

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 486 240**

51 Int. Cl.:

C07D 401/04 (2006.01)

A61K 31/4709 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2004** **E 04816941 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014** **EP 1699421**

54 Título: **Salas de lactato de compuestos de quinolinona y su uso farmacéutico**

30 Prioridad:

07.11.2003 US 517915 P

02.12.2003 US 526425 P

02.12.2003 US 526426 P

19.02.2004 US 546017 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.08.2014

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)

Lichtstrasse 35

4056 Basel, CH

72 Inventor/es:

CAI, SHAOPEI;

CHOU, JOYCE;

HARWOOD, ERIC;

MACHAJEWSKI, TIMOTHY D.;

RYCKMAN, DAVID;

SHANG, XIAO;

ZHU, SHUGUANG;

OKHAMAFE, AUGUSTUS O. y

TESCONI, MARC S.

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 486 240 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

Sales de lactato de compuestos de quinolinona y su uso farmacéutico

Campo de la invención

- La invención es pertinente en general a la preparación de una sal de lactato de 4-amino-5-fluoro-3-[6-metilpiperazin-1-il) -1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona o un tautómero del mismo que tiene solubilidad acuosa y otras propiedades fisicoquímicas deseables (por ejemplo estabilidad, higroscopicidad, cristalinidad y compactabilidad) mejoradas. El compuesto de quinolinona es útil en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por la angiogénesis incluyendo cáncer. Más específicamente, la invención descrita aquí es pertinente a una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de quinolinona específico que inhibe la proteína quinasa el cual tiene acuasolubilidad y propiedades de sustancia farmacéutica deseables mejoradas. La presente invención provee sales que son útiles como inhibidores de la tiroxina quinasa del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular y puede utilizarse en métodos para tratar pacientes en donde está indicada la inhibición de la tiroxina quinasa del receptor de factor de crecimiento endotelial vascular.

Antecedentes de la invención

- El cambio de una forma de una sustancia farmacéutica desde su base o ácidos libres a una forma de sal es una técnica que puede ser empleada para mejorar sus propiedades farmacocinéticas o fisicoquímicas tales como absorción, biodisponibilidad, solubilidad acuosa, estabilidad, higroscopicidad, cristalinidad y procesabilidad (Handbook of Pharmaceutical Salts Properties, Selection, and Use; P. H. Stahl, C.G. Wermuth (Eds.): Chapter 5 Biological effects of the drug salt form; F. Pfannkuch, H. Rettig, P.H. Stahl. Preservation of Pharmaceutical Products to Salt Forms of Drugs and Absorption, Encyclopedia of Pharmaceutical Technology; J. Swarbrick, J.C. Boilan; Vol. 13, p. 433-476). Hasta la fecha sin embargo, no hay un método confiable para predecir exactamente qué efecto tendría el cambiar la sal sobre sus propiedades fisicoquímicas o farmacocinéticas. No hay tampoco una manera confiable de predecir cual agente formador de sal o contraión producirá las propiedades farmacéuticas más deseables en un compuesto o sustancia fármacos. Dependiendo de la dosis requerida, las solubilidades acuosas en el rango de 0.1-1.0 mg/mL son típicas para formulaciones para dosificación oral. La formulación parenteral puede requerir solubilidades más altas, tales como 10 mg/mL o mayores (Handbook of Pharmaceutical Salts Properties, Selection, and Use; P. H. Stahl, C.G. Wermuth (Eds.): Chapter 7. A Procedure for Salt Selection and Optimization; M. J. Bowker).

- En general, una sal puede ser manufacturada mezclando un ácido y una base en un medio adecuado (solución o resina). Metodologías típicas para inducir que la sal cristalice desde el medio incluyen enfriamiento, evaporación, desplazamiento del pH y adición de antisolventes entre otros. Por ejemplo, una sal de un compuesto básico puede ser preparada haciendo reaccionar este compuesto con un ácido inorgánico, un ácido orgánico, un aminoácido ácido. Las sales formadas agregando bases inorgánicas y bases orgánicas, tales como catión amina, amonio y compuestos de amonio cuaternarios a una sustancia fármaco también están incluidas en la definición de "sales farmacéuticamente aceptables".

- El ión salina seleccionado puede influenciar significativamente la farmacocinética de un fármaco, especialmente la absorción o el proceso de transferencia por membrana. Se sabe que la forma en sal de una sustancia fármaco influye los factores que afectan la biodisponibilidad. Las sales difieren en sus perfiles de solubilidad y en sus ratas de disolución las cuales afectan la rata de absorción del fármaco y su biodisponibilidad. La solubilidad de una sustancia fármaco puede ser mejorada convirtiendo la base o ácido libres en una forma de sal. La solubilidad de una sustancia fármaco afecta el perfil farmacocinético, la estabilidad química y la formulación final de la composición de dosificación final. La solubilidad del compuesto depende de las propiedades físicas y químicas de la sustancia fármaco y otros factores tales como temperatura, presión y propiedades del solvente (tal como pH). Las propiedades físicas y químicas pueden variar de una forma de sal a otra.

- La forma de sal particular de una sustancia fármaco puede afectar su estabilidad lo cual puede afectar significativamente la selección de la forma de dosificación, el proceso de manufactura, empaque y el beneficio terapéutico último del producto fármaco terminado. Los factores que influyen en la estabilidad incluyen higroscopicidad y cristalinidad. Las sales no higroscópicas así como las sales cristalinas, no amorfas se prefieren en general para desarrollar formulaciones con propiedades óptimas de almacenamiento, manejo y procesamiento.

- La procesabilidad (esto es, la morfología cristalina y compactabilidad) es otra característica que se debe considerar cuando se selecciona una forma de sal. En general, se prefieren los cristales en forma de placa sobre los cristales en forma de aguja por sus mejores propiedades de flujo de polvo a granel. La compactabilidad es definida como la capacidad del material pulverizado para ser comprimido en una tableta de resistencia específica a la tensión y es de particular importancia en un fármaco de alta dosis.

- La capacidad para formar una sal a partir del ácido o base libres de una sustancia fármaco provee un medio para alterar las características químicas, físicas y/o biológicas de un producto fármaco sin modificar su fórmula química.

Tales cambios permiten que se desarrollen formulaciones que tengan solubilidad, estabilidad, procesabilidad y biodisponibilidad incrementadas sobre la sustancia fármaco original.

Los capilares se encuentran en casi todos los tejidos del cuerpo humano y suministran a los tejidos oxígeno y nutrientes a la vez que retiran productos residuales. Bajo condiciones típicas, las células endoteliales que recubren los capilares no se dividen, y los capilares, por lo tanto, no se incrementan normalmente en número o tamaño en un adulto humano. Bajo ciertas condiciones normales, sin embargo, tales como aquellas cuando un tejido es dañado, o durante ciertas partes del ciclo menstrual, los capilares comienzan a proliferar rápidamente. Este proceso de formar nuevos capilares a partir de vasos sanguíneos preexistentes es conocido como angiogénesis o neovascularización. Véase Folkman, J. *Scientific American* 275, 150-154 (1996). La angiogénesis durante la curación de heridas es un ejemplo de neovascularización patofisiológica durante la vida adulta. Durante la cicatrización de heridas, los capilares adicionales proveen un suministro de oxígeno y nutrientes, promueven la granulación del tejido, y ayudan en la eliminación de residuos. Después de la terminación del proceso de curación, los capilares experimentan regresión nuevamente. Lymboussaki, A. "Vascular Endothelial Growth Factors and their Receptors in Embryos, Adults, and in Tumors" Academic Dissertation, University of Helsinki, Molecular/Cancer Biology Laboratory and Department of Pathology, Haartman Institute, (1999).

La angiogénesis también juega un papel importante en el crecimiento de células cancerosas. Se sabe que una vez que un nido de células cancerosas alcanza un cierto tamaño, aproximadamente 1 a 2 mm de diámetro, las células cancerosas deben desarrollar un suministro de sangre con el fin de que el tumor crezca más puesto que la difusión no será suficiente para suministrar a las células cancerosas el suficiente oxígeno y nutrientes. Así, se espera que la inhibición de la angiogénesis detenga el crecimiento de las células cancerosas.

Las tirosina quinasas receptoras (RTKs) son polipéptidos transmembrana que regulan el crecimiento y diferenciación, remodelación y regeneración celular durante el desarrollo en tejidos de adultos. Mustonen, T. et al., *J. Cell Biology* 129, 895-898 (1995); van der Geer, P. et al. *Ann Rev. Cell Biol.* 10, 251-337 (1994). Los ligandos polipeptídicos conocidos como factores de crecimiento o citoquinas, son conocidos por activar los RTKs. La señalización de RTKs involucra el enlazamiento de ligandos y un desplazamiento en la conformación en el dominio externo del receptor dando como resultado su dimerización. Lymboussaki, A. "Vascular Endothelial Growth Factors and their Receptors in Embryos, Adults, and in Tumors" Academic Dissertation, University of Helsinki, Molecular/Cancer Biology Laboratory and Department of Pathology, Haartman Institute, (1999); Ullrich, A. et al., *Cell* 61, 203-212 (1990). El enlazamiento del ligando al RTK da como resultado una transfosforilación del receptor en residuos de tirosina específicos y la activación subsecuente de los dominios catalíticos para la fosforilación de sustratos citoplasmáticos. Id.

El FLT-3 es una tirosina quinasa receptora que pertenece a la familia de receptores PDGF expresados sobre células de leucemia mielogenosa aguda (AML) en la mayoría de pacientes y puede estar presente en forma silvestre o tener mutaciones de activación que dan como resultado una función de quinasa constitutivamente activa. Una mutación en tándem repetida (ITD) interna se expresa en aproximadamente el 25% de pacientes de AML y ha sido asociada con una pobre prognosis en pacientes de AML. Levis, M. et al., *Blood* 99, 11; 202.

El c-Kit es otra tirosina quinasa receptora que pertenece a la familia de receptores PDGF y se expresan normalmente en un progenitor hematopoyético, en mastocitos y células germinales. La expresión del c-kit ha sido implicada en un cierto número de cánceres incluyendo leucemia de mastocitos, tumores de células germinales, carcinoma de pulmón de células pequeñas, tumores estromales gastrointestinales, leucemia mielogenosa aguda (AML), neuroblastoma, melanoma, carcinoma del ovario, carcinoma de seno. Heinrich, M. C. et al., *J. Clin. Onc.* 20, 6 1692-1703, 2002 (review article); Smolich, B. D. et al., *Blood*, 97, 5; 1413-1421.

La c-ABL es una tirosina quinasa que fue identificada originalmente como un producto oncogénico a partir del genoma del virus de leucemia murina Abelson. Aproximadamente el 90% de la leucemia mielogenosa crónica (CML), del 20-30% de la leucemia linfoblástica aguda (ALL) y aproximadamente el 1% de la leucemia mieloblástica aguda (AML) tienen una translocación recíproca entre el cromosoma 9 y el 22. La translocación da como resultado el cromosoma "Filadelfia" y esta es la razón para la expresión de un transcrito BCR/ABL quimérico.

La FGFR3 es una tirosina quinasa asociada con diversos cánceres. El receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3) es una tirosina quinasa receptora de clase IV. La FGFR3 es desregulada debido a una translocación t(4,14) en aproximadamente 15 – 20% de los pacientes con mieloma múltiple. Esta translocación produce la expresión de una FGFR3 funcional que puede responder a FGF1 en, por ejemplo, el microambiente de un hueso. En algunos casos, la activación de las mutaciones que hacen que el ligando FGFR3 sea independiente han sido identificadas. Se ha encontrado que estas mutaciones de activación de FGFR3 producen la progresión de tumores tipo Ras y existe evidencia de que se utilizan rutas de señalización similares (Chesi, et al., *Blood* 2001 97 729-736).

La CSF-1 (factor 1 de estimulación de colonias) y su receptor macrófago CSFR1 (Fms) son requeridos para la proliferación de macrófagos y la diferenciación así como del desarrollo de la placenta. Se expresa durante el

embarazo y la lactancia en la glándula mamaria. La expresión anormal de CSFR1 ha sido correlacionada con una etapa avanzada y prognosis pobre en pacientes con cáncer de seno.

La C-Met es una tirosina quinasa receptora que enlaza el HGF (factor de crecimiento de hepatocitos). La C-Met está implicada en la tumorigénesis, progresión de tumores y metástasis de tumores múltiples incluyendo cáncer de colon, mieloma múltiple, cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas y carcinoma de células renales. La C-Met ha sido encontrada mutada, amplificada y sobreexpresada en múltiples cánceres.

Dos subfamilias de RTKs son específicas para el endotelio vascular. Incluyen la subfamilia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y la subfamilia del receptor Tie. La clase VRTKs incluye VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3. Shibuya, M. et al., *Oncogene* 5, 519-525 (1990); Terman, B. et al., *Oncogene* 6, 1677-1683 (1991); Aprelikova, O. et al., *Cancer Res.* 52, 746-748 (1992).

Los miembros de la subfamilia VEGF han sido descritos como capaces de inducir la permeabilidad vascular y la proliferación de células endoteliales y han sido identificados adicionalmente como inductores principales de la angiogénesis y la vasculogénesis. Ferrara, N. et al., *Endocrinol. Rev.* 18, 4-25 (1997). La VEGF es conocida por enlazarse específicamente a RTKs incluyendo VEGFR-1 y VEGFR-2. DeVries, C. et al., *Science* 255, 989-991 (1992); Quinn, T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 7533-7537 (1993). La VEGF estimula la migración y proliferación de las células endoteliales e induce la angiogénesis tanto *in vitro* como *in vivo*. Connolly, D. et al., *J. Biol. Chem.* 264, 20017-20024 (1989); Connolly, D. et al., *J. Clin. Invest.* 84, 1470-1478 (1989); Ferrara, N. et al., *Endocrinol. Rev.* 18, 4-25 (1997); Leung, D. et al., *Science* 246, 1306-1309 (1989); Plouet, J. et al., *EMBO J* 8, 3801-3806 (1989).

Puesto que la angiogénesis es conocida por ser crítica para el crecimiento del cáncer y ser controlada por VEGF y VEGF-RTK, se han emprendido esfuerzos sustanciales para desarrollar procedimientos terapéuticos que sean antagonistas de VEGF-RTK para por lo tanto inhibir o retardar la angiogénesis y, ojala, interferir o detener la proliferación tumoral.

Los RTKs de clase III son caracterizados por una región extracelular compuesta de cinco dominios similares a inmunoglobulina y por un dominio de tirosina quinasa dividido. Algunos de los RTK de clase III que son inhibidos por los compuestos de la fórmula 1, incluyen pero no están limitados a, KIT, FMS, FLT3, PDGFR α , y PDGFR β .

Los RTKs de clase IV contienen tres dominios similares a inmunoglobulina en sus regiones extracelulares. Por ejemplo la FGFR es un RTK de clase IV el cual es inhibido por los compuestos de la fórmula 1.

Ejemplos de RTKs de clase V que son inhibidos por el compuesto de la fórmula 1 incluyen, pero no se limitan a, VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3.

Se ha reportado una amplia variedad de compuestos químicos y composiciones que tienen actividad contra uno o más de los VEGF-RTKs. 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 la Patente de los Estados Unidos No. 6,258,951) anticuerpos monoclonales (véase, por ejemplo, EP 1 086 705 A1), diversas 5, 10, 15, 20-tetraaril-porfirinas y 5, 10, 15-triaril corroles (véase, por ejemplo WO 00/27379), derivados de ácidos alcanosulfónicos y alcanocarboxílicos heterocíclicos (véase, por ejemplo, DE 19841985), derivados de oxindolilquinazolina (véase, por ejemplo, WO 99/10349), derivados de 1,4-diazaantracina (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 5, 763,441), y derivados de cinolina (véase, por ejemplo, WO 97/34876), y diversos compuestos de indazol (véase, por ejemplo, WO 01/02369 y WO 01/53268).

Se han divulgado recientemente diversos compuestos de indolilo sustituidos en WO 01/29025, WO 01/62251, y WO 01/62252, y diversos compuestos de bencimidazolilo, han sido divulgados recientemente en WO 01/28993. Se reporta que estos compuestos son capaces de inhibir, modular, y/o regular la transducción de señales de tirosina quinasas tanto de tipo receptor como de tipo no receptor. Algunos de los compuestos divulgados contienen un fragmento de quinolona enlazado al grupo indolilo o bencimidazolilo.

La síntesis de derivados de la 4-hidroxi quinolona y 4-hidroxi quinolina está divulgada en un cierto número de referencias. Por ejemplo, Ukrainets *et al.* han divulgado la síntesis de 3-(bencimidazol-2-il)-4-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinoline. Ukrainets, I. et al., *Tet. Lett.* 42, 7747-7748 (1995); Ukrainets, I. et al., *Khimiya Geterotsiklicheskih Soedinii*, 2, 239-241(1992). Ukrainets también ha divulgado la síntesis, la actividad anticonvulsiva y anti-tiroides de otras 4-hidroxi quinolonas y análogos tio tales como 1H-2-oxo-3-(2-bencimidazolil)-4-hidroxiquinolinine. Ukrainets, I. et al., *Khimiya Geterotsiklicheskih Soedinii*, 1, 105-108 (1993); Ukrainets, I. et al., *Khimiya Geterotsiklicheskih Soedinii*, 8, 1105-1108 (1993); Ukrainets, I. et al., *Chem. Heterocyclic Comp.* 33, 600-604, (1997).

La síntesis de diversos derivados de quinolina está divulgada en WO 97/48694. Se divulga que estos compuestos son capaces de enlazarse a receptores de hormonas nucleares y ser útiles para estimular la proliferación de

osteoblastos y crecimiento óseo. Los compuestos son divulgados también como útiles en el tratamiento o prevención de enfermedades asociadas con familias de receptores de hormonas nucleares.

Diversos derivados de quinolina en los cuales el anillo bencénico de la quinolina está sustituido con un grupo sulfuro se divulgan en WO 92/18483. Estos compuestos se divulgan como útiles en formulaciones farmacéuticas y como medicamentos.

Se han divulgado derivados de quinolina y cumarina por tener uso en una variedad de aplicaciones no relacionadas con la medicina y formulaciones farmacéuticas. Las referencias que describen la preparación de derivados de quinolina para uso en composiciones fotopolimerizables o por sus propiedades luminiscentes incluyen: la Patente de los Estados Unidos No. 5, 801,212 concedida a Okamoto et al.; JP 8-29973; JP 7-43896; JP 6-9952; JP 63-258903; EP 797376; y DE 23 63 459.

Se han divulgado derivados de quinolinona en la solicitud de Patente de los Estados Unidos serie No. 09/951,265 publicada el 8 de agosto de 2002 como US 2002/0107392 y en una solicitud PCT publicada el 21 de marzo de 2002, como WO 02/22598A1, los cuales son útiles como inhibidores de VEGF-RTK. Ambas referencias anteriores se incorporan aquí como referencia en su totalidad y para todos los propósitos. Sin embargo, existe una necesidad continuada para mejorar la biodisponibilidad, estabilidad, solubilidad e higroscopicidad de los compuestos que inhiben la proliferación de capilares, inhiben el crecimiento de tumores, y/o inhiben la tirosina quinasa receptora del factor de crecimiento endotelial vascular y formulaciones farmacéuticas que contengan tales compuesto por conversión de las bases y ácidos libres en sus correspondientes formas en sal.

Como resultado de la inhibición de diversos RTKs, otras funciones celulares estimuladas por el ligando son bloqueadas, incluyendo la activación de moléculas de señalización corriente abajo, proliferación celular y supervivencia. Agentes que actúan como inhibidores de RTKs específicos son útiles en el tratamiento de enfermedades diseminadas y leucemia, así como de tumores sólidos, aparte de la actividad antiogénica del agente. Esto es, compuestos tales como los descritos en WO 01/60814, los cuales tienen amplio rango de actividad en diferentes RTKs y PTKs y son agentes antiangiogénicos así como agentes antitumorales.

El mieloma múltiple (MM), una enfermedad de las células B malignas, es caracterizado por la acumulación de células de plasma clonal en la médula ósea (BM) y por lesiones osteolíticas en huesos. Trasplantes autólogos de células madre (ASCT) y avances en el cuidado de soporte han tenido un impacto significativo sobre la enfermedad y la supervivencia a largo plazo. Attal, M. et al., N. Engl. J. Med., 1996; 335:91-97; y Barlogie, B. et al., Blood, 1997; 89:789-793. Sin embargo, los pacientes invariablemente son relapsos, y la MM sigue siendo una enfermedad fatal universal. La identificación de translocaciones cromosómicas no aleatorias en MM ha dado como resultado el desarrollo de herramientas de pronóstico poderosas y la identificación de objetivos moleculares novedosos. Casi la mitad de los pacientes con MM sobreexpresan un oncógeno putativo, desregulado por una de cinco translocaciones pesadas de inmunoglobulina recurrentes (IgH): 11q13 (cyclin D1), 6p21 (cyclin D3), 4p16 (FGFR3 and MMSET), 16q23 (c-maf) and 20q11 (mafB). Kuehl, W. M. et al., Nat Rev Cancer, 2002; 2:175-187; y Avet-Loiseau, H. et al., Blood, 2002; 99:2185-2191. Estas translocaciones probablemente representan un evento temprano y posiblemente seminal en el desarrollo del MM. Más recientemente, se ha hecho claro que estas translocaciones de IgH específico imparten significado pronóstico. Particularmente, la translocación t(4;14) la cual ocurre en aproximadamente el 20% de los pacientes parece conferir una prognosis particularmente pobre para MM, sin beneficio terapéutico aparente para ASCT. Fonseca, R. et al., Blood, 2003; 101:4569-4575; Keats, J. J. et al., Blood, 2003; 101:1520-1529; Moreau, P. et al., Blood, 2002; 100:1579-1583; y Chang, H. et al., Br. J. Haematol., 2004; 125:64-68. Claramente, se requieren novedosas metodologías de tratamiento para estos pacientes.

La translocación t(4;14) es inusual en cuanto a que parece desregular dos oncógenos potenciales, MMSET en der(4) y FGFR3 en der(14). Chesi, M. et al., Nat. Genet., 1997; 16:260-265; y Chesi, M. et al., Blood, 1998; 92:3025-3034. No se sabe si la desregulación de cualquiera o ambos de estos genes es crítica para la patogénesis del MM, sin embargo varias líneas de evidencia soportan el papel de FGFR3 en la iniciación y progresión del tumor. La activación de WT FGFR3, un RTK, promueve la proliferación y supervivencia en las células de mieloma y se transforma débilmente en un modelo de ratón hematopoyético. Plowright, E. E. et al., Blood, 2000; 95:992-998; Chesi, M. et al., Blood, 2001; 97:729-736; and Pollett, J. B. et al., Blood, 2002; 100:3819-3821. La adquisición subsecuente de mutaciones activadoras de FGFR3 en algunos MM está asociada con la progresión a un mieloma en etapa posterior y son fuertemente transformantes en varios modelos experimentales. Chesi, M. et al., Blood, 2001; 97:729/736; nd Li, Z. et al., Blood, 2001; 97:2413-2419. Estudios *in vitro* sugieren que FGFR3 puede impactar la quimiorresistencia, una observación soportada por datos clínicos que demuestran pobres respuestas a una quimioterapia convencional y una supervivencia media acortada de pacientes de MM con t(4;14). Fonseca, R. et al., Blood, 2003; 101:4569-4575; Keats, J. J. et al., Blood, 2003; 101:1520-1529; Moreau, P. et al., Blood, 2002; 100:1579-1583; and Chang, H. et al., Br. J Haematol., 2004; 125:64-68. Estos hallazgos sugieren que la expresión ectópica de FGFR3 puede jugar un papel significativo si bien no singular en la oncogénesis de mieloma haciendo así que este RTK sea un objetivo para una terapia con base molecular.

- La inhibición de FGFR3 en líneas celulares de MM con t(4;14) induce respuestas citotóxicas que demuestran que estas células permanecen dependientes de la señalización de FGFR3 con independencia de la complejidad de las alteraciones genéticas en estas células derivadas de pacientes en etapa terminal. Trudel, S. et al., Blood, 2004; 103:3521-3528; Paterson, J. L. et al., Br. J. Haematol., 2004; 124:595-603; y Grand, E. K. et al., Leukemia, 2004; 18:962-966. Estas observaciones son congruentes con los resultados de la inactivación de la tiroxina receptora en un rango de enfermedades malignas humanas en donde se han documentado éxitos clínicos y alentado el desarrollo clínico de inhibidores de FGFR3 para el tratamiento de estos pacientes con prognosis pobre. Druker, B. J. et al., N. Engl. J. Med., 2001; 344:1031-1037; Demetri, G. D. et al., N. Engl. J. Med., 2002; 347:472-480; Slamon, D. J. et al., N. Engl. J. Med. 2001; 344:783-792; and Smith, B. D. et al., Blood, 2004; 103:3669-3676.
- 10 La US 2002/107192 divulga formulaciones farmacéuticas que comprenden derivados de quinolinona y métodos para preparar las formulaciones farmacéuticas que comprenden derivados de quinolinona. Se dice que las formulaciones farmacéuticas son útiles en la inhibición de la proliferación de capilares, inhibiendo el crecimiento de tumores, y/o inhibiendo la tiroxina quinasa receptora del factor de crecimiento endotelial vascular.
- 15 En Berge, S. et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, 1997, 66(11); 1-19 divulga sales farmacéuticas y estudios fisicoquímicos en ratas de disolución, solubilidad, estudios organolépticos y estabilidad, así como efectos sobre la biodisponibilidad y toxicidad.
- 20 La WO 2004/043389 divulga métodos para tratar el cáncer utilizando 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona. Se dice que los métodos son efectivos para el tratamiento de tumores sólidos o leucemias, incluyendo próstata, colorrectal, mieloma múltiple de seno, carcinoma pancreático, de células pequeñas, leucemia mielogenosa aguda, leucemia mielogenosa crónica, enfermedad microproliferativa. Este documento también divulga métodos para medir cantidades de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona y determinar un perfil metabólico.
- 25 La US 2002/107392 divulga derivados de quinolinona de los que se dice que son útiles en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por la angiogénesis incluyendo cáncer. Se dice que los derivados de quinolinona son útiles en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por la actividad de tiroxina quinasas receptoras del factor de crecimiento endotelial vascular.

Resumen de la invención

- 30 La invención provee sales de lactato farmacéuticamente aceptables del 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, o de un tautómero del mismo, métodos para producir tales sales, formulaciones farmacéuticas y medicamentos que incluyen tales sales, uso de las sales en la preparación de medicamentos y formulaciones farmacéuticas para uso en el tratamiento de diversas condiciones, y usos en métodos de tratamiento que utilizan la sal farmacéuticamente aceptable o formulaciones farmacéuticas de la invención.
- 35 Para evitar cualquier duda, la expresión "sal de lactato" se refiere a una sal de lactato del 4-amino-5-fluoro-3-[6-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, o a una sal de lactato del tautómero de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona.
- 40 En una realización, la sal de lactato tiene una solubilidad en agua a 22°C desde aproximadamente 5 mg/mL hasta aproximadamente 400 mg/mL. En algunas realizaciones, la sal de lactato tiene una solubilidad en agua de desde aproximadamente 100 mg/mL hasta aproximadamente 400 mg/mL. En otras realizaciones, la sal de lactato tiene una solubilidad en agua de desde aproximadamente 200 mg/mL hasta aproximadamente 400 mg/mL. En algunas realizaciones, la sal de lactato tiene una solubilidad en agua de más de 30 mg/mL. En otras realizaciones, la sal de lactato tiene una solubilidad en agua desde aproximadamente 150 mg/mL hasta aproximadamente 250 mg/mL. En otra realización, la sal de lactato es capaz de disolverse en un medio acuoso por debajo de aproximadamente pH 7, tal como de desde pH 1-7, de desde pH 3-7, o desde pH 4-7. En algunas realizaciones, la sal de lactato es cristalina y en algunas tales realizaciones comprende cristales en forma de placa.
- 45 En algunas realizaciones la sal de lactato es una sal de DL-lactato. En otras realizaciones, la sal de lactato es una sal de L-lactato. En aún otras realizaciones la sal de lactato es una sal de D-lactato. En todavía otras realizaciones, la sal de lactato es una mezcla de la sal D-lactato y de las sales L-lactato. Las sales pueden estar presentes en más de una forma. De acuerdo con la presente invención, el racemato o un enantiómero específico puede ser utilizado para preparar las sales de la invención.
- 50 La sal de lactato es una sal de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona o un tautómero del mismo. En algunas realizaciones, la sal es una sal monolactato o bis-lactato del 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, o un tautómero del mismo. En realizaciones más preferidas, la sal es una sal DL-lactato de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, o un tautómero del mismo. En otras tales realizaciones, la sal es una sal L-lactato del 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiper-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, o un tautómero del mismo. En todavía otras
- 55

realizaciones, la sal es una sal D-lactato del 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, o un tautómero del mismo.

En algunas realizaciones, la invención provee un método para preparar una sal de lactato. Tales métodos incluyen típicamente:

- 5 (a) suspender 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, o un tautómero del mismo, en un solvente o mezcla de solventes;
- (b) poner en contacto ácido láctico con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, o un tautómero del mismo, para proveer una mezcla;
- (c) calentar la mezcla;
- 10 (d) enfriar la mezcla;
- (e) y aislar la sal.

En algunos métodos para preparar la sal de lactato, la mezcla se enfría y la sal es precipitada desde la solución.

En algunos métodos para preparar una sal de lactato, la mezcla es calentada y sometida a reflujo antes del enfriamiento.

- 15 En algunos métodos para preparar una sal de lactato, el solvente es un solvente prótico.

En algunas realizaciones del método para preparar una sal de lactato, el solvente se selecciona de metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, 2-butanol, acetona, butanona, dioxanos, agua, tetrahidrofurano, o combinaciones de estos.

- 20 En una realización preferida del método para la preparación de una sal de lactato, la etapa de aislamiento incluye filtrar la mezcla.

La invención provee adicionalmente una composición que comprende una tableta de la sal de lactato.

La invención provee adicionalmente formulaciones farmacéuticas y medicamentos. Tales formulaciones y medicamentos incluyen la sal de lactato en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 25 La invención también provee usos en métodos para tratar cáncer o inhibir la proliferación de capilares. Tales métodos incluyen la administración de una cantidad efectiva de una sal de lactato de la invención o una formulación farmacéutica o medicamento que incluye la sal de lactato de la invención a un paciente que así lo requiere.

Objetivos, características y ventajas adicionales de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

- 30 La figura 1 es una gráfica que muestra que el 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona inhibe la proliferación de líneas celulares de mieloma múltiple incluyendo KMS11, OPM-2 y H929.

La figura 2 es una inmunoprecipitación western que muestra que el 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona inhibe la fosforilación de FGFR3 a 0.5 μ m en células KMS 11.

- 35 Las figuras 3A, 3B y 3C son inmunoprecipitaciones western que muestran que el 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona inhibe la fosforilación de ERK a 0.5 μ m en células KMS 11 (Figura 3A), a 0.1 μ m en células OPM-2 (Figura 3B), y no tiene efecto sobre la fosforilación de ERK hasta 5 μ m en células H929 (Figura 3C).

- 40 La figura 4 es una gráfica que muestra la apoptosis de células KMS, medidas según la tinción de Annexin VPE, cuando tales células fueron incubadas con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona a diversas concentraciones.

La figura 5 es una gráfica que muestra que el 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, a diversas concentraciones, tiene efectos menores sobre el ciclo celular de células KMS 11 cuando es incubado con la célula durante 72 horas pero induce la apoptosis.

La figura 6 es una gráfica que muestra la apoptosis de células OPM-2, medida mediante la tinción Annexin VPE, cuando tales células fueron incubadas con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona a diversas concentraciones.

- 5 La figura 7 es una gráfica que muestra que 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, a diversas concentraciones, tiene efectos menores sobre el ciclo celular de células OPM-2 cuando es incubado con las células durante 72 horas pero induce la apoptosis.

La figura 8 es una gráfica que muestra que el 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, a diversas concentraciones, tiene efectos menores o ninguno sobre el ciclo celular de células H929 cuando se incubaba con las células.

- 10 La figura 9 es una gráfica que muestra que la proliferación mediada por M-CSF de una línea celular mieloblastica de ratón M-NFS-60 fue inhibida cuando las células fueron incubadas con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (EC_{50} de 220 nM).

- 15 La figura 10 es una gráfica que muestra que el 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona inhibe la viabilidad de células B9 que expresan FGFR3, pero no células originales estimuladas con interleucina-6 (IL6). Los valores representan la desviación estándar +/- promedio de cuatro experimentos independientes.

- 20 La figura 11 es una gráfica que muestra la apoptosis en diversas líneas celulares de mieloma humano establecidas con una prueba de citometría de flujo de enlazamiento con annexina V y exclusión con yoduro de propidio. Se incubaron células KMS11, KMS18, OPM2, H929, y 8226 con vehículo (barra no sombreada); con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona 100 nM (barra sombreada); y con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona 500 nM (barra rayada). Los valores representan la desviación estándar +/- promedio de cuatro experimentos independientes.

- 25 Las figuras 12A-12D son gráficas que muestran que el 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona inhibe la fosforilación de ERK1/2 mediada por FGF e induce la citotoxicidad en células de mieloma múltiple primario que expresan FGFR3. La figura 12A muestra una gráfica obtenida utilizando citometría de flujo de células teñidas con anticuerpo de FGFR3 (abierto) o suero preinmune de conejo (lleno) y luego teñidas con FITC anticonejo de cabra. Las células de mieloma fueron identificadas mediante marcación de CD138. La figura 12B muestra una gráfica obtenida utilizando citometría de flujo de células de mieloma primarias, incubadas en la ausencia (lentos) o presencia de aFGF (-) o pre-incubada con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona 500 nM durante 2 horas y luego estimulada con aFGF. La fosforilación de ERK1/2 fue establecida utilizando citometría de flujo. Las figuras 12C y 12D son gráficas obtenidas utilizando citometría de flujo de células de mieloma primarias cultivadas en medio de crecimiento en la presencia de DMSO (Figura 12C) o 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona 500 nM (Figura 12D). Las células fueron recolectadas después de 7 días y teñidas con annexin V-FITC y analizadas por citometría de flujo. Las células de mieloma fueron identificadas por marcación con $CD38^{++}/CD45^{-}$. El porcentaje total de células $CD38^{++}/CD45^{-}/annexin V^{+}$ se muestra en el cuadrante superior derecho.

- 35 Las figuras 13A y 13B son gráficas que muestran que el 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona inhibe la viabilidad de células KMS11 en la presencia de interleucina-6 (IL6), factor de crecimiento de insulina (IGF-1), y células estromales de médula ósea (BMSCs). La figura 13A es una gráfica en la cual las células KMS11 fueron cultivadas con DMSO (barra no sombreada); con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona 100 nM (barra sombreada); y con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona 500 nM (barra rayada) en presencia o ausencia de IL6 50 ng/mL o IGF-1 50 ng/mL. La viabilidad celular fue establecida por la prueba de MTT después de 48 horas. La figura 13B es una gráfica en la cual las BMSCs solas o juntas con KMS 11 fueron cultivadas con DMSO (barra no sombreada); con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona 100 nM (barra sombreada); y con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona 500 nM (barra rayada). La viabilidad fue establecida después de 96 horas mediante el ensayo MTT. Los datos representan las medias de cultivos cuadruplicados +/- en desviaciones estándar.

- 50 La figura 14 es una gráfica que muestra que el 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona inhibe la proliferación de M-NFS-60, una línea celular mieloblástica de ratón guiada por el crecimiento de M-CSF con un EC_{50} de 220 nM. Las células M-NFS-60 fueron incubadas con diluciones seriadas de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-benzamidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona en la presencia de M-CSF y sin GM-CSF. El número de células viables se estableció después de 72 horas utilizando la prueba de Cell Titer-Glo™.

- 55 La figura 15 es una gráfica que muestra que el 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona inhibe la fosforilación de FGFR3 y demuestra los efectos antitumorales *in vivo*. Cuando el tamaño del tumor alcanzó 200 mm³, los ratones fueron asignados aleatoriamente (8 – 10/grupo) para recibir solo

vehículo o dosis variables de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona por ingesta oral durante 21 días. La gráfica muestra el volumen del tumor (promedio +/- de desviación estándar) como una función de los días de tratamiento.

Descripción detallada de la invención

- 5 La presente invención provee sales novedosas de lactato de un compuesto de quinolinona, o un tautómero del mismo, que actúa como un antagonista de las tirosina quinasas receptoras, y más particularmente como un inhibidor de la función de FGFR1 y FGFR3, PDGFR α y PDGFR β , macrófago CSFR-1, FLT-3, c-KIT y/o VEGF-RTK. Tales quinasas también pueden incluir IGFR1, EphA2, FGFR2, y FGFR4. Las sales provistas aquí pueden ser formuladas en formulaciones farmacéuticas que son útiles en el tratamiento de pacientes con necesidad de un inhibidor de
- 10 VEGF-RTK, especialmente, en realizaciones particulares, para proveer composiciones y usos en métodos para reducir la proliferación capilar y en el tratamiento del cáncer.

Algunas de las propiedades mejoradas que imparten las sales de lactato incluyen solubilidad, higroscopicidad, cristalinidad, compactabilidad y morfología.

A lo largo de esta solicitud se usan las siguientes abreviaturas y definiciones:

- 15 "bFGF" es una abreviatura que significa factor de crecimiento básico de fibroblasto;
- "bFGFR" también denominado como FGFR1, es una abreviatura que significa una tirosina quinasa receptora que interactúa con el factor de crecimiento de fibroblasto FGF;
- "C-MET", también denominado como "receptor HGF", es una abreviatura que significa el producto celular del gen MET o del receptor de factor de crecimiento de hepatocitos; una tirosina quinasa receptora que interactúa con el
- 20 factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) también denominado como factor Scatter;
- "CSF-1" es una abreviatura que significa factor 1 estimulante de colonias y su receptor. El macrófago CSFR-1 (Fms) es un receptor para CSF-1;
- "EGFR1" es una abreviatura que significa receptor 1 del factor de crecimiento epidérmico y se enlaza al factor de crecimiento epidérmico "EGF";
- 25 "EphA2" es una abreviatura que significa receptor A2 de efrina, también denominado como tirosina quinasa receptora de células epiteliales o ECK;
- "ERK" es una abreviatura que significa quinasa regulada extracelular;
- "FACS" es una abreviatura que significa selección celular activada por fluorescencia;
- "FBS" es una abreviatura que significa suero bovino fetal;
- 30 "Flk-1" es una abreviatura que significa tirosina quinasa 1 de hígado fetal, también conocida como tirosina quinasa de dominio de inserto de quinasa o KDR (humana) también conocida como receptor 2 de factor de crecimiento endotelial vascular o VEGFR2 (KDR (humano), Flk-1 (ratón));
- "FLT-1" es una abreviatura que significa tirosina quinasa similar a fins, también conocida como receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular o VEGFR1;
- 35 "FLT-3" es una abreviatura que significa tirosina quinasa 3 similar a fins, también conocida como tirosina quinasa 1 de células madre (STK I);
- "FLT-4" es una abreviatura que significa tirosina quinasa similar a fms, también conocida como VEGFR3;
- "FGFR2" y "FGFR4" son abreviaturas que significan receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblasto y receptor 4 del factor de crecimiento de fibroblasto, respectivamente. FGFR2 y FGFR4 son tirosina quinasas receptoras de clase
- 40 IV;
- "FGFR3" es una abreviatura que significa receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblasto de tirosina quinasa que se expresa en 15 – 20% de los cánceres tipo mieloma múltiple;
- "G₁" es una abreviatura que significa una fase del ciclo celular eucariota estándar. En el ciclo celular estándar, la fase G₁ es la brecha entre la fase S y después de la fase M y G₂ es la brecha después de la fase S y antes de la
- 45 fase M;

"GM-CSF" es una abreviatura que significa factor estimulante de colonia de macrófagos de granulocitos;

"IGFR1" es una abreviatura que significa receptor 1 del factor de crecimiento similar a insulina. El IGFR1 es una tirosina quinasa receptora de clase II;

"HER2" es una abreviatura que significa receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano;

5 "IL6" es una abreviatura que significa interleucina 6;

"KDR" es una abreviatura que significa receptor que contiene el dominio del inserto de quinasa, también conocido como receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular o "VEGFR2";

"MAPK" es una abreviatura que significa proteína quinasa activada por mitógeno;

"M-CSF" es una abreviatura que significa factor estimulante de colonias de macrófagos;

10 "PDGF" es una abreviatura que significa factor de crecimiento derivado de plaquetas. El PDGF interactúa con las tirosina quinasas PDGFR α y PDGFR β ;

"RTK" es una abreviatura que significa tirosina quinasa receptora;

"Tie-2" es una abreviatura que significa tirosina quinasa con dominios de homología de Ig y EGF;

"VEGF" es una abreviatura que significa factor de crecimiento endotelial vascular;

15 "VEGF-RTK" es una abreviatura que significa tirosina quinasa receptora del factor de crecimiento endotelial vascular.

Las sales de los compuestos de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona con ácido láctico pueden ser preparadas disolviendo el 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona en un solvente o en una mezcla de solventes orgánicos adecuados junto con uno, dos o más equivalentes, de ácido láctico. La mezcla se calienta, usualmente se somete a reflujo, y luego se enfría. La sal formada se recupera típicamente filtrando o evaporando hasta sequedad. Los solventes orgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, alcoholes y éteres inferiores, preferiblemente metanol, etanol, dietil éter o combinaciones de estos. Las sales pueden ser formuladas en una cualquiera de un cierto número de formas de dosificación conocidas o sistemas de administración por medios conocidos en la técnica, por ejemplo, para uso oral, parenteral, transdérmico o tópico. En algunas realizaciones la sal es cristalina y en algunas realizaciones los cristales tienen forma de placa o agujas. Las sales pueden ser comprimidas para formar tabletas. Preferiblemente, las sales de la invención se utilizan para preparar formulaciones acuosas de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona. La sal de la invención tiene en general solubilidad mejorada en el agua con respecto a la base o el ácido libres. La solubilidad de la sal de lactato del 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona en agua destilada es aproximadamente 330 mg/mL.

30 El compuesto de la invención es una sal de lactato de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona o un tautómero del mismo.

En una realización, la sal de lactato tiene una solubilidad en agua a 22°C de desde aproximadamente 5 mg/mL hasta aproximadamente 400 mg/mL. En algunas realizaciones, la sal tiene una solubilidad en agua desde aproximadamente 100 mg/mL hasta aproximadamente 400 mg/mL. En otras realizaciones, la sal tiene una solubilidad en agua desde aproximadamente 200 mg/mL hasta aproximadamente 400 mg/mL. En algunas realizaciones, la sal tiene una solubilidad en agua de más de 30 mg/mL. En otras realizaciones, la sal tiene una solubilidad en agua de desde aproximadamente 150 mg/mL hasta aproximadamente 250 mg/mL. En otra realización, la sal de lactato farmacéuticamente aceptable es capaz de disolverse en un medio acuoso por debajo de aproximadamente pH 7, tal como de pH 1-7, de pH 3-7, o de pH 4-7.

40 La invención provee adicionalmente formulaciones farmacéuticas y medicamentos. Tales formulaciones y medicamentos incluyen la sal de lactato en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La divulgación también provee métodos para tratar cáncer o inhibir la proliferación de capilares. Tales métodos incluyen la administración de una cantidad efectiva de una sal farmacéuticamente aceptable o de una formulación farmacéutica o medicamento que incluye la sal farmacéuticamente aceptable a un paciente que así lo requiere.

45 La invención también se relaciona con un método para preparar una sal farmacéuticamente aceptable de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona. El método incluye:

(a) suspender la base libre de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, o un tautómero del mismo, en un solvente o mezcla de solventes;

(b) poner en contacto el ácido láctico con el 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, o un tautómero del mismo, para proveer una mezcla;

(c) calentar la mezcla;

(d) enfriar la mezcla;

5 (e) y aislar la sal.

En algunos métodos para preparar la sal de lactato la mezcla se enfría y la sal se precipita desde la solución.

En algunos métodos para preparar la sal de lactato la mezcla se calienta y se somete a reflujo antes del enfriamiento.

10 En algunas realizaciones del método para preparación de la sal de lactato, la etapa de aislamiento incluye filtrar la mezcla.

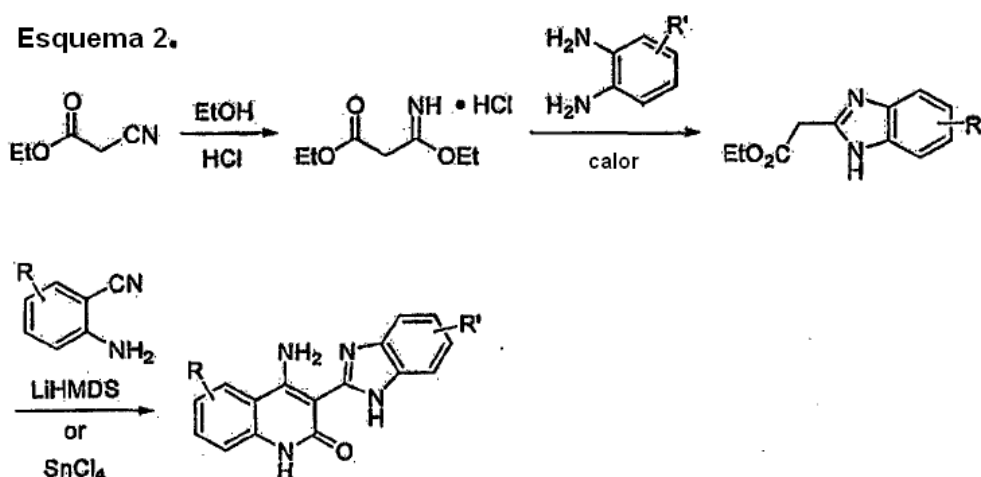
En algunas realizaciones, el ácido es ácido láctico y puede ser una mezcla de las formas D y L del ácido láctico o puede ser el ácido láctico D o el ácido láctico L.

En algunas realizaciones, el solvente usado en el método de preparación de las sales es un solvente prótico.

15 En otras realizaciones de la invención, el solvente usado en el método para preparar la sal se selecciona del grupo consistente de metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, 2-butanol, acetona, butanona, dioxanos, agua, tetrahidrofurano y combinaciones de estos. Los compuestos se sintetizan fácilmente a partir de moléculas repartidas simples como las mostradas en los siguientes ejemplos. Los compuestos pueden ser preparados en general utilizando benceno sustituido con grupos nitrilo o ácido carboxílico además de otros grupos opcionales. Los compuestos y análogos de tales compuestos pueden ser sintetizados a partir de moléculas de partidas simples como se muestran en el Esquema 2 y se ejemplifica en los Ejemplos.

20 Un método para preparar los compuestos sustituidos con 4-amino se muestra en el Esquema 2. Como se muestra en el Esquema 2, los compuestos aromáticos sustituidos con grupos amina y nitrilo pueden ser utilizados para sintetizar los compuestos sustituidos con 4-amino. Un compuesto tal como etil 2-cianoacetato puede hacerse reaccionar con etanol para producir etil 3-etoxi-3-imopropionato clorhidrato. La reacción subsecuente con una 1,2-fenilendiamina sustituida o no sustituida provee el etilo 2-benzimidazol-2-ilacetato sustituido o no sustituido. La reacción de un etil 2-benzimidazol-2-ilacetato sustituido o no sustituido con un compuesto aromático que tiene un grupo amino o nitrilo tal como 2-amino benzonitrilo sustituido o no sustituido con una base tal como bis (trimetilsilil) amida de litio o un ácido de Lewis tal como tetracloruro de estaño provee el compuesto sustituido con 4-amino sustituido o no sustituido.

Esquema 2.



30 La presente invención también provee composiciones que pueden ser preparadas mezclando una o más sales, con vehículos, excipientes, aglomerantes, diluyentes o similares farmacéuticamente aceptables, para tratar mejor alguna variedad de trastornos relacionados con la actividad de VEGF-RTK, más particularmente angiogénesis asociada con el cáncer.

Excipientes, diluyentes, aglomerantes, vehículos y similares incluyen, pero no se limitan a, celulosa microcristalina, lactosa, fosfato de calcio dibásico, fosfato de calcio tribásico, almidón glicolato de sodio (NaSG), crospovidona, croscarmelosa (CC), lauril sulfato de sodio (SLS), Tween, polietilén glicol (PEG), povidona, hidroxipropil celulosa (HPMC), estearato de Mg, estearato de Ca, ácido esteárico, estearato fumarato de sodio y dióxido de silicio.

- 5 Una dosis terapéuticamente efectiva se refiere adicionalmente a aquella cantidad de una o más sales suficiente para dar como resultado una mejora de síntomas del trastorno. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser manufacturadas por métodos bien conocidos en la técnica tales como procesos convencionales de granulación, mezcla, disolución, encapsulación, liofilización, emulsificación o levidación, entre otros. Las composiciones pueden estar en la forma de, por ejemplo, gránulos, polvos, tabletas, cápsulas, jarabe, 10 supositorios, inyecciones, emulsiones, elíxires, suspensiones o soluciones. Las composiciones presentes pueden ser formuladas para diversas rutas de administración, por ejemplo, por administración oral, por administración transmucosa, por administración rectal, o administración subcutánea así como inyección untratecal, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, intraocular o intraventricular. Las sales del compuesto o compuestos de la Fórmula 1 y Fórmula 2 también pueden ser administradas de manera local en vez de sistémica, tal como inyección 15 como una formulación de liberación sostenida. Las siguientes formas de dosificación se dan a manera de ejemplo y no deberían ser consideradas como limitantes de la presente invención.

Con el fin de determinar la cantidad de compuesto en un paciente después de la administración, pueden tomarse ciertas etapas de manipulación. Tal método está descrito en la solicitud provisional de los Estados Unidos serie No. 60/517,915, titulada, "Métodos para tratar cáncer y métodos relacionados", presentada el 7 de noviembre de 2003 20 por Vora et al.

La administración oral, bucal y sublingual, polvos, suspensiones, gránulos, tabletas, píldoras, cápsulas, cápsulas de gel y tabletas son aceptables en formas de dosificación sólida. Estas pueden ser preparadas, por ejemplo, mezclando una o más sales, con al menos un aditivo o excipiente tal como un almidón u otro aditivo. Aditivos 25 excipientes adecuados son sacarosa, lactosa, azúcar de celulosa, manitol, maltitol, dextrano, sorbitol, almidón, agar, alginatos, quitinas, quitosanos, pectinas, goma de tragacanto, goma arábica, gelatinas, colágenos, caseína, albumina, polímeros o glicéridos sintéticos o semisintéticos, metil celulosa, hidroxipropil metil celulosa y/o polivinil pirrolidona. Opcionalmente, las 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 antioxidantes tales como ácido ascórbico, tocoferol o cisteína, un agente 30 desintegrante o agentes quelantes tales como EDTA, aglomerantes, espesantes, reguladores, endulzantes, agentes saborizantes o agentes aromatizadores. Adicionalmente, pueden agregarse colorantes o pigmentos para identificación. Las tabletas y píldoras pueden ser tratadas adicionalmente con materiales de recubrimiento adecuados conocidos en la técnica, tales como recubrimientos protectores para la humedad, entéricos o de liberación sostenida.

35 Las formas de dosificación líquida para administración oral pueden ser en la forma de emulsiones, jarabes, elíxires, suspensiones, pastas y soluciones farmacéuticamente aceptables, las cuales pueden contener un diluyente inactivo, tal como agua. Las formulaciones farmacéuticas pueden ser preparadas como suspensiones o soluciones líquidas utilizando un líquido estéril, tal como, pero no limitándose a, un aceite, agua, un alcohol, y combinaciones de estos. Pueden agregarse surfactantes, agentes de suspensión, agentes emulsificantes, endulzantes, agentes saborizantes, 40 agentes quelantes, conservantes, antioxidantes, solubilizantes tales como propilén glicol y glicerina y sorbitol, farmacéuticamente aceptables, para administración oral o parenteral.

Como se anotó anteriormente, las suspensiones pueden incluir aceites. Tal aceite incluye, pero no se limita a, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, aceite de algodón, aceite de maíz y aceite de oliva. La preparación de suspensiones también puede contener ésteres de ácidos grasos tales como oleato de etilo, miristato de isopropilo, 45 glicéridos de ácidos grasos y glicéridos de ácidos grasos acetilados. Las formulaciones en suspensión pueden incluir alcoholes, tales como, pero no limitándose a etanol, alcohol isopropílico, alcohol hexadecílico, glicerol y propilén glicol. Éteres tales como pero no limitándose a, poli (etilen glicol), hidrocarburos del petróleo tales como aceite mineral y petrolato; y también puede utilizarse agua en formulaciones en suspensión. Además las formulaciones en suspensión también pueden incluir estabilizadores, preconservantes, antioxidantes, surfactantes, colorantes, 50 endulzantes, agentes saborizantes, solubilizantes, espesantes y agentes emulsificadores.

Para administración nasal, las formulaciones farmacéuticas pueden ser una aspersión o aerosol que contiene solventes apropiados y opcionalmente otros compuestos tales como, pero no limitándose a, estabilizadores, agentes antimicrobianos, antioxidantes, modificadores del pH, surfactantes, modificadores de la biodisponibilidad y combinaciones de estos. Un propelente para una formulación en aerosol puede incluir aire comprimido, nitrógeno, 55 dióxido de carbono o un solvente basado en un hidrocarburo de bajo punto de ebullición. La sal de lactato es suministrada convenientemente en la forma de una presentación para aspersión en aerosol desde un nebulizador o similar.

Las formas de dosificación inyectables incluyen en general suspensiones acuosas o suspensiones oleosas las cuales pueden ser preparadas utilizando un dispersante o agente humectante adecuado y un agente de suspensión. Las formas inyectables pueden ser en fase de solución o en la forma de una suspensión, la cual se prepara con un solvente o diluyente. Solventes o vehículos aceptables 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 sintéticos, ácidos grasos, mono, di o triglicéridos.

Para inyección, la formulación farmacéutica puede ser un polvo adecuado para reconstitución con una solución apropiada tal como se describió anteriormente. Ejemplos de estas incluyen, pero no se limitan a, polvos, polvos amorfos, gránulos, precipitados o partículas secadas por congelación, secadas por rotación o secadas por aspersión. Para inyección, las formulaciones pueden contener opcionalmente estabilizadores, modificadores del pH, surfactantes, modificadores de la biodisponibilidad y combinaciones de estos. La sal de lactato puede ser formulada para administración parenteral por inyección tal como mediante inyección de bolus o infusión continua. Una forma de dosificación unitaria para inyección puede estar en ampollas o en contenedores de dosis múltiples. Para administración rectal, las formulaciones farmacéuticas pueden estar en la forma de un supositorio, un ungüento, un enema, una tableta o una crema para liberación del compuesto en los intestinos, flexión sigmoide y/o recto. Los supositorios rectales se preparan mezclando la sal de lactato con vehículos aceptables, por ejemplo, manteca de cacao o polietilen glicol, los cuales están presentes en una fase sólida a temperaturas de almacenamiento normal, y se presentan en fase líquida aquellas temperaturas adecuadas para liberar un fármaco dentro del cuerpo, tales como en el recto. Los aceites también pueden ser empujados en la preparación de formulaciones del tipo de gelatina blanda y supositorios. Pueden emplearse agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcar relacionadas, y glicerol, en la preparación de formulaciones en suspensión las cuales pueden contener también agentes de suspensión tales como pectinas, carbomeros, metil celulosa, hidroxipropil celulosa o carboximetil celulosa, así como reguladores y conservantes.

En alguna realización, la sal es suministrada en forma de polvo en un contenedor de almacenamiento tal como un vial. En algunas realizaciones, el vial es cerrado y en otras realizaciones el vial puede ser evacuado con un gas inerte y tapado.

Además de aquellas formas de dosificación representativas descritas anteriormente, los excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables son conocidos en general por los experimentados en la técnica y están incluidos así en la presente invención. Tales excipientes y vehículos están descritos, por ejemplo, en "Remington Pharmaceutical Sciences" Mack Pub. Co., New Jersey (1991).

Las formulaciones de la invención pueden estar diseñadas para ser de acción corta, liberación rápida, actividad larga y liberación sostenida como se describe más adelante. Así, las formulaciones farmacéuticas también pueden ser formuladas para liberación controlada o para liberación lenta.

Las presentes composiciones también pueden comprender, por ejemplo, micelas o liposomas, o alguna otra forma encapsulada, o pueden ser administradas en una forma de liberación extendida para proveer un almacenamiento prolongado y/o efecto de suministro. Por lo tanto, las formulaciones farmacéuticas pueden ser comprimidas en pastillas o cilindros e implantadas intramuscularmente o por vía subcutánea como inyecciones de depósito o como implantes tales como cánulas. Tales implantes pueden emplear materiales inertes conocidos tales como siliconas y polímeros biodegradables.

Las dosificaciones específicas pueden ajustarse dependiendo de las condiciones de la enfermedad, la edad, el peso corporal, las condiciones generales de la salud, sexo y dieta del sujeto, intervalos de dosis, rutas de administración, tasa de excreción y combinaciones de fármacos. Cualquiera de las formas de dosificación anteriores que contienen cantidades efectivas está bien dentro de los límites de la experimentación rutinaria y por lo tanto, caen suficientemente dentro del alcance de la presente invención.

Una dosis terapéuticamente efectiva puede variar dependiendo de la ruta de administración y forma de dosificación. La sal de lactato es una formulación que exhibe un alto índice terapéutico. El índice terapéutico es la relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos que puede ser expresada como la relación entre LD_{50} y ED_{50} . La LD_{50} es la dosis letal para el 50% de la población y la ED_{50} es la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población. Las LD_{50} y ED_{50} se determinan mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos de células animales o animales experimentales.

"Tratar" dentro del contexto de la presente invención, significa un alivio de síntomas asociados con un trastorno o enfermedad, o detención de la progresión o empeoramiento posterior de estos síntomas, o prevención o profilaxis de la enfermedad o trastorno. Por ejemplo, dentro del contexto del tratamiento de pacientes que necesitan de un inhibidor de VEGF-RTK, un tratamiento exitoso puede incluir una reducción en la proliferación de capilares que alimentan un tumor o un tejido enfermo, un alivio de los síntomas relacionados con un crecimiento canceroso o tumor, proliferación de capilares, o tejido enfermo, una detención en la proliferación de capilares, o una detención

en la progresión de una enfermedad tal como un cáncer o en el crecimiento de células cancerosas. El tratamiento también puede incluir la administración de formulaciones farmacéuticas de la presente invención en combinación con otras terapias. Por ejemplo, los compuestos y formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser administrados antes, durante, o después de un procedimiento quirúrgico o una terapia de radiación. Los compuestos de la invención también pueden ser administrados en conjunción con otros fármacos anticáncer incluyendo los utilizados en terapia antisentido y genética.

Una realización de la divulgación es un uso en un método para inhibir el crecimiento de un tumor en un paciente que incluye administrar una cantidad efectiva de una sal de lactato de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, o un tautómero del mismo, a un paciente que tiene un tumor.

Una realización de la divulgación es un uso en un método para inhibir la proliferación de capilares en un paciente el cual incluye administrar una cantidad efectiva de una sal de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, o un tautómero del mismo, a un paciente que lo requiere.

La invención también proporciona una sal de lactato de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, o un tautómero del mismo, o una formulación farmacéutica que comprende 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, o un tautómero del mismo, para uso en un método para inhibir la proliferación de capilares, o para uso en un método de tratamiento del cáncer.

Una realización de la invención es un método para preparar formulaciones farmacéuticas el cual incluye mezclar cualquiera de las sales antes descritas con un vehículo farmacéuticamente aceptable y agua o una solución acuosa.

La presente invención, descrita así en general, será entendida más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos, los cuales se proveen a manera de ilustración.

Ejemplos

Las siguientes abreviaturas se utilizan en los ejemplos:

ATP: Trifosfato de adenosina

BSA: Albumina de suero bovino

DMA: N,N-dimetilacetamida

DMF: N,N-dimetilformamida

dppf: 1,1'-(difenilfosfino) ferroceno

DTT: DL-Ditiotreitol

EDTA: Ácido etilen diamino tetraácetico

EtOAc: Acetato de etilo

EtOH: Etanol

HBTU: O-Benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato

Valor IC₅₀: La concentración de un inhibidor que produce un 50% de reducción en una actividad medida

LiHMDS: Litio bis(trimetilsilil)amida

MeOH: Metanol

NMP: N-metil pirrolidona

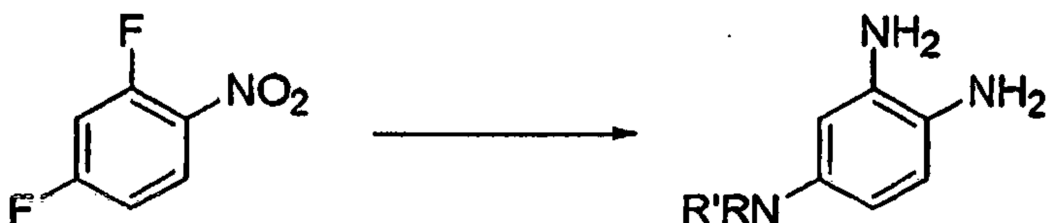
THF: Tetrahidrofurano

Los compuestos fueron nombrados utilizando (v. 3.0 & v. 5.0) from ChemInnovation Software, Inc. and ACD/Name v. 4.53.

Metodología sintética

Los diversos materiales de partida de aril diamina usados para sintetizar acetatos de bencimidazol pueden ser obtenidos de fuentes comerciales, preparados por métodos conocidos para los experimentados en la técnica, o preparados mediante los siguientes Métodos generales 1-15.

Método 1



Se colocó 2,4-difluoronitrobenzene (1.0 equivalentes) en un matraz de fondo redondo equipado con un condensador con hielo seco cargado con acetona y hielo seco. Se condensó el amoníaco en el matraz y la solución resultante fue agitada a reflujo durante 7 horas. Se formó un precipitado amarillo al cabo de 1 hora. Después de 7 horas, el condensador fue retirado y el amoníaco líquido se dejó evaporar durante varias horas. El producto crudo fue purificado por cromatografía instantánea sobre silica gel (85:15 hexanes:etil acetate, product at $R_f=0.32$, contaminant at $R_f=0.51$); GC/MS m/z 156.1 (M⁺), R_t 11.16 minutos.

La 5-fluoro-2-nitrofenilamina resultante (1.0 equivalente) y una amina (1.1 equivalente) por ejemplo, N-metil piperazina, fueron disueltas en NMP y se agregó trietil amina (2.0 equivalentes). La mezcla de reacción fue calentada a 100°C durante 3 horas. La solución fue enfriada entonces hasta temperatura ambiente y diluida con agua. El precipitado resultante fue filtrado y secado bajo vacío para proveer el producto 2-nitro-diamino. Alternativamente, el mismo producto puede ser obtenido a partir de 5-cloro-2-nitrofenil amina disponible comercialmente bajo condiciones idénticas excepto por calentamiento a 130°C durante 1-2 días. En algunos ejemplos, el desplazamiento bien sea sobre 5-fluoro-2-nitrofenilamina o 5-cloro-2-nitrofenilamina puede llevarse a cabo en amina pura (5 equivalentes) a 100°C o 130 °C, respectivamente. El producto es aislado de una manera idéntica. LC/MS m/z 237.1 (MH⁺), R_t 1.304 minutos.

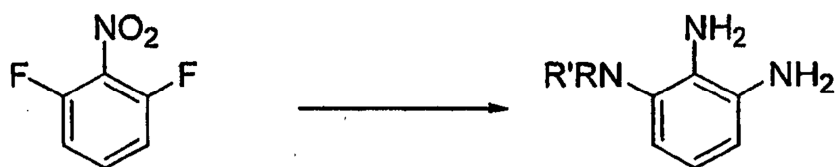
La nitroamina (1.0 equivalentes) y Pd/C al 10% (0.1 equivalente) se suspendieron en etanol anhidro a temperatura ambiente. El matraz de reacción fue evacuado y subsecuentemente llenado con H₂. La mezcla resultante fue agitada entonces bajo una atmósfera de hidrógeno durante la noche. La solución resultante fue filtrada a través de Celite y concentrada bajo vacío para proveer el producto crudo el cual fue utilizado sin purificación adicional.

Método 2



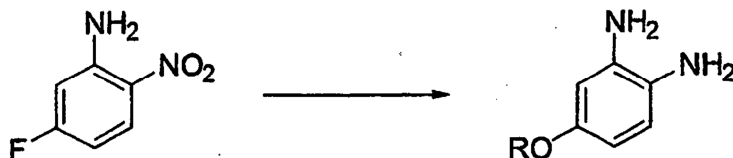
Se cargó un matraz de fondo redondo con 2,3-difluoro-6-nitrofenilamina (1 equivalente) y NMP suficiente para hacer una pasta viscosa. Se agregó una amina (5 equivalentes), por ejemplo, N-metil piperazina, y la solución fue calentada a 100°C. Después de 2 horas, la solución fue enfriada y vertida sobre agua. Se formó un sólido amarillo brillante el cual fue filtrado y secado. La nitroamina fue reducida como en el Método 1 para proveer el producto crudo el cual fue utilizado sin purificación adicional. LC/MS m/z 225.1 (MH⁺), R_t 0.335 minutos.

Método 3



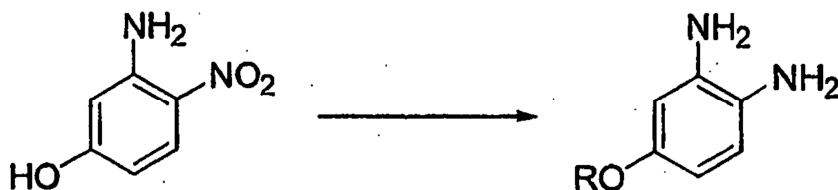
A una solución en DMF 0.1 M de 1,3-difluoro-2-nitrobenzeno se agrego Et₃N (2 equivalentes) seguido por una amina (1 equivalente), por ejemplo, morfolina. La mezcla fue agitada durante 18 horas y luego diluida con agua y extraída con acetato de etilo. LC/MS *m/z* 227.2 (MH⁺), R_t 2.522 minutos. Las capas orgánicas combinadas fueron secadas sobre MgSO₄, filtradas y concentradas. Se condensó amoníaco dentro de una bomba que contenía el producto crudo. La bomba fue sellada y calentada a 100°C (por encima de 400 psi). Después de 72 horas la bomba se dejó enfriar y el amoníaco fue evaporado para proveer un sólido rojizo. La nitroamina fue reducida como en el Método 1 para proveer el producto crudo el cual fue utilizado sin purificación adicional. LC/MS *m/z* 194.1 (MH⁺), R_t 1.199 minutos.

Método 4



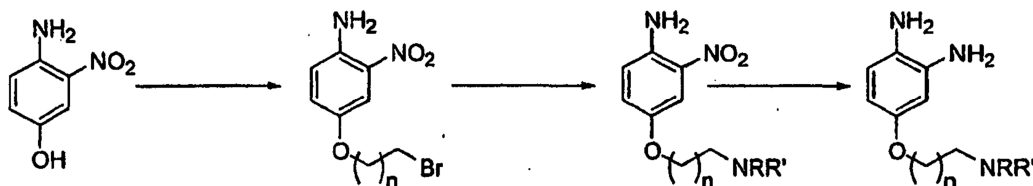
A una solución de NMP en agitación que contenía NaH (1.3 equivalentes) se agregó un alcohol (1.0 equivalentes), por ejemplo, 2-metiloxietanol. La mezcla resultante fue agitada entonces durante 30 minutos. Se agregó entonces lentamente una suspensión de 5-fluoro-2-nitrofenilamina en NMP. La mezcla fue calentada luego a 100°C. Después de 2 horas, la mezcla de reacción fue enfriada y se agregó agua. La mezcla fue filtrada entonces y el sólido capturado fue lavado con agua y purificado por cromatografía en sílica gel (1:1 etil acetate:hexane). LC/MS *m/z* 213.2 (MH⁺), R_t 2.24 minutos. La nitroamina fue reducida como en el Método 1 para proveer el producto crudo el cual fue utilizado sin purificación adicional. LC/MS *m/z* 183.1 (MH⁺), R_t 0.984 minutos.

Método 5



Se agregó diisopropil azodicarboxilato (1.1 equivalentes) gota a gota a una solución en agitación de 4-amino-3-nitrofenol (1.0 equivalentes), trifetilfosfina (1.1 equivalentes), y un alcohol, por ejemplo, N-(2-hidroxietil)morfolina (1.0 equivalentes), en tetrahidrofurano a 0°C. La mezcla se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó durante 18 horas. El solvente fue evaporado y el producto fue purificado por cromatografía en sílica gel (98:2 CH₂Cl₂:metanol) para producir 4-(2-morfolin-4-iletoxi)-2-nitrofenilamina en forma de un aceite marrón rojizo oscuro. LC/MS *m/z* 268.0 (MH⁺), R_t 1.01 minutos. La nitroamina fue reducida como en el Método 1 para dar el producto crudo el cual fue usado sin purificación adicional. LC/MS *m/z* 238.3 (MH⁺), R_t 0.295 minutos.

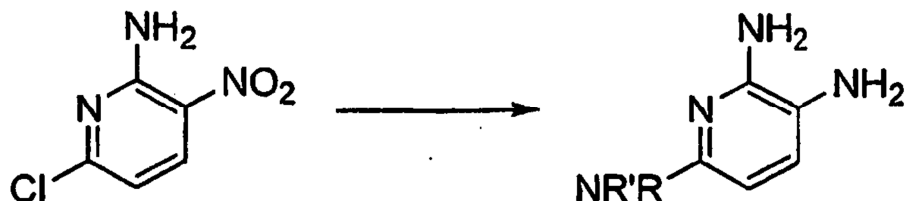
Método 6



A un matraz cargado con 4-amino-3-nitrofenol (1 equivalente), K₂CO₃ (2 equivalentes), y 2-butanona se agregó un dibromuro de alquilo, por ejemplo, 1,3-dibromopropano (1.5 equivalentes). La mezcla resultante fue calentada entonces a 80°C durante 18 horas. Después del enfriamiento, la mezcla fue filtrada, concentrada y diluida con agua. La solución fue extraída entonces con CH₂Cl₂ (3 x) y las capas orgánicas combinadas fueron concentradas para dar un sólido que fue lavado entonces con pentano. LCMS *m/z* 275.1 (MH⁺), R_t 2.74 minutos.

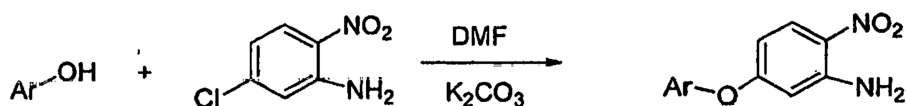
Una solución en acetonitrilo del bromuro preparado anteriormente, una amina, por ejemplo pirrolidina (5 equivalentes), Cs₂CO₃ (2 equivalentes) y Bu₄NI (0.1 equivalentes) fue calentada a 70°C durante 48 horas. La mezcla de reacción fue enfriada, filtrada y concentrada. El residuo fue disuelto en CH₂Cl₂, lavado con agua y concentrado para dar la nitroamina deseada, 2-nitro-4-(3-pirrolidin-1-ilpropoxi)fenilamina. LCMS *m/z* 266.2 (MH⁺), R_t 1.51 minutos. La nitroamina fue reducida como en el Método 1 para proveer el producto crudo el cual fue utilizado sin purificación posterior.

Método 7



A una suspensión de 6-cloro-3-nitropiridin-2-amina (1 equivalente) en acetonitrilo se agregó una amina, por ejemplo, morfolina (4 equivalentes). La mezcla de reacción resultante fue agitada a 70°C durante 5 horas. El solvente fue evaporado bajo presión reducida, y el residuo triturado con éter para proveer el compuesto deseado en forma de un polvo amarillo brillante. LC/MS *m/z* 225.0 (MH⁺), *Rt* 1.79 minutos. La nitroamina fue reducida como en el Método 1 para proveer el producto crudo el cual fue utilizado sin purificación posterior.

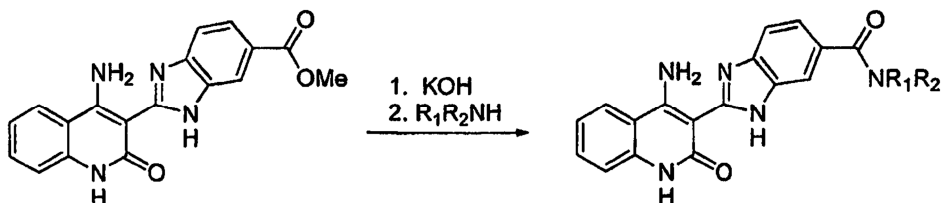
Método 8



Método 8

Una mezcla de fenol (1 equivalente) y 5-cloro-2-nitro anilina (1 equivalente) se disolvió en DMF, y se adicionó K₂CO₃ sólido (2 equivalentes) en una porción. La mezcla de reacción fue calentada 120°C durante la noche. La mezcla de reacción fue enfriada a temperatura ambiente, la mayoría del DMF fue destilado, y se adicionó agua al residuo que se obtuvo como precipitado. El sólido se secó y purificó por cromatografía de sílica gel (2-10% MeOH/CH₂Cl₂) para generar el producto deseado

Método 9

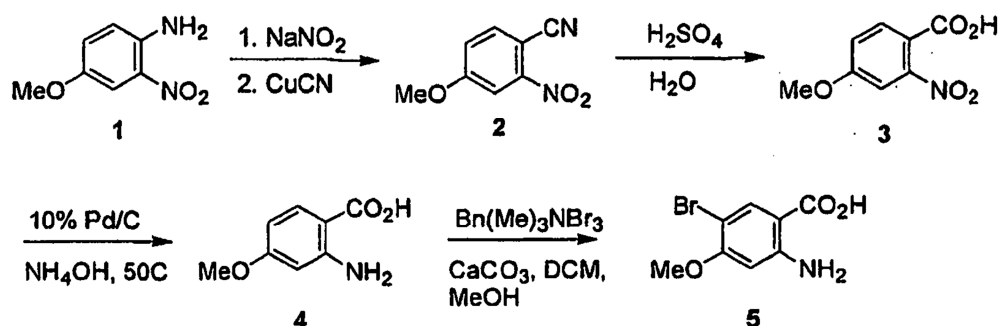


La introducción de sustituyentes en el anillo de bencimidazol no está necesariamente limitado a las primeras etapas de la síntesis y puede surgir después de la formación del anillo de quinolinona. Por ejemplo, el metil ester crudo mostrado en la figura más arriba se disolvió en una mezcla 1:1 de EtOH y 30% de KOH acuoso y agitado durante la noche a 70° C. La mezcla de reacción se filtró, se lavó con agua y se secó para obtener el ácido 2-(4-amino-2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-il)-1*H*-bencimidazol-6-carboxílico como un sólido marrón. LC/MS *m/z*: 321.1 (MH⁺), *Rt* 2.26 minutos.

Una mezcla de ácido 2-(4-amino-2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-il)-1*H*-bencimidazol-6-carboxílico (1 equivalente), la amina (1 equivalente), EDC (1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida hidrocloreto, 1.2 equivalentes), HOAT (1-hidroxi-7-azabenzotriazol, 1.2 equivalentes) y trietilamina (2.5 equivalentes) en DMF, se agitó a 23 °C durante 20 horas. La mezcla de reacción fue sometida a partición entre agua y acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas fueron secadas (Na₂SO₄) y concentradas. Se agregó agua y el precipitado así formado fue filtrado y secado para generar el producto deseado.

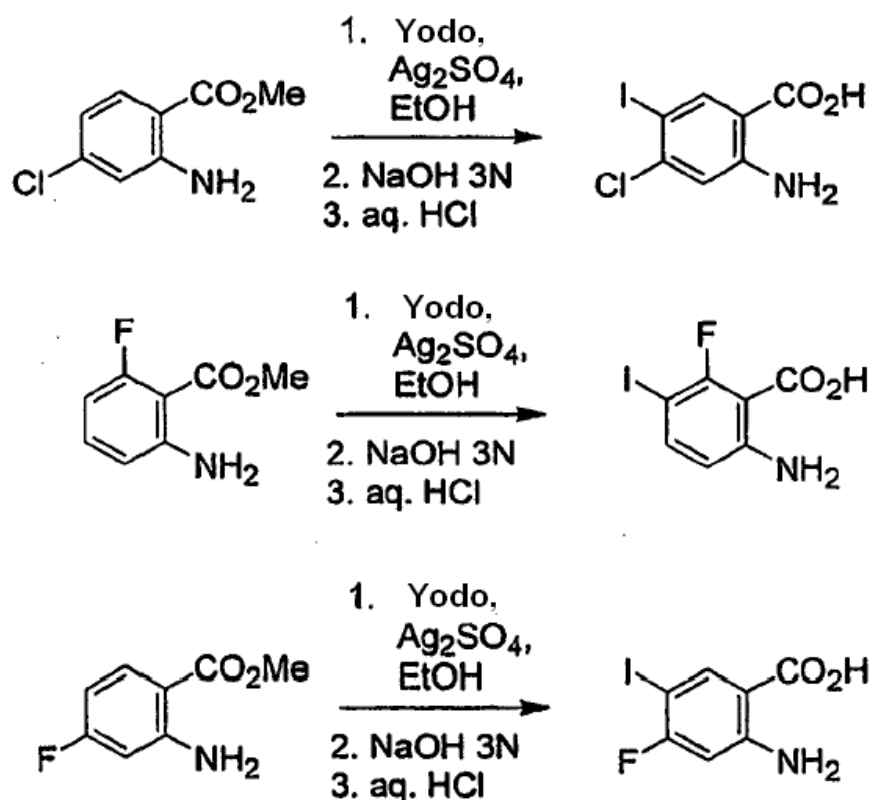
Los diversos materiales de partida de ácido 2-amino benzoico usados para sintetizar anhídridos isatoicos pueden ser obtenidos a partir de fuentes comerciales, preparados por métodos conocidos para una persona experimentada en la técnica, o preparados mediante los siguientes Métodos generales 10 – 11. Los métodos de síntesis de anhídridos isatoicos generales están descritos en J. Med. Chem. 1981, 24 (6), 735 and J. Heterocycl. Chem. 1975, 12(3), 565.

Método 10



5 Los compuestos 1-3 fueron hechos utilizando procedimientos similares como los encontrados en la Patente de los Estados Unidos No. 4, 287,341. El compuesto 3 fue reducido utilizando condiciones de hidrogenación estándar de Pd/C al 10% en NH_4OH a 50°C a lo largo de 48 horas. El producto fue precipitado por neutralización con ácido acético glacial, filtración y lavado con agua y éter. Los rendimientos fueron de aproximadamente 50%. El compuesto 5 fue preparado de manera similar a la divulgada en la Patente de los Estados Unidos No. 5,716, 993.

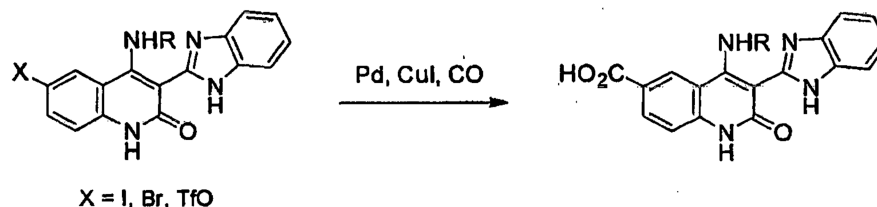
Método 11



10 La yodación de compuestos que contienen anilina fue logrado utilizando diversos procedimientos. La yodinación fue lograda utilizando un procedimiento similar al descrito en J. Med. Chem. 2001, 44, 6, 917-922. El éster antranílico en EtOH fue agregado a una mezcla de sulfato de plata (1 equivalente) e I_2 (1 equivalente). La reacción terminó típicamente después de 3 horas a temperatura ambiente. La reacción fue filtrada a través de Celita y concentrada. El residuo fue tomado en EtOAc y lavado con NaHCO_3 acuoso saturado (3x), agua (3x), sal muera (1x), secado (MgSO_4), filtrado, y concentrado. El producto crudo (~5 g) fue disuelto en MeOH (60-100 mL), NaOH 6N (25 mL), y agua (250 mL). Las reacciones fueron terminadas típicamente después de calentar a $70-80^\circ\text{C}$ durante 4 horas. La mezcla de reacción fue extraída con EtOAc (2x), neutralizada con HCl acuoso, filtrada para recolectar los sólidos, y los productos sólidos fueron lavados con agua. Los productos fueron secados *in vacuo*.

En diversas instancias, las sustituciones sobre el anillo quinolina también pueden ser introducidas después de acoplamiento como se muestra en los métodos generales 12-15.

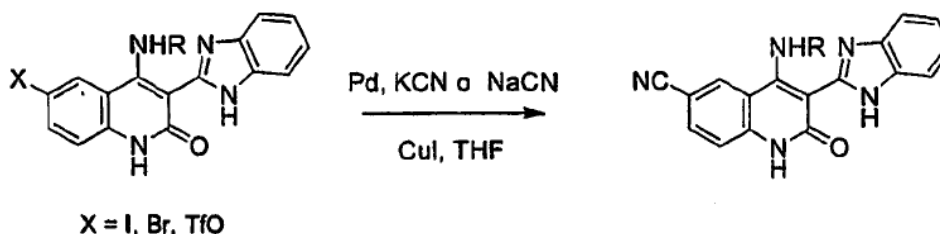
Método 12



5

La conversión de los haluros C-6 o C-7 a un grupo ácido fue logrado utilizando procedimientos en las siguientes referencias: Koga, H. et al., Tet. Let., 1995, 36, 1, 87-90; and Fukuyama, T. et al., J. Am. Chem. Soc., 1994, 116, 3125-3126.

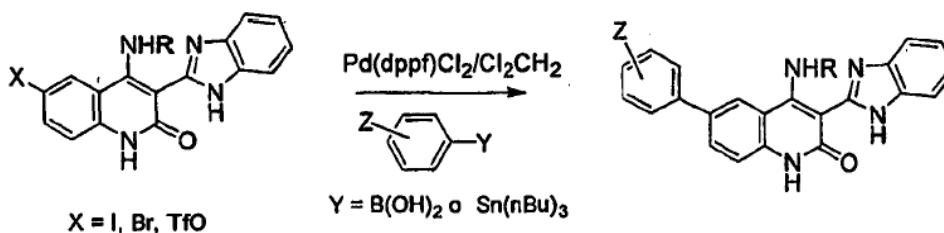
Método 13



10

La conversión de los haluros C-6 o C-7 a un grupo ciano fue logrado utilizando procedimientos en la siguiente referencia. Anderson, B.A. et al., J.Org. Chem., 1998, 63, 8224-828.

Método 14

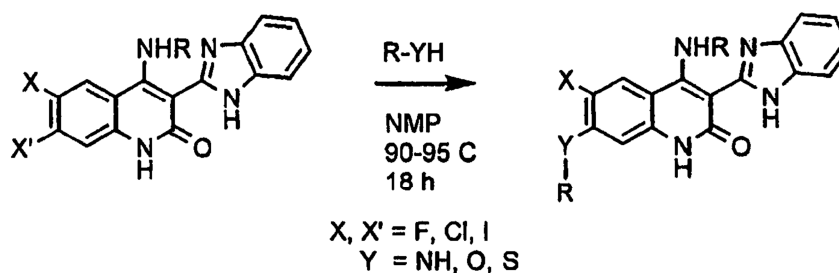


15 La conversión de los haluros C-6 o C-7 a un grupo arilo fue logrado utilizando los procedimientos estándar de Suzuki o Stille tal como se describe más adelante.

20 **Método de Suzuki:** A 1 vial de una pequeña porción (4 mL) se agregaron secuencialmente la quinolona (1 equivalente), ácido borónico (1.2-1.5 equivalentes), Pd(dppf)Cl₂, Cl₂CH₂ (0.2 equivalentes), DMF (0.5 - 1 mL) y TEA (4 equivalentes). La reacción fue purgada con argón, tapada y calentada a 85°C durante 12 horas. Una vez terminada, la reacción fue enfriada hasta temperatura ambiente, y filtrada con un disco de filtro por jeringa. La solución clara fue neutralizada entonces con TFA (un par de gotas) e inyectada directamente sobre HPLC preparativa. Los productos fueron liofilizados hasta sequedad.

25 **Método de Stille:** a 1 vial de una pequeña porción (4 mL) se agregaron secuencialmente la quinolona (1 equivalente), el reactivo de estaño (1.8 equivalentes), Pd(dppf)Cl₂, Cl₂CH₂ (0.2 equivalentes), y DMF (0.5 - 1 mL). La reacción fue purgada con argón, tapada y calentada a 60 - 85°C durante 4 horas. Una vez terminada, la reacción fue enfriada a temperatura ambiente y filtrada con un disco de filtración en jeringa. La solución clara fue neutralizada entonces con TFA (un par de gotas) e inyectada directamente sobre una HPLC preparativa. Los productos fueron liofilizados hasta sequedad.

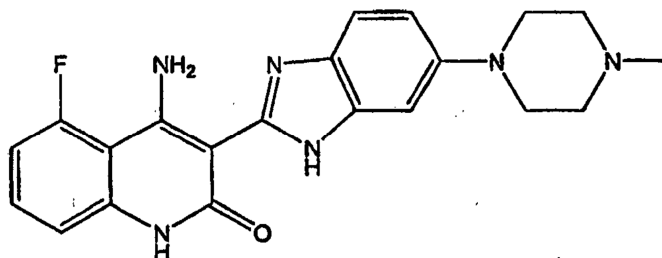
Método 15



Se colocó una dihaloquinolona tal como difluoroquinolona (12-15 mg) en un vial de una porción pequeña (2 mL). Se agregó NMP (seco y prepurgado con argón durante 5 minutos) al vial (0.5 mL). A continuación se agregó el reactivo de amina (40-50 mg). Si la amina era una sal de HCl, la reacción fue neutralizada con TEA (~1.2-1.5 equivalentes). La reacción fue purgada de nuevo con argón durante aproximadamente 5 segundos y tapada inmediatamente. La reacción fue calentada típicamente en un bloque de calentamiento a 90 - 95°C durante 18 horas. La reacción fue seguida por HPLC o LCMS. Después de tomar muestras para HPLC, el vial fue purgado con argón de nuevo y tapado. Algunos asociados de acoplamiento tomaron de 24 a 48 horas para alcanzar la terminación. Menos aminas nucleofílicas como el pirrol requirieron la adición de una base fuerte para alcanzar la terminación. En estos casos, se agregó carbonato de cesio, (2 equivalentes con base en la amina usada). Una vez terminada, la reacción fue enfriada hasta temperatura ambiente, y filtrada con un filtro de disco en jeringa. La solución clara fue neutralizada entonces con TFA (un par de gotas) e inyectada directamente sobre una HPLC preparativa. Los productos fueron liofilizados hasta sequedad.

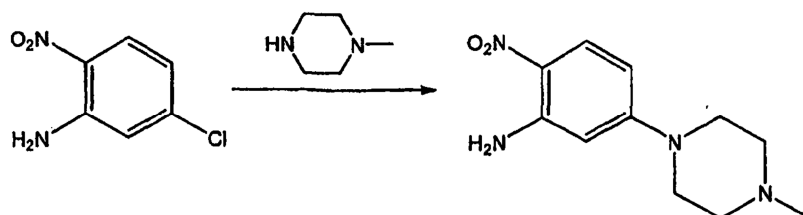
Método 16

Síntesis general de compuestos de Fórmula I y Fórmula II tales como 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona



A. Síntesis de 5-(4-metil-piperazina-1-il)-2-nitroanilina

Procedimiento A



Se colocaron 5-cloro-2-nitroanilina (500 g, 2.898 mol) y 1-metil piperazina (871 g, 8.693 mol) en un matraz de 2000 mL acoplado con un condensador y purgado con N₂. El matraz fue colocado en un baño de aceite a 100°C y calentado hasta que la 5-cloro-2-nitroanilina reaccionó completamente (típicamente durante la noche) determinado por HPLC. Después de que la HPLC confirmó la desaparición de la 5-cloro-2-nitroanilina, la mezcla de reacción fue vertida directamente (aún tibia) en 2500 mL de agua a temperatura ambiente con agitación mecánica. La mezcla resultante fue agitada hasta que alcanzó la temperatura ambiente y luego fue filtrada. El sólido amarillo obtenido así fue agregado a 1000 mL de agua y agitado durante 30 minutos. La mezcla resultante fue filtrada y el sólido resultante fue lavado con TBME (500 mL, 2X) y luego secado bajo vacío durante una hora utilizando un dique de goma. El sólido resultante fue transferido a una bandeja de secado y secado en un horno al vacío a 50°C hasta un peso constante para producir 670 g (97.8%) del compuesto del título en forma de un polvo amarillo.

Procedimiento B

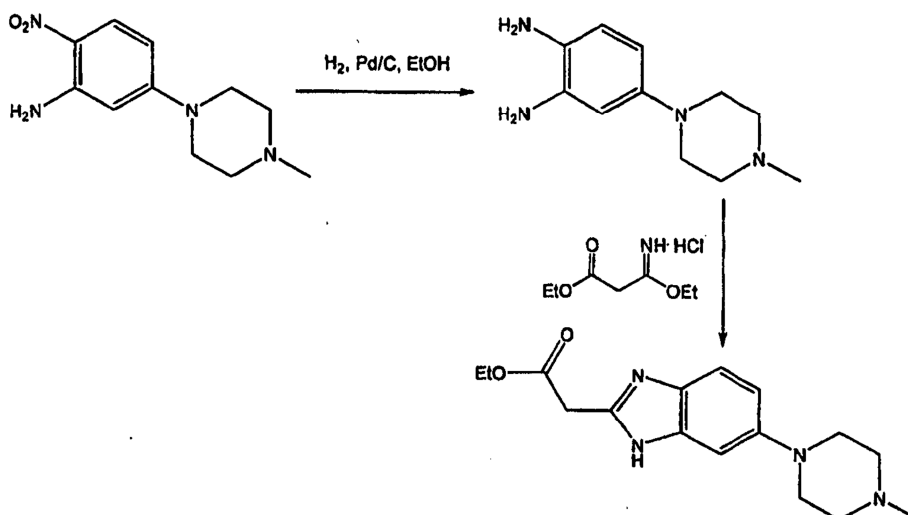
Se agregó 5-cloro-2-nitroanilina (308.2 g, 1.79 moles) a un matraz de fondo redondo de 5000 mL de 4 bocas provisto con un agitador superior, condensador, entrada de gas, embudo de adición y sonda de termómetro. El matraz fue purgado entonces con N₂. Se agregaron entonces 1-metilpiperazina (758.1 g, 840 mL, 7.57 mol) y 200 de etanol de prueba (508 mL) al matraz de reacción con agitación. El matraz fue purgado de nuevo con N₂, y la reacción fue mantenida bajo N₂. El matraz fue calentado en una manta de calentamiento hasta una temperatura interna de 97°C (+/- 5°C) y mantenido a esa temperatura hasta que la reacción se termino (típicamente aproximadamente 40 horas) según se determino por HPLC. Después de que la reacción terminó, el calentamiento fue descontinuado y la reacción fue enfriada hasta una temperatura interna de aproximadamente 20°C a 25°C con agitación, y la reacción fue agitada durante 2 a 3 horas. Se agregaron cristales de semilla (0.20 g, 0.85 mmol) de 5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitroanilina a la mezcla de reacción hasta que la precipitación ya había ocurrido. Se agregó agua (2,450 mL) a la mezcla de reacción durante un periodo de aproximadamente una hora mientras que la temperatura interna fue mantenida a una temperatura que variaba desde aproximadamente 20°C hasta 30°C. Después de que se terminó la adición de agua, la mezcla resultante fue agitada durante aproximadamente una hora a una temperatura de 20°C a 30°C. La mezcla resultante fue filtrada entonces, y el matraz y la torta del filtro fueron lavados con agua (3 x 2.56 L). El producto sólido amarillo dorado fue secado hasta un peso constante de 416 g (98.6% de rendimiento) bajo vacío a aproximadamente 50°C en un horno de vacío.

Procedimiento C

Se agregó 5-cloro-2-nitroanilina (401 g, 2.32 mol) a un matraz de fondo redondo de 12 L de 4 bocas provisto de un agitador superior, condensador, entrada de gas, embudo de adición y sonda de termómetro. El matraz fue purgado con N₂. Se agregaron 1-metilpiperazina (977 g, 1.08 L, 9.75 moles) y etanol al 100% (650 mL) al matraz de reacción con agitación. El matraz fue purgado de nuevo con N₂, y la reacción fue mantenida bajo N₂. El matraz fue calentado en una manta de calentamiento hasta una temperatura interne de 97°C (+/- 5°C) y mantenida a esa temperatura hasta que la reacción terminó (típicamente alrededor de 40 horas) según se determinó por HPLC. Después de que la reacción terminó, se descontinuó el calentamiento y la reacción fue enfriada hasta una temperatura interna de aproximadamente 80°C con agitación, y se agregó agua (3.15 L) a la mezcla a través de un embudo de adición durante el periodo de 1 hora mientras que la temperatura interna fue mantenida a 82°C (+/- 3°C). Después de que se terminó la adición de agua, se descontinuó el calentamiento y la mezcla de reacción se dejó enfriar durante un periodo de no menos de 4 horas hasta una temperatura interna de 20 – 25°C. La mezcla de reacción fue agitada entonces durante una hora adicional a una temperatura interna de 20-30°C. La mezcla resultante fue filtrada entonces, y el matraz y la torta de filtro fueron lavados con agua (1 x 1 L), etanol al 50% (1 x 1L), y etanol al 95% (1 x 1L). El producto sólido amarillo brillante fue colocado en una bandeja de secado y secado hasta un peso constante de 546 g (99% de rendimiento) bajo vacío a aproximadamente 50°C en un horno al vacío.

B. Síntesis de etil éster del ácido [6-(4-Metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-acético

Procedimiento A



Un matraz de 5000 mL, de 4 bocas fue provisto con un agitador, termómetro, condensador y entrada/salida de gas. El matraz equipado fue cargado con 265.7 g (1.12 mol 1.0 eq) de 5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitroanilina y 2125 mL de EtOH de prueba 200. La solución resultante fue purgada con N₂ durante 15 minutos. A continuación se agregaron 20.0 g de Pd/C al 5% (50% H₂O p/p). La reacción fue agitada vigorosamente a 40-50°C (temperatura interna) mientras se burbujaba H₂ a través de la mezcla. La reacción fue monitoreada cada hora en cuanto a la desaparición de la 5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitroanilina por HPLC. El tiempo de reacción típico fue de 6 horas.

Después de que toda la 5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitroanilina había desaparecido de la reacción, la solución fue purgada con N₂ durante 15 minutos. A continuación se agregaron 440.0 g (2.25 mol) de clorhidrato de 3-etoxi-3-iminopropanoato de etilo en forma de un sólido. La reacción fue agitada a 40-50°C (temperatura interna) hasta que se terminó la reacción. La reacción fue monitoreada siguiendo la desaparición del compuesto diamino por HPLC. El tiempo de reacción típico fue de 1-2 horas. Después de terminar la reacción, se enfrió hasta temperatura ambiente y se filtró a través de un lecho de material filtrante de Celite. El material filtrante de Celite fue lavado con EtOH absoluto (2 x 250 mL), y el filtrado fue concentrado bajo presión reducida proveyendo un aceite espeso marrón/naranja. El aceite resultante fue tomado en 850 ml de una solución de HCl al 0.37%. Se agregó entonces NaOH sólido (25 g) en una porción y se formó un precipitado. La mezcla resultante fue agitada durante 1 hora y luego filtrada. El sólido fue lavado con H₂O (2 x 400 mL) y secado a 50°C en un horno al vacío proveyendo 251.7 g (74.1%) de etil éster del ácido [6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzoimidazol-2-il]-acético en forma de un polvo amarillo pálido.

Procedimiento B

Un matraz recubierto de 4 bocas de 5000 mL, fue provisto con un agitador mecánico, condensador, sonda de temperatura, entrada de gas, y burbujeador de aceite. El matraz equipado fue cargado con 300 g (1.27 mol) de 5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitroanilina y 2400 mL de EtOH 200 de prueba (la reacción puede ser y ha sido llevada a cabo con etanol al 95% y no es necesario utilizar etanol de prueba 200 para esta reacción). La solución resultante fue agitada y purgada con N₂ durante 15 minutos. A continuación, se agregaron 22.7 g de Pd/C al 5% (50% de H₂O p/p) al matraz de reacción. El vaso de reacción fue purgado con N₂ durante 15 minutos. Después de purgar con N₂, el recipiente de reacción fue purgado con H₂ manteniendo un flujo lento pero constante de H₂ a través del matraz. La reacción fue agitada a 45-55°C (temperatura interna) mientras se burbujeara H₂ a través de la mezcla hasta que la 5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitroanilina fue consumida completamente según se determinó por HPLC. El tiempo de reacción típico fue de 6 horas.

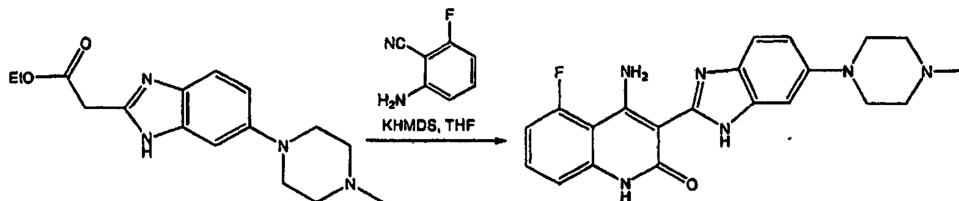
Después que desapareció toda la 5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitroanilina de la reacción, la solución fue purgada con N₂ durante 15 minutos. El intermediario diamina es sensible al aire de manera que tiene que tenerse cuidado para evitar la exposición al aire. Se agregaron 500 g (2.56 mol) de clorhidrato de etil 3-etoxi-3-iminopropanoato a la mezcla de reacción durante un periodo de aproximadamente 30 minutos. La reacción fue agitada a 45-55°C (temperatura interna) bajo N₂ hasta que la diamina fue completamente consumida según se determinó por HPLC. El tiempo de reacción típico fue de aproximadamente 2 horas. Después de que la reacción se terminó, la reacción fue filtrada mientras estaba tibia a través de un lecho de Celite. El matraz de reacción y la Celite fueron lavados entonces con EtOH de prueba 200 (3 x 285 mL). Los filtrados fueron combinados en un matraz de 5000 mL y se retiraron aproximadamente 3300 mL de etanol bajo vacío produciendo un aceite color naranja. Se agregaron entonces agua (530 mL) y luego HCL 1 M (350 mL) al aceite resultante, y la mezcla resultante fue agitada. La solución resultante fue agitada vigorosamente mientras se agregaba NaOH al 30% (200 mL) durante un periodo de aproximadamente 20 minutos manteniendo la temperatura interna a aproximadamente 25-30°C mientras que el pH fue llevado a entre 9 y 10. La suspensión resultante fue agitada durante aproximadamente 4 horas mientras se mantenía la temperatura interna a aproximadamente 20-25 °C. La mezcla resultante fue filtrada, y la torta de filtro fue lavada con H₂O (3 x 300 mL). El sólido recolectado fue secado hasta un peso constante a 50°C bajo vacío en un horno vacío proveyendo 345.9 g (90.1%) de etil éster del ácido [6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-benzoimidazol-2-il]-acético en forma de un polvo amarillo pálido. En un procedimiento de manipulación alternativo, los filtrados fueron combinados y el etanol fue retirado bajo vacío hasta que se hubiera retirado aproximadamente al menos 90%. Se agregó entonces agua a un pH neutro al aceite resultante, y la solución fue enfriada a aproximadamente 0°C. Se agregó entonces una solución acuosa de NaOH al 20% lentamente con agitación rápida para llevar el pH hasta 9.2 (leído con un medidor de pH). La mezcla resultante fue filtrada entonces y secada como se describió anteriormente. El procedimiento de manipulación alternativo proveyó el producto de color bronce claro a amarillo claro en rendimientos tan altos como el 97%.

Método para reducir el contenido de agua 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 ha sido manipulado previamente y secado hasta un contenido de agua de aproximadamente 8-9% de H₂O fue colocado en un matraz de fondo redondo de 2000 mL y disuelto en etanol absoluto (500 mL). La solución ámbar fue concentrada hasta un aceite espeso utilizando un evaporador rotatorio con calentamiento hasta que se retiró todo el solvente. El procedimiento fue repetido dos veces más. El aceite espeso así obtenido fue dejado en el matraz y colocado en un horno al vacío calentado a 50°C durante la noche. Los resultados del análisis de Karl Fisher indican un contenido de agua de 5.25%. El contenido de agua disminuido obtenido por este método proveyó rendimientos incrementados en el procedimiento del siguiente ejemplo. Pueden utilizarse otros solventes tales como tolueno y THF en lugar de etanol para este proceso de secado.

C. 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 mmol) (secado con etanol como se describió anteriormente) en THF (3800 mL) en un matraz de 5000 mL provisto de un condensador, agitador mecánico, sonda de temperatura y purgado con argón. Se agregó 2-amino-6-fluoro-benzonitrilo (95.3 g, 700 mmol) a la solución, 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 sólido (376.2 g, 1890 mmol) durante un periodo de 5 minutos. Cuando se terminó la adición de la base de potasio, se obtuvo una solución amarilla heterogénea, y la temperatura interna se había elevado a 62°C. Después de un periodo de 60 minutos, la temperatura interna disminuyó de nuevo hasta 40°C, y la reacción fue determinada como completa por HPLC (no estaba presente el material de partida ni intermediario no ciclizado). La mezcla de reacción espesa fue luego enfriada vertiéndola sobre H₂O (6000 mL) y agitando la mezcla resultante hasta que hubo alcanzado la temperatura ambiente. La mezcla fue filtrada entonces, y el lecho de filtración fue lavado con agua ((1000 mL 2X). El sólido amarillo brillante fue colocado en una bandeja de secado y secado en un horno al vacío a 50°C durante la noche produciendo 155.3 g (47.9%) de la 4-amino-fluoro- 3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona deseada.

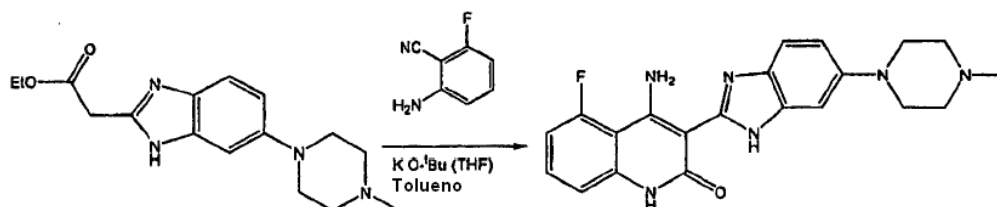
Procedimiento B

Un matraz de 5000 mL de 4 bocas fue equipado con un aparato de destilación, una sonda de temperatura, una entrada de gas N₂, un embudo de adición y un agitador mecánico. Se cargó el etil éster del ácido [6-(4-Metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-acético (173.0 g, 570 mmol) dentro del reactor, y el reactor fue purgado con N₂ durante 15 minutos. Se cargó entonces THF seco (2600 mL) en el matraz con agitación. Después de que se hubo disuelto el sólido, el solvente fue retirado por destilación (al vacío o atmosférica) (la temperatura más alta ayuda a retirar el agua) utilizando calor según sea necesario. Después de que se habían retirado 1000 mL del solvente, se detuvo la destilación y la reacción fue purgada con N₂. Se agregaron entonces 1000 mL del THF seco al recipiente de reacción, y cuando se disolvió todo el sólido, se llevó a cabo de nuevo destilación (al vacío o atmosférica) hasta que se retiraron otros 1000 mL de solvente. Este proceso de agregar THF seco y retirar el solvente fue repetido al menos 4 veces (a la cuarta destilación, el 60% del solvente fue retirado en vez de solo el 40% de las primeras 3 destilaciones) después de lo cual se retiró una muestra de 1 mL para análisis por Karl Fischer para determinar el contenido de agua. Si el análisis mostraba que la muestra contenía menos de 0.20% de agua, se continuaba con la reacción según se describe en el párrafo siguiente. Sin embargo, si el análisis mostraba más de 0.20% de agua, entonces el proceso de secado descrito anteriormente se continuo hasta que se alcanzó un contenido de agua de menos de 0.20%.

Después de que se hubiera alcanzado un contenido de agua de menos de o aproximadamente 0.20% utilizando el procedimiento descrito en el párrafo anterior, el aparato de destilación fue reemplazado con un condensador de reflujo, y la reacción se cargó con 2-amino-6-fluoro-benzonitrilo (66.2 g, 470 mmol) (en algunos procedimientos se utilizan 0.95 equivalentes). La reacción fue calentada entonces hasta una temperatura interna de 38-42°C. Cuando la temperatura interna hubo alcanzado 38-42°C, se agregó solución de KHMDS (1313 g, 1.32 moles, 20% KHMDS in THF) a la reacción a través del embudo de adición durante un periodo de 5 minutos manteniendo la temperatura interna a aproximadamente 38-50°C durante la adición. Cuando se completó la adición de la base de potasio, la reacción fue sometida a agitación durante 3.5 a 4.5 horas (en algunos ejemplos fue sometida a agitación durante 30 a 60 minutos y la reacción puede ser terminada dentro de ese tiempo) a la vez que se mantiene la temperatura inicial desde 38-42°C. Una muestra de la reacción fue entonces retirada y analizada por HPLC. Si la reacción no fue completa, se agrega solución adicional de KHMDS al matraz a lo largo de un periodo de 5 minutos y la reacción fue agitada a 38-42°C durante 45-60 minutos (la cantidad de solución de KHMDS agregada fue determinada como sigue: si la relación IPC es < 3.50, se agregan entonces 125 mL; si 10.0 ≥ relación IPC ≥ 3.50, se agregan entonces 56 mL; si 20.0 ≥ relación IPC ≥ 10, entonces se agregan 30 mL. La relación IPC es igual al área correspondiente a la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona) dividido por el área correspondiente al intermediario no ciclizado). Una vez que la reacción se completó (relación IPC > 20), el reactor fue enfriado hasta una temperatura interna de 25-30°C, y se cargó agua (350 mL) dentro del reactor a lo largo de un periodo de 15 minutos mientras que se mantenía la temperatura interna a 25-35°C (en una alternativa, la reacción se lleva a cabo a 40°C y se agrega agua durante 5 minutos. El enfriamiento más rápido reduce la cantidad de impurezas que se forman con el tiempo). El condensador de reflujo fue reemplazado entonces con un aparato de destilación y se retiró el solvente por destilación (vacío o atmosférica) utilizando calor según se requiera. Después de que 1500 mL de solvente hayan sido retirados, se discontinúa la destilación y la reacción se purga con N₂. Se

agrega entonces agua (1660 mL) al matraz de reacción a la vez que se mantiene la temperatura interna a 20-30°C. La mezcla de reacción fue agitada entonces a 20-30°C durante 30 minutos antes de enfriarla hasta una temperatura interna de 5-10°C y luego con agitación durante 1 hora. La suspensión resultante fue filtrada, y el matraz y la torta del filtro fueron lavados con agua (3 x 650 mL). El sólido así formado fue secado hasta un peso constante bajo vacío a 50°C en un horno al vacío para proveer 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 en forma de un polvo amarillo.

Procedimiento C

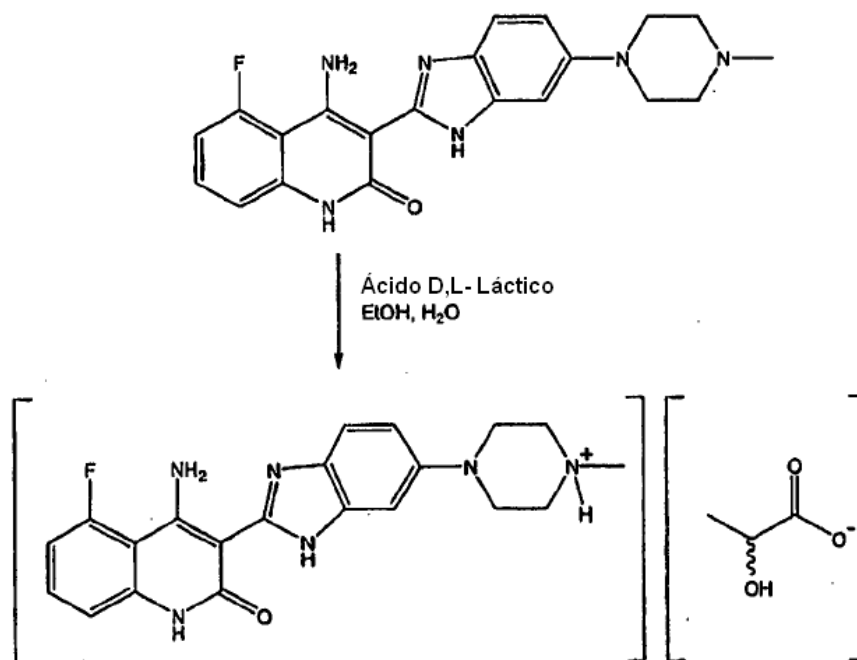


Se cargaron etil éster del ácido [6-(4-Metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-acético (608 g, 2.01 mol) (seco) y 2-amino-6-fluoro-benzonitrilo (274 g, 2.01 mol) en un matraz de 12 L de 4 bocas asentado sobre una manta de calentamiento y provisto con un condensador, un agitador mecánico, entrada de gas y sonda de temperatura. El recipiente de reacción fue purgado con N₂, y se cargó tolueno (7.7 L) dentro de la mezcla de reacción a medida que se agitaba. El recipiente de reacción fue purgado de nuevo con N₂ y se mantuvo bajo N₂. La temperatura interna de la mezcla fue elevada hasta que una temperatura de 63°C (+/- 3°C) fue alcanzada. La temperatura interna de la mezcla fue mantenida a 63°C (+/- 3°C) mientras que se destilaron aproximadamente 2.6 L de tolueno desde el matraz bajo presión reducida (380 +/- 10 torr, cabeza de destilación t = 40°C (+/- 10°C) (se utilizó el análisis de Karl Fischer para verificar el contenido de agua en la mezcla. Si el contenido de agua era mayor de 0.03% se agregaron entonces otros 2.6 L de tolueno y se repitió la destilación. Este proceso fue repetido hasta que se alcanzó un contenido de agua de menos de 0.03%). Después de que se hubo alcanzado un contenido de agua de menos de 0.03%, se discontinuó el calentamiento y la reacción fue enfriada bajo N₂ hasta una temperatura interna de 17 – 19°C. Se agregó entonces t-butoxido de potasio en THF (20% in HF; 3.39 kg, 6.04 moles de t-butoxido de potasio) a la reacción bajo N₂ y a una rata tal que la temperatura interna de la reacción se mantuvo por debajo de 20°C. Después de que la adición del t-butoxido de potasio se completó, la reacción se sometió a agitación a una temperatura interna de menos de 20°C durante 30 minutos. La temperatura fue elevada entonces hasta 25°C, y la reacción fue sometida a agitación durante al menos 1 hora. La temperatura fue elevada entonces a 30°C y la reacción fue sometida a agitación durante al menos 30 minutos. La reacción fue monitoreada entonces en cuanto a su terminación utilizando HPLC para verificar el consumo de los materiales de partida (típicamente en 2-3 horas, antes de que los materiales de partida fueran consumidos (menos de 0.5% por porcentaje de área en HPLC)). Si la reacción no estaba terminada después de 2 horas, se agregaron otros 0.05 equivalentes de t-butoxido de potasio de una sola vez, y el proceso fue completado hasta que la HPLC mostró que la reacción estaba terminada. Después de que la reacción estaba terminada se agregaron 650 mL de agua a la mezcla de reacción en agitación. La reacción fue calentada entonces hasta una temperatura interna de 50°C y el THF fue eliminado por destilación (aproximadamente 3 litros en volumen) bajo presión reducida desde la mezcla de reacción. Se agregó entonces agua (2.6 L) gota a gota a la mezcla de reacción utilizando un embudo de adición. La mezcla fue enfriada entonces hasta temperatura ambiente y agitada durante al menos 1 hora. La muestra fue entonces filtrada, y la torta de filtro fue lavada con agua (1.2 L), con etanol al 70% (1.2 L), y con etanol al 95% (1.2 L). El sólido amarillo brillante fue colocado en una bandeja de secado y secado en un horno al vacío a 50°C hasta que se obtuvo un peso constante que proveyó 674 g (85.4%) de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona deseada.

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 bocas de 3000 mL equipado con un condensador, sonda de temperatura, entrada de gas N₂ y agitador mecánico fue colocado en una manta de calentamiento. El matraz fue cargado 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 fue suspendido en etanol al 95% (1000 mL) y sometido a agitación. En algunos casos se utilizó una relación de solvente 8:1. La suspensión fue calentada entonces hasta reflujo suave (temperatura de aproximadamente 76°C) con agitación a lo largo de un periodo de aproximadamente 1 hora. La reacción fue agitada entonces durante 45 – 75 minutos mientras se mantenía el reflujo. En este punto, el calor fue retirado del matraz y la suspensión se dejó enfriar hasta una temperatura de 25 – 30 °C. La suspensión fue filtrada entonces, y el lecho del filtro fue lavado con agua (2 x 500 mL). El sólido amarillo fue colocado entonces en una bandeja de secado y secado en un horno al vacío a 50°C hasta que se obtuvo un peso constante (típicamente 16 horas) para obtener 97.2 g (96.2%) del producto purificado en forma de un polvo amarillo.

D. Preparación 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



Un matraz recubierto de 4 bocas de 3000 mL fue provisto con un condensador, una sonda de temperatura, una entrada para gas N₂ y un agitador mecánico. El recipiente de reacción fue purgado con N₂ durante al menos 15 minutos y luego cargado con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona (484 g, 1.23 mol). Se preparó una solución de ácido D, L-láctico (243.3 g, 1.72 mol de monómero - véase el parágrafo siguiente), agua (339 mL) y etanol (1211 mL) y se cargó al matraz de reacción. Se inició la agitación a una velocidad media, y la reacción fue calentada hasta 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 se discontinuó el calentamiento. La mezcla resultante fue filtrada a través de una frita de 10-20 micrones para recolectar el filtrado en un matraz de 12 L. El matraz de 12 L fue equipado con una sonda de temperatura interna, un condensador para reflujo, un embudo de adición, una entrada y salida de gas, y un agitador superior. El filtrado fue sometido a agitación entonces a una rata media y calentado hasta reflujo (temperatura interna de aproximadamente 78°C). A la vez que se mantenía un reflujo suave, se cargó etanol (3,596 mL) al matraz a lo largo de un periodo de aproximadamente 20 minutos. El matraz de reacción fue enfriado entonces hasta una temperatura interna que variaba desde aproximadamente 64-70°C a lo largo de 15-25 minutos y esta temperatura se mantuvo durante un periodo de aproximadamente 30 minutos. El reactor fue inspeccionado en búsqueda de cristales. Si no había cristales presentes, se agregaron entonces cristales de la sal del 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 mol %) al matraz, y la reacción fue agitada a 64-70°C durante 30 minutos antes de inspeccionar de nuevo el matraz en búsqueda de cristales. Una vez que había cristales presentes, se redujo la agitación a una rata baja y la reacción fue sometida a agitación a 64-70°C durante 90 minutos adicionales. La reacción fue enfriada entonces hasta aproximadamente 0°C a lo largo de un periodo de aproximadamente 2 horas, y la mezcla resultante fue filtrada a través de un filtro de frita de 25-50 micrones. El reactor fue lavado con etanol (484 mL) y agitado hasta que la temperatura interna fue aproximadamente de 0°C. El etanol frío fue utilizado para lavar la torta del filtro, y este procedimiento fue repetido 2 veces más. El sólido recolectado fue secado hasta peso constante a 50°C bajo vacío en un horno al vacío produciendo 510.7 g (85.7%) de la sal amarilla cristalina de ácido láctico de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona. Se usaron típicamente un dique de goma o condiciones inertes durante el proceso de filtración. En tanto el sólido seco no parecía ser muy higroscópico, la torta húmeda de filtro tiende a tomar agua y hacerse pegajosa. Se tomaron precauciones para evitar una exposición prolongada de la torta de filtro húmeda a la atmósfera.

El ácido láctico comercial contiene en general aproximadamente 8-12% de agua p/p, y contiene dímeros y trímeros además del ácido láctico monomérico. La relación molar del dímero a monómero del ácido láctico es en general aproximadamente 1.0:4.7. El ácido láctico grado comercial puede ser utilizado en el proceso descrito en el parágrafo precedente puesto que la sal de monolactato se precipita preferiblemente desde la mezcla de reacción.

Proceso de descarte para selección de sales

Con el fin de determinar las mejoras en las características de una sal de un compuesto de la fórmula I, se fijaron y observaron ciertos criterios de línea base. Estos incluyen:

1. Solubilidad acuosa > 10 mg/mL

2. Material altamente cristalino determinado por difracción en polvo de Rayos X (XRPD), esto es más estable químicamente, menos higroscópico, preferencia de la sal mono a la sal bis según se determina por RMN o cromatografía de iones y alto rendimiento químico.

Técnicas de descarte

Las técnicas de descarte por propiedades fisicoquímicas incluyen solubilidad en equilibrio, XRPD, higroscopicidad, compactabilidad, morfología y estabilidad en estado sólido las cuales fueron utilizadas para evaluar la base libre y las sales.

Solubilidad

La solubilidad acuosa de los compuestos de la fórmula I y Fórmula II y sus sales fue determinada equilibrando sólido en exceso con 1 mL de agua durante 24 horas a 22°C. Se centrifugó una alícuota de 200 uL a 15,000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante fue analizado por HPLC y la solubilidad se expresa como su equivalente en base libre (mg FB/mL). Por ejemplo, se prepararon sales de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona y se midieron la solubilidad y el pH en solución. A continuación se muestra una tabla que compara la solubilidad acuosa y el pH en saturación para las diversas sales.

Tabla 1. Solubilidad de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona. Base libre de sales

Forma	Lote	pH en saturación	Solubilidad (mg FB/ML)	Cristalinidad
Monolactato	A	5.78	216	Cristalino
Monoacetato	B	5.38	84.4	Amorfo
Monomalato	C	3.99	46.3	Cristalino
Hemimalato	D	5.37	6.39	Cristalino
Monotartrato	E	4.33	2.18	Cristalino
Monotartrato	F	4.14	0.910	Cristalino
Monotartrato	G	3.92	0.889	Cristalino
Monotartrato	H	4.11	0.886	Cristalino
Monomesilato	I	5.33	185	Cristalino
Monomesilato	J	5.11	180	Cristalino
Base libre	K	6.03	0.0703	Mezcla de cristalino y amorfo
Base libre	L	8.65	0.00748	Cristalino
Monomalato	M	4.60	3.13	Cristalino
Monomalato	N	3.93	8.14	Cristalino

(continuación)

Forma	Lote	pH en saturación	Solubilidad (mg FB/ML)	Cristalinidad
monomalato	O	4.08	3.66	Cristalino

Monolactato	P	6.14	182	Cristalino
Monolactato	Q	5.65	202	Cristalino
Monolactato	R	5.60	196	Cristalino
Bis-mesilato	S	1.21	>234	Cristalino
Monocitrato	T	4.56	0.456	Cristalino
Monocitrato	U	5.50	330	Cristalino
Base libre	AA	9.64	0.011	Mezcla de cristalino y amorfo
Lactato	BB	5.05	34.2	Mezcla de cristalino y amorfo
Bis-Lactato	CC	3.89	304 (gelificado)	Mezcla de cristalino y amorfo
Mesilato	DD	5.77	22.3	Mezcla de cristalino y amorfo
Bis-Mesilato	EE	2.51	>475 (gel de cristal líquido metafásico)	Mezcla de cristalino y amorfo
Fosfato	FF	3.98	13.8	Mezcla de cristalino y amorfo
Sulfato	GG	2.68	19.7	Mezcla de cristalino y amorfo
L-Tartrato	HH	3.44	103.4	Mezcla de cristalino y amorfo
Acetato	II	5.72	15.4	Mezcla de cristalino y amorfo
Bis-Acetato	JJ	5.46	31.9	Mezcla de cristalino y amorfo
Nitrato	KK	3.27	6.7	ND
Clorhidrato	LL	3.70	26.3 (gelificado)	ND
BisHCl	MM	1.39	42 (gelificación severa)	ND
Citrato	NN	3.48	27.2	ND
Maleato	OO	2.82	0.866	ND
L-Malato	PP	3.82	69	Mezcla de cristalino y amorfo
Glicinato	QQ	7.68	0.0638	ND
Bis-Glicinato	RR	7.40	0.11	ND
ND = No determinado				

Cristalinidad

Los análisis por XRPD fueron llevados a cabo sobre un difractómetro de Rayos X en polvo Shimadzu XRD-6000 utilizando radiación CuK α . El instrumento está equipado con un tubo de Rayos X de foco fino. El voltaje y el amperaje del tubo fueron fijados a 40 kV y 40 mA, respectivamente. Las rendijas de divergencia y dispersión fueron fijadas a 1° y la rendija de recepción fue fijada a 0.15 mm. La radiación difractada fue detectada mediante un detector de centelleo de NaI. Se utilizó un barrido continuo en teta-dos teta a 3°/minuto (etapa de 0.4

segundos/0.02°) desde 2.5 a 40°C. Por ejemplo, se prepararon sales de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona y se observó el grado de cristalinidad. Varias de las formas salinas en la tabla anterior fueron encontradas exhibiendo un alto grado de cristalinidad y con patrones de difracción de Rayos X en polvo distintos.

5 Higroscopicidad

Se recolectaron los datos de sorción/desorción de humedad sobre un sistema de balanza de humedad VTI SGA-100 o equivalente. Para las isotermas de sorción, se utilizó un rango de sorción de 5 a 95% de humedad relativa (RH) y un rango de desorción de 95 a 5% de humedad relativa en incrementos de 10% de RH a 25°C para cada análisis. Por ejemplo, se prepararon sales de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona y se midió el cambio de peso inducido por humedad.

10

Tabla 2. Cambio en peso inducido por humedad en sales de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona

Forma de sal	Cambio de peso en % inducido por humedad		
	55% RH	85% RH	95% RH
Ensayo Lactato 1	0.61	1.39	12.84
Ensayo Lactato 2	0.13	0.42	2.76
Ensayo Lactato 3	0.08	0.15	0.24
Ensayo Mesilato 1	1.88	2.38	4.12
Ensayo Mesilato 2	6.32	7.65	22.63
Ensayo Malato 1	0.64	1.49	2.71
Ensayo Malato 2	0.16	0.34	0.56
Ensayo Malato 3	0.08	0.18	0.30

Estabilidad química

- 15 Se mantuvieron muestras en polvo secas de base libre y sales en matraces abiertos bajo condiciones de estrés a 30°C/60% de humedad relativa y 40°C/70% de humedad relativa. Se almacenaron muestras en solución de la base libre y las sales en viales sellados bajo temperatura ambiente. Las muestras fueron extraídas a puntos en el tiempo predeterminado y analizadas en cuanto a su estabilidad química. Las muestras fueron extraídas en puntos de tiempo predeterminados y probadas por HPLC con un detector de longitud de onda múltiple UV-visible. Se dan a
- 20 continuación dos tablas que comparan la estabilidad química en estado sólido y en estado de solución de las diversas sales.

Tabla 3. Solubilidad en estado sólido/análisis de HPLC de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona base libre y sales

Sal	% de área en tiempo = 0	% de área en tiempo = 6 semanas	Condiciones de almacenamiento
Base libre	97.38	97.83	Humedad relativa 30°C/60%
Mesilato	98.80	98.68	Humedad relativa 30°C/60%
Sulfato	98.75	99.39	Humedad relativa 30°C/60%
Fosfato	98.47	99.28	Humedad relativa 30°C/60%
Lactato	98.41	99.04	Humedad relativa 30°C/60%
Bis-Mesilato	99.01	98.12	Humedad relativa 30°C/60%
Bis-Lactato	98.71	98.64	Humedad relativa 30°C/60%
Base libre	97.77	98.23	Humedad relativa 40°C/70%
Mesilato	98.89	98.7	Humedad relativa 40°C/70%
Sulfato	98.96	98.9	Humedad relativa 40°C/70%
Fosfato	98.84	98.86	Humedad relativa 40°C/70%
Lactato	98.46	98.55	Humedad relativa 40°C/70%
Bis-Mesilato	98.78	98.35	Humedad relativa 40°C/70%
Bis-Lactato	98.99	97.92	Humedad relativa 40°C/70%

5 Tabla 4. Estabilidad en estado de solución/análisis por HPLC de sales de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona

Sal	% de área en tiempo = 0	% de área en tiempo = 7 días	Condiciones de almacenamiento
Malato	98.70	98.69	5°C
Mesilato	98.70	98.76	5°C
Lactato	98.80	98.60	5°C
Malato	98.70	98.65	Temperatura ambiente
Mesilato	98.70	98.77	Temperatura ambiente
Lactato	98.80	98.71	Temperatura ambiente

Estudios de compactación

10 Se prepesaron 200 mg de sal de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona pulverizada y se colocaron en un cubo de 0.8 cm de diámetro y comprimieron a 5000 psi utilizando un Carver Press (mantenido durante 1 minuto). La fuerza de tensión resultante y el espesor de los compactos se midieron utilizando un VK 200 Tablet Hardness Tester y un calibrador de espesor Mitutoyo. Por ejemplo, fueron preparadas las sales de lactato y mesilato de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona y se llevaron a cabo los estudios de compactación. Cuando se comprimieron bajo la misma presión aplicada, las sales de

lactato, malato y mesilato forman compactación; la sal de lactato generalmente forma compactaciones más fuertes con una tendencia a formar cubiertas o láminas.

Tabla 5. Compactación de sales de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona

Forma de sal	Compactación (200 mg a 5000 psi)		
	Forma compactación	Espesor (mm)	Fuerza de tensión (SC-Strong Cobb)
Ensayo Lactato 1	Si	3.06	13.8
Ensayo Lactato 2	Si	2.92	17.9
Ensayo Lactato 3	Si	2.97	16.1
Ensayo Mesilato 1	Si	2.77	6.9
Ensayo Mesilato 2	Si	2.87	17.9

5

Morfología

La morfología de los cristales de la sal de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona fue determinada utilizando un microscopio de luz polarizada Nikon Eclipse 6600 POL con magnificación de 10x y 40 x.

10 Tabla 6. Morfología de sales de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona

Forma de sal	Morfología
Ensayo Lactato 1	Placa
Ensayo Lactato 2	Placa
Ensayo Lactato 3	Placa
Ensayo Mesilato 1	Placa
Ensayo Mesilato 2	Aguja

Como se describió anteriormente se utilizaron diversas técnicas de descarte por propiedades fisicoquímicas incluyendo solubilidad, XRPD, higroscopicidad, compactabilidad, morfología y estabilidad en estado sólido para evaluar las formas de sal del 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona.

15 En el caso de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona, las formas de sal del compuesto que exhiben solubilidades en agua generalmente entre aproximadamente 20 mg/mL y 330 mg/mL produciendo un pH en agua final aproximadamente entre pH 3 a 6 sin gelificar fueron acetato, tartrato, malato, lactato, bis-acetato, mesilato, citrato y bis mesilato. Así, cambiando la base libre de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona (solubilidad acuosa de aproximadamente 0.01 mg/mL) a la forma en sal puede incrementarse significativamente su solubilidad y rata de disolución.

20

El patrón de XRPD de las sales de L-tartrato, citrato, L-malato, DL-lactato, mesilato y bis-mesilato de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona (lotes A-U) presentan la resolución de reflexiones, demostrando que las muestras son cristalinas en naturaleza. El patrón de XRPD de las sales de acetato sugiere que la muestra es amorfa en su naturaleza.

25 Las siguientes sales de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona fueron analizadas por XRPD, mono-mesilato, sulfato, fosfato, mono-DL-lactato, bis-mesilato, bis-lactato, L-tartrato, bis-acetato, bis-acetato y L-malato (lotes BB-PP). Los patrones de XRPD de todas las muestras (excepto la sal de bis-mesilato) presentan varias reflexiones amplias sobre una línea base fijada, sugiriendo que las muestras están compuestas de una mezcla de material cristalino y amorfo o tienen un bajo grado de orden (baja cristalinidad). El patrón de XRPD de la sal de bis-mesilato presenta resolución de reflexiones, demostrando que la muestra es cristalina en su naturaleza.

30

De las sales cristalinas, las sales de malato, lactato, mesilato y bis-mesilato exhiben solubilidades en agua generalmente entre aproximadamente 50 mg/mL y 330 mg/mL produciendo un pH final en agua cercano a pH 4 a 6. El grado de cristalinidad de la forma de envase libre o salina puede impactar significativamente su solubilidad y rata de disolución. Las siguientes sales cristalinas de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona fueron analizadas en cuanto a higroscopicidad. La afinidad de absorción de agua a 85% de humedad relativa en general fue mesilato > lactato = malato. Las sales de lactato y malato se consideran no higroscópicas. Los datos de estabilidad demostraron que la base libre y las sales seleccionadas de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona exhibieron estabilidad química adecuada.

Las sales de lactato tienen una morfología cristalina en forma de placa, mientras que el mesilato varía de placa a aguja, y el malato muestra morfología cristalina en forma de aguja. Las placas se prefieren a los cristales en forma de aguja por sus mejores propiedades de flujo, las cuales son críticas para una eficiente mezcla, llenado y tableteado de la formulación.

Cuando se comprimen bajo la misma presión aplicada, las sales de lactato, malato y mesilato forman compactación; la sal de acetato generalmente forma compactaciones más fuertes sin tendencia a descascarar o separarse en láminas. Los datos generados a partir de este ejemplo indican que las sales de lactato, acetato, malato, tartrato, mesilato y citrato tienen solubilidad acuosa mejorada con respecto a la correspondiente forma de base libre. Las sales de lactato, malato, tartrato, mesilato y citrato, bis-mesilato son cristalinas en su naturaleza.

Las sales de malato y lactato pueden ser consideradas como no higroscópicas minimizando así el riesgo de inestabilidad química. La sal de lactato muestra buenas características de procesamiento y es adecuada para el desarrollo de tabletas.

Procedimientos de ensayo

Ensayos de quinasa *in vitro* para tirosina quinasas receptoras

La actividad de quinasa de diversas tirosina quinasas puede medirse proveyendo ATP y un sustrato que contiene un péptido adecuado o proteína tirosina, y ensayando la transferencia de la unidad estructural fosfato al residuo tirosina. Las proteínas recombinantes correspondientes a los dominios citoplasmáticos de los receptores flt-1 (VEGFR1), KDR (VEGFR2), PDGF, y bFGF fueron expresados en células de insectos Sf9 utilizando un sistema de expresión de Baculovirus (Invitrogen) y purificado a través de interacción de anticuerpo Glu (para constructos direccionados al epítipo de Glu) o por cromatografía iónica de metales (para constructos dirigidos a His₆ (SEQ ID NO: 1)). Para cada ensayo, los compuestos de prueba fueron diluidos en serie en DMSO y luego mezclados con un regulador de reacción de quinasa apropiado más ATP. La proteína quinasa y un sustrato de péptido biotinilado apropiado fueron agregados para dar un volumen final de 100 µL, las reacciones fueron incubadas durante 1 – 2 horas a temperatura ambiente y detenidas mediante la adición de 50 µL de EDTA 45 mM, Hepes pH 7.5 50 mM. La mezcla de reacción detenida (75 µL) fue transferida a una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina (Boehringer Mannheim) e incubada durante 1 hora. El producto de péptido fosforilado fue medido con el sistema de fluorescencia con resolución en el tiempo DELFIA (Wallac), utilizando un anticuerpo PT66 antifosfotirosina marcado con Eu con la modificación de que el regulador de ensayo de DELFIA fue complementado con MgCl₂ 1 mM para la dilución del anticuerpo. La fluorescencia con resolución de tiempo fue leída en un fluorómetro Wallac 1232 DELFIA. La concentración de cada compuesto para una inhibición del 50% (IC₅₀) se calculó mediante regresión no lineal utilizando el software de análisis de datos XL Fit.

Las quinasas Flt-1, KDR, PDGF, c-KIT, FLT-3 y bFGFR fueron probadas en Hepes pH 7.0 50 mM, MgCl₂ 2 mM, MnCl₂ 10 mM, NaF 1 mM, DTT 1 mM, 1 mg/mL de BSA, ATP 2 µM, y biotin-GGGGQDGKDYIVLPI-NH₂ (SEQ ID NO: 2) 0.42 µM. Las quinasas Flt-1, KDR, y bFGFR fueron agregadas a 0.1 µg/mL, 0.05 µg/mL, o 0.1 µg/mL respectivamente.

Ejemplo 1-Inhibición de crecimiento mediado por CSF-1 por 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona

La actividad antiproliferativa del compuesto 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona fue demostrada para inhibir la proliferación mediada por CSF-1 (Factor de estimulación de colonias 1) de células M-NFS-60 (línea celular de mieloblasto de ratón) con una EC₅₀ de 300 nM. La prueba fue ejecutada sembrando en placas 5000 células/pozo en 50 µL de medio de ensayo (medio de crecimiento sin 67.1 ng/mL de GM-CSF: RPMI-1640+10% FBS+0.044 mM beta Mercaptoetanol+2 mM L-Glut+Pen/Strep) en una placa de 96 pozos. La 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona diluida en serie en solución madre de DMSO comenzando a 20 µM fue agregada a la placa en 50 µL de medio de ensayo que contenía CSF-1 para lograr una concentración final de 10 ng/mL y luego se incubó durante 72 horas a 37°C y CO₂ al 5%. La concentración final en DMSO fue 0.2%. Después de 72 horas de incubación, se agregaron 100 µL de Cell Titer Glo (Promega #G755B) a la placa, y después de agitar y un tiempo de incubación de 10 minutos, se midió la luminiscencia. La EC₅₀ fue calculada utilizando regresión no lineal.

La autofosforilación de CSFR1 es inhibida por la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona con concentraciones < 1 μ M. El tratamiento de las células M-NFS-60 con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona y un tratamiento de las células con CSF-1 durante 5 minutos y al final del tiempo de incubación, dio como resultado la inhibición de la fosforilación de la tirosina receptora detectada por inmunoprecipitación de CSFR1 e inmunoprecipitación western con un anticuerpo antifosfotirosina.

Ejemplo 2-Inhibición de FGFR3 por 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona

La translocación t(4;14) que ocurre únicamente en un subconjunto (15-20%) de pacientes con mieloma múltiple (MM) da como resultado la expresión ectópica de la tirosina quinasa receptora (RTK), FGFR3. La adquisición subsecuente de mutaciones de activación de FGFR3 en algunos MM está asociada con la progresión de la enfermedad y es fuertemente transformante en modelos experimentales.

La 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona inhibió la proliferación de células OPM-2 que expresan el FGFR3 activado constitutivamente debido a una mutación cada 650E con una EC_{50} de 100 nM. El ensayo fue ejecutado sembrando en placa 8000 células/pozo en 50 μ L de medio de ensayo (RPMI-1640+10%FBS+Pen/Strep) en una placa de 96 pozos. La 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona diluida en serie en solución madre de DMSO comenzando a 20 μ M fue agregada a la placa en 50 μ L de medio de ensayo y luego incubada durante 72 horas a 37°C y CO₂ al 5%. La concentración final en DMSO fue de 0.2%. Después de 72 horas de incubación, se agregaron a la placa 100 μ L de Cell Titer Glo (Promega #G755B) y, después de agitación y un tiempo de incubación de 10 minutos, se leyó la luminiscencia. La EC_{50} fue calculada utilizando regresión no lineal. La EC_{50} para la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona en la línea celular H929 (IMDM+10%FBS+Pen/Strep) que expresa al receptor WT FGFR3 fue de 0.63 μ M. La EC_{50} fue determinada como se describió anteriormente utilizando medio que contenía 50 ng/ml de aFGF, 10 mg/ml de heparina y 1% de FBS. La EC_{50} fue calculada utilizando regresión no lineal de los OD a 490 nm los cuales fueron determinados después de agregar el reactivo tetrazolio MTS (Promega) durante 4 horas.

Se observó apoptosis significativa después de 6 días de tratamiento de células OPM-2 con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona (>60% de las células fueron positivas a AnnexinV usando el protocolo e instrumento de Guava Technologies para la detección de células positivas para Annexin V).

La fosforilación del componente ERK de señalización corriente abajo fue inhibida completamente después de la incubación de las células OPM-2 con 0.1 μ M de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona. Se utilizó inmunoprecipitación Western para mostrar la inhibición de la fosforilación de ERK.

Ejemplo 3-Inhibición de C-Met por 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona

La 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona inhibe c-MET con una IC_{50} >3 μ M. La actividad de quinasa de la c-MET fue medida proveyendo ATP a una concentración final de 25 μ M y 10 nM de la enzima c-MET (Upstate# 14-526) en la presencia del sustrato biotinilado 1 μ M (KKKSPGEYVNIEFG (SEQ ID NO: 3)). El sustrato enlazado a las placas de estreptavidina fue detectado con el anticuerpo PT66 antifosfotirosina marcado con europio. El sustrato de péptido fosforilado fue medido con el sistema de fluorescencia con resolución en el tiempo DELPHIA, y la IC_{50} fue calculada empleando regresión no lineal usando el software de análisis de datos XL Fit. La C-MET fue activada constitutivamente en células KM12L4A la cual es una de las líneas celulares más sensibles con respecto a la inhibición de la proliferación por 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona (EC_{50} 20 μ M). Esto sugiere que la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona inhibe bien sea la c-MET mutada o una quinasa en la ruta de señalización corriente abajo de c-MET.

Cada uno de los siguientes compuestos fue sintetizado y probado durante los procedimientos descritos anteriormente, o aquellos descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 6, 605,617.

Tabla 7. Compuesto de ejemplo

60	4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona	393.1
----	---	-------

El ejemplo anterior presento un valor de IC_{50} de menos de 10 μ M con respecto a Flt-1, KDR, PDGF, c-KIT, FLT-3, VEGFR1, VEGFR2, c-Met, CSF-1, FGFR3 y/o bFGFR. Adicionalmente, el ejemplo anterior presento un valor de IC_{50} de menos de 10 μ M con respecto a PDGFR.

Actividad *in vitro* de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona contra diversos RTK

- Los compuestos de quinolinona bencimidazolilo sustituidos con 4-amino tales como 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona y tautómeros y sales del mismo son inhibidores potentes de diversas quinasas tales como VEGFR2 (KDR, Flk-1), FGFR1 y PDGFR β con IC₅₀ que varían desde 10-27 nM. Véase la Patente de los Estados Unidos No. 6,605,617, la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 10/644,055, y la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 10/706,328, para una lista de varias quinasas tirosina y serina/treonina para las cuales 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona ha mostrado actividad y para procedimientos de ensayo. Estas RTK son importantes para la iniciación y mantenimiento de nuevo crecimiento de vasos sanguíneos así como para la proliferación tumoral. Una perfilación sistemática contra las RTK de clase III-IV así como un subconjunto de RTK de otras clases muestra una potente inhibición de CSF-R1/c-fms, c-kit, flt3 and FGFR3. FGFR3 es expresado normalmente y en algunos casos activado constitutivamente en un subconjunto de pacientes con mieloma múltiple como consecuencia de la translocación t(4;14) (aproximadamente 15-20%).
- Los efectos de los compuestos de quinolinona bencimidazolilo sustituidos con 4-amino tales como 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona sobre líneas celulares de mieloma múltiple con la translocación t(4;14) fueron investigados con respecto a efectos sobre la proliferación, ciclo celular, apoptosis y fosforilación de FGFR3 y ERK (quinasa regulada extracelular). El mieloma múltiple se presenta con pérdida en detrimento del hueso mediada principalmente por el gran incremento en la producción de IL6 y la activación concomitante de osteoclastos responsables por la resorción de hueso. La M-CSF tiene un papel en el reclutamiento de precursores de osteoclastos y puede promover su supervivencia. La señalización de bloqueo a través del CSF-1R puede proveer así beneficio adicional a pacientes con mieloma múltiple. La inhibición de la proliferación mediada por M-CSF de la línea celular mielóide murínica M-NFS-60 se correlaciona con la inhibición de la actividad de quinasa *in vitro* contra c-fms/CSF-1R.
- Los compuestos de quinolinona bencimidazol sustituidos con 4-amino tales como 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona y tautómeros y sales del mismo actúan como inhibidores potentes de RTK de clases III-V. Los valores de IC₅₀ de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 9. Actividad de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona contra diversos RTK

RTK	IC ₅₀ (μM)
FLT3	0.001
c-KIT	0.002
CSFR1/c-fms	0.036
FGFR1	0.008
FGFR3	0.009
VEGFR1/Flt1	0.01
VEGFR2/Flk1	0.013
VEGFR3/Flt4	0.008
PDGFR β	0.027
PDGFR α	0.21
EGFR1	2
c-MET	>3
EphA2	4
TIE2	4
IGFR1	>10
HER2	>10

Los ensayos *in vitro* de RTK utilizados para preparar la tabla anterior fueron ejecutados en la presencia de una concentración de ATP que está dentro de tres veces o en la K_m de la enzimas utilizadas (para enzimas donde K_m estaba disponible). El sustrato de péptido fosforilado fue detectado con un anticuerpo (PT66) antifosfotirosina

marcado con europio. El europio fue detectado entonces utilizando fluorescencia con resolución en el tiempo. Para algunas pruebas, se incubó $\gamma\text{-P}^{33}$ ATP con la enzima y la radioactividad del sustrato de péptido fosforilado fue cuantificada en la presencia de diversas concentraciones de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona y utilizada para calcular la IC_{50} .

La figura 1 muestra que la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona inhibe la proliferación de líneas celulares de mieloma múltiple. KMS11, OPM-2, y H929 son líneas celulares de mieloma múltiple que fueron incubadas con diluciones seriadas de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona. Después de 72 horas, el número de células viables restante fue determinado utilizando el CellTiter-Glo™ Assay (Promega). KMS 11 y OPM-2 tienen mutaciones activadoras en el receptor FGFR3, y la H929 expresa WT FGFR3. La 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona inhibe la quinasa receptora FGFR3 (IC_{50} = 9 nM, Tabla 9) y bloquea la proliferación de dos líneas celulares con mutaciones activadoras de FGFR3: células KMS11 (Y373C) y OPM-2 (K650E) con EC_{50} de 60 nM y 87 nM, respectivamente (véase figura 1). Las células H929 expresan WT FGFR3 y el mutante N-ras (13G>D), y se inhibió la proliferación, pero menos potentemente, por parte de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona en esta línea celular (EC_{50} = 2.6 μM , EC_{50} en medio de crecimiento reducido en suero = 0.6 μM).

La fosforilación de tirosina FGFR3 fue inhibida por la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona a 0.5 μM en células KMS11 (véase figura 2). Las células KMS11 fueron dejadas sin nutrición durante dos horas en medio de crecimiento que contenía 1% de FBS. Las células fueron incubadas entonces con diferentes concentraciones de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona durante dos horas en medio de crecimiento sin FBS, lavadas y sometidas a lisis para inmunoprecipitación con FGFR3 Ab (sc123 Santa Cruz Biotech). Los lisados fueron analizados por inmunoprecipitación western y sondeados con anticuerpo 4G10 (Upstate Biotech) antifosfotirosina. El panel inferior mostró la FGFR3 total después de raspar la inmunoprecipitación western y resondear con FGFR3 Ab (véase figura 2).

La 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona demostró inhibir la fosforilación de ERK a 0.5 μM en células KMS11. Las células KMS11 fueron sometidas a carencia de nutrición durante dos horas en medio de cultivo que contenía FBS al 1%. Las células fueron incubadas entonces con diferentes concentraciones de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona durante dos horas en medio de crecimiento sin FBS, lavadas, sometidas a lisis y analizadas por inmunoprecipitación western y sondeadas con el anticuerpo antifosfo-ERK (Cell Signaling). El panel inferior de la figura 3A muestra la proteína ciclofilina (Upstate Biotech) como control de carga. La 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona también inhibió la fosforilación de ERK a 0.1 μM en células OPM-2. Las células OPM-2 fueron incubadas con diferente concentración de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona durante una hora en un medio de crecimiento con FBS al 1%, lavadas, sometidas a lisis y analizadas por inmunoprecipitación western y sondeadas con anticuerpo antifosfo ERK (Cell Signaling). El panel inferior de la figura 3B muestra la proteína 14-3-3 (Santa Cruz Biotech) como un control de carga. La ERK en la ruta MAPK es un componente de señalización de FGFR3 corriente abajo y la fosforilación de ERK fue inhibida tanto en células OPM-2 como KMS11 a 0.5 μM de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (véanse figuras 3A y 3B). En contraste, el compuesto no tuvo efecto sobre los niveles de fosfo-ERK hasta 5 μM en células H929. Las células H929 fueron sometidas a falta de nutrición durante dos días en medio de cultivo con FBS. Las células fueron incubadas entonces con diferentes concentraciones de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona durante una hora en medio de crecimiento sin FBS, lavadas, estimuladas durante 5 minutos con 50 ng/mL de aFGF y 10 $\mu\text{g/mL}$ de heparina, sometidas a lisis y analizadas por inmunoprecipitación western y sondeadas con anti fosfo ERK Ab (Cell Signaling). Solamente un cambio menor en la fosfo-ERK en respuesta a la estimulación con una aFGF después de dos días de carencia de suero indicó que la ruta es activada constitutivamente debido a la mutación Ras (véase figura 3C).

Las células KMS11 fueron incubadas con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona a diversas concentraciones durante 96 horas. Las células KMS11 incubadas fueron lavadas y teñidas con AnnexinVPE y 7AAD de acuerdo con el protocolo de ensayo Nexin (Guava Technologies). Las muestras fueron corridas sobre el instrumento Guava PCA™ y el porcentaje de células en cada categoría fue analizado con el software Guava Nexin™. Las células OPM-2 fueron incubadas con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona a diversas concentraciones durante 72 horas. Las células OPM-2 incubadas fueron lavadas y teñidas con AnnexinVPE y 7AAD de acuerdo con el protocolo de ensayo Nexin (Guava Technologies). Las muestras fueron corridas sobre el instrumento Guava PCA™ y el porcentaje de células en cada categoría fue analizado con el software Guava Nexin™. Los resultados de los experimentos anteriores muestran que la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona induce la apoptosis según se mide por tinción con AnnexinVPE en células KMS 11 y OPM-2 comenzando en concentraciones de 0.1 μM y 0.5 μM respectivamente (figuras 4 y 6).

Los datos experimentales concernientes a la inducción del apoptosis por 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona en células KMS11 y OPM-2 fue confirmado por incremento significativos en

la subpoblación G1 de células en un análisis de ciclo celular observado a concentraciones de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona de 0.1 μ M y superiores (figura 5). Las células KMS 11 fueron incubadas con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona a concentraciones de 0.001 μ M, 0.01 μ M, 0.1 μ M, y 1 μ M durante 72 horas. Las células fueron entonces fijadas y teñidas con yoduro de propidio antes de analizar las muestras por FACS (véase figura 5). Estos resultados mostraron que los compuestos tenían efectos menores sobre el ciclo celular, pero inducían la apoptosis en células KMS 11 a 0.1 μ M. Las células OPM-2 también fueron incubadas con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona en concentraciones de 0.001 μ M, 0.01 μ M, 0.1 μ M, y 1 μ M durante 72 horas. Las células fueron de la misma forma fijadas y teñidas con yoduro de propidio antes de analizar las muestras por FACS (véase figura 7). Estos resultados muestran que el compuesto tiene efectos menores sobre el ciclo celular pero inducía a la apoptosis en células OPM-2 a 0.5 μ M. Otros efectos sobre el ciclo celular por parte del compuesto fueron menores, por ejemplo, no hubo una detención significativa de G1. Los incrementos en la población sub G1 fueron menos significativos en la línea celular OPM-2 en comparación con las células KMS 11 y comenzó a 0.5 μ M (figura 7).

Las células H929 fueron incubadas con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona en concentraciones de 0.01 μ M, 0.1 μ M, 0.5 μ M, y 1 μ M durante 72 horas. Las células fueron entonces fijadas y teñidas con yoduro de propidio antes de analizar las muestras por FACS (véase figura 8). La 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona no tuvo efecto sobre el ciclo celular en células H929 con concentraciones de hasta 1 μ M confirmando que la línea celular mutante N-ras que expresa FGFR3 es menos sensible a la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (figura 8) que lo que son las células KMS 11 y OPM-2.

La pérdida de hueso osteolítica es una de las complicaciones principales en la enfermedad de mieloma múltiple. La citoquinas principales involucradas en la resorción ósea son IL1 β e IL6. Además, las concentraciones en suero incrementadas de M-CSF han sido detectadas en pacientes. La 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona inhibe la actividad de la CSF-1R, el único receptor conocido para M-CSF con una IC₅₀ de 36 nM (véase Tabla 9). La proliferación mediada por M-CSF de una línea celular mieloblástica de ratón M-NFS-60 fue inhibida con una EC₅₀ de 220 nM (figura 9). Las células murínicas M-NFS-60 fueron incubadas con diluciones seriadas de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona en medio de ensayo con 10 ng/mL de M-CSF y sin GM-CSF. Las células en los pozos de control fueron incubadas con medio de prueba únicamente. Después de 72 horas de tiempo de incubación, el número de células viables remanente fue determinado utilizando el CellTiter-Glo™ Assay (Promega). Los valores EC₅₀ fueron determinados utilizando regresión no lineal. (Figura 9).

La 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona tiene actividad antiproliferativa significativa e inhibe la fosforilación del receptor de FGFR3 y la fosforilación de ERK en líneas celulares de mieloma múltiple con mutaciones de FGFR3 activadoras. Por lo tanto, la invención provee un método para inhibir la fosforilación del receptor de FGFR3 y la fosforilación de ERK en líneas celulares de mieloma múltiple con mutaciones de FGFR3 activadoras que incluye administrar una cantidad efectiva de un compuesto de quinolinona bencimidazolilo sustituido con 4-amino, un tautómero del mismo, una sal del compuesto de quinolinona bencimidazolilo sustituido con 4-amino, una sal del tautómero, una combinación de los mismos, o una formulación farmacéutica que comprende el compuesto de quinolinona bencimidazolilo sustituido con 4-amino, el tautómero del mismo, la sal del compuesto de quinolinona bencimidazolilo sustituido con 4-amino, la sal del tautómero, o la combinación de los mismos a un sujeto con una línea celular de mieloma múltiple con mutaciones de FGFR3 activadoras, en donde la inhibición de la fosforilación del receptor de FGFR3 y/o de la fosforilación de ERK se inhibe después de la administración del compuesto o de la formulación farmacéutica. En algunas realizaciones, el compuesto de quinolinona bencimidazolilo es sustituido con 4-amino es 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero tal como un roedor o un primate. En algunas tales realizaciones, el sujeto es un ratón, mientras que en otras realizaciones el sujeto es un humano. La invención provee adicionalmente el uso de un compuesto de quinolinona bencimidazolilo sustituido con 4-amino, un tautómero del mismo, una sal del compuesto de quinolinona bencimidazolilo sustituido con 4-amino, una sal del tautómero, o una combinación de los mismos, en la preparación de un medicamento para inhibir la fosforilación del receptor de FGFR3 y/o fosforilación de ERK. En algunas de tales realizaciones, el compuesto de quinolinona bencimidazolilo sustituido con 4-amino es 4-amino substituted quinolinone bencimidazolil compound is 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona.

La 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona produce apoptosis, pero tiene efectos menores sobre el ciclo celular en líneas celulares mutantes de FGFR3 a concentraciones de < 0.5 μ M. Por lo tanto, esta invención provee un método para inducir la apoptosis en líneas celulares mutantes de FGFR3 la cual, en algunas realizaciones, no es acompañada por un efecto grande sobre el ciclo celular. El método incluye administrar una cantidad efectiva de una cantidad efectiva de un compuesto de quinolinona bencimidazolilo sustituido con 4-amino, un tautómero del mismo, una sal del compuesto de quinolinona bencimidazolilo sustituido con 4-amino, una sal del tautómero, una combinación de los mismos, o una formulación farmacéutica que comprende el compuesto de quinolinona bencimidazolilo sustituido con 4-amino, el tautómero del mismo, la sal del

compuesto de quinolinona bencimidazolilo sustituido con 4-amino, la sal del tautómero, o la combinación de los mismos a un sujeto con una línea celular de mieloma múltiple con mutaciones de FGFR3 activadoras, en donde la apoptosis de la líneas celulares mutantes de FGFR3 es inducida después de la administración. En algunas realizaciones, el compuesto de quinolinona bencimidazolilo sustituido con 4-amino es 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero tal como un roedor o un primate. En algunas de tales realizaciones, el sujeto es un ratón, mientras que en otras realizaciones el sujeto es un humano. La invención provee adicionalmente el uso de un compuesto de quinolinona bencimidazolilo sustituido con 4-amino, un tautómero del mismo, una sal del compuesto de quinolinona bencimidazolilo sustituido con 4-amino, una sal del tautómero, o una combinación de los mismos, en la preparación de un medicamento para inducir apoptosis en líneas celulares mutantes de FGFR3, la cual en algunas realizaciones, no es acompañada por un efecto grande sobre el ciclo celular cuando se incubaba durante los tiempos indicados. En algunas de tales realizaciones, el compuesto de quinolinona bencimidazolilo sustituido con 4-amino es 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona.

La inhibición de la proliferación mediada por M-CSF de la línea celular mielóide murina M-NFS-60 correlacionada con la inhibición de la actividad de quinasa *in vitro* de CSF-1R por 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona. Fueron observadas la actividad potente de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona contra líneas celulares de mieloma múltiple t(4:14) especialmente con aquellas con activación de FGFR3. Adicionalmente, este compuesto y sales y tautómeros del mismo pueden utilizarse para proteger pacientes con mieloma múltiple de pérdida y lesiones óseas osteolíticas. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la invención provee un método para inhibir la proliferación mediada de M-CSF de líneas celulares mieloides a inhibir la actividad de CSF-1R. El método comprende administrar una cantidad efectiva de una cantidad efectiva de un compuesto de quinolinona bencimidazolilo sustituido con 4-amino, un tautómero del mismo, una sal del compuesto de quinolinona bencimidazolilo sustituido con 4-amino, una sal del tautómero, una combinación de los mismos, o una formulación farmacéutica que comprende al compuesto de quinolinona bencimidazolilo sustituido con 4-amino, el tautómero del mismo, la sal del compuesto de quinolinona bencimidazolilo sustituido con 4-amino, la sal del tautómero, o la combinación de los mismos a un sujeto con una línea celular mielóide, en donde es inhibida la proliferación mediada por M-CSF de líneas celulares mieloides y/o la actividad de CSF-1R. En algunas realizaciones, el compuesto de quinolinona bencimidazolilo sustituido con 4-amino es 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona. La invención provee adicionalmente el uso de un compuesto de quinolinona bencimidazolilo sustituido con 4-amino, un tautómero del mismo, una sal del compuesto de quinolinona bencimidazolilo sustituido con 4-amino, una sal del tautómero, o una combinación de los mismos, en la preparación de un medicamento para inhibir la proliferación mediada por M-CSF de líneas celulares mieloides y/o la actividad de CSF-1R. En algunas de tales realizaciones, el compuesto de quinolinona bencimidazolilo sustituido con 4-amino es 4-amino substituted quinolinone bencimidazolil compound es 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona. La invención también provee un método para reducir la pérdida ósea o lesiones osteolíticas en sujetos con mieloma múltiple, comprendiendo el método administrar una cantidad efectiva de una cantidad efectiva de un compuesto de quinolinona bencimidazolilo sustituido con 4-amino, un tautómero del mismo, una sal del compuesto de quinolinona bencimidazolilo sustituido con 4-amino, una sal del tautómero, una combinación de los mismos o una formulación farmacéutica que comprende el compuesto de quinolinona bencimidazolilo sustituido con 4-amino, el tautómero del mismo, la sal del compuesto de quinolinona bencimidazolilo sustituido con 4-amino, la sal del tautómero, o la combinación de los mismos a un sujeto con mieloma múltiple, en donde se observa una reducción de la pérdida o lesiones óseas osteolíticas del sujeto después de la administración. En algunas realizaciones, el compuesto de quinolinona bencimidazolilo sustituido con 4-amino es 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero tal como un roedor o un primate. En alguna de tales realizaciones, el sujeto es un ratón, mientras que en otras realizaciones el sujeto es un humano. La invención provee adicionalmente el uso de un compuesto de quinolinona bencimidazolilo sustituido con 4-amino, un tautómero del mismo, una sal del compuesto de quinolinona bencimidazolilo sustituido con 4-amino, una sal del tautómero, o una combinación del mismo, en la preparación de un medicamento para reducir pérdida ósea o lesiones osteolíticas en sujetos con mieloma múltiple. En algunas de tales realizaciones, el compuesto de quinolinona bencimidazolilo sustituido con 4-amino es 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona.

Tratamiento de mieloma múltiple

La translocación t(4:14) que ocurre únicamente en un subconjunto (20%) de pacientes con mieloma múltiple (MM) da como resultado la expresión ectópica de la tirosina quinasa receptora (RTK), el receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3). La inhibición del FGFR3 activado en células MM induce la apoptosis, validando el FGFR3 como un objetivo terapéutico en MM t(4:14) y alentando el desarrollo clínico de inhibidores de FGFR3 para el tratamiento de estos pacientes con prognosis pobre. Los compuestos de quinolinona bencimidazolilo sustituidos con 4-amino tales como 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, actúan como inhibidores de FGFR3. La 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona inhibe de manera potente la FGFR3 con IC₅₀ de 5 nM in ensayos de quinasa *in vitro* e inhibió selectivamente el crecimiento de células B9 y líneas celulares de mieloma humano que expresan FGFR3 tipo silvestre (WT) o mutante activado. En líneas celulares de buena respuesta, la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-

il]quinolin-2(1H)-ona indujo efectos citostáticos y citotóxicos. De manera importante, la adición de interleucina-6 (IL-6), del factor de crecimiento 1 de insulina (IGF-1) o cocultivo sobre estromas no confirió resistencia a la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona. En células de mieloma primario de pacientes con t(4;14), la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona inhibió la fosforilación de ERK1/2 corriente abajo con una respuesta citotóxica asociada. Finalmente, la eficacia terapéutica de los compuestos de quinolinona bencimidazolilo sustituidos con 4-amino tales como la 4-amino substituted quinolinone bencimidazolil compounds such as 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona fue demostrada en un modelo de ratón con xenoinjerto de MM de FGFR3. Los compuestos de quinolinona bencimidazolilo sustituidos con 4-amino tales como la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona son inhibidores potentes de la líneas celulares hematopoyéticas transformadas con FGFR3 y líneas celulares de mieloma múltiple humano que expresan tanto WT como FGFR3 mutante. Además, estos compuestos son inhibidores potentes en un modelo de ratón de MM mediado por FGFR3 y son citotóxicas para células de mieloma primario de pacientes de t(4;14). Tomados en conjunto, estos datos indican que los compuestos de quinolinona bencimidazolilo sustituidos con 4-amino tales como la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona tienen potencial significativo en tratamiento de MM asociados con expresión de FGFR3.

Métodos

Compuestos químicos y reactivos biológicos

La 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona fue disuelta en DMSO como concentración madre de 20 mM. Para experimentos animales, se formuló la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona en regulador de citrato 5 mM. Se compraron el FGF ácido (aFGF) y la heparina de R&D Systems (Minneapolis, MN) y Sigma (Ontario, Canadá), respectivamente. Los anticuerpos FGFR3 (C15, H100 y B9) fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), y 4G10 de Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY).

Ensayos de quinasas *in vitro*

Los valores IC₅₀ para la inhibición de RTK por la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona fueron determinados en un formato de fluorescencia con resolución en tiempo (TRF) o radioactivo, midiendo la inhibición por parte de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona de la transferencia de fosfato a un sustrato por parte de la respectiva enzima. En resumen, el dominio RTK respectivo fue expresado o comprado como proteína recombinante e incubado con diluciones en serie de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona en presencia del sustrato desde concentraciones de ATP a 2-3 veces la K_m de la enzima. Los valores de IC₅₀ fueron calculados utilizando regresión no lineal y representan el promedio de al menos 2 experimentos

Vectores de expresión de FGFR3 y transfectantes de células B9

Se han descrito previamente células B9 que expresan WT FGFR3 (B9-WT), FGFR3-K650E (B9-K650E) y retrovirus vacíos (B9-MINV). Plowright, E. E. et al., Blood, 2000; 95:992-998. ADNc de FGFR3 de longitud completa, que contienen F384L, Y373C, o J807C (obsequio de Marta Chesi, Weill Medical College of Cornell, New York, NY), fueron clonados en un vector retroviral con base en MSCV que contiene un casete de proteína fluorescente verde (GFP). Un constructo que porta la mutación G384D fue creado a partir de FGFR3-WT reemplazando el fragmento PmlI-BglII entre el aminoácido 290 y 413 con el mismo fragmento obtenido a partir del KMS 18 como se describió previamente. Ronchetti, D. et al., Oncogene, 2001; 20:3553-3562. Los vectores retrovirales construidos fueron transferidos en células de empaque ecotrópico GP-E. Los retrovirus resultantes fueron usados para introducir FGFR3 en la línea celular de mieloma murínico dependiente de IL-6, B9. Se ejecutó adicionalmente una dilución de células limitantes para generar clones celulares sencillos. Se sometió a criopreservación un clon de alta expresión para cada constructo (B9-F384L, B9-Y373C, B9-G384D y B9-J807C).

Líneas celulares y cultivo de tejidos

Todas las líneas celulares MM humana y células B9 fueron mantenidas en medio modificado Dulbecco de Iscove (IMDM) suplementado con FCS al 5%, 100 µg/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin (Gibco, Invitrogen Canada, Ontario) y medio acondicionado con IL-6 al 1% (células B9 solamente). Se derivaron células estromales BM (BMSC) a partir de especímenes BM obtenidas de pacientes MM. Las células mononucleares separadas por sedimentación por densidad Ficoll-Hipaque fueron utilizadas para establecer cultivos a largo plazo, tal como se describió previamente. Hideshima, T. et al., Blood, 2000; 96:2943-2950. Para los propósitos de ensayos de viabilidad se irradiaron BMSC con 20 Gy después de sembrar sobre placas de 96 pozos.

Ensayo de viabilidad

La viabilidad celular fue establecida mediante absorbancia con el colorante 3-(4,5-dimetiltiazol)-2,5-difenil tetrazolium (MTT). Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos a una densidad de 5,000 (células B9) o 20,000 (líneas celulares MM) células por pozo en IMDM con FCS al 5%. Las células fueron incubadas con aFGF a 30 ng/ml y heparina a 100 µg/ml o IL-6 al 1% cuando fue indicado y concentraciones crecientes de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona. Para cada concentración de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, se agregaron alícuotas de 10 µl de fármaco de DMSO diluidos en medio de cultivo. Para estudios de combinación de fármacos, se incubaron células con dexametasona 0.5 µM, 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona 100 nM o ambas simultáneamente cuando era indicado. Para evaluar el efecto de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona sobre el crecimiento de las células MM adherentes a BMSC, se cultivaron 10,000 células KMS11 sobre placas de 96 pozos recubiertas con BMSC, en presencia o ausencia de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona. Las placas fueron incubadas durante 48 a 96 horas a 37°C, CO₂ al 5%. El ensayo de MTT fue llevado a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania). Para establecer el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), se incubaron 5000 células M-NFS-60 con diluciones seriadas de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona en medios con M-CSF 10 ng/ml y sin factor estimulante de colonias de granulocitomaquros (GM-CSF). Después de 72 horas, se determinó la viabilidad celular utilizando Cell Titer-Glo™ Assay (Promega, Madison, WI). Los valores EC₅₀ fueron determinados utilizando regresión no lineal. Cada condición experimental fue ejecutada en triplicado.

Tinción de fosfoproteína intracelular

La determinación de la fosforilación de ERK1/2 por citometría de flujo ha sido descrita previamente. Chow, S. et al., Cytometry, 2001; 46:72-78; and Irish, J. M. et al., Cell, 2004; 118:217-228. En resumen, las células fueron sometidas a falta de nutrición con suero durante la noche y luego estimuladas con aFGF 30 mg/ml y heparina 10 µg/ml durante 10 minutos a 37°C. Las células fueron fijadas inmediatamente agregando formaldehído al 10% directamente sobre el medio de cultivo para obtener una concentración final del 2%. Las células fueron incubadas en fijador durante 10 minutos a 37°C y luego sobre hielo durante 2 minutos adicionales. Las células fueron permeabilizadas utilizando metanol frío con hielo (concentración final de 90%) e incubadas sobre hielo durante 30 minutos. Las células fueron teñidas con anti-ERK1/2 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) durante 15 minutos y marcadas con anticonejo de cabra conjugado con FITC y anti-CD138-PE (PharMinogen, San Diego, CA) cuando era indicado. Las células malignas fueron identificadas como células que expresan altos niveles de CD138. Se ejecutó la citometría de flujos sobre un citómetro de flujo FACS Caliber (BD Biosciences, San Jose, CA) y analizados utilizando el software Cellquest (Becton Dickinson).

Análisis de apoptosis

Para los estudios de apoptosis, se sembraron las células a una densidad inicial de 2×10^5 /ml de medio suplementado con DMSO, 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona 100 nM o 500 nM y se cultivaron hasta por 6 días. El medio y el fármaco fueron repuestos cada 3 días y la densidad celular fue ajustada a 2×10^5 /ml. Se determinó la apoptosis por tinción con Annexin V (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) y se analizó por citometría de flujo.

Muestras de pacientes primarios

Se determinó que los pacientes identificados para el estudio poseían una translocación t(4;14) por fluorescencia en hibridación *in situ* (FISH). La expresión de FGFR3 fue confirmada por citometría de flujo como se describió previamente. Chesi, M. et al., Blood, 2001; 97:729-736. En resumen, los eritrocitos fueron sometidos a lisis y se incubaron las células mononucleares BM sobre hielo durante 30 minutos con anti-FGFR3 de conejo (H100) o suero preinmune de conejo. Las células fueron teñidas con IgG anticonejo de cabra conjugada con FITC y anti-CD138-PE de ratón para identificar células MM. Las muestras fueron analizadas entonces por citometría de flujo.

Todas las muestras positivas para t(4;14) fueron analizadas posteriormente en cuanto a la presencia de mutaciones en FGFR3 o Ras. Se diseñaron cuatro pares de cebadores para amplificar las regiones de codones que contienen FGFR3 del dominio extracelular (EC) del dominio transmembrana (TM) del dominio (TK) de tirosina quinasa y el codón de detención (SC) puntos calientes conocidos para mutaciones activadoras. Se diseñaron dos pares de cebadores para amplificar las regiones de los codones 12, 13 y 61 de N-ras y K-ras. Chesi, M. et al., Blood, 2001; 97:729-736. Se llevó a cabo una primera reacción de PCR sobre ADN genómico extraído a partir de células de mieloma CD138 purificadas y se utilizaron amplicones para el análisis por DHPLC. Los resultados fueron confirmados por análisis de secuencia de los productos del PCR.

Para el análisis de muerte celular, se separaron las células mononucleares por sedimentación por gradiente según Ficoll-Hipaque y se sembraron a una densidad de 5×10^5 células/ml en IMDM suplementado con FCS al 20% y aFGF 30 ng/ml y heparina 10 µg/ml. Las células fueron cultivadas en la presencia de DMSO o 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona 500 nM durante hasta 12 días. El medio, un

aFGF/heparina y el fármaco fueron repuestos cada tres días. Después de 3, 7 y 12 días, las células fueron teñidas triplemente con anti-CD38-PE, anti-CD45-CyChrome (PharMinogen) y Annexin V conjugada con FITC como se describió previamente. LeBlanc, R. et al., Cancer Res., 2002; 62:4996-5000. Los controles incluyeron células no teñidas, células teñidas con control de isótopos y células teñidas individuales. Las células de plasma de células malignas fueron definidas como las células que expresan altos niveles de CD38 y ninguno o bajos niveles de CD45 (CD38⁺⁺/CD45⁻). Las células fueron analizadas por análisis de FACScan utilizando el software Cellqueste. Los aspirados de BM fueron obtenidos por consentimiento bajo un protocolo aprobado por la IRB.

Modelo de ratón con xenoinjerto

El modelo de ratón con xenoinjerto fue preparado como se describió previamente. Mohammadi, M. et al., J. Embo. J., 1998; 17:5896-5904. En resumen, ratones hembra BNX de seis a ocho semanas de edad de Frederick Cancer Research and Development Centre (Frederick, MD) fueron inoculados s.c. en el flanco derecho con 3×10^7 células KMS11 en 150 μ l de IMDM, junto con 150 μ l de matriz de membrana de base de matrigel (Becton Dickinson, Bedford, MA). El tratamiento fue iniciado cuando los tumores alcanzaron volúmenes de aproximadamente 200 mm³ tiempo en el cual los ratones fueron escogidos aleatoriamente para recibir 10, 30 o 60 mg/kg de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona o de un regulador de citrato 5 mM. La dosificación fue llevada a cabo diariamente por ingesta y continuó durante 21 días. De ocho a 10 ratones fueron incluidos en cada grupo de tratamiento. Las mediciones de calibre fueron ejecutadas dos veces semanalmente para estimar el volumen del tumor, utilizando la fórmula: $4\pi/3 \times (\text{anchura}/2)^2 \times (\text{longitud}/2)$. Se utilizó análisis de una vía de la varianza para comparar las diferencias entre los grupos tratados con vehículo y con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona.

Inmunoprecipitación e Inmunosiembra

La inmunoprecipitación y la inmunosiembra fueron ejecutadas como se describió previamente. LeBlanc, R. et al., Cancer Res., 2002; 62:4996-5000. En resumen, los tumores de ratones sacrificados fueron homogeneizados inmediatamente sobre hielo y sometidos a lisis en un regulador detergente. Los extractos celulares clarificados (1 mg/muestra) fueron incubados durante 6 horas con el anticuerpo C 15 FGFR3, luego se agregó proteína A/G agarosa (Santa Cruz) durante 2 horas adicionales. La inmunosiembra se ejecutó con anticuerpo antifosfotirosina, 4G10 para establecer el FGFR3 fosforilado, o con anti-FGFR3 (B9) para medir el FGFR3 total.

Histopatología y análisis inmunohistoquímico

Las muestras de tejido fueron fijadas en formalina al 10% y embebidas en parafina, de la cual se cortaron secciones histológicas de 5 μ m y fueron teñidas con hematoxilina y eosina. Los estudios de inmunohistoquímica (IHC) fueron llevados a cabo por tinción indirecta con inmunoperoxidasa de secciones de tejido en parafina utilizando un aparato de inmunotinción automatizado TechMate500™ BioTek (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) y anticuerpos que reconocen FGFR3 (C15), Ki-67 (Zymed, San Francisco, CA), y caspasa 3 escindida (Signaling Cell Technology) como se describió previamente.

Resultado de los estudios de mieloma múltiple

Inhibición de quinasa selectiva de la 4-Amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona

La capacidad de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona para inhibir la fosforilación de sustrato exógeno fue probada contra un amplio rango de quinasas. La concentración de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona que dio como resultado un 50% de reducción en la actividad de las tirosina quinasa receptoras (IC₅₀) se reporta en la Tabla 9. La 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona inhibe miembros de los RTK de clase III incluyendo FLT3, c-Kit, CSF-R1 y PDGFR α/β con valores de IC₅₀ de 0.001-0.21 mM como se estableció mediante ensayos de quinasa *in vitro*. Además, la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona inhibe potentemente RTK de clase IV (FGFR1 y 3) y clase V (VEGFR1-4) con valores de IC₅₀ de 0.008-0.013 mM. Cuando se ejecutaron ensayos similares con quinasa para InsR, EGFR, c-MET, EphA2, TIE2, IGFR1 y HER2, se observó una inhibición significativa solamente a concentraciones superiores a >10 veces. Estos estudios demostraron que la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona es un inhibidor selectivo pero multiobjetivo de RTK de clase III, IV y V con alta potencia contra FGFRs.

La 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona inhibe el crecimiento de células transformadas WT y FGFR3 mutante

También fue probada la capacidad de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona para inhibir mutantes de FGFR3 activados constitutivamente identificados en paciente MM (Y373C, G384D, K650E, J807C). Chesi, M. et al., Blood, 2001; 97:729-736; and Ely, S. A. et al., Cancer, 2000; 89:445-452. La expresión estable de estos ADNc confirió crecimiento independiente de IL-6 a células B9, demostrando que estos

mutantes retienen actividad biológica y proveyendo una plataforma para la prueba de inhibidores de FGFR3 potenciales contra diversas clases de mutaciones de FGFR3. Para determinar el efecto de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona sobre el crecimiento celular mediado por FGFR3, se cultivaron células B9 que expresan FGFR3-WT, FGFR3-F384L (un polimorfismo no transformante) y los mutantes activados de FGFR3 en concentraciones crecientes de inhibidor por exposición durante 48 horas después de lo cual se determinó la viabilidad por ensayo de MTT (Figura 10). Como se esperaba, la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona inhibe potentemente el crecimiento estimulado por FGFR3 de células B9 que expresan WT y F384L-FGFR3 con valores IC_{50} de 25 nM. Además, la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona inhibe la proliferación de células B9 que expresan cada uno de los diversos mutantes activados de FGFR3. De forma interesante, hubo diferencias mínimas observadas en la sensibilidad de las diferentes mutaciones de FGFR3 a la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, variando el IC_{50} de 70-90 nM para cada una de las diversas mutaciones. Las células 11 dependientes de IL-6 que contienen solamente vector (B9-MINV) fueron usadas para detectar toxicidad no específica. Las células B9-MINV fueron resistentes a la actividad inhibidora de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona a concentraciones de hasta 1 μ M. Estos datos confirman adicionalmente los datos de quinasa *in vitro* que demuestran la inhibición de la FGFR3 por la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona e indica que no se observan efectos citotóxicos no específicos dentro del rango efectivo de concentración del fármaco. Estos resultados también indican que la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona tiene actividad potente contra una variedad de mutantes activados de FGFR3 descritos en MM.

La 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona es citotóxica para células de mieloma que expresan FGFR3

Para establecer el potencial de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona como un agente terapéutico en MM, también fue investigado el efecto de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona sobre el crecimiento y supervivencia de líneas celulares de mieloma humano. Líneas celulares positivas para FGFR3 (KMS11, KMS18, OPM2, H929) y las líneas celulares negativas para FGFR3, U266 y 8226 fueron incubadas con concentraciones crecientes de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona y se monitoreo la viabilidad celular (Tabla 10). La 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona inhibió la proliferación celular de células KMS11 (FGFR3-Y373C) y OPM2 (FGFR3-K650E), y KMS 18 (FGFR3-G384D) con valores de IC_{50} de 90 nM (KMS11 y OPM2) y 550 nM respectivamente. Las líneas celulares negativas para FGFR3 y H929 (FGFR3-WT), una línea celular que aloja una mutación que activa corriente abajo la N-Ras (Chesi, M. et al., Blood, 2001; 97:729-736), fueron resistentes, requiriendo más de 5 veces la concentración más alta para inhibir el crecimiento celular. La inhibición del crecimiento celular fue asociada con la desaparición de la fosforilación de ERK1/2 corriente abajo según se determinó por citometría de flujo. Las líneas celulares sensibles a la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (KMS11, KMS18, OPM2) demostraron toda pérdida de fosforilación de ERK1/2 en la presencia de dosis efectivas de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona. En contraste, las células H929, las cuales desplegaron una respuesta citostática mínima a la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, demostraron altos niveles basales de activación de quinasa MAP, como resultado de la activación de Ras constitutivo y no mostraron cambio en la fosforilación de ERK1/2, indicando que la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona actúa corriente arriba de Ras.

Tabla 10. Valores de IC_{50} (en nM) de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona contra líneas celulares de mieloma humano.

Línea celular	T(4;14)	Genotipo de FGFR3	IC_{50} (nM)
KMS11	+	Y373C	90
KMS18	+	G384D	550
OPM2	+	K650E	90
H929	+	WT	>2500
8226	-	N/D	>2500
U266	-	N/D	>2500
Se listan líneas celulares de MM y la presencia (+) o ausencia (-) de la translocación t(4;14) y las mutaciones de FGFR3. WT denota el genotipo tipo silvestre y N/D significa no determinado. Se determinó la concentración de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona que inhibe la viabilidad al 50% (IC_{50}) en comparación con el DMSO de control (prueba MTT o Cell Titer Glo) después de 72 horas de incubación con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona.			

La 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona también indujo la apoptosis en líneas celulares que expresan FGFR3 con respuesta. El tratamiento de células KMS11, OPM2, y KMS18 con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona 500 nM durante 96 horas dio como resultado un incremento significativo en el porcentaje de células que se enlazan a la annexin V en comparación con los controles de DMSO (Figura 11). La inducción retardada de la apoptosis observada en algunas líneas celulares de mieloma es similar a las reportadas previamente con el inhibidor más selectivo de FGFR3, PD173074. Trudel, S. et al., Blood, 2004; 103:3521-3528. El tratamiento de las células negativas para FGFR3 (U266 no mostrada) no tuvo efecto sobre el enlazamiento con la annexin V sugiriendo que las RTK de clases III y V que puede ser inhibidas potencialmente por la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona no son expresadas o no son esenciales para la supervivencia de estas células de mieloma.

El potencial citotóxico de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona fue establecida contra células de mieloma humano primarias. Células mononucleares BM recién aisladas fueron obtenidas a partir de pacientes previamente identificados por FISH como positivos o negativos para t(4;14). Chang, H. et al., Br. J. Haematol., 2004; 125:64-68. La presencia o ausencia de expresión de FGFR3 fue confirmada por citometría de flujo (Figura 12A). De las cinco muestras positivas para t(4;14), todas excepto una demostraron alto nivel de expresión de FGFR3 sobre células de mieloma positivas para CD138 (Tabla 10). Además, estas muestras fueron descartadas por DHPLC para mutaciones de FGFR3 y mutaciones corriente debajo de N y K-Ras. Los resultados fueron confirmados por análisis de secuencia. No se identificaron mutaciones. La estimulación de FGF sobre células primarias en cultivo dio como resultado la superregulación de la fosforilación de ERK1/2 en células de mieloma positivas a CD138 demostrando la actividad biológica de FGFR3 en estas células (Figura 12B). La 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona a 500 nM inhibió por completo la fosforilación de ERK1/2 en todas las muestras. Además, las células mononucleares fueron cultivadas con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona 500 nM o vehículo de DMSO y se determinó la apoptosis por tinción con annexin V. Cuatro de cinco muestras de mieloma t(4;14) demostraron una respuesta citotóxica a la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona cuando se comparan con el control de vehículo mientras ninguna de las otras muestras de mieloma fue afectada (Figuras 12C y 12D y Tabla 11). De manera interesante, la muestra positiva para t(4;14) que demostró una expresión de FGFR3 a bajo nivel fue resistente a la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona implicando que solamente un alto nivel de expresión de WT FGFR3 puede conferir dependencia. El soporte para esta hipótesis es provisto por estudios de c-KIT (Rubin, B. P. et al., Cancer Res., 2001; 61:8118-8121) en tumores gastrointestinales y FLT3 (Armstrong, S. A. et al., Cancer Cell, 2003; 3:173-183) en AML en donde un alto nivel de expresión de AML del receptor WT, así como la mutación del receptor, lleva a la actividad constitutiva y sensibilidad del inhibidor. Adicionalmente, la sensibilidad a la herceptina en cáncer de seno se correlaciona con el nivel de expresión de HER2/neu. Vogel, C. L. et al., J. Clin. Oncol., 2002; 20:719-726. Alternativamente, las células MM de este paciente pueden tener activación de rutas adicionales, la dependencia evasiva sobre la señalización de FGFR3.

Tabla 11. Resumen de la expresión de FGFR3 sobre las células MM primarias en relación con la sensibilidad a la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (Compuesto).

Paciente	FGFR3 (citometría de flujo)	Genotipo de FGFR3	Genotipo de N & K-Ras	% Annexin DMSO	% Annexin V de Compuesto (500 nM)	% de incremento Annexin V
1	N/D	WT	WT	9.0	21.8	20.9
2	+	WT	WT	10.4	8.6	-1.8
3	++	WT	WT	9.8	42.1	32.3
4	++	WT	WT	6.8	25.7	18.9
5	+++	WT	WT	10.1	24.5	14.4
6	-	N/D	N/D	8.8	10.2	1.4
7	-	N/D	N/D	15.3	16.0	0.7
8	-	N/D	N/D	20.9	20.7	-0.2
9	-	N/D	N/D	12.8	13.4	0.6
10	-	N/D	N/D	15.0	17.1	2.1
Expresión de FGFR3 sobre células de MM primarias de CD138 analizado por citometría de flujo y la fluorescencia fue expresada como sigue: +, débil; ++ intermedia; +++ fuerte; - ausente. Las células seleccionadas CD138 fueron descartadas en cuanto a las mutaciones FGFR3 y N y K-Ras. WT denota estatus tipo silvestre y N/D indica no determinado.						

Efecto de IL-6, IGF-1 y estroma sobre la respuesta de células MM a la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona

Dado el papel conocido de la IL-6 (Klein, B. et al., Blood, 1995; 85:863-872; and Anderson, K. C. et al., Semin. Hematol., 1999; 36:14-20) y más recientemente de IGF-1 (Ogawa, M. et al., Cancer Res., 2000; 60:4262-4269; and Mitsiades, C. S. et al., Cancer Cell, 2004; 5:221-230) en la proliferación, supervivencia y resistencia a fármacos de células tumorales en MM, se llevaron a cabo experimentos para determinar si la IL-6 y la IGF-1 exógenas podrían superar los efectos inhibidores del crecimiento producidos por la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona. La inhibición con la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona fue observada todavía cuando se cultivaron células KMS11 en presencia de IL-6 50 ng/ml o IGF-1 50 ng/ml y fue comparable a la de las células cultivadas en la presencia de aFGF (Figura 13A). Estos estudios resaltan el papel crítico de la función de FGFR3 en la jerarquía de los receptores del factor de crecimiento de estas células.

Puesto que el microambiente de BM ha demostrado conferir resistencia a fármacos en células MM (Dalton, W. S. et al., Semin Hematol., 2004; 41:1-5; and Hideshima, T. et al., Semin. Oncol., 2001; 28:607-612), el efecto de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona en el crecimiento de células MM fue investigado en el medio BM. La toxicidad directa de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona sobre BMSC fue determinado utilizando la prueba MTT, y no se observó diferencias significativas en la viabilidad celular de células tratadas con la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona con los controles de DMSO (Figura 13B). Las células KMS 11 fueron cultivadas entonces con o sin BMSC en la presencia o ausencia de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona. La BMSC confirió en efecto un grado modesto de resistencia con una inhibición del crecimiento del 44.6% para células tratadas con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona 500 nM y cultivadas sobre estroma en comparación con la inhibición del crecimiento en un 71.6% para células cultivadas sin BMSC. Sin embargo, el crecimiento celular fue inhibido significativamente por la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona a pesar de la presencia de estromas.

La 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona aumenta la citotoxicidad a la dexametasona en mieloma múltiple

La expresión de FGFR3 da como resultado una fosforilación incrementada de STAT3 y niveles más altos de la expresión de Bcl-XL que los observados en células B9 progenitoras después del retiro de la IL-6. Plowright, E. E. et al., Blood, 2000; 95:992-998; and Pollett, J. B. et al., Blood, 2002; 100:3819-3821. Estos hallazgos fueron asociados con la inhibición de la apoptosis inducida por dexametasona, un fenómeno que fue reversado por el oligonucleótido antisentido Bcl-XL. El tratamiento de células de MM que expresan FGFR3 pueden, de esta manera superar la resistencia a la dexametasona. Como se muestra en la Tabla 12, las células KMS11 son relativamente resistentes a la dexametasona; sin embargo, cuando se combinan con la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, se observaron efectos inhibidores sinérgicos. Estos datos indican la utilidad de combinar la dexametasona con la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona como estrategia terapéutica.

Tabla 12. Efecto de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (Compuesto) y/o dexametasona sobre la viabilidad de KSM11.

Tratamiento (concentración)	Viabilidad (% de control) ± SD
DMSO	100%
Dexametasona (0.5 µM)	87% ± 4.74
Compuesto (100 nM)	49% ± 4.64
Dexametasona (0.5 µM) y Compuesto (100 nM)	10% ± 6.48

La 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona inhibe el crecimiento celular mediado por M-CSF

La pérdida de hueso osteolítica es una de las principales complicaciones en MM. Los factores activadores de osteoclastos principales involucrados en la resorción ósea son IL-1 β , IL-6, RANK-L y M-CSF. Croucher, P. I. et al., Br. J. Haematol., 1998; 103:902-910. Las células MM, osteoblastos y células estromales en el BM expresan M-CSF el cual junto con RANK-L es esencial para la formación de osteoclastos. Quinn, J. M. et al., Endocrinology, 1998;

139:4424-4427. Concentraciones incrementadas en suero de MCSF han sido detectadas en pacientes MM. Janowska-Wieczorek, A. et al., *Blood*, 1991; 77:1796-1803. Los ensayos de quinasa *in vitro* demuestran la potente actividad de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona contra CSF-1R, el único receptor conocido para M-CSF con un IC₅₀ de 36 nM (Tabla 9). La 4-Amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona inhibe la proliferación de M-NFS-60, una línea celular mieloblástica de ratón conducida por crecimiento de M-CSF con un EC₅₀ de 220 nM (Figura 14). Parecería, sin embargo, que además de inhibir el crecimiento de las células MM, la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona tiene la ventaja de inhibir potencialmente la osteólisis asociada con el tumor.

Evaluación de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona *in vivo* en un modelo de ratón de xenoinjerto

La eficacia de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona fue probada en un modelo murino en el cual se inyectaron células KMS 11 subcutáneamente en ratones BNX. Grad, J. M. et al., *Blood*, 2001; 805-813; y Lentzsch, S. et al., *Leukemia*, 2003; 17:41-44. Un modelo de ratón con xenoinjerto de plasmacitoma similar ha sido utilizado en estudios preclínicos de Bortezomib e IMiDs en MM. Cada uno de los 36 ratones BNX fue inyectado en el flanco con 3×10^7 células KMS11 junto con matrigel por inyección s.c. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 200 mm³, los ratones fueron separados aleatoriamente (n=8-10) para recibir vehículo o 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona a 10 mg/kg, 30 mg/kg y 60 mg/kg, administrados por ingesta oral una vez al día durante 21 días. Cuando se comparó con los controles de vehículo, se observó un efecto antitumoral significativo ($p < 0.001$) en todos los tres grupos de dosis de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona con una dosis efectiva mínima de 10 mg/kg/d (Figura 15). Específicamente, se calculó una inhibición de crecimiento de 48%, 78.5% y 94% en los brazos de tratamiento de 10 mg/kg, 30 mg/kg y 60 mg/kg, respectivamente, en comparación con los ratones tratados con placebo. En el último día de la dosificación, 7 de 10 ratones en el grupo de tratamiento más alto habían alcanzado y mantenido una remisión parcial con > 50% de reducción en volúmenes de tumor en comparación con el día 1 de la administración del fármaco. La pérdida de peso, un marcador de toxicidad significativo, no se observó en ninguno de los grupos de tratamiento.

Para demostrar que las respuestas observadas se correlacionaban con la inhibición de FGFR3, los ratones fueron sacrificados 4 horas después de recibir la última dosis de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona y se recolectaron los tumores para análisis de inhibición *in vivo* de fosforilación de FGFR3. La FGFR3 fue inmunoprecipitada a partir de lisados de células tumorales y el nivel de expresión y fosforilación fue determinado sobre inmunosiembras. Se observó inhibición *in vivo* de FGFR3, con inhibición completa de FGFR3 a una dosis de 60 mg/kg. La inhibición de la fosforilación de FGFR3 fue dependiente de la dosis y correlacionada con la respuesta antitumoral.

El examen histopatológico de los tumores a partir de animales representativos soportó adicionalmente la interpretación de la reducción tumoral en los ratones tratados con fármaco en comparación con los controles con placebo. Los tumores de los ratones tratados con fármaco mostraron grandes áreas de necrosis tumoral. La inmunohistoquímica para la expresión del antígeno proliferativo, Ki-67 y para la caspasa 3 escindida, demostraron que la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona inhibe el crecimiento celular e induce la apoptosis. Estos hallazgos sugieren que la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona induce las respuestas citostáticas y citotóxicas *in vivo* que dan como resultado la regresión de los tumores que expresan FGFR3.

Discusión

La identificación de las anomalías citogenéticas recurrentes en MM y la caracterización de los asociados de translocación han identificado novedosas dianas moleculares y presenta el potencial para una terapia direccionada molecular para esta enfermedad universalmente fatal. Kuehl, W. M. et al., *Nat Rev Cancer*, 2002; 2:175-187; and Chesi, M. et al., *Nat. Genet.*, 1997; 16:260-265. Casi el 20% de los casos recientemente diagnosticados de MM alojan la translocación t(4;14) detectada por la presencia del transcripto híbrido IgH-MMSET (Santra, M. et al., *Blood*, 2003; 101:2374-2376), cuya presencia ha sido reportada en general asociada con una prognosis pobre. Fonseca, R. et al., *Blood*, 2003; 101:4569-4575; Keats, J. J. et al., *Blood*, 2003; 101:1520-1529; Moreau, P. et al., *Blood*, 2002; 100:1579-1583; and Chang, H. et al., *Br. J. Haematol.*, 2004; 125:64-68. FGFR3 is expressed in approximately 70% (Keats, J. J. et al., *Blood*, 2003; 101:1520-1529; and Quinn, J. M. et al., *Endocrinology*, 1998; 139:4424-4427) de estos casos y 10% (Intini, D. et al., *Br. J. Haematol.*, 2001; 114:362-364) de pacientes que adquirirán una mutación activadora de FGFR3 con la progresión de la enfermedad.

Un entendimiento de los defectos genéticos que están casualmente implicados en la oncogénesis ha llevado a una terapia direccionada para el tratamiento de un cierto número de cánceres. Druker, B. J. et al., *N. Engl. J. Med.*, 2001; 344:1031-1037; Demetri, G. D. et al., *N. Engl. J. Med.*, 2002; 347:472-480; Slamon, D. J. et al., *N. Engl. J. Med.*, 2001; 344:783-792; and Smith, B. D. et al., *Blood*, 2004; 103:3669-3676. De la manera más notable, la inhibición de la actividad de BCR-ABL quinasa por STI571 ha producido remisiones citogenéticas mayores en leucemia

mielogenosa crónica (CML). Druker, B. J. et al., N. Engl. J. Med., 2001; 344:1031-1037. La inhibición de la c-Kit activada en tumores estromales gastrointestinales por STI571 también ha sido efectiva contra este tipo de tumor quimiorresistente. Demetri, G. D. et al., N. Engl. J. Med., 2002; 347:472-480. Además, la herceptina, un anticuerpo monoclonal que apunta a HER2/neu, ha dado como resultado respuestas mejoradas a la quimioterapia y una supervivencia prolongada para pacientes de cáncer de seno. Slamon, D. J. et al., N. Engl. J. Med. 2001; 344:783-792. Una estrategia inhibidora de quinasa similar que apunta a FLT3 en leucemia mieloide aguda (AML) también está mostrando resultados promisorios en ensayos clínicos en Fase II. Smith, B. D. et al., Blood, 2004; 103:3669-3676. Estudios preclínicos de la inhibición de FGFR3 en mieloma t(4;14) ha identificado de la misma manera este RTK como un candidato plausible para terapia direccionada. Dos antagonistas de FGFR3, PD173074 y SU5402 inhibieron el crecimiento e indujeron la apoptosis de células MM que expresan FGFR3 mutante. Trudel, S. et al., Blood, 2004; 103:3521-3528; Paterson, J. L. et al., Br. J. Haematol., 2004; 124:595-603; and Grand, E. K. et al., Leukemia, 2004; 18:962-966. Juntos estos estudios soportan el desarrollo clínico de inhibidores de FGFR3 para estos pacientes. Desafortunadamente, el PD173074 no es un compuesto candidato para uso clínico y la IC₅₀ de SU5402, requerida para inhibir la FGFR3 no se logrará probablemente *in vivo*.

La 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona es un inhibidor potente de la FGFR3 y de RTK clase III, IV y V, incluyendo, FLT3, c-Kit, c-Fms, PDGFR y VEGFR. En este estudio, la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona demostró ser un inhibidor altamente activo de tirosina quinasas WT y FGFR3 17 mutante. La actividad de este inhibidor contra un amplio espectro de RTKs implica que la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona requiere menos requerimientos de conformación restrictiva para enlazarse al dominio de quinasa y es consistente con la actividad retenida de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona contra muchos mutantes de FGFR3. El tratamiento con 4-Amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona indujo selectivamente la muerte celular apoptótica de líneas celulares MM y muestras de pacientes primarios que alojaban FGFR3. La aplicación clínica potencial de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona para el tratamiento de MM fue validada adicionalmente utilizando un modelo de ratón de xenoinjerto en el cual el tratamiento con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona inhibió la actividad de FGFR3 *in vivo* y produjo regresión tumoral y disminuyó significativamente la progresión de la enfermedad.

Aunque los datos sugieren que FGFR3 es el objetivo primario de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona en células MM, es importante anotar que las células OPM2 respondieron a este inhibidor de RTK ampliamente activo cuando no respondieron al inhibidor más selectivo para FGFR3 PD173074. Trudel, S. et al., Blood, 2004; 103:3521-3528; and Paterson, J. L. et al., Br. J. Haematol., 2004; 124:595-603. Esta línea celular está caracterizada por altos niveles basales de fosforilación por AKT (datos no mostrados) y eliminación bialélica en PTEN. Consistentes con nuestros resultados, Grand et al., demostraron que el inhibidor multiobjetivo de RTK, SU5402 indujo respuesta citotóxica en células OPM2 mientras que el PD173074 fallo en inducir la apoptosis. Grand, E. K. et al., Leukemia, 2004; 18:962-966. Estos hallazgos también elevan la posibilidad de que la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona esté apuntando a otros objetivos, aún por definir, importantes para la viabilidad de células de mieloma, un hecho que es de relevancia adicional dada la demostración de que la FGFR3 a veces se pierde durante la progresión de la enfermedad y por lo tanto, puede ser suplantada por otros mediadores de señalización corriente abajo.

Con este último punto en mente, es importante anotar que la relevancia clínica de la FGFR3 en mieloma t(4;14) ha sido cuestionada por observaciones en el sentido de que el cromosoma der(14) se pierde en algunos pacientes de mieloma sugiriendo que la FGFR3 es dispensable y que la MMSET es el objetivo causal verdadero de t(4;14) en MM. Keats, J. J. et al., Blood, 2003; 101:1520-1529; and Intini, D. et al., Br. J. Haematol., 2001; 114:362-364. Además, estudios en sistemas modelo indican que la WT FGFR3 no es transformante predominantemente, requiriendo eventos oncogénicos cooperantes adicionales para complementar la transformación. Chesi, M. et al., Blood, 2001; 97:729-736; and Li, Z. et al., Blood, 2001; 97:2413-2419. Los datos presentados anteriormente, sin embargo, indican que las células MM primarias que expresan de manera definitiva la FGFR3 permanecen dependientes de esta ruta para supervivencia a pesar de la presencia de eventos genéticos adicionales. Es probable, por lo tanto, que la FGFR3 actúe en concierto con TACC3 y MMSET proveyendo señales de supervivencia a través de la estimulación por ligandos FGF expresados en el microambiente BM. A lo largo de estas líneas, las mutaciones FLT3 y la expresión a alto nivel de FLT3 han sido descritas en leucemia linfoblástica aguda en donde el MLL, un gen similar a MMSET también es expresado. Armstrong, S. A. et al., Cancer Cell, 2003; 3:173-183. Estas observaciones sugieren un posible mecanismo de complementación entre las tirosina quinasa y los genes de tritórax.

Estudios de la inhibición de FGFR3 en líneas celulares MM indican que solamente la líneas celulares que expresan el receptor constitutivamente activo responden a la inhibición de FGFR3. Trudel, S. et al., Blood, 2004; 103:3521-3528; and Paterson, J. L. et al., Br. J. Haematol., 2004; 124:595-603. Esto resalta la limitación de la utilización de líneas celulares MM que crezcan independientemente del microambiente BM y, así, no están más supeditadas al FGF producido por los estromas para crecimiento y supervivencia. Estudios que utilizan material de pacientes primarios son por lo tanto críticos. El efecto citotóxico demostrado por las células MM primarias expuestas a la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona indican que este fármaco será una

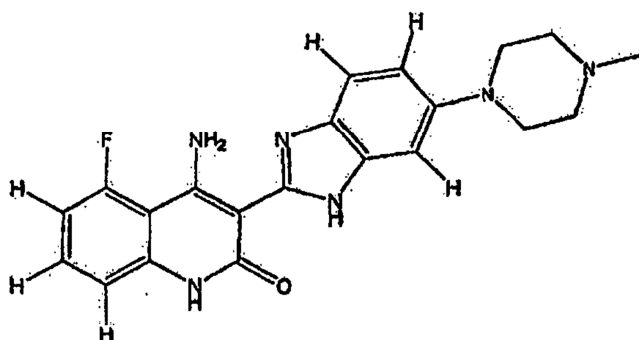
terapia efectiva en pacientes que expresan bien sea WT o FGFR3 mutante. No obstante, la única respuesta citotóxica modesta y retardada a la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona observada en células MM primarias puede implicar que la inhibición de WT FGFR3 no introduce por sí misma una señal proapoptótica, sino más probablemente da como resultado el retiro de señales antiapoptóticas fuertes. Se pediría, por lo tanto, que el uso más efectivo de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona puede ser en combinación con agentes quimioterapéuticos tales como dexametasona según se demostró en células KMS 11.

La importancia del microambiente BM para soportar el crecimiento tumoral se está haciendo crecientemente claro. Mitsiades, C. S. et al., Cancer Cell, 2004; 5:221-230; and Dalton, W. S. et al., Semin Hematol., 2004; 41:1-5. En particular, las citoquinas tales como IL-6 e IGF-1 y la interacción directa con BMSC han demostrado conferir resistencia a fármacos. Los experimentos *in vitro* demuestran que estos factores paracrinós fallan en superar los efectos antitumorales de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona. Dado este perfil objetivo, la 4-amino-3-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona también puede impactar las células asociadas a tumores derivados del huésped dentro del BM que tengan implicaciones en el soporte del crecimiento tumoral. La 4-Amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona exhibe potente actividad antiangiogénica en varios ensayos de angiogénesis incluyendo la migración celular endotelial y la formación de tubos sobre geles de fibrina así como en los ensayos de anillo aórtico de ratas *ex vivo*. Wiesmann, M. et al., Proc AACR, 2003; 44:934a. De acuerdo con lo anterior, los tumores de ratones tratados con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona fueron menos vasculares cuando se compararon con controles (datos no mostrados). Se ha demostrado que la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona inhibe también la actividad de CSF-1R, el receptor para M-CSF, un factor de activación de osteoclastos que puede contribuir a la patogénesis de enfermedad ósea MM. Tomados juntos, los datos sugieren que la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona puede apuntar potencialmente tanto a las células MM dentro del medio BM como al microambiente de BM directamente.

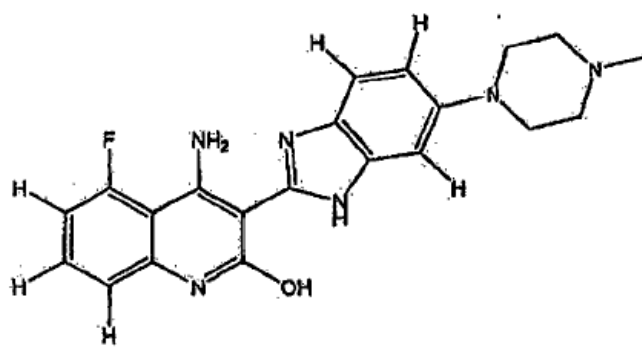
En resumen, la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona representa un novedoso y potente inhibidor de moléculas pequeñas de FGFR3 para el tratamiento de mieloma t(4;14). Los efectos citotóxicos de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona sobre líneas celulares MM y muestras de pacientes primarias, y un perfil de objetivo que sugiere el potencial para modular favorablemente el medio BM, lleva a la predicción de que esta será una terapia efectiva en grupos de prognosis pobre, particularmente en terapias de combinación. El éxito final de esta estrategia terapéutica espera ahora el surgimiento de pruebas clínicas que estarán pronto en progreso para evaluar la eficacia de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona para el tratamiento de MM t(4;14).

La preparación de numerosos compuestos de quinolinona bencimidazolilo sustituidos con 4-amino, formulaciones farmacéuticas de los mismos, y descripciones de sales y tautómeros de los mismos están definidas en las siguientes Patentes de los Estados Unidos, Solicitudes de Patente de los Estados Unidos y Solicitudes Provisionales de los Estados Unidos: Patente de los Estados Unidos No. 6,605,617; Solicitud de Patente de los Estados Unidos 10/644,055; Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 10/706,328; Solicitud provisional de los Estados Unidos No. 60/526,426; Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 60/517,915, y Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 60/546,017.

Debe entenderse que el compuesto orgánico del ejemplo 60 de acuerdo con la invención puede exhibir el fenómeno de tautomerismo. Puesto que las estructuras químicas dentro de esta especificación puedan representar solamente una de las posibles formas tautoméricas a la vez, debe entenderse que la invención abarca una sal de lactato de cualquier forma tautomérica de la estructura dibujada. Por ejemplo, el compuesto de la fórmula IIIB se muestra a continuación con un tautómero, tautómero IIIBa:

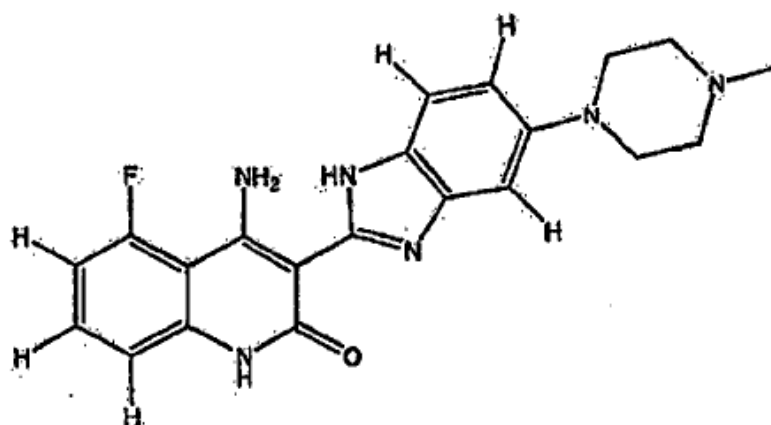


IIIB

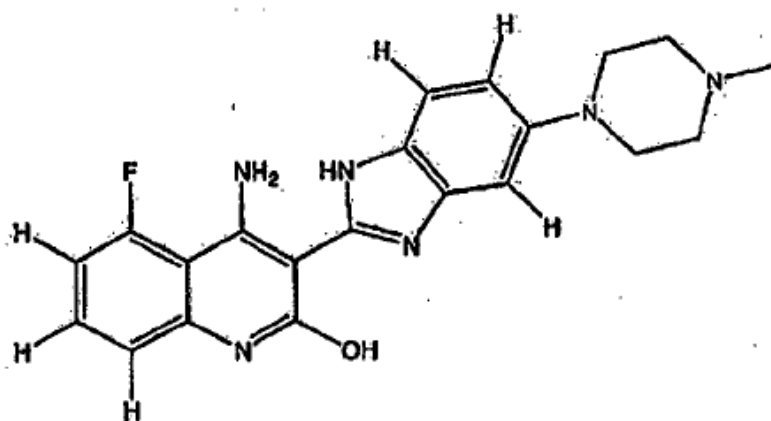


Tautómero IIIBa

Otro tautómeros del compuesto de la Fórmula IIIB, tautómero IIIBb y tautómero IIIBc se muestran a continuación:



Tautómero IIIBb

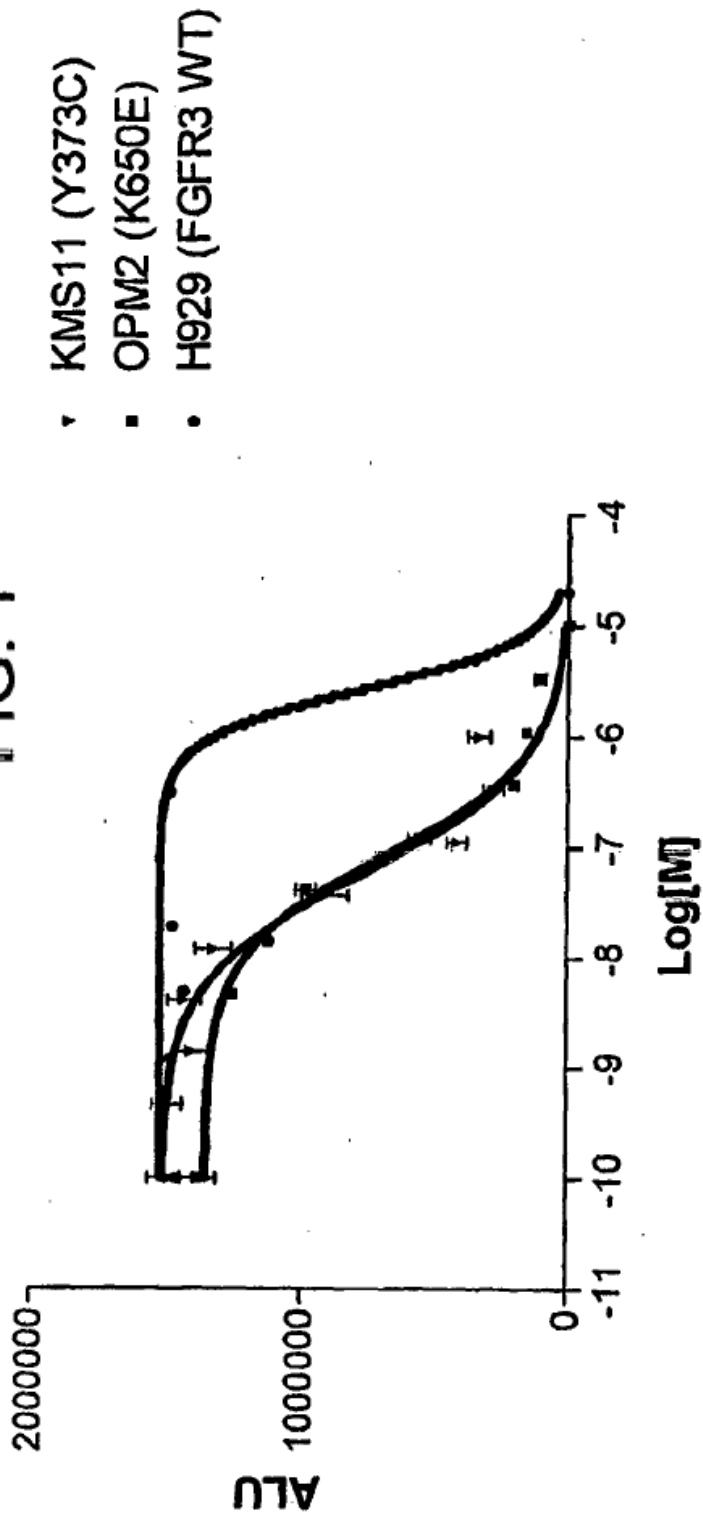


Tautómero IIIBc

REIVINDICACIONES

1. Una sal de lactato de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona o un tautómero del mismo.
- 5 2. La sal de lactato de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la sal comprende la sal de monolactato o bis-lactato.
3. La sal de lactato de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la sal comprende la sal de monolactato.
4. La sal de lactato de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la solubilidad de la sal en agua a 22°C es superior a 30 mg/mL.
- 10 5. La sal de lactato de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la solubilidad de la sal en agua a 22°C va de 150 mg/mL hasta 250 mg/mL.
6. La sal de lactato de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la sal comprende la sal de DL-lactato.
7. La sal de lactato de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la sal comprende la sal de D-lactato.
8. La sal de lactato de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la sal comprende la sal de L-lactato.
- 15 9. La sal de lactato de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la sal comprende la sal de D-lactato, la sal de L-lactato o una mezcla de las mismas.
10. La sal de lactato de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la sal es cristalina y comprende cristales en forma de placa.
11. Una composición que comprende una tableta de la sal de lactato de acuerdo con la reivindicación 1.
12. Un método para preparar la sal de lactato de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:- 20 (a) suspender 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, o un tautómero del mismo, en un solvente o mezcla de solventes;
- (b) poner en contacto ácido láctico con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, o un tautómero del mismo, para proveer una mezcla;
- (c) calentar la mezcla;
- 25 (d) enfriar la mezcla; y
- (e) aislar la sal.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el solvente es un solvente prótico.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el solvente es seleccionado del grupo consistente de metanol, etanol, agua, tetrahidrofurano y mezclas de los mismos.
- 30 15. Una formulación farmacéutica, que comprende la sal de lactato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
16. Uso de la sal de lactato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o la formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15, en la preparación de un medicamento para:- (i) inhibir la proliferación de capilares; o
- 35 (ii) tratar el cáncer.
17. La sal de lactato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o la formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15, para uso en un método para la inhibición de la proliferación de capilares.
18. La sal de lactato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o la formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15, para uso en un método para el tratamiento de cáncer.

FIG. 1



	KMS11	OPM2	H929
FONDO (Constante)	0.0	0.0	0.0
PARTE SUPERIOR	1.5180e+006	1.3600e+006	1.5220e+006
LOGEC50	-7.225	-7.063	-5.583
HILLSLOPE	-0.8926	-0.9733	-1.890
EC50	5.9570e-008	8.6500e-008	2.6150e-006

FIG. 2

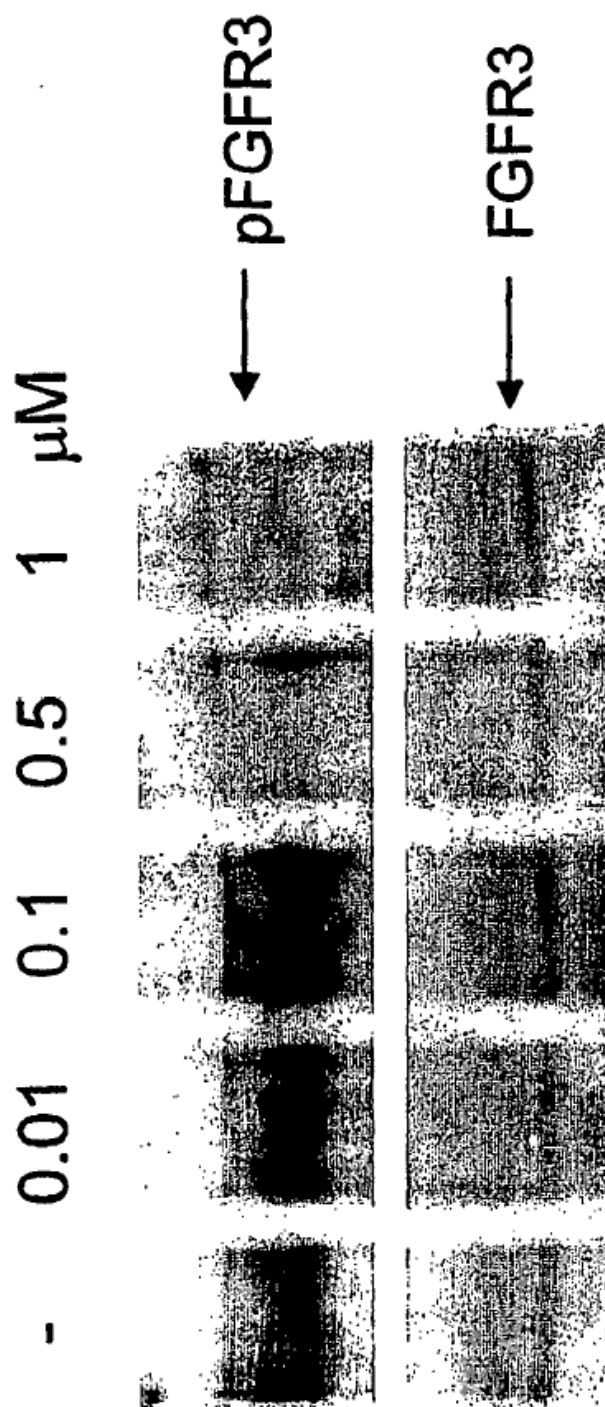


FIG. 3A

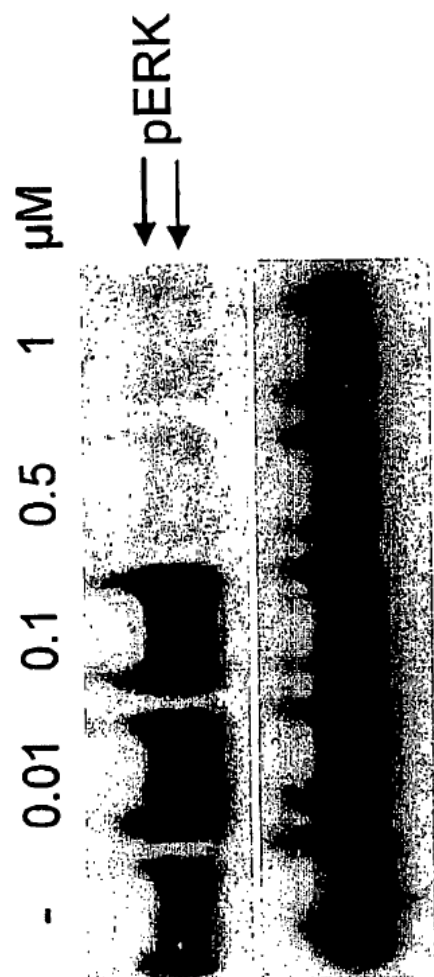


FIG. 3B

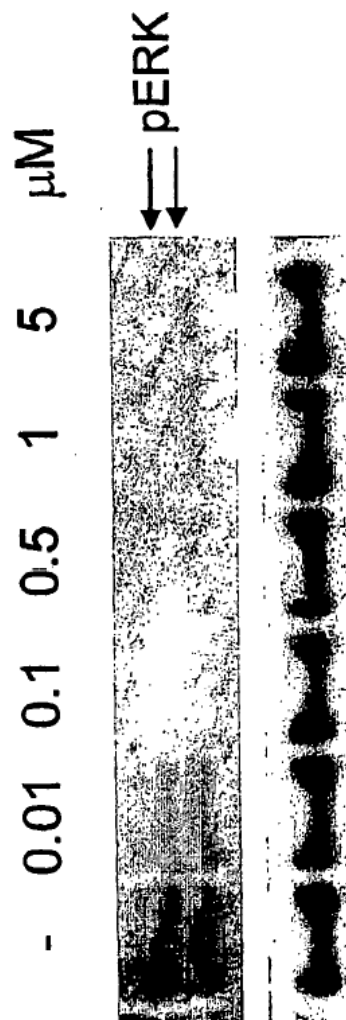


FIG. 3C

aFGF-Heparina

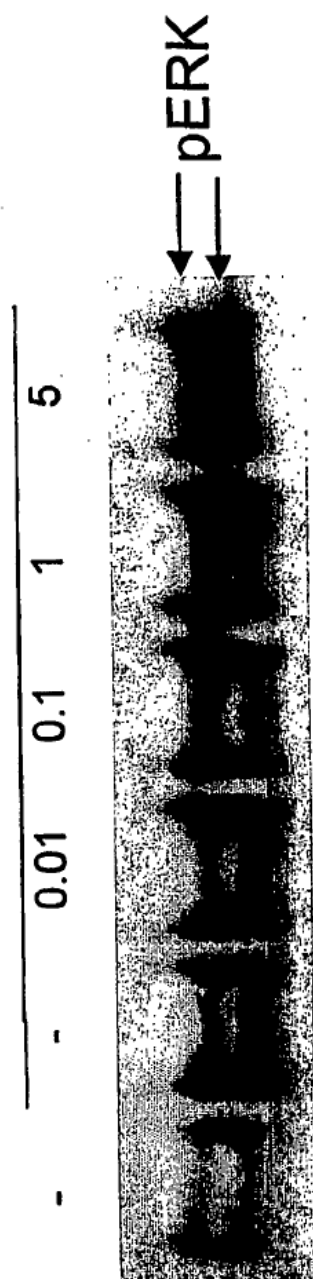


FIG. 4

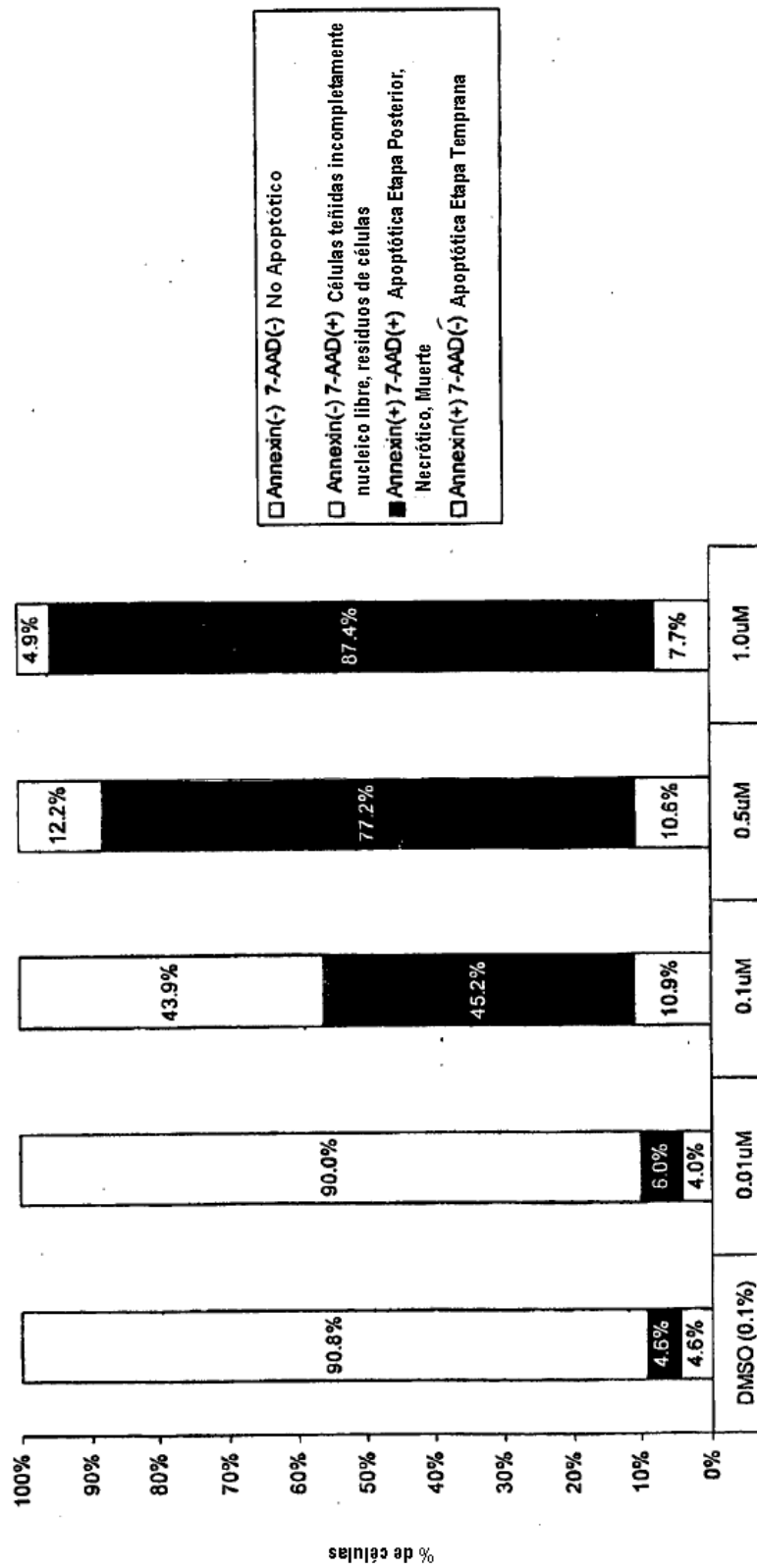


FIG. 5

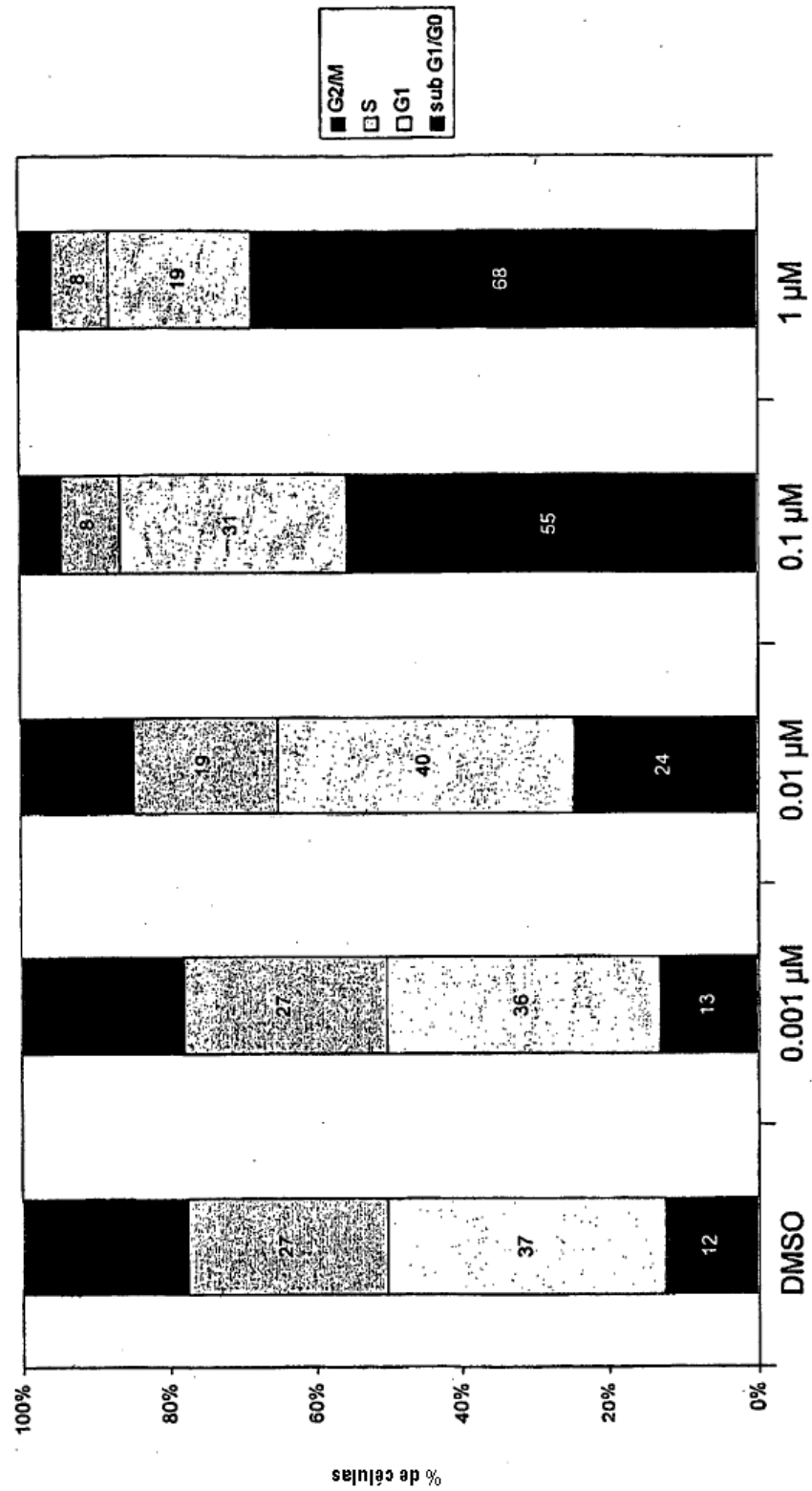


FIG. 6

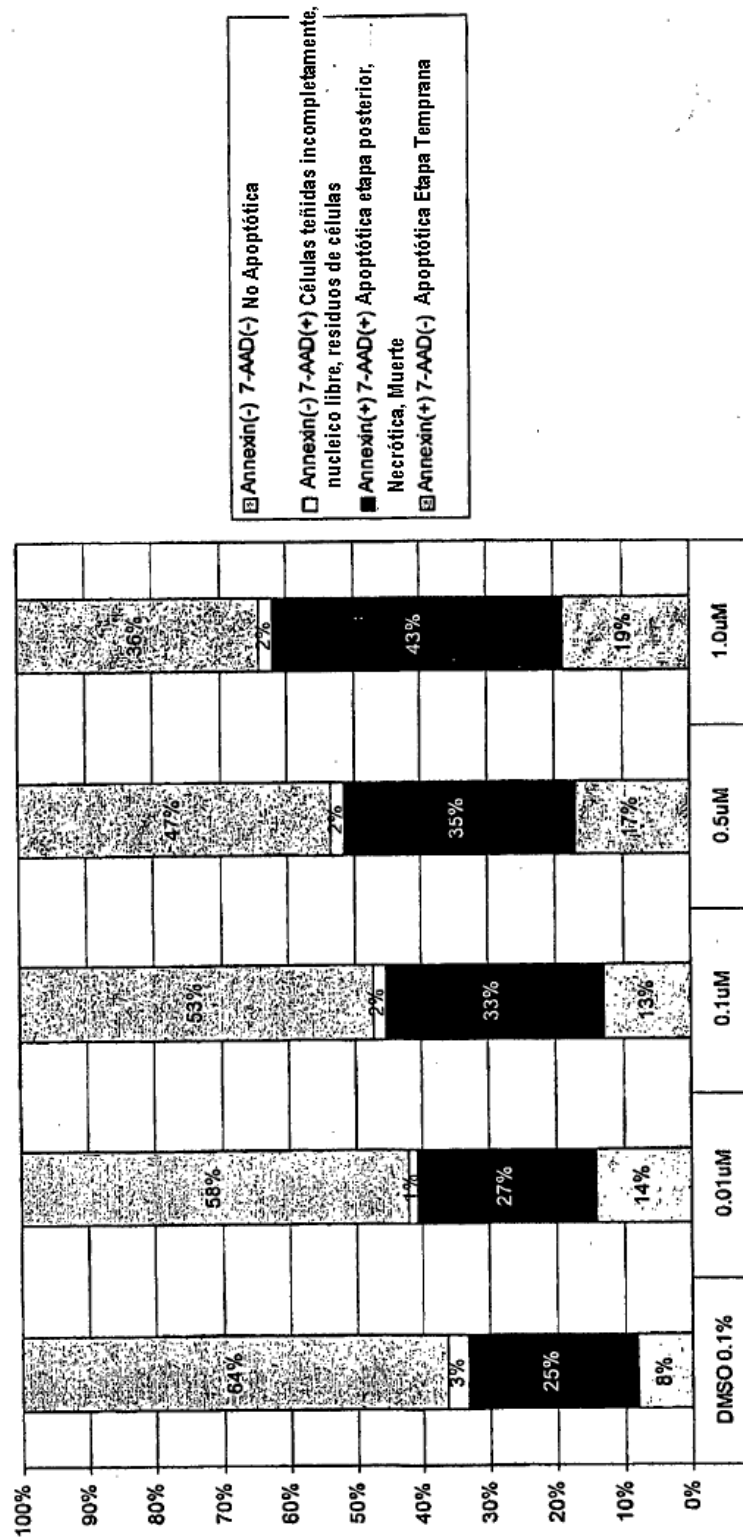


FIG. 7

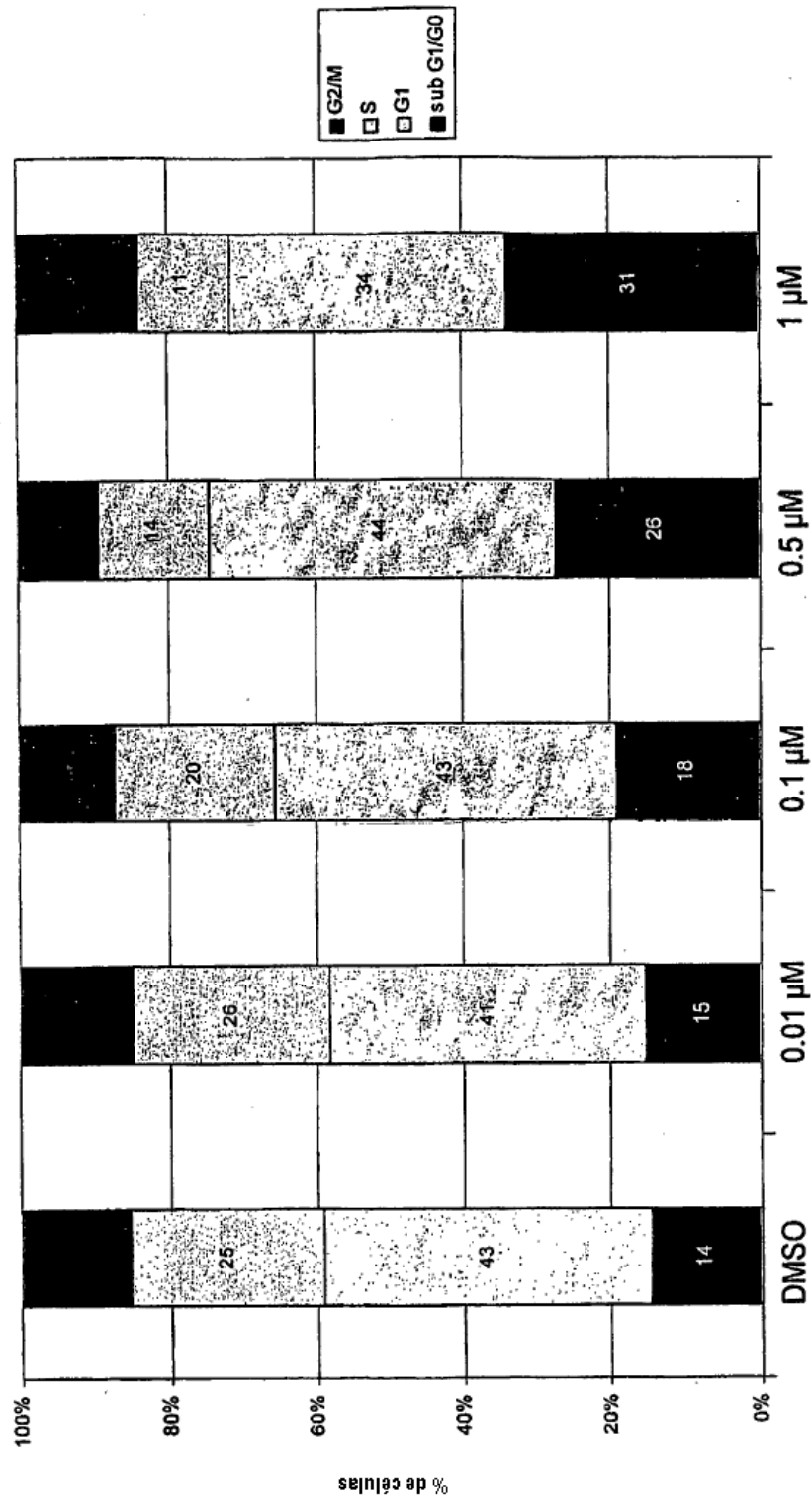


FIG. 8

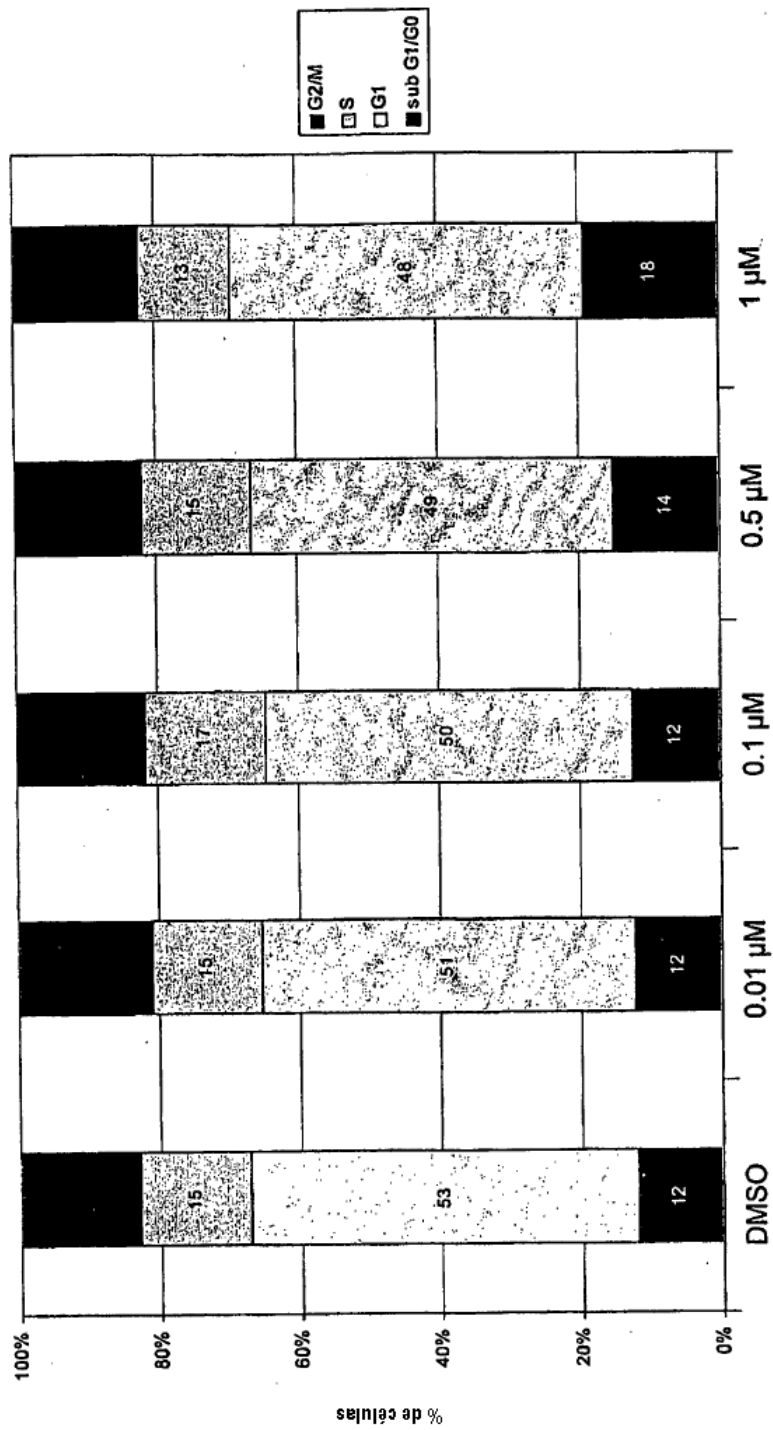


FIG. 9

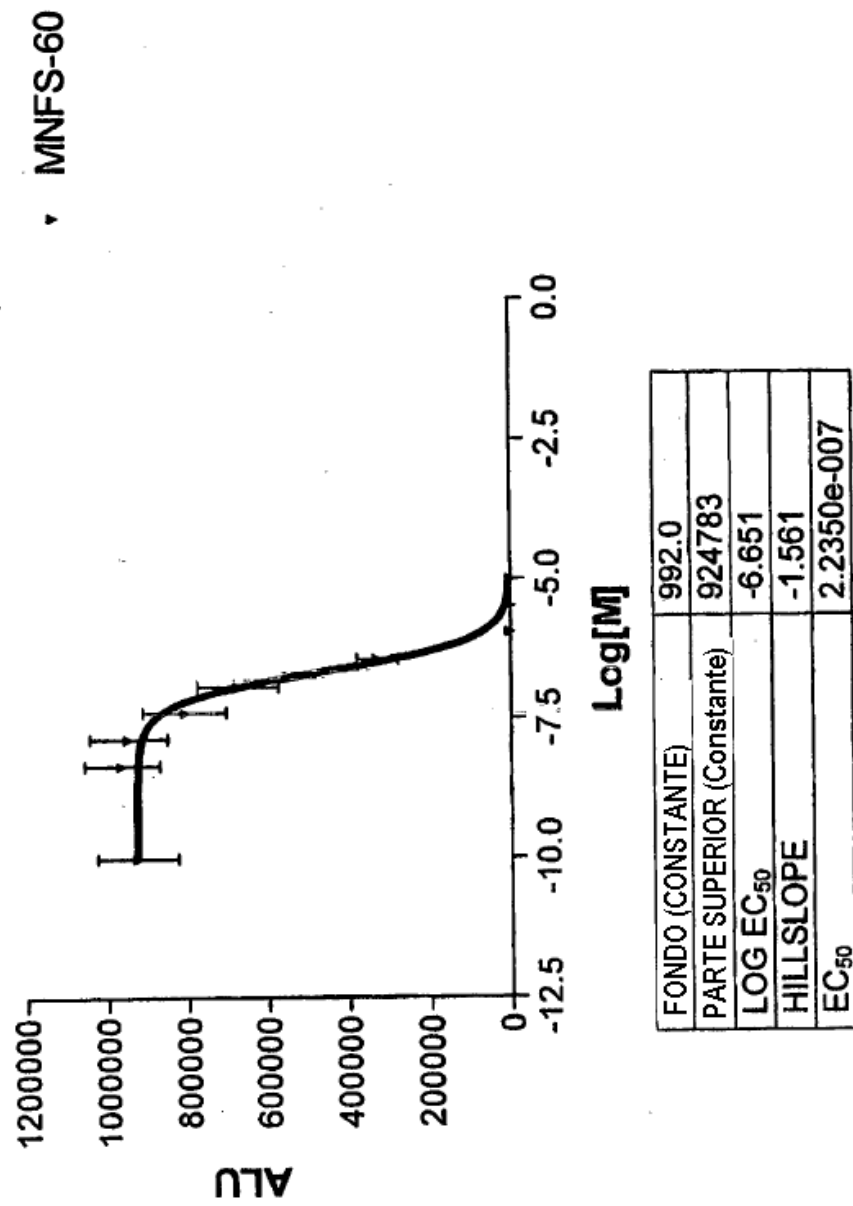


FIG. 10

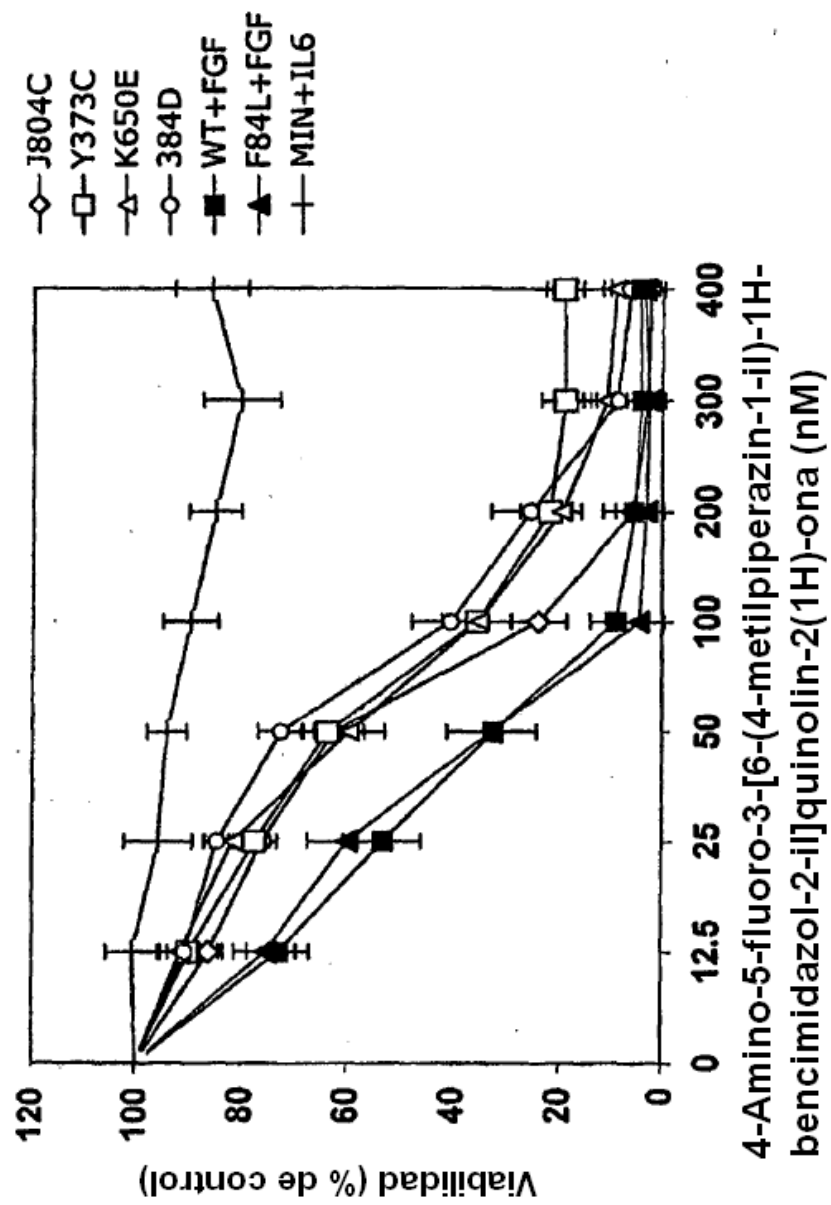
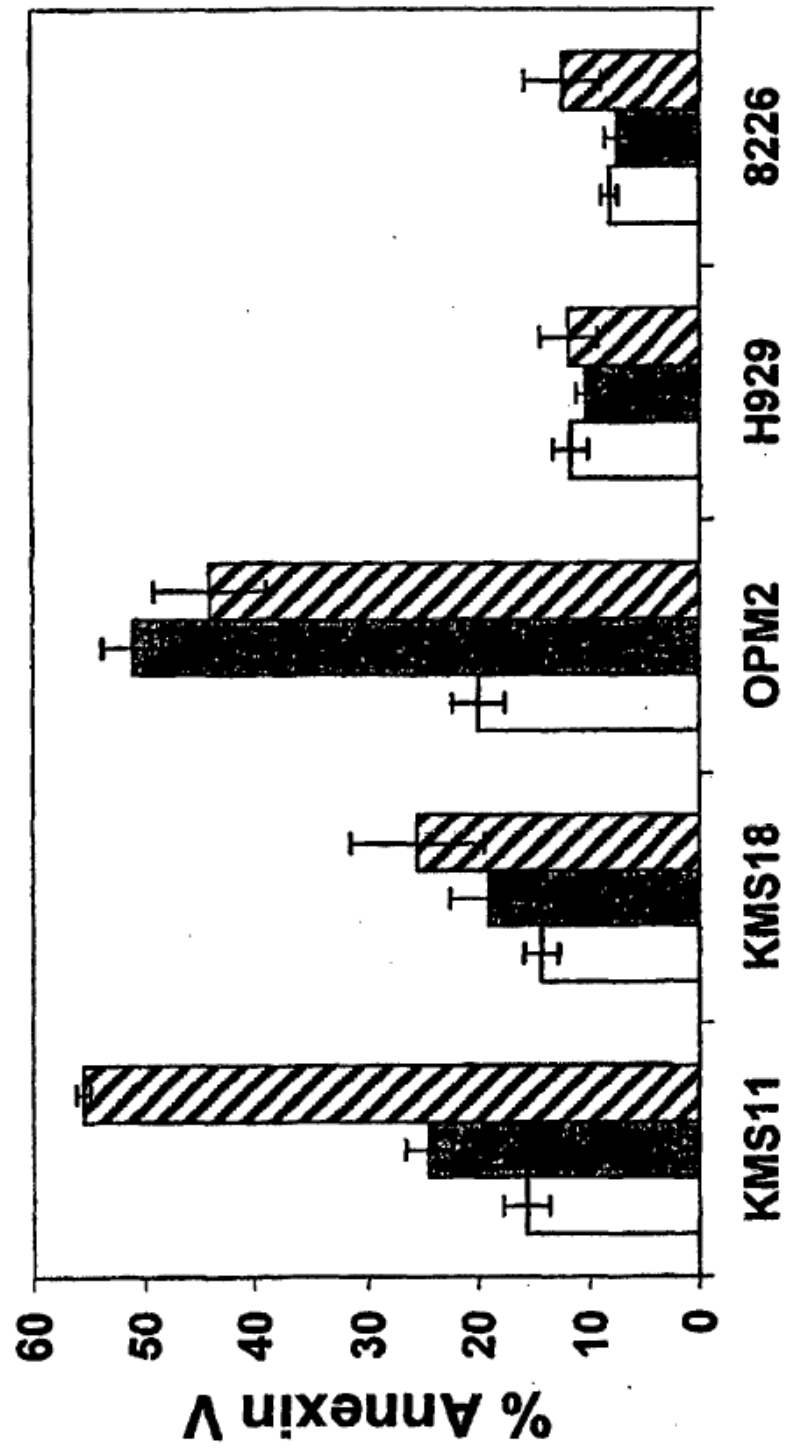


FIG. 11



Líneas Celulares de Mieloma Humano

FIG. 12A

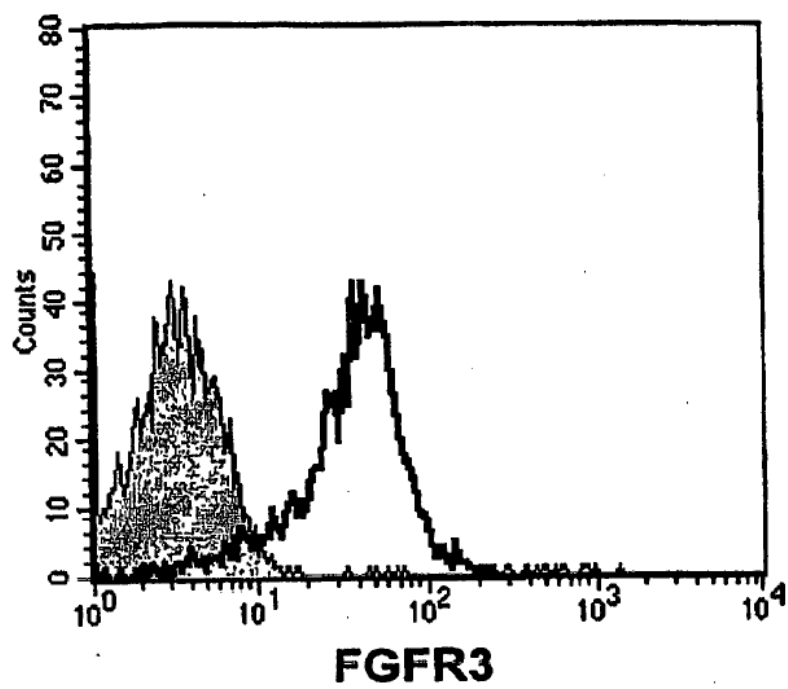


FIG. 12B

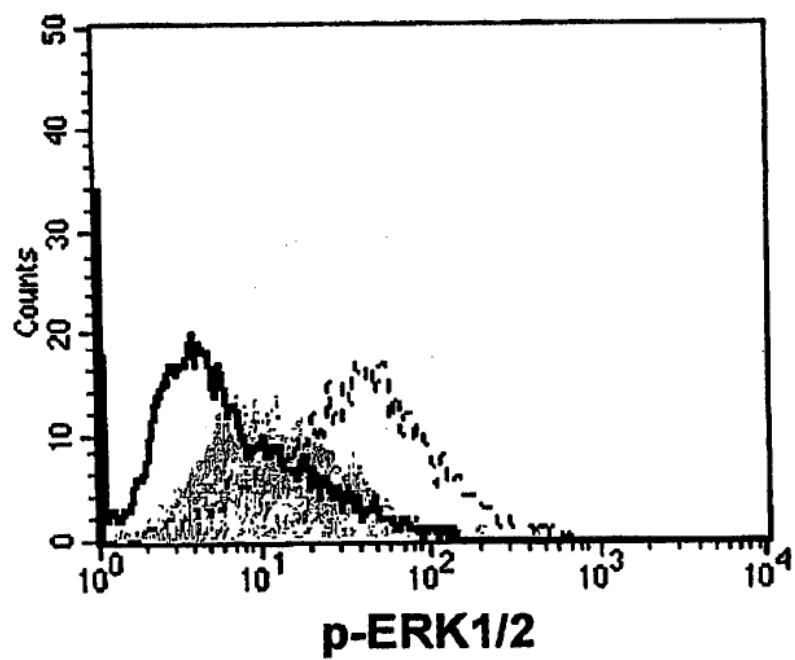


FIG. 12C

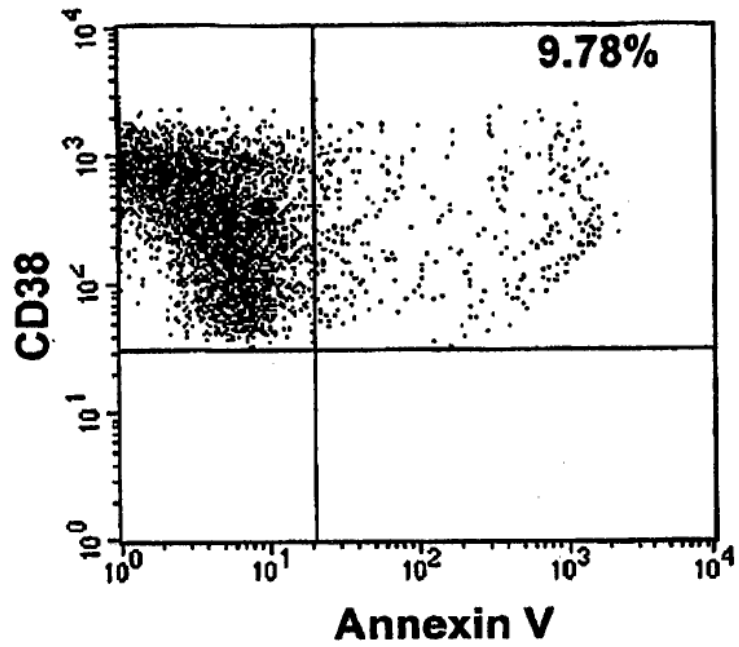


FIG. 12D

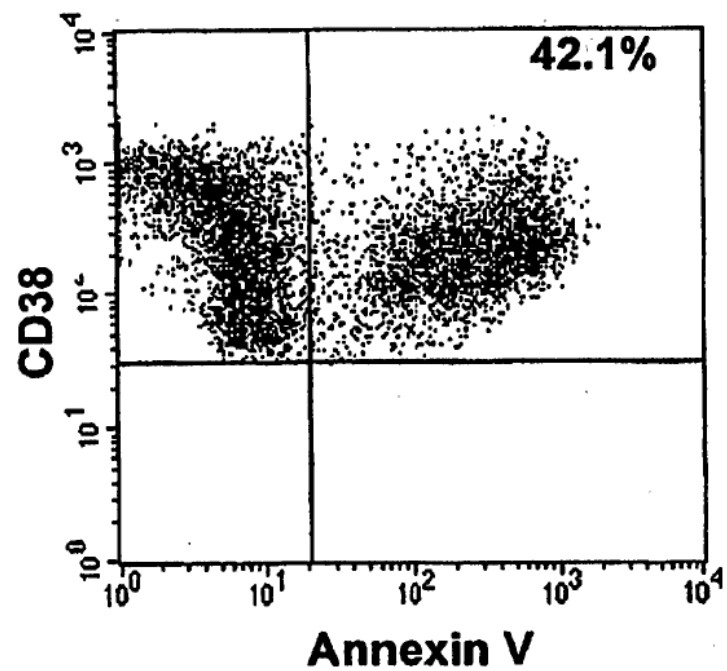


FIG. 13A

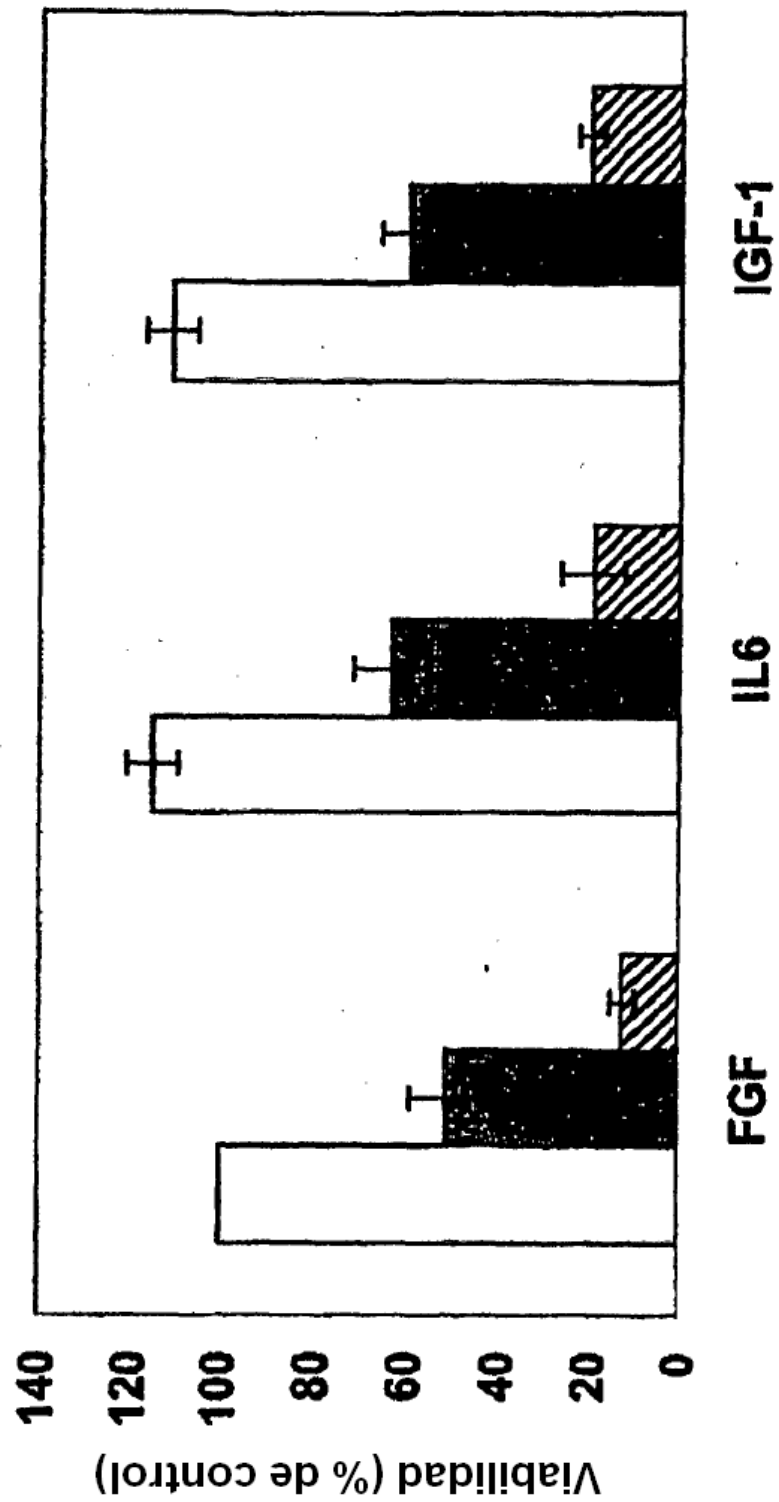


FIG. 13B

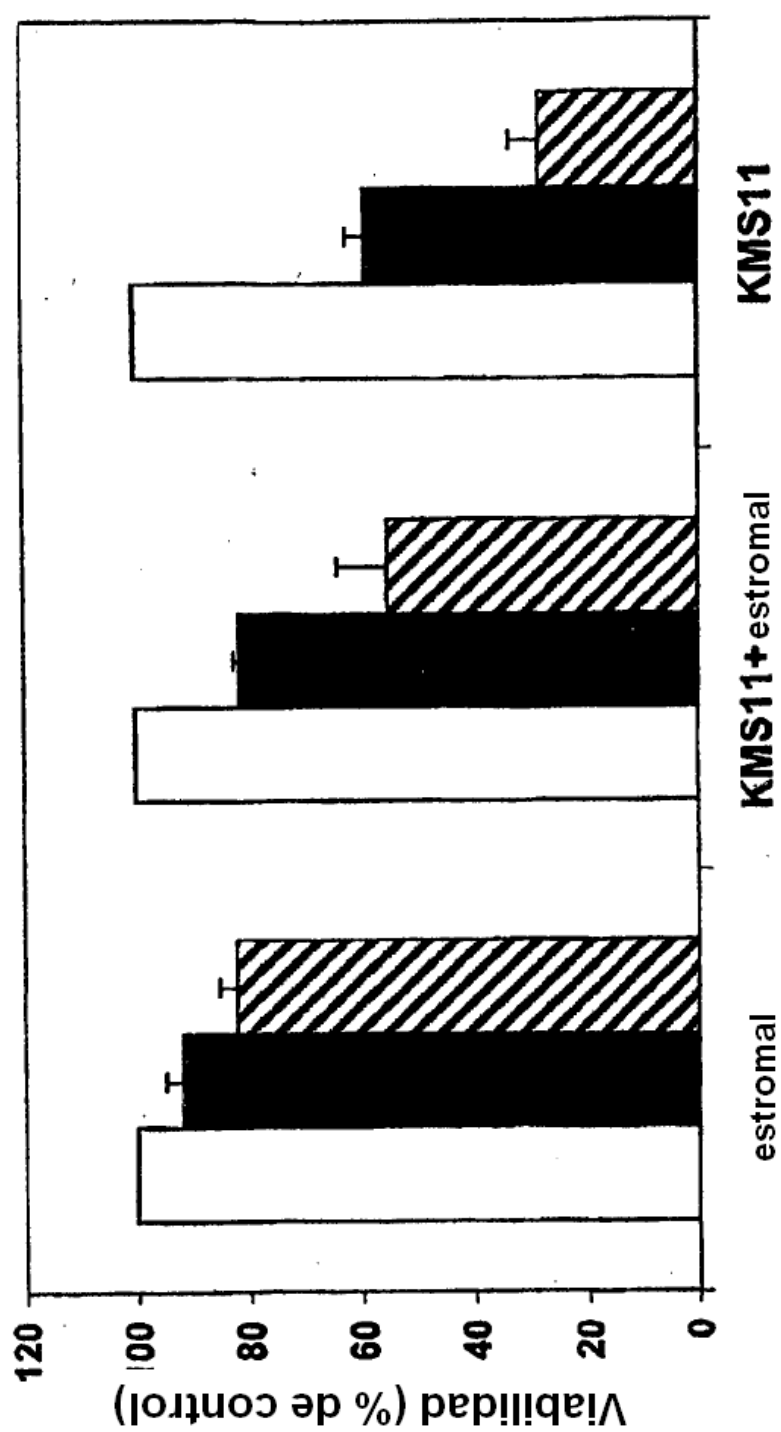


FIG. 14

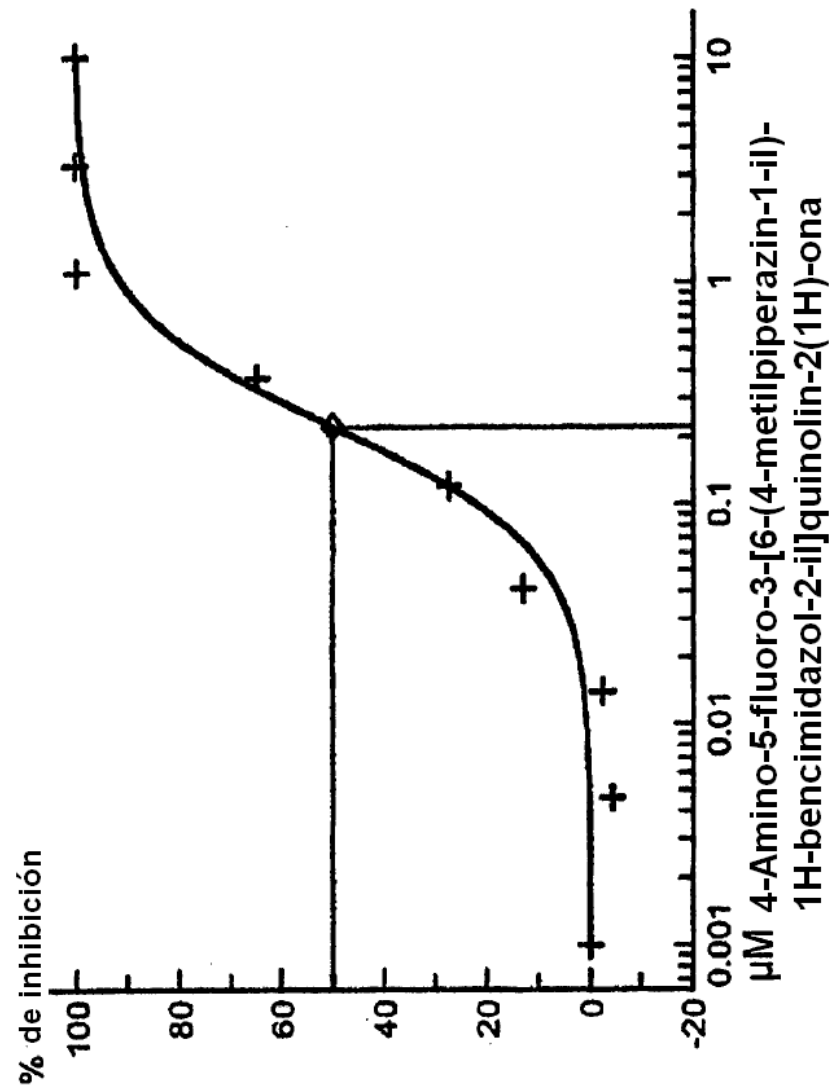


FIG. 15

