

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 475 066**

51 Int. Cl.:

C07D 401/14 (2006.01)

C07D 405/14 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2003 E 10174608 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014 EP 2357182**

54 Título: **Inhibidores de tirosina quinasas**

30 Prioridad:

05.07.2002 GB 0215676

20.12.2002 GB 0229893

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

10.07.2014

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)

Lichtstrasse 35

4056 Basel, CH

72 Inventor/es:

BREITENSTEIN, WERNER;

FURET, PASCAL;

JACOB, SANDRA y

MANLEY, PAUL W.

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 475 066 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

Inhibidores de tirosina quinasas

5 La invención se relaciona con pirimidinilaminobenzamidas sustituidas novedosas, procesos para su preparación, composiciones farmacéuticas que las contienen, el uso de éstas opcionalmente en combinación con uno o más de otros compuestos farmacéuticamente activos para la terapia de una enfermedad que responde a una inhibición de actividad de proteína quinasa, especialmente una enfermedad neoplásica, en particular leucemia, y un método para el tratamiento de tal enfermedad.

Antecedentes de la invención

10 Las proteínas quinasas (PK) son enzimas que catalizan la fosforilación de residuos serina, treonina o tirosina específicos en proteínas celulares. Estas modificaciones postranslacionales de las proteínas de sustrato actúan como conmutadores moleculares que regulan la proliferación, activación y/o diferenciación celular. Se ha observado actividad PK aberrante o excesiva en muchos estados de enfermedad que incluyen trastornos proliferativos benignos y malignos. En un número de casos, ha sido posible tratar enfermedades, tales como trastornos proliferativos, al hacer uso de inhibidores PK *in vitro* e *in vivo*.

15 En vista del gran número de inhibidores de proteína quinasa y la multitud de enfermedades proliferativas y otras enfermedades relacionadas con PK, subsiste la necesidad de proveer clases novedosas de compuestos que sean útiles como inhibidores de PK y así en el tratamiento de estas enfermedades relacionadas con PTK. Lo que se requiere son nuevas clases de compuestos que inhiban PK farmacéuticamente ventajosos.

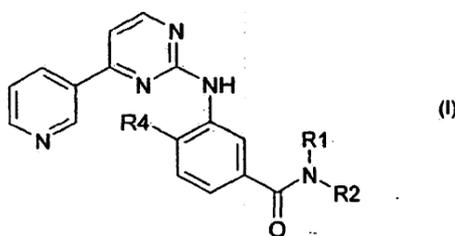
20 El Cromosoma Filadelfia es un sello distintivo para la leucemia mielógena crónica (CML) y lleva un gen híbrido que contiene exones en el terminal N del gen bcr y la parte principal del terminal C (exones 2-11) del gen c-abl. El producto de gen es una proteína 210 kD (p210 Bcr-Abl). La parte Abl de la proteína Bcr-Abl contiene la tirosina quinasa abl que se regula ajustadamente en el c-abl tipo silvestre, pero activada constitutivamente en la proteína de fusión Bcr-Abl. Esta tirosina quinasa desregulada interactúa con múltiples rutas de señalización celulares que conducen a la transformación y proliferación desregulada de las células (Lugo et al., Science 247, 1079 [1990]).

25 Descripción general de la invención

Se ha encontrado ahora que diversos compuestos de la clase pirimidinilaminobenzamida muestran inhibición de actividad de proteína quinasa. Los compuestos de fórmula I, descritos adelante en más detalle, especialmente muestran inhibición de una o más tirosina quinasas, tales como c-Abl, Bcr-Abl, el receptor de tirosina quinasas PDGF-R, Flt3, VEGF-R, EGF-R, y c-Kit, así como también combinaciones de dos o más de estas; en el caso de pirimidinilaminobenzamidas novedosas de acuerdo con la invención, los compuestos son apropiados para la inhibición de estas y/u otras proteínas quinasas, especialmente aquellas mencionadas anteriormente y/o para la inhibición de mutantes de estas enzimas, especialmente de Bcr-Abl, por ejemplo el mutante Glu255 -> Valina. En vista de estas actividades, se pueden utilizar los compuestos para el tratamiento de enfermedades relacionadas especialmente con actividad aberrante o excesiva de tales tipos de quinasas, especialmente aquellas mencionadas.

35 Descripción detallada de la invención

La invención se relaciona con un compuesto de fórmula I,



en donde

R1 representa hidrógeno;

40 R2 representa 5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)-fenilo; y

R4 representa hidrógeno; o un N-óxido o una sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto.

Cuando se usa la forma plural para los compuestos, sales, y similares, esta se toma para significar también un compuesto único, sal, o similares.

5 Pueden estar presentes cualesquier átomos de carbono asimétricos en la configuración (R)-, (S)- o (R,S), preferiblemente en la configuración (R)- o (S). Los compuestos pueden estar así presentes como mezclas de isómeros o como isómeros puros, preferiblemente como enantiómeros diastereómeros puros.

La invención se relaciona también con posibles tautómeros de los compuestos de fórmula I.

Las sales son especialmente las sales farmacéuticamente aceptables de compuestos de fórmula I.

10 Se forman tales sales, por ejemplo, como sales de adición ácida, preferiblemente con ácidos orgánicos o inorgánicos, de los compuestos de fórmula I con un átomo de nitrógeno básico, especialmente las sales farmacéuticamente aceptables. Los ácidos inorgánicos adecuados son, por ejemplo, ácidos de halógeno, tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, o ácido fosfórico. Ácidos orgánicos adecuados son, por ejemplo, ácidos carboxílico, fosfónico, sulfónico o sulfámico, por ejemplo ácido acético, ácido propiónico, ácido octanoico, ácido decanoico, ácido dodecanoico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido adipico, ácido pimélico, ácido subérico, ácido azelaico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, aminoácidos, tales como ácido glutámico o ácido aspártico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido metilmaleico, ácido ciclohexanocarboxílico, ácido adamantanecarboxílico, ácido benzoico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido ftálico, ácido fenilacético, ácido mandélico, ácido cinámico, ácido metano- o etanosulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 1,5-naftaleno-disulfónico, ácido 2-, 3- o 4-metilbencenosulfónico, ácido metilsulfúrico ácido etilsulfúrico, ácido dodecilsulfúrico ácido N-ciclohexilsulfámico, ácido N-metil-, N-etil- o N-propil-sulfámico, u otros ácidos protónicos orgánicos, tal como ácido ascórbico.

25 En la presencia de radicales cargados negativamente, tal como carboxi o sulfo, las sales también se pueden formar con bases, por ejemplo sales de metal o amonio, tal como sales de metal alcali o sales de metal alcalinotérreo, por ejemplo sales de sodio, potasio, magnesio o calcio, o sales de amonio con amonio o aminas orgánicas adecuadas, tales como monoaminas terciarias, por ejemplo trietilamina o tri(2-hidroxietil)amina, o bases heterocíclicas, por ejemplo N-etil-piperidina o N,N'-dimetilpiperazina.

Cuando un grupo básico y un grupo ácido están presentes en la misma molécula, un compuesto de fórmula I también puede formar sales internas.

30 Para propósitos de aislamiento o purificación también es posible usar sales farmacéuticamente no aceptables, por ejemplo picratos o percloratos. Para uso terapéutico, solo se emplean sales farmacéuticamente aceptables o los compuestos libres (cuando sean aplicables en la forma de preparaciones farmacéuticas), y por lo tanto estos son preferidos.

35 A la vista de la relación cercana entre los compuestos novedosos en forma libre y los que están en la forma de sus sales, incluyendo aquellas sales que pueden ser utilizadas como intermedios, por ejemplo en la purificación o identificación de los compuestos novedosos, cualquier referencia a los compuestos libres aquí anteriormente y de aquí en adelante debe entenderse como referencia también a las sales correspondientes, según sea apropiado y conveniente.

El compuesto de fórmula I y sus N-óxidos tienen propiedades farmacológicas valiosas, como se describe aquí anteriormente y de aquí en adelante.

40 La eficacia del compuesto de la invención como inhibidor de la actividad tirosina quinasa del receptor de c-Abl, Bcr-Abl, y VEGF se puede demostrar como sigue:

45 Prueba para actividad contra proteína tirosina quinasa c-Abl. Se conduce la prueba como un ensayo enlazante de filtro como sigue: El dominio quinasa objetivo His de c-Abl se clona y se expresa en el sistema baculovirus/Sf9 como se describe por Bhat et al. en J.Biol.Chem. 272:16170-5 (1997). Una proteína de 37 kD (quinasa c-Abl) se purifica mediante un procedimiento de dos etapas sobre una columna de metal de cobalto quelado seguido por una columna de intercambio de anión con un rendimiento de 1-2 mg/L de células Sf9. La pureza de la quinasa c-Abl es >90% como se juzga por SDS-PAGE después de tinte azul de Coomassie. El ensayo contiene: quinasa c-Abl (50 ng), Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, MgCl₂ 10 mM, Na₃VO₄ 10 μM, DTT 1 mM y 0.06 μCi/ensayo [³³P]-ATP (5 μM de ATP) utilizando 30 μg/ml poly-Ala, Glu, Lys, Tyr-6:2:5:1 (Poly-AEKY, Sigma P1152) en la presencia de DMSO al 1%, volumen total de 30 μL. Las reacciones se terminan al agregar 10 μL de 250 mM de EDTA y 30 μL de la mezcla de reacción se transfiere en membrana Immobilon-PVDF (Millipore, Bedford, MA, USA) previamente remojada durante 50 5 min con metanol, se enjuaga con agua, luego se empapa durante 5 min con H₃PO₄ al 0.5% y se monta sobre colector de vacío con fuente de vacío desconectada. Después de manchar todas las muestras, se conecta el vacío y cada pozo se enjuaga con H₃PO₄ al 0.5% 200 μL. Las membranas se remueven y se lavan en un agitador con H₃PO₄ al 0.5% (4 veces) y una vez con etanol. Las membranas se cuentan después de secado a temperatura

ambiente, se montan en la estructura Packard TopCount de 96-pozos, y la adición de 10 μL /pozo de Microscint TM (Packard)

5 Prueba para actividad contra Bcr-Abl. La línea de célula progenitora mielóide de murino 32Dcl3 transfectada con el vector de expresión p210 Bcr-Abl pGDp210Bcr/Abl (32D-bcr/abl) se obtuvo de J. Griffin (Dana Faber Cancer Institute, Boston, MA, USA). Las células expresan la proteína Bcr-Abl de fusión con una quinasa abl constitutivamente activa y proliferan independiente del factor de crecimiento. Las células se expanden en RPMI 1640 (AMIMED), suero de ternero fetal al 10%, glutamina 2 mM (Gibco) ("medio completo"), y se prepara una solución madre de trabajo mediante alícuotas congeladas de 2×10^6 por vial en medio de congelación (FCS al 95%, DMSO al 5% (SIGMA)). Después de descongelar, se utilizan las células durante máximamente 10 - 12 pasajes para los experimentos. Para ensayos celulares, se disuelven los compuestos en DMSO y se diluyen con medio completo para producir una concentración de partida de 10 μM seguido por preparación de diluciones 3 veces en serie en medio completo. Se siembran 200'000 32D-Bcr/Abl células en 50 μL de medio completo por pozo en placas de cultivo de tejido de fondo redondo de 96 pozos. Se agregan 50 μL por pozo de diluciones 3 veces en serie del compuesto de prueba a las células en triplicado. Se utilizan las células no tratadas como control. Los compuestos se incuban junto con las células durante 90 min a 37° C, CO₂ al 5%, seguido por centrifugación de las placas de cultivo de tejido a 1300 rpm (Beckmann GPRcentrifuge) y se remueven los sobrenadantes mediante aspiración cuidadosa teniendo cuidado de no remover cualquiera de las células sedimentadas. Los sedimentos celulares se lisan por adición de regulador de lisis 150 μL (50 mM de Tris/HCl, pH 7.4, 150 mM de cloruro de sodio, 5 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, NP-40 al 1%, orto-vanadato de sodio 2 mM, PMSF 1 mM, aprotinina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y leupeptina 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se utiliza inmediatamente para el ELISA o se almacena congelado en las placas a -20° C hasta uso. Las placas ELISA negras (placas negras 96 Packard HTRF) se precubren durante la noche a 4° C con 50 ng/pozo del dominio Ab 06-466 anti-abl-SH3 policlonal de conejo de Upstate en 50 μL de PBS. Después de lavar 3 veces con 200 μL /pozo con PBS que contiene Tween20 al 0.05% (PBST) y TopBlock al 0.5% (Juro), se bloquean los sitios de unión de proteína residuales con PBST 200 μL /pozo, TopBlock al 3% durante 4 h a temperatura ambiente seguido por incubación con lisatos 50 μL de células no tratados o tratadas con el compuesto (20 μg de proteína total por pozo) durante 3-4 h a 4° C. Después de 3 lavadas, se agrega anti-fosfotirosina 50 μL /pozo Ab PY20(AP) etiquetada con fosfatasa alcalina (Zymed) diluida con 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en regulador de bloqueo y se incuba durante la noche (4° C). Para todas las etapas de incubación las placas se cubren con selladores de placa (Costar). Finalmente, las placas se lavan otras tres veces con regulador de lavado y una vez con agua desionizada antes de la adición de 90 μL /pozo del sustrato AP CDPStar RTU con Emerald II. Las placas, ahora selladas con selladores de placa Packard TopSeal™-A, se incuban durante 45 min a temperatura ambiente en la oscuridad y la luminiscencia se cuantifica al medir conteos por segundo (CPS) con un contador de Centelleo de Microplaca Packard Top Count (Top Count).

Las diferencias entre la lectura ELISA- (CPS) obtenidas con los lisados de las células 32D-Bcr/Abl no tratadas y la lectura para el ensayo-antecedente (todos los componentes, pero sin lisado celular) se calculan y se toman como 100% al reflejar la proteína Bcr-Abl fosforilada constitutivamente presente en estas células. La actividad del compuesto en la actividad quinasa de Bcr-Abl se expresa como reducción de porcentaje de la fosforilación de Bcr-Abl. Se determinan los valores para el IC₅₀ e IC_{90a} partir de las curvas de respuesta de dosis mediante extrapolación gráfica.

40 Prueba para actividad contra tirosina quinasa del receptor de VEGF. Se conduce la prueba utilizando la tirosina quinasa receptor de VEGF Fit-1. El procedimiento detallado es como sigue: solución de quinasa 30 μL (10 ng del dominio quinasa de Flt-1, Shibuya et al., Oncogene 5 519-24 [1990]) en Tris•HCl 20 mM pH 7.5, dicloruro de manganeso 3 mM (MnCl₂), cloruro de magnesio 3 mM (MgCl₂), vanadato de sodio 10 μM , polietilenglicol 0.25 mg/mL (PEG) 20000, ditiotretol 1 mM y poly(Glu,Tyr) 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 4:1 (Sigma, Buchs, Suiza), [³³P]-ATP 8 μM (0.2 μCi), DMSO al 1%, y 0 a 100 μM del compuesto a ser probado se incuban juntos durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se termina luego mediante la adición de 10 μL de etilendiaminatetraacetato 0.25 M (EDTA) pH 7. Utilizando un dispensador multicanal (LAB SYSTEMS, USA), se aplica una alícuota de 20 μL a una membrana PVDF (= difluoruro de polivinilo) Immobilon P (Millipore, Bedford, USA), a través de un colector del filtro de microtitulación de Gibco-BRL y conectado a un vacío. Luego de la eliminación completa del líquido, la membrana se lava 4 veces sucesivamente en un baño que contiene ácido fosfórico al 0.5% (H₃PO₄) y una vez con etanol, se incuba durante 10 minutos cada vez mientras se agita, luego se monta en un colector Hewlett Packard TopCount y se mide la radioactividad después de la adición de Microscint® 10 μL (líquido contador de centelleo β). Se determinan los valores IC₅₀ mediante análisis de regresión lineal de los porcentajes para la inhibición de cada compuesto en por lo menos cuatro concentraciones (como una regla 0.01, 0.1, 1.0 y 10 μmol). Los valores IC₅₀ que se pueden encontrar con los compuestos de fórmula I están en el rango de 1 a 10'000 nM, preferiblemente en el rango de 1 a 100 nM.

La inhibición de autofosforilación del receptor de KDR inducida por VEGF se puede confirmar con un experimento in vitro adicional en células: células CHO transfectadas, que expresan permanentemente el receptor VEGF humano (KDR), se siembran en medio de cultivo completo con suero de ternera fetal al 10% (FCS) en placas de cultivo celular de 6 pozos y se incuban a 37° C bajo CO₂ al 5% hasta que ellas muestran aproximadamente confluencia al 80%. Los compuestos a ser probados se diluyen luego en medio de cultivo (sin FCS, con albúmina de suero bovino al 0.1%) y se agrega a las células. (Los controles comprenden medio sin compuestos de prueba). Después de dos

horas de incubación a 37°C, se agrega el VEGF recombinante; la concentración VEGF final es 20 ng/mL). Después de una incubación adicional de cinco minutos a 37°C, se lavan las células dos veces con PBS enfriado con hielo (solución salina regulada con fosfato) e inmediatamente se lisan en regulador de lisis 100 µL por pozo. Los lisados se centrifugan luego para remover el núcleo celular, y se determinan las concentraciones de proteína de los sobrenadantes utilizando un ensayo de proteína comercial (BIORAD). Los lisados se pueden entonces o bien ser utilizados inmediatamente o, si es necesario almacenar a -20° C.

Se lleva a cabo un ELISA de sándwich para medir la fosforilación del receptor de KDR: se inmoviliza un anticuerpo monoclonal para KDR (por ejemplo Mab 1495.12.14) en placas ELISA negras (OptiPlate™ HTRF-96 de Packard). Las placas se lavan entonces y los sitios de enlazamiento de proteína libres restantes se saturan con BSA al 1% en PBS. Los lisados celulares (20 µg de proteína por pozo) son entonces incubados en estas placas durante la noche a 4°C junto con un anticuerpo antifosfotirosina acoplado con fosfatasa alcalina (PY20:AP de Transduction Laboratories). Las placas se lavan de nuevo y el enlace del anticuerpo antifosfotirosina al receptor fosforilado capturado se demuestra entonces utilizando un sustrato AP luminiscente (CDP-Star, listo para uso, con Emerald II; TROPIX). Se mide la luminiscencia en un Contador de Centelleo de Microplaca Packard Top Count (Top Count). La diferencia entre la señal del control positivo (estimulado con VEGF) y aquel del control negativo (no estimulado con VEGF) corresponde a la fosforilación del receptor de KDR inducido por VEGF (=100%). La actividad de las sustancias probadas es calculada como % de inhibición de fosforilación del receptor de KDR inducido por VEGF, en donde la concentración de sustancia que induce la mitad de la inhibición máxima se define como el ED50 (dosis efectiva para inhibición al 50%). Los compuestos de fórmula I aquí preferiblemente muestran valores ED50 en el rango de 0.25 nM a 1000 nM, preferiblemente 0.25 a 250 nM.

Un compuesto de fórmula I o un N-óxido del mismo inhibe a grados variables también otras tirosinas quinasas involucradas en la transducción de señal que se media por factores tróficos, por ejemplo las quinasas Bcr-Abl y Abl, Arg, quinasas de la familia Src, especialmente quinasa c-Src, Lck, y Fyn; también quinasas de la familia EGF, por ejemplo, quinasa c-erbB2 (HER-2), quinasa c-erbB3, quinasa c-erbB4; quinasa del receptor del factor de crecimiento similar a insulina (quinasa IGF-1), especialmente miembros de la familia de tirosina quinasa del receptor PDGF, tal como quinasa del receptor de PDGF, quinasa del receptor de CSF-1, quinasa del receptor de Kit y quinasa del receptor de VEGF; y también serina/treonina quinasas, todas las cuales juegan un papel en la regulación y transformación del crecimiento en células de mamíferos, que incluyen células humanas.

Se puede medir la inhibición de la tirosina quinasa c-erbB2 (HER-2), por ejemplo, en la misma forma como la inhibición de proteína quinasa EGF-R, utilizando procedimientos conocidos.

Sobre la base de estos estudios, un compuesto de fórmula I de acuerdo con la invención muestra eficacia terapéutica especialmente contra trastornos dependientes de proteína quinasa, especialmente enfermedades proliferativas.

Sobre la base de su eficacia como inhibidores de actividad de tirosina quinasa del receptor de VEGF, los compuestos de la fórmula I principalmente inhiben el crecimiento de vasos sanguíneos y son así, por ejemplo, efectivos contra un número de enfermedades asociadas con angiogenia desregulada, especialmente enfermedades originadas por neovascularización ocular, especialmente retinopatías, tal como retinopatía diabética o degeneración macular relacionada con la edad, soriasis, hemoangioblastoma, tal como hemoangioma, trastornos proliferativos de células mesangiales, tal como enfermedades renales agudas o crónicas, por ejemplo neuropatía diabética, nefroesclerosis maligna, síndromes de microangiopatía trombótica o rechazo de trasplante, o especialmente enfermedad renal inflamatoria, tal como glomerulonefritis, especialmente glomerulonefritis mesangioproliferativa, síndrome de uremia hemolítico, neuropatía diabética, nefroesclerosis hipertensiva, ateroma, reestenosis arterial, enfermedades autoinmunes, diabetes, endometriosis, asma crónica, y especialmente enfermedades neoplásicas (tumores sólidos, pero también leucemias y otros "tumores líquidos", especialmente aquellos que expresan c-kit, KDR, Flt-1 o Flt-3), tal como especialmente cáncer de seno, cáncer de colon, cáncer de pulmón (especialmente de pulmón de células pequeñas), cáncer de próstata o sarcoma de Kaposi. Un compuesto de fórmula I (o un N-óxido del mismo) inhibe el crecimiento de tumores y es especialmente adecuado para prevenir la diseminación metastásica de los tumores y el crecimiento de micrometástasis.

Un compuesto de fórmula I se puede administrar solo o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos, la terapia de combinación posible tomando la forma de combinaciones fijas o la administración de un compuesto de la invención y uno o más de otros agentes terapéuticos que se dan escalonados o se dan independientemente uno de otro, o la administración combinada de combinaciones fijas y uno o más de otros agentes terapéuticos. Un compuesto de fórmula I puede además o en adición ser administrado especialmente para terapia de tumor, tal como terapia para leucemia, en combinación con quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, intervención quirúrgica, o una combinación de estos. La terapia a largo plazo es igualmente posible cuando es terapia adyuvante en el contexto de otras estrategias de tratamiento, como se describió anteriormente. Otros tratamientos posibles son terapias para mantener el estado del paciente después de la regresión del tumor, o aún terapia quimiopreventiva, por ejemplo en pacientes en riesgo.

5 Los agentes terapéuticos para posible combinación son especialmente uno o más compuestos citostáticos o citotóxicos, por ejemplo un agente quimioterapéutico o varios seleccionados del grupo que comprende indarrubicina, citarabina, interferón, hidroxiurea, bisulfan, o un inhibidor de biosíntesis de poliamina, un inhibidor de proteína quinasa, especialmente de serina/treonina proteína quinasa, tal como proteína quinasa C, o de proteína tirosina quinasa, tal como tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico, una citoquina, un regulador de crecimiento negativo, tal como THF- β o IFN- β , un inhibidor de aromatasas, un citostático clásico, y un inhibidor de la interacción de un dominio de SH2 con una proteína fosforilada.

10 Un compuesto de acuerdo con la invención es no solo para el manejo (profiláctico y preferiblemente terapéutico) de los humanos, sino también para el tratamiento de otros animales de sangre caliente, por ejemplo animales útiles comercialmente, por ejemplo roedores, tales como ratones, conejos o ratas, o cobayas. Tal compuesto también se puede utilizar como un estándar de referencia en los sistemas de prueba descritos anteriormente para permitir una comparación con otros compuestos.

En general, la invención se relaciona también con el uso de un compuesto de fórmula I o un N-óxido del mismo para la inhibición de la actividad de la tirosina quinasa, in vitro o in vivo.

15 Con los grupos de compuestos preferidos de fórmula I y N-óxidos de los mismos mencionados anteriormente, las definiciones de sustituyentes de las definiciones generales mencionadas anteriormente pueden ser utilizadas razonablemente, por ejemplo para reemplazar más definiciones generales con definiciones más específicas o especialmente con definiciones caracterizadas por ser preferidas.

20 Especialmente, la invención se relaciona con el uso de un compuesto de fórmula I o de un N-óxido o un posible tautómero del mismo o de una sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad que responde a una inhibición de actividad de proteína quinasa, en donde la enfermedad es una enfermedad neoplásica.

25 Más particularmente, la invención se relaciona con el uso de un compuesto de la fórmula I o de un N-óxido o un posible tautómero del mismo; o de una sal farmacéuticamente aceptable de tal un compuesto para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de leucemia que responde a una inhibición de la actividad de tirosina quinasa Abl.

30 Adicionalmente, la invención provee compuestos para usar en un método para el tratamiento de una enfermedad que responde a una inhibición de actividad de proteína quinasa, que comprende administrar un compuesto de fórmula I o un N-óxido o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en donde los radicales y símbolos tienen los significados como se definió anteriormente, en una cantidad efectiva contra dicha enfermedad, a un animal de sangre caliente que requiere tal tratamiento.

Preparaciones farmacéuticas, métodos, y usos

35 La presente invención se relaciona adicionalmente con compuestos para uso en un método para el tratamiento de una enfermedad neoplásica que responde a una inhibición de una actividad de proteína quinasa, que comprende administrar un compuesto de fórmula I o un N-óxido o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en donde los radicales y símbolos tienen los significados como se definió anteriormente para la fórmula I, en una cantidad efectiva contra dicha enfermedad, a un animal de sangre caliente que requiere tal tratamiento.

40 En particular la invención se relaciona con compuestos para uso en un método para el tratamiento de leucemia que responde a una inhibición de la actividad de tirosina quinasa Abl, que comprende administrar un compuesto de fórmula I o un N-óxido o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en donde los radicales y símbolos tienen los significados como se definió anteriormente para la fórmula I, en una cantidad efectiva contra dicha leucemia, a un animal de sangre caliente que requiere tal tratamiento.

45 La presente invención se relaciona también con composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula I o un N-óxido de los mismos como ingrediente activo y que se pueden utilizar especialmente en el tratamiento de las enfermedades mencionadas en el inicio. Se prefieren especialmente las composiciones para la administración enteral, tal como administración nasal, bucal, rectal o, especialmente, administración oral, y para administración parenteral, tal como intravenosa, intramuscular o administración subcutánea, a animales de sangre caliente, especialmente humanos. Las composiciones comprenden los ingredientes activos solos o, preferiblemente, junto con un portador farmacéuticamente aceptable. La dosificación del ingrediente activo depende de la enfermedad a ser tratada y de las especies, su edad, peso, y condición individual, los datos farmacocinéticos individuales, y el modo de administración.

50 La presente invención se relaciona especialmente con composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula I, un tautómero, un N-óxido o una sal farmacéuticamente aceptable, o un hidrato o solvato de los mismos, y al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

La invención se relaciona también con composiciones farmacéuticas para uso en un método para el manejo profiláctico o especialmente terapéutico del cuerpo humano o animal, con un proceso para la preparación de las mismas (especialmente en la forma de composiciones para el tratamiento de tumores) y con un método para tratar enfermedades tumorales, especialmente aquellas mencionadas aquí más arriba.

- 5 La invención se relaciona también con procesos y con el uso de los compuestos de fórmula I o N-óxidos de los mismos para la preparación de preparaciones farmacéuticas que comprenden compuestos de fórmula I o N-óxidos de los mismos como componente activo (ingrediente activo).

10 En la realización preferida, una preparación farmacéutica es adecuada para la administración a un animal de sangre caliente, especialmente humanos o mamíferos comercialmente útiles que sufren de una enfermedad sensible a la inhibición de la tirosina quinasa Abl, por ejemplo leucemia mielogenosa crónica (CML), y comprende una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula I o N-óxidos de los mismos para la inhibición de la proteína de fusión de Bcr-Abl, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, si los grupos formadores de sal están presentes, junto con al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

15 Una composición farmacéutica para el manejo profiláctico o especialmente terapéutico de enfermedades neoplásicas y otras enfermedades proliferativas de un animal de sangre caliente, especialmente un humano o un mamífero comercialmente útil que requiere tal tratamiento, especialmente que sufre de tal una enfermedad, que comprende como ingrediente activo en una cantidad que es profilácticamente o especialmente terapéuticamente activa contra las dichas enfermedades un compuesto novedoso de fórmula I o N-óxidos de los mismos, es igualmente preferido.

20 Las composiciones farmacéuticas comprenden de aproximadamente 1% a aproximadamente 95% de ingrediente activo, formas de administración de dosis individual que comprenden en la realización preferida de aproximadamente 20% a aproximadamente 90% de ingrediente activo y formas que no son de tipo de dosis individual que comprenden en la realización preferida de aproximadamente 5% a aproximadamente 20% de ingrediente activo. Las formas de dosis individuales son, por ejemplo, tabletas cubiertas y no cubiertas, ampollas, 25 viales, supositorios, o cápsulas. Las formas de dosificación adicionales son, por ejemplo, ungüentos, cremas, pastas, espumas, tinturas, aspersiones, etc. Ejemplos son cápsulas que contienen de aproximadamente 0.05 g a aproximadamente 1.0 g de ingrediente activo.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se preparan en una forma conocida per se, por ejemplo por medio de procesos de mezcla, granulación, recubrimiento, disolución o liofilización convencionales.

30 Se da preferencia al uso de soluciones del ingrediente activo, y también suspensiones o dispersiones, especialmente soluciones acuosas isotónicas, dispersiones o suspensiones que, por ejemplo en el caso de composiciones liofilizadas que comprenden el ingrediente activo solo o junto con un vehículo se pueden hacer antes del uso. Las composiciones farmacéuticas se pueden esterilizar y/o pueden comprender excipientes, por ejemplo 35 conservantes, estabilizantes, agentes de humectación y/o emulsificadores, solubilizantes, sales para regular presión osmótica y/o reguladores y se preparan en una forma conocida per se, por ejemplo por medio de procesos de disolución y liofilización convencionales. Las dichas soluciones o suspensiones pueden comprender agentes que incrementan viscosidad o solubilizantes.

40 Las suspensiones en aceite comprenden como el componente de aceite los aceites vegetales, sintéticos o semisintéticos habituales para propósitos de inyección. Con respecto a los cuales, se puede hacer mención especial de ésteres de ácidos grasos líquidos que contienen como el componente ácido un ácido graso de cadena larga que tiene de 8 a 22 átomos de carbono. El componente de alcohol de estos ésteres de ácido graso tienen un máximo de 6 átomos de carbono y es un monovalente o polivalente, por ejemplo un alcohol mono-, di- o trivalente, especialmente glicol y glicerol.

45 Las composiciones farmacéuticas para administración oral se pueden obtener, por ejemplo, al combinar el ingrediente activo con uno o más vehículos sólidos, si se desea granular una mezcla resultante, y procesar la mezcla o gránulos, si se desea o es necesario, por la inclusión de excipientes adicionales, para formar tabletas o núcleos de tabletas.

50 Los vehículos adecuados son especialmente agentes de relleno, tales como azúcares, preparaciones de celulosa, y/o fosfatos de calcio, y también aglomerantes, tal como almidones, y/o povidina, y/o, si se desea, desintegrantes. Excipientes adicionales son especialmente acondicionadores de flujo y lubricantes.

Se pueden proveer núcleos de tabletas con recubrimientos adecuados, opcionalmente entéricos, a través del uso de, inter alia, soluciones de azúcar concentrado que pueden comprender goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, polietilén glicol y/o dióxido de titanio, o soluciones de recubrimiento en solventes orgánicos adecuados o mezclas de solventes, o, para la preparación de recubrimientos entéricos, soluciones de preparaciones de celulosa adecuadas.

5 Las composiciones farmacéuticas para administración oral también incluyen cápsulas duras que consisten de gelatina, y también suaves, cápsulas selladas que consisten de gelatina y un plastificante. Las cápsulas duras pueden contener el ingrediente activo en la forma de gránulos, por ejemplo en mezcla con agentes de relleno, aglomerantes, y/o deslizantes, y opcionalmente estabilizadores. En las cápsulas suaves, el ingrediente activo es preferiblemente disuelto o suspendido en excipientes líquidos adecuados, a los que también se pueden agregar estabilizadores y detergentes.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración rectal son, por ejemplo, supositorios que consisten de una combinación del ingrediente activo y una base de supositorio.

10 Son especialmente adecuados para administración parenteral, las soluciones acuosas de un ingrediente activo en forma soluble en agua, por ejemplo de una sal soluble en agua, o suspensiones de inyección acuosa que contienen sustancias que incrementan la viscosidad, por ejemplo carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano, y, si se desea, estabilizadores. El ingrediente activo, opcionalmente junto con excipientes, también puede estar en la forma de un liofilizado y se puede hacer en una solución antes de administración parenteral mediante la adición de solventes adecuados.

15 Soluciones tales como son usadas, por ejemplo, para administración parenteral también se pueden emplear como soluciones de infusión.

Los conservantes preferidos son, por ejemplo, antioxidantes, tales como ácido ascórbico, o microbicidas, tales como ácido sórbico o ácido benzoico.

20 La invención se relaciona de la misma forma con un proceso o un método para el tratamiento de una de las condiciones patológicas mencionadas aquí más arriba, especialmente una enfermedad que responde a una inhibición de una tirosina quinasa, especialmente una enfermedad neoplásica correspondiente. Se pueden administrar los compuestos de fórmula I o N-óxidos de los mismos tal como o especialmente en la forma de composiciones farmacéuticas, profilácticamente o terapéuticamente, preferiblemente en una cantidad efectiva contra las dichas enfermedades, a un animal de sangre caliente, por ejemplo un humano, que requiere tal tratamiento. En el caso de un individuo que tiene un peso corporal de aproximadamente 70 kg la dosis diaria administrada es de aproximadamente 0.05 g a aproximadamente 5 g, preferiblemente de aproximadamente 0.25 g a aproximadamente 1.5 g, de un compuesto de la presente invención.

30 La presente invención también se relaciona especialmente con el uso de un compuesto de fórmula I o N-óxidos del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, especialmente un compuesto de fórmula I que se dice es preferido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como o en la forma de una formulación farmacéutica con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable para el manejo terapéutico y también profiláctico de una o más de las enfermedades mencionadas aquí más arriba, preferiblemente una enfermedad que responde a una inhibición de una proteína quinasa, especialmente una enfermedad neoplásica, más especialmente leucemia que responde a una inhibición de la tirosina quinasa Abl.

35 La cantidad preferida de la dosis, la composición, y la preparación de formulaciones farmacéuticas (medicinas) que son para ser utilizadas en cada caso se describen anteriormente.

Materiales de partida

40 Los nuevos materiales de partida y/o intermedios, así como también procesos para la preparación de los mismos, son en forma similar el objeto de esta invención. En la realización preferida, se utilizan tales materiales de partida y las condiciones de reacción se seleccionan para permitir la obtención de los compuestos preferidos.

El ácido aminobenzoico sustituido de fórmula II, por ejemplo, se puede obtener mediante reacción de un éster de ácido 3-amino-4-R₄-benzoico, por ejemplo ácido 3-amino-4-metilbenzoico, con cianamida y condensando la guanidina obtenible con 3-(dimetilamino)-1-(3-piridinil)-2-propen-1-ona, y finalmente hidrolizando la función éster.

45 Se conocen los materiales de partida de la fórmula III, disponibles comercialmente, o se pueden sintetizar en analogía a o de acuerdo con métodos que son conocidos en la técnica.

Los siguientes Ejemplos sirven para ilustrar la invención sin limitar la invención en su alcance.

Abreviaturas

DMSO dimetilsulfóxido

HPLC/MS-MS cromatografía líquida de alta presión/espectrometría de masa en tándem

50 min minutos

p.f. punto de fusión

NMP N-metil-pirrolidona

RMN resonancia magnética nuclear

PEG polietilen glicol

5 THF tetrahidrofurano

Ejemplos

Ejemplo de Preparación 1: N-(2-Furanilmetil)-4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]benzamida

10 Se agrega una solución que contiene ~50% de anhídrido propilfosfónico en N,N-dimetilformamida (Fluka, Buchs, Suiza; 674 µL, -1 mmol) en 20 minutos a una mezcla agitada de ácido 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-benzoico (214.4 mg, 0.7 mmol), furfuralmina (Aldrich, Buchs, Suiza; 61.8 µL, 0.7 mmol) y trietilamina (776 µL, 5.6 mmol) en 2 ml de N,N-dimetilformamida. Después de agitar durante 24 horas a temperatura ambiente, la mezcla se trata con una solución acuosa saturada media de hidrógeno carbonato de sodio y se extrae tres veces con acetato de etilo. El solvente se evapora bajo presión reducida y el residuo se seca *in vacuo*. El producto crudo se cristaliza a partir de diclorometano para dar el compuesto del título como un sólido cristalino.

15 ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆, δ): 2.28 (s, 3H); 4.43 (d, 2H); 6.23 (m, 1H); 6.33-6.37 (m, 1H); 7.30 (d, 1H); 7.42 (d, 1H); 7.49 (ddd, 1H); 7.53 (m, 1H); 7.59 (dd, 1H); 8.11 (d, 1H); 8.38 (m, 1H); 8.49 (d, 1H); 8.66 (dd, 1H); 8.87 (t, 1H); 9.05 (s, 1H); 9.22 (m, 1H).

El material de partida se prepara como sigue:

Ejemplo 1a: mononitrato de etil éster de ácido 3-[(Aminoiminometil)amino]4-metil-benzoico

20 Se agrega cianamida (Fluka, Buchs, Suiza; 77.4 g, 1.842 mol) a una solución de etil éster de ácido 3-amino-4-metilbenzoico (J. Med. Chem. 16, 118-122, 1973; 150 g, 0.837 mol) en 850 mL de etanol. Se agrega entonces gota a gota ácido clorhídrico (Fluka, Buchs, Suiza; 108 mL de 12M, 1.27 mol) durante 15 min y la mezcla de reacción se agita entonces a 90°C (temperatura de baño) durante 15 horas. El solvente se evapora bajo presión reducida para dar un residuo que se trata con agua (1000 mL) y se agita con enfriamiento a 5-10°C. Se agrega gota a gota una
25 solución de nitrato de amonio (Merck, Darmstadt, Alemania; 134.8 g, 1.68 mol) en agua (400 mL) durante 30 min. seguido por agua helada (1200 mL). Después de agitar durante 30 min. adicionales el producto se filtra, se lava con agua helada (3 x 1000 mL) y se seca al aire. El residuo se lava con dietil éter (2 x 2000 mL) y se seca *in vacuo* a 50°C para dar el compuesto del título como un sólido cristalino, p.f. 195-197°C.

Ejemplo 1b: etil éster de ácido 4-Metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-benzoico

30 Una mezcla agitada del Ejemplo intermedio 1a (164 g, 0.577 mol), 3-(dimetilamino)-1-(3-piridinil)-2-propen-1-ona (113.8 g, 0.646 mol) y NaOH en polvo (99%; Merck, Darmstadt, Alemania; 26.6 g, 0.658 mol) en etanol (2200 mL) se calienta bajo reflujo durante 68 h. El solvente de reacción se evapora bajo presión reducida y el residuo se somete a partición entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica se separa y la fase acuosa se extrae dos veces con acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se lavan con agua y salmuera, se secan (Na₂SO₄) y el solvente se
35 evapora bajo presión reducida para dar un residuo, que se cristaliza a partir de dietil éter para dar el compuesto del título como un sólido cristalino, p.f. -95-96°C.

Ejemplo 1c: ácido 4-Metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-benzoico

40 Se agrega gota a gota hidróxido de sodio acuoso (500 mL de 2M) a una suspensión agitada del Ejemplo intermedio 1b (132.8 g, 0.397 mol) en etanol (1200 mL) y agua (1200 mL). La mezcla de reacción se agita a 45°C durante 2.5 h y luego se trata gota a gota con HCl acuoso (1000 mL de 1 M) durante 1.5 horas. Después de adición de agua (1000 mL) el precipitado se filtra, se lava con agua (4 x 500 mL) y se seca a temperatura ambiente. El agua residual presente en el producto secado al aire se remueve por destilación azeotrópica con tolueno bajo presión reducida. La suspensión seca de tolueno se diluye con dietil éter y se filtra. El residuo sólido se lava con dietil éter y se seca *in vacuo* a 80°C para dar el compuesto del título, p.f. 277-278°C.

45 **Ejemplo 2:** 3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil]benzamida

Utilizando el procedimiento descrito en el ejemplo 1, pero empleando ácido 3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-benzoico en lugar de ácido 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-benzoico y 5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)-bencenammina en lugar de furfuralmina, genera el compuesto del título como un sólido cristalino amarillo pálido p.f. 264-266°C.

Ejemplo 2a: mononitrato de etil éster de ácido 3-[(Aminoiminometil)amino]-benzoico

Utilizando el procedimiento descrito en el ejemplo 1 a pero empleando etil éster del ácido 3-amino-benzoico (Fluka, Buchs, Suiza) en lugar de etil éster de ácido 3-amino-4-metilbenzoico, genera el compuesto del título como un sólido cristalino, p.f 170-172°C.

5 **Ejemplo 2b:** etil éster del ácido 3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-benzoico

Utilizando el procedimiento descrito en el ejemplo 1b pero empleando mononitrato de etil éster de ácido 3-[(aminoiminometil)amino]-benzoico en lugar de mononitrato de etil éster de ácido 3-[(aminoiminometil)amino]-4-metilbenzoico, genera el compuesto del título como un sólido cristalino, p.f 197-199°C.

Ejemplo 2c: ácido 3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-benzoico

- 10 Utilizando el procedimiento descrito en el ejemplo 1c pero empleando etil éster de ácido 3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-benzoico en lugar de etil éster de ácido 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-benzoico, genera el compuesto del título como un sólido cristalino, p.f 291-295°C.

Ejemplo 3: Cápsulas suaves

- 15 5000 cápsulas de gelatina suave, cada una que comprende como ingrediente activo 0.05 g de uno de los compuestos de fórmula I mencionados en los Ejemplos precedentes, se preparan como sigue: 250 g de ingrediente activo pulverizado se suspende en 2L de Lauroglykol® (propileno glicol laurato, Gattefossé S.A., Saint Priest, Francia) y se muele en un pulverizador húmedo para producir un tamaño de partícula de aproximadamente 1 a 3 µm. Luego se introducen porciones de 0.419 g de la mezcla en las cápsulas de gelatina suave utilizando una máquina para llenado de cápsula.

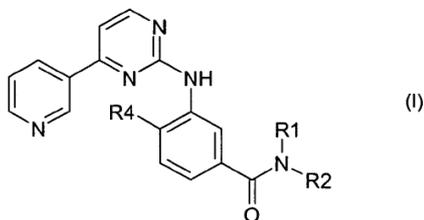
20 **Ejemplo 4:** Datos farmacocinéticos:

- El compuesto de fórmula I a ser probado se formula para administración a ratones hembra OF1 de IFACREDO, Francia, primero disolviendo en NMP, y luego diluyendo con PEG300 a una concentración final de NMP al 10% v/v: PEG300 al 90% v/v, produciendo una solución clara del compuesto. Las concentraciones se ajustaron para suministrar un volumen constate de 10 mL/kg de peso corporal. El compuesto se prepara inmediatamente antes de uso. El compuesto formulado se administra de forma peroral mediante alimentación forzada para proveer dosificaciones de 50 mg/kg. En los puntos de tiempo asignados, se anestesian los ratones (4 en cada momento) con isoflurano al 3% en oxígeno médico y se obtienen las muestras de sangre mediante punción del corazón en tubos heparinizados (ca. 30 IU/mL). Los animales se sacrifican subsecuentemente sin recuperarse de la anestesia. Se prepara el plasma a partir de la sangre mediante centrifugación (10,000 g, 5 min) y se analiza inmediatamente o se almacena congelado a -70° C.

- Las muestras de plasma (10 - 250 µL) reciben por ejemplo la adición de 5 µL de estándar interno, mezcladas con 200 µL de NaOH 0.1 M y 500 µL de cloroformo en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se agita vigorosamente durante 10 minutos en un mezclador Eppendorf. Después de esto, la mezcla se centrifuga (3 min a 10'000xg) la fase orgánica se transfiere a un segundo tubo Eppendorf y se evapora hasta secado en una centrifuga de vacío (Speedvac 5301).
- 35 El residuo seco por ejemplo se disuelve en 250 µL de Acetonitrilo al 10% v/v en agua que contiene ácido fórmico al 0.1%. Se lleva a cabo el análisis subsecuente por ejemplo por HPLC/MS-MS utilizando un sistema HPLC Agilent 1100 Series (Agilent, Palo Alto, CA, USA) con desgasificador en vacío, la bomba binaria, y compartimiento de columna de termostato combinados con un sistema automuestreador enfriado (HTS PAL, CTC Analytics, Zwingen, Suiza). La muestra (5-15 µL) se inyecta por ejemplo en una columna Ultra Phenyl (tamaño de partícula 3 µm, 50 x1 mm; Restek, Bellefonte, USA) con una columna de guarda (4 x 2 mm) del mismo material (Fenomenex, Torrance, USA). Después del equilibrio por ejemplo con agua y un periodo de latencia de 1 min la muestra es eludida por ejemplo mediante un gradiente lineal de 0 -100% de acetonitrilo en agua que contiene 0.2% v/v de ácido fórmico durante un periodo de de 11 min a una rata de flujo de 60 µL/min. La columna se prepara para la siguiente muestra por ejemplo al reequilibrar durante 3 min con 100% de agua a las condiciones de partida. La separación se desarrolla por ejemplo a una temperatura de columna de 40°C. Se introduce el efluente de columna por ejemplo directamente en la fuente de ión de un espectrómetro de masa cuadrupolar de etapa triple (Quattro Ultima™, Micromass, Manchester, UK) controlado por el software Masslynx™ 3.5 (Micromass, Manchester, UK) utilizando como técnica de ionización el modo positivo de ionización por electroaspersión (ESI +). El compuesto se detecta por MS/MS luego de fragmentación de los iones originales. El límite de cuantificación se determina en por ejemplo 0.002 nmol/L. Una curva de calibración se construye con cantidades conocidas de compuesto que incluyen una cantidad fija de estándar interno en el plasma que se procesa como se describió anteriormente. La concentración de muestras no conocidas se calcula a partir de una gráfica de la relación de área de pico del ión hijo seleccionado del análisis al producto de su estándar interno (ordenada) contra la concentración nominal (abscisa). Se desarrolla el análisis de regresión utilizando Quanlynx™, software Masslynx™ 3.5 (Micromass, Manchester, UK).
- 50

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula



en donde

5 R₁ representa hidrógeno;

R₂ representa 5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)-fenil; y

R₄ representa hidrógeno;

o un N-óxido o una sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto.

10 2. Una composición farmacéutica que comprende como un ingrediente activo un compuesto de fórmula I de acuerdo con la reivindicación 1 o un N-óxido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

3. El uso de un compuesto de fórmula I de acuerdo con la reivindicación 1 o un N-óxido o un tautómero posible del mismo o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad que responde a una inhibición de la actividad de la proteína quinasa.

15 4. Un compuesto de fórmula I de acuerdo con la reivindicación 1 o un N-óxido o un tautómero posible del mismo o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en el tratamiento de una enfermedad que responde a una inhibición de la actividad de la proteína quinasa.