

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 503 734**

51 Int. Cl.:

**C07D 401/04** (2006.01)

**A61K 31/506** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**C07D 401/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2003** **E 10150442 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014** **EP 2194049**

54 Título: **N-Óxidos de derivados de n-fenil-2-pirimidinamina**

30 Prioridad:

**23.01.2002 GB 0201508**

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

**07.10.2014**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BÖRNSEN, K. OLAF;  
END, PETER;  
GROSS, GERHARD;  
PFAAR, ULRIKE;  
MANLEY, PAUL W. y  
ZIMMERMANN, JUERG**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 503 734 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

N-Óxidos de derivados de n-fenil-2-pirimidinamina

5 La invención se refiere a [(4-metil-4-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida y a una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y a composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos.

Las sales se forman, por ejemplo, como sales de adición de ácidos, preferiblemente con ácidos orgánicos o inorgánicos, a partir de 4-[(4-metil-4-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida, especialmente las sales farmacéuticamente aceptables.

10 Con propósitos de aislamiento o purificación, también es posible usar sales farmacéuticamente inaceptables, por ejemplo picratos o percloratos. Solo las sales farmacéuticamente aceptables o los compuestos libres (si se da la ocasión, en la forma de composiciones farmacéuticas) alcanzan un uso terapéutico y, por lo tanto, estos se prefieren.

15 En vista de la estrecha relación entre los nuevos compuestos en forma libre y en forma de sus sales, incluyendo las sales que pueden usarse como productos intermedios, por ejemplo en la purificación o la identificación de los nuevos compuestos, ha de entenderse anteriormente y posteriormente en la presente memoria que cualquier referencia al compuesto libre se refiere también a las sales correspondientes, según sea apropiado y conveniente.

20 La 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida posee propiedades farmacológicas valiosas y puede usarse, por ejemplo, como un agente antitumoral, como un agente para tratar la aterosclerosis, como un agente para tratar la reestenosis, como un agente antileucémico para la prevención de trastornos inducidos por trasplantes, tales como bronquiolitis obliterante, y/o para prevenir la invasión de células de animales de sangre caliente por ciertas bacterias, tales como *Porphyromonas gingivalis*.

La fosforilación de proteínas se conoce desde hace mucho como una etapa esencial en la diferenciación y la división de células. La fosforilación es catalizada por proteína quinasas subdivididas en serina/treonina y tirosina quinasas. Las tirosina quinasas incluyen tirosina quinasa receptora de PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas).

25 El PDGF es un factor de crecimiento muy comúnmente presente, que representa un papel importante tanto en el crecimiento normal como también en la proliferación celular patológica, tal como se observa en la carcinogénesis y en enfermedades de las células del músculo liso de los vasos sanguíneos, por ejemplo en la aterosclerosis y la trombosis.

30 La inhibición de la actividad de tirosina quinasa receptora estimulada por PDGF in vitro se mide en complejos inmunitarios receptores de PDGF de células A431, según se describe por E. Andrejaskas-Buchdunger y U. Regenass en Cancer Research 52, 5353-5358 (1992). La 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida inhibe la fosforilación de receptor acelular dependiente de PDGF. La inhibición de tirosina quinasa receptora de PDGF se mide en un ensayo de ELISA de microvaloración (cfr. Trinks y otros, J. Med. Chem. 37, 1015-27 (1994)).

35 La inhibición de tirosina quinasa receptora de PDGF hace a 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida también adecuada para el tratamiento de enfermedades tumorales, tales como gliomas, sarcomas, tumores de próstata y tumores de colon, mama y ova-rio.

40 [(4-Metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida también inhibe procesos celulares que implican el llamado factor de células pluripotenciales (SCF, también conocido como el ligando c-Kit o factor "steel"), tal como la autofosforilación del receptor de SCF (Kit) y la actividad estimulada por SCF de quinasa MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno).

45 En particular, 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida inhibe la actividad de tirosina quinasa de c-Kit. Esto puede observarse en un ensayo de inhibición de tirosina quinasa usando el dominio de quinasa citoplásmico de c-Kit. El ensayo se realiza como sigue: El vector donante de baculovirus pFbacG01 (GIBCO) se usa para generar un baculovirus recombinante que expresa la región de aminoácidos 544-976 de los dominios de quinasa citoplásmicos de c-Kit humano. Las secuencias de codificación para el dominio citoplásmico de c-Kit se amplifican mediante PCR a partir de una biblioteca de c-DNA de útero humano (Clontech). El fragmento de DNA amplificado y el vector pFbacG01 se hacen compatibles para la ligación mediante digestión con BamH1 y EcoRI. La ligación de estos fragmentos de DNA da como resultado el plásmido donante de baculovirus c-Kit. La producción de los virus, la expresión de proteínas en células Sf9 y la purificación de las proteínas fusionadas a GST se realizan como sigue:

50

*Producción de virus:* Vector de transferencia (pFbacG01-c-Kit) que contiene el dominio de quinasa de c-Kit se transfiere a la línea celular DH10Bac (GIBCO) y las células transfectadas se cultivan en placa sobre placas de agar selectivas. Las colonias sin inserción de la secuencia de fusión en el genoma viral (soportadas por las bacterias) son azules. Las colonias blancas simples se recogen y el DNA viral (bácmido) se aísla de las bacterias mediante procedimientos de purificación de plásmidos estándar. Células Sf9 o Sf21 (American Type Culture Collection) se transfectan a continuación en matraces de 25 cm con el DNA viral usando reactivo Cellfectin.

*Determinación de la expresión de proteínas a pequeña escala en células Sf9:* Medio que contiene virus se recoge del cultivo celular transfectado y se usa para la infección para incrementar su concentración. Medio que contiene virus obtenido después de dos rondas de infección se usa para la expresión de proteínas a gran escala. Para la expresión de proteínas a gran escala, placas de cultivo tisular redondas de 100 cm<sup>2</sup> se siembran con 5 x 10<sup>7</sup> células/placa y se infectan con 1 ml de medio que contiene virus (aproximadamente 5 MOIs). Después de 3 días las células se rascan de la placa y se centrifugan a 500 rpm durante 5 min. Las pellas de células de 10-20 placas de 100 cm<sup>2</sup> se resuspenden en 50 ml de tampón de lisis (Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, EDTA 2 mM, NP-40 al 1%, DTT 1 mM, PMSF 1 mM) enfriado con hielo. Las células se agitan sobre hielo durante 15 min y a continuación se centrifugan a 5000 rpm durante 20 min.

*Purificación de proteína etiquetada con GST:* El lisado celular centrifugado se carga en una columna de glutationa-Sepharose de 2 ml (Pharmacia) y se lava tres veces con 10 ml de Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, EDTA 2 mM, DTT 1 mM, NaCl 200 mM. La proteína etiquetada con GST se eluye mediante 10 aplicaciones (1 ml cada una) de Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, glutationa reducida 10 mM, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, glicerol al 10%, y se almacena a -70°C.

*Ensayo de quinasa:* Los ensayos de tirosina proteína quinasa con GST-c-Kit purificada se llevan a cabo en un volumen final de 30 µl que contiene 200-1800 ng de proteína de enzima (dependiendo de la actividad específica), Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, MnCl<sub>2</sub> 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, DTT 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 10 µM, 5 µg/ml de poli(Glu, Tyr) 4:1, DMSO al 1%, ATP 1,0 µM y [γ<sup>33</sup>P] ATP 0,1 µCi. La actividad se ensaya en presencia o ausencia de inhibidores, midiendo la incorporación de <sup>33</sup>P desde [γ<sup>33</sup>P]ATP en el sustrato de poli(Glu, Tyr) 4:1. El ensayo (30 µl) se lleva a cabo en placas de 96 pocillos a temperatura ambiente durante 20 min bajo condiciones descritas posteriormente y se termina mediante la adición de 20 µl de EDTA 125 mM. Subsiguientemente, 40 µl de la mezcla de reacción se transfieren a membrana Immobilon-PVDF (Millipore, Bedford, MA, EE.UU. de A.) previamente embebida durante 5 min con metanol, enjuagada con agua, a continuación embebida durante 5 min con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 0,5% y montada en una tubería de vacío con la fuente de vacío desconectada. Después de añadir por gotas todas las muestras, el vacío se conecta y cada pocillo se enjuaga con 20 µl de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 0,5%. Las membranas se retiran y se lavan 4 veces en un agitador con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 1,0% y una vez con etanol.

Las membranas se cuentan después del secado a temperatura ambiente, montando en un bastidor de 96 pocillos TopCount de Packard, y la adición de 10 µl/pocillo de Microscint TM (Packard). Los valores de IC<sub>50</sub> se calculan mediante análisis de regresión lineal del porcentaje de inhibición de cada compuesto por duplicado, a cuatro concentraciones (habitualmente 0,01, 0,1, 1 y 10 µM). Una unidad de actividad de proteína quinasa se define como un nmol de <sup>33</sup>P ATP transferido desde [γ<sup>33</sup>P]ATP a la proteína de sustrato por minuto por mg de proteína a 37°C.

[(4-Metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida también inhibe la autofosforilación de receptor de SCF (y c-Kit, un protooncogén). La inhibición de la autofosforilación del receptor de SCF puede medirse usando, por ejemplo, células MO7e, una línea celular de leucemia promegacariocítica humana que depende de SCF para la proliferación. Se obtienen de Grover Bagby, Oregon Health Sciences University, EE.UU. de A. Las células se cultivan en medio RPMI 1649 complementado con FBS al 10% y 2,5 ng/ml de GC-CMF. GM-SCF y SCF están disponibles comercialmente. Células MO7e privadas de suero se preparan y se incuban durante 90 min a 37°C con la sustancia de prueba antes de estimularse con SCF recombinante durante 10 min a 37°C. Cantidades idénticas de lisados celulares se analizan mediante transferencia Western usando anticuerpos antifosfotirosina (Buchdunger y otros, Proc. Natl. Acad. Sci (EE.UU. de A.) 92, 2558-62 (1995)). Las proteínas inmunodecoradas se detectan por medio del sistema de transferencia Western ECL de Amersham (Amersham, Reino Unido).

Sobre la base de las proteínas descritas, 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida puede usarse no solo como una sustancia inhibidora de tumores, por ejemplo en el cáncer de pulmón de células pequeñas, sino también como un agente para tratar trastornos proliferativos no malignos, tales como aterosclerosis, trombosis, psoriasis, escleroderma y fibrosis, así como para la protección de células pluripotenciales, por ejemplo para combatir el efecto hemotóxico de los agentes quimioterapéuticos, tales como el 5-fluorouracilo, y en el asma. Puede usarse especialmente para el tratamiento de enfermedades que responden a una inhibición de la quinasa receptora de PDGF.

Además, 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida

evita el desarrollo de la resistencia a múltiples fármacos en la terapia para el cáncer con otros agentes quimioterapéuticos o aborta una resistencia preexistente a otros agentes quimioterapéuticos. Además, independientemente del efecto descrito anteriormente en la presente memoria, 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida puede usarse ventajosamente en combinación con otros agentes antitumorales, tales como, especialmente, otros inhibidores de c-Kit e inhibidores del receptor de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o la actividad de c-Src.

Además, la Abl quinasa, especialmente v-Abl quinasa, es inhibida por 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida. La inhibición de v-Abl tirosina quinasa se determina mediante los métodos de N. Lydon y otros, *Oncogene Research* 5, 161-173 (1990) y J. F. Geissler y otros, *Cancer Research* 52, 4492-8 (1992). En esos métodos, se usan como sustratos [Val<sup>5</sup>]-angiotensina II y [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]-ATP.

Por analogía, 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida también inhibe Bcr-Abl quinasa (véase *Nature Medicine* 2, 561-566 (1996)) y así es adecuada para el tratamiento de cáncer y enfermedades tumorales positivas a Bcr-Abl, tales como leucemias (especialmente leucemia mieloide crónica y leucemia linfoblástica aguda, donde se encuentran especialmente mecanismos de acción apoptóticos) y también muestra efectos sobre el subgrupo de células pluripotenciales leucémicas así como potencial para la purificación de estas células in vitro después de la retirada de dichas células (por ejemplo, retirada de la médula ósea) y la reimplantación de las células una vez que se han depurado de células cancerosas (por ejemplo, reimplantación de células de la médula ósea purificadas).

Prueba para la actividad contra c-Abl proteína tirosina quinasa. La prueba se efectúa como un ensayo de unión a filtro como sigue: El dominio de quinasa etiquetado con His de c-Abl se clona y se expresa en el sistema de baculovirus/Sf9 según se describe por Bhat y otros, *J. Biol. Chem.* 272, 16170-5 (1997). Una proteína de 37 kD (c-Abl quinasa) se purifica mediante un procedimiento en dos etapas sobre una columna de quelato metálico de cobalto seguido por una columna de intercambio aniónico con un rendimiento de 1-2 mg/l de células Sf9. La pureza de la c-Abl quinasa es >90% según se juzga mediante SDS-PAGE después de tinción con azul de Coomassie. El ensayo contiene c-Abl quinasa (50 ng), Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 10  $\mu$ M, DTT 1 mM y 0,06  $\mu$ Ci/ensayo de [ $\gamma$ <sup>33</sup>P]-ATP (5  $\mu$ M ATP) usando 30  $\mu$ g/ml de poli-Ala, Glu, Lys, Tyr-6:2:5:1 (Poly-AEKY, Sigma P1152) en presencia de DMSO al 1%, volumen total de 30  $\mu$ l. Las reacciones se terminan añadiendo 10  $\mu$ l de EDTA 250 mM, y 30  $\mu$ l de la mezcla de reacción se transfieren sobre membrana Immobilon-PVDF (Millipore, Bedford, MA, EE.UU. de A.) previamente embebida durante 5 min con metanol, enjuagada con agua, a continuación embebida durante 5 min con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 0,5% y montada sobre una tubería de vacío con la fuente de vacío desconectada. Después de añadir por gotas todas las muestras, el vacío se conecta y cada pocillo se enjuaga con 200  $\mu$ l de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 0,5%. Las membranas se retiran y se lavan en un agitador con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 0,5% (4 veces) y una vez con etanol. Las membranas se cuentan después del secado a temperatura ambiente, montando en un bastidor de 96 pocillos Packard TopCount, y la adición de 10  $\mu$ l/pocillo de Microscint TM (Packard).

Prueba para la actividad contra Bcr-Abl. La línea celular progenitora mieloide múrida 32Dcl3 transfectada con el vector de expresión de Bcr-Abl p210, pGDp210Bcr/Abl (32D-bcr/abl) se obtuvo de (Dana Faber Cancer Institute, Boston, MA, EE.UU. de A.). Las células expresan la proteína Bcr-Abl de fusión con una Abl quinasa constitutivamente activa e independiente de factor de crecimiento proliferativo. Las células se expanden en RPMI 1640 (AMIMED), suero de ternero fetal al 10%, glutamina 2 mM (Gibco) ("medio completo") y se prepara una solución de reserva de trabajo congelando partes alícuotas de 2 x 10<sup>6</sup> células por vial en medio de congelación (FCS al 95%, DMSO al 5% (SIGMA)). Después de descongelar, las células se usan durante un máximo de 10-12 pasadas para los experimentos. Para ensayos celulares, los compuestos se disuelven en DMSO y se diluyen con medio completo para dar una concentración de partida de 10  $\mu$ M, seguido por preparación de diluciones de 3 veces en serie en medio completo. Se siembran 200.000 células 32D-Bcr/Abl en 50  $\mu$ l de medio completo por pocillo en placas de cultivo tisular de fondo redondo de 96 pocillos. Se añaden 50  $\mu$ l por pocillo de diluciones de 3 veces en serie del compuesto de prueba a las células por triplicado. Células no tratadas se usan como control. El compuesto se incuba junto con las células durante 90 min a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%, seguido por centrifugación de las placas de cultivo tisular a 1300 rpm (centrífuga Beckman GPR) y retirada de los sobrenadantes mediante aspiración cuidadosa teniendo cuidado de no retirar ninguna de las células formadas como pellas. Las pellas de células se someten a lisis mediante adición de 150  $\mu$ l de tampón de lisis (Tris/HCl 50 mM, pH 7,4, cloruro sódico 150 mM, EDTA 5 mM, EGTA 1 mM, NP-40 al 1%, orto-vanadato sódico 2 mM, PMSF 1 mM, 50  $\mu$ g/ml de aprotinina y 80  $\mu$ g/ml de leupeptina) y bien se usan inmediatamente para el ELISA o bien se almacenan congeladas en las placas a -20°C hasta la utilización. Placas de ELISA negras (placas negras Packard HTRF-96) se prerrevisten durante la noche a 4°C con 50 ng/pocillo del anti-dominio abl-SH3 policlonal de conejo Ab 06-466 de Upstate en 50  $\mu$ l de PBS. Después de lavar 3 veces con 200  $\mu$ l/pocillo de PBS que contiene Tween 20 al 0,05% (PBST) y TopBlock (Juro) al 0,5%, los sitios de unión a proteína residuales se bloquean con 200  $\mu$ l/pocillo de PBST, TopBlock al 3% durante 4 h a temperatura ambiente, seguido por incubación con 50  $\mu$ l de lisados de células no tratadas o tratadas con compuesto (200  $\mu$ g de proteína total por pocillo) durante 3-4 h a 4°C. Después de 3 lavados, se añaden 50  $\mu$ l/pocillo de antifosfotirosina Ab PY20(AP) etiquetada con fosfatasa alcalina (Zymed) diluida hasta 0,2  $\mu$ g/ml en tampón de bloqueo y se incuban durante la noche (4°C). Para todas las etapas de incubación las placas se cubren con selladores de placas (Costar). Finalmente, las placas se lavan otras 3 veces con tampón de lavado y una vez con agua desionizada antes de la

adición de 90 µl/pocillo del sustrato para AP CDPStar RTU con Emerald II. Las placas, ahora selladas con selladores para placas Packard TopSeal™-A, se incuban durante 45 min a temperatura ambiente en la oscuridad y la luminiscencia se cuantifica midiendo conteos por segundo (CPS) con un contador de centelleo de microplacas Top Count de Packard (Top Count).

- 5 La diferencia entre la lectura de ELISA (CPS) obtenida para los lisados de las células 32D-Bcr/Abl no tratadas y la lectura para el fondo del ensayo (todos los componentes, pero sin lisado celular) se calcula y se toma como 100% que refleja la proteína Bcr-Abl constitutivamente fosforilada presente en estas células. La actividad de la 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida sobre la actividad de Bcr-Abl quinasa se expresa como porcentaje de reducción de la fosforilación de Bcr-Abl. Los valores para la IC<sub>50</sub> y la IC<sub>90</sub> se determinan a partir de las curvas de respuesta a la dosis mediante extrapolación gráfica.

Prueba para la actividad contra Bcr-Abl mutante: La actividad de los compuestos sobre la actividad de Bcr-Abl mutante M351T se determina como se describe anteriormente, excepto que se utilizan células 32Dcl3 transfectadas con Bcr-Abl mutante en lugar de Bcr-Abl p210.

- 15 Ensayos de c-Raf-1 proteína quinasa: c-Raf-1 recombinante se obtiene mediante infección triple de células Sf21 con baculovirus recombinante GST-c-Raf-1 junto con v-Src y baculovirus recombinante v-Ras que se requiere para la producción de c-Raf-1 quinasa activa (Williams y otros, PNAS 1992; 89:2922-6). Se requiere Ras activa (v-Ras) para reclutar c-Raf-1 hacia la membrana celular y v-Src para fosforilar c-Raf-1 para activarla completamente. Las células se siembran en 2,5 x 10<sup>7</sup> células por plato de 150 mm y se deja que se peguen a un plato de 150 mm durante 1 h a TA. Se aspira medio (SF900II que contiene FBS al 10%) y baculovirus recombinante GST-c-Raf-1, v-Ras y v-Src se añaden a una MOI de 3,0, 2,5 y 2,5, respectivamente, en un volumen total de 4-5 ml. Las células se incuban durante 1 h a TA y a continuación se añaden 15 ml de medio. Las células infectadas se incuban durante 48-72 a 27°C. Las células Sf21 infectadas se rascan y se recogen en un tubo de 50 ml y se centrifugan durante 10 min a 4°C a 1100 g en una centrífuga Sorvall. La pella de células se lava una vez con PBS enfriada con hielo y se somete a lisis con 0,6 ml de tampón de lisis por 2,5 x 10<sup>7</sup> células. La lisis completa de las células se alcanza después de 10 min sobre hielo con pipeteado ocasional. Los lisados de células se centrifugan durante 10 min a 4°C a 14.500 g en una centrífuga Sorvall con rotor SS-34 y el sobrenadante se transfiere a un tubo reciente y se almacena a -80°C. c-Raf-1 se purifica de los lisados de células usando 100 µl de cuentas de glutationa-Sepharose 4B de relleno equilibradas en PBS enfriada con hielo por 2,5 x 10<sup>7</sup> células. Se deja que GST-c-Raf-1 se una a las cuentas a 4°C durante 1 hora con oscilación. GST-c-Raf-1 unida con las cuentas se transfiere a una columna. La columna se lava una vez con tampón de lisis y dos veces con solución salina tamponada con Tris enfriada con hielo. Tampón de elución enfriado con hielo se añade y el flujo de la columna se detiene para dejar que la glutationa libre rompa la interacción de GST-c-Raf-1 con cuentas de glutationa-Sepharose. Se recogen fracciones (1 ml) en tubos prerrefrigerados. Cada tubo contiene glicerol al 10% (concentración final) para mantener la actividad de quinasa durante ciclos de congelación-descongelación. Fracciones purificadas de proteína de GST-c-Raf-1 quinasa se almacenan a -80°C.

- 35 Se usa IκB como sustrato para la c-Raf-1 quinasa. IκB se expresa en bacterias como proteína BL21 etiquetada con His. Bacterias LysS que contienen el plásmido IκB se hacen crecer hasta una DO<sub>600</sub> de 0,6 en medio LB, a continuación se inducen para expresar IκB con IPTG (concentración final de 1 mM) durante 3 h a 37°C y a continuación las bacterias se someten a lisis mediante sonicación (graduación límite de la micropunta durante 3 veces a 1 min cada una en tampón de sonicación [Tris 50 mM, pH 8,0, DTT 1 mM, EDTA 1 mM]) y se centrifugan a 10.000 g durante 15 min. El sobrenadante se mezcla con sulfato amónico para dar una concentración final de 30%. Esta mezcla se somete a oscilación durante 15 min a 4°C y a continuación se centrifuga a 10.000 g durante 15 min. La pella se resuspende en tampón de unión (Novagen) que contiene BSA 10 mM. Esta solución se aplica a Ni-agarosa (Novagen) y se lava de acuerdo con el manual de Novagen. IκB se eluye de la columna usando tampón de elución (imidazol 0,4 M, NaCl 0,2 M, Tris 8 mM, pH 7,9). Las fracciones que contienen proteína se dializan en Tris 50 mM, pH 8, DTT 1 mM.

- La actividad de c-Raf-1 proteína quinasa se ensaya en presencia o ausencia de inhibidores, midiendo la incorporación de <sup>33</sup>P procedente de [Y<sup>33</sup>P]ATP en IκB. el ensayo se lleva a cabo en placas de 96 pocillos a temperatura ambiente durante 60 min. Contiene (volumen total de 30 µl): c-Raf-1 quinasa (400 ng), Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, MnCl<sub>2</sub> 5 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 10 µM, DTT 1 mM y 0,3 µCi/ensayo de [Y<sup>33</sup>P]-ATP (ATP 10 µM) usando 600 ng de IκB en presencia de DMSO al 1%. Las reacciones se terminan añadiendo 10 µl de EDTA 250 mM, y 30 µl de la mezcla de reacción se transfieren sobre membrana Immobilon-PVDF (Millipore, Bedford, MA, EE.UU. de A.) previamente embebida durante 5 min con metanol, enjuagada con agua, a continuación embebida durante 5 min con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 0,5% y montada sobre una tubería de vacío con la fuente de vacío desconectada. Después de añadir en forma de gota todas las muestras, el vacío se conecta y cada pocillo se enjuaga con 200 µl de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 0,5%. Las membranas se retiran y se lavan 4 veces en un agitador con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 0,5%, una vez con etanol. Las membranas se cuentan después del secado a temperatura ambiente, montando en un bastidor de 96 pocillos TopCount de Packard, y la adición de 10 µl/pocillo de Microscint TM (Packard).

También se ha descubierto sorprendentemente que 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida tiene un potencial inesperado para servir como productos selectivos

frente a la hipoxia debido a biorreducción (desoxigenación) en la célula, especialmente en los tumores y en el cerebro. Los profármacos activados por hipoxia son especialmente útil en la terapia del cáncer ya que se produce hipoxia severa en tejido de tumor sólido o en el cerebro. Las células hipóxicas pueden explotarse para terapia mediante profármacos atóxicos activados por hipoxia. Así, debido a la reducción neta del resto N-óxido, existe una captación superior de 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida en los tumores o en el cerebro y una acumulación de la forma reducida de 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida en los tumores o el cerebro.

Otra ventaja de 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida son los efectos superiores para el flujo mediado por portador sobre el compuesto A (mediante un sistema saturable, probablemente P-gp). Consecuencias de este flujo menos pronunciado son:

- una mayor absorción
- niveles de fármaco superiores en el cerebro y
- niveles de fármaco superiores en el tumor.

Este efecto sobre P-gp y el mecanismo de transporte pueden demostrarse como sigue:

Monocapas de células Caco-2 desarrolladas sobre filtros de poli(tereftalato de etileno) (PET) (Talcon™) durante 21-25 días se usan para experimentos de transporte. El flujo de compuestos a través de monocapas de células Caco-2 sobre filtros de PET así como a través de filtros de PET solos sin células Caco-2 (para la validación del sistema) en presencia y ausencia de los potentes inhibidores de la bomba de flujo CsA y verapamil, respectivamente, se determina como sigue: Antes del experimento de transporte, el medio de cultivo en el compartimento aceptor (0,2 ml para el lado apical y 1,0 ml para el basolateral) se reemplaza por solución aceptora (HBSS, cuando es pertinente que contenga el inhibidor de interés) preincubada a 37°C. Para iniciar el experimento, el medio del compartimento donante (0,35 ml para el lado apical y 1,5 para el basolateral) se reemplaza por solución donante (compuesto en HBSS, cuando es pertinente que contenga inhibidor de interés) preincubada a 37°C. Partes alícuotas de 150 µl se retiran del lado donante y aceptor después de aproximadamente 1 y 120 minutos. Se realizan experimentos de transporte en las direcciones tanto de apical a basolateral como de basolateral a apical por triplicado a 37°C en una incubadora sin agitación.

Por otra parte, la unión a proteína plasmática de 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida es superior con respecto a la fracción libre y/o la asociación con proteínas plasmáticas (por ejemplo, albúmina, glicoproteína ácida α-1 (AAG)) a la observada con compuesto A. Una extensión inferior de la asociación a AAG da como resultado una variabilidad menos pronunciada de la fracción libre de N-óxidos y también tiene un efecto de la fracción libre de compuestos del compuesto A. A la dosis clínicamente pertinente de una dosis diaria de 400 mg (concentraciones de 900-2600 ng/ml de compuesto A), la fracción libre de compuesto A varía de 4 a 5%. Usando reparto de eritrocitos, el compuesto A se encontraba principalmente asociado con albúmina y glicoproteína ácida alfa-1 (AAG). La fracción asociada con lipoproteínas y gammaglobulinas era <5%. La unión a proteínas plasmáticas reducida de 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida se muestra mediante el siguiente ejemplo.

La fracción libre (o no unida) de 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida se determina mediante el método de ultracentrifugación que también se usó para el compuesto A (véase la solicitud de Patente Europea N° 1250140 o la solicitud de Patente Internacional WO 01/47507 presentada el 22/12/2000). Soluciones de albúmina de suero humano (40 g/l) y glicoproteína ácida α-1 (1 g/l) se prepararán en tampón de Soerensen, pH 7,4, que contiene NaCl al 0,9% (p/v). 30 µl de soluciones de reserva de 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida se agregan directamente a 3 ml de las soluciones de proteína para dar las concentraciones finales pretendidas de 300-5000 ng/ml de 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida (concentración final de etanol 0,5%, factor 1:200). Después de la incubación durante 30 min a 37°C bajo agitación suave constante, las muestras de proteína con agregado (n=3/4) se centrifugan a 200.000 g durante al menos 5 h a 37°C (centrífuga con un rotor de ángulo fijo) usando tubos de centrifuga de policarbonato de paredes gruesas. El giro se detiene sin frenar. La concentración de 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida se determina después de la incubación (antes de la centrifugación) y después de la centrifugación en el sobrenadante.

La farmacocinética de 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida es ventajosa sobre el compuesto A con respecto a  $C_{m\acute{a}x}$  (la concentración más alta en plasma observada en unidades de masa/volumen), la semivida (se refiere al tiempo después de la administración del fármaco para observar una disminución de un medio de la respuesta farmacológica medida; en un aspecto, la semivida se mejora cuando la semivida se incrementa en al menos 50%) o la AUC (concentraciones en plasma a lo largo del tiempo,

según se definen por el área bajo la curva (AUC) en unidades de masa-tiempo/volumen) en plasma como una cuestión del mecanismo de transporte (por ejemplo, P-gp). Esta farmacocinética ventajosa se muestra dando a los animales (por ejemplo ratas) una sola dosis de 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida (un grupo de animales será tratado intravenosamente y un grupo de animales será tratado oralmente). Se recoge sangre en puntos temporales seleccionados (por ejemplo 0,083 min (iv: intravenoso) y 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 y 48 horas después de iv o po (dosificación oral). El plasma se prepara inmediatamente mediante centrifugación de sangre. 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida y el compuesto A inalterados se miden en plasma usando detección HPLC/UV o LC-MS.

Por otra parte, la unión a proteínas plasmáticas reducida de 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida puede provocar un incremento en el volumen aparente de la distribución debido a una fracción superior de fármaco no unido (fu). Ventajosamente, la distribución de 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida en los órganos y tejidos (incluyendo el cerebro) es diferente a la del compuesto A. Esto puede mostrarse como sigue.

- 4-[(4-Metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida y compuesto A en el cerebro de ratones o ratas durante la dosificación con N-óxido no radioetiquetado.

Los animales (por ejemplo, ratones o ratas) reciben una sola dosis de 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida (un grupo de animales se trata intravenosamente y un grupo de animales se trata oralmente). Los animales se sacrifican en puntos temporales seleccionados (por ejemplo, 0,083 min (iv) y 1, 8, 24 y 48 h después de la dosificación iv o po). El cerebro de los animales tratados se recoge, se preparan homogenados de cerebro y se preparan muestras (por ejemplo, extracción de homogenado con disolvente orgánico tal como metanol, acetonitrilo u otros) para el análisis (HPLC/UV o LC-MS) de 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida y compuesto A. Las concentraciones de 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida y compuesto A en el cerebro y el plasma se miden para la determinación de la relación cerebro/plasma.

- Distribución de sustancia o sustancias radiactivas en ratones o ratas durante la dosificación con N-óxido radioetiquetado.

Para el estudio de distribución tisular, por ejemplo, 10 mg/kg po de 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida radioetiquetada (por ejemplo, etiqueta de  $^{14}\text{C}$ ; 100  $\mu\text{Ci/kg}$  por semana) se administran a los animales. La captación/distribución de sustancia o sustancias radiactivas a través del cuerpo del animal se investiga usando autorradioluminografía cuantitativa de cuerpo entero (QWABL). Los animales son sacrificados en puntos temporales seleccionados y se congelan en una mezcla de hielo seco y hexano a aproximadamente  $-75^\circ\text{C}$ . Los animales congelados son embebidos en un gel acuoso al 2% precongelado de Na-CMC, a aproximadamente  $-75^\circ\text{C}$ ; se obtienen secciones de 40  $\mu\text{m}$  de grosor a alrededor de  $-20^\circ\text{C}$  en un criomicrotomo CryoMacrocut (Leica Instr. GmbH, D-Nussloch). La deshidratación de las secciones tiene lugar durante 24-60 h a  $-23^\circ\text{C}$  en el criomicrotomo. Las secciones se exponen a placas BAS III Imaging (Fuji Photo Film Co., Ltd., J-Tokyo) durante 1 día a temperatura ambiente en una caja protectora de plomo para minimizar el incremento del fondo. La duración de la exposición permite la detección de alrededor de 2 dpm/mg, es decir la concentración de radiactividad correspondiente a alrededor de 0,2-0,4% de la dosis radiactiva total si la radiactividad se distribuía uniformemente a través del cuerpo. La exploración se realiza en un formador de imágenes fosforescente Fuji BAS 2000 TR, inmediatamente después del final de la exposición, bajo condiciones de luz controlada, con una etapa de exploración de 100  $\mu\text{m}$  con una graduación 1024. El análisis de imágenes se realiza como sigue: Los archivos de datos de luz fotoestimulados resultantes se corrigen sustrayendo el fondo, se procesan electrónicamente con la ayuda de un analizador de imágenes MCID/M4 (3.0 Rev. 1.3) (Imaging Research, St. Catherines, Ontario, Canadá) y se convierten automáticamente en concentraciones de radiactividad usando una curva de calibración polinómica de primer grado obtenida a partir de una escala de sangre radiactiva procesada bajo condiciones similares a las muestras. Los límites de detección (LD) y cuantificación (QL) se determinan mediante  $\text{LD} = \text{media del fondo} (n = 10) + 3 \text{ DE}$ ;  $\text{QL} = 3 \text{ LD}$ .

El tamaño de las áreas de medida es igual que el de cada patrón de sangre de la escala de sangre usada para establecer la curva de calibración. Los archivos de imágenes se procesan usando el software Adobe Photoshop®.

Para la distribución de sustancia o sustancias radiactivas totales usando QWABL, solo se usa la mitad del animal tratado, lo que hace posible usar órganos o tejidos para la determinación de 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida y/o compuesto A inalterados en muestras seleccionadas usando HPLC/UV o HPLC-radiactividad y/o LC-MS.

4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida también tiene menos afinidad para CYP450s[1,2], debido a que los N-óxidos son más polares. Estas enzimas metabolizan la mayoría de los fármacos del mercado. Menos afinidad se traduce en un potencial de interacción fármaco/fármaco

5 menor. Especialmente, el bloqueo de un nitrógeno básico como en un resto de piperazina/piridina reduce la afinidad para CYP2D6, una enzima que se une a sustratos especialmente mediante interacción iónica con el residuo aspartato, lo que requiere un resto básico como el nitrógeno en el sistema anular de piperazina. Una fracción reunida de 10 microsomas de hígado humano diferentes se incuban con todos los cofactores necesarios para su actividad metabólica (NADPH) con sustratos marcadores definidos para la actividad específica de la isozima CYP450 respectiva. El inhibidor potencial se añade con concentraciones crecientes y las reacciones metabólicas se evalúan mediante el método analítico correspondiente (LC/MS, HPLC, fluorescencia). La velocidad de conversión sin inhibidor se establece como 100% y la velocidad de inhibición se evalúa como la concentración de inhibidor necesaria para suprimir 50% de la conversión (IC50). Se usan los siguientes sustratos marcadores:

| Sustratos |   |   |
|-----------|---|---|
| CYP       | Preferidos  | Aceptables  |
| 1A2       | Etoixirresorufina<br>Fenacetina   | Cafeína (baja renovación)<br>Teofilina (baja renovación)<br>Acetanilida (principalmente aplicada en hepatocitos)<br>Metoxirresorufina |
| 2A6       | Cumarina  |   |
| 2C8       | Paclitaxel (¿disponibilidad de patrones?)   |   |
| 2C9       | S-Warfarina diclofenac  | Tolbutamida (baja renovación)   |
| 2C19      | S-Mefenitoína (metabolito hidroxilado en 4)<br>Omeprazol  |   |
| 2D6       | Bufuralol<br>Dextrometorfano  | Metoprolol<br>Debrisoquina Codeína (todos sin problemas, pero menos comúnmente usados)  |
| 2E1       | Clorzoxazona  | 4-Nitrofenol<br>Ácido Láurico   |
| 3A4       | Midazolam<br>Testosterona (muy recomendada para usar al menos dos sustratos estructuralmente no relacionados) | Nifedipina<br>Felodipina<br>Ciclosporina<br>Terfenadina<br>Eritromicina<br>Simvastatina   |

10  
15  
20  
25 Además, 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida muestra efectos útiles en el tratamiento de trastornos que surgen como resultado de un trasplante, por ejemplo trasplante alogénico, especialmente rechazo de tejidos, tales como especialmente bronquiolitis obliterante (OB), es decir, un rechazo crónico de trasplantes pulmonares alogénicos. En contraste con los pacientes sin OB, aquellos con OB a menudo muestran una concentración de PDGF elevada en fluidos de lavado broncoalveolares. Si se administra 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida a ratas con trasplantes alogénicos traqueales (por ejemplo en una dosis de 50 mg/kg i.p., puede observarse después de la retirada de 10 trasplantes por grupo después de 10 y 30 días para el análisis morfológico de posibles lesiones epiteliales y oclusión de las vías respiratorias, y la investigación para las rutas inmunohistoquímicas de acción que, aunque 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida no tiene un efecto significativo sobre la necrosis epitelial o la infiltración por células inflamatorias, sí reduce notablemente la fibroproliferación y la oclusión de la luz en comparación con los controles. Son posibles efectos sinérgicos con otras sustancias inmunomoduladoras o antiinflamatorias, por ejemplo cuando se usan en combinación con ciclosporina A (CsA), rapamicina o ascomicina, o análogos inmunosupresores de las mismas, por ejemplo ciclosporina G, FK-506 o compuestos comparables; corticosteroides; ciclofosfamida; azatioprina; metotrexato; brequinar; leflunomida; mizoribina; ácido micofenólico; micofenolato de mofetilo; 15-desoxiespergualina; anticuerpos inmunosupresores, especialmente anticuerpos monoclonales para receptores de leucocitos, por



ejemplo, MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD25, CD28, B7, CD45, CD58 o sus ligandos; u otros compuestos inmunomoduladores, tales como CTLA4lg. Si CsA (1 mg/kg s.c.), por ejemplo, se combina con 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida (50 mg/kg), puede observarse sinergia.

5 4-[(4-Metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida también es eficaz en enfermedades asociadas con la migración y la proliferación de células del músculo liso vascular (donde el PDGF y el receptor de PDGF también representan un papel a menudo), tales como reestenosis y aterosclerosis. Estos efectos y las consecuencias de los mismos para la proliferación o la migración de células del músculo liso vascular in vitro e in vivo pueden demostrarse mediante la administración de 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida y también investigando su efecto sobre el engrosamiento de la capa íntima vascular después de lesión mecánica in vivo.

15 4-[(4-Metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida se usa en HCl 0,1 N o DMSO a una concentración de 10 mM para estudios in vitro. La solución de reserva se diluye adicionalmente con medio de cultivo celular y se usa en concentraciones de 10 a 0,1 µM para los experimentos. Para la administración in vivo, la 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida se disuelve, por ejemplo, en DMSO a una concentración de 200 mg/ml y a continuación se diluye 1:20 con Tween al 1% en solución salina al 0,9%. Después de la sonicación, se obtiene una solución transparente. Las soluciones de reserva se pre-paran recientemente cada día antes de la administración. (La 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida también puede disolverse simplemente en agua desionizada para la administración oral o en solución salina al 0,9% para la administración parenteral). La administración se lleva a cabo 24 horas antes de la operación. La 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida se administra a ratas en una dosis de 50 mg/kg i.p. al día durante todo el período de observación. A las ratas de control se les da la misma formulación pero sin la presencia de 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida. También es posible la administración oral.

30 Cultivos primarios de células de músculo liso de aorta se aíslan de aorta de rata DA (AG-B4, RT1a) de 9 a 11 días de edad usando una modificación del método descrito por Thyberg y otros (véase Differentiation 25, 156-67 (1983)). La aorta se abre por medio de una incisión longitudinal y el endotelio se retira cuidadosamente. La capa adventicia y la túnica media se separan y la túnica media se digiere con colagenasa al 0,1% y DNAsa en solución salina fisiológica tamponada con fosfato durante 30 min a 37°C. Las células se centrifugan, se suspenden en medio de cultivo y a continuación se dejan crecer sobre viales de plástico. Las células primarias se usan para los experimentos después de las pasadas 2 a 6. Se mantienen subcultivos en DMEM (Medio de Eagle Modificado de Dulbecco), complementado con suero de ternero fetal al 10%, 2 mmol/ml de glutamina, 100 mmol/ml de estreptomocina y 100 UI/ml de penicilina. Con propósitos de identificación, las células se dejan crecer sobre cubreobjetos de vidrio y se tiñen inmunohistoquímicamente usando un anticuerpo anti-actina α obtenido de células del músculo liso (véase posteriormente).

40 La migración de células del músculo liso se cuantifica in vitro usando un dispositivo de inserción de cultivo celular Transwell (Costar, Cambridge, MA) cuyos compartimentos superior e inferior están separados por una membrana de policarbonato de un tamaño de poro de 8 µm. Las células (100 µl a una concentración de 1 millón de células/ml) se exponen en el compartimento superior. Después de 2 horas, se añaden 60 ng/ml de PDGF-BB o PDGF-AA (Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY) al compartimento inferior, se complementa con suero de ternero fetal al 0,5% y albúmina de suero bovino al 0,1% y se añade 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida en concentraciones de 3, 1, 0,3, 0,1, 0,03, 0,01 y 0,003 µM. Para medir la migración dependiente de fibronectina, las cámaras Transwell se cubren con fibronectina a una concentración de 10 µg/ml durante 24 h a 4°C (fibronectina celular humana, Upstate Biotechnology Inc.). Después de una migración de 24 horas, los filtros se retiran, se fijan en metanol y se tiñen con hematoxilina y eosina de Mayer. Las células migradas en la cara inferior de la membrana del filtro se determinan contando los campos de sección especificados sobre los filtros con la ayuda de un microscopio óptico con 400 aumentos. La inhibición de la migración se cuantifica en términos del porcentaje de células frente al control. Para excluir la posibilidad de un efecto tóxico, la viabilidad de las células se prueba mediante la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en DMEM, complementado con suero de ternero fetal al 10%. Se observa una inhibición de la migración inducida por PDGF-AA y especialmente por PDGF-BB con 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida.

55 Animales experimentales: la arteria aorta y carótida de ratas Wistar macho (adquiridas de the Laboratory Animal Centre of the University of Helsinki, Finlandia) se desnudan. Las ratas se anestesian con 240 mg/kg de hidrato de cloral i.p. y se administra buprenorfina (Temgesic, Reckitt & Coleman, Hull, Reino Unido) para el alivio del dolor perioperatorio y posoperatorio. A todos los animales se les da cuidado humano de acuerdo con the "Principles of Laboratory Animal Care" y the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" de the NIH (NIH Publication 86-23, revisado 1985). Se usaron ratas que pesaban 200-300 g para el procedimiento de denudación. La arteria carótida común izquierda se desnuda de endotelio a través del paso intraluminal de un catéter de embolectomía 2F (Baxter Healthcare Corporation, Santa Ana, CA, 27). Para retirar el endotelio, el catéter se hace pasar a través de la

luz tres veces, inflado con 0,2 ml de aire. La carótida externa se liga después de la retirada del catéter y la herida se cierra. Los cambios histológicos se evalúan mediante referencia a secciones de carótida media 4 días después de la denudación. La aorta torácica se denuda de endotelio usando un catéter de embolectomía arterial de Fogarty 2F. El catéter se inserta en la aorta torácica a través de la arteria ilíaca izquierda, se infla con 0,2 ml de aire y se hace pasar a través de la luz cinco veces para retirar el endotelio. La arteria ilíaca se liga a continuación. Se seleccionan tres tiempos (3, 7 y 14 días) para la evaluación de los cambios histológicos.

Para cuantificar las células que proliferan, se usan tres procedimientos diferentes para etiquetar las células con bromodesoxiuridina (BrdU) después de la denudación de la carótida de la rata. En este modelo, la proliferación de células de la capa media empieza 24 h después de la denudación; las células en la capa íntima aparecen en primer lugar después de 72-96 horas. Para cuantificar la proliferación de células del músculo liso antes de la aparición de las células de la capa íntima, se administran 0,1 ml de reactivo de etiquetaje de BrdU (ZYMED, San Francisco, CA) i.v. durante el período posoperatorio de 0 a 72 h después de la denudación (en total 0,1 ml 6 veces). Para cuantificar la proliferación durante la ola inicial de migración, se les da a las ratas 3 x 0,1 ml de reactivo de etiquetaje de BrdU a intervalos de 8 horas durante un período de 72-96 horas después de la operación. Para cuantificar la proliferación al final de la ola inicial de migración, a un tercer grupo de ratas se les da una dosis pulsátil de 0,3 ml de BrdU tres horas antes del sacrificio.

Las muestras histológicas se fijan en solución de paraformaldehído al 3% durante 4 h para embeber en parafina. Los cambios morfológicos se evalúan a partir de secciones parafinicas teñidas con hematoxilina-eosina de Mayer. Los conteos de células de diferentes secciones del vaso se calculan con 400 aumentos. Para identificar células en cultivo y células que aparecen en la capa neoíntima a menos de cuatro días después de la lesión de denudación, se lleva a cabo dilución inmunohistoquímica de muestras fijadas con acetona usando un anticuerpo anti-actina  $\alpha$  obtenido de células del músculo liso (Bio-Makor, Rehovot, Israel). Células primarias del músculo liso se identifican sobre cubreobjetos de vidrio fijados con acetona usando el mismo método de tinción. Las secciones se incuban con el anticuerpo primario (dilución 1:2000), se lavan y se incuban consecutivamente con anti-(Ig de ratón) de conejo y anti-(Ig de conejo) de cabra conjugados a peroxidasa, seguido por tratamiento con solución de sustrato con el cromógeno 3-amino-9-etilcarbazol y peróxido de hidrógeno. Las tinciones de BrdU se preparan a partir de secciones parafinicas usando un anticuerpo primario de ratón (Bu20a, Dako, A/S, Dinamarca) y el estuche Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Las secciones se desparafinan y se tratan mediante microondas a 500 W (2 x 5 min en tampón de citrato 0,1 M, pH 6), seguido por tratamiento con formamida al 95% en citrato trisódico 0,15 M durante 45 min a 70°C. Se preparan diluciones de anticuerpo de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las secciones se tiñen por contraste con hematoxilina y eosina de Mayer y las células positivas se cuentan separadamente para la capa íntima, la capa media y la capa adventicia.

En la carótida de los animales tratados, se encuentra una disminución significativa en el conteo de células para células del músculo liso. La capa adventicia y la capa media mostraban una reducción significativa en el conteo de células. Como resultado de 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida, una ligera disminución en el número absoluto de células etiquetadas con BrdU se observa en la capa íntima, la capa media y la capa adventicia durante los dos primeros períodos de etiquetaje (0-72 y 72-96 h) y después de 93-96 h se observa una disminución en el número de células etiquetadas en todos los compartimentos. Asimismo, se encuentran disminuciones en el número de células del músculo liso en los animales denudados de la aorta.

De acuerdo con estos hallazgos, 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida puede inhibir así la proliferación, y especialmente la migración, de células del músculo liso vascular.

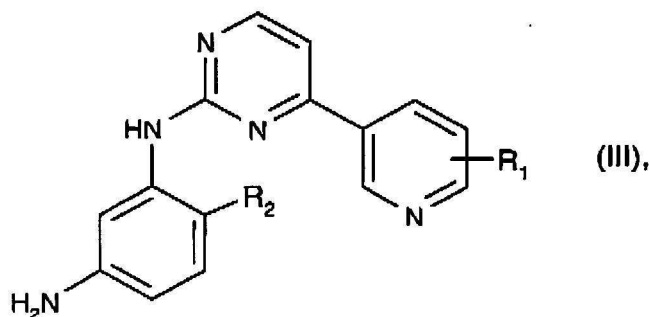
4-[(4-Metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida también es capaz de inhibir la angiogénesis. Esto puede demostrarse como sigue: una cámara que contiene agar (0,8%) y heparina (2 U/ml) con o sin factor de crecimiento (VEGF 3  $\mu$ g/ml, PDGF 1  $\mu$ g/ml o bFGF 0,3  $\mu$ g/ml) se implanta subcutáneamente en ratones normales (C57 BL/6). 4-[(4-Metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida se administra oralmente en una dosis que muestra buena actividad antitumoral en un modelo de xenotrasplante en ratones desnudos. La dosificación se inicia un día antes de la implantación de las cámaras. Las cámaras se retiran después de 5 días. La eficacia angiogénica se cuantifica midiendo tanto el tejido vascularizado que se ha desarrollado alrededor del implante como el contenido de sangre de este tejido (sangre externa). La sangre se determina midiendo la hemoglobina. Aunque los vasos no se desarrollan en el agar, el agar se vuelve intensamente rojo si está presente un efecto antiangiogénico. Si un compuesto inhibe el incremento en la sangre que es inducido por el factor de crecimiento, esto se observa como una indicación de que el compuesto en cuestión está bloqueando el efecto angiogénico del factor de crecimiento en cuestión. La inhibición del peso pero no del volumen de sangre sugiere un efecto sobre la proliferación de fibroblastos. Una supresión de la respuesta de control sugiere una inhibición de la curación de heridas. A una dosis oral de 50 mg/kg una vez al día, 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida inhibe el efecto angiogénico de los tres factores de crecimiento (VEGF, PDGF, bFGF).

De forma interesante, se encontró que la 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-hidroximetil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida, la 4-[(4-metil-4-óxido-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida y la 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida representan metabolitos de N-[4-metil-3-(4-piridin-3-ilpirimidin-2-ilamino)-fenil]-4-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-benzamida (STI571 o imatinib, en lo sucesivo en la presente memoria compuesto A) que puede encontrarse en el cuerpo humano al administrar compuesto A. El compuesto A se describe en EP 0 564 509 B1 y, en forma de la sal de metanosulfonato, en WO 99/03854.

Además de los metabolitos mencionados anteriormente, metabolitos del compuesto A adicionales se identificaron en monos, tales como 4-[(4-metilcarbonil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida, 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-carboxi-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida, 4-carboxi-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida, 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida, en la que el resto piridinilo está sustituido en un átomo de carbono del anillo por hidroxilo, y 4-[(1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida, en la que el resto piridinilo está sustituido en un átomo de carbono del anillo por hidroxilo.

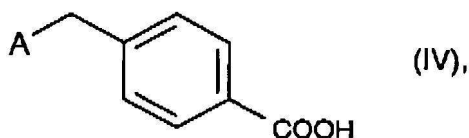
4-[(4-Metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida o las sales de la misma se preparan de acuerdo con procedimientos conocidos de por sí, aunque no se describen previamente para la fabricación de 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida, especialmente en donde

a) un compuesto de fórmula III



20

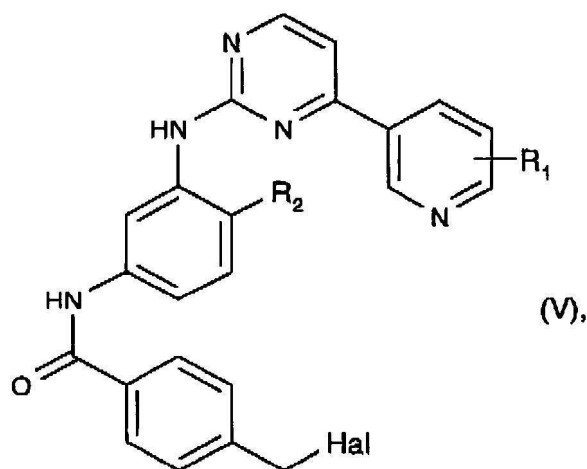
en la que R<sub>1</sub> es H y R<sub>2</sub> es metilo, se hace reaccionar con un compuesto de fórmula IV



en la que A es 4-metil-1-piperazinilo

25 y el compuesto así obtenido se convierte en un N-óxido con un agente oxidante adecuado; o

b) un compuesto de fórmula V



en la que  $R_1$  es hidrógeno y  $R_2$  es metilo, Hal es halo (por ejemplo, -Cl, -Br, -F, -I) se hace reaccionar con un compuesto de fórmula VI

AH (VI),

5 en la que A es metil-1-piperazinilo,

y un compuesto así obtenido se convierte opcionalmente en un N-óxido con un agente oxidante adecuado;

en donde los grupos funcionales que están presentes como los compuestos de partida del procedimiento a) o b) y no están destinados a tomar parte en la reacción están presentes en forma protegida si es necesario, y los grupos protectores que están presentes se escinden, en donde dichos compuestos de partida también pueden existir en forma de sales con tal de que esté presente un grupo formador de sal y sea posible una reacción en forma de sal;

10 y, si así se desea, 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida obtenida mediante el procedimiento a) o b) se convierte en una sal, una sal obtenida de 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida se convierte en el compuesto libre o en otra sal, y/o una mezcla de 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida isómera se separa en los isómeros individuales.

15 En la modalidad más preferida, 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida está en una forma sustancialmente pura.

20 Se entiende que el término "sustancialmente pura" en el contexto de la presente invención significa sustancialmente libre de material biológico tal como el encontrado en la sangre, especialmente menos de 10%, preferiblemente menos de 1% y lo más preferiblemente libre de tal material biológico.

#### Descripción de las variantes del procedimiento

25 Un agente oxidante adecuado para convertir un compuesto obtenido mediante el procedimiento a) o b) en un N-óxido es preferiblemente peróxido de hidrógeno o un perácido adecuado, por ejemplo un ácido perbenzoico adecuado, tal como, especialmente, ácido m-cloroperbenzoico. La reacción se lleva a cabo en un disolvente inerte, por ejemplo un hidrocarburo halogenado, tal como diclorometano, a temperaturas de aproximadamente -20°C hasta el punto de ebullición del disolvente en cuestión, en general por debajo de +100°C. Si se usa peróxido de hidrógeno como el agente oxidante, la reacción se lleva a cabo preferiblemente en agua aproximadamente a temperatura ambiente. El N-óxido deseado puede purificarse a continuación usando métodos convencionales tales como, por ejemplo, cromatografía en columna o recristalización.

30 Por una parte, 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida puede prepararse de acuerdo con el procedimiento descrito en el párrafo precedente oxidando los materiales de partida usados en la síntesis de 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida.

En cuanto al procedimiento a):

La reacción entre un compuesto de fórmula III y un compuesto de fórmula IV tiene lugar preferiblemente en un disolvente inerte adecuado, especialmente *N,N*-dimetilformamida, en presencia de anhídrido propilfosfónico (Fluka, Buchs, Suiza) y una base tal como, especialmente, trietilamina, preferiblemente a temperatura ambiente.

5 En cuanto al procedimiento b):

La reacción entre un compuesto de fórmula V y un compuesto de fórmula IV tiene lugar preferiblemente en un disolvente inerte adecuado, especialmente alcoholes, por ejemplo alcoholes inferiores tales como, especialmente, etanol, a temperatura elevada, preferiblemente cerca del punto de ebullición del disolvente empleado.

Halo presente en un compuesto de fórmula V es, por ejemplo, fluoro, cloro, bromo y yodo, preferiblemente cloro.

#### 10 Etapas de procedimiento adicionales

En las etapas de procedimiento adicionales, llevadas a cabo según se desee, grupos funcionales de los compuestos de partida que no deben tomar parte en la reacción deben estar presentes en forma desprotegida o pueden estar protegidos, por ejemplo, por uno o más grupos protectores. A continuación, los grupos protectores se retiran totalmente o parcialmente de acuerdo con uno de los métodos conocidos.

15 Los grupos protectores, y el modo en el que se introducen y se retiran, se describen, por ejemplo, en "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, Londres, Nueva York 1973, y en "Methoden der organischen Chemie", Houben-Weyl, 4ª edición, Vol. 15/1, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart 1974 y en Theodora W. Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, Nueva York 1981. Una característica de los grupos protectores es que se pueden retirar fácilmente, es decir sin la presencia de reacciones secundarias no deseadas, por ejemplo  
20 mediante solvolisis, reducción, fotólisis o, alternativamente, bajo condiciones fisiológicas.

#### Condiciones generales del procedimiento

Todas las etapas del procedimiento descritas en la presente pueden llevarse a cabo bajo condiciones de reacción conocidas, preferiblemente bajo las mencionadas específicamente, en ausencia de o habitualmente en presencia de  
25 disolventes o diluyentes, preferiblemente los que son inertes para los reactivos usados y capaces de disolverlos, en ausencia o presencia de catalizadores, agentes de condensación o agentes neutralizantes, por ejemplo intercambiadores iónicos, típicamente intercambiadores catiónicos, por ejemplo en la forma protonada (H<sup>+</sup>), dependiendo del tipo de reacción y/o los reaccionantes, a temperatura reducida, normal o elevada, por ejemplo en el intervalo de -100°C hasta aproximadamente 190°C, preferiblemente de aproximadamente -80°C a aproximadamente 150°C, por ejemplo a de -80 a -60°C, a TA, a de -20 a 40°C, a de 0 a 100°C o en el punto de ebullición del disolvente  
30 usado, bajo presión atmosférica o en un recipiente cerrado, si se necesita bajo presión, y/o en una atmósfera inerte, por ejemplo de argón o nitrógeno.

La invención se refiere además a aquellas modalidades del procedimiento en las que se parte de un compuesto obtenible en cualquier fase como un producto intermedio y se llevan a cabo las etapas restantes, o se rompe el  
35 procedimiento en cualquier fase, o se forma un material de partida bajo las condiciones de reacción, o se usa dicho material de partida en la forma de un derivado reactivo o una sal, o se produce un compuesto obtenible por medio del procedimiento de acuerdo con la invención bajo esas condiciones de procesamiento, y además se procesa dicho compuesto in situ. En la modalidad preferida, se parte de los materiales de partida que conducen a los compuestos descritos anteriormente en la presente memoria como preferidos.

40 En la modalidad preferida, se prepara 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida de acuerdo con los procedimientos y las etapas de procesamiento definidos en los Ejemplos.

4-[(4-Metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida y sus sales también pueden obtenerse en forma de hidratos, o sus cristales pueden incluir, por ejemplo, el disolvente usado para la cristalización (presente como solvatos).

#### 45 Materiales de partida

Los nuevos materiales de partida y/o productos intermedios, así como procedimientos para la preparación de los mismos, son asimismo la materia de esta invención. En la modalidad preferida, se usan tales materiales de partida y las condiciones de reacción se seleccionan así a fin de permitir que se obtengan los compuestos preferidos.

Los materiales de partida usados en el procedimiento descrito anteriormente son conocidos, pueden prepararse de acuerdo con procedimientos conocidos (véase también EP 0 564 409 B1) o pueden obtenerse comercialmente; en particular, pueden prepararse usando procedimientos como los descritos en los Ejemplos.

5 En la preparación de los materiales de partida, los grupos funcionales existentes que no participan en la reacción, si es necesario, deben protegerse. Grupos protectores preferidos, su introducción y su retirada se describen anteriormente o en los Ejemplos. En lugar de los materiales de partida y las sustancias transitorias respectivas, también pueden usarse sales de los mismos para la reacción, con tal de que estén presentes grupos formadores de sales y la reacción con una sal también sea posible. Cuando se usa el término materiales de partida anteriormente y posteriormente en la presente memoria, siempre se incluyen las sales de los mismos, con tal de que sea razonable y posible.

10 Un compuesto de fórmula III en la que R<sub>2</sub> es metilo y el átomo de nitrógeno marcado con una estrella no tiene un átomo de oxígeno como un sustituyente puede prepararse como se describe en EP 0 564 109 B1. Tales compuestos pueden convertirse a continuación en los N-óxidos correspondientes usando un agente oxidante adecuado según se describe anteriormente bajo "Descripción de las variantes del procedimiento".

15 Los materiales de partida restantes son conocidos, pueden prepararse de acuerdo con procedimientos conocidos como los descritos en, por ejemplo, EP 0 564 409 B1, o están disponibles comercialmente; o, en particular, pueden prepararse usando procedimientos como los descritos en los Ejemplos. Derivados de N-fenil-2-pirimidina adecuados para formar los N-óxidos correspondientes también se describen en, por ejemplo, EP 0 564 409 B1.

20 Así, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida o una sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un trastorno proliferativo.

Lo más preferiblemente, el trastorno proliferativo se selecciona de tumores o trastornos proliferativos del cerebro.

25 En otra modalidad más, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones de la presente invención pueden contener al menos un compuesto farmacéuticamente activo tal como 4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il)pirimidin-2-ilamino]fenil]-benzamida.

30 Preferiblemente, una composición farmacéutica para el tratamiento de un trastorno proliferativo en animales de sangre caliente, incluyendo seres humanos, comprende como un ingrediente activo 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida o una sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

35 Así, la invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden como un ingrediente activo 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida junto con un portador farmacéuticamente aceptable, especialmente para la prevención o el tratamiento de una de dichas enfermedades, siendo adecuadas dichas composiciones farmacéuticas para, por ejemplo, la administración tópica, enteral, por ejemplo oral o rectal, o parenteral. Especialmente, las tabletas o las cápsulas de gelatina que contienen la sustancia activa junto con diluyentes, por ejemplo lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa y/o glicerina, y/o lubricantes, por ejemplo sílice, talco, ácido esteárico o sales del mismo, típicamente estearato magnésico o cálcico, y/o polietilenglicol, se usan para la administración oral. Las tabletas pueden asimismo contener aglutinantes, por ejemplo silicato de magnesio y aluminio, almidones, típicamente almidón de maíz, trigo o arroz, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona y, si así se desea, desintegrantes, por ejemplo almidones, agar, ácido algínico o una de sus sales, típicamente alginato sódico, y/o mezclas efervescentes, o adsorbentes, agentes colorantes, saboreantes y agentes edulcorantes. Los compuestos farmacológicamente activos de la presente invención pueden además usarse en forma de preparaciones para administración parenteral o soluciones de infusión. Tales soluciones son preferiblemente soluciones o suspensiones acuosas isotónicas, preparándose posiblemente estas antes del uso, por ejemplo en el caso de preparaciones liofilizadas que contienen la sustancia activa bien sola o bien junto con un portador, por ejemplo manitol. Las sustancias farmacéuticas pueden esterilizarse y/o pueden contener excipientes, por ejemplo conservantes, estabilizantes, agentes humectantes y/o emulsionantes, solubilizantes, sales para la regulación de la presión osmótica y/o tampones. Las presentes composiciones farmacéuticas que, si así se desea, pueden contener sustancias farmacológicamente activas adicionales, tales como otros inhibidores de c-Kit o inhibidores de receptor de VEGF o de la actividad de c-Src, se preparan de una manera conocida de por sí, por ejemplo por medio de procedimientos de mezclado, granulación, revestimiento, disolución o liofilización convencionales, y contienen de aproximadamente 1% a aproximadamente 100%, especialmente de aproximadamente 1% a aproximadamente 20%, de la sustancia o sustancias activas.

**Ejemplos:**

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención pero no limitan el alcance de la misma de ningún modo.

Abreviaturas:

DMF N,N-Dimetilformamida

5 h hora u horas

min minuto o minutos

p.f. punto de fusión

TA temperatura ambiente

THF tetrahidrofurano

10 **Ejemplo de Referencia 1: 4-[(4-Metil-4-óxido-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida**

Se añade ácido 3-cloroperoxibenzoico (Fluka, Buchs, Suiza; 2,06 g de 55%, 4,27 mmol) a una mezcla agitada de 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida (preparada como se describe en EP 0 564 409 B1, Ejemplo 21; 2,00 g, 4,05 mmol) en diclorometano (70 ml) a -20°C. La mezcla resultante se agita a continuación a TA durante 72 h. El disolvente se separa a continuación por evaporación bajo presión reducida para dar una mezcla que se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyente diclorometano-metanol-agua (70:30:5), para dar el compuesto del título como un sólido cristalino amarillo, p.f. 154-158°C.

20 **Ejemplo 2: 4-[(4-Metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida**

Se añade N-metilpiperazina (99 mg, 1,0 mmol) a una suspensión agitada de 4-clorometil-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida (220 mg, 0,49 mmol) en etanol (5 ml). A continuación la mezcla se agita a 100°C durante 15 h para dar una solución, que a continuación se enfría hasta TA y se trata con acetato de etilo (200 ml). La solución resultante se lava con hidróxido sódico acuoso (100 ml de 2M) y solución acuosa saturada de cloruro sódico (100 ml), se seca (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtra y el disolvente se separa por evaporación bajo presión reducida para dar el producto bruto que se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyente amoníaco-metanol-diclorometano (0,5:10:90) acuosos al 25% para dar el compuesto del título como un sólido cristalino amarillo, p. f. 232-235°C.

Etapa 2.1: N-[4-Metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida

30 Utilizar el procedimiento descrito en el Ejemplo de Referencia 1, pero empleando N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida (preparada como se describe en EP 0 564 409 B1, Ejemplo 20) en lugar de 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida, proporcionaba el compuesto del título que se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyente metanol al 10% en diclorometano, y se recristalizaba en etanol para dar el compuesto del título como un sólido cristalino amarillo claro, p. f. 258 - 260°C.

Etapa 2.2: 4-Metil-N-3-[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-1,3-bencenodiamina

40 Se añade ácido clorhídrico (9 ml de 4M) a una suspensión de N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida (0,43 g, 1,08 mmol) en n-propanol (9 ml) y la mezcla resultante se calienta a 100°C durante 34 h. La mezcla enfriada se evapora bajo presión reducida para dar un aceite, que se disuelve en agua (10 ml), se filtra y se basifica con hidróxido sódico acuoso (4 M). El precipitado resultante se filtra, se lava con agua y se seca para dar el producto bruto, que se recristaliza en etanol para dar el compuesto del título como un sólido cristalino amarillo, p. f. 104-106°C.

Etapa 2.3: 4-Clorometil-N-(4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil)-benzamida

45 Una solución de cloruro de 4-(clorometil)-benzoílo (Fluka, Buchs, Suiza; 184 mg, 0,977 mmol) en dioxano (2 ml) se añade gota a gota a una solución de 4-metil-N-3-[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-1,3-bencenodiamina (275 mg,

- 5 0,937 mmol) en dioxano (5 ml) y la mezcla se agita a 20°C durante 75 min. A continuación, se añade una segunda porción de cloruro de 4-(clorometil)-benzoilo (60 mg, 0,317 mmol) disuelto en dioxano (1 ml) y la mezcla se agita durante 120 min más. La suspensión resultante se trata con acetato de etilo (50 ml) para dar una solución que se lava con hidróxido sódico acuoso (2 x 50 ml de 2M). La solución de acetato de etilo se seca (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtra y el disolvente se evapora bajo presión reducida para dar el producto bruto que se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyente metanol al 5% en diclorometano para dar el compuesto del título como un sólido cristalino amarillo, p. f. 224-226°C.

### Ejemplo 3

- 10 Tabletas que contienen 100 mg de 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida se preparan habitualmente en la siguiente composición:

#### Composición:

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Ingrediente activo  | 100 mg |
| Lactosa cristalina  | 240 mg |
| Avicel              | 80 mg  |
| PVPPXL              | 20 mg  |
| Aerosil             | 2 mg   |
| Estearato magnésico | 5 mg   |
|                     | 447 mg |

Preparación: La sustancia activa se mezcla con materiales portadores y se comprime en una máquina de formación de tabletas (Korsch EKO, diámetro de troquel 10 mm). Avicel es celulosa microcristalina (FMC, Filadelfia, EE.UU. de A.). PVPPXL es polivinilpirrolidona, reticulada (BASF, Alemania). Aerosil es dióxido de silicio (Degussa, Alemania).

### 15 Ejemplo 4:

Cápsulas que contienen 100 mg de 4-[(4-metil-1-piperazinil)-metil]-N-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida se preparan habitualmente en la siguiente composición:

#### Composición:

|                     |          |
|---------------------|----------|
| Ingrediente activo  | 100 mg   |
| Avicel              | 200 mg   |
| PVPPXL              | 15 mg    |
| Aerosil             | 2 mg     |
| Estearato magnésico | 1,5 mg   |
|                     | 318,5 mg |

- 20 Preparación: Las cápsulas se preparan mezclando los componentes y cargando la mezcla en cápsulas de gelatina dura, tamaño 1.



**REIVINDICACIONES**

1. 4-[(4-Metil-1-piperazinil)-metil]-*N*-[4-metil-3-[[4-(1-óxido-3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-fenil]-benzamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
  2. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.
- 5