

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 202**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4745 (2006.01)

A61K 31/4985 (2006.01)

A61K 31/513 (2006.01)

A61K 31/5517 (2006.01)

A61K 31/555 (2006.01)

A61K 31/704 (2006.01)

A61K 31/7068 (2006.01)

A61K 31/724 (2006.01)

A61K 33/24 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2008 E 08771559 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2015 EP 2173348**

54 Título: **Potenciación de quimioterapia contra el cáncer**

30 Prioridad:

02.07.2007 US 947512 P

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

25.02.2016

73 Titular/es:

**ELI LILLY & COMPANY (100.0%)
LILLY CORPORATE CENTER
INDIANAPOLIS, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**ABURUB, AKTHAM;
CHEDID, MARCIO;
ENGLER, THOMAS ALBERT y
VASUDEVAN, VENKATRAGHAVAN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 561 202 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

Potenciación de quimioterapia contra el cáncer

Antecedentes de la invención

5 La eficacia de cualquier quimioterapia contra el cáncer está limitada por la sensibilidad de cánceres específicos a un tratamiento particular. Incluso cuando un cáncer es sensible a una quimioterapia particular, los efectos tóxicos, agudos y crónicos, asociados con la quimioterapia frecuentemente obligan a una reducción de la dosis o una interrupción del tratamiento en su conjunto. Un enfoque para el tratamiento de cánceres no sensibles o para superar la toxicidad limitante de dosis, es combinar agentes que actúan a través de diferentes mecanismos de acción. Aunque se han descubierto algunas combinaciones de quimioterapia ventajosas, la identificación de combinaciones de agentes que demuestran eficacia mejorada en un cáncer particular o que son mejor tolerados por el paciente, permanece esencialmente empírica.

15 La glicógeno sintasa cinasa 3 β (GSK3 β) es una serina/reonina cinasa implicada en varias redes de transducción de señal que son conocidas por regular una diversidad de funciones celulares. El papel de GSK3 β en el tratamiento del cáncer no está claro. Se ha informado de que la rapamicina, por ejemplo, potencia dramáticamente los efectos de paclitaxel, vinorelbina y carboplatino, pero no los efectos de doxorubicina o gemcitabina, en células de cáncer de mama por la activación de GSK3 β . Esta potenciación es inhibida por los inhibidores de GSK3 β bien conocidos cloruro de litio, SB216763, y SB415286. (Dong, et al., Cancer Research, 65(5), 1961-1972 (2005)). En contraste, se ha demostrado que cloruro de litio y SB216763, inhibidores de GSK3 β , potencian dramáticamente la eficacia anti-tumoral de ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis de tumor (TRAIL) en células de cáncer de próstata tanto p53 positivas como p53 negativas a concentraciones sub-tóxicas (Liao, et al., Molecular Cancer Therapeutics, 2, 1215-1222 (2003)). De manera similar, se ha mostrado que el cloruro de litio sensibiliza células de tumor al factor de necrosis de tumor (TNF) en células de rhabdomyosarcoma humano y células de fibrosarcoma murino, pero los inhibidores de GSK3 β Ro31-8220, ácido valpróico e indirubin-3'-monoxima, fracasaron al potenciar el mismo efecto (Schoette, et al., The Journal of Biological Chemistry, 276(28), 25939-25945 (2001)). Finalmente, se ha informado de que los inhibidores de GSK3 β cloruro de litio y LY2119301 potencian los efectos de adriamicina, etopósido y 5-fluorouracilo en células de cáncer de colon p53 positivas, pero ni SB216763 ni SB415286 potencian los efectos de ningún agente ensayado, y todos los inhibidores de GSK3 β ensayados fallaron al demostrar la potenciación deseada en líneas de células de colon p53 negativas (Tan, et al., Cancer Research, 65(19), 9012-9020 (2005)).

30 Existe una necesidad de combinaciones específicas de agentes que exhiban eficacia mejorada en el tratamiento de un paciente con cáncer con un cáncer particular, o que permitan a un paciente con cáncer tolerar mejor la quimioterapia. El inhibidor de GSK3 β 7-(2,5-dihidro-4-imidazo[1,2-a]piridin-3-il-2,5-dioxo-1H-pirrol-3-il)-9-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-2-(1-piperidinil-carbonil)-pirrolo[3,2,1-jk][1,4]benzodiazepina, potencia los efectos de ciertos agentes quimioterapéuticos en cánceres particulares.

Breve resumen de la invención

35 La invención proporciona 7-(2,5- dihidro-4-imidazo[1,2-a]-piridin-3-il-2,5-dioxo-1H-pirrol-3- il)-9-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-2-(1-piperidinilcarbonil)-pirrolo[3,2,1-jk][1,4]benzodiazepina o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en combinación con un agente quimioterapéutico seleccionado de entre el grupo que consiste en CPT-11, pemetrexed, gemcitabina, etopósido, doxorubicina y agentes quimioterapéuticos de platino para el tratamiento de cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas o cáncer colorrectal.

40 La invención proporciona también 7-(2,5- dihidro-4-imidazo[1,2-a]-piridin-3-il-2,5-dioxo-1H-pirrol-3- il)-9-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-2-(1-piperidinilcarbonil)-pirrolo[3,2,1-jk][1,4]benzodiazepina o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en combinación con un agente quimioterapéutico seleccionado de entre el grupo que consiste en 5-fluorouracilo y agentes quimioterapéuticos de platino para el tratamiento de cáncer gástrico.

Descripción detallada de la invención

45 La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Los temas que no están incluidos en el alcance de las reivindicaciones no forman parte de la presente invención.

50 El compuesto CPT-11 es conocido también como irinotecan y se comercializa bajo el nombre comercial CAMPTOSAR®. CPT-11 es un fármaco de quimioterapia usado para tratar pacientes con cáncer avanzado del intestino grueso y colon. Se administra periódicamente por inyección de bolo o infusión a una dosis de 120-180 mg/m² durante ciclos de tratamiento de seis semanas. Típicamente, CPT-11 es administrado en combinación con 5-fluorouracilo (5-FU) y leucovorina (LV).

El compuesto pemetrexed se comercializa bajo el nombre comercial ALIMTA®. Pemetrexed es un fármaco de quimioterapia usado para tratar pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas metastásico o localmente

5 avanzado después de una quimioterapia previa. El pemetrexed en combinación con cisplatino está indicado para el tratamiento de pacientes con mesotelioma pleural maligno cuya enfermedad no es operable o pacientes que por otra parte no son candidatos para cirugía curativa. Típicamente, se administran 500 mg/m² de pemetrexed a un paciente mediante infusión durante 10 minutos cada 21 días después de un pre-tratamiento con ácido fólico, vitamina B₁₂ y dexametasona.

Se considera que la expresión "agente quimioterapéutico de platino" significa un agente quimioterapéutico contra el cáncer que contiene platino. Los agentes quimioterapéuticos de platino específicos, contemplados por la presente invención incluyen cisplatino, carboplatino y oxaliplatino. El uso de cisplatino o carboplatino es preferente.

10 El compuesto cisplatino se comercializa bajo el nombre comercial PLATINOL®-AQ. El cisplatino es administrado para tratar pacientes con tumores de ovario metastásicos que ya han recibido procedimientos quirúrgicos y/o radioterapéuticos apropiados. Como un agente único, el cisplatino es administrado típicamente a una dosis de 100 mg/m² IV por ciclo, una vez cada cuatro semanas. El cisplatino puede ser administrado también en combinación con CYTOXAN®.

15 El compuesto carboplatino se comercializa bajo el nombre comercial PARAPLATIN®. El carboplatino es administrado para tratar pacientes con carcinoma de ovario. Como un agente único, el carboplatino es administrado típicamente a una dosis de 360 mg/m² IV por ciclo, una vez cada cuatro semanas. El carboplatino puede ser administrado también con ciclofosfamida.

20 El compuesto oxaliplatino se comercializa bajo el nombre comercial ELOXATIN®. El oxaliplatino es administrado para tratar pacientes con cáncer colorrectal. Es administrado típicamente a una dosis de 85 mg/m² IV por ciclo, una vez cada dos semanas en combinación con 5-FU y LV.

25 El compuesto doxorubicina se comercializa bajo los nombres comerciales ADRIAMYCIN® y RUBEX®. La doxorubicina ha sido usada exitosamente para producir regresión en condiciones neoplásicas diseminadas, tales como leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloblástica aguda, tumor de Wilms, neuroblastoma, sarcomas de tejido blando y óseo, carcinoma de mama, carcinoma de ovario, carcinoma de vejiga de células transicionales, carcinoma de tiroides, carcinoma gástrico, enfermedad de Hodgkin, linfoma maligno y carcinoma broncogénico. Es administrado típicamente a una dosis de 60-75 mg/m² IV a intervalos de 21 días.

El compuesto etopósido se comercializa bajo los nombres comerciales ETOPOPHOS®, TOPOSAR® y VEPESID®. El etopósido es administrado para tratar pacientes con cáncer testicular o de pulmón. Es administrado típicamente mediante inyección a una dosis desde 5-100 mg/m².

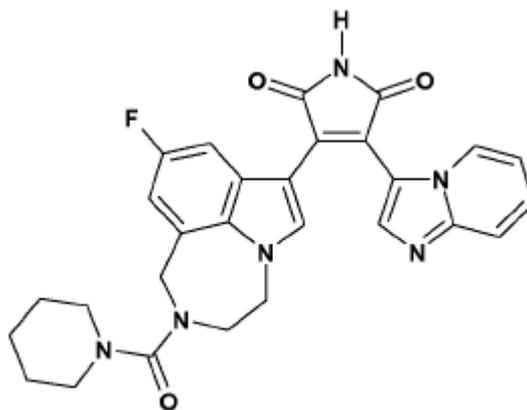
30 El compuesto 5-fluorouracilo (5-FU) se comercializa bajo el nombre comercial ADRUCIL®. Se administra para tratar pacientes con carcinoma de colon, recto, mama, estómago y páncreas. El 5-FU es administrado típicamente IV a una dosis de 12 mg/kg una vez al día durante cuatro días sucesivos.

35 La gemcitabina se comercializa bajo el nombre comercial GEMZAR®. Es usada más comúnmente para tratar cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer pancreático, cáncer de vejiga y cáncer de mama. Es administrado típicamente mediante infusión IV a una dosis de 1.000 mg/m² durante 30 minutos a la semana durante 3 semanas consecutivas de cada 4 semanas.

40 El experto en la técnica apreciará que la dosificación exacta y el número de ciclos de tratamiento de cualquiera de los agentes descritos anteriormente, requeridos para tratar un paciente, son determinados por un médico en vista de la etapa y la severidad de la enfermedad, así como las necesidades y las respuestas específicas de un paciente individual.

45 En el documento WO 03/076442 se enseña que el compuesto 7-(2,5-dihidro-4-imidazo[1,2-a]piridin-3-il-2,5-dioxo-1H-pirrol-3-il)-9-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-2-(1-piperidinil-carbonil)-pirrolo[3,2,1-jk][1,4]benzodiazepina es un inhibidor de GSK-3β, documento en el que se denomina 3-(9-fluoro-6-(piperidin-1-il)carbonil)-6,7-dihidro-6H-[1,4]diazepin-[6,7,1-hi]indol-1-il)-4-(imidazo[1,2-a]piridin-3-il)-2,5-dioxopirrol (Ejemplo 365, página 113). Las dos convenciones de nomenclatura descritas anteriormente se consideran como sinónimas y se considera que cada una identifica la estructura siguiente:

50



Compuesto I

El compuesto I es una base y, por consiguiente, puede reaccionar con cualquiera de entre una serie de ácidos inorgánicos y orgánicos para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables preferentes, son aquellas formadas con HCl, HBr, ácido sulfúrico o ácido metansulfónico.

El Compuesto I forma solvatos, por ejemplo, con agua, metanol y etanol. Un solvato preferente es el formado con etanol.

Aunque el Compuesto I carece de actividad antitumoral útil por sí mismo, cuando se administra en combinación con CPT-11, pemetrexed, gemcitabina, etopósido, doxorubicina o agentes quimioterapéuticos de platino, se consigue un beneficio terapéutico significativo en el tratamiento de cáncer de ovario, de pulmón de células no pequeñas o colorrectal con relación al tratamiento con CPT-11, pemetrexed, gemcitabina, etopósido, doxorubicina o agentes quimioterapéuticos de platino solos. Un beneficio de esta combinación es que el efecto terapéutico de CPT-11, pemetrexed, gemcitabina, etopósido, doxorubicina y agentes quimioterapéuticos de platino es potenciado por la co-administración con el Compuesto I. Es decir, una dosis de CPT-11, pemetrexed, gemcitabina, etopósido, doxorubicina o agentes quimioterapéuticos de platino más baja que la administrada típicamente proporcionará un efecto terapéutico similar al paciente. Además, el paciente notará un efecto terapéutico mayor de CPT-11, pemetrexed, gemcitabina, etopósido, doxorubicina o agentes quimioterapéuticos de platino a la dosis típica cuando estos agentes sean co-administrados con el Compuesto I. La presente invención proporciona la ventaja adicional de la conveniencia para el paciente y el médico, permitiendo la administración del Compuesto I en la misma planificación de tratamiento que CPT-11, pemetrexed, gemcitabina, etopósido, doxorubicina o agentes quimioterapéuticos de platino.

El paciente es un mamífero y el mamífero preferente es un ser humano.

Aunque todas las combinaciones descritas del Compuesto I o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo y agentes quimioterapéuticos son útiles, ciertas combinaciones son preferentes. Una combinación preferente es la co-administración de 7-(2,5-dihidro-4-imidazo[1,2-a]piridin-3-il-2,5-dioxo-1H-pirrol-3-il)-9-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-2-(1-piperidinil-carbonil)-pirrolo[3,2,1-jk][1,4]benzodiazepina o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, con un agente quimioterapéutico de platino. Otra realización es la co-administración de 7-(2,5-dihidro-4-imidazo[1,2-a]piridin-3-il-2,5-dioxo-1H-pirrol-3-il)-9-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-2-(1-piperidinil-carbonil)-pirrolo[3,2,1-jk][1,4]benzodiazepina o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo con cisplatino o carboplatino. Una realización adicional de la invención es la administración de 7-(2,5-dihidro-4-imidazo[1,2-a]piridin-3-il-2,5-dioxo-1H-pirrol-3-il)-9-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-2-(1-piperidinil-carbonil)-pirrolo[3,2,1-jk][1,4]benzodiazepina o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, con pemetrexed y un agente quimioterapéutico de platino. Es preferente que 7-(2,5-dihidro-4-imidazo[1,2-a]piridin-3-il-2,5-dioxo-1H-pirrol-3-il)-9-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-2-(1-piperidinil-carbonil)-pirrolo[3,2,1-jk][1,4]benzodiazepina o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo sea administrada con pemetrexed y carboplatino.

Se considera que la frase "una cantidad efectiva de un agente quimioterapéutico" significa la dosificación del agente quimioterapéutico particular necesario para destruir las células cancerígenas objetivo o reducir o detener el progreso del cáncer en un paciente cuando el agente quimioterapéutico es administrado en combinación con el Compuesto I o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

Se considera que la frase "una cantidad efectiva de 7-(2,5-dihidro-4-imidazo[1,2-a]piridin-3-il-2,5-dioxo-1H-pirrol-3-il)-9-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-2-(1-piperidinil-carbonil)-pirrolo[3,2,1-jk][1,4]benzodiazepina o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo" significa la dosificación del Compuesto I o una sal o solvato

farmacéuticamente aceptable del mismo necesaria para potenciar el efecto de una dosis específica de un agente quimioterapéutico particular para destruir las células de cáncer objetivo o ralentizar o detener el progreso del cáncer en un paciente. Las dosificaciones anticipadas del Compuesto I o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo están comprendidas en el intervalo de 5 a 600 mg/paciente/día. Las dosificaciones preferentes están comprendidas en el intervalo de 50 a 400 mg/paciente/día. Las dosificaciones más preferentes están comprendidas en el intervalo de 100 a 400 mg/paciente/día. La dosificación exacta requerida para tratar un paciente será determinada por un médico en vista de la etapa y la severidad de la enfermedad, así como las necesidades y la respuesta específicas del paciente individual.

Se considera que la frase "para potenciar el efecto de una dosis específica de un agente quimioterapéutico particular" significa una dosis de un agente quimioterapéutico inferior a la administrada típicamente será una dosis efectiva, o que el paciente nota un efecto terapéutico mayor del agente quimioterapéutico a la dosis típica cuando es co-administrado con el Compuesto I o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

Los términos "co-administrados" y "co-administración", así como las frases "en combinación con" y "administrado en combinación con", tal como se usan en la presente memoria, significan que el Compuesto I o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo es proporcionado al paciente durante el mismo ciclo de tratamiento que CPT-11, pemetrexed o un agente quimioterapéutico de platino. Es decir, el Compuesto I o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo pueden ser administrados antes de, durante o después de la administración de CPT-11, pemetrexed o un agente quimioterapéutico de platino a la discreción del médico, teniendo en cuenta el tipo de tumor, la etapa de la enfermedad, el agente quimioterapéutico específico empleado y la condición y severidad del paciente.

Los siguientes estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran las ventajas de estas combinaciones.

Ejemplos de eficacia *in vitro*

La apoptosis o muerte celular programada está caracterizada por un conjunto de reacciones bioquímicas, una de las cuales es la inducción de caspasas. Las caspasas activadas son proteasas que participan en una cascada de eventos de escisión que deshabilitan las enzimas clave responsables de la homeostasis y la reparación celular. Las caspasas 3 y 7 desempeñan papeles efectores clave en la apoptosis y pueden ser detectadas y medidas mediante un ensayo bioquímico fluorescente. El incremento de la actividad de Caspasa-3/7 en las células está correlacionado directamente con la actividad apoptótica. (D. W. Nicholson, et al., Nature, 376, 37-43 (1995)). Se usó el kit de ensayo de Caspasa-3/7 homólogo Promega Apo-ONE (Nº catálogo G7791). El tampón de ensayo consistía en HEPES 30 mM (N-(2-hidroxi-etil)piperazin-N'-(2-ácido etansulfónico) pH 7,4, NaCl 150 mM, KCL 50 mM, MgCl₂ 10 mM, EGTA 0,4 mM (ácido etilen glicol tetraacético), 0,5% de Nonidet P40 (octilfenolpoli(éter de etilenglicol)), 0,1 % de CHAPS (hidrato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propansulfonato y 10% de sacarosa, que lisa/permeabiliza las células cultivadas y un sustrato de caspasa 3/7, Z-DEVD (Z-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)), acoplado a una rodamina profluorescente 110. Cuando la mezcla tampón-sustrato se añade a una muestra de ensayo, la escisión y la retirada subsiguiente de los péptidos DEVD por la actividad de caspasa 3/7 resulta en una intensa fluorescencia del grupo saliente de rodamina 110, que es detectada mediante excitación a 499 nm. La cantidad de producto fluorescente es proporcional a la cantidad de actividad de escisión de caspasa 3/7 en la muestra.

Para medir el efecto apoptótico de los compuestos de ensayo, las células tumorales se colocan en placas a 1×10^4 células por pocillo en placas de 96 pocillos y se incuban durante la noche a 37°C, con 5% de CO₂. Las células tumorales se tratan con el compuesto de ensayo a concentraciones deseadas por triplicado, incluyendo pocillos de control no tratados/negativos. Las placas de ensayo se incuban de nuevo durante 48 horas. Al final del período de incubación, se añade una mezcla del tampón de ensayo y sustrato a cada pocillo de muestra. Se mide la fluorescencia en cada pocillo a una longitud de onda de excitación de 485 +/- 20 nm y una longitud de onda de emisión de 530 +/- 25 nm. El % de incremento de la actividad de caspasa en las células tratadas se calcula con relación a los controles no tratados.

HCT-116 y colo-205 son carcinomas colorrectales, A2780 y SKOV3 son carcinomas de ovario, A549, Calu-6 y NCI H-460 son carcinomas de pulmón de células no pequeñas, y AGS, KATO III y MKN 45 son carcinomas gástricos. En las tablas siguientes, el término "Compuesto I" o "Cmpd I" significa 7-(2,5-dihidro-4-imidazo[1,2-a]piridin-3-il-2,5-dioxo-1H-pirrol-3-il)-9-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-2-(1-piperidinil-carbonil)-pirrolo[3,2,1-jk][1,4]benzodiazepina.

Los agentes quimioterapéuticos se ensayaron a las concentraciones siguientes:

Línea celular	Cisplatino	Carboplatino	CPT-11	Pemetrexed
HCT-116	5 µM	-	20 nM	60 nM
Colo-205	5 µM	-	20 nM	-
A2780	5 µM	-	20 nM	60 nM
A549	1 µM	10 µM	-	-
NCI-H460	1 µM	10 µM	-	-
Calu-6	-	-	-	60 nM

Los datos en las Tablas 1-12 se expresan como % de incremento de la actividad de caspasa con relación a los controles no tratados, a menos que se indique lo contrario.

5

Tabla 1: Cisplatino en combinación con el Compuesto I

Línea celular	Medio de cultivo	Compuesto I*	cisplatino	Compuesto I* + cisplatino	Veces de incremento sobre cisplatino
HCT-116	0	16	36	180	5
Colo-205	0	12	8	85	10,6
A2780	0	0	1,5	93	62
A549	0	80	4	183	46
NCI-H460	0	99	47	379	8

*Concentración del Compuesto I variada por línea celular: HCT-116 (300 nM); Colo-205 (110 nM); A2780 (60 nM); A549 (300 nM); NCI-H460 (300 nM).

Tabla 2: Carboplatino en combinación con el Compuesto I

Línea celular	Medio de cultivo	Compuesto I*	carboplatino	Compuesto I* + carboplatino	Veces de incremento sobre carboplatino
A549	0	52	14	282	20,1
NCI-H460	0	122	16	299	18,7

*Concentración de Compuesto I variada por la línea celular: A549 (300 nM); NCI-H460 (100 nM).

Tabla 3: CPT-11 en combinación con el Compuesto I

Línea celular	Medio de cultivo	Compuesto I*	CPT-11	Compuesto I* + CPT-11	Veces de incremento sobre CPT-11
HCT-116	4	53	50	263	5,3
Colo-205	0	45	38	254	6,7

10

(Cont.)

A2780	1	1	153	450	2,9
*Concentración de Compuesto I variada por la línea celular: HCT-116 (330 nM); Colo-205 (33 nM); A2780 (330 nM).					

Tabla 4: Pemetrexed en combinación con el Compuesto I

Línea celular	Medio de cultivo	Compuesto I*	Pemetrexed	Compuesto I* + Pemetrexed	Veces de incremento sobre Pemetrexed
HCT-116	0	0	23	125	5,4
Calu-6	0	139	24	319	13,3
A2780	0	10	0	35	-**
*La concentración del Compuesto I era de 30 nM para todas las líneas celulares.					
**No puede calcularse ni medirse el efecto de pemetrexed solo.					

5

Tabla 5: HCT-116

Fármaco	Conc. Comp I	Conc. Fárm	Comp. I	Fármaco	Compuesto I + Fármaco	Veces de incremento sobre Fármaco
5-FU	12 nM	5 µM	47	55	305	5,5
Gemcitabina	60 nM	30 nM	0	324	595	1,8

Tabla 6: A2780

Fármaco	Conc. Comp I	Conc. Fárm	Comp. I	Fármaco	Compuesto I + Fármaco	Veces de incremento sobre Fármaco
Carboplatino*	300 nM	5 µM	55	78	237	3
*Placas incubadas durante 72 horas						

Tabla 7: SKOV3

Fármaco	Conc. Comp I	Conc. Fárm	Comp. I	Fármaco	Compuesto I + Fármaco	Veces de incremento sobre Fármaco
Doxorubicina	300 nM	1 µM	0	184	270	1,5

10

Tabla 8: Calu 6

Fármaco	Conc. Comp I	Conc. Fárm	Comp. I	Fármaco	Compuesto I + Fármaco	Veces de incremento sobre Fármaco
Cisplatino	33 nM	2 µM	154	97	471	4,8

Tabla 9: NCI-H460

Fármaco	Conc. Comp I	Conc. Fárm	Comp. I	Fármaco	Compuesto I + Fármaco	Veces de incremento sobre Fármaco
Pemetrexed	300 nM	500 nM	38	872	872	4,7
Gemcitabina	300 nM	50 nM	186	1187	1996	1,7
Etopósido	300 nM	1 µM	222	251	935	3,7

5

Tabla 10: AGS

Fármaco	Conc. Comp I	Conc. Fárm	Comp. I	Fármaco	Compuesto I + Fármaco	Veces de incremento sobre Fármaco
Cisplatino*	900 nM	5 µM	0	147	208	1,4
5-FU	900 nM	3 µM	0	133	235	1,7

*Placas incubadas durante 72 horas

Tabla 11: KATO III

Fármaco	Conc. Comp I	Conc. Fárm	Comp. I	Fármaco	Compuesto I + Fármaco	Veces de incremento sobre Fármaco
Cisplatino	600 nM	10 µM	48	389	631	1,6

Tabla 12: MKN 45

Fármaco	Conc. Comp I	Conc. Fárm	Comp. I	Fármaco	Compuesto I + Fármaco	Veces de incremento sobre Fármaco
Cisplatino	600 nM	10 µM	162	359	868	2,4
5-FU*	300 nM	5 µM	105	415	777	1,9

*Placas incubadas durante 72 horas

10

Los datos de veces de incremento en las Tablas 1-12 reflejan la potenciación de la apoptosis mediada por fármaco quimioterapéutico en células mediante la co-administración del Compuesto I con relación al efecto apoptótico del fármaco quimioterapéutico solo.

Experimentos de eficacia *in vivo*

5 Las células cultivadas se implantaron subcutáneamente en el flanco trasero de ratones hembra de cepa nu/nu CD-1, que habían sido aclimatados durante una semana en una instalación para animales después de la recepción desde el vendedor. Los ratones son aleatorizados en grupos de 7 u 8 ratones por grupo y el tratamiento comenzó cuando el volumen medio del tumor alcanzó ~ 10 mm³. El compuesto I se dosificó IV y el agente quimioterapéutico se proporcionó IP. Cuando los agentes se proporcionan en combinación, el agente quimioterapéutico es dosificado 60 minutos antes del Compuesto I. Los tumores se miden 2 veces por semana mediante calibradores electrónicos para trazar curvas de crecimiento. El retardo del crecimiento del tumor es el incremento en tiempo medio que necesita un tumor para alcanzar 1.000 mm³ en volumen cuando se compara con un grupo de control. Los animales son supervisados también para determinar fluctuaciones en peso corporal y supervivencia.

Tabla 13: Cisplatino en combinación con el Compuesto I en xenoinjertos de carcinoma de ovario humano A2780

Se dosifican IP 5 mg/kg de cisplatino solo y en combinación con 5 mg/kg del Compuesto I (inyectado IV). El compuesto I a 5 mg/kg (inyectado IV), es dosificado también solo como un grupo de control. Los animales recibieron 3 ciclos consecutivos de cisplatino y Compuesto I, cada ciclo separado por 7 días		
Grupo de tratamiento	Retardo crecimiento tumor medio ± error estándar (Días)	Valor p**
Vehículo captisol	0 ± 1,2	-
Vehículo salino	0,5 ± 1,4	-
Compuesto I (5 mg/kg)	-0,3 ± 1,4	-
Cisplatino (5 mg/kg)	5 ± 1,6	-
Compuesto I + cisplatino*	23,0 ± 3,9	<0,001
*5 mg/kg de cada uno de entre cisplatino y Compuesto I		
**Efecto de la combinación con relación a cisplatino solo.		

Tabla 14: Cisplatino en combinación con el Compuesto I en xenoinjertos de carcinoma colorrectal humano HCT-116

Se dosifican IP 10 mg/kg de cisplatino solo y en combinación con 5 mg/kg del Compuesto I (inyectado IV). El compuesto I a 5 mg/kg (inyectado IV) es dosificado también solo como un grupo de control. Los animales recibieron 3 ciclos consecutivos de cisplatino y LY2090314, cada ciclo separado por 7 días.		
Grupo de tratamiento	Retardo crecimiento tumor medio ± error estándar (Días)	Valor p**
Vehículo captisol	0 ± 5,9	-
Vehículo salino	3,8 ± 4,5	-
Compuesto I (5 mg/kg)	2 ± 2,2	-
Cisplatino (10 mg/kg)	23 ± 10,3	-
Compuesto I + cisplatino*	40,7 ± 8,3	<0,01
*5 mg/kg de Compuesto I y 10 mg/kg de cisplatino		
**Efecto de combinación con relación a cisplatino solo		

Tabla 15: Cisplatino en combinación con el Compuesto I en xenoinjertos de carcinoma colorrectal humano Colo-205

Se dosifican IP 5 mg/kg de cisplatino solo y en combinación con 5 mg/kg del Compuesto I (inyectado IV). El compuesto I a 5 mg/kg (inyectado IV) es dosificado también solo como un grupo de control. Los animales recibieron 3 ciclos consecutivos de cisplatino y Compuesto I, cada ciclo separado por 7 días.		
Grupo de tratamiento	Retardo crecimiento tumor medio \pm error estándar (Días)	Valor p**
Vehículo captisol	0 \pm 1,4	-
Vehículo salino	4,8 \pm 2,1	-
Compuesto I (5 mg/kg)	10,9 \pm 2,2	-
Cisplatino (5 mg/kg)	18 \pm 3,5	-
Compuesto I + cisplatino*	31,5 \pm 18,6	<0,001
*5 mg/kg de cada uno de entre cisplatino y Compuesto I		
**Efecto de combinación con relación a cisplatino solo		

Tabla 16: Carboplatino en combinación con el Compuesto I en xenoinjertos de cáncer de pulmón de células no pequeñas humanas NCI-H460

El compuesto I es dosificado IV a 5 mg/kg solo y con 50 mg/kg de carboplatino IP. La dosificación es cada 14 días x 3 ciclos. Para los grupos de tratamiento que reciben tanto Compuesto I como carboplatino, el carboplatino es administrado 60 minutos antes del Compuesto I.		
Grupo de tratamiento	Retardo crecimiento tumor medio \pm error estándar (Días)	Valor p**
Vehículo captisol	2,4 \pm 0	-
Vehículo salino	2,9 \pm 2,7	-
Compuesto I (5 mg/kg)	3 \pm 1,4	-
Carboplatino (50 mg/kg)	2 \pm 2,9	-
Compuesto I + carboplatino*	8,6 \pm 13,5	<0,01
*50 mg/kg de carboplatino y 5 mg/kg de Compuesto I		
**Efecto de combinación con relación a carboplatino solo		

5

Tabla 17: Carboplatino y Pemetrexed en combinación con el Compuesto I en injertos heterólogos de cáncer de pulmón de células no pequeñas humanas NCI-H460

El compuesto I es dosificado IV a 5 mg/kg solo, con 10 mg/kg de carboplatino IP, con 300 mg/kg de pemetrexed IP, y con 10 mg/kg de carboplatino IP y 300 mg/kg de pemetrexed IP. La dosificación es cada 14 días durante 3 ciclos. Para los grupos de tratamiento que recibieron tanto el Compuesto I como carboplatino, el carboplatino se administró 60 minutos antes del Compuesto I. Para los grupos de tratamiento que recibieron tanto el compuesto I como pemetrexed, el pemetrexed se administró 24 horas antes de la administración del compuesto I. Para los grupos de tratamiento que recibieron el Compuesto I, carboplatino y pemetrexed, se administró pemetrexed 24 horas antes del Compuesto I y se administró carboplatino 60 minutos antes del Compuesto I.		
Grupo de tratamiento	Retardo crecimiento tumor medio \pm error estándar (Días)	Valor p**

(Cont.)

Vehículo captisol	0 ± 3,4	-
Vehículo salino	2,7 ± 3,8	-
Compuesto I (5 mg/kg)	1,4 ± 3,8	-
Pemetrexed (3000 mg/kg) + Carboplatino (10 mg/kg)	2,8 ± 2,8	-
Pemetrexed (300 mg/kg) + Compuesto I (5 mg /kg)	3,1 ± 3,3	-
Pemetrexed (300 mg/kg) + Carboplatino (10 mg/kg) + Compuesto I (5 mg/kg)	10,5 ± 3,8	<0,01
* Efecto de pemetrexed, carboplatino y Compuesto I con relación a carboplatino + pemetrexed		

5 Los datos en las Tablas 13 - 17 demuestran que la potenciación del retardo del crecimiento de tumor inducido por fármaco quimioterapéutico por el Compuesto I es estadísticamente significativa con relación al retardo del crecimiento del tumor causado por los fármacos quimioterapéuticos solos.

Preparación 1

2-imidazo[1,2-a]piridin-3-il-acetamida

Éster etílico de ácido 4,4-dimetoxi-but-2-enóico

10 Se añadió carbonato de potasio (16,5 g, 120 mmol) a una solución de dimetoxi acetaldehído (60% en peso en agua) (15 ml, 100 mmol) y trietil fosfonoacetato (20 ml, 100 mmol) en 210 ml tetrahidrofurano y 30 ml agua. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se vertió en éter dietílico (200 ml) y se lavó con cloruro de sodio acuoso saturado. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró bajo presión reducida para proporcionar el compuesto deseado como un aceite amarillo (15,8 g, 90%). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 6,77 (dd, J = 15,9, 4,0 Hz, 1H), 6,13 (dd, J = 15,9, 1,4 Hz, 1H), 4,95 (dd, J = 4,0, 1,4 Hz, 1H), 4,22 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 3,34 (s, 6H), 1,30 (t, J = 7,1 Hz, 3H).

15

Éster etílico de ácido imidazo[1,2-α]piridin-3-il-acético

20 Se calentó una mezcla de éster etílico de ácido 4,4-dimetoxi-but-2-enóico (43,5 g, 250 mmol) y ácido p-toluensulfónico (4,75 g, 25 mmol) en acetonitrilo (240 ml) y agua (15 ml) a reflujo durante 2 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadió 2-aminopiridina (18,8 g, 200 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 16 horas, a continuación, se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (1.200 ml) y se lavó secuencialmente con bicarbonato de sodio acuoso saturado (600 ml x3) y cloruro de sodio acuoso saturado (600 ml x2). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró bajo presión reducida para proporcionar el compuesto deseado como un aceite marrón (30 g, 73%). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8,06 (d, J = 6,6 Hz, 1H), 7,63 (d, J = 9,1 Hz, 1H), 7,56 (s, 1H), 7,20 (dd, J = 8,9, 6,8 Hz, 1H), 6,84 (t, j = 6,7 Hz, 1H), 4,17 (q, J = 7,3 Hz, 2H), 3,93 (s, 2H), 1,25 (t, J = 7,3 Hz, 3H).

25

Formación de Amida

30 Se calentó una solución de éster etílico de ácido imidazo[1,2-α]piridin-3-il-acético (30 g, 147 mmol) en NH₃/MeOH (solución 7 N, 250 ml) a 85°C en un tubo sellado durante 15 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se concentró bajo presión reducida. El residuo se trató con diclorometano, se sonicó y el precipitado resultante se filtró para proporcionar el compuesto deseado como un sólido amarillo (8,9 g, 35%).

30

¹H-RNM (300 MHz, DMSO): δ 8,30 (d, J = 6,9 Hz, 1H), 7,62 (br s, 1H), 7,54 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 7,42 (s, 1H), 7,21 (dd, J = 7,7, 6,7 Hz, 1H), 7,18 (br s, 1H), 6,91 (t, J = 6,8 Hz, 1H), 3,81 (s, 2H).

Preparación 2

Éster tert-butílico de ácido 9-fluoro-7-metoxioxalil-3,4-dihidro-1H-[1,4]diazepino[6,7,1-hi]indol-2-carboxílico

35 2-dibutoximetil-4-fluoro-1-nitro-benceno

5 Se calentó una solución de 5-fluoro-2-nitro-benzaldehído (10 g, 59,17 mmol), butanol (20 ml, 219 mmol) y ácido 2-toluensulfónico (600 mg, 3,15 mmol) en tolueno (200 ml) a reflujo durante 2 horas en un matraz equipado con una trampa Dean-Stark. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con acetato de etilo (400 ml) y se lavó secuencialmente con bicarbonato de sodio acuoso saturado (300 ml x3) y cloruro de sodio acuoso saturado (300 ml x2). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró bajo presión reducida para proporcionar el compuesto deseado como un aceite amarillo pálido (17 g, 96%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7,91 (dd, J = 8,9, 4,9 Hz, 1H), 7,53 (dd, J = 9,3, 2,9 Hz, 1H), 7,15-7,09 (m, 1H), 6,04 (s, 1H), 3,67-3,50 (m, 4H), 1,63-1,54 (m, 4H), 1,44-1,32 (m, 4H), 0,92 (t, J = 7,3 Hz, 6H).

5-fluoro-1H-indol-7-carbaldehído

10 Se añadió bromuro de vinilmagnesio (1 M en tetrahidrofurano, 85,2 ml, 85,2 mmol), gota a gota, a una solución de 2-dibutoximetil-4-fluoro-1-nitro-benceno (8,5 g, 28,4 mmol) en tetrahidrofurano (250 ml) a -78°C . Se calentó la mezcla de reacción -45°C a -50°C durante 30 minutos, se enfrió a -78°C y se añadió bromuro de vinilmagnesio (1 M en tetrahidrofurano, 85,2 ml, 85,2 mmol) gota a gota. Se calentó la mezcla de reacción a entre -45°C y -50°C durante 20 minutos, a continuación se añadió cloruro de amonio acuoso saturado (300 ml). La mezcla se calentó a temperatura ambiente y se extrajo con éter dietílico (200 ml x2). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con cloruro de sodio acuoso saturado (400 ml x2), se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se secó en tetrahidrofurano (100 ml), se añadió 0,5 N HCl (10 ml) y se agitó durante 20 minutos. Se diluyó la mezcla con éter dietílico (200 ml), se lavó secuencialmente con bicarbonato de sodio acuoso saturado (200 ml x3) y cloruro de sodio acuoso saturado (200 ml x2). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró bajo presión reducida. El residuo se sometió a cromatografía en gel de sílice, eluyendo con 5% a 10% acetato de etilo en hexanos para proporcionar el compuesto deseado como un sólido amarillo pálido (2,6 g, 56%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 10,07 (s, 1H), 10,05 (br s, 1H), 7,62 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,42-7,39 (m, 2H), 6,60 (d, J = 5,4 Hz, 1H).

2-[(5-fluoro-1H-indol-7-ilmetil)-aminol-etanol]

25 Se añadió 2-aminoetanol (1,93 ml, 32,0 mmol) seguido por ácido acético (2,01 ml, 48,0 mmol) a una solución de 5-fluoro-1H-indol-7-carbaldehído (2,6 g, 16,0 mmol) en 1,2-dicloroetano (10 ml). Se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (4,07 g, 19,2 mmol) en porciones. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 3 horas. Se añadió bicarbonato de sodio acuoso saturado (100 ml) lentamente seguido por 1 N NaOH a pH ~9. Se extrajo con acetato de etilo (100 ml x3). Se lavó la fase orgánica con cloruro de sodio acuoso saturado (200 ml x2), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró bajo presión reducida para proporcionar el compuesto deseado como un sólido amarillo pálido (3,2 g, 96%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 9,71 (br s, 1H), 7,24 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 7,19 (dd, J = 9,5, 2,3 Hz, 1H), 6,79 (dd, J = 9,8, 2,2 Hz, 1H), 6,49 (dd, J = 3,1, 2,2 Hz, 1H), 4,15 (s, 2H), 3,77 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 2,84 (t, J = 5,2 Hz, 2H).

Éster ter-butílico de ácido (5-fluoro-1H-indol-7-ilmetil)-(2-hidroxi-etil)-carbámico

35 Se añadió una solución de dicarbonato di-ter-butilo (3,63 g, 16,65 mmol) en tetrahidrofurano (40 ml), gota a gota, a una solución de 2-[(5-fluoro-1H-indol-7-ilmetil)-amino]-etanol (3,15 g, 15,14 mmol) en tetrahidrofurano (60 ml) a 0°C . Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió acetato de etilo (200 ml) y se lavó con cloruro de sodio acuoso saturado. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró bajo presión reducida para proporcionar el compuesto deseado como un aceite amarillo pálido (4,9 g, >100%).

40 $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 10,17 (br s, 1H), 7,27-7,23 (m, 2H), 6,81 (dd, J = 9,4, 2,4 Hz, 1H), 6,50 (dd, J = 2,9, 2,2 Hz, 1H), 4,67 (s, 2H), 3,72 (br s, 2H), 3,33 (t, J = 5,3 Hz, 2H), 1,50 (s, 9H).

Éster 2-[tert-butoxicarbonil-(5-fluoro-1H-indol-7-ilmetil)-amino]-etilico de ácido metansulfónico

45 Se añadió trietilamina (4,64 ml, 33,3 mmol) seguido por cloruro de metansulfonilo (1,29 ml, 16,65 mmol) a una solución de éster ter-butílico de ácido (5-fluoro-1H-indol-7-ilmetil)-(2-hidroxi-etil)-carbámico (4,9 g, supuesto 15,14 mmol) en diclorometano (70 ml) a 0°C . Se agitó la mezcla de reacción durante 30 minutos a 0°C . Se diluyó con acetato de etilo (200 ml), se lavó secuencialmente con bicarbonato de sodio acuoso saturado (200 ml x3) y cloruro de sodio acuoso saturado (200 ml x2). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró bajo presión reducida para proporcionar el compuesto deseado como un aceite marrón amarillo (5,9 g, >100%).

50 $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 10,07 (br s, 1H), 7,28-7,2 (m, 2H), 6,83 (dd, J = 9,3, 2,3 Hz, 1H), 6,50 (dd, J = 2,9, 2,2 Hz, 1H), 4,67 (s, 2H), 4,17 (t, J = 5,5 Hz, 2H), 3,51 (t, J = 5,6 Hz, 2H), 2,79 (s, 3H), 1,51 (s, 9H).

Éster tert-butilico de ácido 9-fluoro-3,4-dihidro-1H-[1,4]diazepino[6,7,1-hi]indol-2-carboxílico

Se añadió hidruro de sodio (60%) (666 mg, 16,65 mmol) en una porción a una solución de éster 2-[fert-butoxicarbonil-(5-fluoro-1H-indol-7-ilmetil)-amino]-etilico de ácido metansulfónico (5,9 g, supuesto 15,14 mmol) en dimetilformamida (40 ml) a 0°C. Se agitó la mezcla de reacción a 0°C durante 10 minutos y, a continuación, a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió agua (200 ml) lentamente. Se filtró y se secó el precipitado amarillo resultante para proporcionar el compuesto deseado (4,14 g, 94%).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7,15 (d, J = 9,1 Hz, 1H), 7,07 (s, 1H), 6,78 (dd, J = 14,7, 8,8 Hz, 1H), 6,49 (d, J = 3,1 Hz, 1H), 4,81 (s, 1H), 4,76 (s, 1H), 4,25-4,23 (m, 2H), 3,94-3,83 (m, 2H), 1,49 (s, 9H).

Éster tert-butilico de ácido 9-fluoro-7-metoxioxalil-3,4- dihidro-1H-[1,4]diazepino[6,7,1-hi]indol-2-carboxílico

Se añadió cloruro de oxalilo (1,62 ml, 18,56 mmol) a una solución de éster tert-butilico de ácido 9-fluoro-3,4- dihidro-1H-[1,4]diazepino[6,7,1-hi]indol-2-carboxílico (4,14 g, 14,28 mmol) en metil ter-butyl éter (100 ml) a -5°C. Se calentó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1,5 horas y, a continuación, se enfrió a -5°C. Se añadió metanol (11,6 ml, 286 mmol) y se agitó a -5°C durante 30 minutos. Se añadió bicarbonato de sodio acuoso saturado (100 ml) y se extrajo con acetato de etilo (100 ml x3). Se lavó la fase orgánica combinada secuencialmente con bicarbonato de sodio acuoso saturado (200 ml x3) y cloruro de sodio acuoso saturado (200 ml x2). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio y, a continuación, se concentró bajo presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido amarillo (5,13 g, 93%).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8,38 (s, 1H), 8,04 (d, J = 6,8 Hz, 1H), 6,89 (dd, J = 19,7, 8,6 Hz, 1H), 4,90 (s, 1H), 4,81 (s, 1H), 4,45-4,43 (m, 2H), 4,05-3,93 (m, 2H), 3,95 (s, 3H), 1,42 (s, 9H),

Preparación 3

Diclorhidrato de 3-(9-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-(1,4)diazepino[6,7,1-hi]indol-7-il)-4-imidazo(1,2-α)-piridin-3-il-pirrol-2,5-diona

Se añadió ter-butóxido de potasio (4,58 g, 40,92 mmol) en una porción a una solución de éster ter-butilico de ácido 9-fluoro-7-metoxioxalil-3,4-dihidro-1H-[1,4]diazepino[6,7,1-hi]indol-2-carboxílico (5,13 g, 13,64 mmol) y 2-imidazo[1,2-α]piridin-3-il-acetamida (2,39 g, 13,64 mmol) en dimetilformamida (80 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante tres horas. Se añadió cloruro de amonio acuoso saturado (200 ml) y se extrajo con acetato de etilo (200 ml x3). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con cloruro de sodio acuoso saturado (200 ml x3), se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se secó en diclorometano (20 ml) y se añadió 4N HCl en dioxano (40 ml) gota a gota, a continuación se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El precipitado resultante se filtró y se lavó con éter dietílico para proporcionar el compuesto del título como un sólido rojo (4,4 g, 68%).

MS(APCI): m/z = 402 (C₂₂H₁₆FN₅O₂ + H)⁺.

Ejemplo 1

7-(2,5-dihidro-4-imidazo[1,2-α]piridin-3-il-2,5-dioxo-1H-pirrol-3-il)-9-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-2-(1-piperidinil-carbonil)-pirrolo[3,2,1-jk][1,4]benzodiazepina

Se añadió cloruro de piperidin-1-carbonilo (0,5 ml, 4,0 mmol) a una solución de 3-(9-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-1H-[1,4]diazepino[6,7,1-hi]indol-7-il)-4-imidazo[1,2-α]piridin-3-il-pirrol-2,5-diona (1,42 g, 3,0 mmol) y trietilamina (2,09 ml, 15,0 mmol) en metanol (80 ml). Se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió trietilamina (1,04 ml, 7,5 mmol) y cloruro de piperidina-1-carbonilo (0,5 ml, 4,0 mmol). Se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. Se añadió acetato de etilo (500 ml) y se lavó secuencialmente con bicarbonato de sodio acuoso saturado (300 ml x3) y cloruro de sodio acuoso saturado (200 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró bajo presión reducida. El residuo se sometió a cromatografía en gel de sílice, eluyendo con 0% a 3% metanol en acetato de etilo para proporcionar el compuesto del título como un sólido rojo (700 mg, 45%).

p.f. = 188-190°C.

MS(APCI): m/z = 513 (C₂₈H₂₅FN₆O₃ + H)⁺.

Ejemplo 2

Metansulfonato de 7-(2,5-dihidro-4-imidazo[1,2-α]piridin-3-il-2,5-dioxo-1H-pirrol-3-il)-9-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-2-(1-piperidinil-carbonil)-pirrolo[3,2,1-jk][1,4]benzodiazepina

Se calentó una suspensión de 7-(2,5-dihidro-4-imidazo[1,2-α]piridin-3-il-2,5-dioxo-1H-pirrol-3-il)-9-fluoro-1,2,3,4-

5 tetrahidro-2-(1-piperidinil-carbonil)-pirrolo[3,2,1-jk][1,4]benzodiazepina (500 mg, 0,976 mmol) en metanol (2,5 ml) a 64°C. Se añadió a solución de ácido metansulfónico (64 µl, 0,976 mmol) en metanol (1,0 ml) durante 5 minutos. La mezcla se agitó a 64°C durante 15 minutos y, a continuación, se añadió isopropanol (5,0 ml) durante 30 minutos. La suspensión resultante se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 1 hora y, a continuación, se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Se filtró la suspensión, se lavó con isopropanol y se secó bajo presión reducida a 42°C para proporcionar el compuesto del título como un sólido naranja (478 mg, 88,5% (ajustada al 9,9% volátiles en el material de partida y al 1,0% de volátiles en producto)).

p.f. = 282,3°C (DSC).

Ejemplo 3

10 Etanolato de 7-(2,5-dihidro-4-imidazo[1,2-a]piridin-3-il-2,5-dioxo-1H-pirrol-3-il)-9-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-2-(1-piperidinil-carbonil)-pirrolo[3,2,1-jk][1,4]benzodiazepina

15 Se calentó una suspensión de 7-(2,5-dihidro-4-imidazo[1,2-a]piridin-3-il-2,5-dioxo-1H-pirrol-3-il)-9-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-2-(1-piperidinil-carbonil)-pirrolo[3,2,1-jk][1,4]benzodiazepina (2,0 g, 3,9 mmol) en etanol (30 ml) a 70°C. Se añadió 5M HCl (0,73 ml) todo de una vez. La mezcla se agitó a 70°C durante 10 minutos y, a continuación, se añadió 1N NaOH (3,63 ml) durante 3 minutos. La mezcla se agitó a 70°C durante 2 horas. La suspensión resultante se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 1 hora y, a continuación, se agitó a temperatura ambiente durante 3,5 horas. Se filtró la suspensión, se lavó con etanol y se secó bajo presión reducida a 42°C para proporcionar el compuesto del título como un sólido naranja (1,84 g, 92% (ajustado al 7,5% de volátiles en el material de partida y al 7,7% de volátiles en el producto)).

20 p.f. = 179,4°C (DSC)

Picos Principales de rayos X en Polvo (Grados 2 Teta, Intensidad): 8,989°, 100%; 9,787°, 48,7%; 12,846°, 20,0%; y 7,444°, 17,5%.

Ejemplo 4

25 Hidrato I de 7-(2,5-dihidro-4-imidazo[1,2-a]piridin-3-il-2,5-dioxo-1H-pirrol-3-il)-9-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-2-(1-piperidinil-carbonil)-pirrolo[3,2,1-jk][1,4]benzodiazepina

30 Se calentó una suspensión de etanolato de 7-(2,5-dihidro-4-imidazo[1,2-a]piridin-3-il-2,5-dioxo-1H-pirrol-3-il)-9-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-2-(1-piperidinil-carbonil)-pirrolo[3,2,1-jk][1,4]benzodiazepina (198,5 mg) en agua (10 ml) a 80°C durante 2,75 horas. Se añadieron 3,11 ml de 1N HCl. Cuando la temperatura volvió a 80°C, se añadieron rápidamente 3,11 ml de 1N NaOH. Se permitió que la temperatura permaneciese a 80°C durante aproximadamente 15 minutos, a continuación, la suspensión se dejó enfriar a temperatura ambiente. El sólido se recogió usando filtración en vacío a través de papel Whatman #1 y se dejó secar holgadamente cubierto durante la noche. Picos principales de Rayos X en polvo (Grados 2 Teta, Intensidad): 12,089°, 100%; 10,485°, 83,6%; 13,227°, 56,0% y 7,660°, 8,0%.

Ejemplo 5

35 Hidrato II de 7-(2,5-dihidro-4-imidazo[1,2-a]piridin-3-il-2,5-dioxo-1H-pirrol-3-il)-9-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-2-(1-piperidinil-carbonil)-pirrolo[3,2,1-jk][1,4]benzodiazepina

40 Se calentó una suspensión de etanolato de 7-(2,5-dihidro-4-imidazo[1,2-a]piridin-3-il-2,5-dioxo-1H-pirrol-3-il)-9-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-2-(1-piperidinil-carbonil)-pirrolo[3,2,1-jk][1,4]benzodiazepina (200,6 mg) en agua (25 ml) a 75°C durante 0,5 horas. Se añadieron 0,72 ml de 1N HCl y se continuó el calentamiento durante 0,75 horas. Rápidamente se añadieron 0,72 ml of 1N NaOH. La suspensión se dejó enfriar a temperatura ambiente. El sólido se recogió usando filtración en vacío a través de papel Whatman #1, se enjuagó con 20 ml de agua desionizada y se dejó secar holgadamente cubierto durante 2 días.

Picos principales de rayos X en polvo (Grados 2 Teta, Intensidad): 6,878°, 100%; 5,732°, 58,7%; 11,550°, 82,8%; 18,426°, 20,7% y 10,856°, 44,2%.

Ejemplo 6

45 Dihidrato de 7-(2,5-dihidro-4-imidazo[1,2-a]piridin-3-il-2,5-dioxo-1H-pirrol-3-il)-9-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-2-(1-piperidinil-carbonil)-pirrolo[3,2,1-jk][1,4]benzodiazepina

50 Se calentó una suspensión de etanolato de 7-(2,5-dihidro-4-imidazo[1,2-a]piridin-3-il-2,5-dioxo-1H-pirrol-3-il)-9-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-2-(1-piperidinil-carbonil)-pirrolo[3,2,1-jk][1,4]benzodiazepina (200,8 mg) en agua (25 ml) a 75°C durante 0,67 horas. Se añadieron 0,72 ml de 1N HCl y el calentamiento se continuó durante 1,75 horas. Se añadió 0,1N NaOH en 1 ml incrementado cada 5 minutos hasta que se añadieron 7,2 ml. Después de la última adición, la

suspensión se dejó reposar a 75°C durante 0,67 horas y, a continuación, la suspensión se dejó enfriar a temperatura ambiente. El sólido se recogió usando filtración en vacío a través de papel Whatman #1, se enjuagó con 20 ml de agua desionizada y se dejó secar holgadamente cubierto durante 2 días. Picos principales de rayos X en polvo (Grados 2 Teta, Intensidad): 5,498°, 100%; 22,149°, 100%; 14,921°, 32,9%; 11,399°, 36,7% y 11,019°, 20,5%.

- 5 Preferentemente, el compuesto I se formula como una composición farmacéutica antes de la administración a un paciente. Las formulaciones útiles comprenden el Compuesto I o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo y SBE7-β-CD. El compuesto SBE7-β-CD es un éter de sulfobutilo de β-ciclodextrina descrito en la patente US Nº 5.134.127. Se comercializa bajo el nombre comercial CAPTISOL®. Se describen formulaciones particulares en los siguientes ejemplos de formulación.
- 10 Puede prepararse una composición farmacéutica útil disolviendo el Compuesto I o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo (50 mg/ml) en 2-pirrolidona (SOLUPHOR®-P). A continuación, esta solución se diluyó con una solución acuosa de SBE7-β-CD (30% en volumen) y poloxámero 188 (Lutrol®-F 68)(10% en volumen).

Ejemplo de Formulación 1

- 15 Se preparó una primera solución añadiendo 30,0 g de SBE7-β-CD hasta 71,25 ml de agua y se revolvió o agitó hasta que se disolvió completamente. Se añadieron 10,0 g de poloxámero 188 y la agitación se continuó hasta que se disolvió completamente. Se preparó una segunda solución agregando etanolato del Compuesto I a 2-pirrolidona según la siguiente fórmula: ml de 2-pirrolidona = (peso real de etanolato del compuesto I (mg)/50 mg/ml) x 0,5. Se añadió la primera solución a la segunda solución. Se filtró la solución resultante a través de un filtro SUPOR® de 0,2 μm (polietersulfona hidrófila) (Pall Corporation) a un contenedor libre de polvo.
- 20 Se prepara una realización de composición farmacéutica adicional combinando el Compuesto I o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo en una cantidad equimolar de un ácido farmacéuticamente aceptable en agua. A continuación, la mezcla es combinada con al menos un equivalente molar de SBE7-β-CD como una solución acuosa. Los ácidos farmacéuticamente aceptables preferentes incluyen HCl, HBr, ácido sulfúrico y ácido metansulfónico. El uso de HCl es especialmente preferente.

Ejemplo de Formulación 2

- 25 Se preparó una primera solución añadiendo 20,0 g de SBE7-β-CD a 80,00 ml de agua y se revolvió o agitó hasta que se disolvió completamente. Se añadió esta solución al etanolato del Compuesto I según la siguiente fórmula: ml de primera solución = (peso real del etanolato de Compuesto I (mg)/20 mg/ml) - (peso real del etanolato de Compuesto I (mg)/1.200 mg/ml) - (peso real del etanolato de Compuesto 1 (mg) x 0,00195107 ml de 1N HCl/mg de etanolato de Compuesto I). Se añadió HCl 1N según el siguiente cálculo: ml de HCl 1N a añadir = (peso real del etanolato de Compuesto I (mg) x 0,00195107 ml de HCl 1N/mg de etanolato de Compuesto I). Se agito o sonicó en baño hasta que se disolvió todo el compuesto.

- 30 Se preparó una realización de composición farmacéutica preferente añadiendo 1 equivalente molar del Compuesto I o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo a una solución acuosa de al menos 1 equivalente molar de SBE7-β-CD a un pH por debajo de 5,5 (pH de solución inicial), opcionalmente en presencia de un tampón farmacéuticamente aceptable, y mezclando hasta que el Compuesto I o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo se disuelve. A continuación, el pH se ajusta entre 2,5 y 3,5 con una base farmacéuticamente aceptable (pH de solución final). Esta formulación de solución resultante puede ser administrada a un paciente directamente, o preferentemente la solución puede ser liofilizada para proporcionar una formulación sólida que puede ser reconstituida con agua.

- 35 El SBE7-β-CD puede estar presente en el intervalo de 1 equivalente molar hasta una cantidad requerida para suministrar no más de 13,4 gm de SBE7-β-CD a un paciente en un día. Una cantidad preferente de SBE7-β-CD es de 1,0 a 4,0 equivalentes molares, más preferente es desde 2,0 a 3,0 equivalentes molares, y de 2,5 a 2,7 equivalentes molares con relación al Compuesto I, es especialmente preferente.

- 40 Aunque cualquier pH de solución inicial por debajo de 5,5 es aceptable, un pH de solución inicial entre 3,0 es preferente, un pH de solución inicial comprendido en el intervalo de 1,0 a 2,0 es más preferente, y un pH de solución inicial comprendido entre 1,2 y 1,4 es más preferente. El pH de solución inicial objetivo se consigue mediante la adición de cualquier ácido farmacéuticamente aceptable capaz de ajustar el pH de la solución a un pH de menos de 5,5. El uso de ácido clorhídrico es preferente.

- 45 La formulación puede contener opcionalmente un tampón farmacéuticamente aceptable. Los tampones farmacéuticamente aceptables son los compuestos empleados por una persona con conocimientos en las artes la formulación farmacéutica para estabilizar el pH de una solución final en un intervalo de pH particular. Los tampones farmacéuticamente aceptables incluyen tampones de fosfato, así como ácido cítrico, glicina y ácido tartárico o sus sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables de estos ácidos incluyen las sales de

sodio y potasio. Es preferente que un tampón farmacéuticamente aceptable esté presente en la formulación. El ácido tartárico es un tampón farmacéuticamente aceptable preferente.

5 Es importante que el Compuesto I se disuelva completamente antes que el pH sea ajustado al pH de la solución final. La disolución puede ser asistida por cualquier medio mecánico de mezclado o ajustando la temperatura de la solución si es necesario o se desea. Es preferente agitar la solución a temperatura ambiente.

10 El pH de la solución final se consigue mediante la adición de cualquier base farmacéuticamente aceptable capaz de ajustar el pH de la solución a un pH comprendido en el intervalo de 2,5 a 3,4. El uso de hidróxido de sodio es preferente. El pH de la solución final puede estar comprendido en el intercalo de 2,5 a 3,5, pero está comprendido preferentemente en el intervalo de 2,5 a 3,1. Un pH de solución final comprendido en el intervalo de 2,7 a 3,1 es más preferente. Una vez conseguido el pH de la solución final, la solución puede ser liofilizada si es necesario o se desea bajo condiciones de liofilización estándar para proporcionar una composición farmacéutica sólida adecuada para su reconstitución con agua.

Ejemplo de Formulación 3

15 Se preparó una solución de 0,15 g de ácido tartárico y 12 g (5,55 mmol) de SBE7- β -CD en 70 ml de agua. Se añadieron 5 ml de HCl 1,0 N y se mezcló a temperatura ambiente. Se añadieron 1,1 g (2,15 mmol) de etanolato de Compuesto I y se agitó a temperatura ambiente hasta que se disolvió. Se añadió hidróxido de sodio 1N a un pH de aproximadamente 2,9. Se añadió suficiente agua para conseguir un volumen final de 100 ml. Esta solución se liofilizó para proporcionar un sólido naranja-rojo amorfo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. 7-(2,5- dihidro-4-imidazo[1,2-a]piridin-3-il-2,5-dioxo-1H-pirrol-3- il)-9-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-2-(1-piperidinilcarbonil)-pirrolo[3,2,1-jk][1,4]benzodiazepina o una sal o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptable para su uso en combinación con un agente quimioterapéutico seleccionado de entre el grupo que consiste en CPT-11, pemetrexed, gemcitabina, etopósido, doxorubicina y agentes quimioterapéuticos de platino para el tratamiento de cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas o cáncer colorrectal.
- 10 2. 7-(2,5- dihidro-4-imidazo[1,2-a]piridin-3-il-2,5-dioxo-1H-pirrol-3- il)-9-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-2-(1-piperidinilcarbonil)-pirrolo[3,2,1-jk][1,4]benzodiazepina o una sal o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptable para su uso según la reivindicación 1, en el que el agente quimioterapéutico es un agente quimioterapéutico de platino.
- 15 3. 7-(2,5- dihidro-4-imidazo[1,2-a]piridin-3-il-2,5-dioxo-1H-pirrol-3- il)-9-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-2-(1-piperidinilcarbonil)-pirrolo[3,2,1-jk][1,4]benzodiazepina o una sal o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptable para su uso según la reivindicación 1, en el que el agente quimioterapéutico es pemetrexed y un agente quimioterapéutico de platino.
4. 7-(2,5- dihidro-4-imidazo[1,2-a]piridin-3-il-2,5-dioxo-1H-pirrol-3- il)-9-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-2-(1-piperidinilcarbonil)-pirrolo[3,2,1-jk][1,4]benzodiazepina o una sal o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptable para su uso en combinación con un agente quimioterapéutico seleccionado de entre el grupo que consiste en 5-fluorouracilo y agentes quimioterapéuticos de platino para el tratamiento de cáncer gástrico.
- 20 5. 7-(2,5- dihidro-4-imidazo[1,2-a]piridin-3-il-2,5-dioxo-1H-pirrol-3- il)-9-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-2-(1-piperidinilcarbonil)-pirrolo[3,2,1-jk][1,4]benzodiazepina o una sal o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptable para su uso según las reivindicaciones 1 a 4, en el que el agente quimioterapéutico de platino es cisplatino o carboplatino.