) de 5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitroanilina se agregaron a la mezcla de reacción a menos que la precipitación hubiera ocurrido previamente. Se agregó agua (2, 450 ml) a la mezcla de reacción agitada durante un periodo de aproximadamente una hora mientras la temperatura interna se mantuvo a una temperatura que varía de aproximadamente 20°C a 30°C. Después que se completó la adición del agua, la mezcla resultante se agitó durante aproximadamente una hora a una temperatura de 20°C a 30°C. La mezcla resultante se filtró entonces, y el matraz y la torta de filtro se lavaron con agua (3 x 2,56 l). El producto sólido amarillo oro se secó hasta un peso constante de 416 g (98,6% de rendimiento) bajo vacío aproximadamente a 50°C en un horno al vacío.

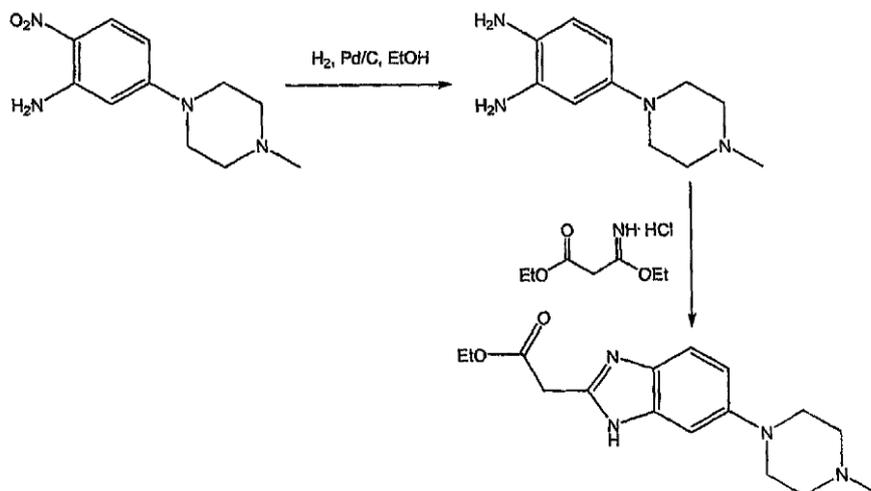
#### Procedimiento C

Se agregó 5-cloro-2-nitroanilina (401 g, 2,32 moles) a un matraz de fondo redondo de 12 litros de 4 cuellos adaptado con un agitador aéreo, un condensador, una entrada de gas, un embudo de adición y una sonda termométrica. El matraz se purgó entonces con N<sub>2</sub>. Se agregaron 1-metilpiperazina (977 g, 1,08 l, 9,75 moles) y etanol a 100% (650 ml) al matraz de reacción con agitación. El matraz se purgó de nuevo con N<sub>2</sub>, y la reacción se mantuvo bajo N<sub>2</sub>. El matraz se calentó en un manto de calentamiento a una temperatura interna de 97°C (+/-5°C) y se mantuvo a esa temperatura hasta que la reacción se completó (normalmente alrededor de 40 horas) como se determina por la HPLC. Después que la reacción se completó, el calentamiento se interrumpió y la reacción se enfrió a una temperatura interna de aproximadamente 80°C con agitación, y agua (3,15 l) se agregó a la mezcla a través de un embudo de adición durante el periodo de 1 hora mientras la temperatura interna se mantuvo a 82°C (+/-3°C). Después que la adición se completó, el calentamiento se interrumpió y la mezcla de reacción se permitió enfriar durante un periodo de no menos de 4 horas a una temperatura interna de 20-25°C. La mezcla de reacción se agitó entonces durante una hora adicional en una temperatura interna de 20-30°C. La mezcla resultante se filtró entonces, y el matraz y la torta de filtro se lavaron con agua (1 x 1 l), etanol a 50% (1 x 1 l) y etanol a 95% (1 x 1 l). El producto sólido amarillo oro se colocó en una bandeja de secado y se secó hasta un peso constante de 546 g (99% de rendimiento) bajo vacío aproximadamente a 50°C en un horno al vacío.

#### 35 Ejemplo 2

Síntesis del éster etílico del ácido [6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-acético

#### Procedimiento A



Un matraz de 4 cuellos, de 5000 ml, se adaptó con un agitador, un termómetro, un condensador y una entrada/salida de gas. El matraz equipado se cargó con 265,7 g (1,12 moles, 1,0 equivalentes) de 5-(4-metil-piperazinil-1-il)-2-nitroanilina y 2125 ml de EtOH de pureza 200. La solución resultante se purgó con N<sub>2</sub> durante 15 minutos. Luego, se agregaron 20,0 g de 5% de Pd/C (50% de H<sub>2</sub>O p/p). La reacción se agitó vigorosamente a 40-50°C (temperatura interna) mientras se burbujeó H<sub>2</sub> a través de la mezcla. La reacción se monitoreó cada hora para la desaparición de 5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitroanilina por HPLC. El tiempo de reacción típico fue de 6 horas.

Después que se había disipado toda la 5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitroanilina de la reacción, la solución se purgó con N<sub>2</sub> durante 15 minutos. Luego, se agregó 440,0 g (2,25 moles) de clorhidrato de etil-3-etoxi-2-iminopropanoato de etilo como un sólido. La reacción se agitó a 40-50°C (temperatura interna) hasta que la reacción se completó. La reacción se monitoreó siguiendo la desaparición del compuesto diamino por HPLC. El tiempo de reacción típico fue 1-2 horas. Después que la reacción se completó, se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a través de una almohadilla de material de filtrado Celite. El material de filtrado Celite se lavó con EtOH absoluto (2 x 250 ml), y el filtrado se concentró bajo presión reducida proporcionando un aceite café/anaranjado espeso. El aceite resultante se incorporó en 850 ml de una solución de HCl a 0,37%. Se agregó entonces NaOH sólido (25 g) en una porción, y se formó un precipitado. La mezcla resultante se agitó durante 1 hora y luego se filtró. El sólido se lavó con H<sub>2</sub>O (2 x 400 ml) y se secó a 50°C en un horno al vacío proporcionando 251,7 g (74,1%) de éster etílico del ácido [6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzoimidazol-2-il]-acético como un polvo color paja.

#### Procedimiento B

Se equipó un matraz encamisado de 4 cuellos, de 5000 ml, con un agitador mecánico, un condensador, una sonda termométrica, una entrada de gas, y un burbujeador de aceite. El matraz equipado se cargó con 300 g (1,27 moles) de 5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitroanilina y 2400 ml de EtOH de pureza 200 (la reacción puede conducirse y se ha conducido con etanol a 95% y no es necesario utilizar etanol de pureza 200 para esta reacción). La solución resultante se agitó y se purgó con N<sub>2</sub> durante 15 minutos. Luego, se agregaron 22,7 g de 5% de Pd/C (50% de H<sub>2</sub>O p/p) al matraz de reacción. El recipiente de reacción se purgó con N<sub>2</sub> durante 15 minutos. Después de purgar con N<sub>2</sub>, el recipiente de reacción se purgó con H<sub>2</sub> manteniendo un flujo lento, pero constante de H<sub>2</sub> a través del matraz. La reacción se agitó a 45-55°C (temperatura interna) mientras el H<sub>2</sub> se burbujea a través de la mezcla hasta que la 5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitroanilina se consumió completamente como se determina por HPLC. El tiempo de reacción típico fue 6 horas.

Después que toda la 5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitroanilina se había disipado de la reacción, la solución se purgó con N<sub>2</sub> durante 15 minutos. El producto intermedio de diamina es sensible al aire de manera que se tuvo cuidado para evitar la exposición al aire. Se agregó 500 g (2,56 moles) de clorhidrato de 3-etoxi-3-iminopropanoato de etilo a la mezcla de reacción durante un periodo de aproximadamente 30 minutos. La reacción se agitó a 45-55°C (temperatura interna) bajo N<sub>2</sub> hasta que la diamina se consumió completamente como se determina por la HPLC. El tiempo de reacción típico fue aproximadamente 2 horas. Después que la reacción se completó, la reacción se filtró mientras se calentaba a través de una almohadilla de Celite. El matraz de reacción y la Celite se lavaron entonces con EtOH de pureza 200 (3 x 285 ml). Los filtrados se combinaron en un matraz de 5000 ml, y aproximadamente 3300 ml de etanol se removió bajo vacío produciendo un aceite anaranjado. Se agregaron agua (530 ml) y luego 1 M de HCl (350 ml) al aceite resultante, y la mezcla resultante se agitó. La solución resultante se agitó vigorosamente mientras NaOH a 30% (200 ml) se agregó durante un periodo de aproximadamente 20 minutos manteniendo la temperatura interna de aproximadamente 25-30°C mientras el pH se llevó a entre 9 y 10. La suspensión resultante se agitó durante 4 horas mientras se mantuvo la temperatura interna en aproximadamente 20-25°C. La mezcla resultante se filtró, y la torta de filtro se lavó con H<sub>2</sub>O (3 x 300 ml). El sólido recolectado se secó hasta un peso constante a 50°C bajo vacío en un horno al vacío proporcionando 345,9 g (90,1%) del éster etílico de ácido [6-(2-metil-piperazin-1-il)-1H-benzoimidazol-2-il]-acético como un polvo color paja. En un procedimiento de desarrollo alternativo, los filtrados se combinaron y el etanol se removió bajo vacío hasta que al menos aproximadamente 90% había sido removido. El agua en un pH neutro se agregó entonces al aceite resultante, y la solución se enfrió aproximadamente a 0°C. Una solución de NaOH acuosa al 20% se agregó entonces lentamente con agitación rápida para llevar el pH hasta 9,2 (leer con un medidor de pH). La mezcla resultante se filtró entonces y se secó como se describe anteriormente. El procedimiento de desarrollo alternativo proporciona el producto marrón claro a amarillo ligero en rendimientos tan elevados como 97%.

#### Ejemplo 3

Método para reducir el contenido acuoso del éster etílico del ácido [6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzoimidazol-2-il]-acético

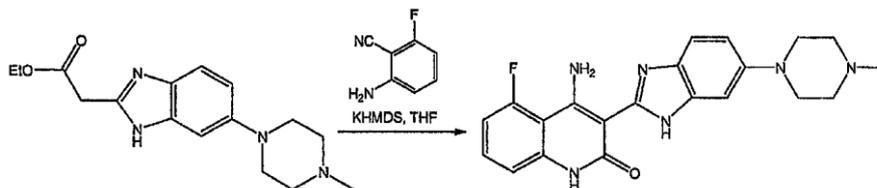
El éster etílico del ácido [6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-acético (120,7 gramos) que había sido previamente tratado y secado hasta un contenido acuoso de aproximadamente 8-9% de H<sub>2</sub>O se colocó en un matraz de fondo redondo de 2000 ml y se disolvió en etanol absoluto (500 ml). La solución ámbar se concentró hasta dar un aceite espeso utilizando un evaporador giratorio con calentamiento hasta que todo el solvente se removió. El procedimiento se repitió dos veces más. El aceite espeso así obtenido se dejó en el matraz y se colocó en un horno

al vacío calentado a 50°C durante la noche. Los resultados de análisis de Karl Fisher indicaron un contenido acuoso de 5,25%. El contenido acuoso reducido obtenido por este método proporcionó rendimientos incrementados en el procedimiento del ejemplo 4. Otros solventes tales como tolueno y THF pueden utilizarse en lugar del etanol para este proceso de secado.

## 5 Ejemplo 4

Síntesis de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona

Procedimiento A



Se disolvió éster etílico del ácido [6-(4-Metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-acético (250 g, 820 mmoles) (secado con etanol como se describe anteriormente) en THF (3800 ml) en un matraz de 5000 ml adaptado con un condensador, un agitador mecánico, una sonda termométrica, y se purgó con argón. Se agregó a la solución 2-amino-6-fluoro-benzonitrilo (95,3 g, 700 mmoles), y la temperatura interna se elevó a 40°C. Cuando todos los sólidos se habían disuelto y la temperatura de la solución había alcanzado 40°C, se agregó KHMDS sólida (376,2 g, 1890 mmoles) durante un periodo de 5 minutos. Cuando la adición de la base de potasio se completó, se obtuvo una solución amarilla heterogénea, y la temperatura interna había alcanzado 62°C. Después de un periodo de 60 minutos, la temperatura interna disminuyó de nuevo a 40°C, y se determinó que la reacción era completa por HPLC (no estaba presente material de partida ni producto intermedio no ciclizado). La mezcla de reacción espesa se extinguió entonces vertiéndola en H<sub>2</sub>O (6000 ml) y se agitó la mezcla resultante hasta que había alcanzado la temperatura ambiente. La mezcla se filtró entonces, y la almohadilla de filtro se lavó con agua (1000 ml 2X). El sólido amarillo brillante se colocó en una bandeja de secado y se secó en un horno al vacío a 50°C durante la noche proporcionando 155,3 g (47,9%) de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona.

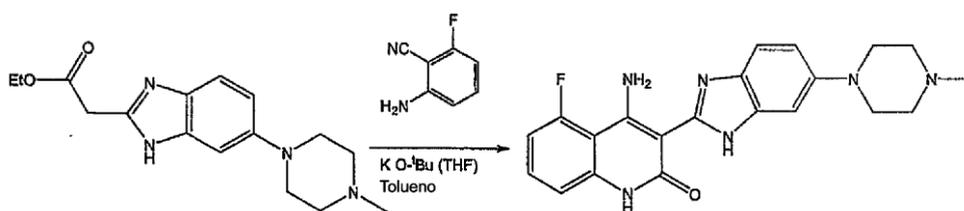
Procedimiento B

Se equipó un matraz encamisado de 4 cuellos de 5000 ml con un aparato de destilación, una sonda de temperatura, una entrada de gas N<sub>2</sub>, un embudo de adición, y un agitador mecánico. Se cargó en el reactor el éster etílico del ácido [6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-acético (173,0 g, 570 mmoles), y el reactor se purgó con N<sub>2</sub> durante 15 minutos. El THF seco (2600 ml) se cargó entonces en el matraz con agitación. Después que todo el sólido se había disuelto, el solvente se removió por destilación (a vacío o atmosférica (la temperatura más elevada ayuda a remover el agua)) utilizando calor cuando sea necesario. Después que 1000 ml de solvente se hubo removido, la destilación se detuvo y la reacción se purgó con N<sub>2</sub>. Se agregaron entonces 1000 ml de THF seco al recipiente de reacción, y cuando todo el sólido se disolvió, la destilación (a vacío o atmosférica) se condujo de nuevo hasta que otros 1000 ml de solvente habían sido removidos. Este proceso para agregar THF seco y la remoción del solvente se repitió al menos 4 veces (en la cuarta destilación, 60% del solvente se removió en lugar de sólo 40% como en las primeras 3 destilaciones) después de lo cual 1 ml de la muestra se removió para análisis de Karl Fischer para determinar el contenido acuoso. Si el análisis mostró que la temperatura contenía menos de 0,20% de agua, la reacción se continuó como se describe en el siguiente párrafo. Sin embargo, si el análisis mostró más de 0,20% de agua, entonces el proceso de secado descrito anteriormente se continuó hasta que el contenido acuoso de menos de 0,20% se logró.

Después de que un contenido acuoso de menos de o aproximadamente 0,20% se lograra utilizando el procedimiento descrito en el párrafo previo, el aparato de destilación se reemplazó con un condensador de reflujo, y la reacción se cargó con 2-amino-6-fluoro-benzonitrilo (66,2 g, 470 mmoles) (en algunos procedimientos se utilizó 0,95 equivalentes). La reacción se calentó entonces a una temperatura interna de 38-42°C. Cuando la temperatura interna había alcanzado 38-42°C, la solución de KHMDS (1313 g, 1,32 moles, 20% de KHMDS en THF) se agregó a la reacción a través del embudo de adición durante un periodo de 5 minutos manteniendo la temperatura interna aproximadamente a 38-50°C durante la adición. Cuando la adición de la base de potasio se completó, la reacción se agitó durante 3,5 a 4,5 horas (en algunos ejemplos se agitó durante 30 a 60 minutos y la reacción puede completarse dentro de ese tiempo) mientras se mantiene la temperatura interna de 38-42°C. Una muestra de la reacción se removió entonces y se analizó por HPLC. Si la reacción no se completó, se agregó la solución de KHMDS adicional al matraz durante un periodo de 5 minutos y la reacción se agitó a 38-42°C durante 45-60 minutos (la cantidad de solución de KHMDS agregada se determinó por lo siguiente: Si la relación de IPC <3,50, entonces

125 ml se agregó; si  $10,0 \geq$ relación de IPC  $\geq 3,50$ , entonces se agregó 56 ml; si  $20,0 \geq$ relación de IPC  $> 10$ , entonces 30 ml se agregó. La relación de IPC es igual al área que corresponde a 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona dividida por el área que corresponde al producto intermedio no ciclizado. Una vez que la reacción se completó (relación de IPC  $> 20$ ), el reactor se enfrió a una temperatura interna de 25-30°C, y el agua (350 ml) se cargó en el reactor durante un periodo de 15 minutos mientras se mantiene la temperatura interna de 25-35°C (en una alternativa, la reacción se condujo a 40°C y el agua se agrega en un lapso de 5 minutos). La extinción más rápida reduce la cantidad de impureza que se forma con el tiempo). El condensador de reflujo se reemplazó entonces con un aparato de destilación y el solvente se removió por destilación (a vacío o atmosférica) utilizando calor cuando se requiera. Después que 1500 ml de solvente se había removido, la destilación se interrumpió y la reacción se purgó con N<sub>2</sub>. Se agregó entonces agua (1660 ml) al matraz de reacción mientras se mantiene la temperatura interna a 20-30°C. La mezcla de reacción se agitó entonces a 20-30°C durante 30 minutos antes de enfriarla a una temperatura interna de 5-10°C y luego se agitó durante 1 hora. La suspensión resultante se filtró, y el matraz y la torta de filtro se lavaron con agua (3 x 650 ml). El sólido así obtenido se secó hasta un peso constante bajo vacío a 50°C en un horno al vacío para proporcionar 103,9 g (42,6% de rendimiento) de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona como un polvo amarillo.

#### Procedimiento C



Se cargaron éster etílico del ácido [6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-acético (608 g, 2,01 moles) (secado) y 2-amino-6-fluoro-benzonitrilo (274 g, 2,01 moles) en un matraz de 12 litros de 4 cuellos acomodado en un manto de calentamiento y se adaptó con un condensador, un agitador mecánico, una entrada de gas, y una sonda de temperatura. El recipiente de reacción se purgó con N<sub>2</sub>, y se cargó tolueno (7,7 l) en la mezcla de reacción mientras se agitó. El recipiente de reacción se purgó de nuevo con N<sub>2</sub> y se mantuvo bajo N<sub>2</sub>. La temperatura interna de la mezcla se elevó hasta una temperatura de 63°C (+/- 3°C) se logró. La temperatura interna de la mezcla se mantuvo a 63°C (+/- 3°C) mientras se destiló aproximadamente 2,6 litros de tolueno desde el matraz bajo presión reducida (380 +/- 10 torr, cabeza de destilación t = 40°C (+/- 10°C) (se utilizó el análisis Karl Fischer para verificar el contenido acuoso en la mezcla. Si el contenido acuoso fue mayor de 0,03%, entonces otros 2,6 litros de tolueno se agregó y la destilación se repitió. Este proceso se repitió hasta que un contenido acuoso de menos de 0,03% se logró). Después que un contenido acuoso de menos de 0,03% se alcanzó, el calentamiento se interrumpió, y la reacción se enfrió bajo N<sub>2</sub> a una temperatura interna de 17-19°C. T-butoxido de potasio en THF (20% en THF; 3,39 kg, 6,04 moles de t-butoxido de potasio) se agregó entonces a la reacción bajo N<sub>2</sub> a una velocidad tal que la temperatura interna de la reacción se mantuvo debajo de 20°C. Después que la adición del t-butoxido de potasio se completó, la reacción se agitó a una temperatura interna de menos de 20°C durante 30 minutos. La temperatura se elevó entonces a 25°C, y la reacción se agitó durante al menos 1 hora. La temperatura se elevó entonces a 30°C, y la reacción se agitó durante al menos 30 minutos. La reacción se monitoreó hasta que se completó utilizando HPLC para verificar el consumo de los materiales de partida (normalmente en 2-3 horas, ambos materiales de partida se consumieron (menos de 0,5% por % de área de HPLC)). Si la reacción no se completó después de 2 horas, otros 0,05 equivalentes de t-butoxido de potasio se agregó de una vez, y el proceso se completó hasta que la HPLC mostró que la reacción se completó. Después que la reacción se completó, se agregó 650 ml de agua a la mezcla de reacción agitada. La reacción se calentó entonces a una temperatura interna de 50°C y el THF se destiló (aproximadamente 3 litros por volumen) bajo presión reducida de la mezcla de reacción. Se agregó entonces en gotas agua (2,6 l) a la mezcla de reacción utilizando un embudo de adición. La mezcla se enfrió entonces a temperatura ambiente y se agitó durante al menos 1 hora. La mezcla se filtró entonces, y la torta de filtro se lavó con agua (1,2 l), con etanol a 70% (1,2 l) y con etanol a 95% (1,2 l). El sólido amarillo brillante se colocó en una bandeja de secado y se secó en un horno al vacío a 50°C hasta que un peso constante se obtuvo proporcionando 674 g (85,4%) de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-pieprazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona deseada.

#### Ejemplo 5

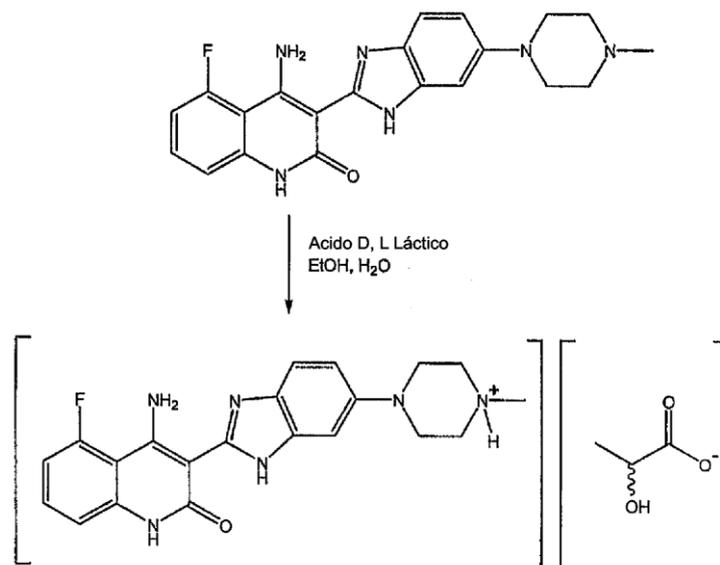
##### Purificación de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona

Un matraz de 4 cuellos de 3000 ml equipado con un condensador, una sonda de temperatura, una entrada de gas N<sub>2</sub> y un agitador mecánico se colocó en un manto de calentamiento. El matraz se cargó entonces con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona (101,0 g, 0,26 moles), y el sólido amarillo se suspendió en etanol a 95% (1000 ml) y se agitó. En algunos casos, se utilizó una relación de solvente de 8:1. La suspensión se calentó entonces a un reflujo suave (temperatura de aproximadamente 76°C) con agitación durante

un periodo de aproximadamente 1 hora. La reacción se agitó entonces durante 45-75 minutos mientras se llevó a reflujo. En este punto, el calor se removió del matraz y la suspensión se permitió enfriar a una temperatura de 25-30°C. La suspensión se filtró entonces, y la almohadilla de filtro se lavó con agua (2 x 500 ml). El sólido amarillo se colocó entonces en una bandeja de secado y se secó en un horno al vacío a 50°C hasta que un peso constante se obtuvo (normalmente 16 horas) para obtener 97,2 g (96,2%) del producto purificado como un polvo amarillo.

### Ejemplo 6

Preparación de sal del ácido láctico de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona

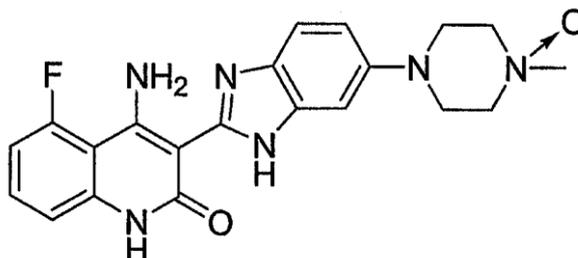


Se adaptó un matraz encamisado de 4 cuellos de 3000 ml con un condensador, una sonda de temperatura, una entrada de gas N<sub>2</sub> y un agitador mecánico. El recipiente de reacción se purgó con N<sub>2</sub> durante al menos 15 minutos y luego se cargó con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona (484 g, 1,23 moles). Una solución de ácido D,L-láctico (243,3 g, 1,72 moles de monómero-véase el siguiente párrafo), agua (339 ml) y etanol (1211 ml) se preparó y luego se cargó al matraz de reacción. La agitación se inició en una velocidad media, y la reacción se calentó a una temperatura interna de 68-72°C. La temperatura interna de la reacción se mantuvo a 68-72°C durante 15-45 minutos y luego el calentamiento se interrumpió. La mezcla resultante se filtró a través de una frita de 10-20 micras recolectando el filtrado en un matraz de 12 litros. El matraz de 12 litros se equipó con una sonda de temperatura interna, un condensador de reflujo, un embudo de adición, una entrada y salida de gas y un agitador aéreo. El filtrado se agitó entonces en una velocidad media y se calentó a reflujo (temperatura interna de aproximadamente 78°C). Mientras se mantenía un reflujo suave, se cargó etanol (3,596 ml) al matraz durante un periodo de aproximadamente 20 minutos. El matraz de reacción se enfrió entonces a una temperatura interna que varía de aproximadamente 64-70°C en un lapso de 15-25 minutos y esta temperatura se mantuvo durante un periodo de aproximadamente 30 minutos. El reactor se inspeccionó para detectar cristales. Si no estaban presentes cristales, entonces los cristales de la sal de ácido láctico de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona (484 mg, 0,1% en moles) se agregaron al matraz, y la reacción se agitó a 64-70°C durante 30 minutos antes de inspeccionar de nuevo el matraz para detectar cristales. Una vez que estaban presentes los cristales, la agitación se redujo a una velocidad baja y la reacción se agitó a 64-70°C durante 90 minutos adicionales. La reacción se enfrió entonces aproximadamente a 0°C durante un periodo de aproximadamente 2 horas, y la mezcla resultante se filtró a través de un filtro frito de 25-50 micras. El reactor se lavó con etanol (484 ml) y se agitó hasta que la temperatura interna fue aproximadamente 0°C. El etanol frío se utilizó para lavar la torta de filtro, y este procedimiento se repitió 2 veces más. El sólido recolectado se secó hasta un peso constante a 50°C bajo vacío en un horno al vacío produciendo 510,7 g (85,7%) de la sal del ácido láctico amarillo cristalino de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona. Un dique de caucho o condiciones inertes se utilizaron normalmente durante el proceso de filtración. Aunque el sólido seco no pareció ser muy higroscópico, la torta de filtro húmeda tiende a captar agua y volverse pegajosa. Se tomaron precauciones para evitar exposición prolongada de la torta de filtro húmeda a la atmósfera.

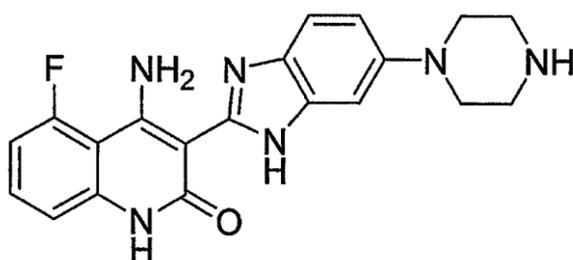
El ácido láctico comercial generalmente contiene alrededor de 8-12% p/p de agua, y contiene dímeros y trímeros además del ácido láctico monomérico. La relación molar del dímero de ácido láctico al monómero es generalmente alrededor de 1,0:4,7. El ácido láctico de grado comercial puede utilizarse en el proceso descrito en el párrafo precedente ya que la sal de monolactato se precipita de preferencia a partir de la mezcla de reacción.

## Identificación de metabolitos

5 Dos metabolitos de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona (compuesto 1) se han identificado y caracterizado en plasma de rata agrupado de un estudio de toxicología de 2 semanas como se describe en las referencias incorporadas en la presente. Los dos metabolitos identificados fueron el compuesto de N-óxido de piperazina (compuesto 2) y el compuesto N-desmetilado (compuesto 3) mostrados posteriormente.



Compuesto 2



Compuesto 3

10  $Cl_{50}$ s de los compuestos 1-3

La actividad de cinasa de un número de las proteína tirosina cinasas se midió utilizando los procedimientos establecidos posteriormente para los compuestos 1-3 para proporcionar los valores de  $Cl_{50}$  mostrados en el siguiente cuadro.

Cuadro.  $Cl_{50}$ s de los compuestos 1-3

Compuesto	$Cl_{50}$ ( $\mu$ M)					
	VEGFR flt	VEGFR flt 1	bFGFR	PDGFR	Flt3	c-kit
Compuesto 1	0,010	0,013	0,008	0,027	0,0001	0,0015
Compuesto 2	0,004	0,009	0,005	0,010	0,0004	0,0002
Compuesto 3	0,019	0,012	0,019	0,037	0,0001	0,0002

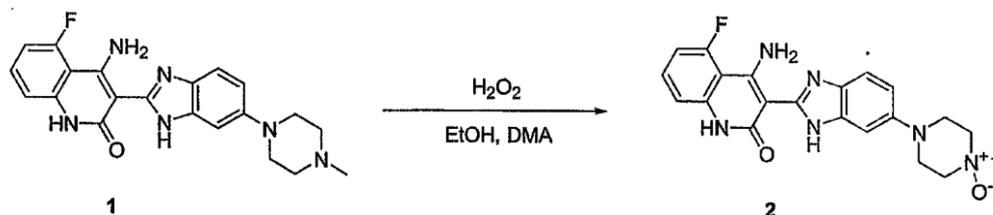
15 Síntesis de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-4-oxidopiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2-(1H)-ona (compuesto 2) y 4-amino-5-fluoro-3-(6-piperazin-1-il-1H-bencimidazol-2-il)quinolin-2(1H)-ona

(Compuesto 3)

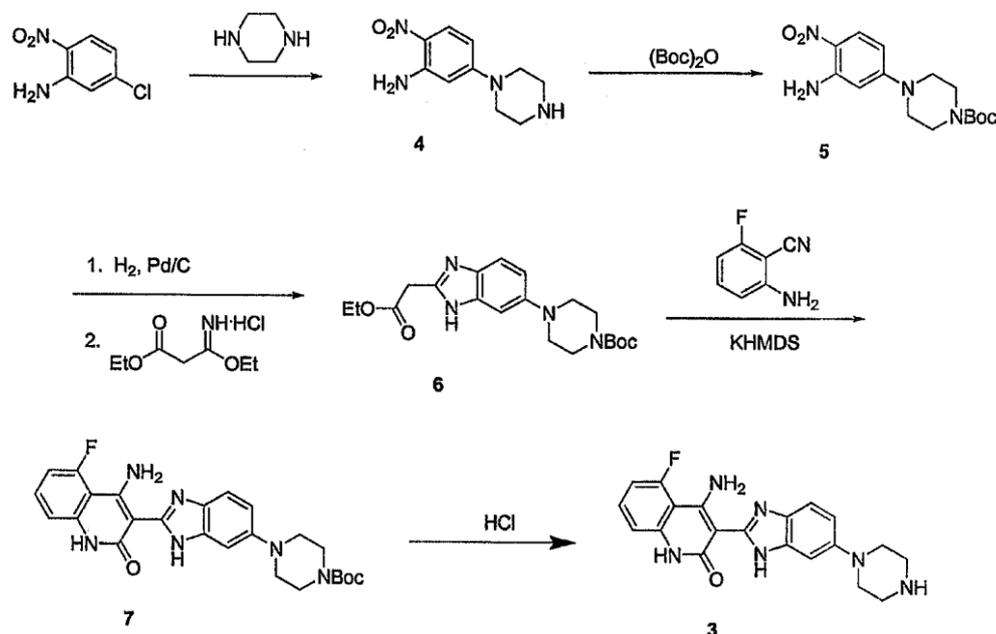
20 Para confirmar las estructuras de los metabolitos identificados del compuesto 1, los metabolitos se sintetizaron en forma independiente.

El compuesto 2, el metabolito de N-óxido del compuesto 1, se sintetizó como se muestra en el esquema posteriormente. El compuesto 1 se calentó en una mezcla de etanol, dimetilacetamida y peróxido ácido. Una vez terminada la reacción, el compuesto 2 se aisló por filtración y se lavó con etanol. Si es necesario, el producto podría

purificarse además por cromatografía en columna.



El compuesto 3, el metabolito de N-desmetilo del compuesto 1, se sintetizó como se muestra en el esquema posteriormente. Se trató 5-cloro-2-nitroanilina con piperazina para producir 4 el cual se protegió subsecuentemente con un grupo butiloxicarbonilo (Boc) para producir 5. La reducción del grupo nitro seguida por condensación con éster etílico de ácido 3-etoxi-3-iminopropiónico dio 6. La condensación de 6 con 6-fluoroantranilonitrilo utilizando hexametildisilazida de potasio como la base produjo 7. El producto sin purificar 7 se trató con HCl acuoso para producir el metabolito deseado como un sólido amarillo/café después de la purificación.



#### Procedimientos de ensayo

Las cinasas ABL (T315I) y FLT3 (D8354) se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones. Las demás son ejemplos de referencia.

#### 15 Serina/treonina cinasas

La actividad de la cinasa de varias proteínas serina/treonina cinasas se midió proporcionando ATP y un péptido o proteína adecuada que contiene un residuo de aminoácido de serina o treonina para fosforilación, y analizando la transferencia de resto de fosfato al residuo de serina o treonina. La síntesis y la actividad de ensayo de un gran número de compuestos de la fórmula I, II y III se describe en las siguientes referencias: patente de EUA No. 6.605.617; solicitud de patente de EUA publicada No. 2004/0092535; solicitud de patente de EUA No. 10/983.174, presentada el 5 de noviembre del 2004; y la solicitud de patente de EUA No. 2004/0220196. Las proteínas recombinantes que contienen los dominios cinasa de enzimas GSK-3, RSK-2, PAR-1, NEK-2 y CHK1 se expresaron en células de insecto Sf9 utilizando un sistema de expresión de Baculovirus (InVitrogen) y se purificaron a través de interacción de anticuerpo Glu (para construcciones etiquetadas con Glu) o mediante cromatografía de ión metálico (para construcciones etiquetadas con His<sub>6</sub> (SEQ ID NO: 1)). Cdc2 (construcción de fusión GST) y ciclina B se co-expresaron en células de insecto Sf9 utilizando un sistema de expresión de Baculovirus. La Cdk2/ciclina A activa, recombinante está comercialmente disponible y se adquirió de Upstate Biotechnology. La enzima Cdc2 purificada utilizada en el ensayo estuvo comercialmente disponible, y puede adquirirse de New England Bio Labs. Para cada ensayo, los compuestos de prueba se diluyeron consecutivamente en DMSO y luego se mezclaron con el regulador de pH de reacción de cinasa apropiado más 5-10 nM de ATP etiquetado con <sup>33</sup>P gamma. La proteína cinasa y el

5 sustrato de péptido biotinilado apropiado se agregaron para dar un volumen final de 150  $\mu$ l. Las reacciones se incubaron durante 3-4 horas a temperatura ambiente y luego se detuvieron transfiriendo a una placa microtituladora blanca recubierta con estreptavidina (Thermo Labsystems) que contenía 100  $\mu$ l del regulador de pH de reacción de detención. El regulador de pH de reacción de detección consiste en 50 mM de ATP no etiquetado y 30 mM de EDTA. Después de 1 hora de incubación, las placas de estreptavidina se lavaron con PBS, y 200  $\mu$ l de fluido de centelleo Microscint 20 se agregó por pozo. Las placas se sellaron y contaron utilizando Topcount. La concentración de cada compuesto para 50% de inhibición ( $CI_{50}$ ) se calculó empleando regresión no lineal utilizando software de análisis de datos XL Fit.

10 El regulador de pH de reacción contuvo 30 mM de Tris-HCl<sub>2</sub>, pH 7,5, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de DTT, 4 mM de EDTA, 25 mM de beta-glicerofosfato, 5 mM de MnCl<sub>2</sub>, 0,10% de BSA/PBS, 0,5  $\mu$ M de sustrato peptídico y 1  $\mu$ M de ATP no etiquetado. Se utilizó la enzima GSK-3 a 27 nM, CHK1 a 5 nM, Cdc2 a 1 nM, Cdk2 a 5 nM y Rsk2 a 0,044 unidades/ml. Para el ensayo GKS-3, se utilizó biotina-péptido CREB (Biotina-SGSGKRREILSRP(pS)YR-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 4)). Para el ensayo CHK1, se utilizó una biotina-péptido Cdc25c (Biotina-[AHX]SGSGSGLYRSPMPENLNRPR[CONH<sub>2</sub>] (SEQ ID NO: 5)). Para los ensayos Cdc2 y Cdk2, se utilizó una biotina-péptido de histona H1 ([IcBiotin]GGGGPKTPKKAKKL[CONH<sub>2</sub>] (SEQ ID NO: 6)). En el ensayo Rsk2, se utilizaron una biotina-péptido p70, 15 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de DTT, 5 mM de EDTA, 2,7  $\mu$ M de péptido inhibidor PKC y 2,7  $\mu$ M de péptido inhibidor de PKA.

#### Tirosina cinasas

20 La actividad de la cinasa de un número de las proteína tirosina cinasas se midió proporcionando ATP y un péptido o proteína apropiada que contiene un residuo de aminoácido de tirosina para fosforilación, y evaluando la transferencia de resto de fosfato al residuo de tirosina. Las proteínas recombinantes que corresponden a los dominios citoplásmicos de los receptores FLT-1 (VEGFR1), VEGFR2, VEGFR3, Tie-2, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$  y FGFR1 se expresaron en células de insectos Sf9 utilizando un sistema de expresión de Baculovirus (InVitrogen) y puede purificarse a través de interacción de anticuerpo Glu (para construcciones etiquetadas de Glu-epítipo) o por cromatografía de ión metálico (para construcciones etiquetadas de His<sub>6</sub> (SEQ ID NO: 1)). Para cada ensayo, los compuestos de prueba se diluyeron en serie en DMSO y luego se mezclaron con un regulador de pH de reacción de cinasa apropiado más ATP. La proteína cinasa y un sustrato de péptido biotinilado apropiado se agregaron para dar un volumen final de 50-100  $\mu$ l, las reacciones se incubaron durante 1-3 horas a temperatura ambiente y luego se detuvieron por la adición de 25-50  $\mu$ l de 45 mM de EDTA, 50 mM de Hepes pH 7,5. La mezcla de reacción detenida (75  $\mu$ l) se transfirió a una placa microtituladora recubierta con estreptavidina (Boehringer Mannheim) y se incubó durante 1 hora. El producto de péptido fosforilado se midió con un sistema de fluorescencia de resolución temporal DELFIA (Wallac o PE Biosciences), utilizando un anticuerpo PT66 anti-fosfotirosina etiquetado con europio con la modificación de que el regulador de pH de ensayo DELFIA se suplementó con 1 mM de MgCl<sub>2</sub> para la dilución de anticuerpo. La fluorescencia de resolución temporal se leyó en un fluorómetro Wallac 1232 DELFIA o un lector de señal múltiple PE Victor II. La concentración de cada compuesto para 50% de inhibición ( $CI_{50}$ ) se calculó empleando regresión no lineal utilizando software de análisis de datos XL Fit.

35 Se evaluaron cinasas FLT-1, VEGFR2, VEGFR3, FGFR3, Tie-2 y FGFR1 en 50 mM de Hepes pH 7,0, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de MnCl<sub>2</sub>, 1 mM de NaF, 1 mM de DTT, 1 mg/ml de BSA, 2  $\mu$ M de ATP y 0,20-0,50  $\mu$ M que corresponde al sustrato de péptido biotinilado. Se agregaron cinasas FLT-1, VEGFR2, VEGFR3, Tie-2 y FGFR1 a 0,1  $\mu$ g/ml, 0,05  $\mu$ g/ml o 0,1  $\mu$ g/ml, respectivamente. Para el ensayo de cinasa PDGFR, 120  $\mu$ g/ml de enzima con las mismas condiciones de regulador de pH como lo anterior se utilizó excepto por cambiar las concentraciones de ATP y sustrato peptídico a 1,4  $\mu$ M de ATP, y 0,25  $\mu$ M de biotina-sustrato peptídico GGLFDDPSYVNVQNL-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 2).

45 Las tirosina cinasas recombinantes y activas Fyn, y Lck están comercialmente disponibles y se adquirieron de Upstate Biotechnology. Para cada ensayo, los compuestos de prueba se diluyeron en serie en DMSO y luego se mezclaron con un regulador de pH de reacción de cinasa apropiado más 10 nM de ATP etiquetado con <sup>33</sup>P gamma. La proteína cinasa y el sustrato de péptido biotinilado apropiado se agregaron para dar un volumen final de 150  $\mu$ l. Las reacciones se incubaron durante 3-4 horas a temperatura ambiente y luego se detuvieron transfiriendo a una placa microtituladora blanca recubierta con estreptavidina (Thermo Labsystems) que contenía 100  $\mu$ l del regulador de pH de reacción de detección de 100 mM de EDTA y 50  $\mu$ M de ATP no etiquetado. Después de 1 hora de incubación, las placas de estreptavidina se lavaron con PBS y 200  $\mu$ l de fluido de centelleo Microscint 20 se agregó por pozo. Las placas se sellaron y contaron utilizando TopCount. La concentración de cada compuesto para 50% de inhibición ( $CI_{50}$ ) se calculó empleando la regresión no lineal utilizando software de análisis de datos XL Fit.

55 El regulador de pH de reacción de cinasa para Fyn, Lck y c-ABL contuvo 50 mM de Tris-HCl pH 7,5, 15 mM de MgCl<sub>2</sub>, 30 mM de MnCl<sub>2</sub>, 2 mM de DTT, 2 mM de EDTA, 25 mM de fosfato de beta-glicerol, 0,01% de BSA/PBS, 0,5  $\mu$ M del sustrato peptídico apropiado (sustrato peptídico Src biotinilado: biotina-GGGGKVEKIGEGTYGVVYK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 3) para Fyn y Lck), 1  $\mu$ M de ATP no etiquetado, y 1 nM de cinasa.

La actividad cinasa de c-Kit y FLT-3 se midieron proporcionando ATP y un péptido o proteína conteniendo un

residuo de aminoácido de tirosina para fosforilación, y evaluando la transferencia del resto de fosfato al residuo de tirosina. Las proteínas recombinantes que corresponden a los dominios citoplásmicos de los receptores de c-Kit y FLT-3 se adquirieron (Proquinase). Para experimentación, un compuesto ejemplar, por ejemplo 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, se diluyó en DMSO y luego se mezcló con el regulador de pH de reacción de cinasa descrito posteriormente más ATP. La proteína cinasa (c-Kit o FLT-3) y el sustrato peptídico biotinilado (biotina-GGLFDDPSYVNVQNL-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 2)) se agregaron para dar un volumen final de 100  $\mu$ l. Estas reacciones se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente y luego se detuvieron por la adición de 50  $\mu$ l de 45 mM de EDTA, 50 mM de HEPES, pH 7,5. La mezcla de reacción detenida (75  $\mu$ l) se transfirió a una placa microtituladora recubierta con estreptavidina (Boehringer Mannheim) y se incubaron durante 1 hora. El producto peptídico fosforilado se midió con el sistema de fluorescencia de resolución temporal DELPHIA (Wallac o PE Biosciences), utilizando un anticuerpo anti-fosfotirosina etiquetado con europio, PT66, con la modificación de que el regulador de pH de ensayo DELFIA se suplementó con 1 mM de MgCl<sub>2</sub> para la dilución del anticuerpo. Los valores de fluorescencia de resolución temporal se determinaron en un fluorómetro Wallac 1232 DELFIA o un lector de señal múltiple PE Victor II. La concentración de cada compuesto para 50% de inhibición (CI<sub>50</sub>) se calculó empleando regresión no lineal utilizando software de análisis de datos XL Fit.

Se evaluaron las cinasas FLT-3 y c-Kit en 50 mM de Hepes pH 7,5, 1 mM de NaF, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de MnCl<sub>2</sub> y 1 mg/ml de BSA, 8  $\mu$ M de ATP y 1  $\mu$ M del sustrato peptídico biotinilado correspondiente (biotina-GGLFDDPSYVNVQNL-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 2)). La concentración de las cinasas FLT-3 y c-Kit se evaluaron en 2 nM.

#### Evaluación exhaustiva de formación de imágenes y en tiempo real de la eficacia de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona en un modelo de mieloma múltiple pre-clínico

Mieloma múltiple (MM), un neoplasma de células B caracterizado por expansión clonal de células de plasma en la médula ósea hematopoyética, sigue siendo una malignidad hematológica fatal debido al desarrollo de resistencia intrínseca y adquirida a fármacos a pesar de la introducción de quimioterapia de alta dosis convencional. Se ha demostrado que el microambiente de médula ósea, en donde las células MM se alojan y crecen de preferencia, juega un papel crucial en el desarrollo de resistencia a terapias convencionales y novedosas para MM. Por lo tanto, los agentes direccionados molecularmente que se dirigen no sólo a las células MM sino también a interacción de microambiente de células MM-médula ósea ofrecen una oportunidad potencial para tratar MM. Avances recientes para entender la patología molecular de MM han provisto objetivos terapéuticos novedosos para el tratamiento de esta enfermedad. La FGFR-3 ectópicamente expresada y desregulada, lo cual ocurre en aproximadamente 15% de pacientes con MM que resultan de desplazamiento t(4;14) cromosomal y confiere un pronóstico particularmente pobre en la clínica, se ha vuelto un objetivo terapéutico atractivo para MM.

La 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (compuesto 1) es un inhibidor de molécula pequeña que se dirige a múltiples tirosina cinasas receptoras VEGFR-2 y PDGFR (CI<sub>50</sub>s ~20 nM en ensayos de cinasa) y FGFR-3 (CI<sub>50</sub> ~5 mM en ensayos de cinasa). Se ha demostrado que la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona inhibe la autofosforilación de FGFR-3 y la proliferación celular en células MM mutantes FGFR-3 *in vitro* (S. Trudel *et al.*; Blood; en prensa). Para evaluar la eficacia anti-mieloma de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, se desarrolló un modelo de MM preclínico *in vivo* en el cual se desarrollaron lesiones de MM de órganos múltiples después de inyección i.v. en la vena de la cola de células KMS-11-luc humanas que expresan FGFR-3 mutante (Y373C) transfectadas establemente con una construcción de luciferasa. Se empleó formación de imágenes bioluminiscentes (BLI) para monitorear no invasivamente el crecimiento *in vivo* y la metástasis de tumores de MM de KMS-11-luc. La detección temprana y el monitoreo completo en serie del crecimiento de lesiones metastásicas se capturó exitosamente por BLI con este modelo. Casi todos los animales inyectados con células tumorales KMS-11-luc se encontraron que desarrollaron lesiones MM ya en el día 26, los cuales se localizaron principalmente en la espina dorsal, cráneo y pelvis resultando en desarrollo frecuente de parálisis en este modelo. La eficacia anti-mieloma de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona en este modelo de MM de KMS-11-luc *in vivo* inyectado i.v. se investigó y se encontró que la administración oral diaria de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona a 20 mg/kg, una dosis que se demostró que inhibe la fosforilación de RK en tumores de KMS-11-luc *in vivo*, resultó en una inhibición notable del crecimiento tumoral de KMS-11, como se detectó por la formación de imágenes BLI en serie. Además, la actividad anti-crecimiento tumoral de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona se tradujo en una mejora notable en la tasa de supervivencia animal comparada al tratamiento con vehículo. Estos estudios proporcionan bases pre-clínicas adicionales para pruebas clínicas de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona en pacientes con MM y se justifican una evaluación adicional de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona en terapia de combinación con agentes direccionados molecularmente convencionales u otros en este modelo *in vivo* KMS-11-luc.

#### Método

Un grupo de 18 ratones beige SCID inmunodeficientes hembras (aproximadamente 8 semanas de edad) se obtuvieron de The Jackson laboratory (Bar Harbor, ME) y se alojaron en una instalación de barrera en jaulas de filtro

superior estériles con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad. Todos los experimentos se condujeron en una instalación acreditada por la Asociación Internacional para Evaluación y Acreditación para el Cuidado de Animales de Laboratorio y de acuerdo con todos los lineamientos del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales y la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (National Reseca Council). Se cultivaron células de MM KMS-11-luc que alojaban mutantes FGFR-3 (Y373C) en medio de Iscove + 10% de FBS + L-glutamina y se pasaron dos veces/semana en un intervalo de 1:2 a 1:4. Las células se implantaron por inyección intravenosa en la vena de la cola a  $10 \times 10^6$  células por 100  $\mu$ l de HBSS por ratón. Los ratones fueron irradiados a 3 GY (3,2 minutos) en el día de implantación celular. Los animales recibieron tratamiento oral diario de 20 mg/kg de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2-(1H)-ona o vehículo (n = 9 cada grupo) iniciando en 48 horas después de que se inyectaron las células KOM11-luc. Se obtuvieron imágenes bioluminiscentes (BLI) utilizando un sistema de formación de imágenes IVIS (Xenogen) que incluye una cámara CCD refrigerada, altamente sensible, montada en una cámara oscura de tipo caja. Las imágenes y las medidas de señales bioluminiscentes, como se cuantifica por fotones/segundo, se adquirieron en el día 8 y una vez por semana después de eso. Los pesos corporales de los animales se monitorearon dos veces por semana y las observaciones clínicas se registraron diariamente. De acuerdo con la regulación y lineamientos del cuidado de animales, los ratones se sacrificaron por inhalación de CO<sub>2</sub> en el caso de parálisis o compromiso mayor en su calidad de vida.

### Resultados

En el día 8 después que las células KMS-11-luc se inyectaron intravenosamente en ratones SCID-beige, la formación de imágenes de cuerpo total demostró el desarrollo de crecimiento celular y posiblemente las lesiones de MM localizadas principalmente en regiones extraesqueléticas incluyendo pulmón, hígado y bazo. Se observaron claramente lesiones esqueléticas múltiples difusas típicas incluyendo el cráneo, pelvis y espina dorsal en la mayoría de ratones entre el día 41 y el día 48 como se observa en las imágenes BLI de la figura 1, la cual se asoció con parálisis de extremidades posteriores, resultando en el sacrificio de ratones de acuerdo al protocolo.

La eficacia antimieloma de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona se probó en KMS-11-luc en este modelo *in vivo*. Los ratones empezaron a recibir tratamiento oral diario de 58 a 20 mg/kg a las 48 horas después que se inyectaron las células KMS-11-luc. El monitoreo exhaustivo y en serie de conteos de fotones en cada animal se realizó en un horario semanal. Se demostró un conteo de fotones promedio notable inferior en un grupo tratado con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona comparado al tratamiento con vehículo como se muestra en la figura 2. Esto se observó fácilmente en comparación de las imágenes BLI de cuerpo completo tomadas de ratones inyectados con KMS-11-luc tratados con vehículo y aquellos tratados con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona como se muestra en la figura 3.

La reducción del conteo de fotones en ratones tratados con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona tratados se reflejó bien por un incremento notable en el tiempo de supervivencia comparado a ratones tratados con vehículo. En el día 91, 5 de 9 animales en aquellos ratones tratados con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(H)-ona permanecieron vivos con condiciones saludables globales. En contraste, la mayoría de los animales en el grupo tratado con vehículo se sacrificaron alrededor del día 50. Además, los ratones tratados con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, toleraron este tratamiento bien durante un largo periodo de este estudio. Debido a la mejora obvia en el tiempo de supervivencia de los ratones tratados con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, el estudio se terminó el día 91 por consideraciones prácticas.

Varios estudios con respecto a la inhibición de cinasa en general, la inhibición de FGFR3, y el tratamiento de cánceres incluyendo mieloma múltiple con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona se establecen en la solicitud de patente de EUA publicada No. 2004/0092535, y la solicitud de patente de EUA No. 10/983.174 (US 7.825.132), solicitud de patente de EUA No. 2004/0220196 y la patente de EUA No. 6.605.617.

### Actividad de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (compuesto 1) en modelos de xenoinjerto de tumor experimental de AML humana

La 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (compuesto 1) es una molécula pequeña, multidireccional, oralmente activa, novedosa, que exhibe actividad potente contra cinasa FLT3 y la clase III, IV y V de RTK implicada en proliferación celular endotelial y tumoral. Dada la relevancia de mutaciones de FLT3 en leucemia mieloide aguda (AML), se probó el compuesto 1 en dos líneas celulares leucémicas humanas con diferente estado mutacional de FLT3 (MV4;11 FLT3 ITD contra RS4; 11 FLT3 WT). La actividad antiproliferativa del compuesto 1 contra MV4; 11 fue ~24 veces mayor comparada a RS4; 11, indicando inhibición más potente de FLT3 constitutivamente activada. La modulación dependiente de dosis de fosforilación de receptor y señalización corriente abajo (STAT5 y ERK/MAPK) en células MV4;11 con el compuesto 1 confirmó el mecanismo de acción molecular. La modulación objetivo de pFLT3, pERK en tumores MV4;11 se logró en dosis biológicamente activas del

compuesto 1. Las regresiones y erradicación del tumor de células de AML de la médula ósea (BM) fueron demostradas en modelos de xenoinjerto leucémico injertados en BM y subcutáneos. Las respuestas tumorales se caracterizaron por proliferación celular disminuida y tinción inmunohistoquímica positiva para caspasa-3 activa y PARP escindido, que sugiere muerte celular mediada mediante apoptosis. Estos datos soportan la evaluación clínica del compuesto 1 en AML.

#### Líneas celulares

Se obtuvieron células leucémicas MV4;11 (FLT3 ITD) y RS4;11 (FLT3 WT) humanas de American Tissue Culture Collection (Rockville, MD) 24-26. Las células MV4;11 se hicieron crecer en medio de Dulbecco modificado por Iscoves (IMBM) suplementado con 10% de suero de bovino fetal (FBS, Gibco Life Technologies, Gaithersburg, MD) que contenía 4 mM de L-glutamina, 5 ng/ml del factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, R&S Systems, Minneapolis, MN) y 1% de penicilina y estreptomina. Se hicieron crecer RS4;11 en medio RPMI-1640 que contenía 10% de FBS, 1 mM de piruvato de sodio y 10 mM de HEPES (pH 7,4). Las células se hicieron crecer como cultivos en suspensión y se mantuvieron en una atmósfera humidificada a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### Ensayos de cinasa

Se ejecutaron ensayos de cinasa FLT3 *in vitro* con 2 nM de enzima FLT3 (Upstate Biotechnology, Charlottesville, VA) en la presencia de 8 μM de ATP y diluciones en serie del compuesto 1. El sustrato de péptido fosforilado en una concentración final de 1 μM se incubó con un anticuerpo anti-fosfotirosina etiquetado con europio (PT66) (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA). Se detectó europio utilizando fluorescencia de resolución temporal. La CI<sub>50</sub> se calculó utilizando regresión no lineal.

#### Ensayos de proliferación

Se sembraron en placas células en placas microtituladoras de 96 pozos (10.000 células/pozo) y las diluciones en serie del compuesto 1 se agregaron. Se estimularon células RS4;11 con ligando FLT3 (100 ng/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN). En el final del periodo de incubación (72 horas a 37°C), la viabilidad celular se determinó por el ensayo de MTS (Promega, Madison, WI). Los valores de CE<sub>50</sub> se calcularon utilizando regresión no lineal, y se definieron como la concentración necesaria para una reducción del 50% en absorbancia de células tratadas contra control no tratadas.

#### Análisis de inmunoprecipitación y transferencia Western

Para experimentos *in vitro*, se trataron células MV4;11 y RS4;11 con el compuesto 1 durante 3 horas. Las células RS4;11 fueron estimuladas con el ligando FLT3 (100 ng/ml) durante 15 minutos después de la incubación con el compuesto 1. Después de la incubación con fármaco, las células se cosecharon, lavaron con PBS enfriado en hielo y se lisaron con regulador de pH RIPA (1% de Nonidet P-40, 0,5% de desoxicolato de sodio, 0,1% de dodecilsulfato de sodio en solución salina tamponada con fosfato 1X, pH 7,2), que contenía inhibidores de proteasa (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN) e inhibidores de fosfatasa (Sigma, St. Louis, MO). Para análisis de modulación objetivo *in vivo*, los tumores extirpados se congelaron instantáneamente, se pulverizaron y se almacenaron a -70°C antes de la lisis con 150 mM de NaCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de Hepes, pH 7,5, 10% de glicerol, 1,0% de Triton X-100, 1 mM de EGTA, 50 mM de NaF, 1 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2 mM de Pefabloc (Roche) y coctel inhibidor de proteasa completo (Roche). El contenido de proteína de los lisatos se determinó utilizando el ensayo de BCA (Bio-Rad, Hercules, CA). El análisis de transferencia western para pERK se realizó con un anticuerpo de ratón contra PERK (1:1000, Cell Signaling, Beverly, MA) y se incubó a 4°C durante la noche. El nivel de ERK total se evaluó al re-sondear con anticuerpo contra ERK total (Cell Signaling). Las membranas se incubaron entonces durante 1 hora a TA con IgG anti-conejo conjugada con peroxidasa de rábano 1:5000 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Para inmunoprecipitación para detectar FLT3, cantidades iguales de proteínas (500 μg para STAT5; 1000 μg para FLT3) se incubaron con anticuerpos contra FLT3 o STAT5 humana (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) durante la noche a 4°C y con proteína A-agarosa durante 2 horas a 4°C. La fosforilación FLT3 o STAT5 se midió sondeando con un anticuerpo anti-fosfotirosina (anticuerpo anti-pFLT3 de Cell Signaling, y anticuerpo anti-pSTAT5 de Upstate). Las proteínas se detectaron utilizando quimioluminiscencia mejorada (CEL; Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra) y se visualizaron después de la exposición a película Kodak. La densitometría de barrido se realizó para cuantificar intensidades de banda. Para verificar carga igual, las transferencias se removieron y volvieron a sondear con anticuerpos anti-FLT3 (Santa Cruz Biotechnology) o anti-STAT5 (BD Biosciences) para medir la proteína FLT3 o STAT5 total, respectivamente. La cantidad de pFLT3, pERK o pSTAT5 se normalizó a niveles de proteína FLT3, ERK o STAT5 totales y se comparó a controles vehículo o no tratados.

#### Ensayos citométricos de flujo

Se trataron células MV4;11 con el compuesto 1 durante 3 horas bajo condiciones privadas de suero (durante la

5 noche en medio OptiMEM). Para detección de pSTAT5, se fijaron células con 1% de formaldehído, y se permeabilizaron con metanol enfriado en hielo a 90%. Las células permeabilizadas ( $0,5 - 1 \times 10^6$ ) se incubaron con anticuerpo anti-pSTAT5 (Cell Signaling) durante 30 minutos. La IgG de conejo purificada (Oncogene, San Diego, CA) en la misma concentración se utilizó como control de isotipo. El anticuerpo secundario fue F(ab')<sub>2</sub> de cabra conjugado con PE anti-IgG de conejo (Jackson Immunoresearch). Las muestras se almacenaron a 4°C en la oscuridad antes del análisis utilizando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). Se determinó la intensidad fluorescente promedio (MFI) para tinción pSTAT5 utilizando software CellQuest (Becton Dickinson) y la MFI específica fue la diferencia de la MFI del anticuerpo control de isotipo.

10 Para procesamiento de células de médula ósea (BM) del modelo de injerto de MV4;11 de ratón, se purgaron los fémures con solución salina fría y los glóbulos rojos se lisaron con regulador de pH de lisis FACS (Becton Dickinson). El porcentaje de injerto de células leucémicas humanas en BM de ratón se determinó tiñendo con HLA-A,B,C-FITC anti-humano (contra anticuerpo compatible con isotipo-control FITC) (BD Pharmingen).

#### ELISA DE VEGF

15 Se cultivaron células MV4;11 en medios que contenían 10% de FBS con varias concentraciones (0 - 1 µM) del compuesto 1 durante 48 horas. Los sobrenadantes se recolectaron después de la centrifugación, y los niveles de VEGF se midieron por ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). Las concentraciones de proteína se determinaron utilizando el ensayo de proteína BIO-RAD (Hercules, CA) y los resultados se normalizaron para concentración de proteínas.

#### Estudios de eficacia *in vivo*

20 Se obtuvieron ratones SCID-NOD hembras (4-6 semanas de edad, 18-22 g) de Charles River (Wilmington, MA) y se aclimataron durante 1 semana en compartimiento libre de patógenos antes de iniciar el estudio. Los animales recibieron comida para roedores estéril y agua *ad libitum* y se alojaron en jaulas de filtro superior estériles con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad. Todos los experimentos estuvieron bajo los lineamientos de la Asociación Internacional para Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio.

#### 25 Modelo subcutáneo

30 Las células MV4;11 y RS4;11 se pasaron a partir de tumores subcutáneos (s.c.) en ratones SCID-NOD. Las células ( $5 \times 10^6$  células/ratón) se reconstituyeron con 50% de Matrigel (Becton Dickinson) y se implantaron s.c. en el costado derecho de los ratones SCID-NOD. Los tratamientos se iniciaron cuando los tumores tuvieron 200-1000 mm<sup>3</sup>, como se subraya en diseños de estudio específicos. Los ratones se asignaron aleatoriamente en grupos (normalmente 10 ratones/grupo para estudios de eficacia y 3-5 ratones/grupo para estudios farmacodinámicos (PD)). El compuesto 1 se administró como una solución a través de alimentación oral. Los volúmenes tumorales y pesos corporales se evaluaron 2-3 veces a la semana. Las medidas de calibre de tumores se convirtieron en volumen de tumor promedio utilizando la fórmula:  $1/2 (\text{longitud} \times [\text{ancho}]^2)$ . El porcentaje de inhibición de crecimiento tumoral (TGI) se comparó con ratones tratados con vehículo. Las tasas de respuesta se definieron como respuestas completas CR (tumor no palpable) o respuestas parciales PR (50-99% de contracción) comparadas al volumen tumoral de inicio de tratamiento.

#### Modelo de injerto de médula ósea (BM) intravenoso

40 Se irradiaron ratones SCID-NOD (3 Gy) antes de la inyección en la vena de la cola de  $1 \times 10^7$  células MV4;11 en 0,2 ml de solución salina. Los tratamientos con compuesto 1 o con vehículo se iniciaron 3 semanas después de la inoculación celular. Los ratones se monitorearon diariamente y se sacrificaron cuando estuvieron moribundos o con señales tempranas de pérdida de motilidad de extremidades posteriores. La vida incrementada (ILS) de ratones tratados se calculó como un incremento en porcentaje del tiempo de supervivencia promedio (MST) contra ratones control tratados con vehículo.

#### Modulación objetivo *in vivo*

45 Tumores s.c. MV4;11 en ratones SCID-NOD (n=3 ratones/grupo) se estadificaron en 300 mm<sup>3</sup> y los tratamientos consistieron en cualquiera de vehículo o compuesto 1 administrados oralmente a 10 mg/kg durante 5 días. Para la caracterizaron de las propiedades de PD del compuesto 1, las muestras de tumor se recolectaron varias veces (N=3 ratones/punto de tiempo) tras la dosificación del compuesto 1.

#### Inmunohistoquímica

50 Se colocaron tumores extirpados en 10% de formalina tamponada neutra durante la noche a TA, se transfirieron a etanol a 70% y se procesaron para incrustación en parafina utilizando un procesador de tejidos Thermo Electron

Excelsior (Pittsburg, PA). Muestras óseas (fémur) se descalcificaron (Protocolo ITM, Fisher Diagnostics, Middletown, VA). Los bloques de parafina se seccionaron en 4  $\mu\text{m}$  de espesor y se colocaron en portaobjetos de vidrio positivamente cargados. Los tejidos se tiñeron utilizando una máquina de portaobjetos automatizada Discovery (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Los portaobjetos se trataron con regulador de pH de citrato (pH 6,0) en un vaporizador de presión para recuperar antígeno para tinción de Ki-67, pERK y PARP, y caspasa-3 se recuperó mediante reactivo CC1 de Ventana. Los anticuerpos primarios utilizados fueron Ki-67 (dilución de 1:750, Novocastra Laboratories, RU), pERK (dilución 1:100, Biosource, Camarillo, CA), anti-mitocondria humana (1:200, Chemicon, Temecula, CA), caspasa-3 escindida (1:200, Cell Signaling) y PARP escindido (1:100, Biosource). El anticuerpo secundario fue un anticuerpo biotinilado de cabra anti-F(ab')<sub>2</sub> de conejo, dilución 1:100 (Jackson ImmunoResearch). Los portaobjetos se contra-tiñeron con hematoxilina y se montaron con un cubreobjetos. La morfología del tejido general se evaluó también utilizando tinción con hematoxilina y eosina.

#### Análisis estadísticos

Se realizó regresión lineal utilizando Microsoft Excel (Redmond, WA). La prueba de la t de Student se utilizó para medir importancia estadística entre dos grupos de tratamiento. Comparaciones múltiples se hicieron utilizando un análisis unidireccional de varianza (ANOVA), y pruebas posteriores comparando diferentes medios de tratamiento se hicieron utilizando prueba de Student-Newman Keul (SigmaStat, San Rafael, CA). Para estudios de supervivencia, la prueba de rangos logarítmicos se utilizó para determinar importancia entre las curvas de supervivencia de varios tratamientos contra grupos vehículo (Prism, San Diego, CA). Los ratones sacrificados con estado de salud normal en la terminación de estudio se consideraron supervivientes a largo plazo y se censuraron en este análisis. Las diferencias se consideraron estadísticamente notables a  $p < 0,05$ .

#### RESULTADOS

El compuesto 1 demuestra inhibición potente de actividad de cinasa FLT3

El carácter específico del compuesto 1 se probó contra un panel diverso de RTKs utilizando ensayos de unión competitivos con ATP con enzimas purificadas como se describe anteriormente. El compuesto 1 se encontró que es altamente potente contra FLT3 (1 nM) con actividad nanomolar contra c-KIT (2 nM), VEGFR1/2/3 (10 nM); FGFR1/3 (8 nM); PDGFR $\beta$  (27 nM) y CSF-1R (36 nM) (véase el siguiente cuadro). Para confirmar la selectividad contra la clase III, IV y V de RTKs, el compuesto 1 se probó contra otras cinasas en las trayectorias PI3K/Akt y MAPK(K) y se encontró que tiene actividad insignificante ( $\text{CI}_{50} > 10 \mu\text{M}$ ) (véase el siguiente cuadro).

Cuadro. Actividad de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona contra varios RTKs

RTK	$\text{CI}_{50}(\mu\text{M})$
FLT3	<0,001
c-KIT	0,002
CSF-1R	0,036
FGRF1	0,008
FGRF3	0,009
VEGFR1/Flt1	0,01
VEGFR2/Flt1	0,013
VEGFR3/Flt4	0,008
PDGFR $\beta$	0,027
PDGFR $\alpha$	0,21

(continuación)

INSR	2
EGFR1	2
c-MET	>3
EphA2	4
TIE2	4
IGFR1, HER2, PI-3K, Akt1/3, Raf, ERK-1/2, MEK, p38- $\alpha,\beta,\gamma$	>10

5 Los ensayos de RKT *in vitro* utilizados para preparar el cuadro anterior se activaron con varias diluciones del compuesto 1 en la presencia de enzimas purificadas y ATP como se describe anteriormente. Los sustratos de péptido fosforilados (1  $\mu$ M) se incubaron con anticuerpos anti-fosfoespecíficos etiquetados con europio y se detectó europio utilizando fluorescencia de resolución temporal.

Efectos antiproliferativos potentes del compuesto 1 en células MV4;11 (FLT3ITD)

10 Para determinar si la inhibición de la FLT3 se traduce en inhibición de crecimiento *in vitro*, la actividad del compuesto 1 se probó contra células MV4;11 y RS4;11 utilizando el ensayo de MTS (figura 5). El compuesto 1 inhibe potencialmente la proliferación de células MV4;11 en una manera dependiente de dosis con  $CE_{50} = 13$  nM. Aunque se observaron efectos dependientes de concentración similar en la proliferación con células RS4;11, fueron aproximadamente 24 veces menos sensibles al compuesto 1 ( $CE_{50} = 315$  nM). El efecto antiproliferativo del compuesto 1 se probó también en las células mutantes FLT3 ITD, MOLM13 y MOLM14 con concentraciones de  $CE_{50}$  similares a aquellas vistas con MV4;11 ( $CE_{50} \sim 6$  nM) (datos no mostrados). Estos datos sugieren que el compuesto 1 es activo tanto en células leucémicas FLT3ITD y WT, con el receptor constitutivamente activo que es más sensible para inhibición (figura 5).

Efectos *In vitro* del compuesto 1 en señalización mediada por FLT3 en células leucémicas

20 La actividad celular *in vitro* del compuesto 1 se investigó en dos líneas celulares leucémicas humanas MV4;11 y RS4;11 con estado mutacional de FLT3 contrastante (confirmado utilizando RT-PCR, datos no mostrados). Las células MV4;11 tienen una mutación de duplicación de tándem interna (ITD) en el receptor FLT3, resultando en FLT3 constitutivamente activado. Levis M. *et al.*, *Blood*, 99:3885-3891 (2002); O'Farrell A.M. *et al.*, *Blood*, 101:3597-3605 (2003). Esta activación resulta en autofosforilación de FLT3 en la ausencia de estimulación de ligando exógeno (figura 6, carril 1). Se trataron células MV4;11 desprovistas de suero con el compuesto 1 durante 3 horas, y los efectos directos en la activación del receptor FLT3 se determinó por análisis de su estado de fosforilación. La exposición de células MV4;11 para incrementar las concentraciones del compuesto 1 inhiben potencialmente pFLT3 en una manera dependiente de dosis con  $CE_{50}$  entre 1-10 nM (figura 6).

30 Aunque las FLT3 ITDs son prevalentes en aproximadamente 20% de blastos de pacientes con AML, las leucemias más agudas expresan WT FLT3. Los efectos del compuesto 1 en células RS4;11 leucémicas se investigaron también (FLT3 WT) (figura 7) siguiendo el ligando FLT3 exógeno (100 ng/ml, 15 minutos) para activar la fosforilación del receptor FLT3 (figura 7, líneas carriles 1 contra 2). El compuesto 1 redujo los niveles pFLT3 en células RS4;11 (figura 7). Sin embargo, comparativamente, se requirieron concentraciones más elevadas para modulación de WT FL3 contra ITD. La inhibición completa se obtuvo con concentraciones de  $> 0,5 \mu$ M (figuras 6 y 7).

35 Compuesto 1 modula ERK y STAT5, objetivos corriente debajo de inhibición de FLT3

40 Para caracterizar además los efectos del compuesto 1 en inhibición de FLT3, la modulación de objetivos corriente abajo de FLT3, es decir, STAT5 y ERK, los cuales son proteínas clave en la supervivencia y proliferación celular se investigaron. Las células MV4;11 se trataron con concentraciones incrementadas del compuesto 1 durante 3 horas y se procesaron para citometría de flujo y transferencia Western para detección de pERK y p-STAT5 (figuras 8 y 9). En células MV4;11, debido a la señalización activa de FLT3, las células tienen niveles basales elevados de pERK y pSTAT5 (figuras 8 y 9). El compuesto 1 inhibe fosforilación de ERK (figura 8) y STAT5 (figura 9) en una manera

dependiente de dosis. La inhibición sustancial de pERK y pSTAT5 (>50%) se observó en concentraciones >0,1  $\mu\text{M}$  (flujo citométrico y transferencia Western). Los efectos de inhibición del compuesto 1 en pERK y pSTAT5 fueron más potentes en MV4;11 comparados a células RS4;11 estimuladas con ligando FLT3 (datos no mostrados).

Compuesto 1 inhibe la producción autocrina de VEGF en células MC4;11 *in vitro*

- 5 Para dirigir el efecto del compuesto 1 en la producción de VEGF *in vitro*, se realizó un ELISA en sobrenadantes de cultivo MV4;11 (figura 10). En estos experimentos, las células MV4;11 se cultivaron en medio que contienen 10% de FBS con concentraciones crecientes (0 - 1  $\mu\text{M}$ ) del compuesto 1 durante 48 horas. En la ausencia del tratamiento con fármaco, las células MV4;11 secretan VEGF sustancial (180 pg/ml), mientras que el compuesto 1 inhibe la producción de VEGF en una manera dependiente de dosis, con una  $\text{CE}_{50}$  entre 0,001 y 0,01  $\mu\text{M}$  y la inhibición completa en concentraciones > 0,5  $\mu\text{M}$  (figura 10).

Compuesto 1 Modula la señalización de FLT3 *In Vivo*

- 15 Para examinar la modulación objetivo *in vivo*, ratones que padecen tumor MV4;11 (presentados en 300 - 500  $\text{mm}^3$ ) se administraron al compuesto 1 (10 mg/kg/d) o vehículo durante 5 días. Los tumores se cosecharon después de los puntos de tiempo seleccionados, se homogenizaron y analizaron para niveles de pFLT3 y pSTAT5 por IP/transferencia Western. Las reducciones notables en niveles de pFLT3 y pSTAT5 se observaron tan pronto como 4 horas después de la dosis con ya sea una dosis sencilla (datos no mostrados) o múltiples dosis del compuesto 1 (figura 11), sin efectos en la proteína FLT3 o STAT5 total (figura 11). La fosforilación de FLT3 y STAT5 se redujo con relación a la línea base alcanzando una inhibición máxima de ~90% en 8 horas después de la dosis y permaneció suprimida durante 24 horas (~85% de inhibición). El Fosfo-FLT3 se volvió más cercano a los niveles de línea base, mientras que, pSTAT5 se inhibió aún (~60% de inhibición) 48 horas después de la dosis (figura 4). Las disminuciones en los niveles de pERK se observaron también, indicando el bloqueo de señalización de FLT3 corriente abajo (datos no mostrados).

Estudios de eficacia *in vivo*

Efectos de respuesta de dosis del compuesto 1 en tumores de MC4;11 y RS4;11 *in vivo*

- 25 Para confirmar si los efectos *in vitro* del compuesto 1 se correlacionan con la inhibición del crecimiento tumoral *in vivo*, la eficacia del compuesto 1 se examinó contra xenoinjertos de tumor MV4;11 o RS4;11 en ratones SCID-NOD. Los ratones se implantaron s.c. con células tumorales y los tratamientos del compuesto 1 se iniciaron cuando los tumores tuvieron 200-300  $\text{mm}^3$ . En estudios de eficacia de respuesta de dosis, el compuesto 1 se administró oralmente en un intervalo de dosis de 1 - 30 mg/kg/d para tumores MV4;11 y 10 - 150 mg/kg/d para tumores RS4;11.
- 30 El compuesto 1 fue altamente potente contra tumores MV4;11, revelando un buen efecto de respuesta de dosis con inhibición de crecimiento tumoral notable en dosis > 5 mg/kg/d (figura 12). Las dosis de 30 mg/kg/d inducidas por regresión tumoral (respuestas de tumor 9/10), las cuales consisten de respondedores parciales y completos (1CR, 8PR). La inhibición de crecimiento tumoral modesta se observó en 1 mg/kg/d (23%) después de 2 semanas de dosificación, y se identificó como la dosis estadísticamente efectiva mínima en este modelo ( $p < 0,01$  contra Vehículo). En ratones que padecen tumores RS4;11, el tratamiento con el compuesto 1 resultó en inhibición de crecimiento tumoral, sin embargo, no se observaron regresiones (figura 13). Los efectos de inhibición del compuesto 1 fueron más potentes contra tumores MV4;1 comparados a tumores RS4;11, definidos por las dosis efectivas mínimas respectivas en cada modelo (día 8; 100 mg/kg/d; 48% de TGI,  $p < 0,01$  contra tumores RS4;11 contra 1 mg/kg/d; 23% de TGI,  $p < 0,01$  contra tumores MV4;11).

- 40 Horarios de dosis alternas del compuesto 1 son igualmente potentes

- Los efectos de dosis intermitentes y cíclicas del compuesto 1 contra tumores de xenoinjerto MV4;11 se examinó también (figura 14). El compuesto 1 se administró oralmente en 30 mg/kg diariamente, cada tercer día (q.o.d.) o cíclicamente, 7 días de tratamiento seguidos por 7 días sin tratamiento por 2 ciclos (figura 14). Similar a dosificación diaria, los regímenes de dosis intermitentes produjeron regresiones tumorales notables dentro de días del tratamiento de fármaco (>94% de TGI). Todos los tres regímenes resultaron en actividad anti-tumor equivalente (día 29,  $p > 0,05$ ) y números de respuestas vistas con q.o.d. (6PR) y 7 días de tratamiento/7 días sin tratamiento (9PR) fueron similares a aquellos vistos con tratamiento diario (1CR, 9PR).

Compuesto 1 es efectivo contra tumores MV4;11 grandes

- 50 Los efectos del compuesto 1 en tumores V4;11 grandes de tamaños variables; 300, 500 ó 1000  $\text{mm}^3$  se investigó también. El tratamiento con el compuesto 1 (30 mg/kg/d) indujo regresión notable en todos los tumores MV4;1 lo cual fue independiente de los tamaños iniciales del tumor en el inicio del tratamiento (figura 15). Las regresiones

tumorales fueron evidentes dentro de 3-5 días del tratamiento de fármaco. Todos los tumores tratados respondieron (n=27), con 15% de respuestas completas y 70% de respuestas parciales. El 15% restante fueron respuestas menores o permanecieron estables. La dosificación se discontinuó después de 50 días. Ningún tumor volvió a crecer durante el tratamiento de 50 días, indicando que la resistencia contra el compuesto 1 no se desarrolló. La durabilidad de respuestas después de la discontinuación del tratamiento se examinó también. Una CR y aproximadamente 50% de PRS fueron durables durante 40 días después del cese de la dosificación del compuesto 1. Diez tumores que volvieron a crecer (a 600-2000 mm<sup>3</sup>) se volvieron a tratar con 30 mg/kg/d del compuesto 1 iniciando en el estudio 90 (40 días después del cese de la dosificación) y continuaron durante 60 días. Todos los tumores fueron sensibles al segundo ciclo del compuesto 1 (2 CR, 8 PR), indicando claramente una carencia de resistencia al tumor al compuesto 1 (figura 16).

#### Evaluación histológica de actividad biológica *in vivo*

Además del volumen tumoral y los puntos finales de modulación objetivo, las lecturas inmunohistoquímicas se utilizaron como indicadores de actividad de fármaco (figuras 17-19). Los efectos temporales de la administración del compuesto 1 (30 mg/kg/d) se investigaron en tumores MV4;11 después de 1 a 5 dosis (figura 17). La evaluación morfológica utilizando tinción H&E, reveló que los tumores tratados con vehículo consistieron de células tumorales MV4;11 con hiper celularidad marcada indicativa de hiperplasia mieloide (figura 17-a). Las células tumorales teñidas fuertemente con Ki67 indican una composición tumoral de células altamente proliferativas (figura 17-b). Durante 24 horas después de la dosificación, los tumores tratados con el compuesto 1 mostraron una reducción en células densamente empacadas y consistieron de áreas escasas de células apoptóticas/necróticas (día 1, figura 17-a contra f). Las áreas de apoptosis/necrosis fueron más pronunciadas después de 5 dosis con áreas notables de tumor no viable coincidente con tinción ki67 reducida (figura 17-g). La modulación objetivo se confirmó *in vivo* a partir de tinción inmunohistoquímica de pERK. Fosfo-ERK se disminuyó notablemente en tumores tratados con el compuesto 1 durante el periodo de dosificación de 5 días corroborando análisis Western de pERK en tumores (figura 17-c contra h). La apoptosis inducida por el compuesto 1, evidenciada de tinción de caspasa-3 activada incrementada (figura 17-d contra i) y PARP desdoblado (figura 17-e contra j) en tumores en el día 5 se comparó a controles tratados con vehículo. Efectos similares de celularidad disminuida así como pERK reducida fueron evidentes en tumores RS4;11 tratados con el compuesto 1 (30 mg/kg/d) (figura 18).

La histología de tumores que se definieron ya sea como respuestas parciales (figura 19-c,d) o completas (figura 19-e) se examinaron también. Los respondedores completos fueron desprovistos totalmente de células tumorales MV4;11, presentando sólo restos de necrosis y/o tejido conectivo (figura 19-e). En respuestas parciales, se observaron cavidades de células tumorales proliferantes Ki67 positivas en la periferia de los tumores (figura 19-a, c contra b, d).

#### Compuesto 1 prolonga el tiempo de supervivencia de ratones que llevan células de leucemia humana diseminada

La eficacia del compuesto 1 se probó en el modelo de leucemia MV4;1 en el cual las células se inocularon en la vena de la cola de ratones SCID-NOD irradiados (Figura 20). En este modelo, las células MV4;11 se diseminan a la médula ósea (BM), imitando patológicamente un patrón de enfermedad similar a leucemia humana. Los ratones se inyectaron con células MV4;11 en el día 1 y los tratamientos del compuesto 1 (20 mg/kg, diariamente ó 7 días de tratamiento/7 días sin tratamiento, n=10-12/grupo) se iniciaron en el día 23, después del injerto de células MV4;11 en BM. Los ratones control (tratados con vehículo) normalmente producen parálisis de extremidades posteriores como una consecuencia de células tumorales que se infiltraban en la BM, con un tiempo de supervivencia promedio (MST) de 51 días (figura 20). En estudios de supervivencia, el tratamiento diario con el compuesto 1 (día 23-100) retrasó notablemente el tiempo para el progreso de la enfermedad (MST = 134 días) comparado a controles tratados con vehículo (MST = 51 días) (p< 0,0001), demostrando una vida útil incrementada de 163% (ILS) (figura 20). Sorprendentemente, con el tratamiento del compuesto 1 diariamente, 4 ratones fueron supervivientes a largo plazo (MST > 160 días). El análisis histológico y la citometría de flujo se utilizaron para cuantificar el % de injerto de células MV4;11 en BM (figura 21). En el análisis de citometría de flujo, las células MV4;11 humanas se identificaron en BM de ratón con un anticuerpo anti-HLA-A,B,C humano el cual se enlaza a un epítipo en MHC I humano. En ratones tratados con vehículo, aproximadamente 2-19% de las células de BM aisladas totales consistieron de células MV4;11 injertadas (día 51, figura 21-a). Esto se corroboró también por inmunohistoquímica con un anticuerpo frente a mitocondria humana que tiñe células MV4;11 identificando las células humanas en la matriz de BM de ratón (figura 21-b,c). La dosis diaria del compuesto 1 (20 mg/kg) durante 25 días redujo notablemente la carga leucémica (< 1% células MV4;11 en BM) contra tratamiento de vehículo (figura 21-a contra d). En una forma interesante, los ratones supervivencias después del tratamiento del compuesto 1 no mostraron inmunohistoquímicamente evidencia de células tumorales (observado como una ausencia de células positivas mitocondriales anti-ser humano en el día 167) en la BM y se definieron como "antídotos" (figura 21-e,f). La dosificación cíclica del compuesto 1 (7 días de tratamiento/7 días sin tratamiento, 5 ciclos) también resultó en tiempos de supervivencia notablemente incrementados (MST = 118 días, 131% de ILS contra vehículo, p = 0,0001), pero no tan efectivo como el régimen diario (p = 0,007, figuras 20 y 21).

DISCUSIÓN

Las trayectorias de señalización de cinasa intracelular aberrante direccionadas implicadas en la proliferación de células tumorales pueden interrumpir los procesos celulares y causar la inhibición del crecimiento tumoral. Esto se ha ejemplificado por la aprobación de dos agentes direccionados de molécula pequeña imatinib (Gleevec) en CML (Bcr-Abl) y tumores de estroma gastrointestinal (c-KIT) y gefitinib (Irressa) en cáncer de pulmón de célula no pequeña desarrollado o metastático resistente (EGFR). Druker B.J. *Oncogene*, 21:8541-8546 (2002); Giaccone G. *Clin Res.* 10:4233S-4237S (2004). Ambos compuestos direccionan defectos moleculares específicos en células tumorales y este acierto ha conducido a investigar terapias direccionadas moleculares a otras cinasas oncogénicas, incluyendo FLT3 15, 20-23. Las mutaciones en el gen FLT3 son la alteración genética más común en AML, en donde casi 35% de pacientes alojan mutaciones de activación. Las mutaciones FLT3 han demostrado que confieren un pronóstico clínico pobre implicando así a FLT3 como un objetivo terapéutico en AML. Thiede C. *et al.*, *Blood*, 99:4326-4335 (2002); Schnittger S, *et al.*, *Blood*, 2002;100:59.66 (2002).

El compuesto 1 es un inhibidor de cinasa multi-objetivo con potencia nanomolar contra la clase III, IV y V de RTK implicadas en proliferación tumoral y angiogénesis. Los ensayos de cinasa bioquímicos demuestran que el compuesto 1 tiene actividad potente contra FLT3 (CI<sub>50</sub> de 1 nM). La actividad del compuesto 1 en dos líneas celulares leucémicas se caracterizó con estado de FLT3 contrastante, MV4;11 (FLT3 ITD) y RS4;11 (FLT3 WT). El compuesto 1 demostró que reduce la fosforilación de FLT3 en una manera dependiente de dosis, confirmando la actividad molecular en células. *In vitro*, el compuesto 1 bloqueó moléculas de señalización corriente abajo subsecuentes en trayectorias MAPK y STAT5 mitogénicas, ambos reguladores clave en trayectorias proliferativas celulares. De forma interesante, la actividad en la modulación objetivo de FLT3 fue más pronunciada en células MV4;11 que en RS4;11 como fueron los efectos del compuesto 1 en los ensayos de citotoxicidad/proliferación celular. Efectos diferenciales similares contra FLT3-ITD y FLT3 de tipo silvestre se han reportado para otros inhibidores de FLT3. Puede considerarse que las células FLT3 ITD MV4;11 tienen señales constitutivamente activas (Ras, STAT5) las cuales conducen a la proliferación celular, y difieren de células FLT3 WT (RS4;11) las cuales pueden sustentar crecimiento independiente de activación de FLT3 y/o pueden basarse en otras trayectorias oncogénicas. Minami Y. *et al.*, *Blood*, 102:2969-2975 (2003); Kiyoi H. *et al.*, *Oncogene*, 21:255-2563 (2002), Spiekermann K. *et al.*, *Clin Cancer Res.* 9:2140-2150 (2003).

Los resultados de estudios *in vivo* han demostrado que el compuesto 1 tiene potente actividad contra modelos de tumor sólido y BM diseminada de leucemia. La actividad molecular del compuesto 1 en modelos pre-clínicos se dirigió utilizando puntos finales de PD para estudiar el grado y la duración de modulación objetivo. El compuesto 1 demostró que desregula sustancialmente tanto pFLT3 como pERK en tumores MV4;11. La modulación objetivo (pFLT3) se observó durante 4 horas y se mantuvo en tumores hasta 24 horas después de una sola dosis o múltiples dosis del compuesto 1. Efectos biológicos fueron también evidentes a partir de la histopatología tumoral, en donde pERK disminuido, respuestas de proliferación y apoptosis en tumores se observaron dentro de 1-2 días de tratamiento con fármaco. En xenoinjertos de tumor sólido de MV4;11, las regresiones de tumor se remarcaron también dentro de los días del tratamiento con fármaco. Es posible que los efectos inhibidores potentes del compuesto 1 en el modelo de MV4;11 puedan originarse de la inhibición directa de FLT3 en combinación con la inhibición de otras RTGs. Los datos (RT-PCR, no mostrados) indican que las células MV4;11 expresan también VEGFR1, cKIT, PDGFR $\beta$ , FGFR1, CSF-1R 32, todas las RTK potencialmente inhibidas por el compuesto 1. El compuesto 1 tiene actividad de <10 contra cinasas VEGF1/2/3, y los datos demuestran claramente que el compuesto 1 puede inhibir niveles de VEGF autocrinos en cultivos de MV4;11 *in vitro*. La inhibición *in vivo*, autocrina o paracrina de VEGF o FGF secretada por células tumorales o células estromales tumorales (incluyendo células endoteliales) puede inhibir la proliferación y supervivencia de estas células. Ferrara N. *et al.*, *Nat Med.*, 9:669-676 (2003); Compagni A. *et al.*, *Cancer Res.* 60:7163-7169 (2000); Carmeliet P. *Nat. Med.*, 9:653-660 (2003). La actividad adicional del compuesto 1 en tumores sólidos puede originarse de sus efectos potentes contra PDGFR $\beta$  impactando el reclutamiento y la maduración de pericitos de vasos sanguíneos durante la angiogénesis. Carmeliet P. *Nat Med.* 9:653-660 (2003); Ostman A. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 15:275-286 (2004). En el modelo de AML BM, se demostró que el compuesto 1 mejoró la supervivencia de ratones y en algunos ratones se erradicó la enfermedad. Esto representa el potencial del compuesto 1 para erradicar blastos circulantes y enfermedad de BM por efectos anti-proliferativos directos o regulación de angiogénesis de médula ósea, lo cual puede jugar un papel en la supervivencia de los blastos. Carow C. E. *et al.*, *Blood*, 87:1089-1096 (1996); Drexler H. G. *Leucemia*, 10:568-599 (1996).

Con base en la farmacología y la inhibición objetivo del compuesto 1, se estudiaron horarios de dosis intermitente y cíclica del compuesto 1. Los horarios de dosificación alterna del compuesto 1 demostraron actividad similar comparada a dosis diaria del compuesto 1, sugiriendo el potencial para regímenes de dosificación flexible en el consultorio. Múltiples dosis del compuesto 1 fueron capaces de suprimir continuamente el crecimiento de tumores y cualesquiera tumores recurrentes después del cese de tratamiento se encontró que eran igualmente sensibles a re-tratamiento con fármaco. Estos hallazgos son relevantes si se traducen en el ambiente clínico, ya que algunos pacientes con AML han demostrado regresión en el tratamiento con inhibidores de cinasa a pesar del tratamiento continuo. Fiedler W. *et al.*, *Blood*, (2004); Cools J. *et al.*, *Cancer Res.* 64:6385-6389 (2004). Múltiples mecanismos incluyendo flujo externo celular o metabolismo (a través de expresión de transportadores de fármaco tales como P-

glicoproteína) o mutaciones en los dominios de enlace de ATP de los sitios activos de enzima que interfieren con enlace de fármaco han demostrado que se correlacionan con resistencia a inhibidores de cinasa. Bragintseva K. *et al.*, *Blood*, 103:2266-2274 (2004); Grundler R. *et al.*, *Blood*, 102:646-651 (2003). El compuesto 1 no es un sustrato de P-GP, y las respuestas durables en todo el curso del tratamiento con fármaco pueden implicar que el desarrollo de resistencia puede evitarse con el compuesto 1.

El desarrollo clínico de inhibidores de FLT3 (SU11248 PKC412, CEP-701, MLN518) para AML está aún en fases tempranas. O'Farrell A.M. *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 9:5465-5476 (2003); Fiedler W. *et al.*, *Blood*, (2004); Stone R.M. *et al.*, *Ann Hematol.* 83 Suppl 1:S89-90 (2004); Smith B.D. *et al.*, *Blood*, 103:3669-3676 (2004); DeAngelo D.J. *et al.*, *Blood*, 102:65a (2003). La selección de terapias de agente sencillo no ha producido aún respuestas notables, y el desarrollo clínico futuro de inhibidores FLT3 en AML pueden depender de la combinación de estos agentes con cualesquiera fármacos citotóxicos u otros agentes objetivo moleculares. Los datos reportados aquí para el compuesto 1, un inhibidor de FLT3 potente con actividad adicional en RTK mostró que juega papeles en la patogénesis de AML garantiza su evaluación clínica.

### ACTIVIDAD CONTRA CÁNCERES RESISTENTES A FÁRMACOS EN PACIENTES

Los compuestos de las fórmulas I, II y III, tales como 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona (compuesto 1), tienen actividad directa contra células tumorales y la formación y mantenimiento de vasos sanguíneos que suministran a tumores. Estos compuestos han demostrado también actividad oral en una variedad de modelos animal de tumor por angiogénesis y metástasis. Como se muestra en la figura 22, el compuesto 1 inhibe la selectividad de clase III, IV y V de RTK (véase también la tabla con valores  $CI_{50}$ ). La administración del compuesto 1 a ratones desnudos que tienen xenoinjertos de tumor de colon humano KM12L4A establecido, grande proporcionan regresión y/o estabilización de enfermedad en 90-100% de animales tratados (Véase la figura 23).

Se realizaron estudios de etiqueta abierta de centro múltiple de aumento de dosis de fase I para evaluar la seguridad, farmacocinética y farmacodinámica del compuesto 1 en sujetos con tumores malignos sólidos desarrollados. Además, objetivos primarios de los estudios incluyen: 1) determinar la dosis tolerada máxima (MTD); 2) identificar la toxicidad limitante de dosis (DLT); y 3) evaluar la seguridad en un sujeto con tumores sólidos desarrollados. Objetivos secundarios del estudio incluyen: 1) evaluar la farmacocinética; 2) evaluar la farmacodinámica en plasma, linfocitos sanguíneos periféricos, orina y células tumorales; 3) recomendar dosis y horario para investigaciones futuras; y 4) determinar evidencia de actividad anti-tumor (RCEIST).

Detalles con respecto a este estudio se establecen posteriormente

Regímenes de dosificación incluyen:

- dosificación diaria sencilla 7 días de tratamiento/7 días sin tratamiento, repetidas (dosis 25-100 mg).

- Dosis  $\geq 100$  mg un ciclo de 7 días de tratamiento/7 días sin tratamiento, seguidos por dosificación diaria continua más adelante.

Incremento de dosis:

- 3-4 pacientes por grupo, duplicación de dosis hasta > toxicidad de grado 2; luego esquema de Fibonacci modificado.

Criterios de inclusión:

• Tumores sólidos histológica o mitológicamente documentados, resistentes a terapia estándar o para lo cual no existe terapia estándar curativa.

• Edad >18 horas

• Estado de rendimiento de ECOG 0 - 1

• Hemoglobina  $\geq 8,0$  g/dl; neutrófilos  $\geq 1,500/mm^3$ ; plaquetas  $\geq 75.000/mm^3$

• Creatinina  $\leq 1,5$  x límite superior de normal (ULN); bilirrubina  $\leq 1,5$  x ULN; fosfatasa alcalina  $\leq 5$  x ULN; asparato aminotransferasa (AST)  $\leq 2,5xULN$  (excepto implicación de hígado  $\leq 5x$  ULN); Amilasa  $\leq ULN$

• Consentimiento informado firmado

- Dosis final de terapia antineoplásica (excepto para terapia hormonal) > 21 días.

Criterios de exclusión:

- Edema intracraneal, metástasis intracraneal o enfermedad epidural.
  - Enfermedad cardíaca clínicamente notable (NYHA clase III o IV); arritmia pre-existente; insuficiencia cardíaca congestiva; cardiomiopatía; intervalo QTc >450 msegundos (machos) y >470 msegundos (hembras) o >G2 LVEF (por MUGA o ecocardiograma)
  - Diabetes mellitus (requiriendo medicación crónica) con signos de enfermedad vascular periférica clínicamente notable
  - Pericarditis previa: Efusión pleural clínicamente notable en los 12 meses previos o ascitis recurrentes requiriendo >2 intervenciones/mes.
  - Síndrome de malabsorción o toxicidad de GI no controlada (>náusea G2, diarrea, vómito). Pancreatitis aguda o crónica de cualquier etiología.
  - Obstrucción biliar intra- o extra-hepática anterior dentro de 12 meses previos o historia de obstrucción maligna requiriendo un stent biliar, a menos que se trate establemente sin obstrucción anterior o bloqueo del stent.
- Definición de DLT/MTD:
- Neutropenia G4 <5 días de neutropenia febril; trombocitopenia G4
  - Fatiga G4 o un declive de dos puntos en estado de rendimiento de ECOG
  - G3 o náusea mayor y/o vómito a pesar del uso de intervención médica adecuada/máxima y/o profilaxis.
  - G3 o toxicidad no hematológica mayor (excepto fatiga)
- G2 o toxicidad cardíaca mayor de importancia clínica (por ejemplo, un declive en EF en reposo a 40% ≤50% o fracción de acortamiento a 15% ≤24%; troponina cardíaca T/I ≥ 0,05 ng/MI

MTD: nivel de dosis debajo de la cual >2/6 pacientes experimentan DLT

Características del paciente:

Características del paciente

25	No. de Sujetos (22 de abril del 2005):	25	
	Edad promedio (rango):	57 (30-72)	
	Género:	Macho	14
		Hembra	11
	ECOG PS:	0	12
30		1	7
	Regímenes de quimioterapia anterior (No.)	0-3	8
		4-6	4
		>6	2
	Tipos de Tumor	Próstata	5

	Renal 3
	GIST 2
	Sarcoma 2
	Colorectal 1
5	Mama 1
	Paratiroides 1
	Gástrico 2
	Melanoma 2
	Esofágico2
10	NET (Sinonasal) 1
	Colon 1
	Ovario 1
	Hígado 1

Niveles de Dosis:

Nivel de Dosis	No. de pacientes	DTL (ocurriendo en el ciclo 1)
25 mg	3	0
50 mg	4	0
75 mg	4	0
10 mg(7 activo/7 desactivo)	4	0
100 mg (continuo)	6	1 (hipertensión G3)
125 mg (continuo)*	4	0

15 \*enrolamiento en curso

Eventos adversos clínicos relacionados con fármacos mayores que o iguales a G2:

AE	25	50	75	100	100 Cont.	Total
Fatiga	3	1	1		1	5
Anemia	3(2 G3)	1				4(2 G3)
N & V/Diarrea	1(1 G3)	2(2 G3)	2	2		7(3 G3)

(continuación)

Cefalea	3(1 G3)	1	4(1 G3)
Anorexia	2		2
LVEF reducido	1	1	2
<i>Hipertensión**</i>		2(1 G3)	2(1 G3)

\*\*DLT

5 La evidencia de actividad antitumor del compuesto 1 se ha observado como 7/22 (32%) de pacientes tuvieron enfermedad estable (SD) en su primera evaluación. Además, la SD por más de 4 meses se ha reportado en 4  
10 pacientes, incluyendo un paciente con un tumor de glándula parótida (mayor de 7 meses) y un pacientes GIST resistente a Gleevec (más de 6 meses). La figura 24 es una imagen de PET-CT barrida del paciente con GIST resistente a Gleevec el cual muestra una disminución notable en la incorporación durante el tratamiento con el compuesto 1, comparado a la terapia libre sugiriendo un efecto de tratamiento del compuesto 1. Información adicional con respecto a este paciente y el protocolo de tratamiento se establece a continuación:

Paciente femenino, con un diagnóstico de tumor estromal gastrointestinal (GIST). El paciente había sido previamente tratado como sigue:

	Fármaco	Dosis	Comentarios
	Gleevec	Dosis diaria total entre 200 a 800 mg	
15	BAY43-9006	400 mg dos veces al día	enfermedad progresiva
	brostalicina	18 mg una vez al día	
	Gleevec	100 mg en días alternos	resistente a los fármacos
	brostalicina	12.8 mg una vez al día	

20 El paciente se reclutó en el estudio de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión del protocolo el 2 de junio del 2004, como se establece anteriormente.

Registro de tratamiento del compuesto 1:

Dosis	Frecuencia	Horario
75 mg	una vez al día	7 días de tratamiento/7 días sin tratamiento
100 mg	una vez al día	7 días de tratamiento/7 días sin tratamiento

25 El paciente recibió una dosis total de 9,625 mg (véase la tabla adjunta). El paciente logró enfermedad estable (SD) mientras estaba en tratamiento con el compuesto 1 (ocho ciclos completos)

Como se muestra en la figura 25, la exposición en plasma aumenta proporcionalmente con la dosis del compuesto 1 en pacientes. La exposición en plasma en el grupo de 100 mg de dosis se aproxima al intervalo en donde se ha observado la eficacia preclínica.

30 Se llevaron a cabo estudios para identificar un marcador farmacodinámico (PD) para la actividad biológica del compuesto 1 utilizando leucocitos sanguíneos periféricos (PDL) como un tejido de reemplazo en pacientes con tumor sólido en donde existe acceso limitado a tejido objetivo.

Desarrollo racional y de ensayo:

- La fosforilación de ERK es un efecto corriente abajo bien caracterizado de la activación de RTK y el compuesto 1 modula la fosforilación EKR en células endoteliales y tumorales.

- Para determinar si el compuesto 1 afecta a la activación de ERK en PBL, se trató sangre de donantes normales *ex vivo* con el compuesto 1. Ninguna estimulación exógena con PMA o PHA se añadió.

5 • La inhibición dependiente de la dosis en pERK endógena se observó por transferencia Western y ensayos de citometría de flujo después de la incubación de PBL con el compuesto 1 (Véase la figura 26), sugiriendo que este ensayo puede ser útil en pruebas clínicas para mostrar que el compuesto 1 está modulando sus objetivos.

10 Se probó el compuesto 1 contra un panel de cinasas, incluyendo una forma mutante de ABL (T315I) que se ha encontrado que es resistente a Gleevec y otros inhibidores de cinasa. Véase Shah, N.P. *Science*, 305, p. 399 (2004); y LaRosse, *Cancer Res.* 67, p. 7149-7153 (2002). El residuo T315 en ABL se conoce como el “residuo guardabarrera” y se ubica en una cavidad hidrofóbica en la estructura de ABL. Este residuo, así como posiciones análogas de este residuo en otras cinasas tales como, pero sin limitarse a Flt-3, KIT, PDGFRa, EGFR y similares, se encuentran frecuentemente en pacientes que han sustituido a ciertos inhibidores de cinasa, tales como pacientes que se han vuelto resistentes a ciertos agentes quimioterapéuticos tales como Gleevec, Iressa, Tarceva y otros. De este modo, existe una necesidad médica de estrategias de tratamiento alternativo para estos pacientes que se han vuelto resistentes a estos fármacos. Se ha encontrado que el compuesto 1 inhibe el mutante T315I de ABL con un valor de  $CI_{50}$  de 0,0185 micromolar como se compara a >10 micromolar para Gleevec y 0,371 micromolar para SU11248. ABL es una tirosina cinasa citoplásmica. Por lo tanto, los compuestos de la invención tienen la capacidad para inhibir cinasas mutantes incluyendo tirosina cinasas receptoras y tirosina cinasas citoplásmicas. Los compuestos de la fórmula I, II y III pueden utilizarse en pacientes con esta mutación en ABL, ya sea como un tratamiento alternativo, o como un tratamiento simultáneo con otros fármacos anti-cáncer. El compuesto 1 se ha probado también contra una forma mutante de FLT3 (D835Y). Este residuo se muta frecuentemente en pacientes con tumores malignos hematológicos. Véase Yamamoto, Y. *Blood*, 97, 2434 (2001). De este modo, los compuestos de la fórmula I, II y III tales como el compuesto 1 pueden también utilizarse para tratar pacientes con esta mutación. La mutación del residuo guardabarrera en EGFR se ha reportado recientemente en pacientes con cáncer de pulmón tratados con gefitinib (Iressa). Véase Pao W., *PLoS Med.*2(3):e73 (2005). El compuesto 1 se prueba contra otras cinasas con mutaciones en el “residuo guardabarrera”. El compuesto 1 es útil para tratar pacientes con cáncer con estas mutaciones. La siguiente tabla muestra valores de  $CI_{50}$  del compuesto 1 comparados con Gleevec y SU11248.

Cinasa	Nota	Valores de $CI_{50}$ (micromolar)		
		Compuesto 1	Gleevec	SU11248
Abl T315I	ABL mutante	0,0184	> 10	0,371
Alk		3,7	> 10	0,603
Aurora_A		0,162	5,24	0,287
Blk		0,036	0,475	0,203
CamKII_alfa		4,54	> 10	2,89
Cdk7_cyclinH_MAT1		0,622	6,3	0,0343
Ck1_delta		6,05	5,48	0,0497
Ck1_gamma_2		> 10	> 10	4,51
Ck2		> 10	0,488	> 10
cRaf		> 10	4,18	> 10

(continuación)

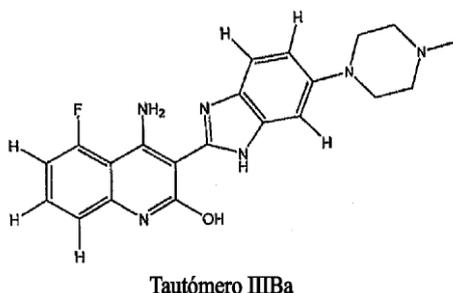
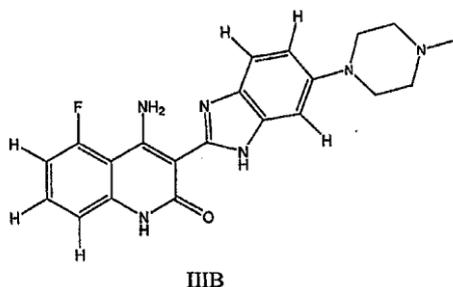
Erk1		> 10	> 10	> 10
Flt3_D835Y		<0,001000000	<0,001000000	<0,001000000
Hck		0,259	1,8	1,17
Hyl		9	> 10	> 10
JNK_alfa_2		> 10	> 10	> 10
MLCK		3,63	> 10	0,304
PAK2		> 10	> 10	> 10
PAK4		7,94	> 10	9,25
PHKG2		8,11	> 10	0,535
Pim1		> 10		> 10
PKC_theta		> 10	> 10	> 10
PKCe		> 10	> 10	> 10
Ron		> 10	> 10	> 10
ROS		> 10	> 10	> 10
Syk		5,47	> 10	> 10
TAK1		0,0359	> 10	0,0373
TRKC		0,00923	0,227	0,14
TSSK1		0,982	> 10	0,401
ZAP70		> 10	> 10	> 10
CABL_CR/1//CI50 (µM)	ABL wt	0,652	0,428	2,95
FLT3_CR/1//CIO50 (µm)		0,000085	1,26	0,000219
Abl_T315I	ABL mutante	0,0184	> 10	0,371

5 El ensayo para determinar la  $CI_{50}$  de ABL (T315I) se logró utilizando el siguiente procedimiento. En un volumen de reacción final de 25 µl, ABL (T315I) (h) (5-10 mU) se incubó con 8 mM de MOPS pH 7,0, 0,2 mM de EDTA, 50 µM de EAIYAAPFAKKK (SEQ ID NO. 7), 10 mM de acetato de Mg y ATP etiquetado con  $^{33}P$  gamma (actividad específica de aproximadamente 500 cpm/pmoles, concentración como se requiera). La reacción se inicia mediante la adición de la mezcla de MgATP. Después de la incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, la reacción se detiene por la adición de 5 µl de una solución de ácido fosfórico al 3%. 10 µl de la reacción se tiñen entonces sobre  
10 una estera de filtro P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en 7 mM de ácido fosfórico y una vez en metanol antes del secado y el recuento por centelleo.

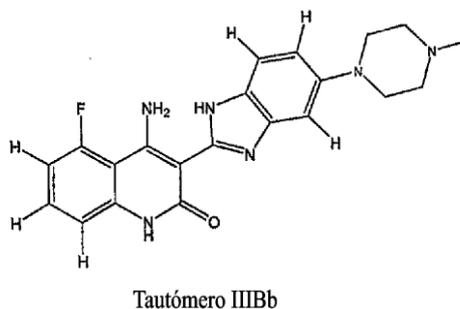
Otros compuestos de la fórmula I tales como compuestos de la fórmula II y la fórmula III se prepararon como se

describió anteriormente y en las referencias citadas en el presente documento. Estudios que utilizan estos compuestos se llevan a cabo utilizando la metodología descrita anteriormente para 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona. Estos estudios mostraron que estos compuestos son también útiles para tratar cáncer, incluyendo cáncer resistente a los fármacos, en ratones, seres humanos y otros mamíferos y pueden utilizarse en combinación con los fármacos anti-cáncer descritos en el presente documento.

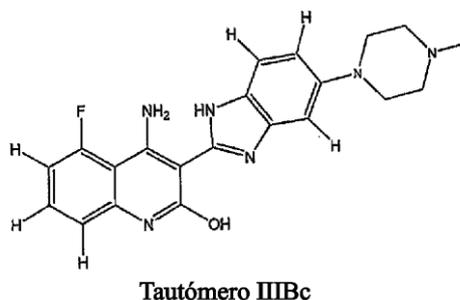
Se debe entender que los compuestos orgánicos de acuerdo con la invención pueden presentar el fenómeno de tautomerismo. Ya que las estructuras químicas dentro de esta memoria descriptiva pueden representar solamente una de las posibles formas tautoméricas a la vez, se debe entender que la invención abarca cualquier forma tautomérica de la estructura dibujada. Por ejemplo, el compuesto que tiene la fórmula IIIB se muestra a continuación con otro tautómero, tautómero IIIBa:



Otros tautómeros del compuesto que tienen la fórmula IIIB, tautómero IIIBb y tautómero IIIBc, se muestran a continuación:



15



Se entiende que la invención no se limita a las modalidades establecidas en el presente documento para ilustración, sino que abarca todas las formas de la misma que están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

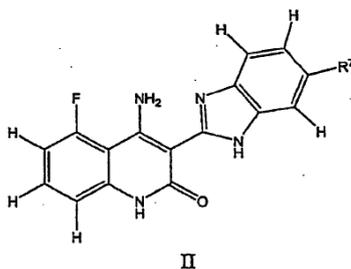
## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula II, un tautómero del compuesto, una sal del compuesto, una sal del tautómero, una mezcla del mismo o una composición farmacéutica que comprende el compuesto, el tautómero, la sal del compuesto, la sal del tautómero o la mezcla

5 para su uso en el tratamiento de cáncer resistente a los fármacos, en el que el cáncer resistente a los fármacos es resistente a mesilato de imatinib (Gleevec), BAY43-9006, brostalicina, erlotinib (Tarceva), gefitinib (Iressa) o vatalanib (PTK-787), o

para su uso en el tratamiento de cáncer resistente a los fármacos inhibiendo una cinasa seleccionada de ABL (T315I) o FLT3 (D835Y) en un paciente con cáncer resistente a los fármacos,

10 en el que el compuesto de fórmula II tiene la siguiente fórmula:



en la que R<sup>7</sup> es un grupo heterociclilo sustituido o no sustituido seleccionado de un grupo piperidinilo sustituido o no sustituido, grupo piperazinilo o grupo morfolinilo.

15 2. Un compuesto de fórmula II tal como se define en la reivindicación 1, un tautómero del compuesto, una sal del compuesto, una sal del tautómero, una mezcla de los mismos, o una composición farmacéutica del compuesto, el tautómero, la sal del compuesto, la sal del tautómero, o la mezcla

para su uso en el tratamiento de cáncer resistente a los fármacos, en el que el cáncer resistente a los fármacos es resistente a mesilato de imatinib (Gleevec), BAY43-9006, brostalicina, erlotinib (Tarceva), gefitinib (Iressa) o vatalanib (PTK-787), o

20 para su uso en el tratamiento de cáncer resistente a los fármacos inhibiendo una cinasa seleccionada de ABL (T315I) o FLT3 (D835Y) en un paciente con cáncer resistente a los fármacos,

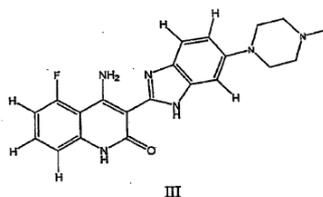
en el que el compuesto se administra conjuntamente con un fármaco anti-cáncer seleccionado de mesilato de imatinib (Gleevec), BAY43-9006, brostalicina, lenalidomida (Revlimid), talidomida (Thalomid), docetaxel (Taxotere), erlotinib (Tarceva), vatalanib (PTK-787), VEGF-trap, fenretidina, bortezomib, bevacizumab (Avastin), pertuzumab, y/o rituximab.

25 3. Uso de un compuesto de fórmula II tal como se define en la reivindicación 1, un tautómero del compuesto, una sal del compuesto, una sal del tautómero, o una mezcla de los mismos para la preparación de un medicamento para tratar cáncer resistente a los fármacos, en el que el cáncer resistente a los fármacos es resistente a mesilato de imatinib (Gleevec), BAY43-9006, brostalicina, erlotinib (Tarceva), gefitinib (Iressa) o vatalanib (PTK-787), o para tratar cáncer resistente a los fármacos inhibiendo una cinasa seleccionada de ABL (T315I) o FLT3 (D835Y) en un paciente con cáncer resistente a los fármacos.

30 4. Uso de un compuesto de fórmula II tal como se define en la reivindicación 1, un tautómero del compuesto, una sal del compuesto, una sal del tautómero, o una mezcla de los mismos para la preparación de un medicamento para tratar cáncer resistente a los fármacos, en el que el cáncer resistente a los fármacos es resistente a mesilato de imatinib (Gleevec), BAY43-9006, brostalicina, erlotinib (Tarceva), gefitinib (Iressa) o vatalanib (PTK-787), o para tratar cáncer resistente a los fármacos inhibiendo una cinasa seleccionada de ABL (T315I) o FLT3 (D835Y) en un paciente con cáncer resistente a los fármacos, en el que el compuesto se administra conjuntamente con un fármaco anti-cáncer seleccionado de mesilato de imatinib (Gleevec), BAY43-9006, brostalicina, lenalidomida (Revlimid), talidomida (Thalomid), docetaxel (Taxotere), erlotinib (Tarceva), vatalanib (PTK-787), VEGF-trap, fenretidina, bortezomib, bevacizumab (Avastin), pertuzumab, y/o rituximab.

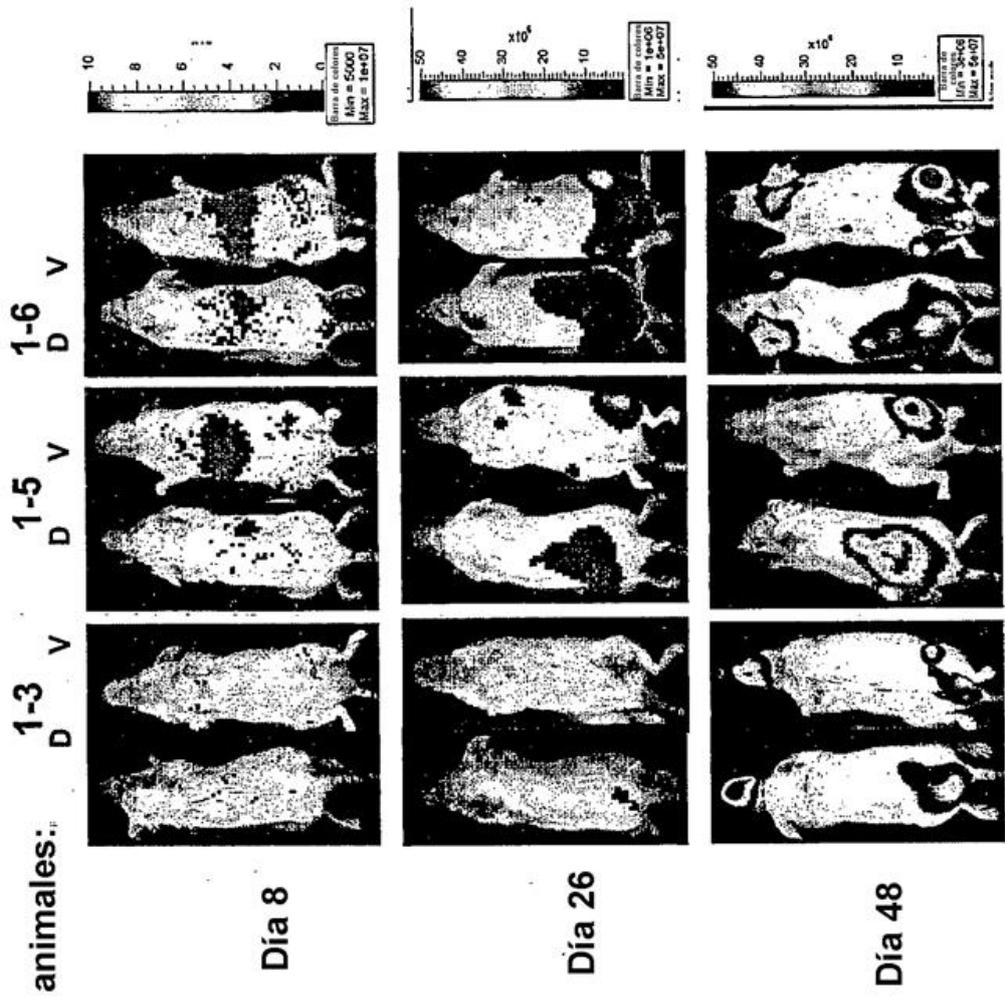
40 5. Una composición terapéutica, que comprende: un fármaco anti-cáncer y un compuesto de fórmula II, un tautómero del compuesto, una sal del compuesto, una sal del tautómero, o una mezcla de los mismos como una

- 5 preparación combinada para uso simultáneo, separado, o secuencial en el tratamiento de cáncer resistente a los fármacos en el que el cáncer resistente a los fármacos es resistente a mesilato de imatinib (Gleevec), BAY43-9006, brostalicina, erlotinib (Tarceva), gefitinib (Iressa) o vatalanib (PTK-787), o para su uso en el tratamiento de cáncer resistente a los fármacos inhibiendo una cinasa seleccionada de ABL (T315I) o FLT3 (D835Y) en un paciente con cáncer resistente a los fármacos.
6. La composición terapéutica de la reivindicación 5 para su uso de la reivindicación 5, en la que el fármaco anti-cáncer y el compuesto, el tautómero, la sal del compuesto, la sal del tautómero o la mezcla se proporcionan como una composición individual o separada como partes de un equipo.
- 10 7. La composición terapéutica de la reivindicación 5 para su uso de la reivindicación 5, en la que el fármaco anti-cáncer es mesilato de imatinib (Gleevec), BAY43-9006 o brostalicina.
8. El compuesto o la composición farmacéutica de la reivindicación 1 ó 2 para el uso de la reivindicación 1 ó 2, el uso de la reivindicación 3 ó 4 o la composición terapéutica de las reivindicaciones 5, 6 ó 7 para el uso de las reivindicaciones 5, 6 ó 7 en el que  $R^7$  es un grupo N-alquil piperazinilo sustituido o no sustituido.
- 15 9. El compuesto, la composición farmacéutica, el uso o la composición terapéutica de la reivindicación 8 para el uso de la reivindicación 8, en el que el grupo alquilo del N-alquil piperazinilo comprende de 1 a 4 átomos de carbono.
10. El compuesto o la composición farmacéutica de la reivindicación 1 ó 2 para el uso de la reivindicación 1 ó 2, el uso de la reivindicación 3 ó 4 o la composición terapéutica de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que el compuesto de fórmula II es un compuesto de fórmula III:



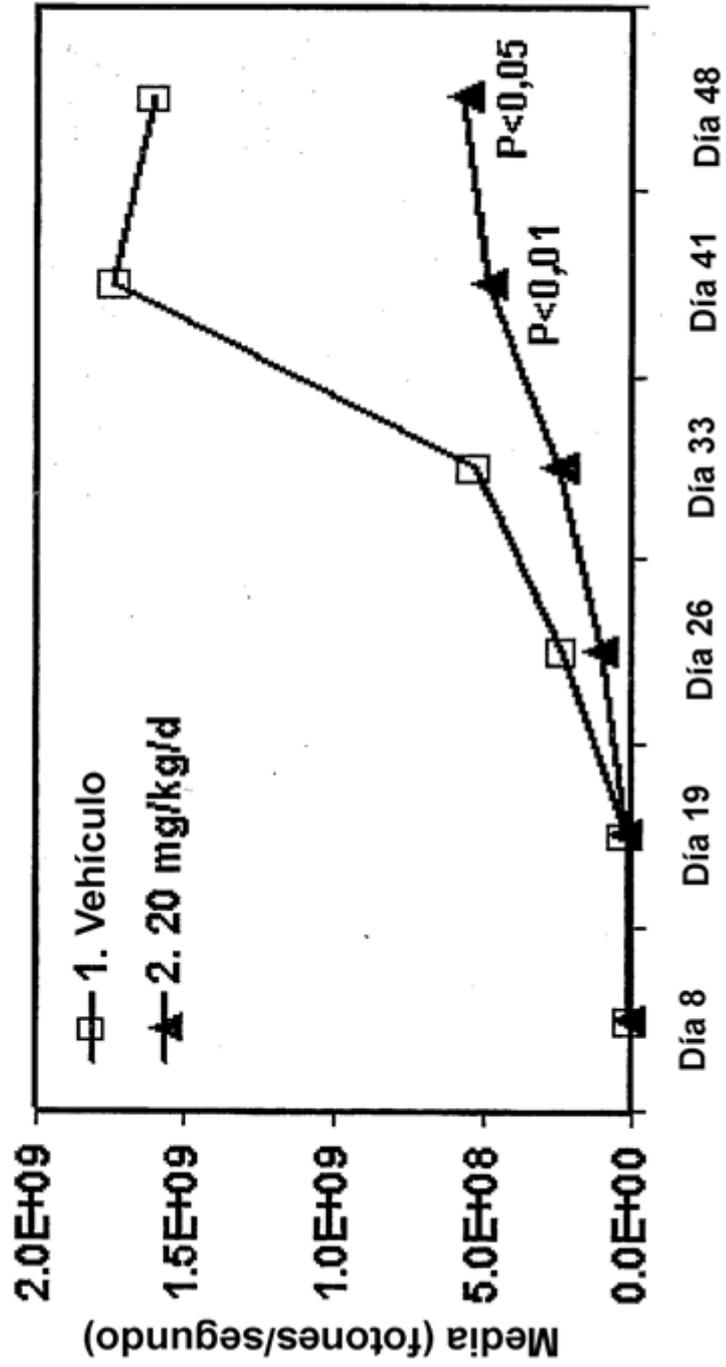
- 20 11. El compuesto o la composición farmacéutica de la reivindicación 1 ó 2 para el uso de la reivindicación 1 ó 2, el uso de la reivindicación 3 ó 4 o la composición terapéutica de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que la sal es una sal de ácido láctico.
- 25 12. El compuesto o la composición farmacéutica de la reivindicación 1 ó 2 para el uso de la reivindicación 1 ó 2, el uso de la reivindicación 3 ó 4 o la composición terapéutica de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que el cáncer es resistente a mesilato de imatinib (Gleevec), BAY43-9006 o brostalicina.
- 30 13. El compuesto o la composición farmacéutica de la reivindicación 2 para el uso de la reivindicación 2 o el uso de la reivindicación 4, en el que el compuesto, el tautómero, la sal del compuesto, la sal del tautómero, la mezcla, o la composición farmacéutica se administra después de que se haya administrado el fármaco anti-cáncer, antes de que se haya administrado el fármaco anti-cáncer o al mismo tiempo de que se hayan administrado algunos de los fármacos anti-cáncer.
- 35 14. El compuesto o la composición farmacéutica de la reivindicación 1 ó 2 para el uso de la reivindicación 1 ó 2, el uso de la reivindicación 3 ó 4 o la composición terapéutica de la reivindicación 5 para su uso de la reivindicación 5, en el que el cáncer resistente a los fármacos se selecciona de tumor estromal gastrointestinal, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple, carcinoma de célula renal, cáncer de pulmón de células no pequeñas o síndrome hipereosinofílico (HIS).
- 40 15. El compuesto o la composición farmacéutica de la reivindicación 1 ó 2 para el uso de la reivindicación 1 ó 2, el uso de la reivindicación 3 ó 4 o la composición terapéutica de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que el cáncer resistente a los fármacos es tumor estromal gastrointestinal.
- 45 16. El compuesto o la composición farmacéutica de la reivindicación 1 ó 2 para el uso de la reivindicación 1 ó 2, el uso de la reivindicación 3 ó 4 o la composición terapéutica de la reivindicación 5 para su uso de la reivindicación 5, en el que el cáncer resistente a los fármacos es uno seleccionado de cáncer de próstata, cáncer renal, tumor estromal gastrointestinal, sarcoma, cáncer colorectal, cáncer del seno, cáncer de la parótida, cáncer gástrico, melanoma, cáncer del esófago, NET cáncer (sinonasal), cáncer de colon, cáncer de ovario, o cáncer del hígado.

**FIGURA 1**

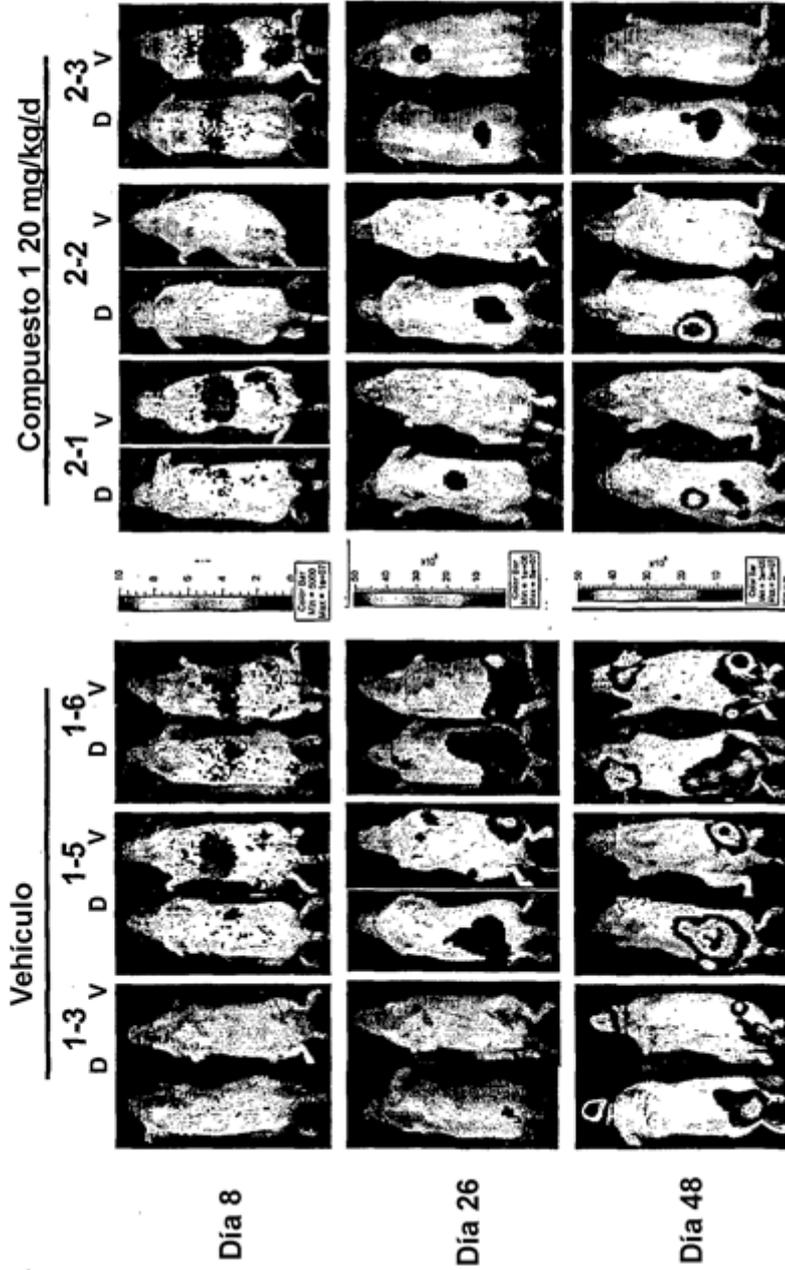


**FIGURA 2**

El tratamiento con compuesto 1 demostró una cantidad de cuenta de fotón media significativamente más baja en comparación con el tratamiento con vehículo



**FIGURA 3**  
Monitoreo de tiempo real del crecimiento de MM KMS-11-luc in vivo en ratones SCID-beige tratados con vehículo o compuesto 1 (20 mg/kg p.o. diariamente)



### FIGURA 4

El compuesto 1 demostró beneficio de supervivencia aumentada frente al modelo de MM KMS-11-luc i.v.

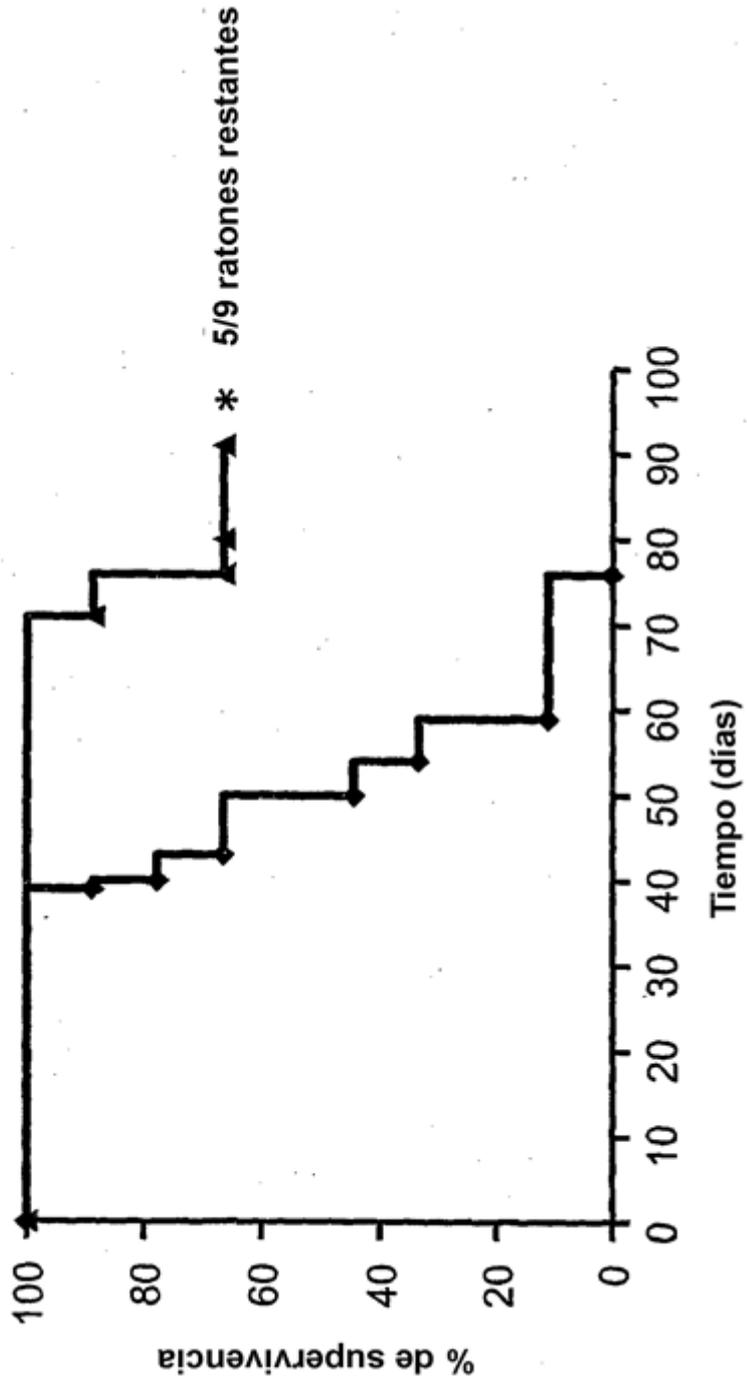
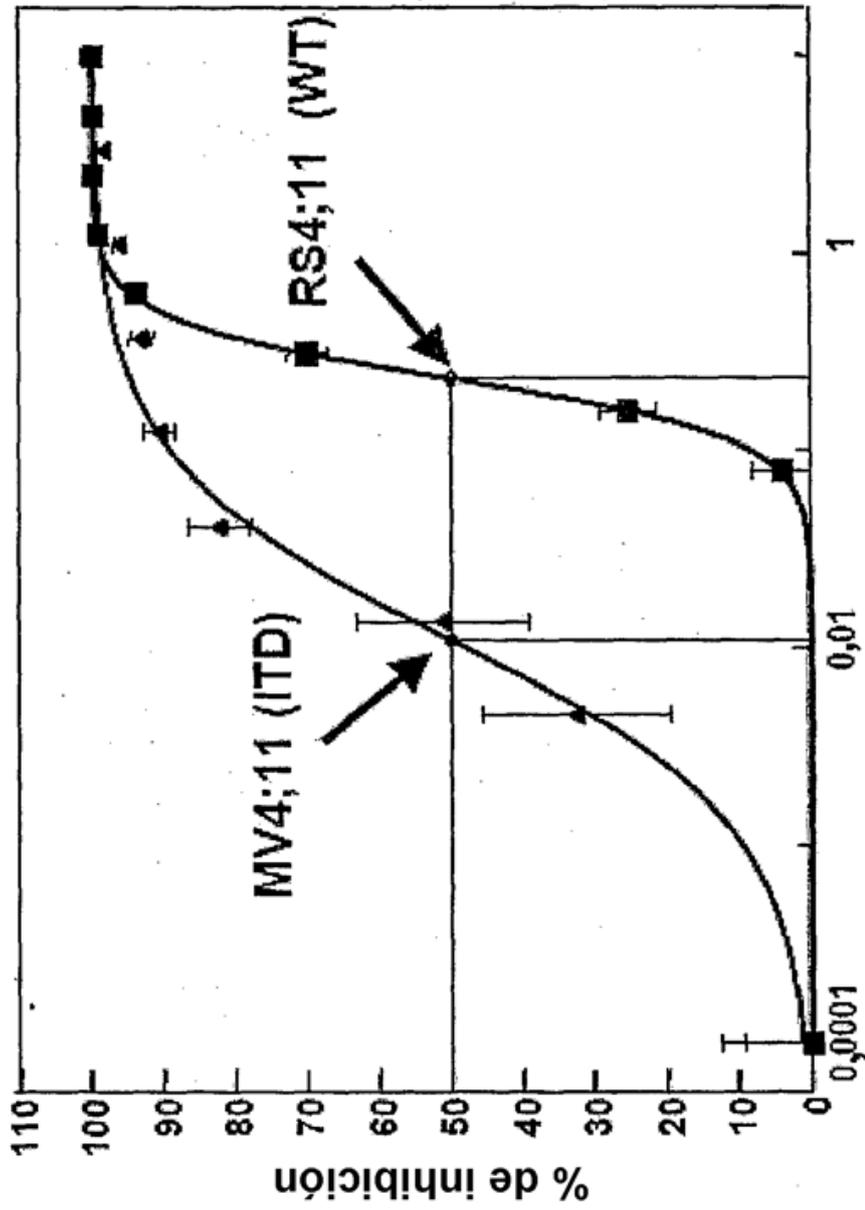


FIGURA 5



Concentración de compuesto 1 (μM)

MV4;11: CE<sub>50</sub> = 13 nM

RS4;11: CE<sub>50</sub> = 315 nM

FIGURA 6

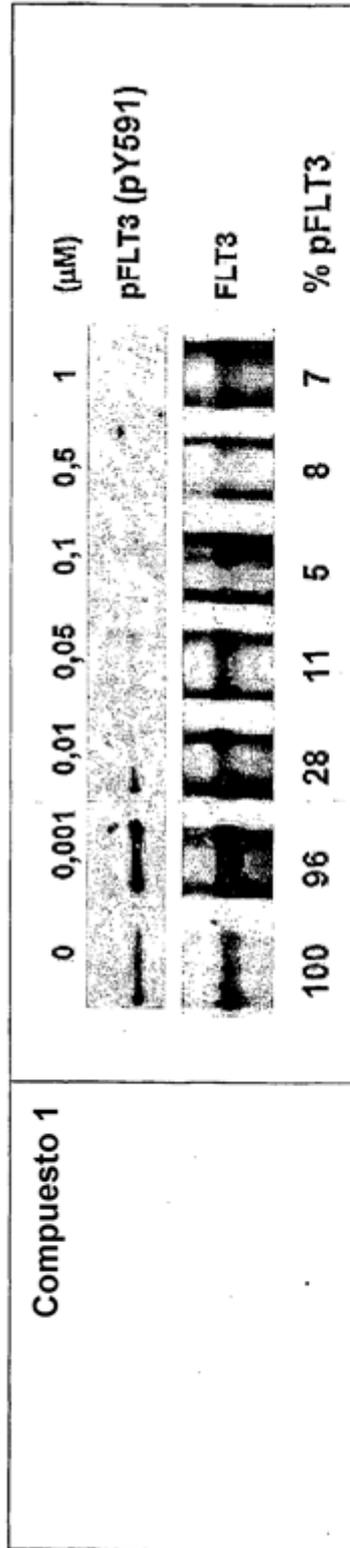


FIGURA 7

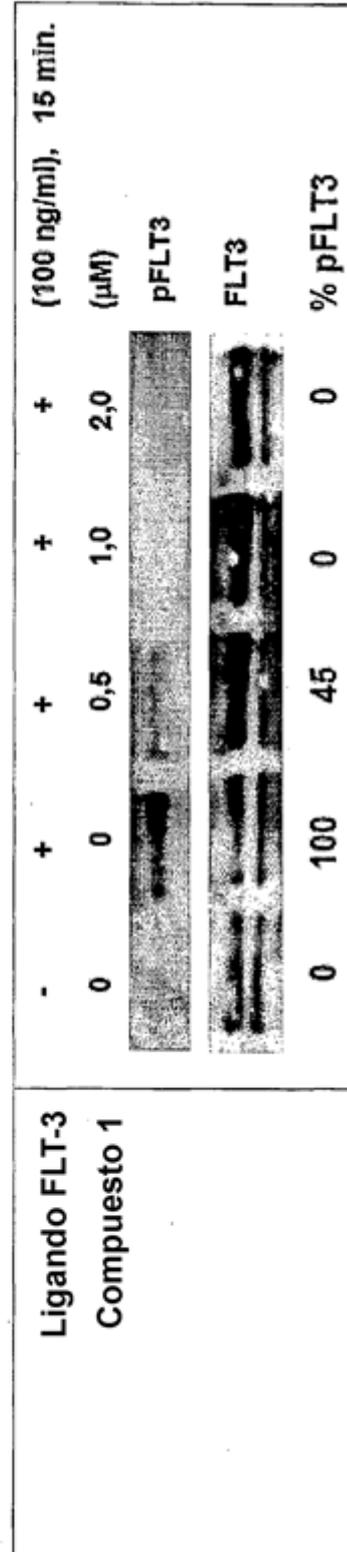


FIGURA 8

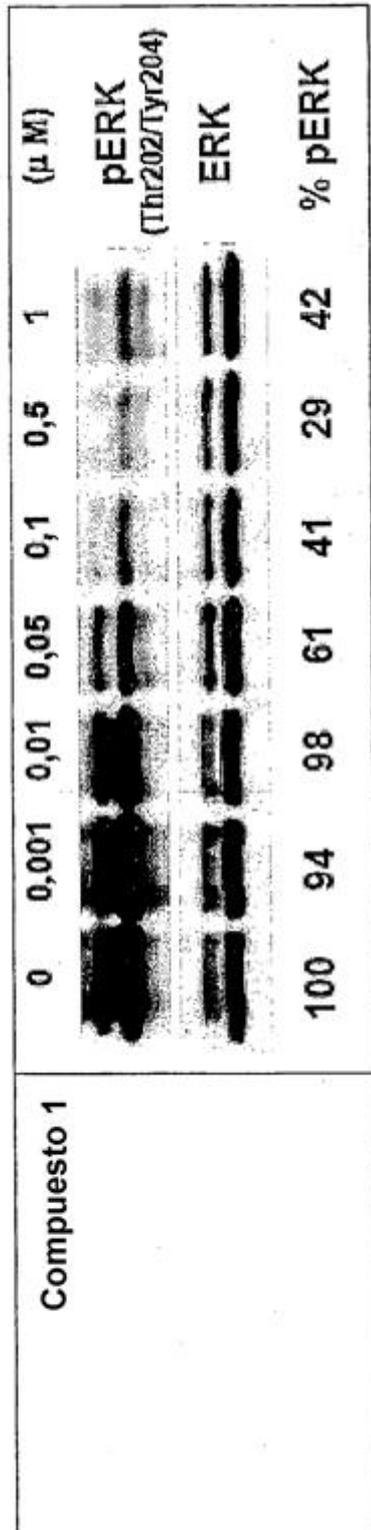


FIGURA 9

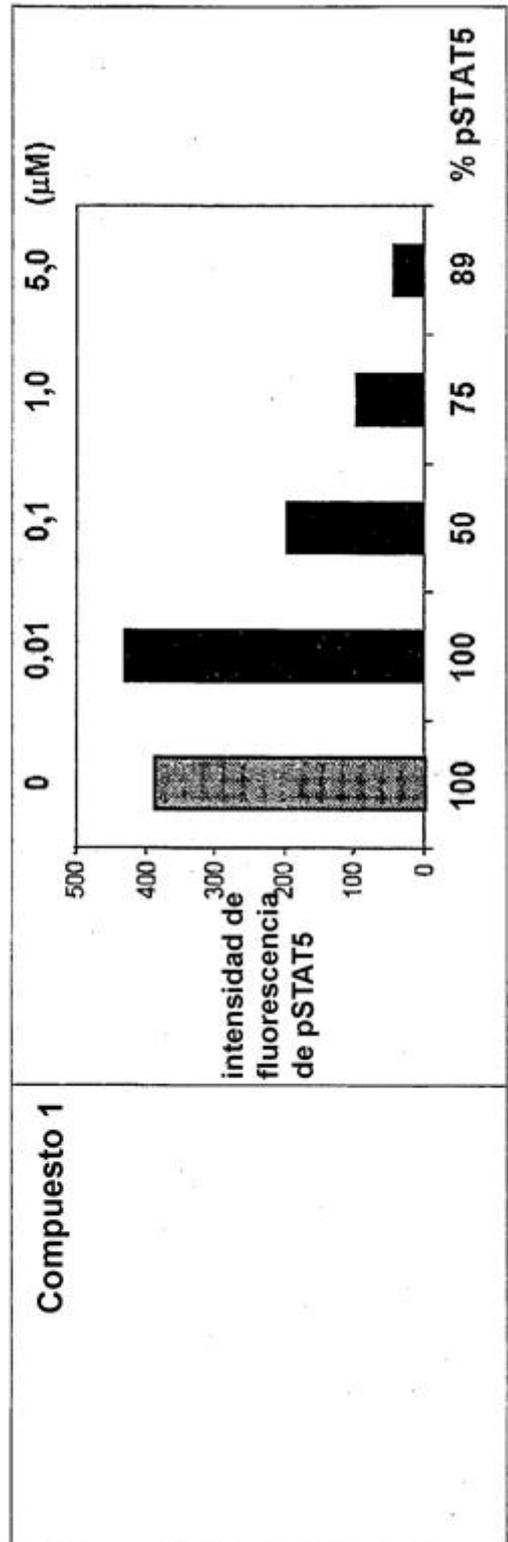


FIGURA 10

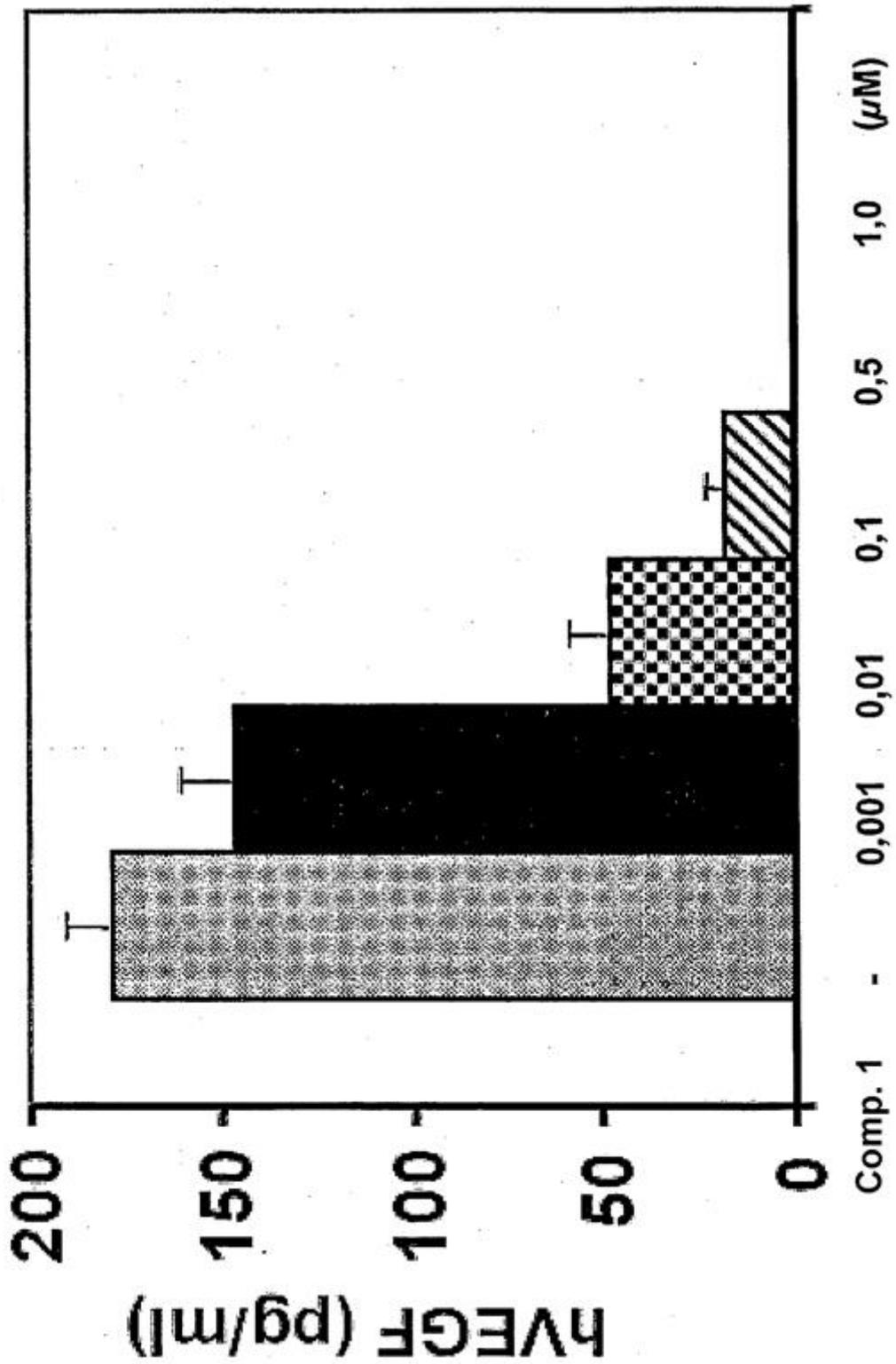


FIGURA 11

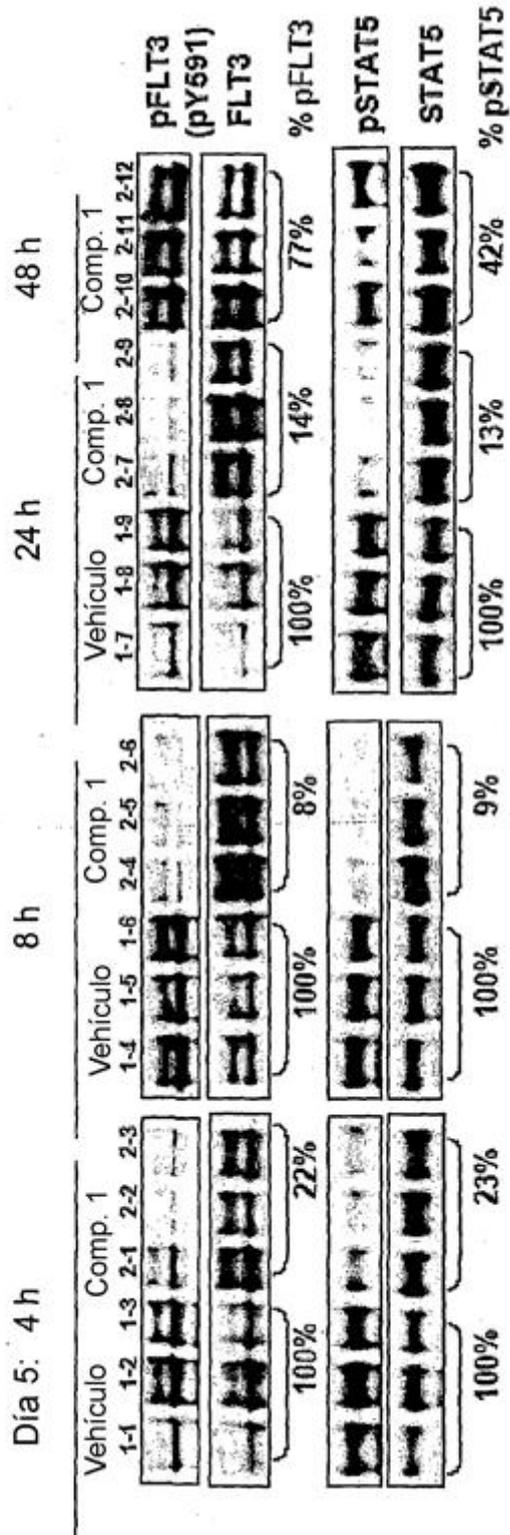


FIGURA 12

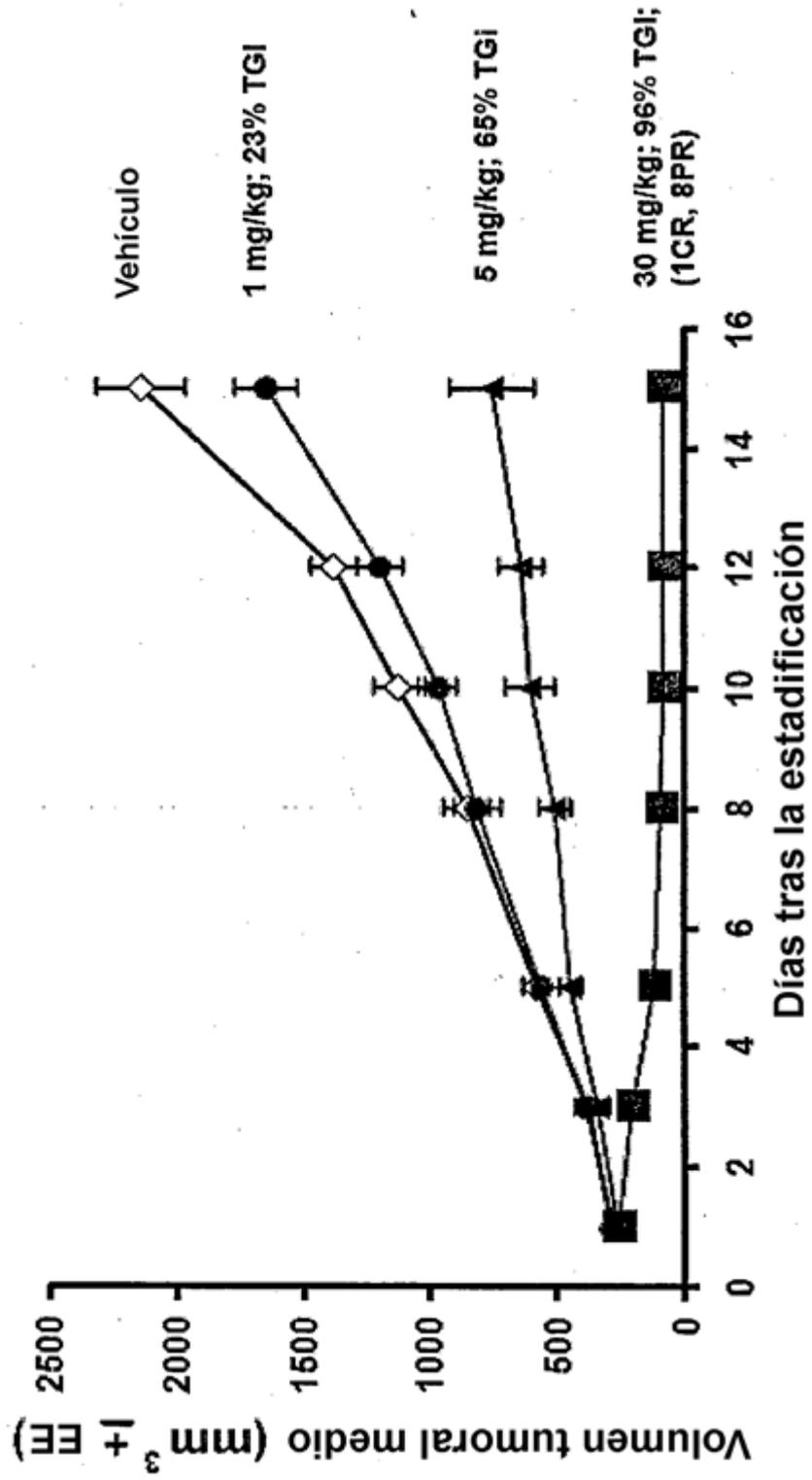
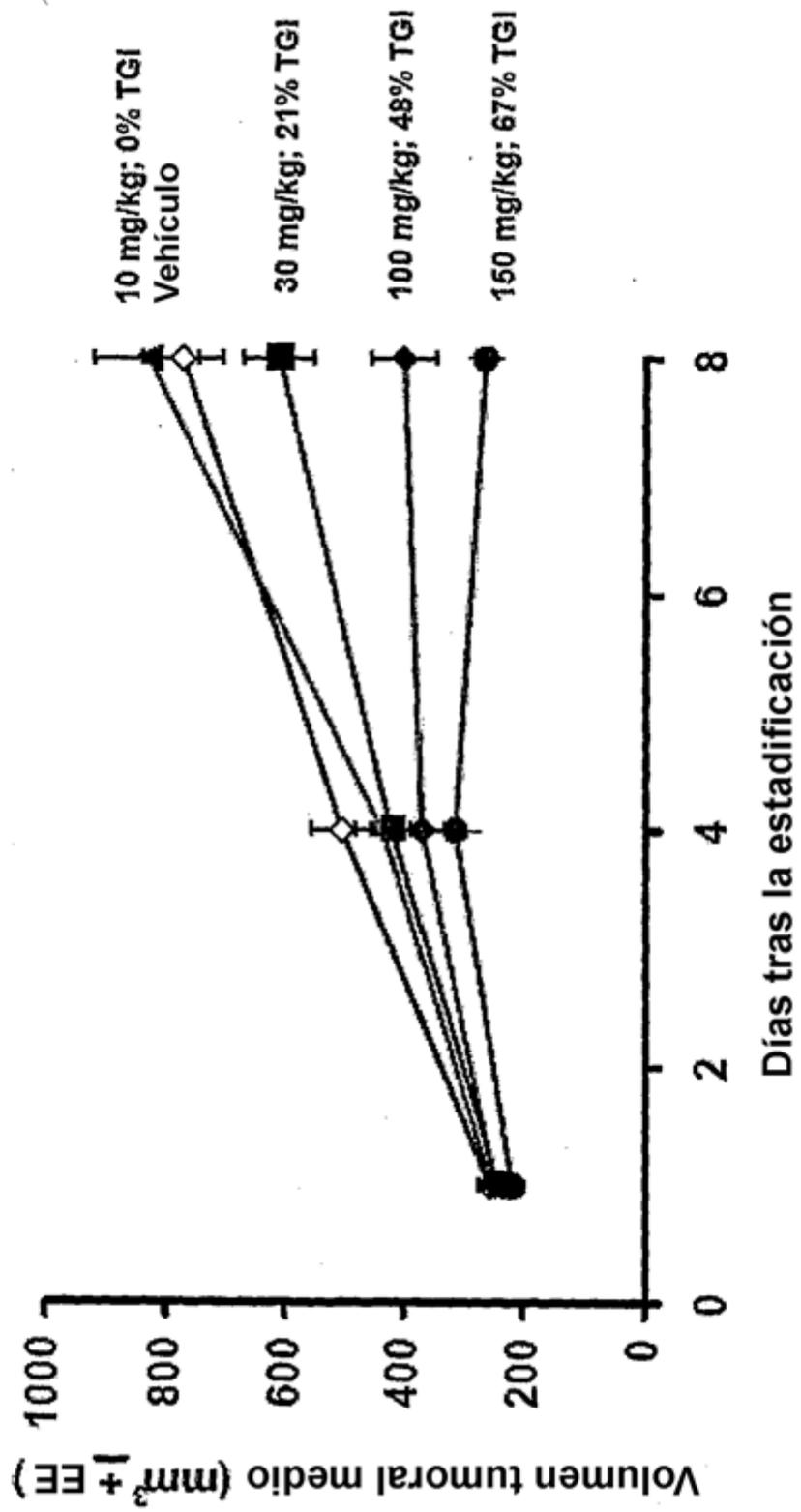


FIGURA 13



**FIGURA 14**

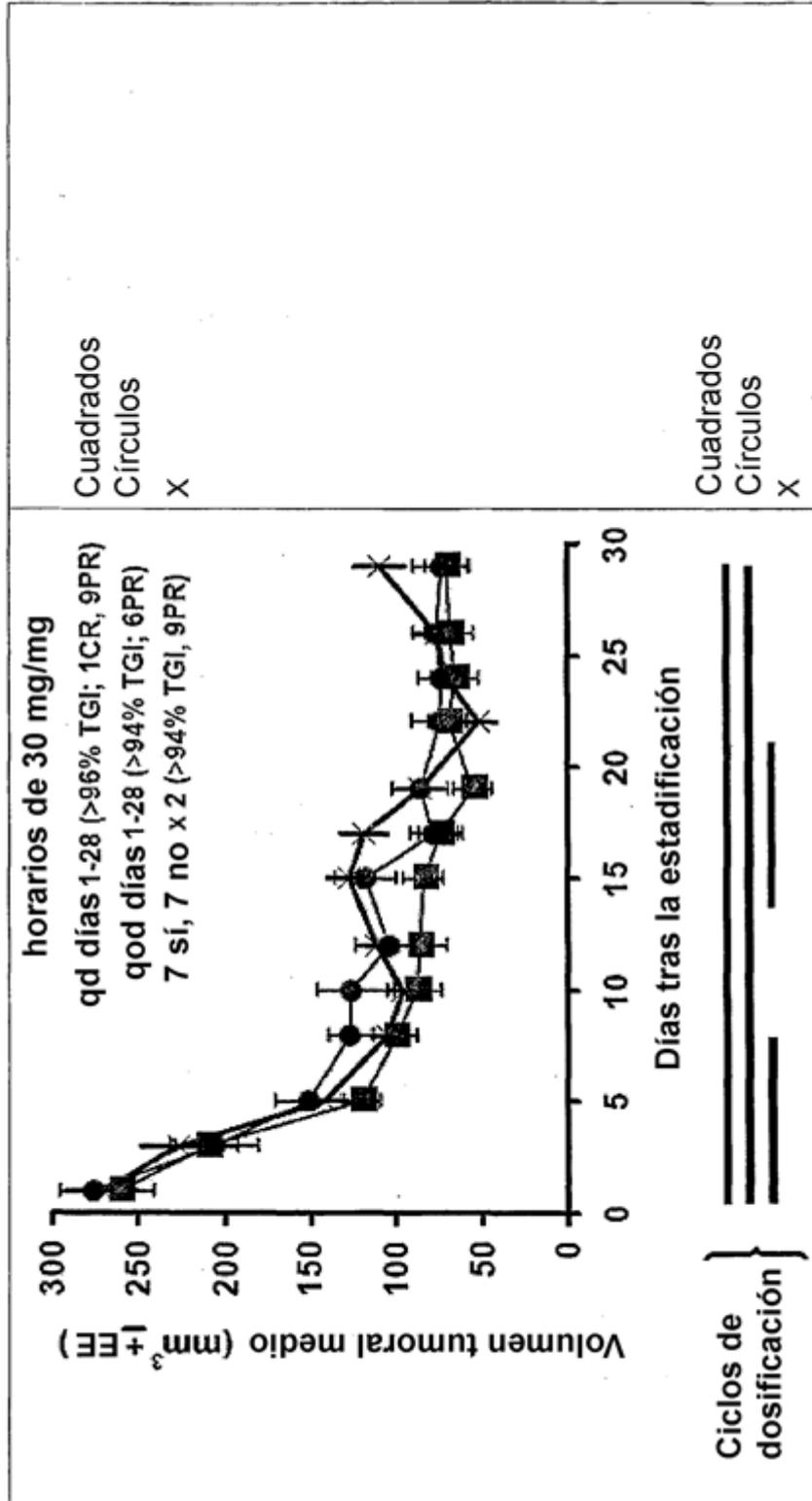
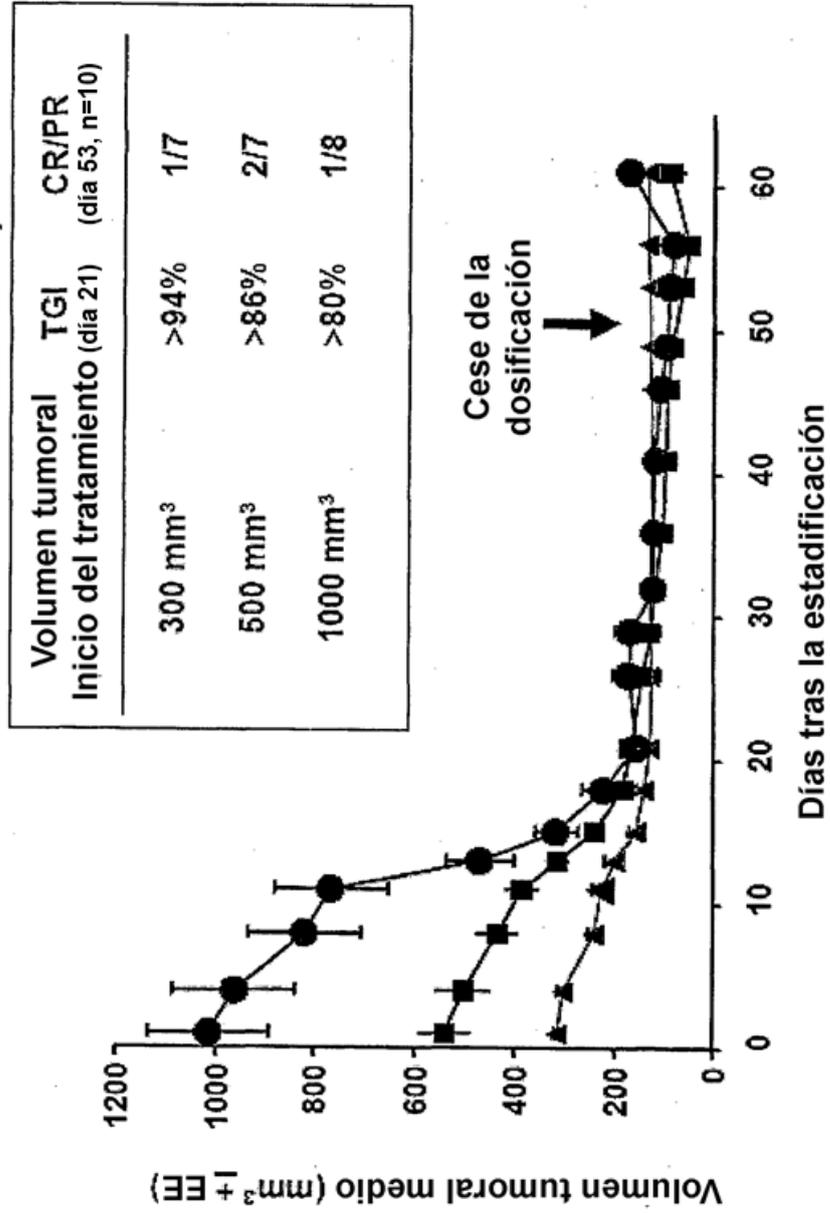


FIGURA 15



**FIGURA 16**

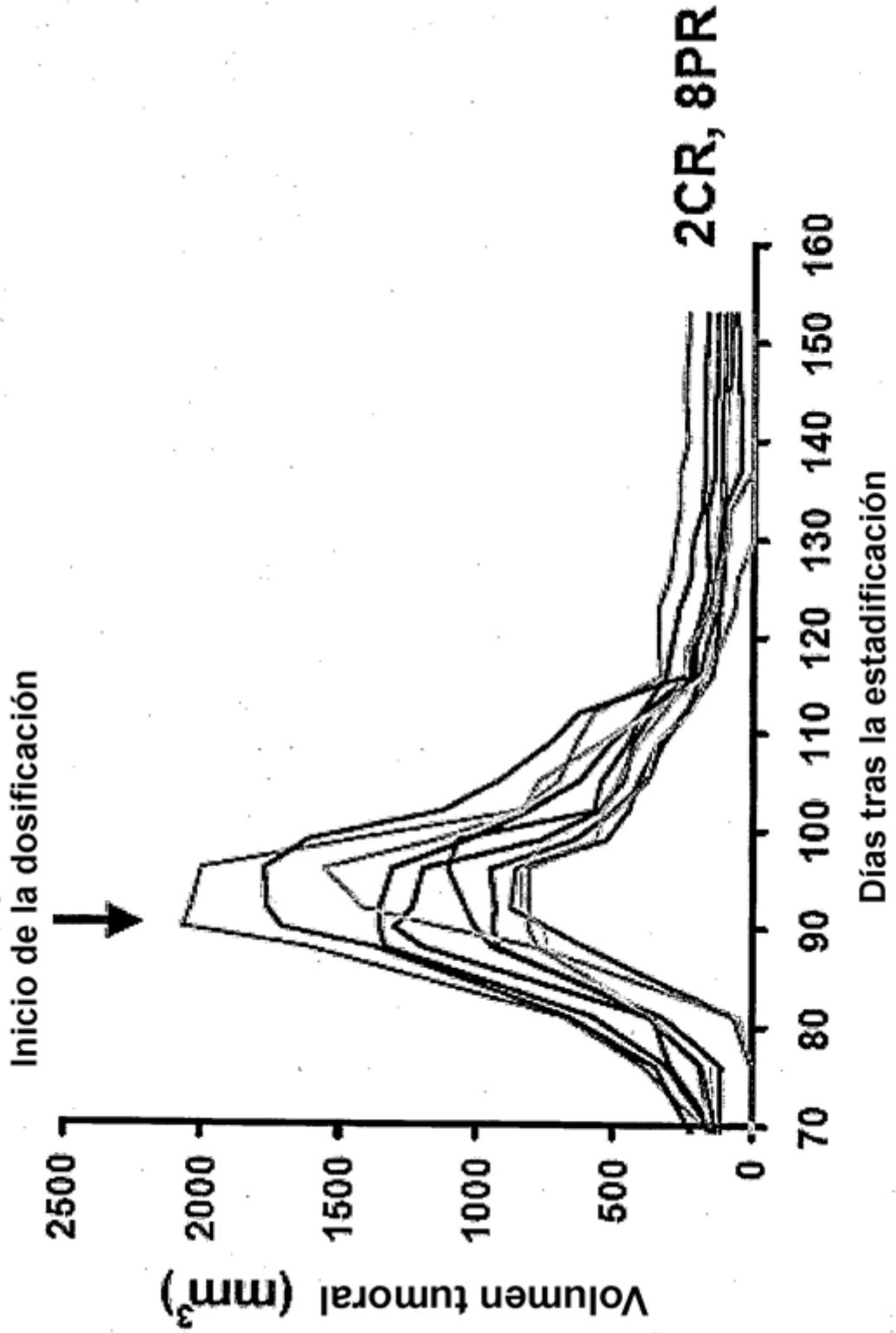


FIGURA 17

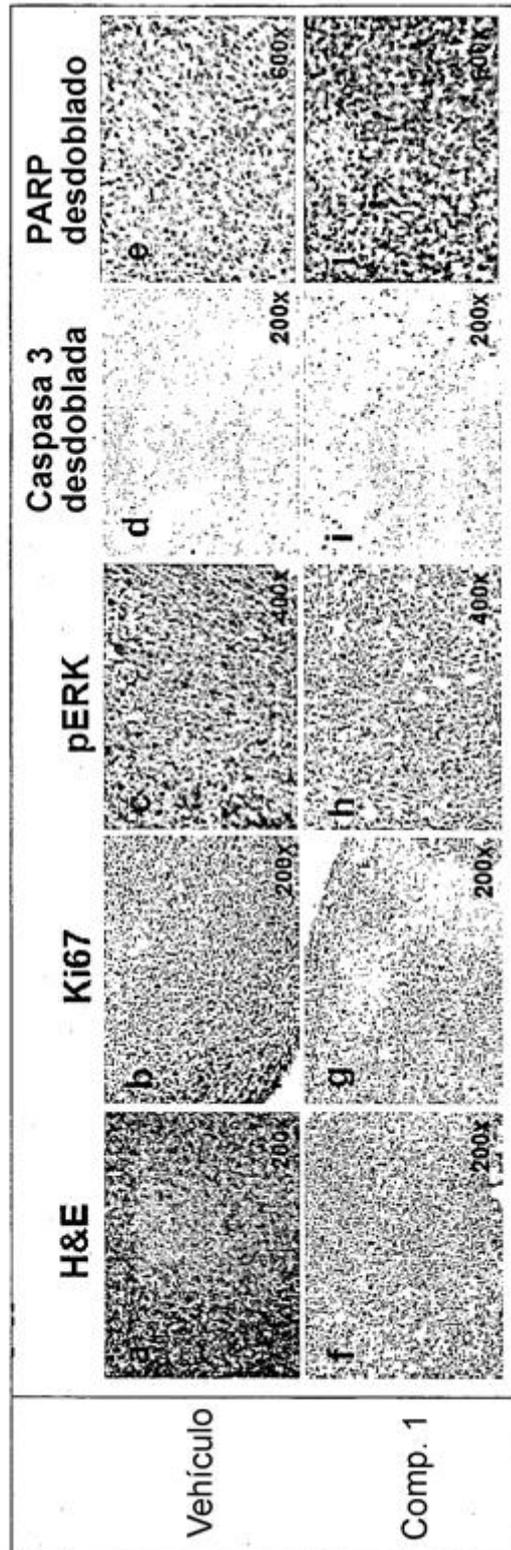


FIGURA 18

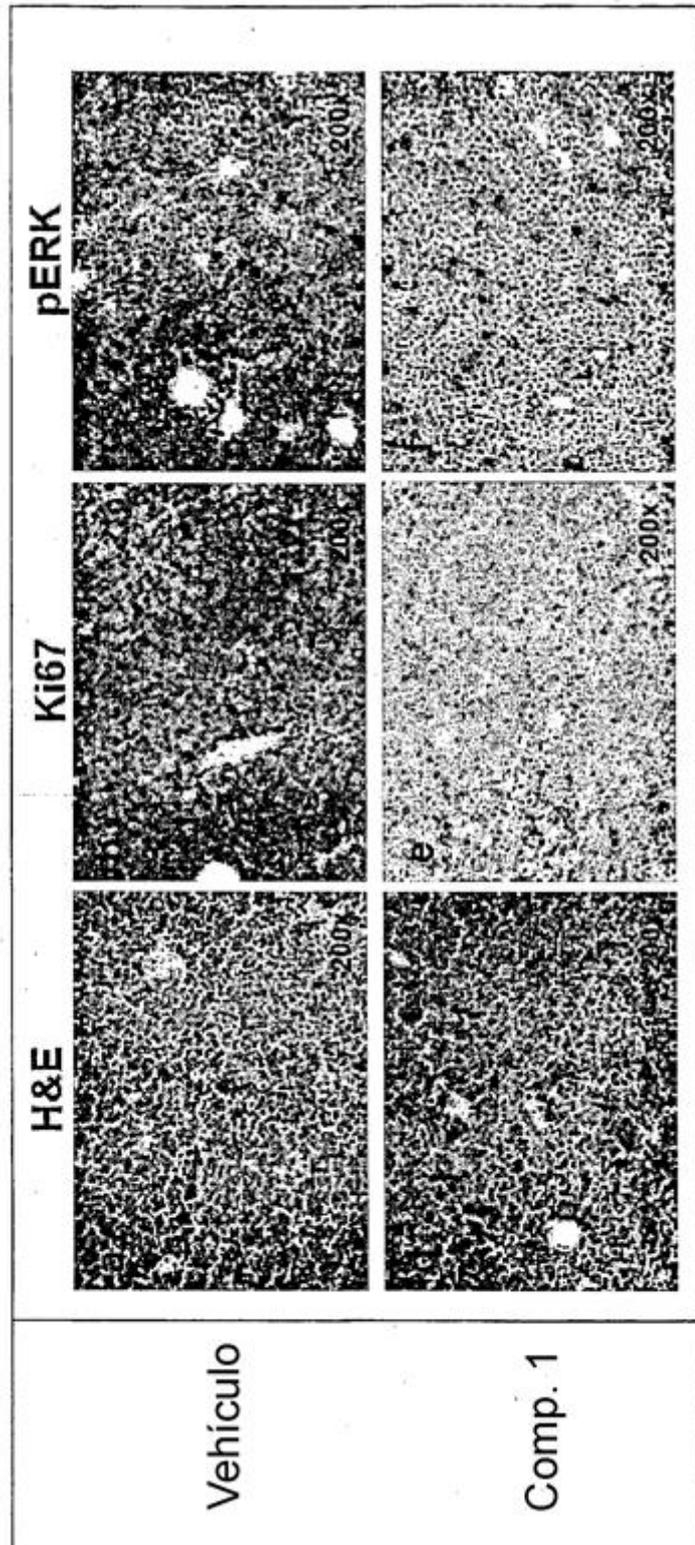


FIGURA 19

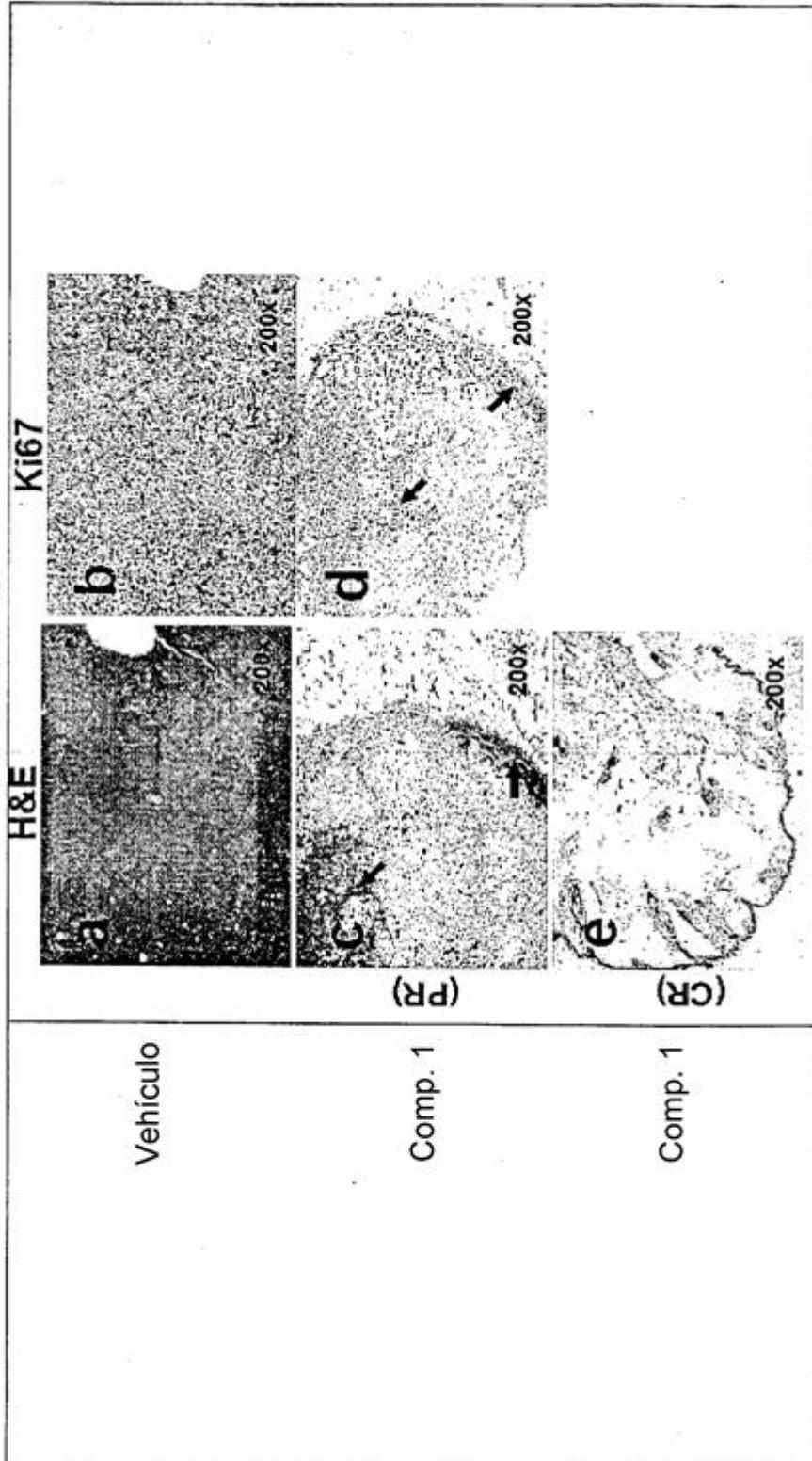


FIGURA 20

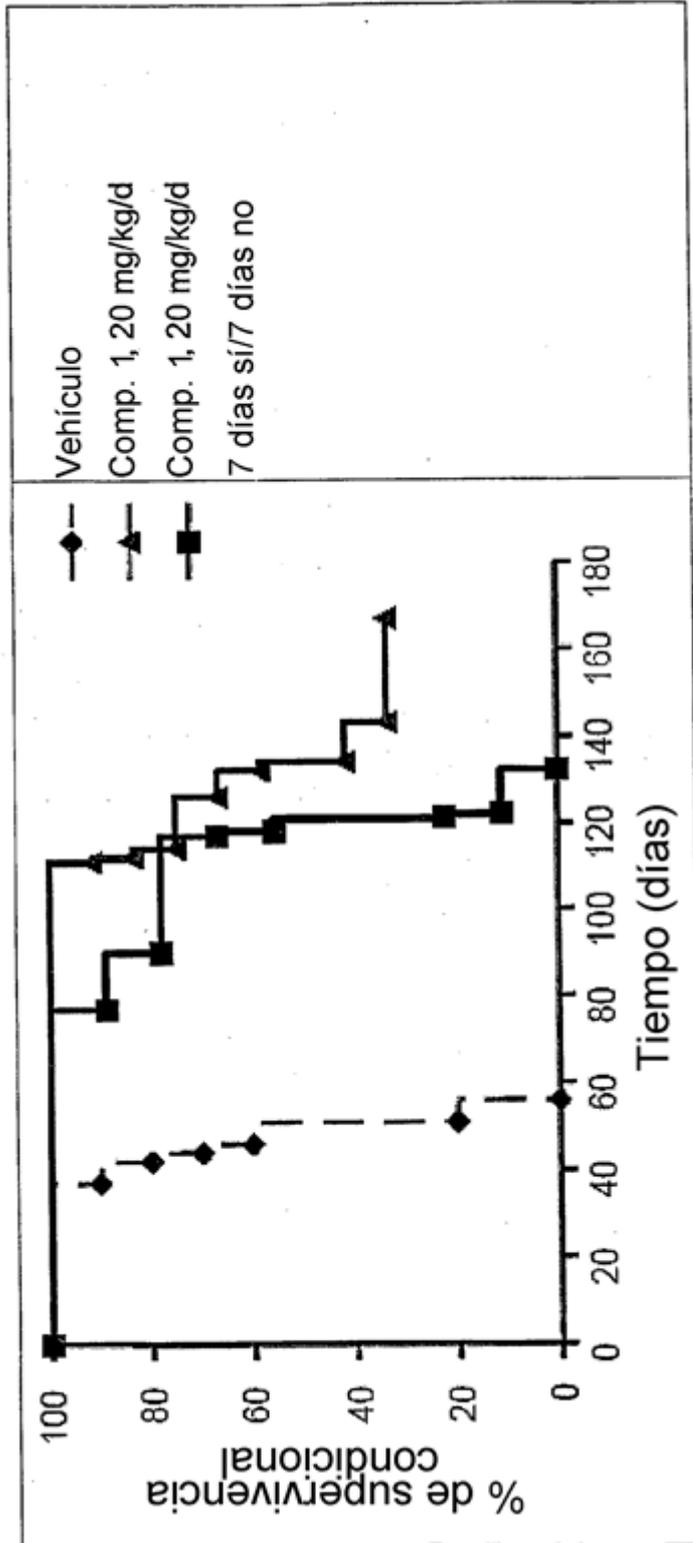


FIGURA 21

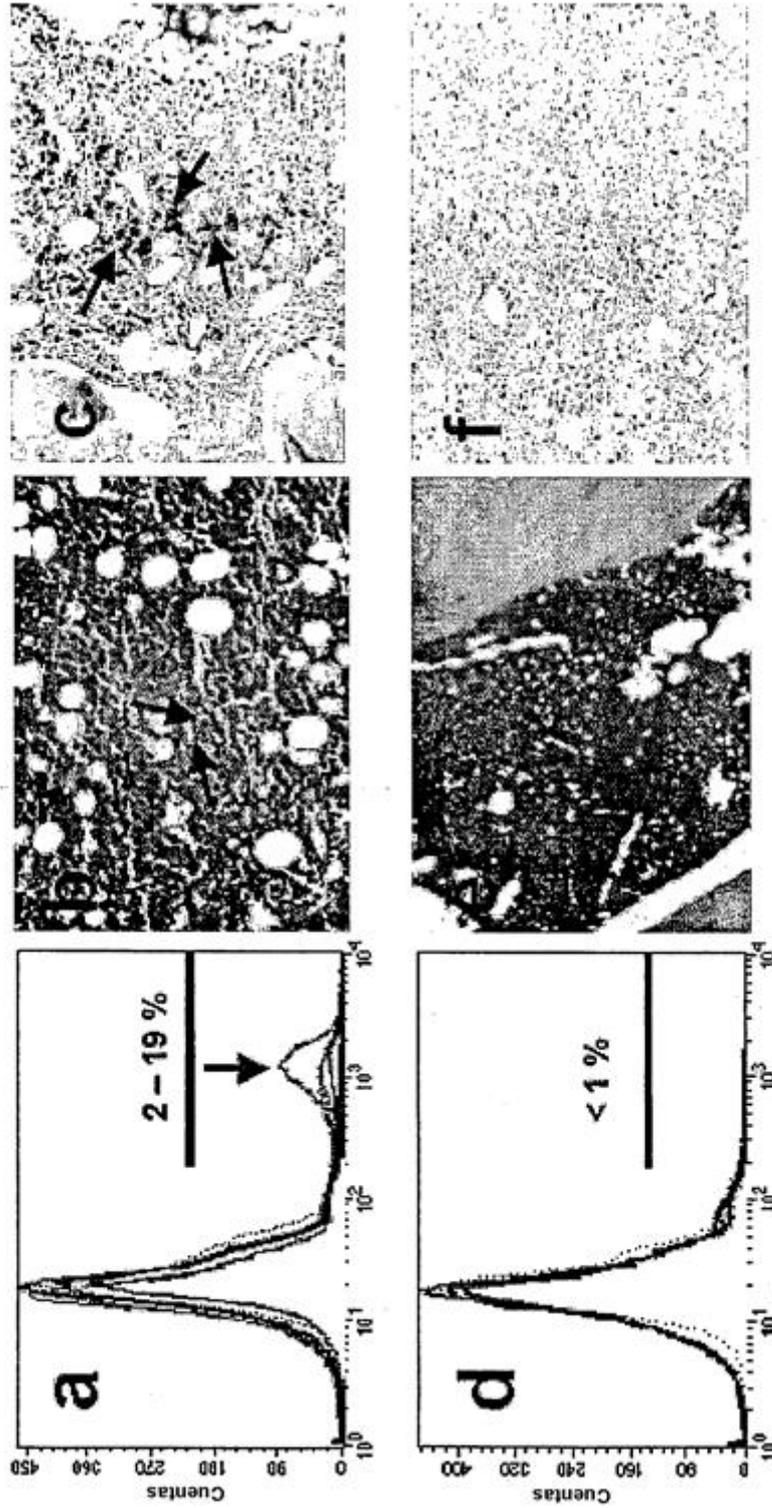
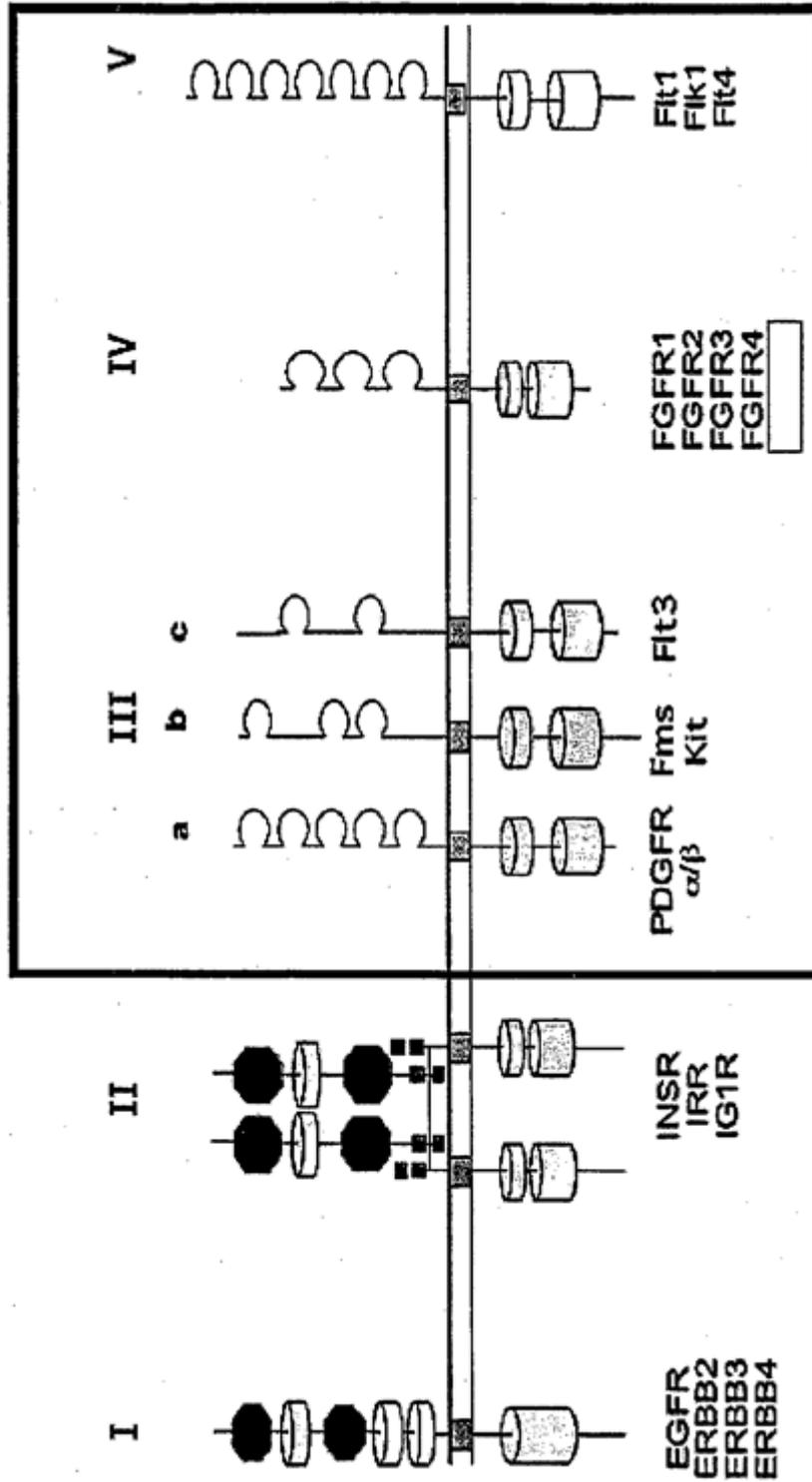
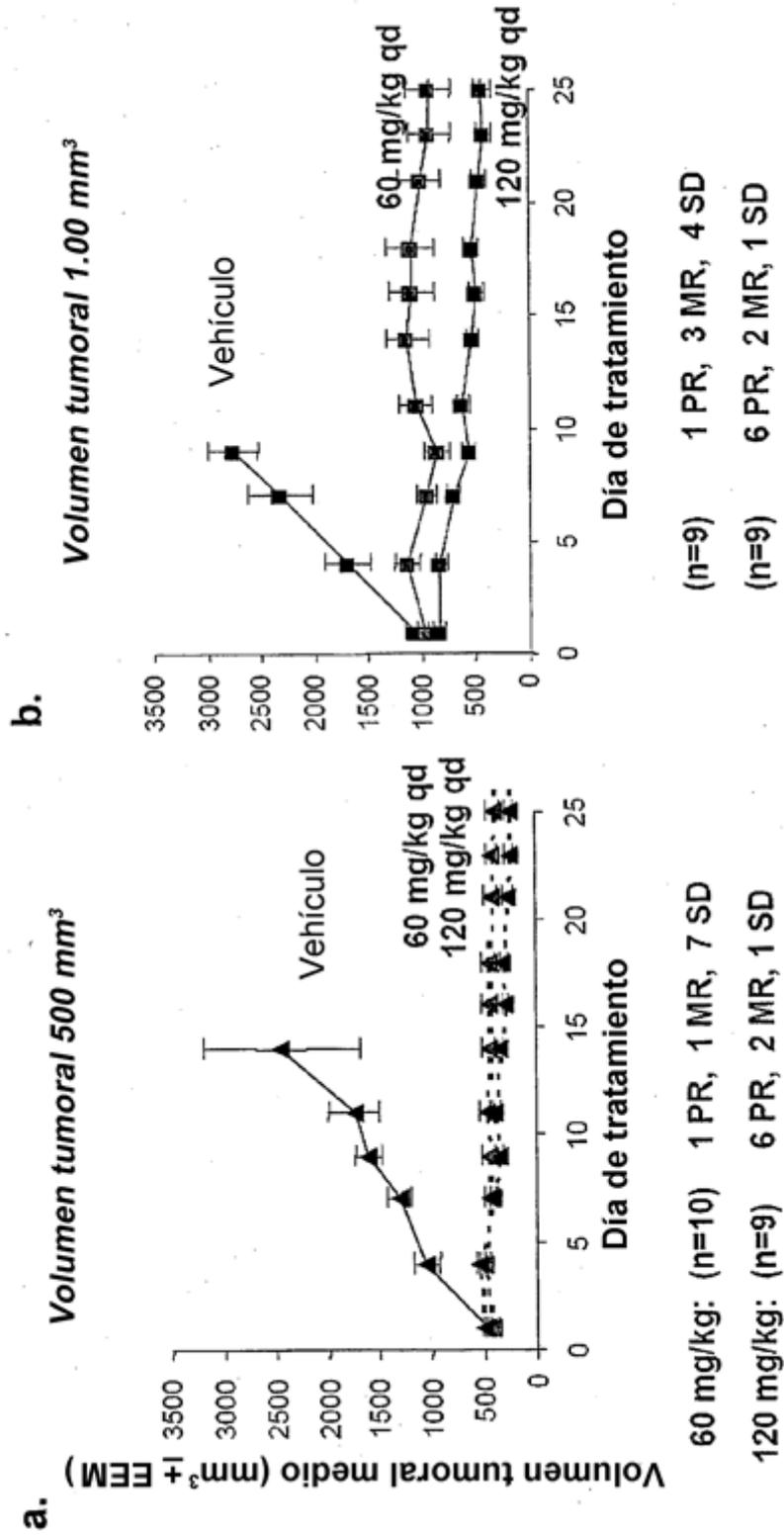


FIGURA 22



Adaptado de Grassot et al. Nucleic Acids Res. 2003 Jan 1; 31(1): 353-8.

**FIGURA 23**



**FIGURA 24**

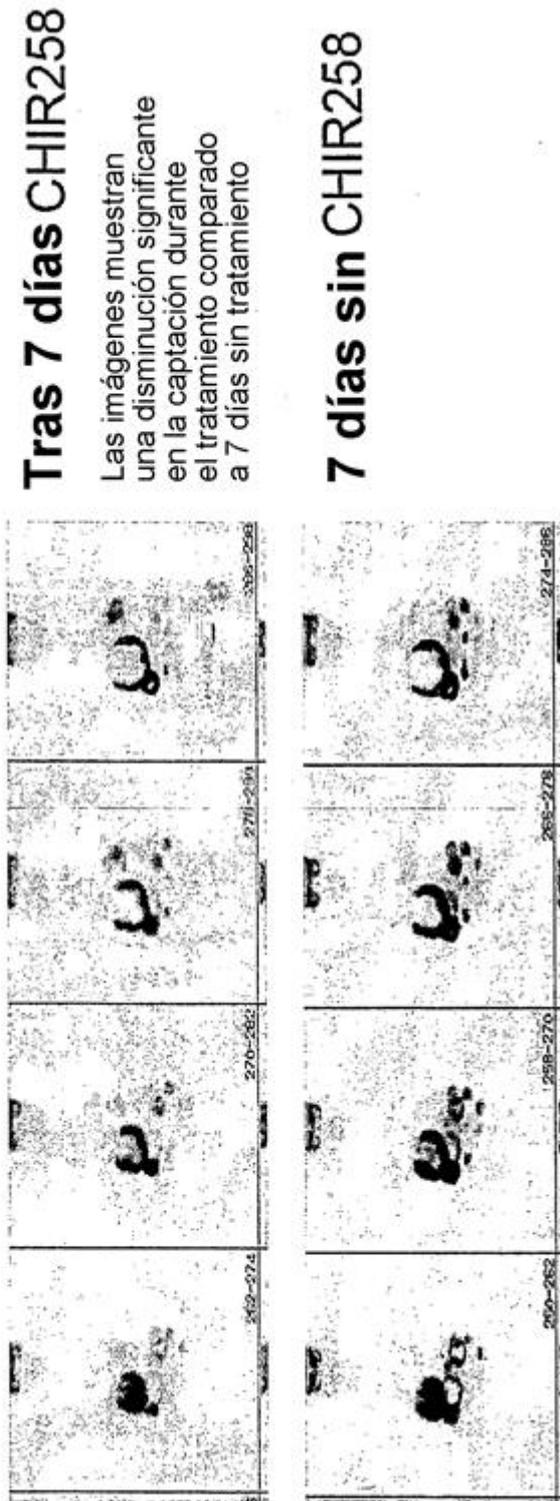
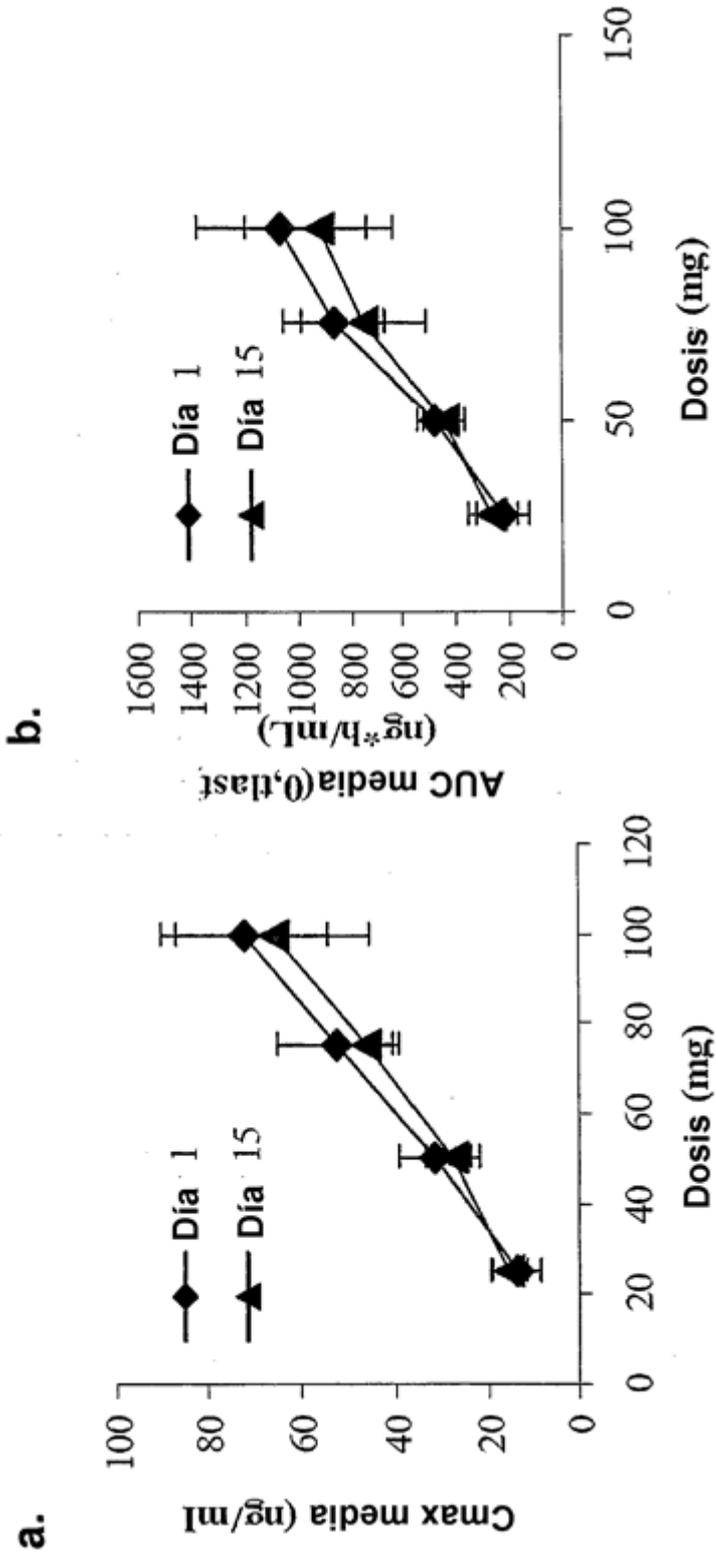


FIGURA 25



### FIGURA 26

4-Amino-5-fluoro-3-[6-(metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona  
 Días de dosificación 1-7, días sin 8-14, días de dosificación 15-21

