

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 681 487**

51 Int. Cl.:

A61P 35/00 (2006.01)

C07D 403/04 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2013 E 15202516 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 3056494**

54 Título: **Derivado de 2,4-diaminopirimidina bicíclico condensado como inhibidor dual de ALK y FAK**

30 Prioridad:

06.03.2012 US 201261607305 P

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

13.09.2018

73 Titular/es:

**CEPHALON, INC. (100.0%)
41 Moores Road, P.O.Box 4011
Frazer, PA 19355, US**

72 Inventor/es:

**JACOBS, MARTIN J.;
OTT, GREGORY R.;
COURVOISIER, LAURENT y
ALLWEIN, SHAWN P.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 681 487 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

Derivado de 2,4-diaminopirimidina bicíclico condensado como inhibidor dual de ALK y FAK

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

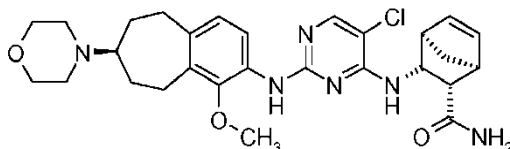
La cinasa de linfoma anaplásico (ALK) es una tirosina cinasa de receptor que atraviesa la membrana celular, que pertenece a la subfamilia de receptores de insulina. La expresión más abundante de ALK se produce en el cerebro neonatal, sugiriendo una posible función para ALK en el desarrollo del cerebro (Duyster, J. et al., *Oncogene*, 2001, 20, 5623-5637).

ALK también participa en la progresión de ciertos tumores. Por ejemplo, aproximadamente el sesenta por ciento de los linfomas anaplásicos de células grandes (ALCL) están asociados a una mutación de cromosoma que genera una proteína de fusión que consiste en nucleofosmina (NPM) y el dominio intracelular de ALK (Armitage, J.O. et al., *Cancer: Principle and Practice of Oncology*, 6ª edición, 2001, 2256-2316; Kutok J.L. & Aster J.C., *J. Clin. Oncol.*, 2002, 20, 3691-3702). Esta proteína mutante, NPM-ALK, posee un dominio de tirosina cinasa constitutivamente activo que es responsable de su propiedad oncogénica mediante la activación de efectores aguas abajo (Falini, B. et al., *Blood*, 1999, 94, 3509-3515; Morris, S.W. et al., *Brit. J. Haematol.*, 2001, 113, 275-295; Duyster et al.; Kutok & Aster). Además, el gen de fusión transformante EML4-ALK se ha identificado en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) (Soda, M., et al., *Nature*, 2007, 448, 561 - 566) y representa otro en una lista de proteínas de fusión de ALK que son dianas prometedoras para la terapia de inhibidores de ALK. Datos experimentales han demostrado que la expresión aberrante de ALK constitutivamente activa participa directamente en la patogénesis de ALCL y que la inhibición de ALK puede alterar sustancialmente el crecimiento de células de linfoma ALK+ (Kuefer, Mu et al., *Blood*, 1997, 90, 2901-2910; Bai, R.Y. et al., *Mol. Cell Biol.*, 1998, 18, 6951-6961; Bai, R.Y. et al., *Blood*, 2000, 96, 4319-4327; Ergin, M. et al., *Exp. Hematol.*, 2001, 29, 1082-1090; Slupianek, A. et al., *Cancer Res.*, 2001, 61, 2194-2199; Turturro, F. et al., *Clin. Cancer Res.*, 2002, 8, 240-245). También se ha demostrado la ALK quimérica constitutivamente activada en aproximadamente el 60 % de los tumores miofibroblásticos inflamatorios (IMT), un sarcoma de crecimiento lento que afecta principalmente a niños y adultos jóvenes (Lawrence, B. et al., *Am. J. Pathol.*, 2000, 157, 377-384; Duyster et al.).

Además, ALK y su supuesto ligando, la pleiotrofina, se expresan en exceso en glioblastomas humanos (Stoica, G. et al., *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 16772-16779). En estudios de ratón, el agotamiento de ALK redujo el crecimiento tumoral de glioblastoma y prolongó la supervivencia del animal (Powers, C. et al., *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 14153-14158; Mentlein, R. et al., *J. Neurochem.*, 2002, 83, 747-753).

Cabría esperar que un inhibidor de ALK o bien permitiera curas duraderas cuando se combina con la actual quimioterapia para ALCL, IMT, trastornos proliferativos, glioblastoma y otros posibles tumores sólidos, o bien, como agente terapéutico individual, pudiera usarse en una función de mantenimiento para prevenir la reaparición de cáncer en aquellos pacientes. Se ha informado de diversos inhibidores de ALK, tales como indazoloisoquinolinas (documento WO 2005/009389), tiazolamidas y oxazolamidas (documento WO 2005/097765), pirrolopirimidinas (documento WO 2005080393) y pirimidindiaminas (documento WO 2005/016894).

El documento WO 2008/051547 desvela derivados bicíclicos condensados de 2,4-diaminopirimidina como inhibidores de ALK y c-Met. El principal fármaco candidato desvelado en la solicitud '547 es CEP-28122, un potente inhibidor de ALK con eficacia oral contra tumores dependientes de ALK SUP-M2 y Karpas-299 en los modelos de xenoinjerto de ratón. CEP-28122 avanzó a estudios que permitieron IND hasta que su desarrollo se terminó debido a la inesperada aparición de grave toxicidad pulmonar en monos tratados con CEP-28122.



CEP-28122

La cinasa de adhesión focal (FAK) es una tirosina cinasa no de receptor evolutivamente conservada localizada en adhesiones focales, sitios de contacto celular con la ECM (matriz extracelular) que funciona como transductor crítico de la señalización a partir de receptores de integrina y múltiples tirosina cinasas de receptor, que incluyen EGF-R, HER2, IGF-R1, PDGF-R y VEGF-R2 y TIE-2 (Parsons, JT; Slack-Davis, J; Tilghman, R; Roberts, WG. *Focal adhesion kinase: targeting adhesion signaling pathways for therapeutic intervention. Clin. Cancer Res.*, 2008, 14, 627-632; Kyu-Ho Han, E; McGonigal, T. *Role of focal adhesion kinase in human cancer - a potential target for drug discovery. Anti-cancer Agents Med. Chem.*, 2007, 7, 681-684). La FAK activada por integrina forma un complejo binario con Src que puede fosforilar otros sustratos y desencadenar múltiples vías de señalización. Dada la función

central de la unión de FAK y la fosforilación en mediar en la transducción de señales con múltiples proteínas defectoras de dominio SH2 y SH3 (Mitra, SK; Hanson, DA; Schlaeper, DD. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 2005, 6, 56-68), FAK activada desempeña una función central en mediar en la adhesión, migración, morfogénesis, proliferación y supervivencia de células en células normales y malignas (Mitra et al. 2005; McLean, GW; Carragher, NO; Avizienyte, E; et al. The role of focal adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nature Reviews Cancer*, 2005, 5, 505-515; y Kyu-Ho Han and McGonigal, 2007). En tumores, la activación de FAK media en la supervivencia celular independiente del anclaje, uno de los distintivos de las células cancerosas. Además, la expresión en exceso de FAK y la activación parecen asociarse a un potenciado fenotipo invasivo y metastásico y angiogénesis tumoral en estos tumores malignos (Owens, LV; Xu, L; Craven, RJ; et al. Over expression of the focal adhesion kinase (p 125 FAK) in invasive human tumors. *Cancer Res.*, 1995, 55, 2752-2755; Tremblay, L; Hauck, W. Focal adhesion kinase (pp125FAK) expression, activation and association with paxillin and p50CSK in human metastatic prostate carcinoma. *Int. J. Cancer*, 1996, 68, 164-171; Kornberg, IJ. Focal adhesion kinase in oral cancers. *Head and Neck*, 1998, 20: 634-639; Mc Clean et al 2005; Kyu-Ho Han and McGonigal, 2007) y se correlacionó con mal pronóstico y supervivencia libre de metástasis más corta.

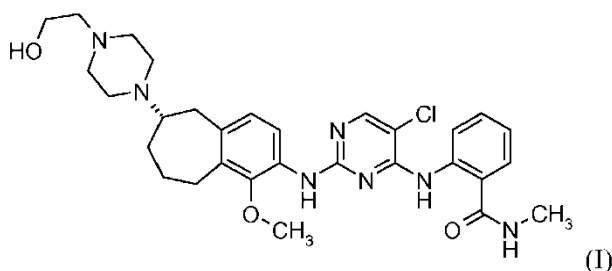
Múltiples estudios de prueba de concepto realizados en diversos tumores sólidos usando ARNip (Halder, J; Kamat, AA; Landen, CN; et al. Focal adhesion kinase targeting using in vivo short interfering RNA delivery in neutral liposomes for ovarian carcinoma therapy. *Clin. Cancer Res.*, 2006, 12, 4916-4924), FAK dominante-negativo e inhibidores de FAK de molécula pequeña (Halder, J; Lin, YG; Merritt, WM; et al. Therapeutic efficacy of a novel focal adhesion kinase inhibitor, TAE226 in ovarian carcinoma. *Cancer Res.*, 2007, 67, 10976-10983; Roberts, WG; Ung, E; Whalen, P; et al. Anti-tumor activity and pharmacology of a selective focal adhesion kinase inhibitor, PF-562,271. *Cancer Res.*, 2008, 68, 1935-1944; Bagi CM; Roberts GW; y Andersen CJ. Dual focal adhesion kinase/Pyk2 inhibitor has positive effects on bone tumors - implications for bone metastases. *Cancer*, 2008, 112, 2313-2321) han proporcionado soporte preclínico para la utilidad terapéutica de la inhibición de FAK como estrategia antitumoral/antiangiogénica, particularmente para cánceres de próstata independientes de andrógenos, cánceres de mama y HNSCC. En modelos preclínicos de cáncer de mama humano (MDA-MB-231) en ratas desnudas, la administración de un inhibidor de FAK de molécula pequeña (PF-562,271) inhibió el crecimiento tumoral primario y la diseminación del tumor intra-tibial, y restauró la pérdida ósea inducida por el tumor (Bagi et al., 2008). Roberts et al., (2008) mostraron que PF-562,271 inhibió las metástasis al hueso, previno la resorción ósea y aumentó la osteogénesis en pacientes con cáncer de mama y de próstata independiente de andrógenos con y sin metástasis al hueso, soportando un beneficio adicional de la inhibición de FAK en estos tumores malignos específicos.

En resumen, hay una clara evidencia genética y biológica que conecta la activación de ALK aberrante y la activación constitutiva de FAK con la aparición y progresión de ciertos tipos de cáncer en seres humanos. Evidencia considerable indica que las células tumorales ALK- y FAK-positivas requieren estos oncogenes para proliferar y sobrevivir, y en el caso de FAK, para invadir y metastatizar a sitios remotos, mientras que la inhibición de tanto la señalización de ALK como de FAK conduce a la detención del crecimiento de células tumorales o apoptosis, produciendo efectos citorreductores objetivos. La inhibición de FAK también produce la atenuación de la motilidad tumoral, invasividad y diseminación metastásica, particularmente en cánceres específicos caracterizados por diseminación metastásica al hueso y enfermedad osteolítica. La activación de FAK protege las células tumorales de la apoptosis inducida por quimioterapia, que contribuye a la resistencia tumoral; la modulación de actividad de FAK (por ARNip o farmacológicamente) potencia la eficacia de agentes quimioterapéuticos *in vivo* (por ejemplo, doxorubicina, docetaxel y gemcitabina), sugiriendo la utilidad para terapias de combinación racionales en cánceres específicos. ALK y FAK se expresan mínimamente en la mayoría de los tejidos normales en el adulto sano y se activan y/o desregulan en cánceres específicos durante la oncogénesis y/o durante fases tempranas de la progresión maligna. Por consiguiente, los efectos específicos del tratamiento con un inhibidor dual de ALK y FAK contra células normales debe ser mínimo, creando un índice terapéutico favorable.

Existe la necesidad de inhibidores de ALK y/o FAK seguros y eficaces adicionales para el tratamiento de cáncer.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I)



o una forma de sal del mismo, para su uso en el tratamiento de una afección o trastorno mediado por ALK o FAK, en donde la afección o trastorno mediado por ALK o FAK es cáncer.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 5 La **Fig. 1** representa una visión general esquemática de un proceso para preparar CEP-37440.
 La **Fig. 2** representa un patrón de XRPD de una sal de tribencenosulfonato de CEP-37440 cristalina.
 La **Fig. 3** representa un patrón de XRPD de una sal de triclorhidrato dihidratado de CEP-37440 cristalina.
 10 La **Fig. 4** representa la eficacia antitumoral de CEP-37440 oral en xenoinjertos de tumor Sup-M2 ALCL en ratones.
 La **Fig. 5** representa los pesos corporales de ratones portadores de xenoinjertos de tumor Sup-M2 ALCL dosificados por vía oral con CEP-37440.
 La **Fig. 6** representa los niveles en plasma y tumor de CEP-37440 en ratones portadores de xenoinjertos de tumor Sup-M2 ALCL después de la dosificación oral.
 15 La **Fig. 7** representa la eficacia antitumoral de CEP-37440 oral en xenoinjertos de tumor Karpas-299 en ratones.
 La **Fig. 8** representa los pesos corporales de ratones portadores de xenoinjertos de tumor Karpas-299 dosificados por vía oral con CEP-37440.
 La **Fig. 9** representa los niveles en plasma y tumor de CEP-37440 en ratones portadores de xenoinjertos de tumor Karpas-299 después de la dosificación oral.
 20 La **Fig. 10** representa la eficacia antitumoral de CEP-37440 oral en xenoinjertos de tumor NCI-H2228 NSCL en ratones.
 La **Fig. 11** representa la eficacia antitumoral de CEP-37440 oral en xenoinjertos de tumor NCI-H3122 NSCL en ratones.
 25 La **Fig. 12** representa los niveles en plasma y tumor de CEP-37440 en ratones portadores de xenoinjertos de tumor NCI-H2228 NSCL después de la dosificación oral.
 La **Fig. 13** representa los niveles en plasma y tumor de CEP-37440 en ratones portadores de xenoinjertos de tumor NCI-H3122 NSCL después de la dosificación oral.
 La **Fig. 14** representa los pesos corporales de ratones portadores de xenoinjertos de tumor NCI-H2228 NSCL dosificados por vía oral con CEP-37440.
 30 La **Fig. 15** representa los pesos corporales de ratones portadores de xenoinjertos de tumor NCI-H3122 NSCL dosificados por vía oral con CEP-37440.
 La **Fig. 16** representa la eficacia antitumoral y las regresiones tumorales a largo plazo de CEP-37440 oral en xenoinjertos de tumor NCI-H2228 NSCL en ratones.
 35 La **Fig. 17** representa los pesos corporales de ratones portadores de xenoinjertos de tumor NCI-H2228 NSCL dosificados por vía oral con CEP-37440.
 La **Fig. 18** representa la eficacia antitumoral de CEP-37440 y PF-562271 oral en ratones sin pelo portadores de xenoinjertos de tumor de próstata PC-3 con activación de FAK constitutiva.
 La **Fig. 19** representa la eficacia antitumoral de CEP-37440 y PF-562271 oral en ratones sin pelo portadores de xenoinjertos de carcinoma NSCL humano HCC-827 (EML4-ALK negativo).
 40 La **Fig. 20** representa los pesos corporales de ratones sin pelo portadores de xenoinjertos de carcinoma NSCL humano HCC-827 (EML4-ALK negativo) dosificados por vía oral con CEP-37440 o PF-562271.
 La **Fig. 21** representa la inhibición farmacodinámica tumoral de la eficacia de FAK y antitumoral de CEP-37440 y PF-562271 oral en ratones SCID portadores de xenoinjertos de carcinoma HNSCC humano Detroit 562
 45 (EML4-ALK negativo).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. Definiciones

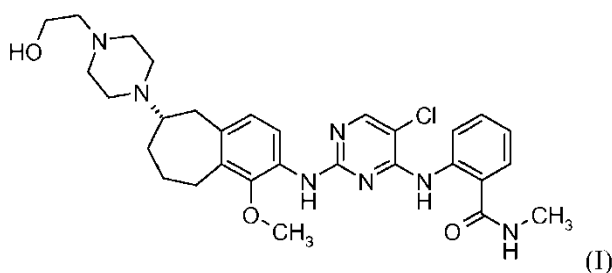
- 50 Como se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados asignados a ellos, a menos que se especifique lo contrario.
- 55 “Composición farmacéutica” se refiere a una composición que tiene un perfil de seguridad/eficacia adecuado para administración a un ser humano.
- “Excipiente farmacéuticamente aceptable” se refiere a materiales fisiológicamente tolerables, que no producen normalmente una reacción alérgica u otra inadecuada, tal como molestia gástrica, mareos y similares, cuando se administra a un ser humano.
- 60 “Sal farmacéuticamente aceptable” se refiere a una sal que tiene un perfil de seguridad/eficacia adecuado para administración a un ser humano.
- 65 “Sujeto” se refiere a un miembro de la clase Mammalia. Ejemplos de mamíferos incluyen, sin limitación, seres humanos, primates, chimpancés, roedores, ratones, ratas, conejos, caballos, ganado, perros, gatos, ovejas y vacas.

“Cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un compuesto suficiente para mejorar o inhibir el empeoramiento de síntomas asociados a un trastorno o afección que está tratándose en un sujeto particular o población de sujetos. Debe apreciarse que la determinación de formas de dosificación apropiadas, cantidades de dosificación y vías de administración está dentro del nivel de experto habitual en las ciencias farmacéuticas y médicas.

“Tratamiento” se refiere a la reducción aguda o profiláctica o alivio de al menos un síntoma o característica asociada o producida por un trastorno que está tratándose. Por ejemplo, el tratamiento puede incluir reducción de un síntoma de un trastorno o erradicación completa de un trastorno.

II. Compuesto

La presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I)



o una forma de sal del mismo. El compuesto de fórmula (I) tiene el nombre químico 2-[[[5-cloro-2-[[[6S)-6-[4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-il]-1-metoxi-6,7,8,9-tetrahidro-5H-benzo[7]anulen-2-il]amino]pirimidin-4-il]amino]-N-metil-benzamida, y también se conoce como CEP-37440. Los presentes inventores han descubierto que el compuesto de fórmula (I) posee propiedades sorprendentes e inesperadas en comparación con CEP-28122 y otros compuestos relacionados.

La forma de sal del compuesto de fórmula (I) es preferentemente farmacéuticamente aceptable. Formas de sal de ácido farmacéuticamente aceptables del compuesto de fórmula (I) incluyen, pero no se limitan a, sales derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso, y mezclas de los mismos, además de las sales derivadas de ácidos orgánicos, tales como ácidos mono- y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanoicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos alcanodioicos, ácidos aromáticos, y ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos. Así, tales sales de ácido incluyen, pero no se limitan a, sulfato, piro-sulfato, bisulfato, sulfito, bisulfito, nitrato, fosfato, monohidrogenofosfato, dihidrogenofosfato, metafosfato, pirofosfato, cloruro, bromuro, yoduro, acetato, propionato, caprilato, isobutirato, oxalato, malonato, succinato, suberato, sebacato, fumarato, maleato, mandelato, benzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, ftalato, bencenosulfonato, toluenosulfonato, fenilacetato, citrato, lactato, maleato, tartrato, metanosulfonato, y mezclas de los mismos. En ciertas realizaciones, la sal de ácido se elige de bencenosulfonato y cloruro. En ciertas realizaciones, la sal de ácido es un cloruro. En ciertas realizaciones, la sal de ácido es un tribencenosulfonato. En ciertas realizaciones, la sal de ácido es un tribencenosulfonato. En ciertas realizaciones, la sal de ácido es un tribencenosulfonato que tiene uno o más picos seleccionados de 7,62, 13,11, 13,76 y 14,05 ± 0,2 grados 2Θ. En ciertas realizaciones, la sal de tribencenosulfonato se caracteriza por un patrón de XRPD que tiene uno o más picos seleccionados de 6,85, 7,62, 8,01, 13,11, 13,76, 14,05 y 14,60 ± 0,2 grados 2Θ. En ciertas realizaciones, la sal de tribencenosulfonato se caracteriza por un patrón de XRPD que tiene uno o más picos seleccionados de 7,62, 13,11, 13,76, 14,05, 17,10, 17,86 y 18,10 ± 0,2 grados 2Θ. En ciertas realizaciones, la sal de ácido es un triclorhidrato. En ciertas realizaciones, la sal de ácido es un triclorhidrato dihidratado. En ciertas realizaciones, la sal de triclorhidrato dihidratado se caracteriza por un patrón de XRPD que tiene uno o más picos seleccionados de 5,42, 8,86, 14,06, 17,52 y 18,51 ± 0,2 grados 2Θ. En ciertas realizaciones, la sal de triclorhidrato dihidratado se caracteriza por un patrón de XRPD que tiene uno o más picos seleccionados de 5,42, 5,91, 8,86, 10,80, 11,79, 14,06, 14,72, 17,02, 17,52 y 18,51 ± 0,2 grados 2Θ. En ciertas realizaciones, la sal de ácido es un triclorhidrato monohidratado.

Las sales de adición de ácido pueden prepararse poniendo en contacto el compuesto de fórmula (I) con una cantidad suficiente del ácido deseado para producir la sal de la manera convencional. La forma de base libre del compuesto de fórmula (I) puede regenerarse poniendo en contacto la forma de sal con una base y aislando la base libre de la manera convencional.

La presente invención incluye el compuesto de fórmula (I) y formas de sal del mismo en cualquier forma física, que incluye sólidos amorfos o cristalinos en cualquier forma polimórfica, en cualquier estado de pureza. Las formas polimórficas cristalinas incluyen formas no solvatadas, además de formas solvatadas, tales como formas hidratadas. Los métodos de preparación de formas cristalinas y amorfas de compuestos orgánicos tales como el compuesto de fórmula (I) son muy conocidos para aquellos expertos habituales en la materia.

III. Composición farmacéutica

La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la presente invención (por ejemplo, un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo), junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Para preparar una composición farmacéutica a partir de un compuesto de la presente invención, excipientes farmacéuticamente aceptables pueden ser tanto sólidos como líquidos. Un excipiente puede ser una o más sustancias que pueden actuar de, por ejemplo, un vehículo, diluyente, aromatizante, aglutinante, conservante, agente disgregante de comprimidos, o un material de encapsulamiento. La composición farmacéutica puede contener dos o más compuestos de la presente invención (por ejemplo, dos o más formas de sal diferentes del compuesto de fórmula (I)). Preferentemente, la composición farmacéutica contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I) o una forma de sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización, la composición contiene una cantidad de un compuesto de fórmula (I) o una forma de sal farmacéuticamente aceptable del mismo eficaz para tratar un trastorno o afección mediado por ALK o FAK. Preferentemente, una composición farmacéutica de la presente invención producirá una disminución en los síntomas o indicios de enfermedad asociados a un trastorno mediado por ALK o FAK como se mide cuantitativamente o cualitativamente. La composición también puede contener, además de un compuesto de fórmula (I) o una forma de sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un excipiente farmacéuticamente aceptable, otro compuesto terapéutico, tal como un compuesto útil en el tratamiento de cáncer.

Un compuesto de la presente invención puede formularse como una composición farmacéutica en cualquier forma, tal como un jarabe, un elixir, una suspensión, un polvo, un gránulo, un comprimido, una cápsula, una pastilla para chupar, un trocisco, una disolución acuosa, una crema, una pomada, una loción, un gel, una emulsión, etc. Preparaciones en forma sólida incluyen polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas, sellos, supositorios y gránulos dispersables. Preferentemente, la composición farmacéutica es un comprimido o cápsula. En una realización, la composición farmacéutica es un comprimido. En otra realización, la composición farmacéutica es una cápsula.

En polvos, el excipiente puede ser un sólido finamente dividido en una mezcla con un componente activo finamente dividido. En comprimidos, el componente activo puede mezclarse con un excipiente que tiene las propiedades de unión necesarias en proporciones adecuadas y compactadas en la forma y tamaño deseado. Excipientes adecuados incluyen carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, cera de baja fusión, manteca de cacao, y similares.

La composición farmacéutica contiene preferentemente del 1 % al 95 % (peso/peso) del compuesto activo. Más preferentemente, la composición farmacéutica contiene del 5 % al 70 % (peso/peso) del compuesto activo.

Para preparar supositorios, una cera de baja fusión, tal como una mezcla de glicéridos de ácido graso o manteca de cacao, puede fundirse y el componente activo dispersarse homogéneamente en su interior, como agitando. La mezcla homogénea fundida puede entonces verterse en moldes de tamaño conveniente, dejarse enfriar, y así solidificar.

Preparaciones en forma líquida incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones. Formulaciones adecuadas para administración parenteral, tales como, por ejemplo, por vías intravenosa, intramuscular, intradérmica y subcutánea, incluyen disoluciones para inyección estériles isotónicas acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor previsto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, espesantes, estabilizadores y conservantes. En la práctica de la presente invención, las composiciones pueden administrarse, por ejemplo, por infusión intravenosa, por vía oral, tópicamente, intraperitonealmente, intravesicalmente o intratecalmente. Las formulaciones de compuestos pueden presentarse en envases sellados de dosis unitaria o multi-dosis, tales como ampollas y viales. Las disoluciones y suspensiones para inyección pueden prepararse a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo previamente descrito.

Un compuesto de la presente invención, solo o en combinación con otros componentes adecuados, puede prepararse en formulaciones en aerosol (es decir, puede "nebulizarse") para administrarse mediante inhalación. Las formulaciones en aerosol pueden disponerse en propulsores aceptables presurizados, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición particular que se administra, además de por el método particular usado para administrar la composición. Por consiguiente, hay una amplia variedad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas de la presente invención (véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed., Gennaro et al. Eds., Lippincott Williams and Wilkins, 2000).

La cantidad de componente activo en una composición farmacéutica puede variarse o ajustarse de, por ejemplo, 1 mg a 1.000 mg, 5 mg a 500 mg, 10 mg a 300 mg, o 25 mg a 250 mg, según la aplicación particular.

La dosis administrada a un sujeto es preferentemente suficiente para efectuar una respuesta terapéutica beneficiosa en el sujeto con el tiempo. Las dosis beneficiosas pueden variar de sujeto a sujeto dependiendo de, por ejemplo, la afección del sujeto, peso corporal, área superficial y susceptibilidad a efectos secundarios. La administración puede llevarse a cabo mediante dosis únicas o divididas.

5

IV. Método de Tratamiento

La presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) o una forma de sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de un trastorno o afección mediado por ALK o FAK en un sujeto, en donde la afección o trastorno mediado por ALK o FAK es cáncer. Preferentemente, el compuesto de fórmula (I) o una forma de sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra al sujeto como una composición farmacéutica que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, el compuesto de fórmula (I) o una forma de sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra al sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz. En una realización, la afección o trastorno mediado por ALK o FAK es cáncer. En otra realización, la afección o trastorno mediado por ALK o FAK está seleccionado de linfoma anaplásico de células grandes (ALCL), cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), neuroblastoma, glioblastoma, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas (SCC) y cáncer de mama. En ciertas realizaciones, la afección o trastorno mediado por ALK o FAK está seleccionado de ALCL ALK-positivo, NSCLC EML4-ALK-positivo, neuroblastoma, glioblastoma, cánceres de próstata independientes de andrógenos, cánceres de mama, y carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC). En ciertas realizaciones, la afección o trastorno mediado por ALK o FAK está seleccionado de ALCL ALK-positivo, NSCLC EML4-ALK-positivo, neuroblastoma, cánceres de próstata independientes de andrógenos, cánceres de mama y HNSCC. En ciertas realizaciones, la afección o trastorno mediado por ALK o FAK está seleccionado de ALCL ALK-positivo, NSCLC EML4-ALK-positivo, neuroblastoma y glioblastoma. En ciertas realizaciones, la afección o trastorno mediado por ALK o FAK está seleccionado de ALCL ALK-positivo, NSCLC EML4-ALK-positivo y neuroblastoma. En ciertas realizaciones, la afección o trastorno mediado por ALK o FAK está seleccionado de ALCL ALK-positivo y NSCLC EML4-ALK-positivo. En ciertas realizaciones, la afección o trastorno mediado por ALK o FAK está seleccionado de cánceres de próstata independientes de andrógenos, cánceres de mama y HNSCC. En ciertas realizaciones, la afección o trastorno mediado por ALK o FAK es una afección o trastorno mediado por ALK. En ciertas realizaciones, la afección o trastorno mediado por ALK o FAK es una afección o trastorno mediado por FAK. En ciertas realizaciones, la afección o trastorno mediado por ALK o FAK es un tumor miofibroblástico. En ciertas realizaciones, la afección o trastorno mediado por ALK o FAK es un tumor miofibroblástico con oncogenes TPM3-ALK o TPM4-ALK. En ciertas realizaciones, la afección o trastorno mediado por ALK o FAK es un tumor miofibroblástico con oncogenes TPM3-ALK. En ciertas realizaciones, la afección o trastorno mediado por ALK o FAK es un tumor miofibroblástico con oncogenes TPM4-ALK.

35

El trastorno o afección mediado por ALK o FAK puede tratarse profilácticamente, agudamente o crónicamente usando compuestos de la presente invención, dependiendo de la naturaleza del trastorno o afección. Preferentemente, el sujeto en cada uno de estos métodos es humano.

En aplicaciones terapéuticas, los compuestos para su uso de acuerdo con la presente invención pueden prepararse y administrarse en una amplia variedad de formas de dosificación orales y parenterales. Por tanto, los compuestos para su uso de acuerdo con la presente invención pueden administrarse por inyección, es decir, intravenosamente, intramuscularmente, intracutáneamente, subcutáneamente, intraduodenalmente o intraperitonealmente. En ciertas realizaciones, los compuestos para su uso de acuerdo con la presente invención se administran intravenosamente o subcutáneamente. Por tanto, los compuestos descritos en el presente documento pueden administrarse por inhalación, por ejemplo, intranasalmente. Adicionalmente, los compuestos para su uso de acuerdo con la presente invención pueden administrarse transdérmicamente. En otra realización, los compuestos para su uso de acuerdo con la presente invención se administran oralmente. Los compuestos también pueden administrarse rectalmente, bucalmente o por insuflación.

50

La determinación de la dosificación apropiada para una situación particular está dentro de la experiencia del médico. Generalmente, el tratamiento se inicia con dosificaciones más pequeñas que son inferiores a la dosis óptima del compuesto. A partir de aquí, la dosificación se aumenta pequeños incrementos hasta que se alcanza el efecto óptimo bajo las circunstancias. Por comodidad, la dosis diaria total puede dividirse y administrarse en porciones durante el día, si se desea. Una dosis típica es aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1.000 mg por día, tal como aproximadamente 5 mg a aproximadamente 500 mg por día. En ciertas realizaciones, la dosis es aproximadamente 10 mg a aproximadamente 300 mg por día, tal como aproximadamente 25 mg a aproximadamente 250 mg por día.

55

V. Química

CEP-28122

Se prepara amida del ácido (1S,2S,3R,4R)-3-[5-cloro-2-((S)-1-metoxi-7-morfolin-4-il-6,7,8,9-tetrahidro-5H-benzociclohepten-2-ilamino)-pirimidin-4-ilamino]-biciclo[2.2.1]hept-5-eno-2-carboxílico (CEP-28122) como se

65

describe en el Ejemplo 882 del documento WO 2008/051547 (Ahmed et al.).

CEP-37440

- 5 La síntesis de 2-(5-cloro-2-((S)-6-[4-(2-hidroxi-etil)-piperazin-1-il]-1-metoxi-6,7,8,9-tetrahidro-5H-benzociclohepten-2-ilamino)-pirimidin-4-ilamino)-N-metil-benzamida puede llevarse a cabo según la **Fig. 1**, siguiendo los procedimientos brevemente expuestos en las etapas 1-8.

10 Etapa 1: 5-Metoxi-1-metilen-1,2,3,4-tetrahidro-naftaleno: A una suspensión de 5-metoxi-3,4-dihidro-2H-naftalen-1-ona (25 g, 0,14 moles) y yoduro de metiltrifenilfosfonio (1,13 eq) en THF (250 ml) a TA se añadió t-butoxido de potasio (1,6 eq) a una tasa tal para mantener una temperatura no superior a caliente al tacto. La reacción se agitó durante una hora y se concentró. A continuación, la reacción se destiló azeotrópicamente con tres volúmenes de hexano para eliminar el exceso de t-butanol. Se añadió hexano nuevo a la disolución, se dejó reposar durante la noche para efectuar la trituración. El sólido rojizo-marrón se separó por filtración y el filtrado se lavó dos veces con agua y se concentró. La purificación por cromatografía sobre ISCO (cartucho de 330 g de SiO₂: hexano escalonado y luego DCM) proporciona el compuesto del título como un aceite amarillo pálido (24 g, 99 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 7,29 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,15 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 6,76 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 5,49 (s, 1H), 4,98 (s, 1H), 3,85 (s, 3H), 2,77 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 2,53-2,50 (m, 2H), 1,93-1,87 (m, 2H).

20 Etapa 2: 1-Metoxi-5,7,8,9-tetrahidro-benzociclohepten-6-ona: 5-Metoxi-1-metilen-1,2,3,4-tetrahidro-naftaleno (23,8 g, 0,137 moles) en 150 ml de MeOH añadido en una porción a disolución recién preparada de nitrato de talio (III) trihidratado (1,0 eq) en 300 ml de MeOH. Se agitó un minuto y se añadieron 400 ml de cloroformo. Se filtró la disolución y los extractos orgánicos se repartieron entre diclorometano y agua. Los extractos orgánicos se secaron (MgSO₄) y se concentraron. La purificación por cromatografía (ISCO, cartucho de 330 g de sílice; elución escalonada con hexano (5 min), luego gradiente de 7 minutos a 100 % de diclorometano (20 min) proporciona el compuesto del título como el más polar de los productos como un aceite amarillo pálido (26 g, 97 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 7,16 (t, J = 7,9 Hz, 1H), 7,84 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 6,79 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 3,84 (s, 3H), 3,73 (s, 2H), 3,05-3,01 (m, 2H), 2,55 (t, J = 7,0 Hz, 2H), 2,01-1,96 (m, 2H). EM/CL (ESI+) m/z = 191 (M+H)⁺

30 Etapa 3: 1-Metoxi-2-nitro-5,7,8,9-tetrahidro-benzociclohepten-6-ona: A nitrato de potasio en acetonitrilo (50 ml) y anhídrido trifluoroacético (100 ml) a 0 °C se añadió gota a gota 1-metoxi-5,7,8,9-tetrahidro-benzociclohepten-6-ona (25 g, 0,131 moles) en 50 ml de acetonitrilo. La reacción se agitó durante 2,5 horas mientras que se calentaba a ta. La reacción se concentró sin calor en un evaporador rotatorio. Se añadió MeOH y se agitó brevemente. Se reconcentró y se procesó repartiendo entre diclorometano y disolución ac. sat. de bicarbonato sódico. La fase orgánica se separó y se secó (Mg₂SO₄), se concentró y se purificó por cromatografía ISCO (cartucho de 330 g de sílice: elución en gradiente - 10 a 50 % de EA:HEX durante 60 minutos) dando dos isómeros. El compuesto del título fue el último en eluir (10,7 gramos, rendimiento del 34,6 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 7,70 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 7,06 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 3,92 (s, 3H), 3,80 (s, 2H), 3,13-3,09 (m, 2H), 2,60 (t, J = 7,0 Hz, 2H), 2,10-2,03 (m, 2H).

40 Etapa 4: 2-[4-(1-Metoxi-2-nitro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-benzociclohepten-6-il)-piperazin-1-il]-etanol: Se trató 1-metoxi-2-nitro-5,7,8,9-tetrahidro-benzociclohepten-6-ona (15,09 g, 64,15 mmoles) en cloruro de metileno (870 ml) con 2-piperazin-1-il-etanol (3 eq), seguido de ácido acético (10 eq). La mezcla se agitó a 50 °C durante 2 h y se enfrió a 0 °C y se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (4 eq), luego se calentó a ta y se agitó. Después de algunas horas todavía estaba presente material de partida. Se añadieron 0,4 eq adicionales de triacetoxiborohidruro de sodio, luego de nuevo después de 6 horas. Se agitó durante la noche. Se vertió en una disolución de bicarbonato sódico ac. sat. y hielo y se basificó a pH 10 con hidróxido sódico 1 N, se extrajo con 2X diclorometano, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró. Este material se recogió en etanol y se añadió HCl/ etanol. El precipitado resultante se trituró durante 2 horas, luego se filtró. El sólido se liberó de la base usando NaOH, seguido de bicarbonato sódico y se extrajo en diclorometano dando el compuesto del título (19 g, rendimiento del 85 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 7,56 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,00 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 3,82 (s, 3H), 3,63-3,06 (m, 2H), 3,29-3,24 (m, 1H), 3,00-2,86 (m, 3H), 2,72-2,67 (m, 2H), 2,60-2,51 (m, 8H), 2,46-2,37 (m, 2H), 2,12-2,07 (m, 2H), 1,87-1,78 (m, 1H), 1,37-1,29 (m, 1H). EM/CL (ESI+) m/z = 350 (M+H)⁺

55 Etapa 5: 2-[4-(2-Amino-1-metoxi-6,7,8,9-tetrahidro-5H-benzociclohepten-6-il)-piperazin-1-il]-etanol. Se fraccionó 2-[4-(1-metoxi-2-nitro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-benzociclohepten-6-il)-piperazin-1-il]-etanol (19,0 g, 54,4 mmoles) en dos lotes y se disolvió en un total de etanol (232 ml). Se dividió 10 % de Pd/C (1,74 g, 1,64 mmoles) a la mitad y la reacción se hidrogenó durante 3-4 horas a 50 psi. Cada mezcla de reacción se filtró a través de Celite para eliminar el Pd. Los filtrados se combinaron y a continuación se concentraron y el compuesto del título se aisló como un sólido espumoso (17,25 g, rendimiento del 99 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) 6,76 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 6,53 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 3,72 (s ancho, 3H), 3,71 (s, 3H), 3,64 (t, J = 5,4 Hz, 2H), 3,26-3,20 (m, 1H), 2,84-2,72 (m, 5H), 2,62-2,56 (m, 8H), 2,42-2,35 (m, 2H), 2,40-2,37 (m, 1H), 1,81-1,74 (m, 1H), 1,70 (s ancho, 1H), 1,41-1,33 (m, 1H). EM/CL (ESI+) m/z = 320 (M+H)⁺

65 Etapa 6: 2-[4-((S)-2-Amino-1-metoxi-6,7,8,9-tetrahidro-5H-benzociclohepten-6-il)-piperazin-1-il]-etanol: Se separaron 34 gramos de 2-[4-(2-amino-1-metoxi-6,7,8,9-tetrahidro-5H-benzociclohepten-6-il)-piperazin-1-il]-etanol racémico usando cromatografía de SFC (fluido supercrítico CO₂) usando una columna Chiralcel OJ-H (3 x 15 cm) 808041 con

15 % de metanol (0,2 % de DEA)/CO₂, eluyente a 100 bar a 80 ml/min de velocidad de flujo monitorizando la longitud de onda de 220 nm con un volumen de inyección: 0,5 ml, 20 mg/ml de etanol. Se aislaron 16,9 gramos del enantiómero (R) y 17 gramos del compuesto del título con una pureza química >99 % y un exceso enantiomérico (ee) >99 % (medido usando una columna analítica Chiralcel OJ-H). RMN y la masa fueron equivalentes al material racémico. La configuración absoluta del primer isómero en eluir se asignó inequívocamente como la configuración (R) mediante rayos X de molécula pequeña usando dispersión anómala del derivado de bis-p-bromobencilo: éster 2-{4-[(R)-2-(4-bromo-benzoilamino)-1-metoxi-6,7,8,9-tetrahidro-5H-benzociclohepten-6-il]-piperazin-1-il}-etilico del ácido 4-bromo-benzoico. Así, se determinó que el segundo enantiómero en eluir era la configuración (S).

10 Etapa 7: 2-(2,5-Dicloro-pirimidin-4-ilamino)-N-metil-benzamida: Se añadió 2-amino-N-metil-benzamida (24,4 g, 0,16 moles) en DMF (0,5 l) a 2,4,5-tricloro-pirimidina (39 g, 1,3 eq) y carbonato de potasio (1,3 eq). Se agitó bajo argón a 75 °C durante 5 h y a continuación a TA durante la noche. Se vertió en 1 l de agua y el precipitado se aisló por filtración y se lavó con 1:1 de acetonitrilo:agua, seguido de secado en corriente de aire y a vacío para proporcionar el compuesto del título como un sólido amarillo (38 g, rendimiento del 78 %). 11,70 (s, 1H), 8,74 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 15 8,24 (s, 1H), 7,59 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,53 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,16 (t, J = 8,4 Hz, 1H), 6,28 (s, 1H), 3,06 (d, J = 4,7 Hz, 3H).

20 Etapa 8: 2-(5-Cloro-2-((S)-6-[4-(2-hidroxi-etil)-piperazin-1-il]-1-metoxi-6,7,8,9-tetrahidro-5H-benzociclohepten-2-ilamino)-pirimidin-4-ilamino)-N-metil-benzamida: En un recipiente sellado se combinaron 2-[4-((S)-2-amino-1-metoxi-6,7,8,9-tetrahidro-5H-benzociclohepten-6-il)-piperazin-1-il]-etano (2,69 g, 8,41 mmoles) y 2-(2,5-dicloro-pirimidin-4-ilamino)-N-metil-benzamida (2,00 g, 6,73 mmoles) en 1-metoxi-2-propanol (120 ml, 1200 mmoles), seguido de la adición de ácido metanosulfónico (2,44 ml, 37,7 mmoles). La reacción se calentó entonces a 90 °C durante 18 horas. La mezcla de reacción se añadió a un embudo de decantación y se diluyó con bicarb sat. hasta que se formó un precipitado turbio. Éste se extrajo con diclorometano 3x. La fase orgánica se lavó entonces con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró. El residuo se bombeó en seco, luego se sometió a cromatografía sobre columna ultrarrápida ISCO. Se inyectó en diclorometano sobre una columna de fase normal y se eluyó con un gradiente de 0-10 % (diclorometano: 10 % de NH₄OH en MeOH). El producto deseado eluyó aproximadamente el 9-10 % y se mantuvo el 10 % de gradiente hasta que el producto eluyó completamente. Las fracciones mixtas se concentraron y se purificaron por cromatografía con elución en gradiente de HPLC de fase inversa Gilson del 0-40 % de CH₃CN. La cromatografía se repitió usando sílice de fase normal y HPLC de fase inversa para efectuar más purificación, según se deseara. Tras la neutralización y concentración de todo el material, el sólido resultante se obtuvo recogiendo la espuma en EtOAc y concentrándola a sequedad varias veces para dar el compuesto del título (1,1 g, 28 %). 11,02 (s, 1H), 8,69 (d, J = 8,9 Hz, 1H), 8,13 (s, 1H), 8,08 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,59-7,50 (m, 2H), 7,41 (s, 1H), 7,13 (t, J = 7,4 Hz, 1H), 6,91 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 6,21 (s, 1H), 3,74 (m, 3H), 3,66-3,63 (m, 2H), 3,29-3,23 (m, 1H), 3,06 (d, J = 4,3 Hz, 3H), 2,92-2,72 (m, 5H), 2,66-2,55 (m, 8H), 2,48-2,39 (m, 2H), 2,16-2,10 (m, 2H), 1,87-1,77 (m, 1H), 1,42-1,32 (m, 1H). EM/CL (ESI+) m/z = 580 (M+H)+

Sal de HCl amorfa de CEP-37440

40 Clorhidrato de 2-(5-cloro-2-{6-[4-(2-hidroxi-etil)-piperazin-1-il]-1-metoxi-6,7,8,9-tetrahidro-5H-benzociclohepten-2-ilamino)-pirimidin-4-ilamino)-N-metil-benzamida: Se calentaron 2-(5-cloro-2-{6-[4-(2-hidroxi-etil)-piperazin-1-il]-1-metoxi-6,7,8,9-tetrahidro-5H-benzociclohepten-2-ilamino)-pirimidin-4-ilamino)-N-metil-benzamida (4,90 g, 8,45 mmoles) y 2,5 M de HCl en etanol (13,5 ml, 33,8 mmoles) hasta que se disolvieron en etanol (164 ml). La reacción se concentró dos veces en etanol, luego se calentó en una pequeña cantidad de etanol hasta que se disolvió completamente. Esta disolución se dejó enfriar lentamente con agitación (< 100 rpm). Se formó un precipitado sólido rápidamente antes de que se hubiera enfriado la disolución. Esta mezcla se dejó con agitación hasta que se logró temperatura ambiente y luego se filtró. El sólido se lavó con etanol, seguido de éter, luego se bombeó directamente en seco bajo alto vacío dando clorhidrato de 2-(5-cloro-2-{6-[4-(2-hidroxi-etil)-piperazin-1-il]-1-metoxi-6,7,8,9-tetrahidro-5H-benzociclohepten-2-ilamino)-pirimidin-4-ilamino)-N-metil-benzamida (5,3 gramos, rendimiento 50 cuantitativo). RMN ¹H (MeOD, 400 MHz) δ 8,55 (s, 1H), 8,17 (s, 1H), 7,80 (d, J = 7,7 Hz, 1H), 7,55 (t, J = 6,8 Hz, 1H), 7,46 (s ancho, 1H), 7,36 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 7,23 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 4,00-3,95 (m, 4H), 3,83-3,72 (m, 5H), 3,73 (s, 3H), 3,65-3,59 (m, 2H), 3,47-3,38 (m, 5H), 2,95 (s, 3H), 2,72-2,65 (m, 1H), 2,44-2,38 (m, 1H), 2,29-2,28 (m, 1H), 2,19-2,12 (m, 1H), 1,59-1,49 (m, 1H). EM/CL (ESI+) m/z = 580 (M+H)+.

Cribado de sal de CEP-37440

Se realizaron experimentos de cribado de la sal (a) en metanol usando 27 ácidos diferentes (ácido acético, ácido ascórbico, ácido bencenosulfónico, ácido cítrico, ácido D-glucurónico, ácido DL-glutámico, ácido DL-láctico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido etanosulfónico, ácido fumárico, ácido glicólico, ácido hipúrico, ácido bromhídrico (48 % ac.), ácido clorhídrico (2,5M, EtOH), ácido L-aspártico, ácido L-tartárico, ácido L-piroglutámico, ácido lactobiónico, ácido maleico, ácido málico, ácido malónico, ácido naftaleno-2-sulfónico, ácido ortofosfórico, ácido p-toluenosulfónico monohidratado, ácido propiónico, ácido succínico y ácido sulfúrico), (b) en diclorometano y tetrahidrofurano usando 9 ácidos diferentes (ácido bencenosulfónico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bromhídrico (48 % ac.), ácido naftaleno-2-sulfónico, ácido o-fosfórico (85 %), ácido sulfúrico, 65 ácido p-toluenosulfónico y ácido clorhídrico (etanol)), y (c) en cloroformo, acetona, acetato de etilo y 1-propanol

usando ácido bencenosulfónico, ácido bromhídrico (48 % ac.), ácido o-fosfórico, ácido sulfúrico, ácido p-toluenosulfónico y ácido clorhídrico (etanol)). Aunque muchos de los experimentos proporcionaron formas de sal, solo algunos de los experimentos produjeron sales cristalinas, y solo dos formas de sal fueron cristalinas, estables y reproducibles: una forma de tri-bencenosulfonato y una forma de triclorhidrato dihidratado. Desde una perspectiva farmacéutica, el triclorhidrato dihidratado está favorecido con respecto al tri-bencenosulfonato debido a que el HCl es una sal de adición de ácido de clase 1 que es generalmente reconocida como segura (GRAS), mientras que el ácido bencenosulfónico es una sal de adición de ácido de clase 2 que no es GRAS (véase Stahl, H.P. & Wermuth, C.G., Editors, 2002 Handbook of Pharmaceutical salts; Properties, Selection, and Use. Verlag Helvetica Chimica Acta and Wiley-VCH). Además de ser menos tóxico, el HCl tiene un menor peso molecular que el ácido bencenosulfónico, que proporciona una mayor relación de API/ácido y una menor dosis eficaz.

Se registraron los patrones de difracción de rayos X de polvo en un difractómetro PANalytical X Pert Pro equipado con un detector X'celerator usando radiación de $\text{CuK}\alpha$ a 45 kV y 40 mA. La radiación de $\text{K}\alpha_1$ se obtuvo con un monocromador de haz incidente de cristal altamente orientado (Ge111). Se insertaron una máscara de haz de 10 mm, y ranuras de divergencia fija ($1/4^\circ$) y anti-divergentes ($1/8^\circ$) sobre el lado del haz incidente. Se insertaron una ranura receptora de 5 mm fija y un bloque Soller de 0,04 radianes sobre el lado del haz difractado. Se recogió el barrido del patrón de polvo de rayos X de aprox. 2 a $40^\circ 2\theta$ con un tamaño de etapa de $0,0080^\circ$ y tiempo de recuento de 96,06 s que produjeron una tasa de barrido de aproximadamente $0,5^\circ/\text{min}$. La muestra se diseminó sobre un placa de fondo cero de silicio (ZBG) para la medición. La muestra se rotó usando una centrifuga PANalytical PW3064 (15 revoluciones / min). La medición del patrón de referencia de Si antes de la recogida de datos produjo valores para 2θ e intensidad que estuvieron perfectamente dentro de las tolerancias de $28,44 < 2\theta < 28,50$ y significativamente superiores a la altura de pico mínima de 150 cps.

Tribencenosulfonato de CEP-37440

Se disolvió base libre de CEP-37440 (500 mg, 0,862 mmoles) en 6 ml de tetrahidrofurano agitando a temperatura ambiente durante 5 minutos. Esta disolución se añadió, un ml cada vez, a ácido bencenosulfónico (545,6 mg, 3,45 mmoles) en un vial de centelleo de vidrio de 20 ml (16 x 60 mm). La muestra se mezcló usando una barra de agitación durante la adición (a temperatura ambiente). Se observó un aceite más un sólido cuando se añadió toda la disolución de CEP-37440. La muestra se agitó a $5-7^\circ\text{C}$ durante 19 horas sobre una unidad HEL Polyblock™. El sólido se aisló por filtración por succión. El sólido se secó a 50°C bajo vacío doméstico durante 5 horas dando 835 mg (recuperación del 80 %) de sólido ligeramente amarillo. La pureza por HPLC, ensayo y color del compuesto mejoraron suspendiendo 616 mg en 1,5 ml de agua y agitando la suspensión resultante durante 30 minutos a temperatura ambiente. El sólido se aisló por filtración por succión y el sólido sobre la almohadilla de filtración se lavó con 1 ml de agua. El sólido blanco se secó a 50°C bajo vacío doméstico durante 68 horas dando 406 mg (recuperación del 67 %). La sal de tribencenosulfonato tiene una solubilidad en agua de aproximadamente 20-33 mg/ml.

Los datos de difracción de rayos X característicos de la sal de tribencenosulfonato cristalina se muestran en la **Tabla 1 y Fig. 2**.

Tabla 1 Mayores intensidades relativas con dos posiciones theta y separaciones d para el patrón de XRPD de la sal de tribencenosulfonato de CEP-37440

Nº	Pos.[2θ]	d-espaciado [Å]	Rel. Int. [%]	Nº	Pos.[2θ]	d-espaciado [Å]	Rel. Int. [%]
1	6.85	12.897	8	11	15.25	5.805	6
2	7.62	11.593	100	12	15.47	5.724	5
3	8.01	11.031	9	13	15.57	5.686	8
4	10.77	8.209	6	14	15.74	5.625	6
5	12.07	7.324	5	15	16.02	5.528	2
6	13.11	6.747	20	16	16.66	5.317	3
7	13.34	6.630	5	17	17.10	5.181	40
8	13.76	6.430	44	18	17.59	5.038	4
9	14.05	6.296	21	19	17.86	4.962	24
10	14.60	6.061	9	20	18.10	4.898	47

El pico más alto (intensidad 100 %) está marcado en negrita.

Triclorhidrato dihidratado de CEP-37440

En un vial de centelleo de 20 ml que contenía 200 mg de base libre de CEP-37440 se añadió alcohol n-butílico (5 ml) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 5 minutos, la base libre estuvo en disolución. Entonces se añadió HCl (2,5 M en EtOH, 0,435 ml, 3,15 eq), produciendo la precipitación inmediata de sólidos blancos (sal de HCl amorfa). La suspensión resultante se calentó a 85 °C durante 20 minutos. (Nota: a aproximadamente 60 °C, no quedaron sólidos en disolución.) La agitación de la disolución entre 80 y 85 °C produjo la auto-nucleación después de 30 minutos que produjo adicionalmente la precipitación de sólidos blancos. Después de agitar la reacción durante un total de 2 horas, la suspensión resultante se enfrió a 5 °C durante 1 hora. La suspensión a 0-5 °C se agitó durante una hora adicional, luego se filtró, lavando con alcohol n-butílico frío mínimo. Los sólidos se secaron entonces a 55 °C durante la noche. Dejándolos estar a HR del aire del 30-70 % se obtuvieron 208 mg de CEP-37440-3HC1-2H₂O.

El patrón de difracción de rayos X característico de la sal de triclorhidrato dihidratado cristalina se muestra en la **Tabla 2** y **Fig. 3**. La sal es estable al 30-80 % de humedad relativa, pero se convierte reversiblemente en una forma de triclorhidrato monohidratado por debajo del 30 % de HR y se convierte irreversiblemente en una forma amorfa altamente hidratada por encima del 80 % de HR.

Tabla 2 Mayores intensidades relativas con dos posiciones theta y separaciones d para el patrón de XRPD de la sal de triclorhidrato dihidratado CEP-37440

No.	Pos. [2θ]	d-espaciado [Å]	Rel. Int. [%]	No.	Pos. [2θ]	d-espaciado [Å]	Rel. Int. [%]	
	1	5.42	16.306	100	11	15.70	5.641	15
	2	5.91	14.940	39	12	17.02	5.204	44
	3	7.02	12.575	8	13	17.52	5.059	83
	4	8.86	9.967	77	14	17.76	4.990	14
	5	10.80	8.184	46	15	18.51	4.789	56
	6	11.06	7.995	14	16	19.13	4.635	3
	7	11.79	7.498	33	17	20.56	4.316	20
	8	14.06	6.292	64	18	20.79	4.269	17
	9	14.22	6.223	26	19	21.12	4.204	24
	10	14.72	6.014	45	20	21.66	4.099	17

El pico más alto (intensidad 100 %) está marcado en negrita.

VI. Biología

Estudio de toxicidad oral y toxicocinético de 13 semanas de CEP-28122 en ratas Sprague-Dawley, que incluye un periodo de recuperación de 4 semanas

Se administraron tres grupos de tratamiento de 20 ratas/sexo con CEP-28122 a niveles de dosis respectivos de 30, 75 y 150 mg de base libre/kg/día (administrado como el ácido mono-metanosulfónico, forma de sal de mono-HCl). Un grupo adicional de 20 animales/sexo sirvió de control y recibió el vehículo, agua destilada. El fármaco o vehículo se administró a todos los grupos mediante sonda nasogástrica oral, una vez al día durante 91 días consecutivos, a un volumen de dosis de 10 ml/kg/dosis. Tras el periodo de dosificación, cinco animales/sexo/grupo se mantuvieron durante un periodo de recuperación de 4 semanas. Adicionalmente, un grupo de tres animales/sexo y tres grupos de nueve animales/sexo/grupo sirvieron de animales toxicocinéticos (TK) y recibieron el vehículo o fármaco del mismo modo y a los mismos niveles de dosis que los principales grupos del estudio.

Se realizaron observaciones para morbilidad, mortalidad, lesión y la disponibilidad de alimento y agua al menos dos veces al día para todos los animales. Se realizaron observaciones clínicas en los principales animales del estudio semanalmente. Se midieron los pesos corporales y se registraron para todos los animales antes del inicio de la dosis (Semana -1) y semanalmente durante el estudio. Se midió el consumo de alimentos y se registró para los principales animales del estudio semanalmente. Se realizaron exámenes oftalmoscópicos en los principales animales del estudio antes de la prueba y antes de las autopsias terminal y de recuperación. Se recogieron muestras de sangre para las evaluaciones de patología clínica designadas de los principales animales del estudio al final de la Semana 4

y en las autopsias terminal y de recuperación. Se recogieron muestras de orina para las evaluaciones del análisis de orina de los principales animales del estudio antes de las autopsias terminal y de recuperación. Se recogieron muestras de sangre para la determinación de las concentraciones plasmáticas del fármaco de animales TK designados en momentos de tiempo designados en el Día 1, Semana 4 y Semana 13. Después de la extracción de sangre final, los animales TK se sacrificaron y se desecharon los esqueletos. Al final de los periodos terminal y de recuperación, se realizaron los exámenes de autopsia, se registraron los pesos de órganos y los tejidos seleccionados se examinaron microscópicamente.

Estudio de toxicidad oral y toxicocinético de 13 semanas de CEP-28122 en monos cinomolgos con un periodo de recuperación de 6 semanas

Se prepararon semanalmente disoluciones de CEP-28122 por disolución de un ácido mono-metanosulfónico de CEP-28122, sal de mono-HCl, en agua estéril para inyección (SWFI) para lograr los niveles de concentración de dosis deseada.

Cuarenta monos cinomolgos experimentalmente sin tratamiento previo (20 machos y 20 hembras), 2,5 a 4,4 años de edad para los machos y 2,5 a 4,0 años de edad para las hembras, y que pesaban 2,1 a 3,3 kg para los machos y 2,0 a 3,1 kg para las hembras al comienzo (Día -1) del estudio, se asignaron a uno de los tres grupos de dosis y un grupo de control de vehículo. Se asignaron cinco animales/sexo a cada grupo de dosis y se administraron con dosis orales diarias de 0 (vehículo), 20, 40 u 80 mg/kg durante hasta 91 días. Debido a la aparición de convulsiones en varios animales administrados con 80 mg/kg/día durante las dos primeras semanas de dosificación, la dosis alta se redujo a 60 mg/kg/día. Se programaron tres animales/sexo/grupo para sacrificio al final del periodo de dosificación (Día 92) y dos animales/sexo/grupo se asignaron a una fase de recuperación sin dosificación de 6 semanas y se sacrificaron en el Día 134.

Los animales se evaluaron para cambios en signos clínicos (observaciones en el laboratorio y consumo de alimentos [dos veces al día] y observaciones después de la dosis [1-2 horas después de la dosis en cada día de dosificación]), peso corporal (Semanas -2 y -1, y semanalmente a partir de aquí empezando en el Día 7, y antes de la autopsia), electrocardiogramas, exámenes oftálmicos y mediciones de la tensión arterial (pre-estudio y en las Semanas 1, 4 y 13), mediciones ecocardiográficas (Semana 11), índice de patología clínica, que incluye química del suero, hematología y coagulación (en el plazo de una semana antes del inicio de la dosificación y cerca del fin de las Semanas 1, 4, 10 y 13; y de los restantes animales cerca del fin del periodo de recuperación; y troponina I (pre-estudio; antes de las dosis y 2, 4 y 24 horas tras una dosis en las Semanas 1, 4 y 13, y en un único momento de tiempo cerca del fin de la fase de recuperación). Las muestras de orina para el análisis de orina solo se obtuvieron por punción de la vejiga durante la autopsia. Las muestras de orina para el análisis de orina y el análisis de la química de la orina también se obtuvieron por drenaje de recipientes de jaula de acero inoxidable especiales en las Semanas -1, 1, 4 y 13, y de los restantes animales cerca del fin del periodo de recuperación.

Se recogieron muestras de sangre para el análisis toxicocinético en diversos momentos de tiempo en el Día 1 y durante las Semanas 4 y 13. Se sacrificaron veintinueve animales (3/sexo/Grupo 1, 2 machos/3 hembras/Grupo 2, 3 machos/2 hembras/Grupo 3 y 2 machos/3 hembras/Grupo 4) un día después de la última dosis. Los 14 animales restantes (2/sexo de cada uno de los Grupos 1 y 2, 1 macho/2 hembras/Grupo 3, y 2 machos/1 hembra/Grupo 4) continuaron en el estudio sin dosificación adicional, y se sacrificaron aproximadamente 6 semanas después de la última dosis. Tras el sacrificio, se realizó una autopsia completa en todos los animales, y se recogieron tejidos, se preservaron, se procesaron y se examinaron microscópicamente por un patólogo veterinario certificado por el Colegio Americano de Patólogos Veterinarios.

Estudio de toxicidad oral y toxicocinético de 4 semanas de CEP-28122 en monos cinomolgos con un periodo de recuperación de 4 semanas

Se administró CEP-28122 (mono-metanosulfonato, sal de mono-HCl) mediante sonda nasogástrica oral a grupos de monos cinomolgos (5/sexo/grupo) a niveles de dosis de 0 (control de vehículo), 3, 10, 20 o 40 mg/kg/día. Tras el periodo de tratamiento de 4 semanas, se sacrificaron 3 animales/sexo/grupo y 2 animales/sexo/grupo entraron en un periodo de recuperación libre de tratamiento de 4 semanas.

Se evaluaron los siguientes parámetros y puntos finales en este estudio: signos clínicos (comprobaciones de mortalidad/moribundidad, observaciones en el laboratorio y consumo de alimentos, y observaciones post-dosis), pesos corporales, exámenes físicos veterinarios, evaluaciones pulmonares, oftalmología, electrocardiografía, mediciones de tensión arterial y de frecuencia cardíaca, parámetros de patología clínica (hematología, coagulación, química clínica, análisis de orina, química de la orina y análisis de troponina I), parámetros toxicocinéticos, resultados del examen macroscópico de la autopsia, pesos de órganos y exámenes histopatológicos.

Estudio de toxicidad oral y toxicocinético de 4 semanas de CEP-37440 en ratas Sprague-Dawley con un periodo de recuperación de 4 semanas

Se asignaron ratas macho y hembra (15/sexo/grupo) a 4 grupos tratados, y un grupo de control de vehículo (agua de ósmosis inversa de pH ajustado) y se administró CEP-37440 como la sal de triclorhidrato dihidratada como se indica en la siguiente tabla. Los animales se dosificaron mediante sonda nasogástrica oral.

Grupo ^a	Subgrupo ^b	No. De animales		Nivel dosis ^{c,d} (mg/kg/día)
		Masculino	Femenino	
1 (control)	1 (Toxicidad)	15	15	0
	2(Toxicocinética)	3	3	0
2 (Bajo)	1 (Toxicidad)	15	15	1
	2(Toxicocinética)	9	9	1
3 (Medio)	1 (Toxicidad)	15	15	3
	2(Toxicocinética)	9	9	3
4 (Medio-alto)	1 (Toxicidad)	15	15	10
	2(Toxicocinética)	9	9	10
5 (alto)	1 (Toxicidad)	15	15	30
	2(Toxicocinética)	9	9	30
a El grupo 1 recibió el control del vehículo (agua RO pH ajustado) solamente.				
b animales de toxicidad designados para el sacrificio de recuperación (hasta cinco animales / sexo en los Grupos 1, 2, 3, 4, y 5) se sometieron a 4 semanas de recuperación después de la administración de la última dosis.				
c No expresados como base libre.				
d The dose volume was 10 mL/kg.				

La evaluación de toxicidad se basó en la mortalidad, observaciones clínicas, pesos corporales, cambios del peso corporal, consumo de alimentos, exámenes oftálmicos y patología clínica y anatómica. Se recogieron muestras de sangre para evaluaciones toxicocinéticas.

Estudio de toxicidad oral y toxicocinético de 4 semanas de CEP-37440 en monos cinomolgos con un periodo de recuperación de 4 semanas

Se asignaron monos cinomolgos macho y hembra (*Macaca fascicularis*) a 4 grupos (3 tratados y un grupo de control de vehículo) que consistían en 5 monos/sexo/grupo. Los niveles de dosis evaluados en este estudio fueron 0 (agua de ósmosis inversa de pH ajustado), 2,5, 7,5 y 20 mg/kg/día. El volumen de dosis fue 5 ml/kg. Se administró CEP-37440 como la forma de sal de triclorhidrato dihidratado. Después de completarse la fase de dosis, se sacrificaron 3 monos/sexo/grupo y 2 monos/sexo/grupo continuaron en una fase de recuperación libre de tratamiento durante 4 semanas adicionales.

Estudios de eficacia antitumoral - Protocolo general

Se aleatorizaron ratones portadores de tumor en diferentes grupos de tratamiento (8-10 ratones/grupo) y se administraron por vía oral con tanto vehículo (PEG-400) como compuesto de prueba formulado en PEG-400 a las dosis indicadas (expresadas como mg/kg equivalentes de base libre) y con la frecuencia de dosificación indicada (bid o qid), con 100 µl por volumen de dosificación. Se midió la longitud (L) y anchura (W) de cada tumor con un compás calibrador Vernier y el peso corporal del ratón se determinó cada 2-3 días. Los volúmenes tumorales se calcularon entonces con la fórmula de $0,5236 * L * W * (L+W) / 2$. Se llevaron a cabo análisis estadísticos de volúmenes tumorales y peso corporal del ratón usando la prueba de Mann-Whitney para datos independientes. Se obtuvieron muestras de plasma y tumorales 2 horas después de la dosis final a cada nivel de dosis, y se midieron los niveles de compuesto en lisados plasmáticos y de tumor por CL-EM/EM.

Eficacia antitumoral en modelos de xenoinjerto de tumor ALCL Sup-M2 y Karpas-299 NPM-ALK positivo en ratones

Se administra CEP-37440 p.o. en PEG400 qd o bid a ratones que contienen xenoinjertos de tumor ALCL Sup-M2 NPM-ALK positivos durante 12 días. También se evaluó la eficacia antitumoral de CEP-37440 (sal de HCl amorfa) en un segundo modelo de xenoinjerto de tumor NPM-ALCL ALK-positivo más resistente (Karpas-299) en ratón Scid.

Actividad antitumoral en xenoinjertos de tumor NSCLC EML4-ALK positivo (NCI-H2228 y NCI-H3122) en ratones con dosificación oral

Se cultivaron líneas de células de cáncer de pulmón humano, NCI-H2228 y NCI-H1650 (ATCC, Manassas, VA) y NCI-H3122 (amablemente proporcionada por Dr. Giorgio Inghirami, Univ. de Turín, Italia), en medio RPMI-1640 complementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS, Cat N.º SH3007003, Hyclone, Logan, UT). Las células NCI-H2228 alojan la variante de EML4-ALK 3a/b y las células NCI-H3122 contienen la variante 1 de EML4-ALK, determinada por hibridación por fluorescencia *in situ* y PCR de transcripción inversa como se ha indicado

previamente (Koivunen JP, Mermel C, Zejnullahu K, Murphy C, Lifshits E, Holmes AJ, et al. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. Clin Cancer Res 2008, 14:4275-8).

5 Generación de xenoinjertos de tumor subcutáneos de NSCLC EML4-ALK-positivo y EML4-ALK-negativo en ratones Scid. Se mantuvieron ratones Scid hembra/beis (6-8 semanas, Taconic, Hudson, NY) 5/jaula en unidades microaisladoras con una dieta de laboratorio estándar (Teklad Labchow, Harlan Teklad, Madison, WI). Los animales se alojaron bajo condiciones controladas de humedad y temperatura y el ciclo de luz/oscuridad se estableció a intervalos de 12 horas. Los ratones se pusieron en cuarentena al menos 1 semana antes de la manipulación experimental. Todos los estudios en animales se realizaron bajo el protocolo (#03-023) autorizado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC) de Cephalon, Inc. Brevemente, se recogieron células de NSCLC EML4-ALK-positivo y negativo y se resuspendieron en medio RPMI-1640 a la densidad de 5×10^7 /ml. Una alícuota (100 μ l) de la suspensión de células (5×10^6 células) se inoculó subcutáneamente en el flanco izquierdo de cada ratón con una aguja 23G (23G1, Cat N.º 305145, Becton Dickinson, Franklin, NJ). Los ratones se monitorizaron hasta que los volúmenes del xenoinjerto tumoral alcanzaron 200-500 mm³.

15 Los ratones portadores de tumor se aleatorizaron en diferentes grupos de tratamiento (8-10 ratones/grupo) y se administraron con tanto vehículo (PEG-400) como la forma de HCl amorfa de CEP-37440 formulada en PEG-400 a las dosis indicadas, bid, con 100 μ l por volumen de dosificación. Se midió la longitud (L) y anchura (W) de cada tumor con un compás calibrador Vernier y el peso corporal del ratón se determinó cada dos a tres días. Los volúmenes tumorales se calcularon con la fórmula de $0,5236 * L * W * (L+W)/2$. Se calculó el porcentaje de inhibición tumoral (% de TGI) del siguiente modo: (volumen tumoral del grupo de control al final del tratamiento - volumen tumoral del grupo tratado al final de tratamiento)/volumen tumoral del grupo de control al final de tratamiento. Se definió la regresión tumoral parcial (PR) como el volumen tumoral del grupo tratado al final de tratamiento que es inferior al del grupo tratado al inicio del tratamiento. Se definió la regresión tumoral completa (CR) como el volumen tumoral del grupo tratado al final de tratamiento que es inferior al 5 % del volumen tumoral del grupo tratado al inicio del tratamiento. Se llevaron a cabo análisis estadísticos de volúmenes tumorales y peso corporal del ratón con la prueba de Mann-Whitney para datos independientes. Se obtuvieron muestras de plasma y tumorales 2 horas después de la dosis final a cada nivel de dosis, y se midieron los niveles de compuesto en lisados plasmáticos y de tumor por CL-EM/EM.

30 Estudios de eficacia antitumoral en xenoinjertos de tumor humano de carcinoma de próstata independiente de hormonas, carcinoma NSCL y carcinoma HNSC

35 Se obtuvieron las líneas celulares de carcinoma de próstata humano, CWR22 y PC3, y la línea celular de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello humano Detroit 562 de la Colección Americana de Cultivos de Tejido (ATCC, Manassas, VA). Se cultivaron células CWR22 en RPMI (ATCC, Cat N.º 30-2001) complementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS, Cat N.º SH3007003, Hyclone Laboratory Inc, Logan, UT), se cultivaron PC3 en medio F12 (ATCC, Cat N.º 30-2004) complementado con 10 % de FBS y se cultivaron Detroit 562 en EMEM (ATCC, Cat N.º 30-2003) complementado con 10 % de FBS. También se compraron la línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas humano HCC-827 y la línea de células de cáncer de mama humano BT474 de la ATCC (Manassas, VA) y se cultivaron en RPMI (Cat N.º 10-040, Mediatech Inc, Manassas, VA) con 10 % de FBS. Se compraron los anticuerpos fosfo-FAK (Tyr397) (Cat N.º 3283) y FAK (Cat N.º 3285) de conejo de Cell Signaling Technology (Beverly, MA).

45 Generación de xenoinjertos de tumor humano subcutáneo en ratones hembra SCID/beis o Nu/Nu. Se mantuvieron ratones SCID/beis (6-8 semanas, Taconic, Hudson, NY) o Nu/Nu (6-8 semanas, Charles River Laboratory, Wilmington, MA) 5/jaula en unidades microaisladoras con una dieta de laboratorio estándar (Teklad Labchow, Harlan Teklad, Madison, WI). Los animales se alojaron bajo condiciones controladas de humedad y temperatura y el ciclo de luz/oscuridad se estableció a intervalos de 12 horas. Los ratones se pusieron en cuarentena al menos 1 semana antes de la manipulación experimental. Los experimentos fueron autorizados (Protocolo 03-023) por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Cephalon, Inc. Brevemente, las células se recogieron y se resuspendieron en medio RPMI a la densidad de 5×10^7 /ml y una alícuota (100 μ l) de la suspensión de células (4×10^6 o 5×10^6 células) se inoculó subcutáneamente en el flanco izquierdo de cada ratón con una aguja 23G (23G1, Cat N.º 305145, Becton Dickinson, Franklin, NJ). Entonces los ratones se monitorizaron diariamente.

55 Los ratones portadores de tumor se aleatorizaron en diferentes grupos de tratamiento (8-10 ratones/grupo) y se administraron con tanto vehículo (PEG-400) como CEP-37440 formulada en PEG-400 a las dosis indicadas (expresadas como mg/kg equivalentes de base libre) y con frecuencia de dosificación indicada, con 100 μ l por volumen de dosificación. Se midió la longitud (L) y anchura (W) de cada tumor con un compás calibrador Vernier y el peso corporal del ratón se determinó cada 2-3 días. Los volúmenes tumorales se calcularon entonces con la fórmula de $0,5236 * L * W * (L+W)/2$. Se llevaron a cabo análisis estadísticos de volúmenes tumorales y peso corporal del ratón usando la prueba de Mann-Whitney para datos independientes. Se obtuvieron muestras de plasma y tumorales 2 horas después de la dosis final a cada nivel de dosis, y se midieron los niveles de compuesto en lisados plasmáticos y de tumor por CL-EM/EM. Los valores de TGI se calcularon al final del estudio comparando los volúmenes tumorales (TV) de cada grupo de tratamiento con CEP-37440 con aquellos del grupo tratado con vehículo con la

siguiente fórmula: $[\frac{\text{TV del último día del grupo tratado con compuesto}}{\text{TV del último día del grupo tratado con vehículo}}] \times 100$.

VII. Resultados

Los datos biológicos para CEP-37440 y CEP-28122 se resumen en la **Tabla 3** y se presentan y tratan a continuación.

Tabla 3. Resumen de datos para CEP-37440 y CEP-28122

Actividad	CEP-37440	CEP-28122
ALK encimática IC ₅₀ (nM)	3.5	3
ALK celular IC ₅₀ (nM)	40	30
ALK celular IC ₅₀ en 75% murina	200	300
Plasma (nM)		
ALK celular IC ₅₀ en 75% plasma humano (nM)	120	300
FAK encimática IC ₅₀ (nM)	2.3	29.5
FAK celular IC ₅₀ (nM)	82	944
IR encimática IC ₅₀ (nM)	66	996
IR/ALK encimática IC ₅₀ tasa	19	332
IR celular IC ₅₀ (nM)	2000	>10.000
IR/ALK celular IC ₅₀ tasa	50	>333
Selectividad Kinasa – 442 kinasas (ámbito KINOMEscan profiling @ 1 µM)	S(80): 0.131; S(90): 0.084; S(99): 0.016	S(80): 0.172; S(90): 0.125; S(99): 0.016
Selectividad de receptor (Cerep) (Ki, µM)	Histamina H2 = 5.2; Muscarinico: M1 = 2.46, M2 = 2.0, M3 = 3.5, M4 = 0.46; Neurokinina: NK1 = 1.2; Serotonina: 5-HT1 B = 3.3; DA transportador = 2.1	Adrenergic α 1B (R), 2.2; Adrenergic α 1D (H), 1.1
Pinzamiento zonal hERG (IC ₅₀ , µM)	>10	>10
Equilibrio de solubilidad en pH 2/pH 7.4 (mg/mL)	>1/0.28	>3/0.013
cLog D _{7.4}	2.95	3.9
Estabilidad metabólica in vitro (t _{1/2} , min)	>40 (M), >40 (R), 21 (Mo), >40 (H)	13.2 (M), 6.7 (R), 19.9 (D), <5 (Mo), 10.3 (H)
Inhibición CYP (IC ₅₀ , µM)	1A2: >30; 2C9: >30; 2C19: >20; 2D6: >30; 3A4: 5	1A2: >30; 2C9: 1.3; 2C19: 6.8; 2D6: 17.3; 3A4: 1.1
CYP3A4 induccion in vitro (pliegue)	1.5 @ 10 µM	0.95 @ 0.3 µM; 1.3 @ 3.0 µM; 2.0 @ 10 µM
Caco-2 P _{app} x10 ⁻⁶ cm/s (PDR)	1.26 (PDR: 4.7)	12.6 (PDR: 3.6)
Fusión de Proteína (% pliegue)	85 (M), 94 (D), 95 (H)	95 (M), 96 (D), 99.2 (H)
Biodisponibilidad rata	>42%	25%
Biodisponibilidad ratón	102% (CD-1), 99% (Scid)	51% (CD-1), 71% (Scid)
Biodisponibilidad mono	50% @ 10mg/kg, 74% @ 30 mg/kg	16% @ 10mg/kg, 37% @ 30 mg/kg
- estabilidad metabólica / proteína de unión: ratón, (O) rata, (Mo) mono, (H) humana, (D) perro (M)		
- biodisponibilidad de ratón y mono para el experimento PAC-37440 se realizaron con el CEP-37440 SAL HCl amorfa		

Estos datos indican que tanto CEP-37440 como CEP-28122 son potentes inhibidores de ALK. Sin embargo, CEP-37440 es ventajoso en comparación con CEP-28122 porque CEP-37440 es un inhibidor de FAK mucho más potente, tiene unión a proteína reducida y elevada actividad en plasma humano, elevada solubilidad intrínseca (facilita la absorción), reducida lipofilia (mayor lipofilia se ha asociado a elevada toxicidad), elevada estabilidad metabólica (facilita mayor concentración en sangre a menores dosis, que reduce la carga xenobiótica en el cuerpo - menos exposición a fármaco y metabolitos y menos presión sobre el sistema metabólico, por ejemplo, hígado), tiene capacidad reducida para la interacción fármaco-fármaco debido a la reducida inhibición de P450, particularmente con respecto a CYP3A4 y CYP2C9 (reducida interferencia con el metabolismo normal y eliminación de fármacos co-

administrados), y posee biodisponibilidad oral mejorada y una menor tasa de eliminación *in vivo* (mayores concentraciones en sangre a menores dosis). Las propiedades favorables de CEP-37440 en comparación con CEP-28122 son sorprendentes e inesperadas.

5 Estudio de toxicidad oral y toxicocinético de 13 semanas de CEP-28122 en ratas Sprague-Dawley, que incluye un periodo de recuperación de 4 semanas

10 No hubo muertes relacionadas con el fármaco durante el estudio ni efectos relacionados con el fármaco sobre el peso corporal, consumo de alimentos o concentraciones de troponina cardíaca. Los efectos relacionados con el fármaco sobre los parámetros de hematología se limitaron a reducciones mínimas no adversas en eritrocitos, hemoglobina y hematocrito en hembras y aumentos mínimos no adversos en plaquetas en ambos sexos. Se observaron otras diferencias estadísticas y se consideraron no significativas debido a la magnitud o dirección de cambio, y/o la ausencia de dependencia de la dosis.

15 Las plaquetas siguieron estando ligeramente elevadas en machos y hembras a 150 mg/kg/día en la recuperación. Los posibles efectos relacionados con el fármaco sobre los parámetros de la coagulación se limitaron a la prolongación del tiempo de protrombina (PT) y el tiempo de tromboplastina parcial (APTT) en machos que recibieron 150 mg/kg/día y el acortamiento de AP y APTT en hembras a todos los niveles de dosis (los valores para hembras siguieron dentro de los intervalos esperados). No hubo cambios significativos evidentes al final del periodo de recuperación.

20 Los cambios relacionados con el fármaco en los parámetros de química clínica se limitaron a aumentos moderados, pero inconsistentes, en alanina aminotransferasa (ALT), bilirrubina total, aspartato aminotransferasa (AST), γ -glutamilttransferasa (GGT) y sorbitol deshidrogenasa (SDH) entre los machos que recibieron ≥ 75 mg/kg/día. Estos efectos fueron más pronunciados al final del periodo de dosificación de 13 semanas que en el momento de la recogida de muestras provisional de 4 semanas y fueron principalmente atribuibles a efectos en un único animal. AST y ALT también aumentaron en las hembras que recibieron 150 mg/kg/día, pero estos efectos fueron generalmente de magnitud mucho menor que los observados en los machos. En particular, las hembras también presentaron un aumento estadísticamente significativo, dependiente de la dosis y progresivo en colesterol a todos los niveles de dosis. Al final del periodo de recuperación, AST, ALT y SDH siguieron siendo elevados en los machos individuales que habían recibido 75 mg/kg/día durante el periodo de dosificación. AST, ALT y SDH siguieron siendo moderadamente elevados en los machos que habían recibido 150 mg/kg/día durante la dosificación y, a una menor magnitud, en las hembras que habían recibido 150 mg/kg/día durante la dosificación.

35 La proteína total y globulinas fueron elevadas dependientemente de la dosis en machos que recibieron ≥ 75 mg/kg/día y en hembras que recibieron ≥ 30 mg/kg/día. La albúmina también fue estadísticamente elevada en hembras que recibieron ≥ 75 mg/kg/día, pero los valores siguieron dentro de los intervalos esperados. Los aumentos estadísticos en el calcio se consideraron secundarios a la elevada albúmina, y proteína total. Se observaron otras diferencias estadísticas esporádicas en el sacrificio y se consideraron no significativas debido a la magnitud o dirección de cambio, y/o la falta de dependencia de la dosis. No hubo efectos de la dosificación sobre la proteína total, globulina, albúmina, o calcio al final del periodo de recuperación.

40 Los volúmenes de orina aumentaron y la gravedad específica disminuyó en machos y hembras a 150 mg/kg/día en el sacrificio. No se observaron otros cambios sorprendentes en el análisis de los parámetros de orina en el sacrificio o la recuperación.

45 Se observaron elevados pesos del hígado (con respecto a controles) en hembras que recibieron ≥ 30 mg/kg/día y en machos que recibieron ≥ 75 mg/kg/día (los machos también tuvieron reducidos pesos del timo con respecto al control a 75 mg/kg/día). Se observaron elevados pesos de riñón, bazo y glándulas suprarrenales en ambos sexos a las dosificaciones ≥ 75 mg/kg/día. Los pesos del corazón pesos también aumentaron moderadamente a dosificaciones ≥ 75 mg/kg/día. Sin embargo, debido a que no hubo resultados microscópicos correlativos en el corazón, la significancia toxicológica de este hallazgo no está clara. Los efectos en el riñón, corazón y bazo de los machos persistieron hasta el fin del periodo de recuperación de cuatro semanas. No hubo efectos relacionados con el fármaco persistentes evidentes en hembras. Al final del periodo de dosificación de 13 semanas, se observó alteración del color marrón o negra de los riñones macroscópicamente en machos que recibieron 150 mg/kg/día y en hembras que recibieron 75 mg/kg/día. Un macho que recibió 150 mg/kg/día tuvo foco/focos en los riñones que se correlacionaron microscópicamente con el pigmento tubular al final de la recuperación. Al final del periodo de dosificación de 13 semanas, las alteraciones microscópicas relacionadas con el fármaco fueron evidentes en los riñones, glándulas suprarrenales, hígado, pulmón, tejido adiposo marrón, ganglio linfático mesentérico, bazo y glándulas tiroideas de animales que recibieron ≥ 30 mg/kg/día. No se considera que los resultados en las glándulas suprarrenales, hígado, pulmón, tejido adiposo marrón, ganglio linfático mesentérico, bazo y glándulas tiroideas sean adversos debido a la baja gravedad y considerable evidencia de recuperación durante el periodo de recuperación de 4 semanas. Se consideró que la neuropatía progresiva, evidente en los riñones de animales que recibieron ≥ 75 mg/kg/día, era adversa debido a la alta prevalencia y persistencia durante todo el periodo de recuperación de 4 semanas. También fue evidente pigmentación, que se supone que es fármaco acumulado, en varios tejidos en la

recuperación, pero no se considera que sea adversa.

La hinchazón de mínima a leve de fibras lenticulares, especialmente en la corteza axial subcapsular, fue evidente en animales en recuperación que recibieron ≥ 75 mg/kg/día durante el periodo de dosificación. Este hallazgo se correspondió con la catarata clínica en estos animales. Hinchazón de las fibras del cristalino; sin embargo, puede ser un artefacto de fijación con fluido de Davidson resultante de la hinchazón de células asociada al ácido acético. La hinchazón de las fibras del cristalino en la región cortical subcapsular se observó en animales tratados (incluyendo los animales enumerados anteriormente y otros animales tratados sin registro de catarata clínica) y, a un menor grado, en algunos animales de control en este estudio. Adicionalmente, la hinchazón de las fibras del cristalino en un patrón cortical anterior circunferencial se observó en algunos animales tratados a 75 y 150 mg/kg/día, pero sin resultados oftalmoscópicos correspondientes, este hallazgo se consideró un artefacto secundario a la fijación de Davidson. Por estos motivos, la hinchazón de las fibras del cristalino observada en este estudio se interpretó como un artefacto, y no se registró como un hallazgo microscópico. Sin embargo, no puede excluirse completamente la posibilidad de un cambio real antes de la muerte que fuera enmascarado por los artefactos.

Basándose en los resultados observados anteriormente, el nivel de efectos adversos no observables (NOAEL) para este estudio se consideró que era 30 mg/kg/día, limitado por los efectos histopatológicos adversos en el riñón que persistieron durante todo el periodo de recuperación de 4 semanas a dosificaciones ≥ 75 mg/kg/día.

Estudio de toxicidad oral y toxicocinético de 13 semanas de CEP-28122 en monos cinomolgos con un periodo de recuperación de 6 semanas

La administración de CEP-28122 mediante sonda nasogástrica diaria durante 91 días consecutivos a niveles de dosis de 20, 40 y 80/60 mg/kg produjo varios acontecimientos adversos relacionados con el fármaco a todos los niveles de dosis que incluyen morbilidad y mortalidad en dos animales dosificados con 80/60 mg/kg y probablemente dos animales adicionales (un dosificado con 40 mg/kg y el otro dosificado con 20 mg/kg). Hubo un animal adicional que se sometió a autopsia temprana; sin embargo, esto no estuvo relacionado con la administración de CEP-28122. La administración de 80 mg/kg produjo convulsiones para 2 animales en los días 9 y/o 10 y condujo a un nivel de reducción de dosis a 60 mg/kg en todos los animales dentro de este grupo. No hubo cambios relacionados con CEP-28122 en el consumo de alimentos, peso corporal, exámenes oftálmicos, parámetros de la coagulación, parámetros del análisis de orina y frecuencia cardíaca, y no hubo cambios definitivos relacionados con CEP-28122 en la tensión arterial o troponina I.

La historia clínica para los animales que se sometieron a autopsia temprana podría generalmente dividirse en dos categorías: 1) animales que tuvieron una disminución gradual en el estado de salud durante varios días/semanas, y 2) animales que parecía que clínicamente estaban tolerando el fármaco hasta poco después de la dosificación en el día de la autopsia temprana. Para los animales en la primera categoría, hubo cambios de patología clínica sugerentes de coagulopatía, respuesta de fase aguda, deshidratación grave y/o toxicidad hepática, mientras que los animales en la última categoría estuvieron esencialmente ausentes de cambios de patología clínica. Aunque hubo una historia clínica de morbilidad rápida (en el plazo de 1-3 minutos desde la dosificación) y muerte (en el plazo de 15 minutos desde la dosificación) dentro de la categoría 2 de animales, que fue sugerente de instilación o aspiración de fármaco en los pulmones, la administración de dosis en los pulmones no pudo identificarse basándose en la histopatología. El motivo para la rápida aparición de morbilidad/mortalidad fue incapaz de ser determinado, pero no pudo excluirse la absorción de fármaco de los pulmones.

En los animales de muerte temprana, los resultados histopatológicos relacionados con el fármaco se identificaron en el pulmón, hígado, bazo, ganglio linfático mesentérico y riñón. En el pulmón se identificaron resultados del examen macroscópico e histológicos de acuerdo con el edema pulmonar en todos los grupos de dosis y fueron generalmente más graves que los resultados, si los hubo, en animales que sobrevivieron hasta el Día 92 o 134.

En los animales supervivientes hubo signos clínicos relacionadas con CEP-28122 presentes de todos los niveles de dosis (20, 40 y 80/60 mg/kg) e incluyeron: vómito, actividad reducida, aspecto encorvado y heces acuosas. En general, estos signos clínicos no fueron dependientes de la dosis (con la excepción de las heces acuosas). Estos signos clínicos no se detectaron durante la fase de recuperación del estudio. Hubo alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) elevada relacionada con CEP-28122 en animales dosificados con 80/60 mg/kg, sugerente de efectos hepáticos; sin embargo, estos valores volvieron al nivel inicial al final del periodo de recuperación. No hubo correlativos histológico definitivos en el hígado.

Los cambios relacionados con CEP-28122 en los parámetros de hematología se limitaron a una disminución en los linfocitos en animales dosificados con 80/60 mg/kg que empezó en el Día 28 y persistió durante todos los momentos de tiempo restantes durante la fase de dosificación del estudio. Los recuentos de linfocitos habían vuelto al nivel inicial al final del periodo de recuperación.

En el Día 92, los resultados histopatológicos relacionados con el fármaco se identificaron en el pulmón, hígado, bazo, ganglio linfático mesentérico y riñón. Los resultados histológicos de acuerdo con el edema pulmonar y lesión

pulmonar más crónica similar a aquella identificada en animales de muerte temprana se observaron en el Día 92 y 134, no fueron proporcionales a la dosis, y fueron generalmente de menor incidencia y/o gravedad que los animales de muerte temprana. La granularidad eosinófila proporcional a la dosis dentro de macrófagos en el hígado, bazo y ganglios linfáticos mesentéricos se identificó normalmente en animales administrados con 40 y 80/60 mg/kg de CEP-28122, con la inclusión de cambio mínimo en un animal administrado con 20 mg/kg de CEP-28122. Este hallazgo se asoció a necrosis de célula única hepatocelular en el hígado de un animal de alta dosis, pero la elevada incidencia del último en el Día 134 y su asociación con el cambio de la granularidad eosinófila sugirió una asociación con la administración del fármaco. El pigmento granular marrón proporcional a la dosis dentro del epitelio tubular del riñón se identificó en todos los grupos de tratamiento con fármaco, fue de mínimo a leve, a diferencia de mínimo a moderado en animales de muerte temprana, y no se asoció a degeneración/necrosis de epitelio tubular.

En el Día 92 se identificaron aumentos en los pesos de órganos y/o relaciones relacionadas con la administración de CEP-28122 para el hígado, pulmón y riñón de animales macho administrados con 40 y 80/60 mg/kg de CEP-28122 (hígado y riñón), y 20, 40 y 80/60 mg/kg de CEP-28122 (pulmón). Estos aumentos se correlacionaron con la granularidad eosinófila dentro de células de Kupffer y hepatocitos en el hígado, edema pulmonar en el pulmón y acumulación de pigmento marrón en el epitelio tubular en el riñón.

En el Día 134, los resultados histopatológicos relacionados con el fármaco se identificaron en el pulmón, hígado, bazo, ganglios linfáticos mesentéricos y mandibulares, y riñón. Los cambios histológicos de acuerdo con el edema pulmonar fueron persistentes con gravedad similar, pero ligeramente reducida, en todos los grupos de dosis en comparación con animales de autopsia terminal, y fueron similarmente no proporcionales a la dosis. El cambio mínimo de acuerdo con la lesión pulmonar más crónica estuvo presente en un animal de dosis alta.

La granularidad eosinófila dentro de macrófagos en el hígado, bazo y ganglios linfáticos mesentéricos y mandibulares se identificó normalmente en animal(es) administrado(s) con 40 y/o 80/60 mg/kg de CEP-28122, y fue proporcional a la dosis cuando más de un grupo estuvo afectado, con la excepción del bazo. Este cambio en el hígado fue más grave en general que aquel en el Día 92. Para el bazo, se redujo en gravedad en comparación con el Día 92 para el grupo de 80/60 mg/kg y de gravedad variable en manifestaciones individuales en los grupos de 20 y 40 mg/kg. El grado de pigmentación granular marrón dentro de áreas de granularidad eosinófila dentro del hígado y bazo fue generalmente elevado para estos grupos de recuperación en comparación con momentos de tiempo anteriores. En comparación con el Día 92, el pigmento granular marrón proporcional a la dosis dentro de células epiteliales tubulares del riñón fue generalmente persistente, pero menos grave en animales administrados con 40 mg/kg de CEP-28122, y persistente y más grave en animales administrados con 80/60 mg/kg de CEP-28122. La mínima degeneración/necrosis de epitelio tubular se identificó en algunos animales administrados con 80/60 mg/kg de CEP-28122 con la acumulación de pigmento más grave.

En el Día 134 se identificaron aumentos en los pesos de órganos y/o relaciones relacionadas con la administración de CEP-28122 en hembras para el hígado y riñón, fueron en animales administrados con 40 y/o 80/60 mg/kg de CEP-28122, y se correlacionaron similarmente como en animales de autopsia terminal.

El edema pulmonar fue un problema significativo en este estudio. En muchos casos, la aparición de edema pulmonar fue asintomática antes del rápido deterioro y mortalidad. Adicionalmente, no hubo componente cardiovascular perceptible a la aparición del edema pulmonar, clasificándose así este hallazgo como edema pulmonar no cardiogénico. La rápida aparición y ausencia de un efecto cardiovascular haría muy difícil de diagnosticar o prevenir el edema pulmonar en un ámbito clínico, convirtiendo el CEP-28122 en inseguro para uso humano.

Estudio de toxicidad oral y toxicocinético de 4 semanas de CEP-28122 en monos cinomolgos con un periodo de recuperación de 4 semanas

La administración de CEP-28122 por sonda nasogástrica oral una vez al día durante 4 semanas a niveles de dosis de 3, 10, 20 y 40 mg/kg/día no produjo ninguna morbilidad o mortalidad. No hubo efectos relacionados con CEP-28122 sobre el consumo de alimentos, pesos corporales, el pulmón (mediante auscultación), ECG oculares, tensión arterial, frecuencia cardíaca, hematología, coagulación, análisis de orina, química de la orina, troponina I, u observaciones de patología macroscópicas a ningún nivel de dosis evaluado.

Los efectos histológicos relacionados con CEP-28122 se produjeron a niveles de dosis ≥ 10 mg/kg/día. Estos resultados consistieron en aumentos mínimos o leves, multifocales, en células vacuoladas dentro del pulmón (supuesto epitelio alveolar) y mínima hiperplasia de neumocitos tipo II (nivel de dosis de 20 mg/kg/día solo). Las elevadas células vacuoladas se correlacionaron con un aumento del peso del pulmón y relaciones de peso del pulmón de animales a niveles de dosis ≥ 10 mg/kg/día, pero no se correlacionaron con ninguna observación clínica o resultados pulmonares clínicos mediante auscultación. Tras un periodo de recuperación de 4 semanas, el aumento en las células vacuoladas dentro de los pulmones estuvo todavía presente en animales a niveles de dosis ≥ 20 mg/kg/día, no obstante con menor incidencia y/o gravedad. La resolución completa de este hallazgo se produjo al nivel de dosis de 10 mg/kg/día. La hiperplasia de neumocitos tipo II no se detectó de animales dosificados con 20 mg/kg tras el periodo de recuperación de 4 semanas, que también soportó una disminución global mínima en la

gravedad.

Los posibles efectos relacionados con CEP-28122 incluyeron después de la dosis emesis en animales a los niveles de dosis de 20 y 40 mg/kg y ligeros aumentos en los triglicéridos (nivel de dosis de 40 mg/kg solo). Estas observaciones no se detectaron durante el periodo de recuperación. Las alteraciones histopatológicas en las capas retinianas en una hembra dosificada con 10 mg/kg/día en el día 29 se consideró un efecto incierto relacionado con CEP-28122. No hubo correlatos en el examen oftálmico.

Este estudio de 4 semanas a la menor dosis demostró que no sería posible evitar la toxicidad pulmonar con CEP-28122. Fue especialmente preocupante el hecho de que el daño pulmonar estuviera ocurriendo sin signos premonitorios (auscultación). Basándose en la aparición y persistencia de la toxicidad pulmonar en los estudios de mono de las semanas 4 y 13, se concluyó que CEP-28122 era demasiado peligroso para uso humano y se terminaron los esfuerzos de desarrollo.

Estudio de toxicidad oral y toxicocinético de 4 semanas de CEP-37440 en ratas Sprague-Dawley con un periodo de recuperación de 4 semanas

No se observaron observaciones clínicas relacionadas con el fármaco durante la fase de dosificación o de recuperación. Las observaciones clínicas aparecieron bastante infrecuentemente, fueron transitorias, fueron con incidencias comparables como controles, se asociaron a animales moribundos, se asociaron a errores conocidos de la sonda nasogástrica, o se produjeron en animales cuyas muertes o sacrificios no se consideraron relacionados con el fármaco; por tanto, las observaciones clínicas no se consideraron relacionadas con el fármaco.

Machos y hembras administrados con 30 mg/kg/día ganaron menos peso que los controles durante todos los intervalos de la fase de dosificación. Durante los Días 1 a 28 de la fase de dosificación, los machos engordaron el 31 % menos que los controles. Durante los Días 1 a 28 de la fase de dosificación, las hembras engordaron el 65 % menos que los controles. Los machos y las hembras administrados con 30 mg/kg/día ganaron tanto o más peso que los controles durante todos los intervalos de la fase de recuperación. Durante los Días 1 a 28 de la fase de recuperación, los machos ganaron el 24 % más que los controles. Durante los Días 1 a 28 de la fase de recuperación, las hembras ganaron el 29 % más que los controles. Los machos y las hembras administrados con 30 mg/kg/día consumieron menos alimento que los controles durante todos los intervalos de la fase de dosificación. Estas diferencias oscilaron del 4 al 10 % menos en machos y del 12 al 24 % menos en hembras. No se observaron efectos relacionados con el fármaco sobre el consumo de alimentos durante la fase de recuperación. La disminución del peso corporal terminal medio se observó en el sacrificio terminal en machos y hembras administrados con 30 mg/kg/día (0,90x y 0,79x, respectivamente) y fue estadísticamente significativa en hembras.

No se observaron resultados oftálmicos relacionados con el fármaco durante la fase de dosificación o de recuperación. No se observaron efectos relacionados con el fármaco en los resultados de la prueba de patología clínica hasta 10 mg/kg/día. Se observaron varios efectos de la patología clínica menores a 30 mg/kg/día que fueron de magnitud de mínima a leve. Ninguno de estos resultados se consideró adverso o toxicológicamente importante.

Los resultados de hematología del fármaco y de la coagulación a 30 mg/kg/día incluyeron los siguientes.

- Masa de glóbulos rojos ligeramente menor (es decir, número de eritrocitos, hemoglobina y hematocrito) en hembras en el Día 29 de la fase de dosificación
- Recuento absoluto de reticulocitos ligeramente menor en machos en los Días 15 y 29 de la fase de dosificación y en hembras en el Día 15 de la fase de dosificación
- Recuento absoluto de neutrófilos ligeramente menor en machos en los Días 15 y 29 de la fase de dosificación
- Recuento absoluto de eosinófilos ligeramente menor en hembras en el Día 29 de la fase de dosificación
- Fibrinógeno mínimamente mayor en machos en los Días 15 y 29 de la fase de dosificación

El recuento de plaquetas pareció inafectado. Las disminuciones en la masa de glóbulos rojos, recuentos absolutos de reticulocitos, neutrófilos y eosinófilos pueden haber reflejado leve supresión/toxicidad de la médula ósea, pero no se observaron resultados de histopatología correlativos en la médula ósea. Estos resultados presentaron reversibilidad al final de la fase de recuperación. El mayor volumen corpuscular medio en hembras administradas con 30 mg/kg/día al final de la fase de recuperación fue probablemente debido a la mayor proporción de glóbulos rojos más jóvenes que normalmente son de mayor tamaño.

Los resultados de química clínica relacionados con el fármaco a 30 mg/kg/día incluyeron los siguientes.

- Albúmina ligeramente menor en hembras en el Día 29 de la fase de dosificación
- Globulina mínimamente mayor en hembras en los Días 15 y 29 de la fase de dosificación
- Relación de albúmina con respecto a globulina menor en hembras en los Días 15 y 29 de la fase de dosificación

- Colesterol mínimamente mayor en machos y hembras en los Días 15 y 29 de la fase de dosificación
- Concentración de calcio en suero ligeramente mayor en machos en el Día 29 de la fase de dosificación
- Cloruro en suero mínimamente menor en machos y hembras en el Día 29 de la fase de dosificación

5 La menor albúmina y relación de albúmina con respecto a globulina y la mayor globulina estuvieron de acuerdo con inflamación y puede haberse asociado a inflamación crónica de la cavidad torácica observada histológicamente. El mayor colesterol puede haberse asociado al reducido consumo de alimentos y al aumento de peso corporal observado en estos animales. El menor cloruro en suero fue probablemente debido a la mayor eliminación de orina. No se conoció un mecanismo para el mayor calcio. No se observó efecto relacionado con el fármaco en la concentración de troponina I a ningún nivel de dosis. Todos los resultados de química clínica presentaron reversibilidad al final de la fase de recuperación.

Los resultados de la química de la orina relacionados con el fármaco a 30 mg/kg/día incluyeron los siguientes.

- 15 • Eliminación de cloruro en orina mínimamente mayor en machos y hembras en los Días 15 y 29 de la fase de dosificación
- Eliminación fraccionaria de orina mínimamente mayor para cloruro en machos y hembras en los Días 15 y 29 de la fase de dosificación

20 El menor cloruro en suero estuvo probablemente asociado a la mayor eliminación total y mayor eliminación fraccionaria de cloruro en la orina de animales administrados con 30 mg/kg/día. No se observaron resultados de histopatología correlativos en el riñón de estos animales. Todos los resultados de química de la orina presentaron reversibilidad al final de la fase de recuperación. No se observaron efectos evidentes en los resultados de la prueba del análisis de orina a ningún nivel de dosis.

25 Diferencias estadísticamente significativas o notables de otro modo en otros resultados de prueba de patología clínica se consideraron casuales debido a que fueron de magnitud normalmente pequeña, carecieron de una relación con la dosis, o fueron inconsistentes con el tiempo y entre sexos.

30 Se produjeron siete muertes no programadas en animales por toxicidad durante la fase de dosificación. Ninguna de las muertes no programadas se atribuyó al fármaco. Un macho de control y una hembra administrados con 30 mg/kg/día murieron poco después de la extracción de sangre; éstas se consideraron muertes accidentales debido a la falta de resultados de patología clínica o anatómica sugerentes de un efecto relacionado con el fármaco. Tres animales tuvieron resultados del examen macroscópico y/o microscópico de acuerdo con lesiones relacionadas con la sonda nasogástrica, que incluyeron una hembra administrada con 1 mg/kg/día que se sacrificó en condición moribunda en el Día 25, una hembra administrada con 3 mg/kg/día que se encontró muerta en el Día 9, y una hembra administrada con 10 mg/kg/día que se sacrificó en condición moribunda en el Día 25 de la fase de dosificación. La causa de la muerte no fue evidente para un macho administrado con 30 mg/kg/día encontrado muerto en el Día 10 y una hembra administrada con 10 mg/kg/día sacrificada en condición moribunda en el Día 15 de la fase de dosificación. Todos los animales de la fase de dosificación y todos los de toxicidad de recuperación sobrevivieron a su sacrificio programado.

45 En el sacrificio terminal se produjeron aumentos estadísticamente significativos en los pesos medios de los órganos (ajustados para el peso corporal terminal) en el hígado de machos administrados con 30 mg/kg/día y la próstata de machos administrados con 10 mg/kg/día. Debido a que estos cambios carecieron de correlatos microscópicos, consistencia entre sexos (hígado solo) y/o evidencia de una respuesta a dosis, no se consideraron relacionados con el fármaco. El peso medio del timo ajustado disminuyó más del 10 % y de un modo dependiente de la dosis en machos administrados con 30 mg/kg/día (0,86x) y hembras administradas con 10 mg/kg/día (0,85x) o 30 mg/kg/día (0,79x). Careciendo de significación estadística o correlatos microscópicos, la relación de las disminuciones del peso del timo con respecto al fármaco en estos grupos es incierta. Todos los otros cambios de peso de los órganos en el sacrificio terminal y todos los cambios de peso de los órganos en el sacrificio de recuperación fueron probablemente debidos a variación biológica normal y no se consideraron un efecto directo del fármaco.

55 Se observaron resultados del examen macroscópico de adhesiones en el corazón y adhesiones o masa en el pulmón en el sacrificio terminal en hembras administradas con 30 mg/kg/día, y se observaron adhesiones en el corazón en el sacrificio de recuperación en una hembra administrada con 30 mg/kg/día. Estos resultados del examen macroscópico se correlacionaron con resultados del examen microscópicos de fibrosis y/o inflamación crónica en el corazón y pulmón y se consideraron relacionados con el fármaco. Todos los otros resultados del examen macroscópico se consideraron espontáneos, casuales o asociados a muerte accidental y no se atribuyeron al fármaco.

60 En el sacrificio terminal, los resultados del examen microscópico de acuerdo con la inflamación crónica de la cavidad torácica estuvieron presentes sobre la superficie serosa del corazón y pulmón y en tejido conjuntivo peritímico de hembras administradas con 30 mg/kg/día. La inflamación y/o fibrosis crónica de la superficie serosa/epicárdica del

corazón y la superficie pleural/subpleural del pulmón se observó en 5/10 hembras administradas con 30 mg/kg/día. Los resultados fueron de multifocales a difusos a lo largo de la superficie serosa del corazón y pulmón y variaron de engrosamiento fibroso con algunas células inflamatorias a inflamación crónica más grave. También se observó inflamación de crónica a crónica-activa en el tejido conjuntivo fibrovascular suelto que rodea el timo en 4/10 hembras administradas con 30 mg/kg/día. En el sacrificio de recuperación, la inflamación y/o fibrosis crónica de la superficie serosa del corazón y pulmón se observaron en 2/5 hembras administradas con 30 mg/kg/día. Los resultados en el sacrificio de recuperación se caracterizaron por engrosamiento fibroso de multifocal a difuso de superficies serosas con poca inflamación, sugiriendo resolución parcial. Debido a que los resultados de inflamación crónica en la cavidad torácica se observaron en los sacrificios programados en un total de 7/15 hembras administradas con 30 mg/kg/día y debido a que estuvo ausente evidencia macroscópica o microscópica de otra causa para estos resultados, la fibrosis y/o inflamación sobre superficies serosas del corazón y pulmón y en tejido fibroadiposo peritímico de hembras administradas con 30 mg/kg/día se consideraron lo más probablemente relacionadas con el fármaco y pueden haber resultado de inflamación serosa secundaria a derrames pleurales y pericárdicos.

Se observó un pequeño aumento en la incidencia de macrófagos alveolares en el pulmón en el sacrificio terminal en hembras administradas con 30 mg/kg/día y se consideró lo más probablemente relacionado con el fármaco. No se observó una elevada incidencia de macrófagos alveolares en el sacrificio de recuperación, que sugiere que este resultado era reversible. Todos los otros resultados del examen microscópico en sacrificios programados y sin programar se consideraron espontáneos, casuales o asociados a muerte accidental y no atribuibles al fármaco.

En un estudio de búsqueda del intervalo de dosis de 10 días previamente realizado con CEP-37440, la administración diaria del fármaco por sonda nasogástrica a 10, 30 o 60 mg/kg/día a ratas fue bien tolerada a 10 mg/kg/día. Se observaron resultados adversos relacionados con el fármaco para el peso corporal en combinación con los resultados de patología anatómica en la médula ósea (hipocelularidad); bazo, timo y ganglio linfático (disminución de linfocitos); y pulmón (aumento en los macrófagos alveolares) en animales administrados con ≥ 30 mg/kg/día. No se observaron cambios relacionados con el fármaco en animales administrados con 10 mg/kg/día. En el presente estudio se observaron resultados adversos y relacionados con el fármaco en machos y hembras administrados con 30 mg/kg/día. Estos resultados incluyeron menor aumento del peso corporal en machos y hembras, menor consumo de alimentos en machos y hembras, y resultados del examen microscópico en hembras de acuerdo con la inflamación crónica de la cavidad torácica.

No se observaron efectos relacionados con el fármaco en resultados de pruebas de patología clínica hasta 10 mg/kg/día. Se observaron varios efectos de la patología clínica menores a 30 mg/kg/día que fueron de magnitud de mínima a leve. Ninguno de estos resultados se consideró adverso, toxicológicamente importante, o definitivamente correlacionado con otros resultados adversos en la vida o de patología anatómica.

Las disminuciones en la masa de glóbulos rojos, recuentos absolutos de reticulocitos, neutrófilos y eosinófilos pueden haber reflejado supresión/toxicidad de la médula ósea leve, pero no se observaron resultados de histopatología correlativos en la médula ósea. Estos resultados presentaron reversibilidad al final de la fase de recuperación. El mayor volumen corpuscular medio al final de la fase de recuperación en hembras administradas con 30 mg/kg/día fue probablemente debido a la mayor proporción de glóbulos rojos más jóvenes que normalmente son de mayor tamaño.

La menor albúmina y relación de albúmina con respecto a globulina y la mayor globulina estuvieron de acuerdo con inflamación y puede haberse asociado a inflamación crónica de la cavidad torácica observada histológicamente. El mayor colesterol puede haberse relacionado con reducido consumo de alimentos y aumento de peso corporal observado en estos animales. El menor cloruro en suero fue probablemente debido a la mayor eliminación de orina. No se conoció un mecanismo para el mayor calcio. No se observó efecto relacionado con el fármaco en la concentración de troponina I a ningún nivel de dosis. Todos los resultados de química clínica presentaron reversibilidad al final de la fase de recuperación.

El menor cloruro en suero estuvo probablemente asociado a la mayor eliminación total y mayor eliminación fraccionaria de cloruro en la orina de animales administrados con 30 mg/kg/día. No se observaron resultados de histopatología correlativos en el riñón de estos animales, y todos los resultados de química de la orina presentaron reversibilidad al final de la fase de recuperación.

En conclusión, la administración de CEP-37440 oral a ratas a dosis ≤ 10 mg/kg/día durante 28 días fue clínicamente bien tolerada. Estuvieron presentes resultados del examen microscópico de acuerdo con la inflamación crónica de la cavidad torácica en hembras administradas con 30 mg/kg/día. Estuvieron presentes disminuciones en el cambio del peso corporal y consumo de alimentos en machos y hembras administrados con 30 mg/kg/día. Basándose en estos resultados, el nivel de efectos adversos no observados (NOAEL) en este estudio fue 10 mg/kg/día.

Estudio de toxicidad oral y toxicocinético de 4 semanas de CEP-37440 en monos cinomolgos con un periodo de recuperación de 4 semanas

Todos los animales sobrevivieron hasta su sacrificio programado.

No se observaron observaciones clínicas relacionadas con el fármaco durante la fase de dosificación o de recuperación. Las observaciones clínicas parecieron bastante poco frecuentes, fueron transitorias, o fueron con incidencias comparables como controles; por tanto, no se consideraron relacionadas con el fármaco.

No hubo efectos relacionados con el fármaco sobre el peso corporal o el aumento del peso corporal observado durante la fase de dosificación o de recuperación. No se observaron resultados oftálmicos anormales relacionados con el fármaco. Adicionalmente, no se observaron observaciones relacionadas con el fármaco durante las mediciones de la tensión arterial.

No se observaron cambios relacionados con el fármaco en el intervalo de PR, duración de QRS, intervalo de QT, intervalo de QT corregido (QTc), intervalo de RR, o frecuencia cardíaca en los días 3 y 27 de la fase de dosificación o Día 28 de la fase de recuperación en animales administrados con 2,5, 7,5 o 20,0 mg de CEP-37440/kg de peso corporal/día (mg/kg/día). No se observaron anomalías del ritmo o cambios de ECG cualitativos atribuibles a CEP-37440 durante la evaluación cualitativa de los ECG.

La administración de CEP-37440 a 20,0 mg/kg/día no tuvo efecto sobre los resultados de la prueba de patología clínica al final de la fase de dosificación o de recuperación.

Algunos animales individuales tuvieron resultados de patología clínica de acuerdo con inflamación (incluyendo aumentos de ligeros a notables en los glóbulos blancos y recuentos absolutos de neutrófilos, fibrinógeno y proteína C reactiva) durante la fase de dosificación, pero estos animales normalmente se dispersaron a través de todos los grupos, que incluyen el control. A este respecto, estos resultados se consideraron no relacionados con el fármaco debido a que carecieron de un patrón relacionado con la dosis, fueron frecuentemente inconsistentes con el tiempo (especialmente para los recuentos de leucocitos), e implicaron a algunos animales de control.

No hubo cambios estadísticamente significativos en los pesos del cuerpo u órganos terminales en el sacrificio terminal. Todos los cambios de peso de órganos presentes en el sacrificio terminal o de recuperación programado se atribuyeron a variación biológica normal y se consideraron casuales y no relacionados con el fármaco.

No estuvieron presentes resultados del examen macroscópico claros relacionados con el fármaco en el sacrificio terminal o de recuperación. En el sacrificio terminal, todos (3/3) los machos administrados con 7,5 mg/kg/día y 2/3 hembras administradas con 20,0 mg/kg/día presentaron de focos individuales a algunos, de rojos a oscuros, sobre la superficie mucosa del estómago. La serosa del estómago en un macho administrado con 20,0 mg/kg/día presentó algunas áreas rojas. Los correlatos microscópicos fueron hemorragia focal dentro de la mucosa y/o submucosa/túnica muscular, con o sin la presencia de degeneración de músculo liso dentro de la túnica muscular. La presencia de resultados similares en una hembra de control sugiere que estos resultados son casuales y no están relacionados con el fármaco.

No estuvieron presentes resultados del examen microscópico claros relacionados con el fármaco en el sacrificio terminal o de recuperación. Los resultados del examen macroscópico en la mucosa o serosa del estómago en algunos animales administrados con CEP-37440 generalmente se correlacionó con los resultados del examen microscópico de hemorragia focal dentro de la mucosa y/o submucosa/túnica muscular, con o sin la presencia de degeneración de músculo liso dentro de la túnica muscular. Sin embargo, la asociación de resultados del examen macroscópico y microscópico para la administración de CEP-37440 en el presente estudio es incierta dada la presencia de resultados del examen microscópico similares y más graves en el estómago de una hembra administrada con artículo de control y el hecho de que la degeneración de músculo liso gástrico es un resultado de fondo conocido en monos cinomolgos. Estuvieron presentes otros resultados del examen microscópico en el estómago de uno o más animales, pero su asociación con el fármaco es incierta debido a su baja gravedad y/o incidencia, ausencia de una clara dosis-respuesta, o presencia concurrente en un animal de control.

Todos los restantes resultados del examen microscópico en el sacrificio terminal o de recuperación, que incluye infiltrados focales mínimos de macrófagos alveolares en el pulmón de dos hembras administradas con 20,0 mg/kg/día, se atribuyeron a variación biológica normal y se consideraron casuales.

En conclusión, la administración de CEP-37440 oral a monos cinomolgos a dosis hasta 20 mg/kg/día durante 28 días consecutivos fue bien tolerada, y no se observaron efectos relacionados con el fármaco a ningún nivel de dosis. Significativamente, no hubo en absoluto evidencia de edema pulmonar, y se determinó que CEP-37440 era seguro para su uso en ensayos humanos. El perfil de seguridad superior de CEP-37440 en comparación con CEP-28122, y en particular la ausencia de toxicidad pulmonar, fue sorprendente e inesperada.

Eficacia antitumoral en modelos de xenoinjertos de tumor ALCL Sup-M2 y Karpas-299 NPM-ALK positivo en ratones

No se observa actividad antitumoral significativa tras el tratamiento de 12 días con CEP-37440 a 10 mg/kg o más

bajo, bid; se observa regresión tumoral parcial tras el tratamiento de 12 días con CEP-37440 a 30 mg/kg, qd; se observa regresión tumoral completa o casi completa tras el tratamiento de 12 días con CEP-37440 a 30 mg/kg bid o 55 mg/kg, qd (**Fig. 4**). La administración de CEP-37440 es bien tolerada sin toxicidad abierta y ninguna pérdida de peso corporal significativa de ratones relacionada con el compuesto en todas las pautas de dosificación (**Fig. 5**). Los niveles relacionados con la dosis CEP-37440 se encuentran en lisados plasmáticos y de tumor recogidos 2 h después de la dosificación final (**Fig. 6**). Obsérvese que no es observable CEP-37440 en tumores a niveles de dosificación 30 mg/kg, bid, y 55 mg/kg, qd, debido a que aquellos animales no tuvieron tumores – regresión tumoral completa. Los niveles de CEP-37440 son aproximadamente 2-3 veces superiores en plasma y más de 10 veces superiores en tumores que los niveles 2 h después de la dosis oral individual en estudios PK/PD, que sugiere alguna acumulación de compuesto en plasma y tumores con pautas de dosificación oral bid o qd a 10 y 30 mg/kg. En xenoinjertos de tumor Karpas-299 se observa actividad antitumoral significativa a 30 mg/kg qd, y se observa regresión tumoral completa o casi completa tras el tratamiento de 12 días a 30 mg/kg bid o 55 mg/kg, qd (**Fig. 7**). La administración de CEP-37440 es bien tolerada sin toxicidad abierta y sin pérdida de peso corporal significativa a una pauta de dosificación (**Fig. 8**). Se observan niveles relacionados con la dosis de CEP-37440 en lisados plasmáticos y de tumor recogidos 2 h después de la dosificación final (**Fig. 9**). Obsérvese que no es observable CEP-37440 en tumores al nivel de dosificación de 50 mg/kg, qd, debido a que aquellos animales no tuvieron tumores – regresión tumoral completa.

Actividad antitumoral en xenoinjertos de tumor NSCLC EML4-ALK positivo (NCI-H2228 y NCI-H3122) en ratones con dosificación oral

Para los modelos de xenoinjerto de tumor NCI-H2228, el tratamiento con CEP-37440 (sal de HCl) a 30 mg/kg, qd y bid, y 55 mg/kg, qd, po durante 12 días produce regresiones tumorales (**Fig. 10**). Para los modelos de xenoinjerto de tumor NCI-H3122, el tratamiento con CEP-37440 (sal de HCl) a 30 mg/kg, bid, o 55 mg/kg, qd, po durante 12 días produce estasis tumoral y regresiones parciales (**Fig. 11**). La eficacia antitumoral mejorada observada en xenoinjertos de tumor NCI-H2228 es probable debido a la mayor distribución tumoral de CEP-37440 (**Figs. 12 y 13**). Los tratamientos en estos ratones portadores de tumor fueron bien tolerados sin toxicidad abierta o pérdida de peso relacionada con el compuesto (**Figs. 14 y 15**), excepto a dosis de 30 mg/kg, bid, en ratones portadores de tumor NCI-H3122 (**Fig. 15**).

Cuatro semanas de tratamiento adicional de los ratones portadores de tumor NCI-H2228 a 55 mg/kg qd po proporciona regresión tumoral completa sostenida en el 100 % de los animales (**Fig. 16**). El tratamiento adicional es bien tolerado sin toxicidad abierta y sin pérdida de peso corporal significativa (**Fig. 17**). Se observan regresiones tumorales sostenidas en el 100 % de los ratones durante 40 días tras el cese del tratamiento, sin re-emergencia del tumor en ningún ratón (**Fig. 16**).

Esto es importante debido a que sugiere que los tumores son completamente erradicados y que los ratones son eficazmente “curados” después de aproximadamente 6 semanas de tratamiento con CEP-37440.

Estudios de eficacia antitumoral en xenoinjertos de tumor humano de carcinoma de próstata independiente de hormona, carcinoma NSCL y carcinoma HNSC

En xenoinjertos de tumor de próstata PC-3 FAK-positivo establecidos, la administración de CEP-37440 durante un periodo de 36 días produce una inhibición del crecimiento tumoral del 55 % (TGI) y 10 % de incidencia de regresiones tumorales completas, un perfil similar al de una dosis equivalente de PF-562271 en este modelo (69 % de TGI y 25 % de incidencia de regresiones tumorales parciales) (**Fig. 18**). Todas las pautas de dosificación son bien toleradas sin toxicidad abierta o pérdida de peso corporal significativa observada.

Carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCL)

CEP-37440 demuestra eficacia antitumoral relacionada con la dosis, con 80 % de TGI y un 60 % de incidencia de regresiones tumorales (30 % completa y 30 % parcial) a 55 mg/kg bid y eficacia significativa (60 % de TGI y evidencia de regresión tumoral parcial) a 30 mg/kg bid en el Día 28 del estudio (**Fig. 19**). Se observa eficacia antitumoral significativa (66 % de TGI) con PF-562271 a 55 mg/kg bid, pero se observó modesta recuperación del crecimiento tumoral empezando en el Día 23. La administración de tanto CEP-37440 como PF-562271 son bien toleradas, sin toxicidad abierta o pérdida de peso corporal significativa observada (**Fig. 20**). De importancia, la significativa eficacia lograda con CEP-37440 no es el resultado de inhibir la fosforilación de EGF-R (activación) en este modelo de xenoinjerto de tumor EML4-ALK negativo.

Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC)

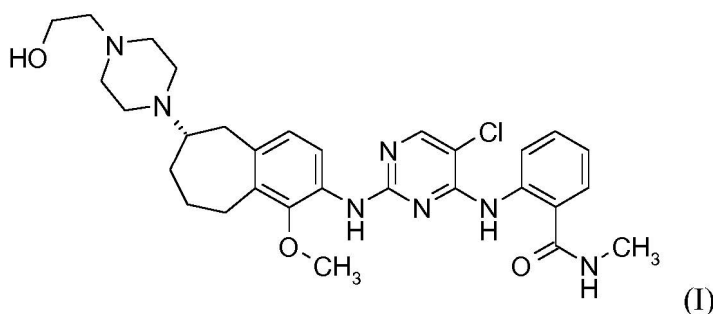
En ratones SCID portadores de xenoinjertos de HNSCC Detroit 562 establecidos, CEP-37440 y PF-562271 demostraron un claro efecto farmacodinámico tumoral para la inhibición de la activación de FAK sin efecto sobre niveles de expresión de FAK totales (**Fig. 21**). Durante un periodo de 28 días, CEP-37440 y PF-562271 producen estasis tumoral y un 20 % de incidencia (CEP-37440, 30 mg/kg bid) y 30 % de incidencia (CEP-37440 y PF-562271,

55 mg/kg bid) de regresiones tumorales parciales. La magnitud de la eficacia observada con CEP-37440 (ambas dosis) es comparable a la observada con 55 mg/kg bid de PF-562271 (Roberts et al., 2008). Las pautas de dosificación son bien toleradas sin morbilidad o mortalidad observadas.

- 5 Estos estudios son importantes debido a que muestran que CEP-37440 demuestra una inhibición farmacodinámica significativa de FAK y eficacia antitumoral independiente de ALK en modelos de xenoinjerto establecidos de carcinoma de próstata independiente de hormonas, carcinoma NSCL y HNSCC - que incluyen respuestas tumorales objetivas.
- 10 Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en el presente documento son con propósitos ilustrativos solamente y que los expertos en la técnica dsugerirán varias modificaciones o cambios a luz de los mismos.

Realizaciones de Referencia:

- 15 1. Un compuesto de fórmula (I)



- o una sal del mismo
- 20 2. El compuesto de fórmula I de acuerdo con la realización 1.
3. Una sal del compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la realización 1 en el que la sal es una sal de adición de ácido.
4. Una sal del compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la realización 1 en el que la sal es una sal de tribencenosulfonato.
- 35 5. Una sal de tribencenosulfonato del compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la realización 4 que tiene un patrón de XRPD que comprende uno o más picos seleccionados de $7,62 \pm 0,2$ grados 2Θ , $13,11 \pm 0,2$ grados 2Θ , $13,76 \pm 0,2$ grados 2Θ y $14,05 \pm 0,2$ grados 2Θ .
6. Una sal de tribencenosulfonato del compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la realización 4 que tiene un patrón de XRPD que comprende uno o más picos seleccionados de $6,85 \pm 0,2$ grados 2Θ , $7,62 \pm 0,2$ grados 2Θ , $8,01 \pm 0,2$ grados 2Θ , $13,11 \pm 0,2$ grados 2Θ , $13,76 \pm 0,2$ grados 2Θ , $14,05 \pm 0,2$ grados 2Θ y $14,60 \pm 0,2$ grados 2Θ .
- 40 7. Una sal de tribencenosulfonato del compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la realización 4 que tiene un patrón de XRPD que comprende uno o más picos seleccionados de $7,62 \pm 0,2$ grados 2Θ , $13,11 \pm 0,2$ grados 2Θ , $13,76 \pm 0,2$ grados 2Θ , $14,05 \pm 0,2$ grados 2Θ , $17,10 \pm 0,2$ grados 2Θ , $17,86 \pm 0,2$ grados 2Θ , y $18,10 \pm 0,2$ grados 2Θ .
8. Una sal del compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la realización 1 en la que la sal es una sal de triclorhidrato dihidratado.
- 45 9. Una sal de triclorhidrato dihidratado del compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la realización 8 que tiene un patrón de XRPD que comprende uno o más picos seleccionados de $5,42 \pm 0,2$ grados 2Θ , $8,86 \pm 0,2$ grados 2Θ , $14,06 \pm 0,2$ grados 2Θ , $17,52 \pm 0,2$ grados 2Θ y $18,51 \pm 0,2$ grados 2Θ .
10. Una sal de triclorhidrato dihidratado del compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la realización 8 que tiene un patrón de XRPD que comprende uno o más picos seleccionados de $5,42 \pm 0,2$ grados 2Θ , $5,91 \pm 0,2$ grados 2Θ , $8,86 \pm 0,2$ grados 2Θ , $10,80 \pm 0,2$ grados 2Θ , $11,79 \pm 0,2$ grados 2Θ , $14,06 \pm 0,2$ grados 2Θ , $14,72 \pm 0,2$ grados 2Θ , $17,02 \pm 0,2$ grados 2Θ , $17,52 \pm 0,2$ grados 2Θ y $18,51 \pm 0,2$ grados 2Θ .
- 50 11. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto o sal de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-10 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 55 12. La composición farmacéutica de la realización 11, en la que dicha composición está en forma de un comprimido o cápsula.
13. Un método para tratar una afección o trastorno mediado por ALK o FAK en un sujeto, que comprende el paso de administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o sal de cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
- 60 14. El método de la realización 13, en el que la afección o trastorno mediado por ALK o FAK se selecciona de linfoma anaplásico de células grandes (ALCL), cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), neuroblastoma, glioblastoma, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas (SCC) y cáncer de mama.
15. El método de la realización 13, en el que la afección o trastorno mediado por ALK o FAK se selecciona de ALCL ALK-positivo, NSCLC EML4-ALK-positivo, neuroblastoma, glioblastoma, cánceres de próstata independientes de andrógenos, cánceres de mama y carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC).
- 65

16. El método de la realización 13, en el que la afección o trastorno mediado por ALK o FAK se selecciona de ALCL ALK-positivo, NSCLC EML4-ALK-positivo, neuroblastoma, glioblastoma, cánceres de próstata independientes de andrógenos, cánceres de mama y HNSCC.

5 17. El método de la realización 13, en el que la afección o trastorno mediado por ALK o FAK se selecciona de ALCL ALK-positivo, NSCLC EML4-ALK-positivo, neuroblastoma y glioblastoma.

18. El método de la realización 13, en el que la afección o trastorno mediado por ALK o FAK se selecciona de ALCL ALK-positivo, NSCLC EML4-ALK-positivo y neuroblastoma.

19. El método de la realización 13, en el que la afección o trastorno mediado por ALK o FAK se selecciona de ALCL ALK-positivo y NSCLC EML4-ALK-positivo.

10 20. El método de la realización 13, en el que la afección o trastorno mediado por ALK o FAK se selecciona de cánceres de próstata independientes de andrógenos, cánceres de mama y HNSCC.

21. El método de la realización 13, en el que la afección o trastorno mediado por ALK o FAK es una afección o trastorno mediado por ALK.

15 22. El método de la realización 13, en el que la afección o trastorno mediado por ALK o FAK es una afección o trastorno mediado por FAK.

20

25

30

35

40

45

50

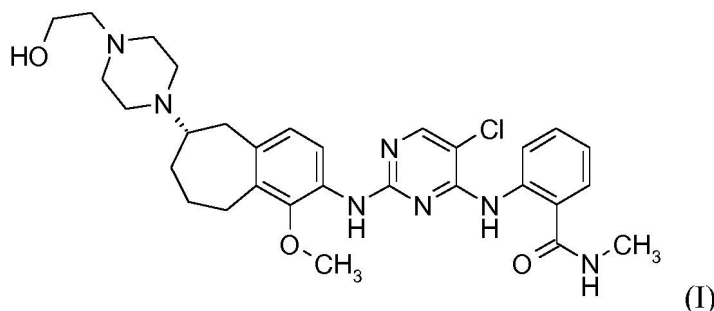
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I)



o una sal del mismo, para su uso en el tratamiento de una afección o trastorno mediado por ALK o FAK, en donde la afección o trastorno mediado por ALK o FAK es cáncer.

2. El compuesto de fórmula I para el uso de acuerdo con la reivindicación 1.

3. Una sal del compuesto de fórmula (I) para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde la sal es una sal de adición de ácido.

4. Una sal del compuesto de fórmula (I) para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde la sal es una sal de tribencenosulfonato.

5. Una sal de tribencenosulfonato del compuesto de fórmula (I) para el uso de acuerdo con la reivindicación 4 que tiene:

(a) un patrón de XRPD que comprende uno o más picos seleccionados de $7,62 \pm 0,2$ grados 2θ , $13,11 \pm 0,2$ grados 2θ , $13,76 \pm 0,2$ grados 2θ y $14,05 \pm 0,2$ grados 2θ ; o

(b) un patrón de XRPD que comprende uno o más picos seleccionados de $6,85 \pm 0,2$ grados 2θ , $7,62 \pm 0,2$ grados 2θ , $8,01 \pm 0,2$ grados 2θ , $13,11 \pm 0,2$ grados 2θ , $13,76 \pm 0,2$ grados 2θ , $14,05 \pm 0,2$ grados 2θ y $14,60 \pm 0,2$ grados 2θ ; o

(c) un patrón de XRPD que comprende uno o más picos seleccionados de $7,62 \pm 0,2$ grados 2θ , $13,11 \pm 0,2$ grados 2θ , $13,76 \pm 0,2$ grados 2θ , $14,05 \pm 0,2$ grados 2θ , $17,10 \pm 0,2$ grados 2θ , $17,86 \pm 0,2$ grados 2θ y $18,10 \pm 0,2$ grados 2θ .

6. Una sal del compuesto de fórmula (I) para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde la sal es una sal de triclorhidrato dihidratado.

7. Una sal de triclorhidrato dihidratado del compuesto de fórmula (I) para el uso de acuerdo con la reivindicación 6 que tiene:

(a) un patrón de XRPD que comprende uno o más picos seleccionados de $5,42 \pm 0,2$ grados 2θ , $8,86 \pm 0,2$ grados 2θ , $14,06 \pm 0,2$ grados 2θ , $17,52 \pm 0,2$ grados 2θ y $18,51 \pm 0,2$ grados 2θ ; o

(b) un patrón de XRPD que comprende uno o más picos seleccionados de $5,42 \pm 0,2$ grados 2θ , $5,91 \pm 0,2$ grados 2θ , $8,86 \pm 0,2$ grados 2θ , $10,80 \pm 0,2$ grados 2θ , $11,79 \pm 0,2$ grados 2θ , $14,06 \pm 0,2$ grados 2θ , $14,72 \pm 0,2$ grados 2θ , $17,02 \pm 0,2$ grados 2θ , $17,52 \pm 0,2$ grados 2θ y $18,51 \pm 0,2$ grados 2θ .

8. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la afección o trastorno mediado por ALK o FAK es una afección o trastorno mediado por ALK.

9. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la afección o trastorno mediado por ALK o FAK es una afección o trastorno mediado por FAK.

Fig. 1

Síntesis de CEP-37440

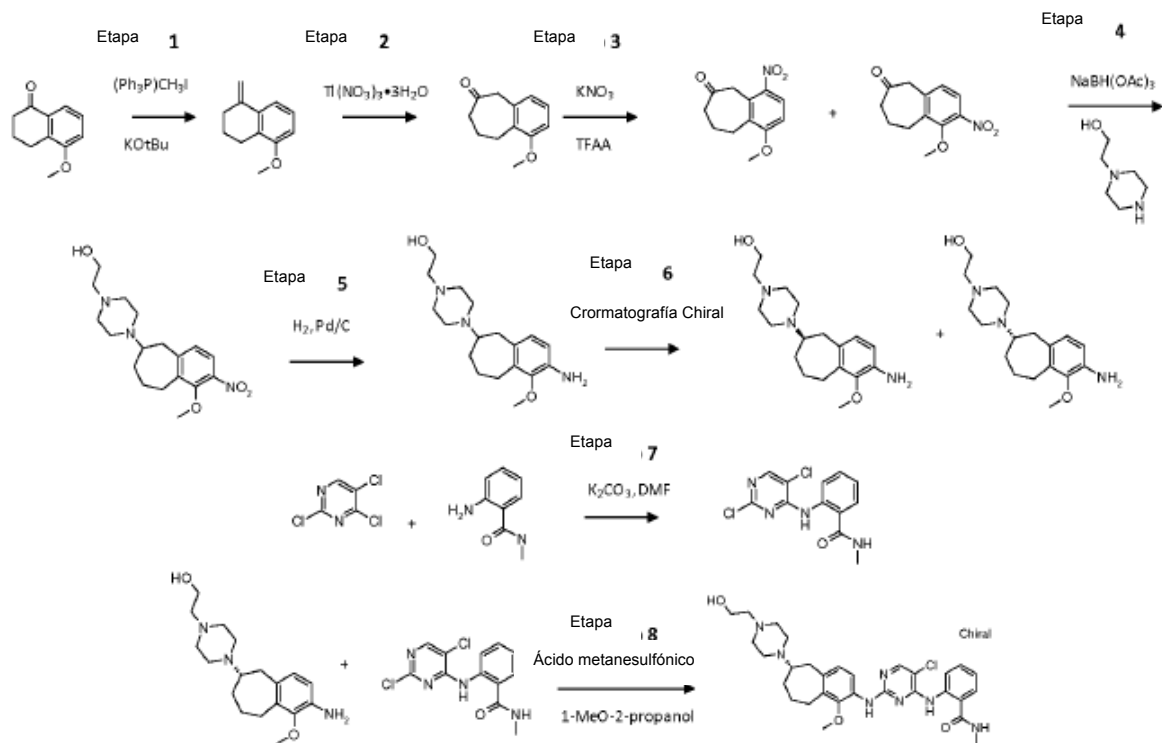


Fig. 2

XRPD Patrón de la sal tribenzenesulfonato CEP-37440

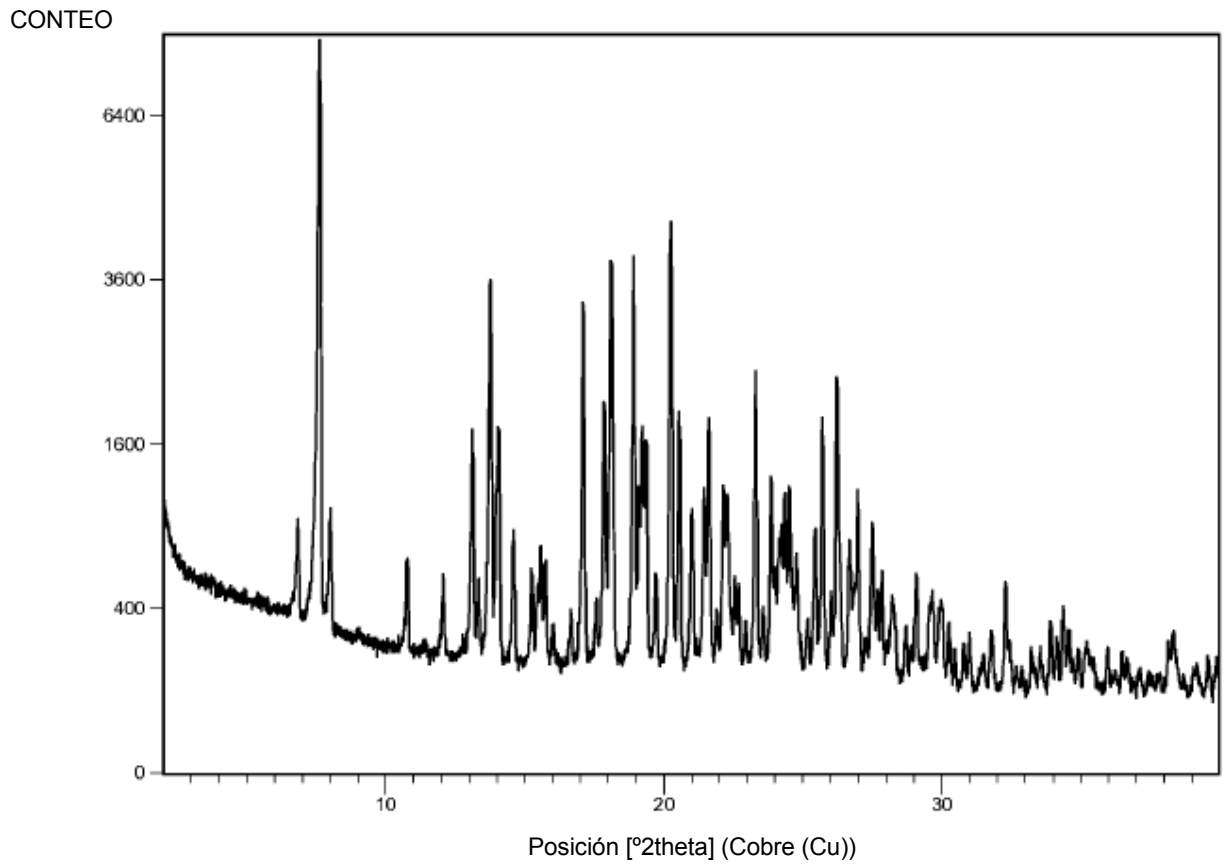


Fig. 3

XRPD Patrón de la sal trihidroclorido dihidrato CEP-37440

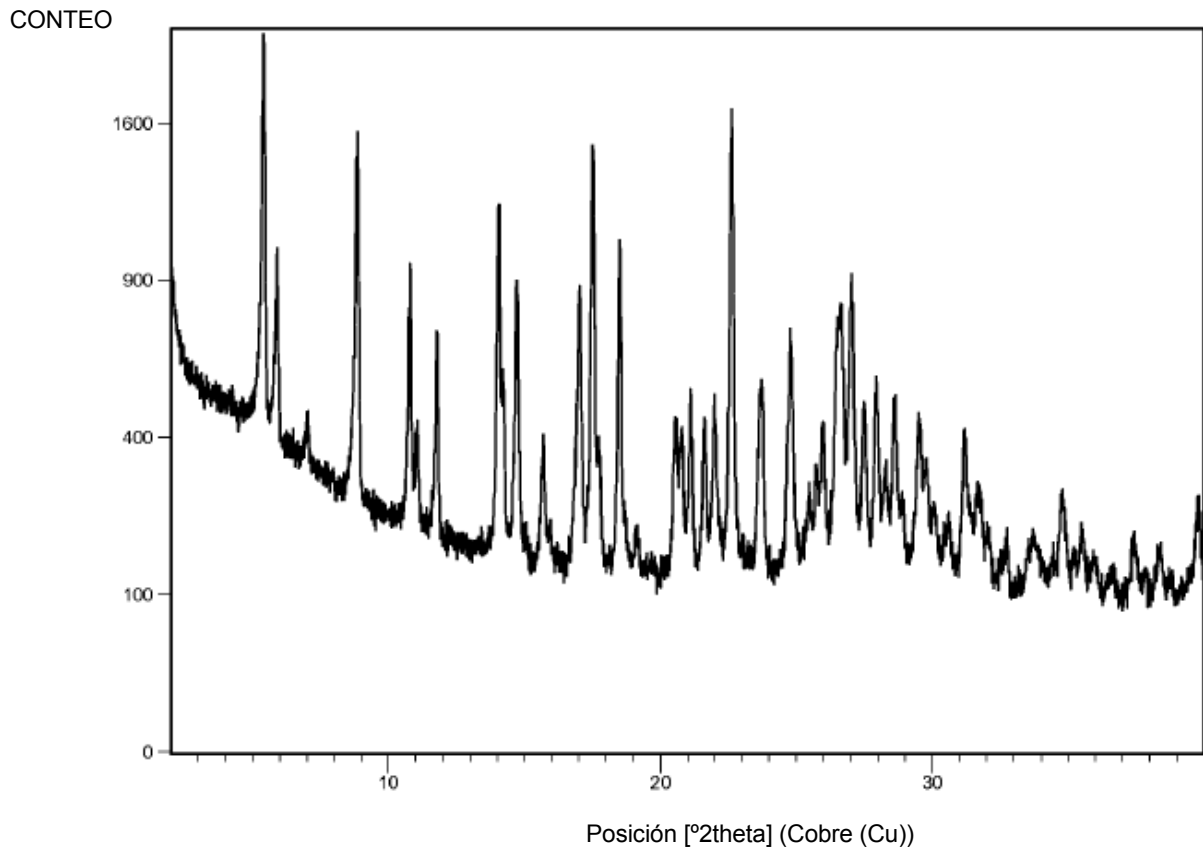


Fig. 4

Eficacia Anti-tumor de CEP-37440 en Xenoinjertos tumorales Sup-M2 ALCL en ratones con dosis orales

Volumen Tumoral de Xenoinjertos Sup-M2 en ratones Scid tratados con CEP-37440 PO

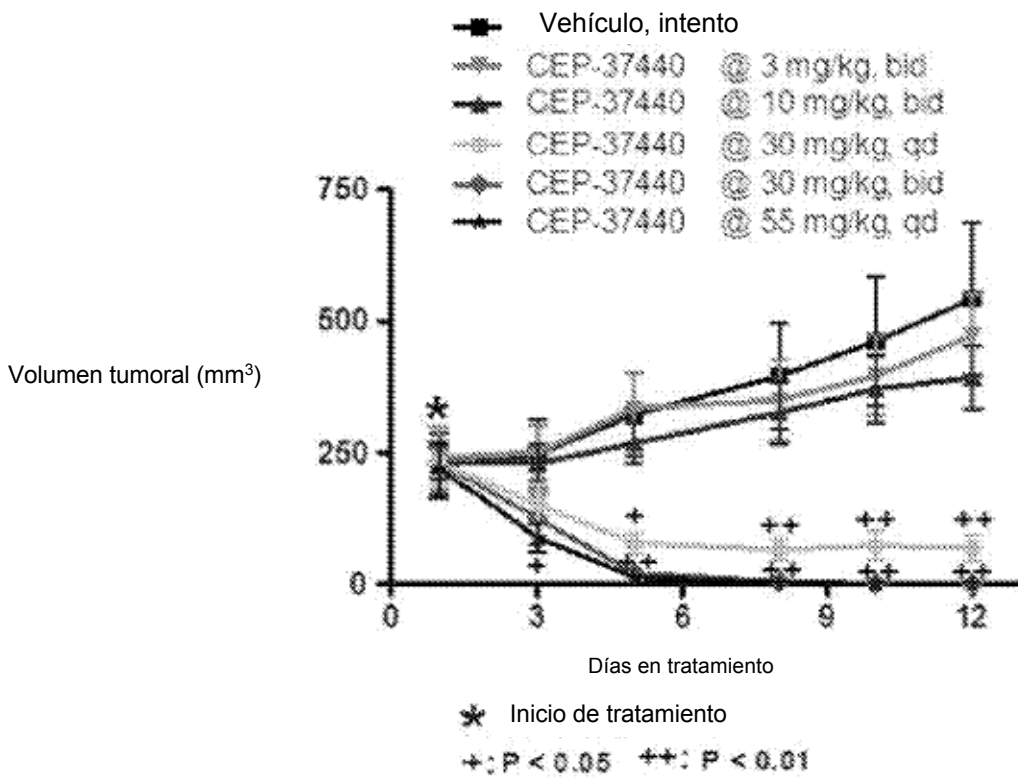


Fig. 5

Pesos corporales de ratones soportando Xenoinjertos tumorales Sup-M2 ALCL con CEP-37440 dosis orales

Peso corporal de ratones soportando Xenoinjertos Sup-M2 Scid tratados con CEP-37440 PO

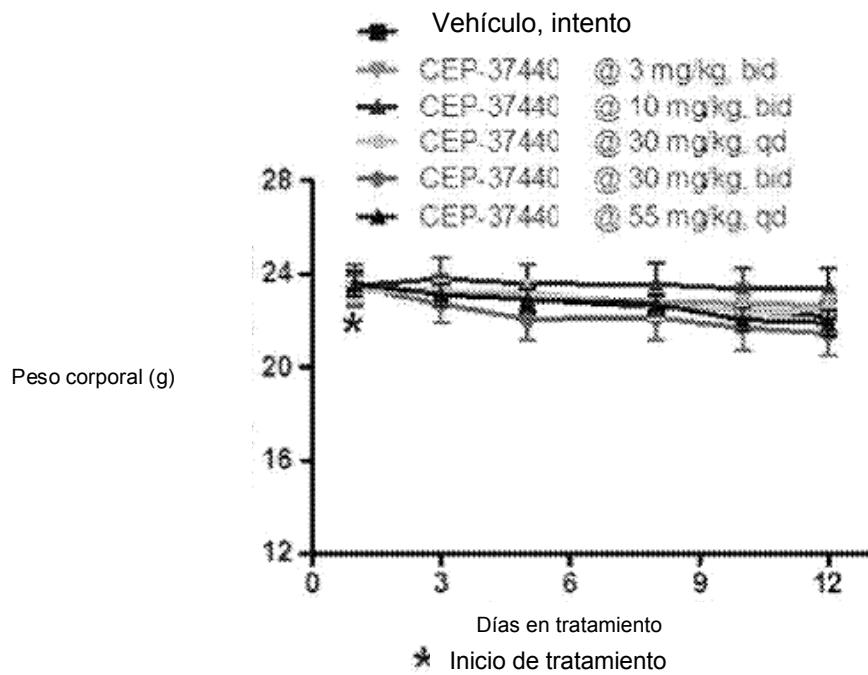


Fig. 6

Niveles de Plasma y Tumores de CEP-37440 en ratones soportando Xenoinjertos tumorales Sup-M2 ALCL con dosis orales

CEP-37440 Niveles de Plasma y Tumores

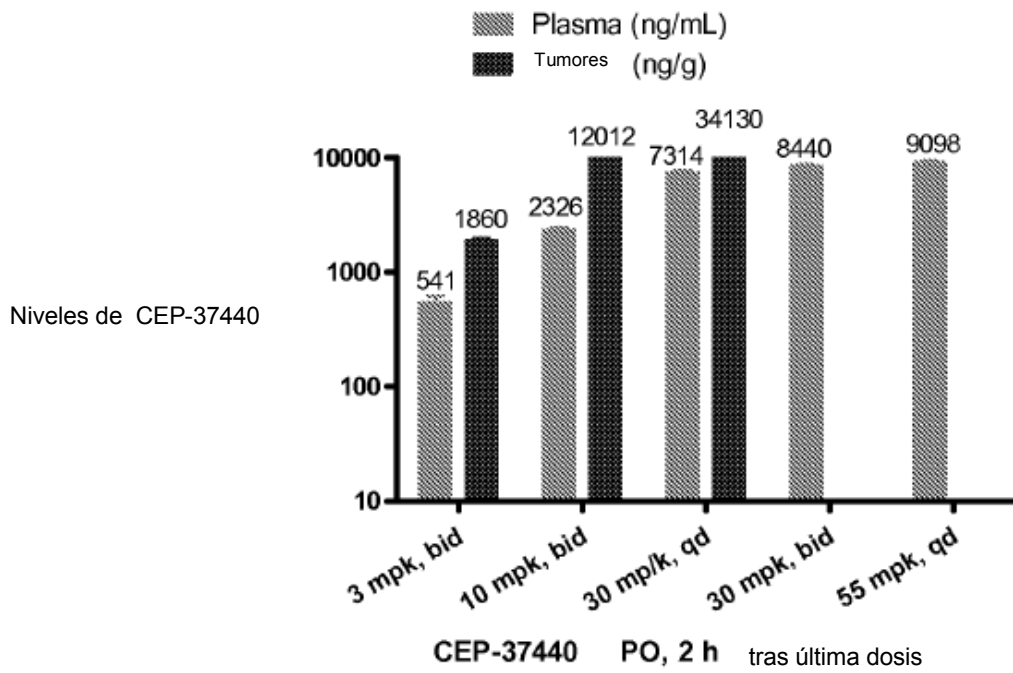


Fig. 7

Eficacia Antitumoral de CEP-37440 en Karpas-299 Xenoinjertos tumorales en ratones con dosis orales

Volumen tumoral de Karpas-299 Xenoinjertos tumorales en ratones con dosis orales de CEP-37440,PO

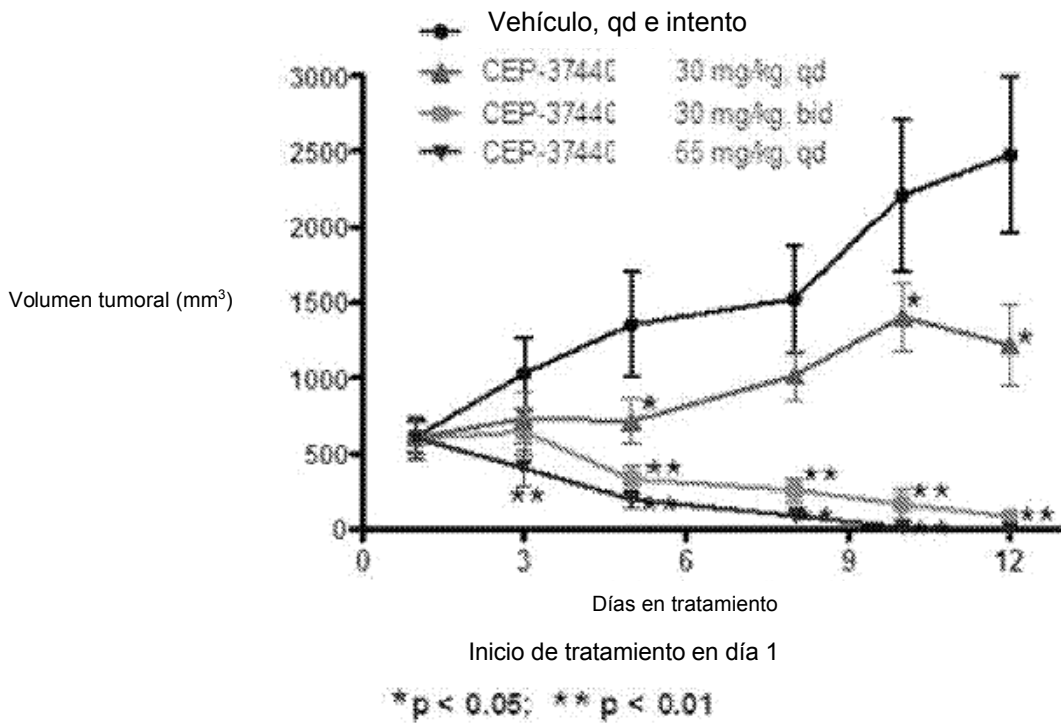


Fig. 8

Pesos corporales de ratones soportando Xenoinjertos tumorales Karpas-299 con CEP-37440 dosis orales

Peso corporal de ratones soportando Xenoinjertos Karpas-299 Scid tratados con CEP-37440 PO

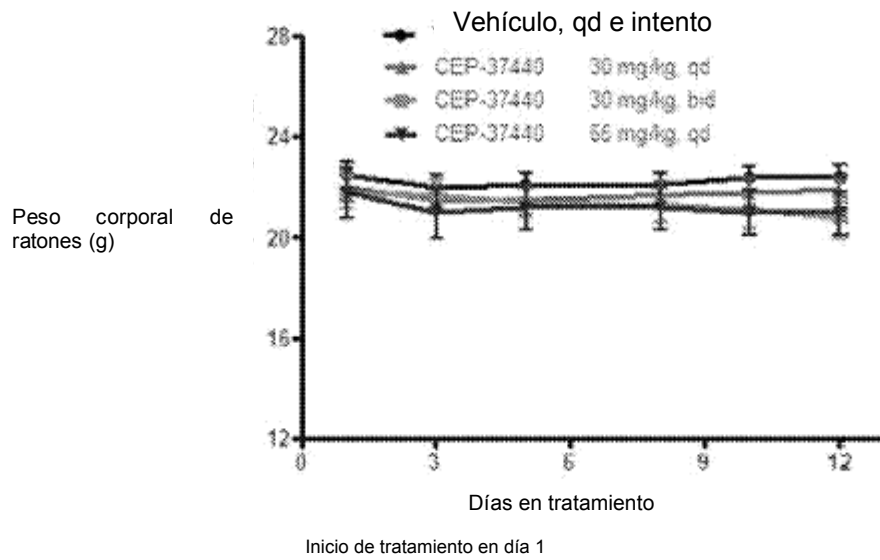


Fig. 9

Niveles de Plasma y Tumores de CEP-37440 en ratones soportando Xenoinjertos tumorales Karpas-299 con dosis orales

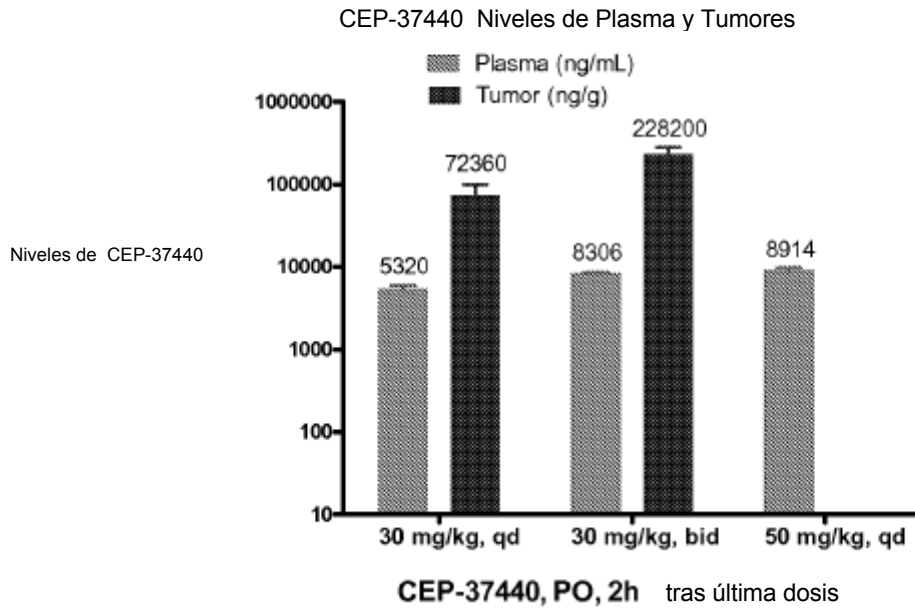


Fig. 10

Eficacia Antitumoral de CEP-37440 en NCI-H2228 NSCL Xenoinjertos tumorales en ratones con dosis orales

Volumen tumoral de H2228 Xenoinjertos tumorales en ratones con dosis orales de CEP-37440,PO

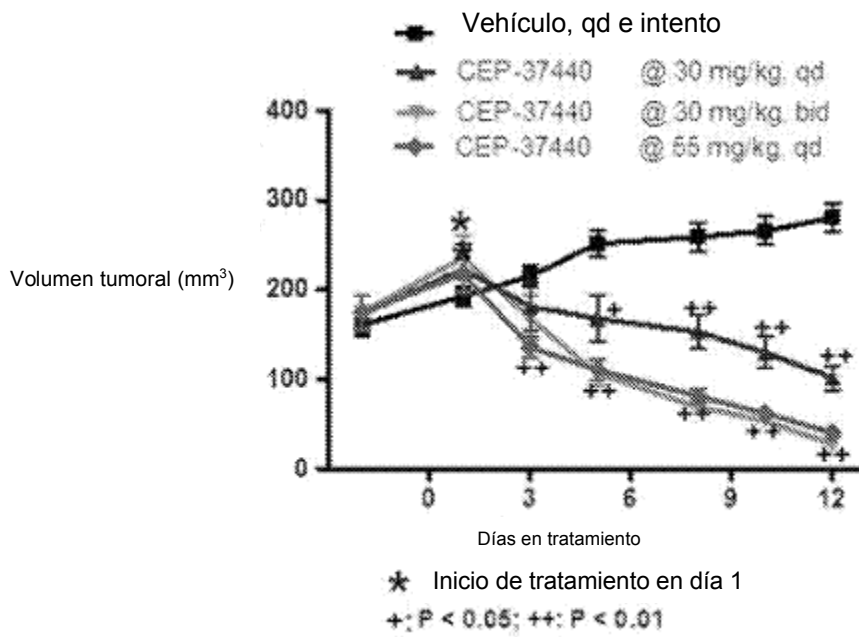


Fig. 11

Eficacia Antitumoral de CEP-37440 en NCI-H3122 NSCL Xenoinjertos tumorales en ratones con dosis orales

Volumen tumoral de H3122 Xenoinjertos tumorales en ratones con dosis orales de CEP-37440,PO

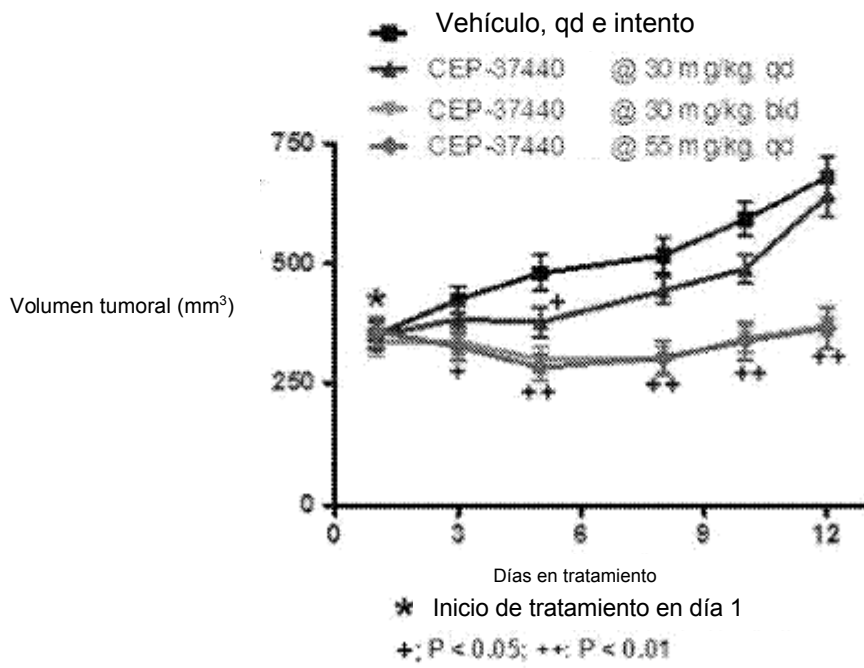


Fig. 12

Niveles de Plasma y Tumores de CEP-37440 en ratones soportando Xenoinjertos tumorales NCI-H2228 NSCL con dosis orales

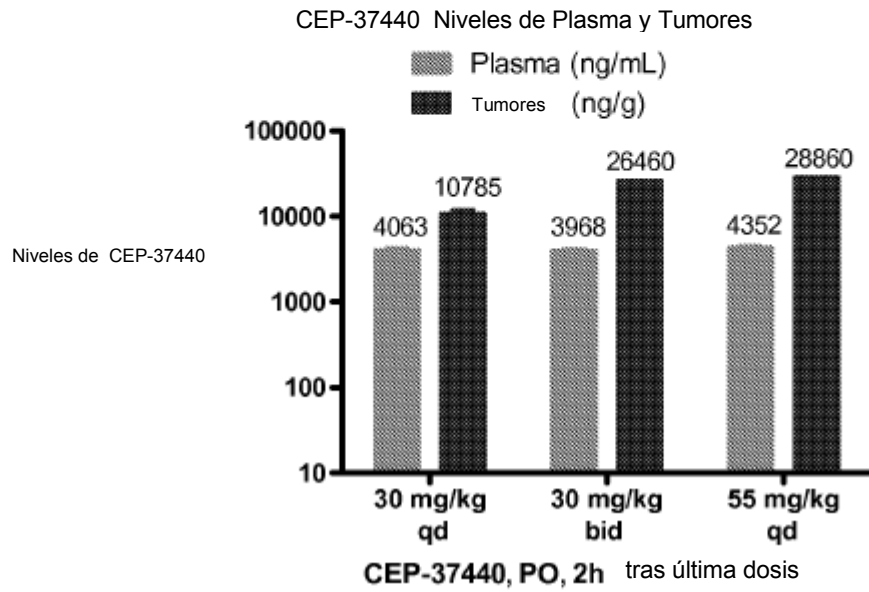


Fig. 13

Niveles de Plasma y Tumores de CEP-37440 en ratones soportando Xenoinjertos tumorales NCI-H3122 NSCL con dosis orales

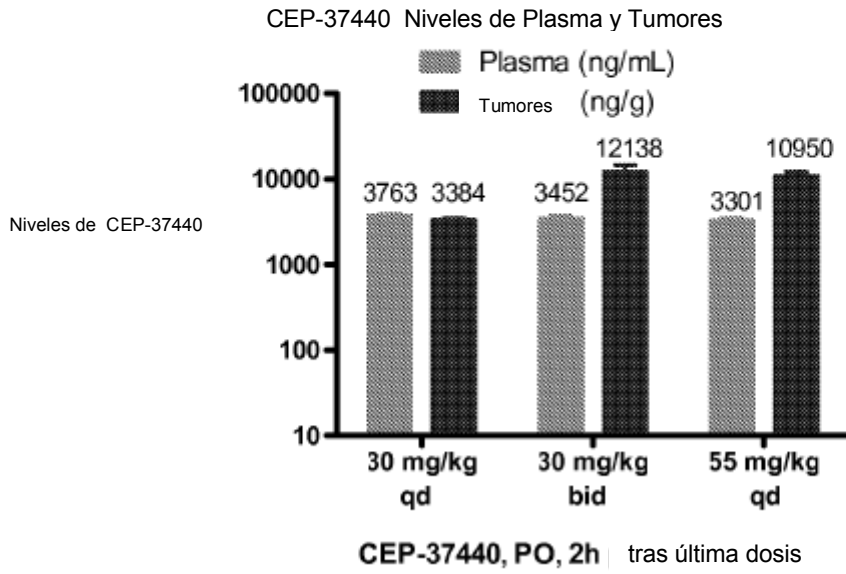


Fig. 14

Pesos corporales de ratones soportando Xenoinjertos tumorales NCI-H2228 con CEP-37440 dosis orales

Peso corporal de ratones soportando Xenoinjertos H2228 Scid tratados con CEP-37440 PO

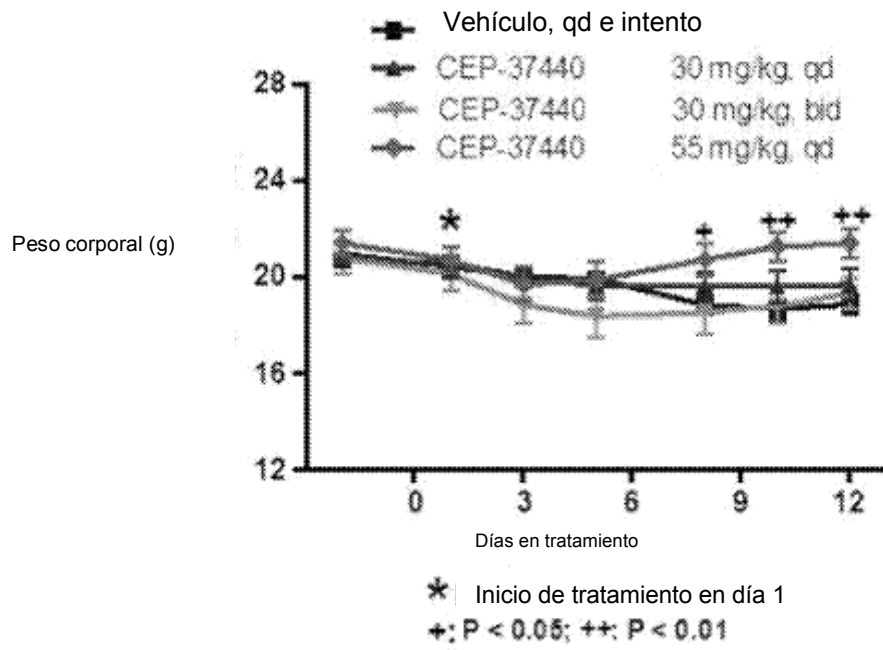


Fig. 15

Pesos corporales de ratones soportando Xenoinjertos tumorales NCI-H3122 con CEP-37440 dosis orales

Peso corporal de ratones soportando Xenoinjertos H3122 Scid tratados con CEP-37440 PO

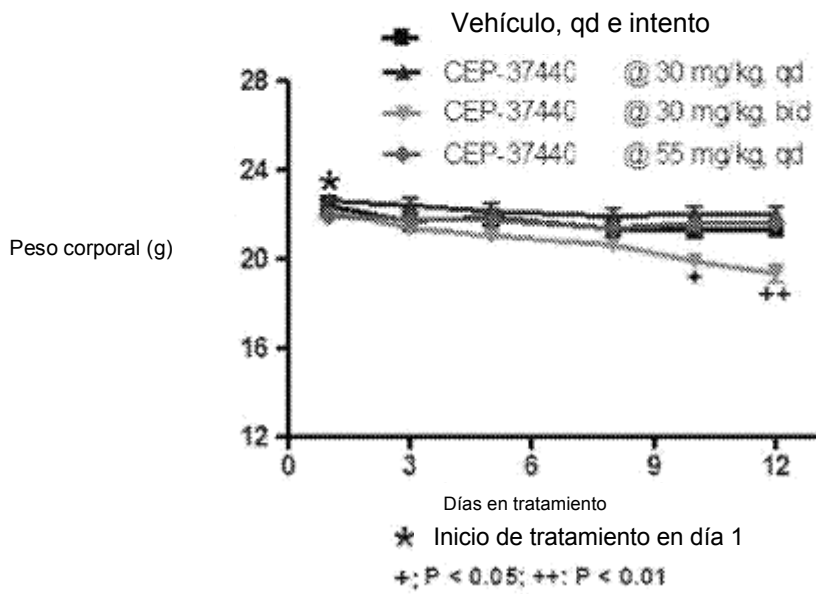


Fig. 16

Eficacia Antitumoral y regresiones de Tumor a largo plazo por CEP-37440 en NCI-H2228 NSCL Xenoinjertos tumorales en ratones

Volumen tumoral de H2228 Xenoinjertos tumorales en ratones con dosis orales de CEP-37440,PO

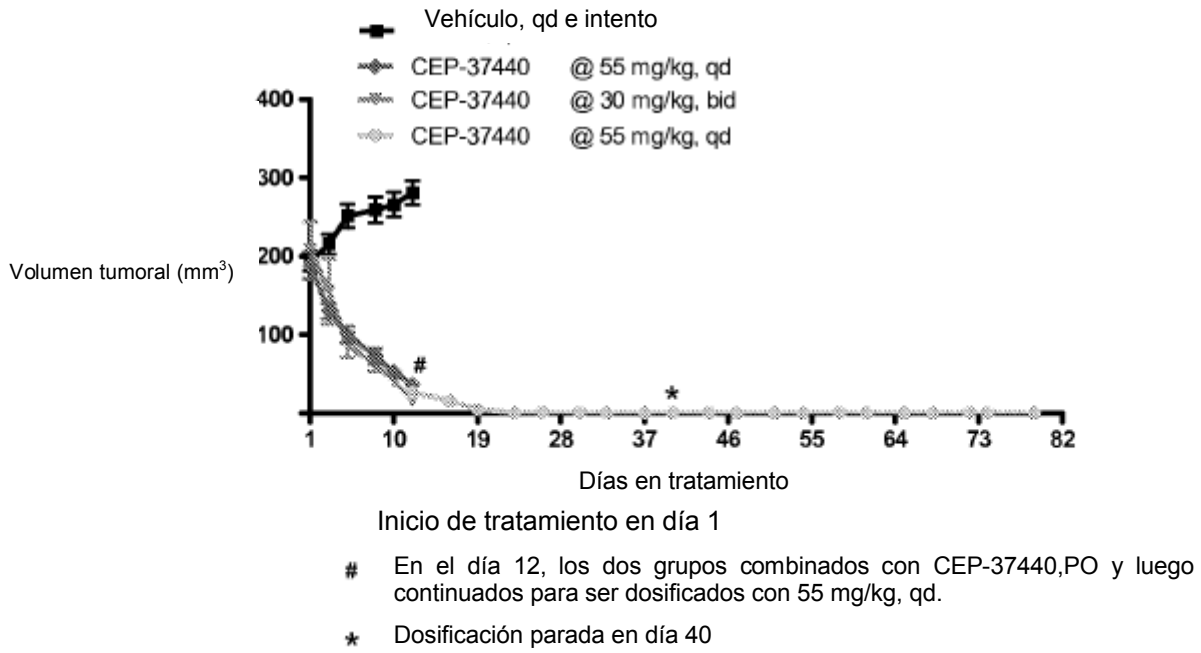


Fig. 17

Peso corporal en ratones con Xenoinjertos tumorales NCI-H2228 NSCL usando dosis orales de CEP-37440

Peso corporal de ratones soportando Xenoinjertos H2228 Scid tratados con CEP-37440 PO

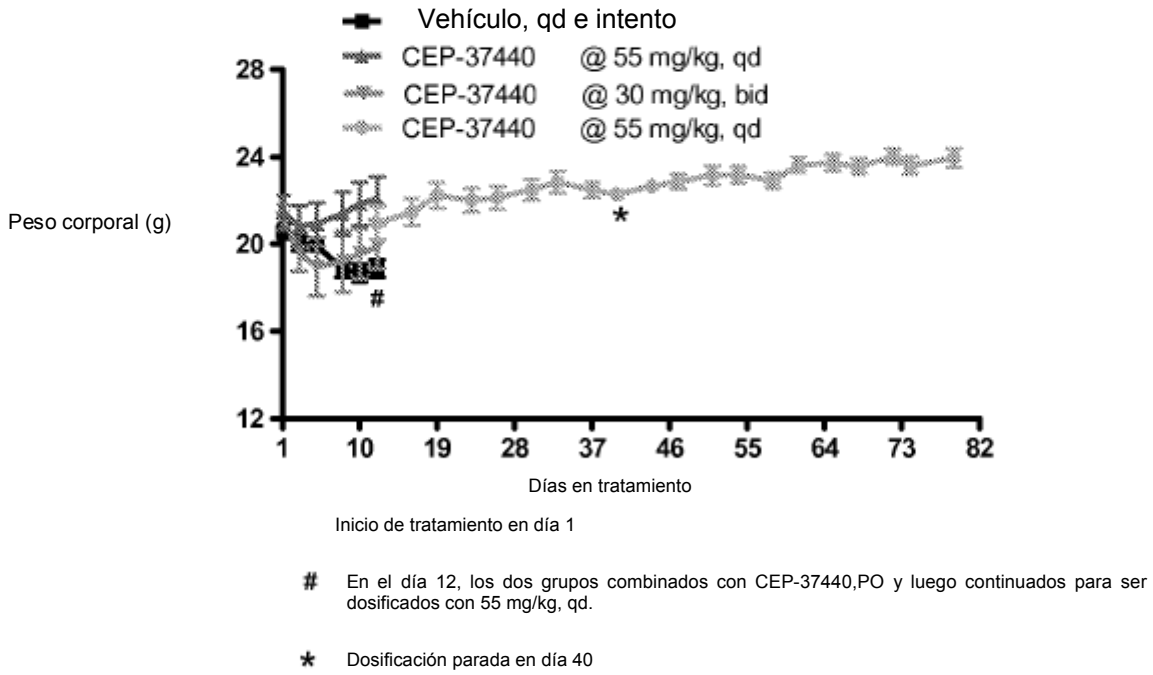


Fig. 18

Eficacia Antitumoral de CEP-37440 y PF-562271 en Ratones desnudos soportando Xenoinjertos PC-3 tumorales de próstata con Activación constitutiva FAK

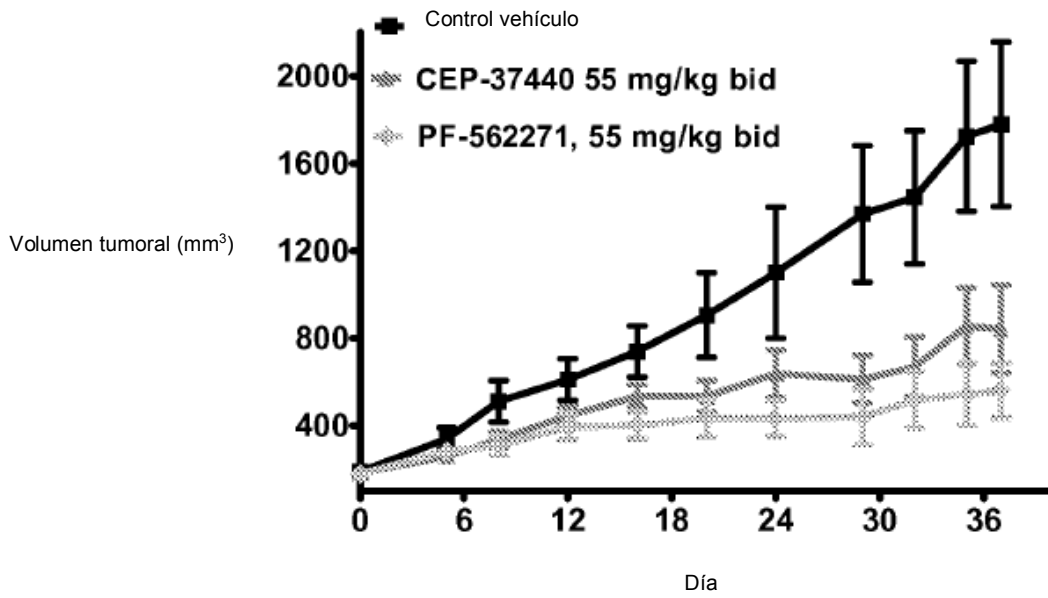


Fig. 19

Eficacia Antitumoral de CEP-37440 y PF-562271 en Ratones desnudos soportando Xenoinjertos HCC-827 DE Carcinoma Humano NSCL (EML4-ALK negativo)

Volumen tumoral de Xenoinjertos HCC827 tumorales en ratones SCID TRATADOS con dosis orales de CEP-37440 o PF562271

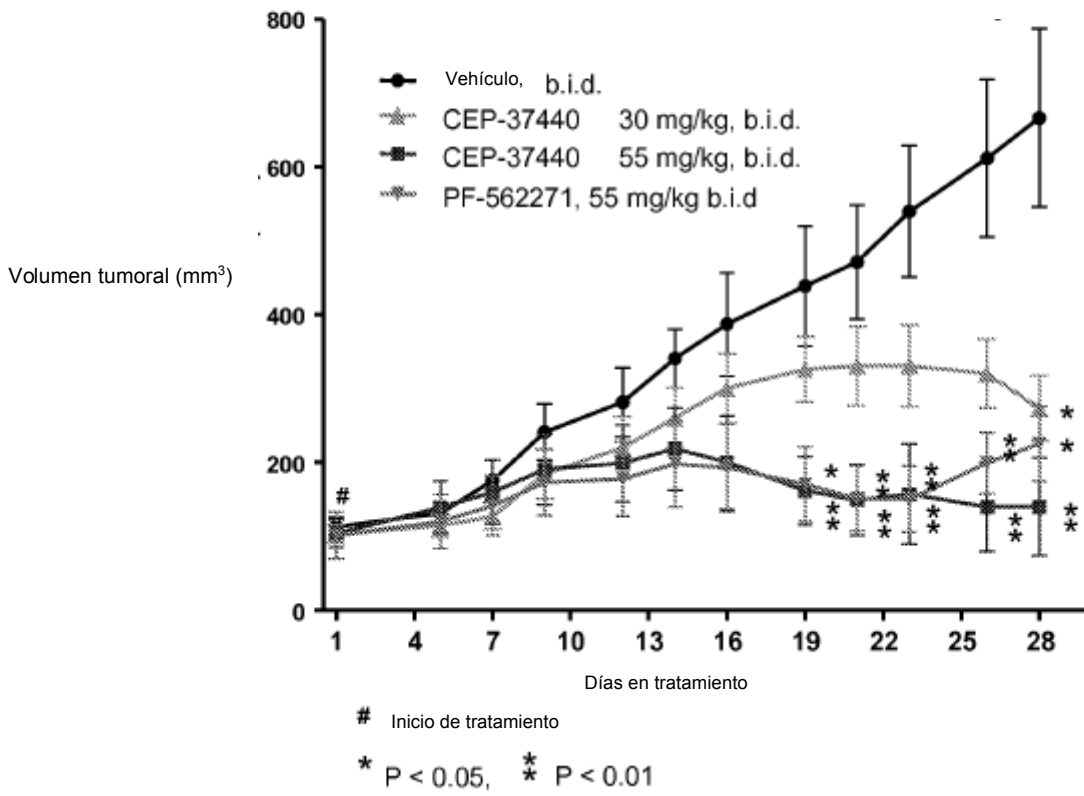


Fig. 20

Peso corporal ratones desnudos soportando Xenoinjertos HCC-827 DE Carcinoma Humano NSCL (EML4-ALK negativo) con con dosis orales de CEP-37440 o PF562271

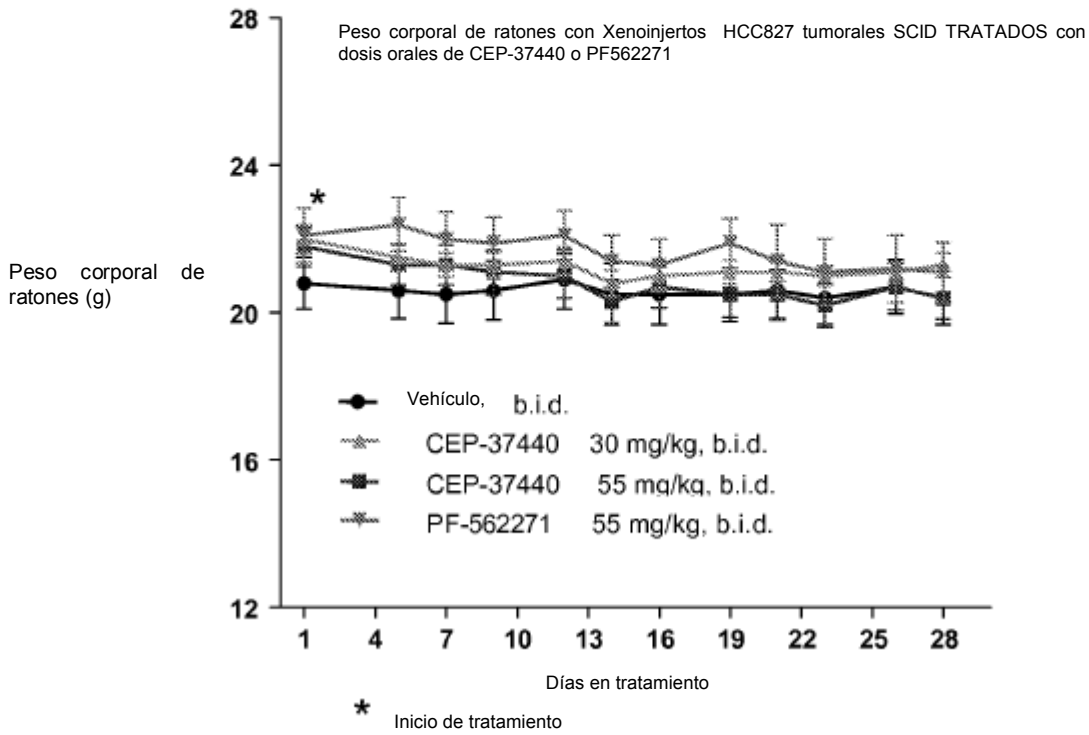


Fig 21

Inhibición de Tumor Farmacodinámico de FAK y Eficacia Anti-tumoral de CEP 37440 y PF-562271 en Ratones SCID soportando Xenoinjertos de Carcinoma HNSCC Humano Detroit 562 (EML4-ALK negativo)

