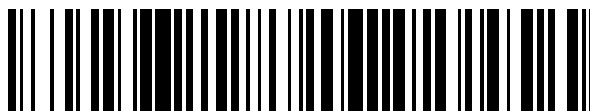


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 125**

51 Int. Cl.:

C07D 401/04 (2006.01)

A61K 31/47 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2015 PCT/IB2015/002438**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2016 WO16067112**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2015 E 15837091 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 3212629**

54 Título: **2,4-diamino-quinolina sustituida como nuevos agentes anticancerosos**

30 Prioridad:

31.10.2014 US 201462073325 P

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

02.04.2019

73 Titular/es:

**GENOSCIENCE PHARMA SAS (100.0%)
10, rue d'Iena
13006 Marseille, FR**

72 Inventor/es:

**BASSISSI, FIRAS;
BERET, ANTOINE;
BRUN, SONIA;
COURCAMBECK, JÉRÔME;
DUBRAY, CLARISSE;
NICOLAS, GREGORY y
HALFON, PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 707 125 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

2,4-diamino-quinolina sustituida como nuevos agentes anticancerosos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a derivados de 2-amino primario-4-amino secundario-quinolina nuevos, a su fabricación, a composiciones farmacéuticas que los comprenden y a su utilización como medicamentos. Los compuestos activos de la presente invención son útiles para el tratamiento y la prevención de enfermedades proliferativas neoplásicas y no neoplásicas.

Antecedentes de la invención

El descubrimiento farmacológico de nuevos agentes anticancerosos se ha desplazado recientemente de un ensayo basado en células a un enfoque más centrado *in vitro* sobre proteínas expresadas bien caracterizadas, aisladas y asistidas por transfección de dianas aptas para fármacos. Este paradigma de descubrimiento de fármacos dirigido a esta(s) proteína(s) está bien descrito en la técnica con el gran esfuerzo producido en el sector del descubrimiento de fármacos del diseño racional de los inhibidores de la cinasa humana que permiten explorar el quinoma humano. De hecho, la cinasa humana podría mutarse y la desregulación de la cinasa generalmente tiene lugar en la transformación maligna, el crecimiento y la evolución de la metástasis final de cánceres humanos. Esta implicación de la cinasa en el desarrollo y la proliferación de cánceres está bien establecida en, por ejemplo, leucemia, linfoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, melanoma, carcinoma de colon, de mama, de riñón, hepatocarcinoma,... Actualmente, a pesar de este gran esfuerzo para dirigirse a disfunciones de cinasa humana en algunos cánceres, el avance clínico del uso de inhibidores de la cinasa en el tratamiento contra el cáncer no se asocia obviamente con la curación o la remisión, y varios cánceres parecen permanecer resistentes de forma natural al uso clínico de inhibidores de la cinasa (por ejemplo, carcinoma hepatocelular). Además, los inhibidores de la cinasa pueden seleccionar *in vivo* algunas cepas mutadas y resistentes o las células transformadas pueden encontrar vías igualmente compensadoras. En este contexto, decidimos tener en cuenta todo el compartimento celular y un entorno de cultivo celular con el desarrollo de un ensayo de cribado celular fenotípico no sesgado. Además, la comprensión molecular y la descripción molecular de la transformación celular, el crecimiento del cáncer y la evolución de la metástasis continúan encontrándose en constante desarrollo, como por ejemplo la descripción reciente del concepto de células troncales cancerosas (CSC) o células iniciadoras de tumores (TIC). Los efectos inesperados del cribado celular pueden sugerir otras dianas o interacciones específicas para el descubrimiento de una nueva diana apta para fármacos. Por lo tanto, el desarrollo de nuevos agentes anticancerosos sigue siendo un desafío único con resultados impredecibles y un lugar para el descubrimiento de compuestos novedosos e innovadores.

En el contexto de la presente invención se ha preparado una nueva serie de bibliotecas de diversidad orientada de compuestos de 2-amino primario-4-amino secundario-quinolina que se cribó frente a un panel de estirpes celulares de cáncer humano (MOLM14, KG-1, MV4-11, A375, HCT116, HepG2, huh-7, MDA-MB-231, CAKI-1, 786-O) y células primarias de cáncer derivadas de pacientes que permiten descubrir nuevos agentes anticancerosos. Además, esta clase de compuestos muestra igualmente una actividad adicional contra células troncales cancerosas (CSC) humanas que están ampliamente incriminadas en la recurrencia y la recaída de los cánceres después del tratamiento contra el cáncer. Se utilizó un ensayo de ALDH bien descrito en la técnica como marcador funcional de células troncales cancerosas para describir la actividad contra las CSC (Greve, B. et al. Cytometry A 2012 (81) 284-293, Liu, S. et al. PLoS One 2013 (25) e81050, Ran, D. et al. Exp. Hematol. 2009 (37) 1423-1434, Cheung, A. M. et al. Leukemia 2007 (21) 1423-1430, Pearce, D. J. et al. Stem Cells 2005 (23) 752-760).

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar agentes activos para prevenir o inhibir la proliferación celular en una diversidad de organismos, y proporcionar procedimientos para su síntesis.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprenda una cantidad terapéuticamente eficaz de agentes activos de la invención, solos o en combinación con otros agentes activos, y un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

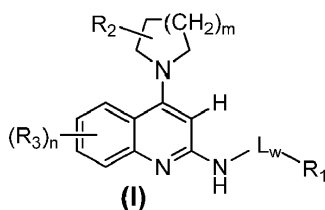
Otro objetivo de la presente invención es proporcionar agentes activos para su uso en tratamiento.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad proliferativa y/o neoplásica.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I)

65



en la que

- 5
- R_1 puede seleccionarse de entre un arilo C6-C10 sustituido o no por R_9 ; un anillo de heteroarilo de 5 a 8 miembros que comprende 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S sustituido o no por R_9 ; un heteroarilo fusionado tal como se ha definido que comprende de 8 a 13 átomos, incluidos 1, 2, 3, 4 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S, y que comprende por lo menos 2 átomos de carbono sustituidos o no por R_9 ;
- 10
- L_w puede seleccionarse de entre un alquilo (C1-C10) opcionalmente sustituido; un alquilo (C1-C10) lineal o ramificado sustituido con R_4 ; un cicloalquilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalqueno (C5-C10) opcionalmente sustituido; un alqueno (C3-C10) opcionalmente sustituido; un alquino (C3-C10) opcionalmente sustituido; C=O; SO; SO₂; (C=O)-NR₈; (C=O)-O; (C=O)-O-alquilo (C1-C4); SO₂-NR₈; NR₈; en la que R_4 puede seleccionarse de entre H; un alquilo (C1-C10) opcionalmente sustituido; un alqueno (C3-C10) opcionalmente sustituido; un alquino (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalqueno (C5-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquino (C8-C10) opcionalmente sustituido; un arilo (C6-C10) opcionalmente sustituido; un anillo de heteroarilo de 5 a 8 miembros o un heteroarilo fusionado tal como se ha definido que comprende de 8 a 13 átomos, incluidos 1, 2, 3, 4 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S, y que comprende por lo menos 2 átomos de carbono sustituidos o no por uno o más grupos sustituyentes seleccionados independientemente de entre hidrógeno, átomo de halógeno, alquilo (C1-C10) sustituido con uno o más átomos de halógeno, alcoxi (C1-C10), hidroxilo, ciano, nitro, carboxi, NR₅R₆, un anillo de 4 a 9 miembros saturado o insaturado que comprende 1, 2 o hasta 3 heteroátomos seleccionados independientemente de entre O, N y S;
- 15
- R_2 se selecciona de NR₅R₆;
- 20
- R_3 puede seleccionarse de entre un átomo de hidrógeno; un átomo de halógeno; un alquilo (C1-C10) lineal o ramificado sustituido o no por uno o más átomos de halógeno, hidroxilo, alcoxi, -NR₅R₆; un alqueno (C2-C10); un alquino (C2-C10); un cicloalquilo (C3-C10); un cicloalqueno (C5-C10); un cicloalquino (C8-C10); un alcoxi (C1-C10); un hidroxilo; un nitro; un ciano; un NR₅R₆; un O-(R₇); un (CO)-R₇; un (CO)-O-R₇; un (CO)-NR₅R₆; un O-(CO)-R₇; un O-(CO)-NR₅R₆; un NR₅-(CO)-R₇; un NR₅-(CO)-OR₇; un NR₅-(CO)-NR₅R₆; un -(O-CH₂CH₂)_m-OR₁₁; un -(O-CH₂CH₂)_m-NR₁₁R₁₁; un SO₂-R₇; un NR₅-SO₂-R₇; un SO₂-NR₅R₆; un NR₅-alquilo (C2-C6)-NR₅R₆; un arilo opcionalmente sustituido; un bencilo opcionalmente sustituido; un heteroarilo opcionalmente sustituido de 5 a 8 miembros que comprende 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S; un heteroarilo fusionado opcionalmente sustituido tal como se ha definido que comprende de 8 a 13 átomos, incluidos 1, 2, 3, 4 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S, y que comprende por lo menos 2 átomos de carbono; un heterociclilo opcionalmente sustituido de 4 a 9 miembros saturado o insaturado que comprende 1, 2 o hasta 3 heteroátomos seleccionados independientemente de entre O, N y S;
- 25
- R_5 y R_6 puede seleccionarse independientemente de entre un hidrógeno; un alquilo (C1-C10) opcionalmente sustituido; un alqueno (C3-C10) opcionalmente sustituido; un alquino (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalqueno (C5-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquino (C8-C10) opcionalmente sustituido; un (CO)-R₇, un (CO)-O-R₇; un (CO)-R₈R₈; un SO₂-R₇; un SO₂-NR₈R₈; un alquilo (C1-C10) sustituido con NR₈R₈; un cicloalquilo (C3-C10) sustituido con NR₈R₈; un arilo opcionalmente sustituido; un bencilo opcionalmente sustituido; un anillo de heteroarilo de 5 a 8 miembros opcionalmente sustituido que comprende 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S; un anillo de heterociclilo opcionalmente sustituido de 4 a 9 miembros saturado o insaturado que comprende 1, 2 o hasta 3 heteroátomos seleccionados independientemente de entre O, N y S; o R_5 y R_6 pueden unirse entre sí con el átomo de nitrógeno al que están unidos covalentemente para formar un grupo heterociclilo que forma un anillo de 4 a 9 miembros que puede contener 1, 2 o 3 heteroátomos adicionales seleccionados de entre O, N y S;
- 30
- R_7 y R_7 pueden seleccionarse independientemente de entre un hidrógeno; un alquilo (C1-C10) opcionalmente sustituido; un alqueno (C3-C10) opcionalmente sustituido; un alquino (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalqueno (C5-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquino (C8-C10) opcionalmente sustituido; un alquilo C1-C10 lineal o
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55

ramificado sustituido con NR_8R_8 ; un arilo (C6-C10) opcionalmente sustituido; un bencilo opcionalmente sustituido; un anillo heteroaromático de 5 a 8 miembros opcionalmente sustituido que comprende 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S;

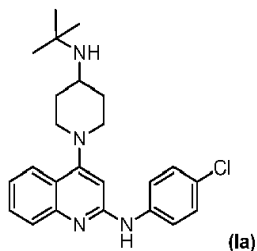
- 5
- R_8 y R_8' puede seleccionarse independientemente de entre un hidrógeno; un alquilo (C1-C10) opcionalmente sustituido; un alquenilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un alquinilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquenilo (C5-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquinilo (C8-C10) opcionalmente sustituido; o R_8 y R_8' pueden unirse entre sí con el átomo de nitrógeno al que están unidos covalentemente para formar un grupo heterociclilo que forma un anillo de 4 a 9 miembros que puede contener 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S;
- 10
- R_9 puede seleccionarse independientemente de entre un hidrógeno; un átomo de halógeno; un alquilo (C1-C10) opcionalmente sustituido; un alquilo (C1-C10) lineal o ramificado sustituido con uno o más átomos de halógeno, un hidroxilo, un alcoxi; un alquenilo (C2-C10) opcionalmente sustituido; un alquinilo (C2-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquenilo (C5-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquinilo (C8-C10) opcionalmente sustituido; un alcoxi (C1-C10) opcionalmente sustituido; un hidroxilo; un nitro; un ciano; un NR_5R_6 ; un (CO)- R_7 ; un (CO)-O- R_7 ; un (CO)- NR_5R_6 ; un O-(CO)- R_7 ; un O-(CO)- NR_5R_6 ; un NR_5 -(CO)- R_7 ; un NR_5 -(CO)-O- R_7 ; un NR_5 -(CO)- NR_5R_6 ; un SO_2 - R_7 ; un NR_5 - SO_2 - R_7 ; un SO_2 - NR_5R_6 ; un alquilo (C1-C10) sustituido con NR_5R_6 ; un NR_5 -alquilo (C2-C10)- NR_5R_6 ; un $-(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2)_m\text{-OR}_{11}$; un $-(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2)_m\text{-NR}_{11}\text{R}_{11}$; un arilo (C6-C10) opcionalmente sustituido que comprende 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S; un grupo heterociclilo opcionalmente sustituido que forma un anillo de 4 a 9 miembros que puede contener 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S; un $-\text{NR}_5\text{R}_{10}$; un $-\text{O}-\text{R}_{10}$;
- 15
- R_{10} puede seleccionarse independientemente de entre un hidrógeno; un arilo (C6-C12) sustituido o no por R_{12} ; un bencilo sustituido o no por R_{12} ; un anillo de heteroarilo de 5 a 8 miembros que comprende 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S sustituido o no por R_{12} ; un heteroarilo fusionado tal como se ha definido que comprende de 8 a 13 átomos, incluidos 1, 2, 3, 4 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S y que comprende por lo menos 2 átomos de carbono sustituido o no por R_{12} ; un heterociclilo que forma un anillo de 4 a 9 miembros que puede contener 0, 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S sustituido o no por R_{12} ;
- 20
- R_{11} y R_{11}' pueden seleccionarse independientemente de entre un átomo de hidrógeno; un alquilo (C2-C10) opcionalmente sustituido; un alquenilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un alquinilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquenilo (C5-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquinilo (C8-C10) opcionalmente sustituido; un alquilo (C2-C10) lineal o ramificado sustituido o no por uno o más átomos de halógeno; o R_{11} y R_{11}' pueden unirse entre sí con el átomo de nitrógeno al que están unidos covalentemente para formar un grupo heterociclilo que forma un anillo saturado o insaturado de 4 a 9 miembros que puede contener 1, 2 o 3 heteroátomos adicionales seleccionados de entre O, N y S;
- 25
- R_{12} puede seleccionarse de entre un átomo de hidrógeno; un átomo de halógeno; un alquilo (C1-C10) lineal o ramificado sustituido o no por uno o más átomos de halógeno, hidroxilo, alcoxi, $\text{NR}_{11}\text{R}_{11}$; un alquenilo (C2-C10); un alquinilo (C2-C10); un cicloalquilo (C3-C10); un cicloalquenilo (C5-C10); un cicloalquinilo (C8-C10); un alcoxi (C1-C10); un hidroxilo; un nitro; un ciano; un $\text{NR}_{11}\text{R}_{11}$; un O-(R_7); un (CO)- R_7 ; un (CO)-O- R_7 ; un (CO)- $\text{NR}_{11}\text{R}_{11}$; un O-(CO)- R_7 ; un O-(CO)- $\text{NR}_{11}\text{R}_{11}$; un NR_{11} -(CO)- R_7 ; un NR_{11} -(CO)-O- R_7 ; un NR_{11} -(CO)- $\text{NR}_{11}\text{R}_{11}$; un $-(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2)_m\text{-OR}_{11}$; un $-(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2)_m\text{-NR}_{11}\text{R}_{11}$; un SO_2 - R_7 ; un NR_5 - SO_2 - R_7 ; un SO_2 - $\text{NR}_{11}\text{R}_{11}$; un NR_{11} -alquilo (C2-C6)- $\text{NR}_{11}\text{R}_{11}$; un arilo opcionalmente sustituido; un bencilo opcionalmente sustituido; un heteroarilo de 5 a 8 miembros opcionalmente sustituido que comprende 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S; un heteroarilo fusionado opcionalmente sustituido tal como se ha definido que comprende de 8 a 13 átomos, incluidos 1, 2, 3, 4 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S, y que comprende por lo menos 2 átomos de carbono; un anillo de heterociclilo de 4 a 9 miembros opcionalmente sustituido saturado o insaturado que comprende 1, 2 o hasta 3 heteroátomos seleccionados independientemente de entre O, N y S;
- 30
- n puede representar un número entero igual que puede tener cualquiera de los valores 0, 1, 2, 3 o 4;
- 35
- m puede representar un número entero igual que puede tener cualquiera de los valores 1, 2 o 3;
- 40
- w puede representar un número entero igual que puede tener cualquiera de los valores 0 o 1;

65 en las que la expresión "opcionalmente sustituido" significa opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes elegidos independientemente de entre un átomo de halógeno, un alquilo (C1-C10) lineal o

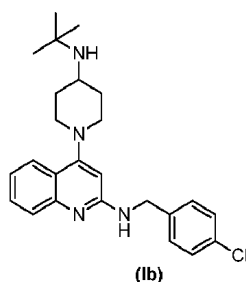
ramificado sustituido o no por uno o más átomos de halógeno, a (C2-C10) alqueno lineal o ramificado sustituido o no por uno o más átomos de halógeno, un alquino (C2-C10) lineal o ramificado sustituido o no por uno o más átomos de halógeno, un cicloalquilo (C3-C10) sustituido o no por uno o más átomos de halógeno, un cicloalqueno (C5-C10) sustituido o no por uno o más átomos de halógeno, un cicloalquino (C8-C10) sustituido o no por uno o más átomos de halógeno, un alcoxi (C1-C10), un hidroxilo, un ciano, un nitro, un NR₈R₈' (siendo R₈ y R₈' tal como se han descrito anteriormente); y cualquier sal, solvato, isómeros, estereoisómeros farmacéuticamente aceptable o mezclas de estereoisómeros, solvatos o profármacos de los mismos.

En algunas formas de realización específicas, la invención proporciona un compuesto seleccionado de entre:

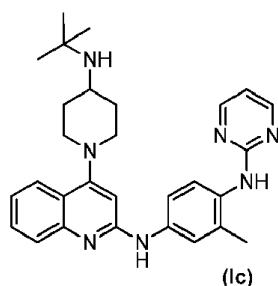
2-(4-clorofenilamino)-4-(4-terc-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina de fórmula (1a) (1-5)



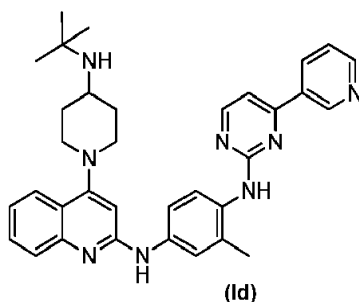
2-(4-clorobencilamino)-4-(4-terc-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina de fórmula (1b) (2-2)



2-[3-metil-4-(pirimidin-2-ilamino)fenilamino]-4-(4-terc-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (3-4) de fórmula (1c)



2-[4-[4-(piridin-3-il)-2-pirimidinamino]-3-metil-fenilamino]-4-(4-terc-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (4-2) de fórmula (1d)



o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 En algunas otras formas de realización específicas, la invención proporciona un compuesto elegido de entre sal clorhidrato de 2-(4-clorofenilamino)-4-(4-terc-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (1-6), sal clorhidrato de 2-(4-clorobencilamino)-4-(4-terc-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (2-3), sal clorhidrato de 2-[3-metil-4-(pirimidin-2-ilamino)fenilamino]-4-(4-terc-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (3-5), sal clorhidrato de 2-{4-[4-(piridin-3-il)-2-pirimidinamino]-3-metil-fenilamino}-4-(4-terc-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (4-3).
- 10 En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que puede comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto según lo anterior, o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, y un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 En algunas formas de realización particulares, la composición farmacéutica de la invención puede comprender además uno o más agentes antineoplásicos.
- 20 En algunas formas de realización particulares, la composición farmacéutica según lo anterior puede comprender una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la invención que puede formularse o coformularse en nanopartículas.
- 25 En algunas formas de realización específicas de la composición farmacéutica de la invención, las nanopartículas pueden comprender una composición biodegradable lisosómica.
- En algunas formas de realización específicas de la composición farmacéutica de la invención, las nanopartículas pueden comprender un polímero o copolímero biocompatible.
- 30 En algunas formas de realización específicas de la composición farmacéutica de la invención, las nanopartículas pueden asociarse covalentemente o no covalentemente con un polietilenglicol (PEG).
- En algunas formas de realización específicas de la composición farmacéutica de la invención, las nanopartículas pueden tener un tamaño promedio de aproximadamente 80 a aproximadamente 600 nm.
- 35 En algunas formas de realización específicas de la composición farmacéutica de la invención, la nanopartícula puede ser una nanopartícula dirigida que contiene un motivo de señalización.
- En algunas formas de realización específicas, las nanopartículas pueden comprender una composición biodegradable polimérica.
- 40 En algunas formas de realización específicas particulares, el polímero puede basarse en poli(ácido-DL-láctico-co-glicólico) que puede tener un peso molecular de 7 a 240 kDa; o un copolímero de poli(ácido láctico) (PLA) y poli(ácido glicólico) (PGA) en el que la relación molecular puede encontrarse entre 95:5 y 50:50.
- 45 En algunas formas de realización específicas de la composición farmacéutica de la invención, las nanopartículas pueden comprender un artículo elegido entre nanopartículas de PLGA, nanopartículas de PLGA-PEG (de tipo de bloques AB, BA, ABA o BAB, en los que A = PLGA y B = PEG) y nanopartículas dirigidas.
- En algunas formas de realización específicas de la composición farmacéutica de la invención, las nanopartículas pueden comprender un artículo elegido de entre liposomas.
- 50 En algunas formas de realización, la composición farmacéutica de la invención puede ser adecuada para liberación lenta o mantenida.
- 55 En algunas formas de realización específicas, la composición farmacéutica de la invención puede ser adecuada para administración oral, parenteral, ocular, transdérmica, nasal o para inhalación.
- En algunas formas de realización específicas de la composición farmacéutica de la invención, el compuesto activo de la invención puede asociarse con por lo menos un agente anticanceroso terapéuticamente activo.
- 60 En alguna forma de realización específica, la composición farmacéutica de la invención puede comprender una combinación de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención y una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes antineoplásicos, en la que los componentes que constituyen dicha combinación pueden ser para su uso simultáneo, por separado o secuencial en un tratamiento contra el cáncer.
- 65 En formas de realización específicas de la composición farmacéutica de la invención, el agente antineoplásico se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en everolimus, cloroquina, hidroxicloroquina, trabectedina, abraxano, TLK 286, AV-299, DN-101, pazopanib, GSK690693, RTA 744, ON 0910.Na, AZD 6244 (ARRY-142886), AMN-107, TKI-258, GSK461364, AZD 1152, enzastaurina, vandetanib, ARQ-197, MK-0457, MLN8054, PHA-739358, R-763, AT-9263, pemetrexed, erlotinib, dasatanib, nilotinib, decatanib, panitumumab, amrubicina,

oregovomab, Lep-etu, nolatrexed, azd2171, batabulina, ofatumumab, zanolimumab, edotecarina, tetrandrme, rubitecán, tesmilifeno, oblimersen, ticilimumab, ipilimumab, gopol, Bio 111, 131-I-TM-601, ALT-110, BIO 140, CC 8490, cilengitida, gimatecán, IL13-PE38QQR, TNO 1001, IPdR1 KRX-0402, lucantona, LY 317615, neuradiab, vitespán, Rta 744, Sdx 102, talampanel, atrasentán, Xr 311, romidepsina, ADS-100380, sunitinib, 5-fluorouracilo, vorinostat, etopósido, gemcitabina, doxorrubicina, irinotecán, doxorrubicina liposomal, 5'-desoxi-5-fluorouridina, vincristina, temozolomida, ZK-304709, seliciclib, PD0325901, AZD-6244, capecitabina, ácido L-glutámico, sal heptahidrato de N-[4-[2-(2-amino-4,7-dihidro-4-oxo-1H-pirrol-2,3-d)pirimidin-5-il)etil]benzoil]-disodio, camptotecina, irinotecán marcado con PEG, tamoxifeno, citrato de toremifeno, anastrozol, exemestano, letrozol, DES(dietilestilbestrol), estradiol, estrógeno, estrógeno conjugado, bevacizumab, IMC-1C11, CHIR-258, 3-[5-(metilsulfonilpiperidinmetil)-indolil]-quinolona, vatalanib, AG-013736, AVE-0005, la sal acetato de acetato de [D-Ser(But)₆,Azgly₁₀](piro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(But)-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH₂, acetato de goserelina, acetato de leuprolida, pamoato de triptorelina, acetato de medroxiprogesterona, caproato de hidroxiprogesterona, acetato de megestrol, raloxifeno, bicalutamida, flutamida, nilutamida, acetato de megestrol, CP-724714; TAK-165, HKI-272, erlotinib, lapatanib, canertinib, anticuerpo ABX-EGF, erbitux, EKB-569, PKI-166, GW-572016, lonafamib, BMS-214662, tipifarnib; amifostina, NVP-LAQ824, ácido suberoil-analida-hidroxiámico, ácido valproico, tricostatina A, FK-228, SU11248, sorafenib, KRN951, aminoglutetimida, amsacrina, anagrelida, L-asparaginasa, vacuna de Bacillus Calmette-Guerin (BCG), bleomicina, busrelina, busulfán, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, cladribina, clodronato, ciproterona, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, daunorrubicina, dietilestilbestrol, epirubicina, fludarabina, fludrocortisona, fluoximesterona, flutamida, gemcitabina, gleevec, hidroxiurea, idarrubicina, ifosfamida, imatinib, leuprolida, levamisol, lomustina, mecloretamina, melfalán, 6-mercaptapurina, mesna, metotrexato, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, nilutamida, octeotida, oxaliplatino, pamidronato, pentostatina, plicamicina, porfimer, procarbazona, raltitrexed, rituximab, estreptozocina, tenipósido, testosterona, talidomida, tioguanina, tiotepa, tretinoína, vindesina, ácido 13-cis-retinoico, mostaza de fenilalanina, mostaza de uracilo, estramustina, altretamina, floxuridina, 5-deoxiuridina, citosina arabinósido, 6-mecaptapurina, deoxicofurcina, calcitriol, valrubicina, mitramicina, vinblastina, vinorelbina, topotecán, razoxina, marimastat, COL-3, neovastat, BMS-275291, escualamina, endostatina, SU5416, SU6668, EMD121974, interleucina-12, 1M862, angiostatina, vitaxina, droloxifeno, idoxifeno, espirolactona, finasterida, cimitidina, trastuzumab, denileucina difitox, gefitinib, bortezimib, paclitaxel, irinotecán, topotecán, doxorrubicina, docetaxel, vinorelbina, bevacizumab (anticuerpo monoclonal) y erbitux, paclitaxel exento de cremophor, epitilona B, BMS-247550, BMS-310705, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, pipendoxifeno, ERA-923, arzoxifeno, fulvestrant, acolbifeno, lasofoxifeno, idoxifeno, TSE-424, HMR-3339, ZK186619, PTK787/ZK 222584, VX-745, PD 184352, rapamicina, 40-O-(2-hidroxi)etil-rapamicina, temsirolimus, AP-23573, RAD001, ABT-578, BC-210, LY294002, LY292223, LY292696, LY293684, LY293646, wortmannina, ZM336372, L-779,450, PEG-filgrastim, darbepoetina, eritropoyetina, factor estimulante de colonias de granulocitos, zolendronato, prednisona, cetuximab, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, histrelina, interferón alfa-2a pegilado, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b pegilado, interferón alfa-2b, azacitidina, PEG-L-asparaginasa, lenalidomida, gemtuzumab, hidrocortisona, interleucina-11, dexrazoxano, alemtuzumab, ácido all-transretinoico, ketoconazol, interleucina-2, megestrol, mostaza de nitrógeno, metilprednisolona, ibritumomab tiuxetán, andrógenos, decitabina, hexametilmelamina, bexaroteno, tositumomab, trióxido de arsénico, cortisona, editronato, mitotano, ciclosporina, daunorrubicina liposomal, Edwina-asparaginasa, estroncio 89, casopitant, netupitant, un antagonista del receptor de NK-1, palonosetrón, aprepitant, difenhidramina, hidroxizina, metoclopramida, lorazepam, alprazolam, haloperidol, droperidol, dronabinol, dexametasona, metilprednisolona, proclorperazina, granisetron, ondansetrón, dolasetron, tropisetron, pegfilgrastim, epoetina alfa y darbepoetina alfa, ipilimumab, vemurafenib, inhibidor de FLT-3, un inhibidor de VEGFR, un inhibidor de EGFR TK, un inhibidor de aurora cinasa, un modulador de PIK-1, un inhibidor de Bcl-2, un inhibidor de HDAC, un inhibidor de c-MET, un inhibidor de PARP, un inhibidor de Cdk, un inhibidor de EGFR TK, un inhibidor de IGFR-TK, un anticuerpo anti-HGF, un inhibidor de PI3 cinasa, un inhibidor de mTOR, un inhibidor de AKT, un inhibidor de JAK/STAT, un inhibidor de punto de control-1 o 2, un inhibidor de cinasa de adhesión focal, un inhibidor de cinasa de Map cinasa (MEK), un anticuerpo de trampa de VEGF y mezclas de los mismos.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad proliferativa y/o neoplásica, que puede comprender la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente activa de un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que comprende la misma, a un ser humano o un animal que lo necesite.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para inhibir el crecimiento o la diferenciación de una célula troncal cancerosa (CSC), una célula iniciadora de tumor, una célula de tipo mesenquimatosa asociada con cáncer, una célula cancerosa mesenquimatosa o una célula mesenquimatosa, que puede comprender la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente activa de un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que comprende el mismo, a un ser humano o un animal que lo necesite.

En otro aspecto, la invención proporciona un compuesto para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad proliferativa y/o neoplásica.

En otro aspecto, la invención proporciona un compuesto para inhibir el crecimiento o la diferenciación de una célula troncal cancerosa (CSC), una célula iniciadora de tumor, una célula de tipo mesenquimatosa asociada con

cáncer, una célula cancerosa mesenquimatosa o una célula mesenquimatosa.

Breve descripción del dibujo

5 Lo expuesto anteriormente y otras características y ventajas de la invención se pondrán más claramente de manifiesto a partir de los siguientes ejemplos, y haciendo referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 representa la disminución de células de la población de ALDH+ en células derivadas de pacientes con CCR (CPP19, CPP30 y CPP45) cuando se tratan con compuesto 2-3 (Ensayo Aldefluor™);

10 La figura 2 representa la inhibición, por el compuesto 2-3, de la formación de tumoroesfera de células derivadas de pacientes con cáncer colorrectal metastásico en el hígado (CCR);

La figura 3 representa los espectros de RMN de ^1H del compuesto 1-6 en DMSO- d_6 ;

15 La figura 4 representa los espectros de RMN de ^1H del compuesto 2-3 en DMSO- d_6 ;

La figura 5 representa los espectros de RMN de ^1H del compuesto 3-5 en DMSO- d_6 ;

20 La figura 6 representa los espectros de RMN de ^1H del compuesto 4-3 en DMSO- d_6 ;

Descripción detallada

25 En la presente descripción, el término "alquilo", solo o en combinación con otros grupos, se refiere a un radical hidrocarburo alifático saturado monovalente de cadena ramificada o lineal de uno a veinte átomos de carbono, preferentemente de uno a dieciséis átomos de carbono, de forma más preferida de uno a diez átomos de carbono. La expresión "alquilo inferior", sola o en combinación, significa un grupo alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada con 1 a 6 átomos de carbono ("alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ "), preferentemente un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada con 1 a 5 átomos de carbono (alquilo " $\text{C}_1\text{-C}_5$ ") y de forma particularmente preferida un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada con 1 a 3 átomos de carbono (alquilo " $\text{C}_1\text{-C}_3$ "). Los ejemplos de grupos alquilo inferior de cadena lineal y ramificada son metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo, los pentilos isoméricos, los hexilos isoméricos, preferentemente metilo y etilo y propilo e isopropilo y de la forma más preferida metilo.

35 La expresión "alcoxi inferior" se refiere al grupo $\text{R}'\text{-O-}$, en el que R' es alquilo inferior y la expresión "alquilo inferior" tiene el significado indicado anteriormente. Ejemplos de grupos alcoxi inferior son metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, isobutoxi, sec-butoxi y terc-butoxi, preferentemente metoxi y etoxi e isopropoxi y terc-butoxi, de la forma más preferida metoxi y etoxi.

40 La expresión "alqueno inferior" significa un residuo de hidrocarburo de cadena lineal o cadena ramificada que comprende un enlace olefínico y 2 a 6 átomos de carbono (alqueno " $\text{C}_2\text{-C}_6$ "), preferentemente de 2 a 5 átomos de carbono (alqueno " $\text{C}_2\text{-C}_5$ "), de forma particularmente preferida de 2 a 4 átomos de carbono (alqueno " $\text{C}_2\text{-C}_4$ "). Ejemplos de grupos alqueno inferior son etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo, isopropenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-pentenilo, isopentenilo. Ejemplos preferidos son 2-propenilo, 2-butenilo e isopentenilo.

45 La expresión "alquino inferior" significa un residuo de hidrocarburo de cadena lineal o cadena ramificada que comprende un enlace alquino y 2 a 6 átomos de carbono (alquino " $\text{C}_2\text{-C}_6$ "), preferentemente de 2 a 5 átomos de carbono (alquino " $\text{C}_2\text{-C}_5$ "), de forma particularmente preferida de 2 a 4 átomos de carbono (alquino " $\text{C}_2\text{-C}_4$ "). Ejemplos de grupos alquino inferior son etinilo, 1-propinilo, 2-propinilo, 1-butinilo, 3-butinilo, 4-butinilo, 1-but-2-ino, 1-pentinilo, pent-2-in-1-ilo, pent-3-in-1-ilo, pent-4-in-1-ilo, pent-2-in-3-ilo. Ejemplos preferidos son propin-1-ilo, propin-3-ilo, butin-1-ilo, butin-3-ilo, butin-4-ilo, but-2-in-1-ilo.

El término "halógeno" se refiere a flúor, cloro, bromo y yodo, prefiriéndose flúor, cloro y bromo.

55 El término "cicloalquilo" denota un grupo carbocíclico saturado que contiene de 3 a 7 átomos de carbono ("cicloalquilo $\text{C}_3\text{-C}_7$ "), tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo o cicloheptilo. Cicloalquilos preferidos son ciclopropilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

60 La expresión "grupo heterocíclico" significa un grupo monocíclico de 3 a 7 miembros completamente saturado o insaturado pero no completamente insaturado, o sistemas de anillos bicíclicos fusionados de 7 a 11 miembros que poseen por lo menos un heteroátomo elegido de entre un átomo de oxígeno, un átomo de nitrógeno o un átomo de azufre. Cada anillo del grupo heterocíclico puede poseer por lo menos un heteroátomo seleccionado de entre átomos de nitrógeno, átomos de oxígeno y/o átomos de azufre. Los grupos heterocíclicos preferidos son pirrolidina, piperidina, piperazina, tetrahidrofurano, bis-tetrahidrofurano y morfolina.

65

El término "carboxilo" significa el grupo -COOH.

El término "heteroarilo" se refiere, en general, a un anillo aromático de 5 u 11 miembros que comprende por lo menos un heteroátomo y puede comprender adicionalmente uno, dos, tres o cuatro átomos elegidos entre nitrógeno, oxígeno y/o azufre, tales como piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, 2-oxo-1,2-dihidropiridinilo, oxadiazolilo, isoxazolilo, tiadiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiofenilo, furanilo, oxazolilo, isotiazolilo y tiazolilo. El término "heteroarilo" se refiere además a grupos bicíclicos aromáticos o parcialmente insaturados que comprenden dos anillos de 5 o 6 miembros, en los que uno o ambos anillos pueden contener uno, dos, tres o cuatro átomos elegidos entre nitrógeno, oxígeno o azufre, tales como quinolinilo, isoquinolinilo, cinolinilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, tiofenilo, furanilo, oxazolilo, isotiazolilo, pirazolo[1,5-a]piridilo, imidazo[1,2-a]piridilo, quinoxalinilo, quinazolilo, benzotiazolilo, benzotriazolilo, 1H-benzo[d]imidazol, benzo[d]isoxazolilo, benzo[d]isotiazolilo, benzo[c]isoxazolilo, benzo[c]isotiazolilo, indolilo, isoindolinilo, 6,7-dihidro-5H-pirrolo[3,4-b]piridinilo, 2,3-dihidro-1H-pirrolo[3,4-c]piridinilo, 6,7-dihidro-5H-pirrolo[3,4-d]pirimidinilo, purinilo, indazolilo, indolizino, imidazo[1,2-a]piridinilo, imidazo[1,5-a]piridinilo, imidazo[1,5-a]pirazinilo, imidazo[1,2-a]pirazinilo, 1H-imidazo[4,5-b]pirazinilo, pirazolo[1,5-a]piridinilo, pirrolo[1,2-a]pirimidinilo, pirrolo[1,2-a]pirazinilo, pirrolo[1,2-c]pirimidinilo, oxazolo[4,5-b]piridinilo, oxazolo[4,5-c]piridinilo, oxazolo[5,4-c]piridinilo, oxazolo[5,4-b]piridinilo, tiazolo[4,5-b]piridinilo, tiazolo[4,5-c]piridinilo, tiazolo[5,4-c]piridinilo, tiazolo[5,4-b]piridinilo, oxazolo[5,4-d]pirimidinilo, oxazolo[4,5-d]pirimidinilo, tiazolo[5,4-d]pirimidinilo, tiazolo[4,5-d]pirimidinilo, oxazolo[4,5-b]pirazinilo, tiazolo[4,5-b]pirazinilo, isoxazolo[4,5-b]pirazinilo, isotiazolo[4,5-b]pirazinilo, isoxazolo[4,5-d]pirimidinilo, isotiazolo[4,5-d]pirimidinilo, isoxazolo[5,4-d]pirimidinilo, isotiazolo[5,4-d]pirimidinilo, isoxazolo[5,4-b]piridinilo, isotiazolo[5,4-c]pirimidinilo, isoxazolo[5,4-c]piridinilo, isotiazolo[4,5-c]piridinilo, isoxazolo[4,5-c]piridinilo, isoxazolo[4,5-b]piridinilo, isoxazolo[4,3-d]pirimidinilo, isotiazolo[4,3-d]pirimidinilo, isoxazolo[3,4-d]pirimidinilo, isotiazolo[3,4-d]pirimidinilo, pirido[2,3-d]pirimidinilo, pirido[3,4-d]pirimidinilo, pirido[4,3-d]pirimidinilo, pirido[3,2-d]pirimidinilo, pirido[2,3-b]pirazinilo, pirido[3,4-b]pirazinilo, [1,2,3]triazolo[4,5-b]piridinilo, [1,2,3]triazolo[4,5-c]piridinilo, 3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidinil. Los grupos heteroarilo preferidos son piridilo, tiozolilo, isotiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, quinoxolinilo y pirazinilo.

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a aquellas sales que conservan la eficacia biológica y las propiedades de las bases libres o ácidos libres, que no son biológicamente o de otra forma indeseables. Las sales se forman con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, preferentemente ácido clorhídrico, y ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxílico, ácido maleico, ácido malónico, ácido salicílico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido glutárico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido málico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido bencenosulfónico, N-acetilcisteína y similares. Además, estas sales pueden prepararse mediante la adición de una base inorgánica o una base orgánica al ácido libre. Las sales derivadas de una base inorgánica incluyen, pero sin limitación, las sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio y similares. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen, pero sin limitación, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas, incluidas aminas naturales sustituidas, aminas cíclicas y resinas básicas de intercambio iónico, tales como resinas de isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, lisina, arginina, N-etilpiperidina, piperidina, poliamina y similares. Los compuestos de la fórmula I también pueden estar presentes en forma de iones dipolares.

Las sales farmacéuticamente aceptables particularmente preferidas de compuestos de la fórmula I son las sales clorhidrato.

Los compuestos de fórmula I también pueden estar solvatados, por ejemplo, hidratados. La solvatación puede efectuarse en el transcurso del proceso de producción o puede tener lugar, por ejemplo, como consecuencia de las propiedades higroscópicas de un compuesto inicialmente anhidro de fórmula I o II (hidratación). La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" también incluye solvatos fisiológicamente aceptables.

Los "isómeros" son compuestos que tienen fórmulas moleculares idénticas pero que difieren en la naturaleza o la secuencia de enlace de sus átomos o en la disposición de sus átomos en el espacio. Los isómeros que difieren en la disposición de sus átomos en el espacio se denominan "estereoisómeros". Los estereoisómeros que no son imágenes especulares uno del otro se denominan "diastereoisómeros", y los estereoisómeros que son imágenes especulares no superponibles se denominan "enantiómeros", o a veces isómeros ópticos. Tal como se utilizan en la presente memoria, los términos "sujeto" o "paciente" se utilizan de forma intercambiable. Tal como se utilizan en la presente memoria, los términos "sujeto" y "sujetos" se refieren a un animal (por ejemplo, aves, reptiles y mamíferos), preferentemente un mamífero, incluido un mamífero no primate (por ejemplo, un camello, un burro, una cebra, una vaca, un cerdo, un caballo, una cabra, una oveja, un gato, un perro, una rata y un ratón) y un primate (por ejemplo, un mono, un chimpancé y un ser humano) y de la forma más preferida un ser humano.

Tal como se utilizan en la presente memoria, los términos "terapias" y "terapia" pueden referirse a cual(es)quier(a) protocolo(s), procedimiento(s), composiciones, formulaciones y/o agente(s) que se pueden utilizar en la prevención, el tratamiento, la gestión o la mejora de una enfermedad, incluidas las infecciones víricas o bacterianas o los síntomas asociados con las mismas, cánceres, etc. En determinadas formas de

realización, los términos "terapias" y "terapia" se refieren a terapia biológica, terapia de apoyo y/u otras terapias útiles en el tratamiento, la gestión, la prevención o la mejora de las diferentes enfermedades conocidas por los expertos en la materia.

5 La expresión "una cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto significa una cantidad de compuesto que es eficaz para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de una enfermedad o prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz se encuentra dentro de la experiencia en la técnica. La cantidad o dosificación terapéuticamente eficaz de un compuesto según la presente invención puede variar dentro de amplios límites y puede determinarse de una forma conocida en la técnica.
10 Dicha dosificación se ajustará a los requerimientos individuales en cada caso particular, incluidos el compuesto o los compuestos específicos que se van a administrar, la vía de administración, la afección que se está tratando, así como el paciente que se está tratando. En general, en el caso de una administración oral o parenteral a seres humanos adultos que pesan aproximadamente 70 kg, una dosis diaria de 0.1 mg a 5 g, preferentemente de aproximadamente 0.1 mg a 1 g, de forma más preferida de 0.5 mg a 500 mg, y de la forma más preferida de aproximadamente 1 mg a 300 mg, debería ser apropiada, aunque el límite superior se puede superar cuando esté indicado. La dosis diaria se puede administrar como una dosis única o en dosis divididas, o para administración parenteral, se puede administrar como una infusión continua.

20 La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se pretende que incluya todos y cada uno de los materiales compatibles con la administración farmacéutica, incluidos disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción y otros materiales y compuestos compatibles con la administración farmacéutica. Excepto cuando cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla la utilización de los mismos en las composiciones de la invención. También pueden incorporarse compuestos activos suplementarios en las composiciones. Estas composiciones pueden prepararse aplicando técnicas conocidas en la técnica tal como se describen en Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (décima edición) 2014, editado por Loyd Allen, Howard C. Ansel, publicado por Wolters Kluwer Health and Remington: The Science and Practice of Pharmacy (vigésimo segunda edición) 2012, editado por Loyd V. Allen, publicado por Pharmaceutical Press, cada uno de los cuales se incorpora a la presente memoria como referencia.

30 Tal como se utilizan en la presente memoria, los términos "tratar", "tratamiento" y "tratando" se refieren, en el contexto de la administración de una terapia(s) a un sujeto para tratar una infección vírica, a uno, dos, tres, cuatro, cinco o más de los efectos siguientes que son resultado de la administración de una terapia o una combinación de terapias: (i) la reducción o la mejora de la gravedad de una enfermedad y/o un síntoma asociado con la misma; (ii) la reducción de la duración de una enfermedad y/o un síntoma asociado con la misma; (iii) la regresión de una enfermedad y/o un síntoma asociado con la misma; (iv) la reducción del título de un patógeno; (v) la reducción de la insuficiencia orgánica asociada con una enfermedad; (vi) la reducción en la hospitalización de un sujeto; (vii) la reducción de la duración de la hospitalización; (viii) el aumento en la supervivencia de un sujeto; (ix) la eliminación de una infección; (x) la inhibición de la progresión de una infección y/o un síntoma asociado con la misma; (xi) la prevención de la propagación de un virus a partir de una célula, tejido o sujeto a otra célula, tejido o sujeto y/o (xii) la potenciación o la mejora del efecto terapéutico de otra terapia.

45 "Profármaco" significa un compuesto que experimenta una conversión para proporcionar el compuesto de la invención dentro de un sistema biológico. Un profármaco es un derivado químico inactivo o menos activo que el fármaco en sí. Después de su administración y su difusión en el cuerpo, el derivado profármaco experimenta uno o más procesos metabólicos que liberan el fármaco activo. La conversión del profármaco al fármaco se lleva a cabo generalmente bajo el control de procesos enzimáticos (generalmente por medios metabólicos, por ejemplo, hidrólisis, reducción u oxidación) y menos frecuentemente por reacciones químicas clásicas durante su difusión en el cuerpo. El enlace entre el vehículo y el fármaco puede ser, pero sin limitación, un éster, una amida, un carbonato, un carbamato, una imina, un acetal, un éter (por ejemplo, conjugación con glucoro), una función y un sistema molecular oxidable, una función reducible y un sistema molecular reducible, una función fotoactivada y un sistema molecular fotoactivado. Por ejemplo, un profármaco de éster de un compuesto que contiene un grupo hidroxilo puede convertirse por hidrólisis *in vivo* en la molécula parental. Ésteres adecuados de los compuestos de la invención que contienen un grupo hidroxilo son, por ejemplo, acetatos, citratos, lactatos, tartratos, malonatos, oxalatos, salicilatos, propionatos, succinatos, fumaratos, maleatos, metileno-bis-β-hidroxi-naftoatos, gestisatos, isetionatos, di-p-toluitartratos, metanosulfonatos, etanosulfonatos, bencenosulfonatos, p-toluenosulfonatos, ciclohexilsulfamatos y quinatos. Como otro ejemplo, un profármaco de éster del compuesto de la invención que contiene un grupo carboxi puede convertirse mediante hidrólisis *in vivo* en la molécula parental (los ejemplos de profármacos éster se describen por F.J. Leinweber, Drug Metab. Res.1987, (18) página 379, que se incorpora a la presente memoria como referencia). De forma similar, un profármaco de acilo de un compuesto que contiene un grupo amino puede convertirse mediante hidrólisis *in vivo* en la molécula parental (los ejemplos de profármacos para estos y otros grupos funcionales, incluidos amina, alcohol, se describen en Prodrugs: Challenges and Rewards (Partes 1 y 2); Ed V. Stella, R. Borchardt et al., Springer, 2007, y Prodrugs and Targeted Delivery: Towards Better ADME Properties Ed. J. Rautio, Seies Ed. R. Mannhold, H. Kubinyi, G. Folkers. Wiley-VCH 2011, cada uno de los cuales se incorpora a la presente memoria como referencia).

Generalmente, se utiliza un sistema vehículo de profármacos a fin de aumentar la solubilidad en agua o lípidos, reducir la toxicidad, aumentar la estabilidad química y biológica de un compuesto sensible, aumentar el tiempo de circulación en el cuerpo ($T_{1/2}$), aumentar la exposición total al fármaco (AUC) y su distribución en órganos (perfiles PK-PD) y que se dirija específicamente al sitio.

5

Material y procedimientos con respecto a los ejemplos 1, 2, 3 y 4

Los reactivos y disolventes se obtuvieron de proveedores comerciales y se utilizaron sin purificación adicional. El cloruro de metileno seco se secó y se destiló sobre CaCl_2 y se almacenó sobre tamices moleculares de 4 Å en atmósfera de argón. El tetrahidrofurano se secó sobre cetilo de sodio/benzofenona en atmósfera de argón y se destiló antes de su utilización. Las purificaciones por cromatografía ultrarrápida se realizaron en gel de sílice Merck (40-63 μm o 15-40 μm) como fase estacionaria.

10

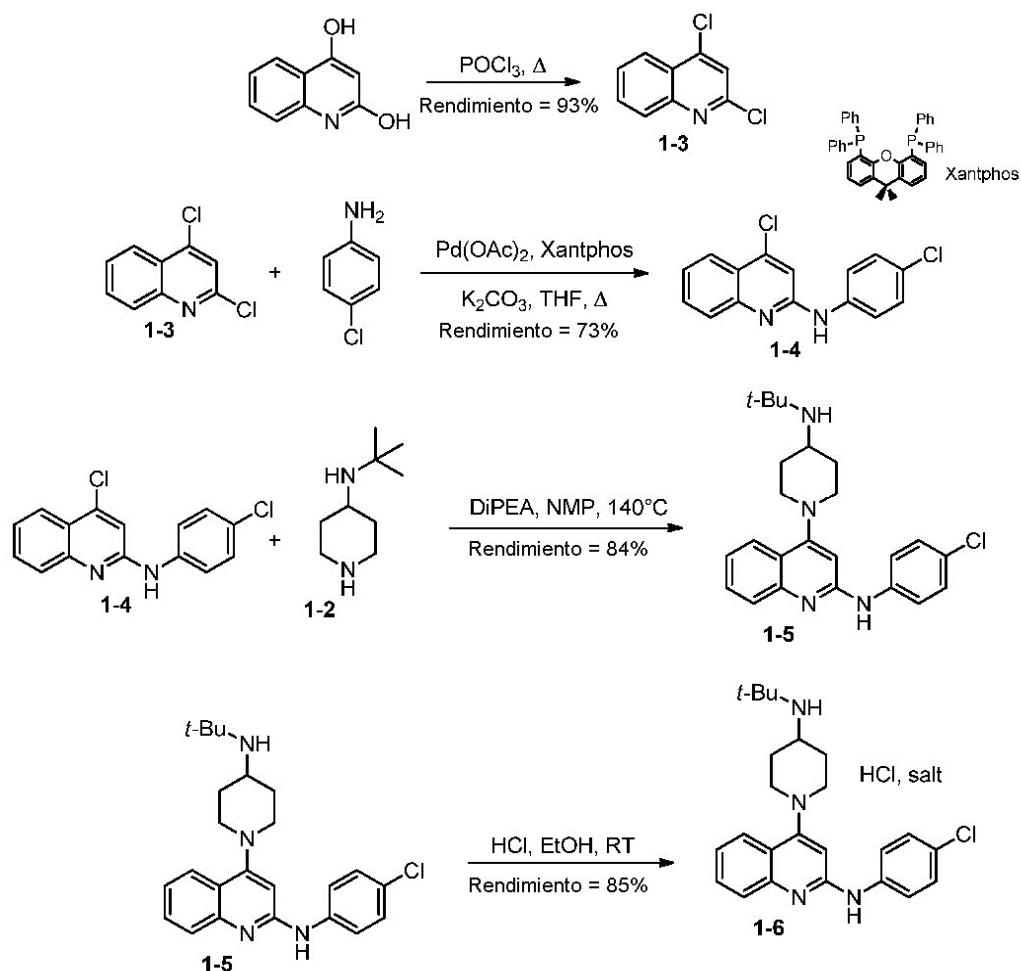
15

Los espectros de RMN se registraron en un Bruker Avance 300 MHz. La cromatografía líquida analítica de ultraalto rendimiento - análisis de masas (UHPLC-EM): UPLC Waters Acquity, UV DAD, acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupolo en tándem Waters Quattro Premier XE.

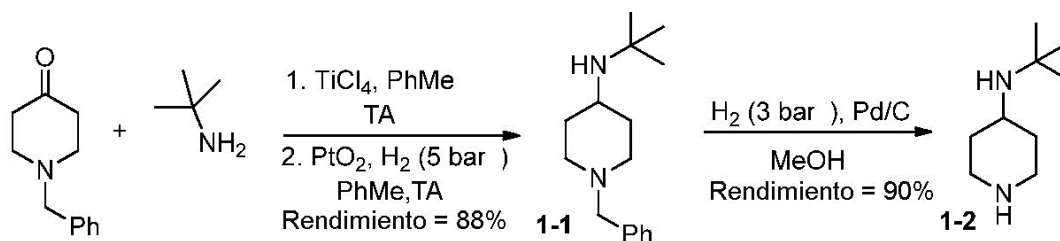
20

Columna Acquity UPLC BEH C18 (2.1 x 50 mm) 1.7 μm , fase móvil: A H_2O + 0,1% de TFA, B: MeCN + 0,1% de TFA. Las condiciones de elución comprendieron un gradiente lineal (minuto/% de B): 0/5% de B, 4/98% de B, caudal de 0,4 ml/min.

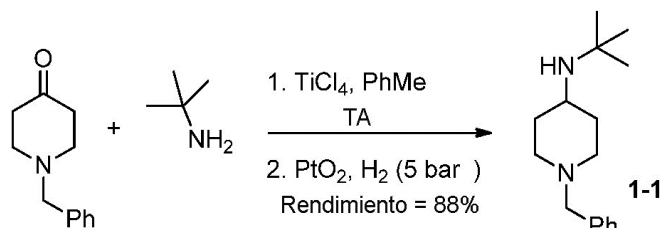
1. Ejemplo 1: Preparación de sal clorhidrato de 2-(4-clorofenilamino)-4-(4-terc-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (1-6).



25

Preparación del intermedio 4-terc-butilaminopiperidina (1-2):

5

1.1. Síntesis de 1-bencil-4-terc-butilaminopiperidina (1-1)

10 A una solución de N-bencil-4-piperidinona (60.0 g, 314 mmol) en 500 ml de tolueno seco y terc-butilamina (135 ml, 1280 mmol) se añadió gota a gota a $T < 15^\circ\text{C}$ una solución de tetracloruro de titanio (23.0 ml, 210 mmol) en 250 ml de tolueno seco. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente (TA) durante 20 h y después se filtró a través de una almohadilla de Celite®. La solución de tolueno se transfirió a un reactor de hidrogenación a alta presión y se añadió el catalizador dióxido de platino (160 mg, 0.70 mmol). Se introdujo hidrógeno en el

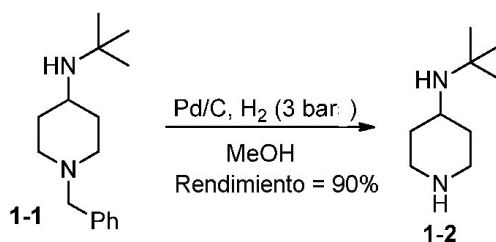
15 reactor a una presión de 5 bares y la reacción transcurrió a TA durante 2 días. Después, la mezcla resultante se diluyó con una solución acuosa de NaOH 2 M (400 ml) y se filtró a través de una almohadilla de Celite®. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con tolueno. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 . Se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar 68.05 g (88% de rendimiento) de un aceite naranja que corresponde a 1-bencil-4-terc-butilaminopiperidina.

20

Masa: (ES +) $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{N}_2$ requerida 246; hallada 247 [M + H]
 RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3)

1.2. Síntesis de 4-terc-butilaminopiperidina (1-2)

25

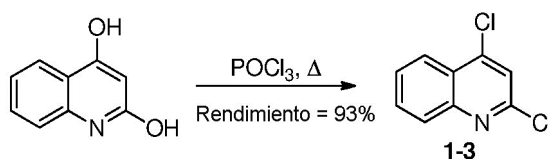


30 En un reactor químico de hidrógeno y a una solución desgasificada con nitrógeno de 1-bencil-4-terc-butilaminopiperidina (68.05 g, 276 mmol) en 700 ml de metanol se añadió en atmósfera de nitrógeno paladio sobre carbono en polvo al 10% en peso, con una humedad del 50% (29.40 g, 13.81 mmol, 5% en moles). Se introdujo hidrógeno en el reactor a una presión de 3 bares y la reacción transcurrió a TA durante 2 días. Después, la mezcla resultante se filtró a través de una almohadilla de Celite® y el filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar 38.86 g (90% de rendimiento) de un sólido amarillo que corresponde a 4-terc-butilaminopiperidina.

35

Masa: (ES+) $\text{C}_9\text{H}_{20}\text{N}_2$ requerida 156; hallada 157 [M + H]
 RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3)

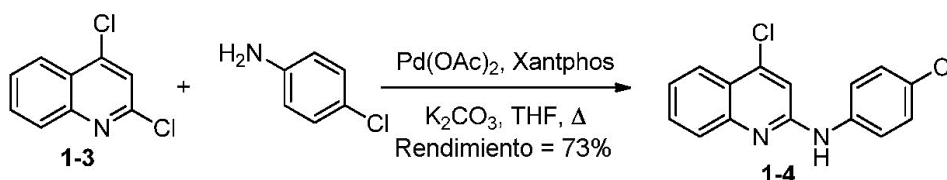
1.3. Síntesis de 2,4-dicloroquinolina (1-3)



5 A quinolina-2,4-diol (50.0 g, 310 mmol) se añadió gota a gota a 0°C cloruro de fosforilo (250 ml, 2682 mmol). La mezcla resultante se agitó y se calentó a reflujo durante la noche. Después, la mezcla se enfrió, se concentró a presión reducida y se coevaporó dos veces con 500 ml de tolueno. El residuo se recogió después con DCM (500 ml) y se lavó con agua fría. La capa acuosa se extrajo con DCM y las capas orgánicas combinadas se combinaron y se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar un sólido marrón (57,0 g, 93% de rendimiento) que corresponde a 2,4-dicloroquinolina.

Masa: (ES +) C₉H₅Cl₂N requerida 197; hallada 198 [M + H]
 RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃)

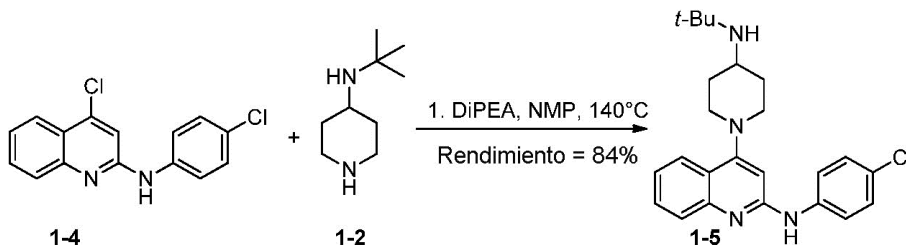
15 1.4. Síntesis de 2-(4-clorofenilamino)-4-cloroquinolina (1-4)



20 A una solución, en atmósfera de gas nitrógeno, de 2,4-dicloroquinolina (2.00 g, 10.1 mmol) en THF seco (20 ml) se añadió 4-cloroanilina (1.45 g, 11.1 mmol) y K₂CO₃ (3.91 g, 28.3 mmol). La mezcla resultante se desgasificó 5 min con nitrógeno, después se añadieron Xantphos (590 mg, 1.01 mmol) y Pd(OAc)₂ (120 mg, 0.5 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 2 h. La mezcla de reacción se enfrió después a TA y se concentró a presión reducida. El residuo se repartió entre agua y AcOEt y la capa acuosa se extrajo con AcOEt. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar un aceite amarillo. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gradiente ciclohexano/AcOEt de 7/3 a 0/10) para proporcionar 2.13 g (73% de rendimiento) de un sólido amarillo que corresponde a 2-(4-clorofenilamino)-4-cloroquinolina.

30 Masa: (ES +) C₁₅H₁₀Cl₂N₂ requerida 288; hallada 289 [M + H]
 RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃)

35 1.5. Síntesis de 2-(4-clorofenilamino)-4-(4-terc-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (1-5)

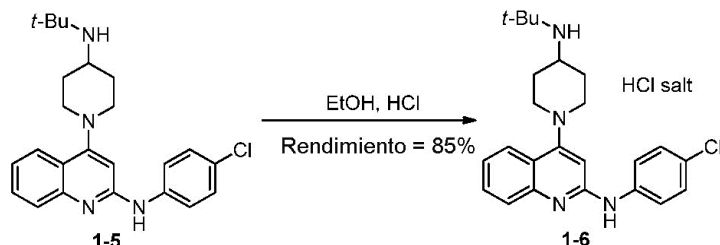


40 A una solución de 2-(4-clorofenilamino)-4-cloroquinolina (1.00 g, 3.46 mmol) y 4-(terc-butilamino)-piperidina (684 mg, 4.38 mmol) en 5 ml de NMP se añadió N,N-diisopropiletilamina (0.947 ml, 5.47 mmol) y la mezcla se calentó durante 24 h a 140°C. Después, la mezcla de reacción se enfrió, se diluyó con una solución acuosa de NaOH 1 N y la mezcla resultante se extrajo con AcOEt. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar un líquido marrón. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gradiente ciclohexano/AcOEt de 8/2 a 2/8) para proporcionar un sólido amarillento. Este sólido se recristalizó a partir de MeCN para proporcionar 1.19 g (84% de rendimiento) de un sólido blanco que corresponde a 2-(4-clorofenilamino)-4-(4-terc-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina.

HPLC-EM: $t_r = 1.24$ min, (ES+) $C_{24}H_{29}ClN_4$ requerida 408; hallada 409 [M + H], 353 [M-tBu + H]
 RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$)

1.6. Síntesis de sal clorhidrato de 2-(4-clorofenilamino)-4-(4-terc-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (1-6)

5



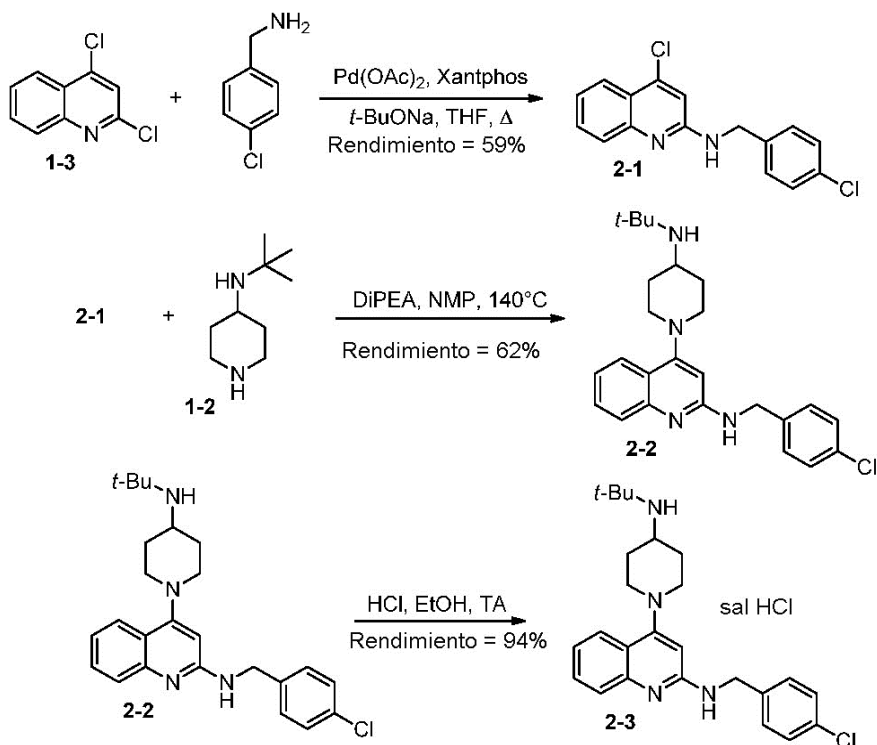
A una suspensión de 2-(4-clorofenilamino)-4-(4-terc-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (440 mg, 1.1 mmol) en 4 ml de EtOH se añadieron gota a gota 371 μ l de una solución 7.25 M de HCl en EtOH. El sólido se disolvió y la mezcla se agitó 20 min a temperatura ambiente. Después, la solución resultante se concentró a aproximadamente la mitad del volumen a presión reducida y se añadieron 6 ml de éter. La mezcla resultante se agitó 1 h a temperatura ambiente para obtener un sólido blanco que se separó por filtración, se enjuagó con éter y se secó al vacío a 45°C para proporcionar 401 mg (85% de rendimiento) de un sólido blanco que corresponde a la sal clorhidrato de 2-(4-clorofenilamino)-4-(4-terc-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina.

10

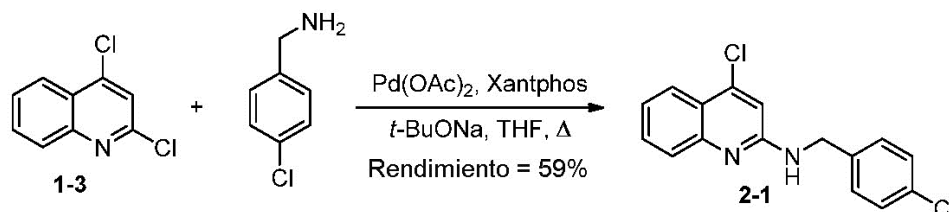
15

HPLC-EM: $t_r = 1.21$ min, (ES+) $C_{24}H_{29}ClN_4$ requerida 408; hallada 409 [M + H], 353 [M-tBu + H]
 RMN de 1H (300 MHz, CD_3OD)
 RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD)

2. Ejemplo 2: Preparación de sal clorhidrato de 2-(4-clorobencilamino)-4-(4-terc-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (2-3)



2.1. Síntesis de 2-(4-clorobencilamino)-4-cloroquinolina (2-1)

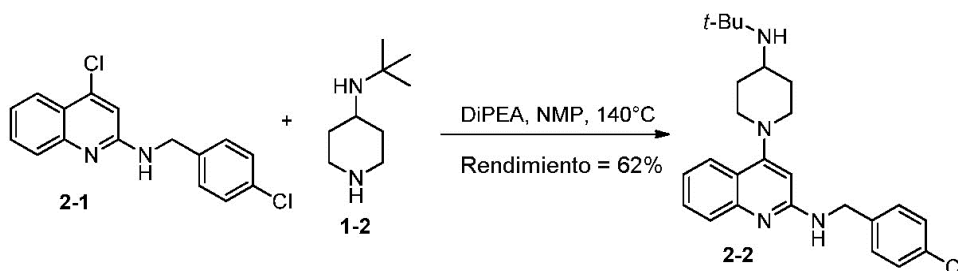


5 A una solución en atmósfera de gas nitrógeno de 2,4-dicloroquinolina (1.00 g, 5.05 mmol) en THF seco (10 ml) se le añadió 4-clorobencilamina (1.46 g, 10.1 mmol) y t-BuONa (1.36 g, 14.1 mmol). La mezcla resultante se desgasificó 5 min con nitrógeno, después se añadieron Xantphos (295 mg, 0.51 mmol) y Pd(OAc)₂ (58 mg, 0.25 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 2 h. La mezcla de reacción se enfrió después a TA y se concentró a presión reducida. El residuo se repartió entre salmuera y AcOEt y la capa acuosa se extrajo con

10 AcOEt. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar un aceite marrón. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gradiente ciclohexano/DCM de 5/5 a 0/10) para proporcionar 897 mg (59% de rendimiento) de un sólido marrón que corresponde a 2-(4-clorobencilamino)-4-cloroquinolina.

15 Masa: (ES+) C₁₆H₁₂Cl₂N₂ requerida 302; hallada 303 [M + H]
 RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃)

2.2. Síntesis de 2-(4-clorobencilamino)-4-(4-terc-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (2-2)



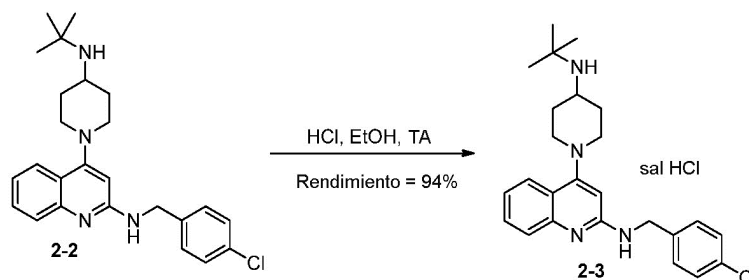
20 A una solución de 2-(4-clorobencilamino)-4-cloroquinolina (1.05 g, 3.46 mmol) y 4-(terc-butilamino)-piperidina (0.684 g, 4.38 mmol) en 5 ml de NMP se le añadió N,N-diisopropiletilamina (0.947 ml, 5.47 mmol) y la mezcla se calentó durante 22 horas a 140°C. Después, la mezcla de reacción se enfrió, se diluyó con una solución acuosa de NaOH 1 N y la mezcla resultante se extrajo con AcOEt. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar un aceite amarillo. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gradiente ciclohexano/AcOEt de 8/2 a 0/10) para proporcionar un sólido amarillo. Este sólido se recristalizó a partir de MeCN para proporcionar 904 mg (62% de rendimiento) de un sólido blanco que corresponde a 2-(4-clorobencilamino)-4-(4-terc-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina.

25

30

HPLC-EM: t_r = 1.30 min, (ES+) C₂₅H₃₁ClN₄ requerida 422; hallada 423 [M + H], 368 [M-tBu + H]
 RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃)

2.3. Síntesis de sal clorhidrato de 2-(4-clorobencilamino)-4-(4-terc-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (2-3)

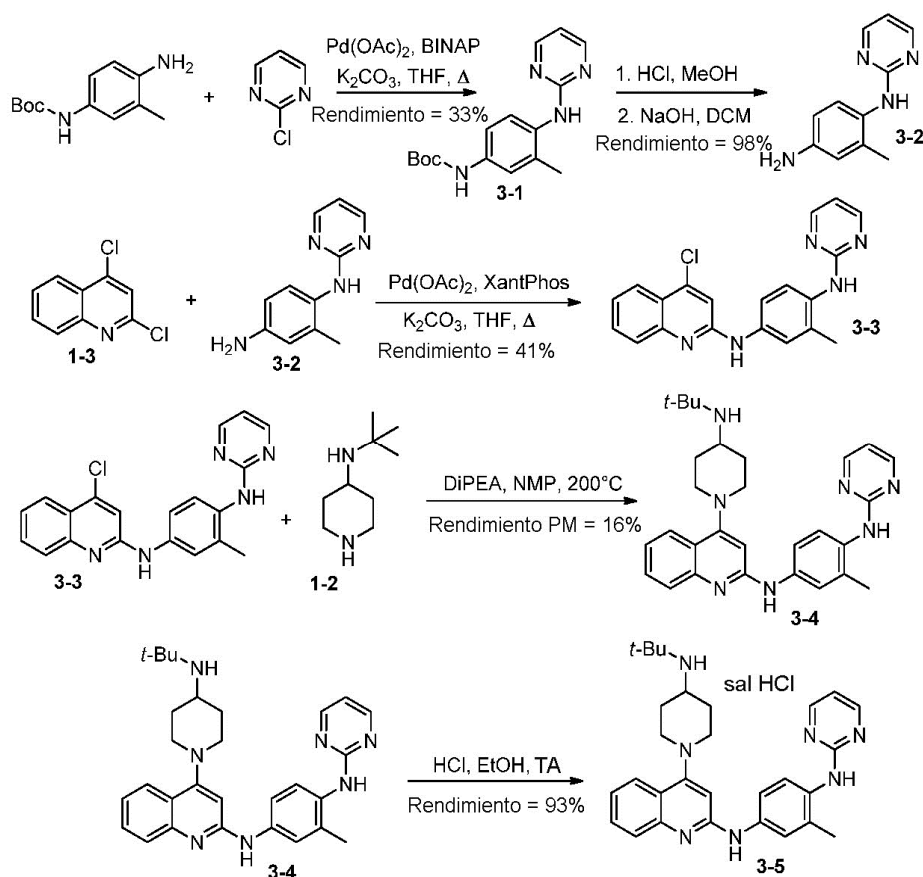


35 A una suspensión de 2-(4-clorobencilamino)-4-(4-terc-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (450 mg, 1.06 mmol) en 2.5 ml de EtOH se le añadieron gota a gota 400 µl de una solución 7 M de HCl en EtOH. El sólido se disolvió y la

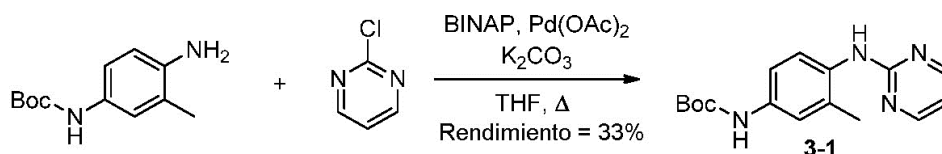
mezcla se agitó 3 h a TA. Después, la solución resultante se concentró a presión reducida y se añadió éter. La mezcla resultante se agitó y se trituró a temperatura ambiente para obtener un sólido amarillento que se separó por filtración, se enjuagó con éter y se secó al vacío. El sólido amarillento se disolvió en agua pura y después se liofilizó para proporcionar 401 mg (94% de rendimiento) de un sólido blanco que corresponde a la sal clorhidrato de 2-(4-clorobencilamino)-4-(4-terc-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina.

HPLC-EM: $t_r = 1.31$ min, (ES+) $C_{25}H_{31}ClN_4$ requerida 422; hallada 423 [M + H], 369 [M-tBu + H]
RMN de 1H (300 MHz, DMSO- d_6)

10 **3. Ejemplo 3: Preparación de sal clorhidrato de 2-[3-metil-4-(pirimidin-2-ilamino)fenilamino]-4-(4-terc-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (3-5)**



15 **3.1. Síntesis de 2-metil- N^1 -(pirimidin-2-il)- N^4 -(terc-butiloxycarbonil)-benceno-1,4-diamina (3-1)**



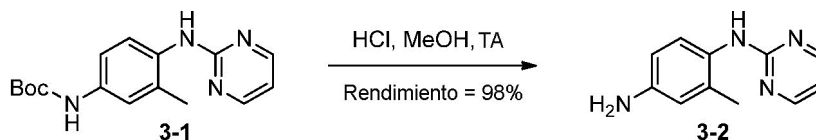
Una solución de 2-metil- N^4 -(terc-butiloxycarbonil)-benceno-1,4-diamina (2.40 g, 10.8 mmol), 2-cloropirimidina (0.78 g, 6.5 mmol) y K_2CO_3 (2.24 g, 16.2 mmol) en THF seco (48 ml) se desgasificó con nitrógeno durante 15 minutos. Después se añadieron $Pd(OAc)_2$ (58 mg, 0.26 mmol) y ligando BINAP (320 mg, 0.52 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó una segunda vez durante 20 minutos. La mezcla de reacción se calentó finalmente a reflujo durante 1 h. La mezcla de reacción se enfrió después a TA y se concentró a presión reducida. El residuo se repartió entre agua y AcOEt y la capa acuosa se extrajo con AcOEt. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gradiente ciclohexano/AcOEt de 10/0 a 7/3) para proporcionar 650 mg (33% de rendimiento) de un sólido marrón que corresponde a 2-metil- N^1 -(pirimidin-2-il)- N^4 -(terc-butiloxycarbonil)-benceno-

1,4-diamina.

HPLC-EM: $t_r = 2.06$ min, (ES +) $C_{16}H_{20}N_4O_2$ requerida 300; hallado 301 [M + H]
 RMN de 1H (300 MHz, CD_3OD)

5

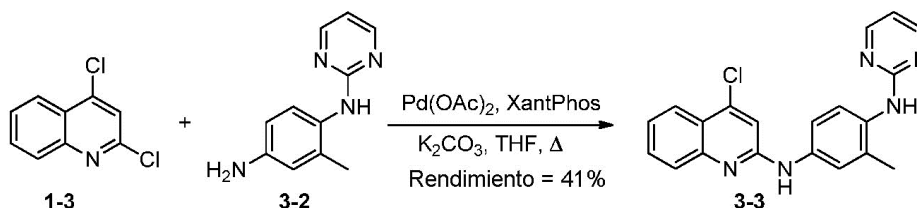
3.2. Síntesis de 2-metil-N¹-(pirimidin-2-il)-benceno-1,4-diamina (3-2)



10 A 2-metil-N¹-(pirimidin-2-il)-N⁴-(terc-butiloxycarbonil)-benceno-1,4-diamina (1.18 g, 3.93 mmol) se le añadió gota a gota a TA una solución de HCl 3 M en metanol (15 ml). Después, la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. La reacción se concentró después a presión reducida y el residuo se repartió entre DCM y una solución acuosa de NaOH 1 M y la capa acuosa se extrajo con DCM. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar 787 mg (98% de
 15 rendimiento) de un aceite amarillo que corresponde a 2-metil-N¹-(pirimidin-2-il)benceno-1,4-diamina.

Masa: (ES +) $C_{11}H_{12}N_4$ requerida 200; hallado 201 [M + H]
 RMN de 1H (300 MHz, CD_3OD)

20 3.3. Síntesis de 2-[4-(2-pirimidinilamino)-3-metil-fenilamino]-4-cloroquinolina (3-3)

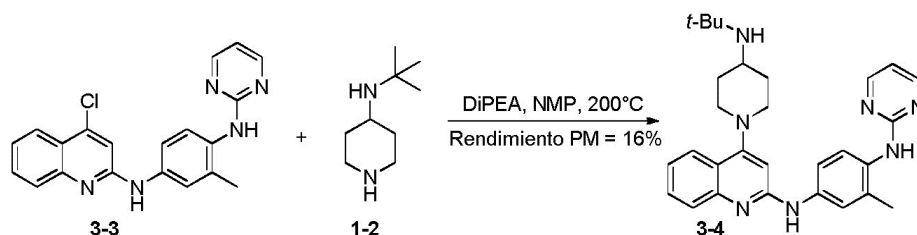


25 Una solución de 2-metil-N¹-(pirimidin-2-il)benceno-1,4-diamina (771 mg, 3.85 mmol), 2,4-dicloroquinolina (693 mg, 3.5 mmol) y K_2CO_3 (1.35 g, 9.80 mmol) en THF seco (7 ml) se desgasificó con nitrógeno durante 20 minutos. Después se añadieron Pd (OAc)₂ (47 mg, 0.21 mmol) y ligando XantPhos (61 mg, 0.10 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó una segunda vez durante 20 minutos. La mezcla de reacción se calentó finalmente a reflujo durante 4 h. La mezcla de reacción se enfrió después a TA y se concentró a presión reducida. El residuo se repartió entre agua y AcOEt y la capa acuosa se extrajo con AcOEt. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gradiente ciclohexano/AcOEt de 10/0 a 5/5) para proporcionar 520 mg (41% de
 30 rendimiento) de un sólido amarillo que corresponde a 2-[4-(2-pirimidinilamino)-3-metilfenilamino]-4-cloroquinolina.

Masa: (ES+) $C_{20}H_{16}ClN_5$ requerida 361; hallada 362 [M + H]

35

3.4. Síntesis de 2-[4-(2-pirimidinilamino)-3-metil-fenilamino]-4-(4-terc-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (3-4)



40 A una solución de 2-[4-(2-pirimidinilamino)-3-metil-fenilamino]-4-cloroquinolina (350 mg, 0.97 mmol) en NMP (1.5 ml) se le añadió 4-terc-butilaminopiperidina (760 mg, 4.80 mmol). La solución resultante se calentó durante 30 minutos a 200°C en un horno de microondas de laboratorio. Después, la mezcla resultante se enfrió y se repartió entre agua y AcOEt y la capa acuosa se extrajo con AcOEt. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre

Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gradiente ciclohexano/AcOEt de 10/0 a 5/5) para proporcionar 75 mg (16% de rendimiento) de un sólido marrón que corresponde a 2-[4-(2-pirimidinilamino)-3-metilfenilamino]-4-(4-terc-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina.

5

HPLC-EM: t_r = 1.15 min, (ES+) C₂₉H₃₅N₇ requerida 481; hallada 482 [M + H], 426 [M-tBu + H]

3.5 Síntesis de sal clorhidrato de 2-[4-(2-pirimidinilamino)-3-metilfenilamino]-4-(4-terc-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (3-5)

10



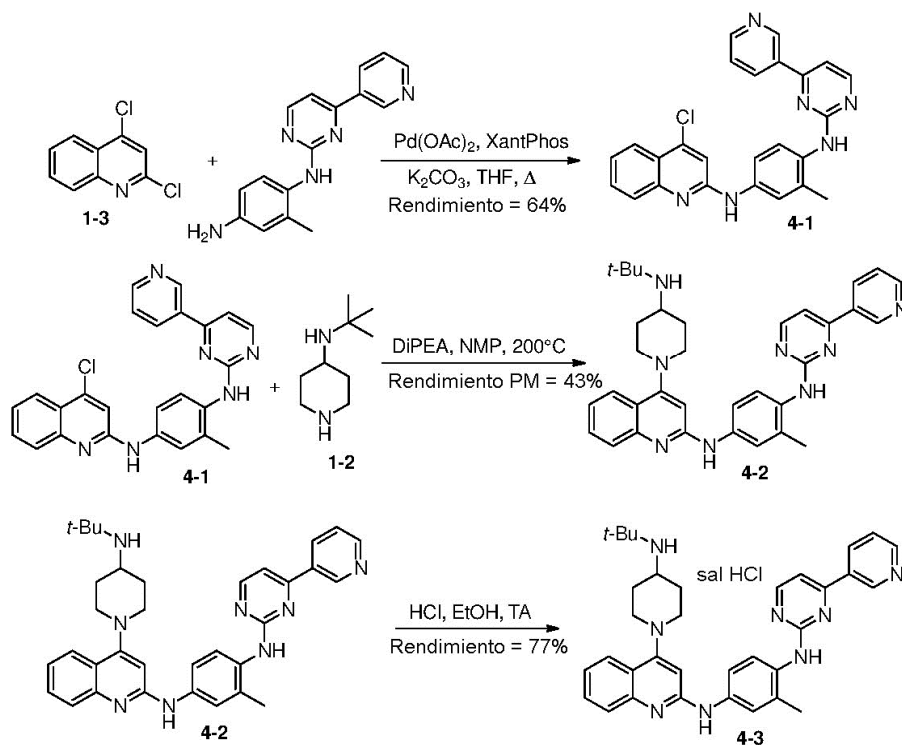
Se añadió gota a gota una solución 3.0 M de HCl en EtOH (290 μ l) a 2-[4-(2-pirimidinilamino)-3-metilfenilamino]-4-(4-terc-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (75 mg, 0.16 mmol). La mezcla resultante se filtró y se evaporó a presión reducida para proporcionar 80 mg (93% de rendimiento) de un sólido amarillento que corresponde a la sal clorhidrato de 2-[4-(2-pirimidinilamino)-3-metilfenilamino]-4-(4-terc-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina.

15

HPLC-EM: t_r = 1.15 min, (ES+) C₂₉H₃₅N₇ requerida 481; hallada 482 [M + H], 426 [M-tBu + H]
 RMN de ¹H (300 MHz, CD₃OD + unas pocas gotas de DMSO-d₆)

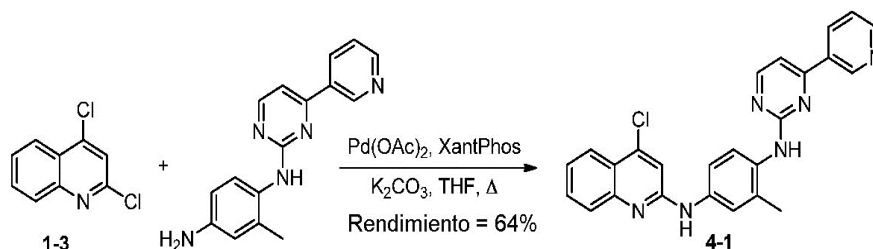
20

4. Ejemplo 4: Preparación de la sal de clorhidrato de 2-[4-[4-(piridin-3-il)-2-pirimidinamino]-3-metilfenilamino]-4-(4-terc-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (4-3)



25

4.1. Síntesis de 2-{4-[4-(piridin-3-il)-2-pirimidinamino]-3-metil-fenilamino}-4-cloroquinolina (4-1)

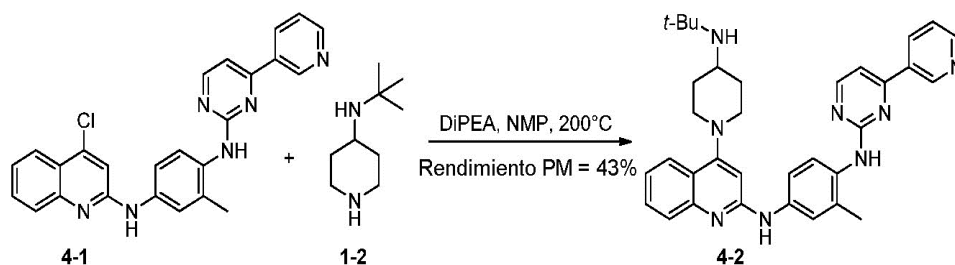


5 A una solución de 2-metil-*N*'-[4-(piridina-3-il)-2-pirimidin-2-il]benceno-1,4-diamina (1.18 g, 4.26 mmol), 2,4-dicloroquinolina (767 mg, 3.87 mmol) en THF seco (11.9 ml) se le añadió K_2CO_3 (2.7 g, 19.0 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó con nitrógeno durante 15 minutos. Después, se añadió ligando XantPhos (226 mg, 0.387 mmol) y $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (44 mg, 0.19 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó una segunda vez durante 15 minutos. La mezcla de reacción se calentó finalmente a reflujo durante la noche. La mezcla de reacción se enfrió después a TA y se concentró a presión reducida. El residuo se repartió entre agua y AcOEt y la capa acuosa se extrajo con AcOEt. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gradiente ciclohexano/AcOEt de 10/0 a 0/10) para proporcionar 1,08 g (64% de rendimiento) de un sólido marrón que corresponde a 2-{4-[4-(piridin-3-il)-2-pirimidinamino]-3-metil-fenilamino}-4-cloroquinolina.

15 Masa: (ES+) $\text{C}_{25}\text{H}_{19}\text{ClN}_6$ requerida 438; hallada 439 [M + H]
 RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD)

4.2. Síntesis de 2-{4-[4-(piridin-3-il)-2-pirimidinamino]-3-metil-fenilamino}-4-(4-terc-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (4-2)

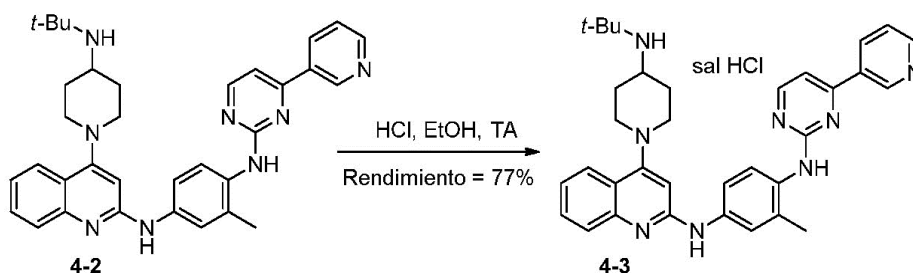
20



25 A una solución de 2-{4-[4-(piridin-3-il)-2-pirimidinamino]-3-metil-fenilamino}-4-cloroquinolina (1.0 g, 2.28 mmol) en NMP (10 ml) se le añadió 4-terc-butylaminopiperidina (1.8 g, 11.0 mmol). La solución resultante se calentó durante 90 minutos a 200°C en un horno de microondas de laboratorio. La mezcla resultante se repartió entre agua y AcOEt y la capa acuosa se extrajo con AcOEt. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (partiendo de AcOEt/DCM 3/2, después DCM/MeOH 9/1) para proporcionar 1.01 g de un sólido amarillo que se recristalizó a partir de EtOH para proporcionar 550 mg (43% de rendimiento) de un sólido blanco que corresponde a 2-{4-[4-(piridin-3-il)-2-pirimidinamino]-3-metil-fenilamino}-4-(4-terc-butylaminopiperidin-1-il)-quinolina.

35 HPLC-EM: $t_r = 1.20$ min, (ES +) $\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{N}_8$ requerida 558; hallada 559 [M + H], 503 [M-tBu + H]
 RMN de ^1H (300 MHz, DMSO-d_6)

4.3. Síntesis de sal de clorhidrato de 2-{4-[4-(piridin-3-il)-2-pirimidinamino]-3-metil-fenilamino}-4-(4-terc-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (4-3)



5 A una suspensión de 2-{4-[4-(piridin-3-il)-2-pirimidinamino]-3-metil-fenilamino}-4-(4-terc-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina en EtOH (5.5 ml) se le añadió gota a gota una solución 3.0 M de HCl en EtOH (4 ml). El sólido amarillo formado se separó por filtración y después se trituró con ciclohexano. La suspensión se separó por filtración para proporcionar 505 mg (77% de rendimiento) de un sólido blanco que corresponde a la sal clorhidrato de 2-{4-[4-(piridin-3-il)-2-pirimidinamino]-3-metil-fenilamino}-4-(4-terc-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina.

HPLC-EM: $t_r = 1.22$ min, (ES+) $C_{34}H_{38}N_8$ requerida 558; hallada 559 [M + H], 503 [M-tBu + H]
 RMN de 1H (300 MHz, CD_3OD + unas pocas gotas de $DMSO-d_6$)
 RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD)

15 **5. Ejemplo 5: Perfil de actividad de los compuestos 1-6, 2-3, 3-5 y 4-3 en estirpes celulares MOLM-14, KG-1, MV4-11, A375, HCT-116, HepG2, Huh-7, MRC-5, MDA-MB-231, ARPE-19 y células PBMC**

20 Cultivo celular: Todas las estirpes celulares se mantuvieron en medio que contenía penicilina-estreptomicina al 1% (Dutscher, P06-07100) y suero bovino fetal al 10% (Gibco, W3387L) excepto al 20% para la estirpe celular KG-1 y PBMC, y se cultivaron a 37°C con el 5% de CO_2 .

25 Las estirpes celulares HepG2, Huh7, HCT-116, MDA-MB-231 y A375 se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (Dutscher, L0103).

Las estirpes celulares KG-1 y MV4-11 se mantuvieron en medio de Dulbecco modificado de Iscove (Dutscher, L0190).

La estirpe celular MOLM-14 se mantuvo en medio MEM alfa (Gibco, 22561-021).

Las PBMC se mantuvieron en medio RPMI 1640 (Dutscher, L0498).

La estirpe celular MRC-5 se mantuvo en MEM (Dutscher, L0416).

35 La estirpe celular ARPE-19 se cultivó en medio DMEM: F12 (Dutscher, L0093).

40 Ensayo de viabilidad celular: La viabilidad celular se midió utilizando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® tal como se describe por el fabricante (Promega, Ref G7571) utilizando un luminómetro Infinite F200Pro (Tecan). En resumen, para células adherentes, las células se plaquearon en placas de 96 pocillos (blancas con fondo transparente) en 90 μl de medio por pocillo y se dejaron crecer durante la noche antes del ensayo. Para células que crecen en suspensión, las células se plaquearon en placas de 96 pocillos inmediatamente antes del ensayo. El número de células sembradas por pocillo se indica en la tabla 1 siguiente:

45 Tabla 1: Número de células sembradas por pocillo para ensayos de viabilidad celular

Entrada	Estirpe celulares	Número de células por pocillo
1	HCT-116	2,000
2	A375	800
3	Huh7	10,000
4	HepG2	7,500
5	MOLM-14	10,000
6	KG-1	20,000
7	MV4-11	20,000
8	PBMC	10,000
9	MRC-5	5,000

Entrada	Estirpe celulares	Número de células por pocillo
10	ARPE-19	5,000
11	MDA-MB-231	10,000

Los compuestos se añadieron a diferentes concentraciones a cada pocillo y los cultivos celulares se incubaron durante 72 h. Se utilizó vehículo (H₂O) como control y todos los compuestos se sometieron a ensayo en un porcentaje constante de H₂O. Después de la adición de 100 µl de CellTiter-Glo®, se midió la luminiscencia utilizando un Infinite F200Pro (Tecan). Se determinaron valores de CE₅₀ como la dosis de compuesto requerida para reducir los valores luminiscentes al 50% de la señal obtenida para los cultivos celulares no tratados. Los datos experimentales se analizaron utilizando un programa informático, Graphpad Prism v5 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA).

- 5
- 10 Todos los experimentos se realizaron por lo menos por duplicado y se repitieron dos veces independientes.

Tabla 2: Ensayo de inhibición de crecimiento de la estirpe celular MOLM-14 en presencia del compuesto 1-6, 2-3, 3-5, 4-3

Compuestos	% de viabilidad celular de la estirpe celular MOLM-14	
	10 µM	4 µM
Concentraciones		
1-6	12.1	71.8
2-3	0.3	31.8
3-5	8.7	78.7
4-3	0.2	0.5

15 Tabla 3: Ensayo de inhibición de crecimiento de las estirpes celulares MOLM-14, KG-1, MV4-11 y PBMC en presencia del compuesto 2-3

Células	MOLM-14	KG-1	MV4-11	PBMC
Descripción	Leucemia mieloide aguda FLT3-ITD Heterocigoto +/-	Leucemia mieloide aguda FLT3-ITD Fusiones WT -/- FGFR1	Leucemia mielomonocítica bifenotípica B FLT3-ITD Heterocigoto +/-	Célula mononuclear de sangre periférica
CE ₅₀ (µM)	2.2	5.1	2.3	1.9

20 Tabla 4: Ensayo de inhibición de crecimiento de las estirpes celulares A375, HCT-116, HepG2 y Huh-7 en presencia del compuesto 2-3

Estirpes celulares	A375	HCT1-116	HepG2	Huh-7
Descripción	Melanoma maligno	Carcinoma colorrectal	Carcinoma hepatocelular	Carcinoma hepatocelular
CE ₅₀ (µM)	1.0	1.6	0.9	1.7

25 Tabla 5: Ensayo de inhibición de crecimiento de las estirpes celulares MRC-5, MDA-MB-231 y ARPE-19 en presencia del compuesto 2-3

Estirpes celulares	MRC-5	MDA-MB-231	ARPE-19
Descripción	Fibroblasto de pulmón humano fetal	Adenocarcinoma de mama	Epitelio pigmentado retinal humano
CE ₅₀ (µM)	~3.4	2.0	~6.9

30 Tabla 6: Ensayo de inhibición de crecimiento de las estirpes celulares MOLM-14, A375, HCT-116 y HepG2 en presencia del compuesto 4-3

Estirpes celulares	MOLM-14	A375	HCT1-116	HepG2
Descripción	Leucemia mieloide aguda	Melanoma maligno	Carcinoma colorrectal	Carcinoma hepatocelular
CE ₅₀ (µM)	2.3	1.4	1.8	6.3

6. Ejemplo 6: Análisis de compartimiento ALDH+ en la estirpe celular MOLM-14

La estirpe celular MOLM-14 se cultivó en medio MEM alfa suplementado con el 10% v/v de suero bovino fetal, penicilina-estreptomicina al 1% y se mantuvo a 37°C con el 5% de CO₂. Se plaquearon 10.000 células en placas de 96 pocillos inmediatamente antes del ensayo.

Cada compuesto se añadió a diferentes concentraciones (combinaciones de seis concentraciones) a cada pocillo, y los cultivos celulares se incubaron durante 72 h. Se utilizó vehículo (H₂O) como control, y todos los compuestos se sometieron a ensayo con un porcentaje constante de vehículo. El crecimiento celular se midió utilizando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® tal como se describe por el fabricante (Promega, Ref. G7571 Madison, WI, Estados Unidos) utilizando un lector de placas Centro (Berthold, Francia).

En cada experimento, cada punto representa el promedio de triplicados en cultivo celular.

Los datos experimentales se analizan utilizando un programa informático, Graphpad Prism v5 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA) y se determinaron valores de CE₅₀ como la dosis de compuesto requerida para reducir los valores de absorbancia al 50% de la señal obtenida para los cultivos celulares tratados con vehículo.

Se utilizó un análisis del compartimiento de la aldehído deshidrogenasa (ALDH) y el nivel de actividad elevado de actividad de la aldehído deshidrogenasa (ALDH+) para detectar la población de células iniciadoras de tumores (células madre cancerosas, CSC). El ensayo del kit Aldefluor™ (StemCell Technologies, 01700) permitió evaluar la actividad de los fármacos en células CSC como en una población de estirpe celular de leucemia mieloide aguda MOLM-14 (ref: Storms, R. W., Trujillo, A. P., Springer, J. B., Shah, L., Colvin, O. M., Ludeman, S. M. y Smith, C. (1999). Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. Proceedings of the National Academy of Sciences, 96(16), 9118-9123). El ensayo del kit Aldefluor™ se utilizó según el procedimiento descrito por el fabricante. En resumen, la estirpe celular MOLM-14 se cultivó en medio MEM alfa suplementado con suero bovino fetal al 10% v/v, penicilina-estreptomicina al 1% y se mantuvo a 37°C con el 5% de CO₂. Se utilizaron 5 x 10⁵ células en este ensayo. Cada compuesto se añadió a diferentes concentraciones (véase la tabla 8) y los cultivos celulares se incubaron durante 72 h. Se utilizó vehículo (H₂O) como control, y todos los compuestos se sometieron a ensayo con un porcentaje constante de vehículo. Las células obtenidas de cultivos celulares se incubaron durante 45 minutos a 37°C con el ensayo de tampón Aldefluor™ que contiene el aminoacetaldehído Bodipy™, un sustrato de aldehído ALDH fluorescente. El ALDH convierte el sustrato fluorescente BAAA en el Bodipy™-ácido aminoacético (BAA) que se retiene en la célula. Un inhibidor de flujo de salida activo está presente en el tampón de ensayo Adelfluor™ para evitar el flujo de salida activo de la célula del producto de sustrato BAA convertido dependiente de ALDH. La señal fluorescente es directamente proporcional a la actividad ALDH en las células y se mide mediante citometría de flujo. Se utiliza un control negativo para medir el nivel de fluorescencia de fondo. Para dicho fin, se utilizó 4-(N,N-dietilamino)-benzaldehído (DEAB) como inhibidor selectivo de ALDH. Se realizó un recuento de células de viabilidad utilizando el kit de tinción de células muertas para rojo lejano fijable LIVE/DEAD® (Invitrogen). Los datos experimentales se analizan utilizando un programa informático, Graphpad Prism v5 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA) y se determinaron valores de CE₅₀ como la dosis de compuesto requerida para reducir los valores de absorbancia al 50% de la señal obtenida para los cultivos celulares tratados con vehículo.

Tabla 7: Ensayo de inhibición de crecimiento de la estirpe celular MOLM-14 en presencia de citarabina y el compuesto 2-3

Compuestos	Citarabina	2-3 ^a
CE ₅₀ (µM)	0.290	2.2

^a: se obtuvo CE₅₀ a partir del procedimiento descrito en el ejemplo 5, véase la tabla 3

Tabla 8: la población de ALDH se reduce en la estirpe celular MOLM-14 por el compuesto 2-3 utilizando el ensayo del kit Aldefluor™

Compuestos	Control	Citarabina		2-3		
		1 µM	3 µM	2.5 µM	5.0 µM	7.5 µM
CSC positivas a ALdefluor™ (%)	100	130	116	100	80	20

7. Ejemplo 7: Ensayo de inhibición de crecimiento (CE₅₀, µM) de la estirpe celular Hep3B-Luc en presencia del compuesto 2-3

Antes del tratamiento del compuesto, el compuesto se disolvió en H₂O para producir una solución madre 10 mM. Las soluciones de trabajo (concentraciones finales quintuplicadas) se prepararon después con medio MEM (Gibco, 1128319) que contenía el 10% de suero bovino fetal (Gibco, 10099141).

Cuando se realice el ensayo, se usará el ensayo de respuesta a la dosis de doxorubicina en la estirpe celular

BEL-7402 (carcinoma hepatocelular primario humano) como control interno en cada placa de ensayo para el ensayo. El medio MEM suplementado con el 5% de H₂O (5x) se añadirá a las celdas como controles negativos. La concentración final de H₂O fue del 1% en cada pocillo.

5 Se cultivó la estirpe celular Hep3B-Luc (estirpe celular de carcinoma hepático humano transfectada con luciferasa para el modelo de tumor ortotópico) en medio MEM suplementado con el 10% v/v de suero fetal bovino (FBS), el 1% de penicilina-estreptomocina y se mantuvo a 37°C con el 5% de CO₂. Se plaquearon 800 células en placas blancas de fondo plano transparente de 384 pocillos (Corning, 3707).

10 Procedimiento de ensayo: Se recogen las células y se realiza un recuento en fase logarítmica. Se añaden suspensiones celulares a cada pocillo de una placa de 384 pocillos a 800 células por pocillo (volumen total 40 µl). Los pocillos de los márgenes se rellenan con tampón PBS. Se añade compuesto de ensayo a diversas concentraciones por duplicado (adición de 10 µl de soluciones de compuesto 5x a la placa). La placa de ensayo se incuba durante 72 h en una incubadora a 37°C/5% de CO₂. La viabilidad celular se midió utilizando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® según se describe por el fabricante (Promega, Ref G7571).
15 Después de la adición de 100 µl de solución reactiva CellTiter-Glo®, se midió la luminiscencia utilizando un luminómetro PHERAstar Plus. Los datos se registraron por medio del PHERAstar Plus, la adquisición y el análisis de los datos se realizaron utilizando el programa Microsoft Excel y el programa informático GraphPad Prism v.6.

20 Tabla 9: Ensayo de inhibición de crecimiento de la estirpe celular Hep3B-Luc en presencia del compuesto 2-3

Compuesto	Doxorrubicina	2-3
Estirpes celulares	BEL-7402	Hep38-Luc
CE ₅₀ (µM)	0.15	1.1

25 **8. Ejemplo 8: Ensayo de inhibición de crecimiento (CE₅₀, µM) de las estirpes celulares CAKI-1 y 786-0 en presencia del compuesto 2-3**

Cultivo celular: Las estirpes celulares CAKI-1 y 786-O se mantuvieron en medio RPMI 1640 (Dutscher, L0498) que contenía el 1% de penicilina-estreptomocina (Dutscher, P06-07100) y el 10% de suero fetal bovino (Gibco, W3387L) y se cultivaron a 37°C con el 5% de CO₂.

30 Medidas de viabilidad celular: La viabilidad celular se midió usando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® tal como se describe por el fabricante (Promega, Ref G7571) utilizando un luminómetro Infinite F200Pro (Tecan). En resumen, las células se plaquearon en placas de 96 pocillos (blancas con fondo transparente) en 90 µl de medio por pocillo y se dejaron crecer durante la noche antes del ensayo. El número de células sembradas por pocillo se indica en la tabla siguiente:
35

Tabla 10: Número de células sembradas por pocillo para ensayos de viabilidad de células CAKI-1 y 786-0

	Número de células por pocillo
CAKI-1	2250
786-0	1250

40 Se añadieron compuestos 2-3 y dos compuestos de referencia (sorafenib y sunitinib) a diferentes concentraciones a cada pocillo y los cultivos celulares se incubaron durante 72 h. Para el análisis del compuesto 2-3, se utilizó H₂O como control negativo (= no tratado) y todas las concentraciones se sometieron a ensayo en un porcentaje constante de H₂O. Para el análisis de sorafenib y sunitinib, se utilizó DMSO como control negativo (= no tratado) y todas las concentraciones se analizaron con un porcentaje constante de DMSO. 72 h después de
45 la incubación de los compuestos, se añadieron 100 µl de CellTiter-Glo® a cada pocillo y se midió la luminiscencia utilizando un Infinite F200Pro (Tecan). Se determinaron valores de CE₅₀ como la dosis de compuesto requerida para reducir los valores luminiscentes al 50% de la señal obtenida para los cultivos celulares no tratados. Los datos experimentales se analizaron utilizando un programa informático, Graphpad Prism v5 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA). Todos los experimentos se realizaron por lo menos por triplicado y se repitieron por lo menos
50 tres veces independientes.

Tabla 11: Ensayo de inhibición de crecimiento de la estirpe celular CAKI-1 en presencia del compuesto 2-3 y sorafenib, sunitinib como controles

Compuestos	CE ₅₀ (µM)	SD
2-3	1.4	0.1
Sorafenib	4.5	1.5
Sunitinib	1.7	0.7

Tabla 12: Ensayo de inhibición de crecimiento de la estirpe celular 786-0 en presencia del compuesto 2-3 y sorafenib, sunitinib como controles

Compuestos	CE ₅₀ (µM)	SD
2-3	2.1	0.2
Sorafenib	6.8	1.7
Sunitinib	6.0	1.1

5

9. Ejemplo 9: Efecto *in vitro* del compuesto 2-3 sobre células del cáncer de colon metastásico en el hígado y la subpoblación de células troncales del cáncer de colon

El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad citotóxica *in vitro* del compuesto 2-3 contra células derivadas de pacientes con cáncer de colon metastásico en el hígado recién aisladas de los pacientes y más específicamente sobre la subpoblación de CSC. Actualmente están disponibles pocos procedimientos para realizar un seguimiento *in vitro* de las CSC. Por ejemplo, la actividad de la aldehído deshidrogenasa (ALDH) se puede utilizar como un marcador para identificar células troncales humanas cancerosas en cáncer de colon. Además, la CSC puede enriquecerse cultivando células en suspensión en un medio exento de suero suplementado con factores de crecimiento. En dichas condiciones, solo las CSC crecieron en forma de clones tridimensionales multicelulares llamados "tumoroesferas". Aprovechando la capacidad de formación de tumoroesferas, podemos estimar la cantidad de CSC en la muestra y, así, evaluar el efecto de una molécula dada en la capacidad de autorrenovación de las CSC.

20 Cultivo de células tumorales derivadas de pacientes

Se mantuvieron células de metástasis hepáticas derivadas de pacientes (CPP19, 30, 36 y CPP45 – véase la tabla 1 para descripciones clínicas) en DMEM completo (Gibco) con el 10% de FBS. Las células se obtuvieron a partir de biopsias proporcionadas por CHU-Caréméau (Nimes, Francia) dentro de un protocolo aprobado. Se obtuvo el consentimiento informado firmado de los pacientes antes de la adquisición de las muestras de acuerdo con todos los aspectos éticos y legales. Los tumores se lavaron, se trocearon en fragmentos (< 2 mm³) y se digirieron con liberasa H (0.26 U/ml, Roche) resuspendida en Accumax (Sigma-Aldrich). Después de 2 horas a 37°C, la suspensión celular se filtró a través de una malla de 40 µm para obtener una única suspensión celular y se plaqueó en medio DMEM, suplementado con FBS, glutamina, antibióticos y aminoácidos no esenciales. Cuando se formó una monocapa de células tumorales derivadas del paciente, las células se separaron usando tripsina/EDTA y se resuspendieron en DMEM con el 10% de FBS (para células adherentes) o medio M11 definidos (para la formación de esferas). Las células se cultivaron en una atmósfera humidificada a 37°C y el 5% de CO₂.

35 Ensayos de toxicidad *in vitro*

Las células se plaquearon a 10⁴ células por pocillo en placas de pocillos P96 en DMEM con el 10% de FBS. Después de 24 horas, las células se trataron con compuesto 2-3 y se evaluó la viabilidad celular 72 horas después del tratamiento mediante el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (Promega). Se calcularon CE₅₀ utilizando GraphPad Prism Software v6 (Graphpad Software, Inc La Jolla, CA).

Ensayo Aldefluor™ y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS)

El ensayo Aldefluor™ (Stem Cell Technologies, 01700) se realizó según las instrucciones del fabricante (Stem Cell Technologies). Las células ALDH^{positivas} se identificaron comparando la misma muestra con y sin el inhibidor de ALDH dietilaminobenzaldehído (DEAB). El valor mínimo FACS de la actividad de ALDH se ajustó al 0.1% en presencia de DEAB. Las células se analizaron con MacsQuant y los datos se analizaron con el programa informático Cyflogic. Las células CPP36 no se utilizaron en estos análisis debido a su elevado perfil de autofluorescencia celular.

50

Ensayos de formación de esferas

La evaluación de esferas de formación celular se determinó después de plaquear 500 células/200 µl de pocillo en medio M11 en pocillos P96 en placas de fijación ultrabaja (Corning). M11 es medio DMEM/F12 (1:1) (Gibco), suplementado con N2, glutamina 3 mM, glucosa al 0.6%, 4 µg/ml de insulina (Sigma-Aldrich), 10 ng/ml de hBasic-FGF (R&D Systems) y 20 ng/ml de hEGF (R&D Systems). Se realizó un recuento de tamaños de esferas superiores a 50 µm después de 10 días y se representó en número de esferas por campo de imagen. Las células CPP45 no se utilizaron en estos análisis debido a su incapacidad para formar tumoroesferas.

60 Análisis estadístico

Para cada experimento, los datos se muestran como la media S.E.M de tres experimentos independientes. Se

utilizó GraphPad Prism Software v6 (Graphpad Software, Inc. La Jolla, CA) para el análisis de datos, es decir, ensayos t de Student.

Tabla 13: Características clínicas de paciente con cáncer de colon

	CPP19	CPP30	CPP36	CPP45
Sexo	M	M	M	M
Edad	65	69	81	80
Mutación	KRAS	Ninguna	KRAS	KRAS
Clasificación TNM	T3N2aMI	TxNxMI	T4N2bMI	T3N1CM1
Radioterapia	No	No	No	No
Quimioterapia	Bevacizumab, folfiri	Bevacizumab Folfox, Folfiri Xelox	Bevacizumab y folfiri	No

Evaluación *in vitro* de la citotoxicidad del compuesto 2-3 en células derivadas de pacientes con cáncer colorrectal metastásico en el hígado (CCR)

Se utilizó el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo®, tal como se describe por el fabricante (Promega, ref. G7571), para determinar la citotoxicidad del compuesto 2-3 en células derivadas de pacientes con CCR metastásico en el hígado. La viabilidad celular de las células de control no tratadas se establece en 100%. Las células se plaquearon en primer lugar a una densidad de 10.000 células/100 µl por pocillo en placas P96 y se incubaron en una atmósfera humidificada con el 5% de CO₂ a 37°C durante 24 horas. Las células se incubaron después con disolvente (DMSO al 0.1%, células de control sin tratar) o concentración creciente de compuesto. 2-3. Después de 72 horas de incubación a una concentración que variaba de 0.1 a 30 µM, el compuesto 2-3 demostró una actividad citotóxica dosis-respuesta contra cuatro células diferentes derivadas de pacientes con CCR establecidas a partir de biopsias de metástasis hepáticas recientes (Tabla 14).

Tabla 14: Ensayo de inhibición del crecimiento en células derivadas de pacientes con CCR metastásico en el hígado en presencia del compuesto 2-3

ID CCR	CPP19	CPP30	CPP36	CPP45
CE ₅₀ (µM)	1.88	1.22	1.45	1.12

Evaluación *in vitro* del compuesto 2-3 en células positivas a Aldefluor™ a partir de células derivadas de pacientes con CCR metastásico hepático

Las células se plaquearon en primer lugar a una densidad de 250.000 células/1000 µl por pocillo en placas P96 y se incubaron en una atmósfera humidificada con el 5% de CO₂ a 37°C durante 24 horas. Las células se incubaron con disolvente (DMSO al 0.1%) o concentración creciente de compuesto 2-3 durante 72 horas. Las células se tripsinizaron, se recogieron y se lavaron. Las partículas acelulares y las células muertas se excluyeron basándose en la dispersión de la luz baja y la positividad de la tinción de células muertas Sytox Blue (Life Technologies) utilizando un citómetro de flujo MACSQuant (Miltenyi biotec). El porcentaje de células ALDH^{brilantes} se cuantificó después utilizando el ensayo Aldefluor™ (Stemcell Technologies, 01700). Se añadió el inhibidor de ALDH, dietilaminobenzaldehído (DEAB) para asegurar la identificación exacta de las células positivas a ALDH. Cuando se aplicó el inhibidor de ALDH DEAB, la fluorescencia se redujo (se desplazó hacia la izquierda) y se dibujó un límite mínimo para delinear el límite superior de estas células. Este límite mínimo se usó para seleccionar la subpoblación de alta tinción ALDH. Tal como se muestra, después de 72 horas de incubación a una concentración de 1 a 3 µM, el compuesto 2-3 demuestra actividades citotóxicas significativas (p < 0,001) y de dosis-respuesta contra la subpoblación de células positivas a Aldefluor™ en tres células diferentes derivadas de pacientes con CCR establecidas a partir de biopsias de metástasis hepáticas recientes (figura 1).

El compuesto 2-3 bloquea la formación de tumoroesferas de células derivadas de pacientes con CCR metastásico hepático.

La formación *in vitro* de tumoroesferas se utiliza ampliamente para identificar la presencia de células troncales cancerosas (CSC) en tumores sólidos o poblaciones de células heterogéneas, ya que solo estas células tienen la capacidad de autorrenovarse. Utilizamos este ensayo como una medida funcional de la frecuencia y la viabilidad de las CSC, y examinamos la capacidad de las células derivadas de pacientes con metástasis en el hígado para formar tumoroesferas después del tratamiento con el compuesto 2-3. Para este fin, las células se cultivaron en primer lugar en un matraz de cultivo tisular con medio DMEM completo con suero bovino fetal (FBS) como una monocapa hasta que alcanzaron casi la confluencia. Las células se tripsinizaron, se recogieron, se lavaron para eliminar el FBS y se hicieron pasar a través de un filtro de células de malla de 40 µm. La suspensión unicelular se cultivó después con medio de CSC (es decir, medio M11) que consiste en DMEM-F12 complementado con 20 ng/ml de EGF, 20 ng/ml de bFGF y suplemento de N2 (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) en una placa de unión ultrabaja de pocillos P96 (Corning Life Sciences, Tewksbury, MA). Las células se plaquearon a una

densidad de 500 células/100 µl por pocillo y se incubaron en una atmósfera humidificada con el 5% de CO₂ a 37°C. Para determinar el efecto del compuesto 2-3 sobre la eficacia de formación de tumorósferas y el tamaño de la esfera, se añadió compuesto 2-3 a dos concentraciones (0.3 µM o 3 µM) 24 horas después de la siembra en un volumen final de 200 µl de M11. Diez días después, las placas se examinaron para determinar la formación de tumoroesferas (> 50 µm) utilizando un microscopio invertido. Se tomaron imágenes de contraste de fase y el tamaño y el número de esferas se midieron manualmente y se contaron a partir de las imágenes usando ImageJ. Como se muestra en la figura 2, el compuesto 2-3 indujo una disminución drástica y dependiente de la dosis en la formación de tumoroesferas en las tres células derivadas de CCR analizadas y aisladas de metástasis en el hígado (CPP19, CPP30 y CPP36). De hecho, la eficacia de formación de tumoroesferas se suprimió significativamente con 3 µM de compuesto 2-3. Por el contrario, el tamaño de las tumoroesferas no se redujo estadísticamente con el tratamiento, excepto en 3 µM en células CPP19 (p = 0.02).

Ejemplo 10: Ensayo de inhibición del crecimiento (CE₅₀, µM) de células derivadas de pacientes con carcinoma hepatocelular (HCC) en presencia del compuesto 2-3

Se obtuvieron células de carcinoma hepatocelular (CHC) derivadas de paciente después de un consentimiento informado por escrito bajo la aprobación de la junta de revisión institucional de CrownBio y bajo el estricto cumplimiento de la declaración de Helsinki sobre investigación médica que implica sujetos humanos.

Las células de carcinoma hepatocelular (CHC) derivadas del paciente se mantuvieron en el medio descrito respectivamente en la tabla 15 que contiene el 1% de penicilina-estreptomicina (Life Technologies, 15070-063), con suplementos para el cultivo de células primarias (PCS) que contienen hidrocortisona (50 nM), factor de crecimiento epidérmico (20 ng/ml), factor de crecimiento de fibroblastos β (10 ng/ml), heparina (2 µg/ml), suplemento de medio líquido ITS (1X) y aminoácido no esencial (NEAA, 0.01 mM, 1X). Las células primarias se cultivaron en una atmósfera humidificada (95% de humedad relativa) con el 5% de CO₂ a 37°C.

Tabla 15: Medio de cultivo y condición de cultivo para células de carcinoma hepatocelular derivado de paciente (CHC)

Entrada	Célula primaria	Medio de cultivo	Condiciones del cultivo
1	LI0050	DMEM/F12 + 10% de FBS + PCS	37°C, 5% de CO ₂ , 95% de humedad relativa
2	LI0574	DMEM/F12 + 10% de FBS + PCS	37°C, 5% de CO ₂ , 95% de humedad relativa
3	LI0612	DMEM/F12 + 10% de FBS + PCS	37°C, 5% de CO ₂ , 95% de humedad relativa
4	LI0752	DMEM/F12 + 10% de FBS + PCS	37°C, 5% de CO ₂ , 95% de humedad relativa
5	LI0801	DMEM/F12 + 10% de FBS + PCS	37°C, 5% de CO ₂ , 95% de humedad relativa
6	LI1005	DMEM/F12 + 10% de FBS + PCS	37°C, 5% de CO ₂ , 95% de humedad relativa
7	LI1098	DMEM/F12 + 10% de FBS + PCS	37°C, 5% de CO ₂ , 95% de humedad relativa
8	LI1646	DMEM/F12 + 10% de FBS + PCS	37°C, 5% de CO ₂ , 95% de humedad relativa

El ensayo de inhibición del crecimiento celular se realizó tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 5 utilizando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® tal como se describe por el fabricante (Promega, Ref G7571). El número de células sembradas por pocillo (en microplacas tratadas con TC de poliestireno negro con fondo plano transparente de 96 pocillos, N° de cat. 3340, Corning®) se describe en la tabla 16. Se colocó una etiqueta adhesiva negra de sello posterior (N° de cat. 6005189, Perkin Elmer) a la parte inferior de cada placa antes de registrar la luminiscencia CellTiter-Glo®.

Tabla 16: Número de células sembradas por pocillo para ensayos de viabilidad de células derivadas de paciente con CHC

Entrada	Células derivadas de paciente con CHC	Número de células por pocillo
1	LI0050	2,500
2	LI0574	3,000
3	LI0612	4,000
4	LI0752	3,500
5	LI0801	2,500
6	LI1005	2,500
7	LI1098	2000
8	LI1646	2000

Los datos experimentales se analizan utilizando un programa informático, Graphpad Prism V 5.0 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA) y los valores de CE₅₀ se determinaron como la dosis de compuesto requerida para reducir los valores de absorbancia al 50% de la señal obtenida para los cultivos celulares tratados con vehículo y fueron una media de por lo menos tres experimentos independientes.

Después de 72 horas de incubación, el compuesto 2-3 demostró una actividad citotóxica dosis-respuesta contra ocho células diferentes derivadas de pacientes con CHC (véase la tabla 17).

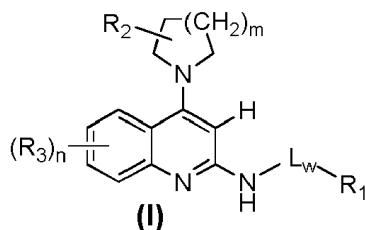
Tabla 17: Ensayo de inhibición del crecimiento sobre células derivadas de paciente con carcinoma hepatocelular (CHC) en presencia del compuesto 2-3, sorafenib y cisplatino

5

Entrada	Células derivadas de pacientes con HCC	CE ₅₀ (µM)		
		2-3	Sorafenib	Cisplatino
1	LI0050	3.5	9.1	1.3
2	LI0574	2.4	8.7	3.6
3	LI0612	6.9	17.9	16.3
4	LI0752	0.5	6.3	2.6
5	LI0801	2.1	5.7	1.5
6	LI1005	3.2	14.5	5.9
7	LI1098	7.0	10.9	5.1
8	LI1646	1.4	10.3	10.0

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I)



5

en el que

- 10
- R_1 se selecciona de entre un arilo C6-C10 sustituido o no por R_9 ; un anillo de heteroarilo de 5 a 8 miembros que comprende 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S sustituido o no por R_9 ; un heteroarilo fusionado como se ha definido que comprende de 8 a 13 átomos que incluyen 1, 2, 3, 4 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S, y que comprende por lo menos 2 átomos de carbono sustituido o no por R_9 ;

15

 - L_w se selecciona de entre un alquilo (C1-C10) opcionalmente sustituido; un alquilo (C1-C10) lineal o ramificado sustituido por R_4 ; un cicloalquilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalqueno (C5-C10) opcionalmente sustituido; un alqueno (C3-C10) opcionalmente sustituido; un alquino (C3-C10) opcionalmente sustituido; C=O; SO; SO₂; (C=O)-NR₈; (C=O)-O; (C=O)-O-alquilo (C1-C4); SO₂-NR₈; NR₈; en el que R_4 se selecciona de entre H; un alquilo (C1-C10) opcionalmente sustituido; un alqueno (C3-C10) opcionalmente sustituido; un alquino (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalqueno (C5-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquino (C8-C10) opcionalmente sustituido; un arilo (C6-C10) opcionalmente sustituido; un anillo de heteroarilo de 5 a 8 miembros o un heteroarilo fusionado como se ha definido que comprende de 8 a 13 átomos que incluyen 1, 2, 3, 4 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S, y que comprende por lo menos 2 átomos de carbono sustituido o no con uno o más grupos sustituyentes seleccionados independientemente de entre hidrógeno, átomo de halógeno, alquilo (C1-C10) sustituido con uno o más átomos de halógeno, alcoxi (C1-C10), hidroxilo, ciano, nitro, carboxi, NR₈R₈, un anillo de 4 a 9 miembros saturado o insaturado que comprende 1, 2 o hasta 3 heteroátomos seleccionados independientemente de entre O, N y S;

20

25

30

 - R_2 se selecciona de entre NR₅R₆;
 - R_3 se selecciona de entre un átomo de hidrógeno; un átomo de halógeno; un alquilo (C1-C10) lineal o ramificado sustituido o no por uno o más átomos de halógeno, hidroxilo, alcoxi, -NR₅R₆; un alqueno (C2-C10); un alquino (C2-C10); un cicloalquilo (C3-C10); un cicloalqueno (C5-C10); un cicloalquino (C8-C10); un alcoxi (C1-C10); un hidroxilo; un nitro; un ciano; un NR₅R₆; un O-(R₇); un (CO)-R₇; un (CO)-O-R₇; un (CO)-NR₅R₆; un O-(CO)-R₇; un O-(CO)-NR₅R₆; un NR₅-(CO)-R₇; un NR₅-(CO)-OR₇; un NR₅-(CO)-NR₅R₆; un -(O-CH₂CH₂)_m-OR₁₁; un -(O-CH₂CH₂)_m-NR₁₁R₁₁; un SO₂-R₇; un NR₅-SO₂-R₇; un SO₂-NR₅R₆; un NR₅-alquilo (C2-C6)-NR₅R₆; un arilo opcionalmente sustituido; un bencilo opcionalmente sustituido; un heteroarilo opcionalmente sustituido de anillo de 5 a 8 miembros que comprende 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S; un heteroarilo fusionado opcionalmente sustituido como se ha definido que comprende de 8 a 13 átomos que incluyen 1, 2, 3, 4 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S y que comprende por lo menos 2 átomos de carbono; un heterociclilo opcionalmente sustituido de anillo de 4 a 9 miembros saturado o insaturado que comprende 1, 2 o hasta 3 heteroátomos seleccionados independientemente de entre O, N y S;

35

40

45

 - R_5 y R_6 se seleccionan independientemente de entre un hidrógeno; un alquilo (C1-C10) opcionalmente sustituido; un alqueno (C3-C10) opcionalmente sustituido; un alquino (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalqueno (C5-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquino (C8-C10) opcionalmente sustituido; un (CO)-R₇, un (CO)-O-R₇; un (CO)-NR₈R₈; un SO₂-R₇; un SO₂-NR₈R₈; un alquilo (C1-C10) sustituido con NR₈R₈; un cicloalquilo (C3-C10) sustituido con NR₈R₈; un arilo opcionalmente sustituido; un bencilo opcionalmente sustituido; un anillo de 5 a 8 miembros de heteroarilo opcionalmente sustituido que comprende 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S; un heterociclilo opcionalmente sustituido de anillo de 4 a 9 miembros saturado o insaturado que comprende 1, 2 o hasta 3 heteroátomos seleccionados independientemente de entre O, N y S; o R_5 y R_6 se une entre sí con el átomo de nitrógeno al que están unidos covalentemente para formar un grupo heterociclilo que forma un anillo de 4 a 9 miembros que puede contener 1, 2 o 3 heteroátomos adicionales seleccionados de entre O, N y S;

50

55

 - R_7 y R_7 se seleccionan independientemente de entre un hidrógeno; un alquilo (C1-C10) opcionalmente

sustituido; un alqueno (C3-C10) opcionalmente sustituido; un alquino (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalqueno (C5-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquino (C8-C10) opcionalmente sustituido; un alquilo C1-C10 lineal o ramificado sustituido con NR₈R₈; un arilo (C6-C10) opcionalmente sustituido; un bencilo opcionalmente sustituido; un anillo de 5 a 8 miembros heteroaromático opcionalmente sustituido que comprende 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S;

- R₈ y R₈' se seleccionan independientemente de entre un hidrógeno; un alquilo (C1-C10) opcionalmente sustituido; un alqueno (C3-C10) opcionalmente sustituido; un alquino (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalqueno (C5-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquino (C8-C10) opcionalmente sustituido; o R₈ y R₈' se une entre sí con el átomo de nitrógeno al que están unidos covalentemente para formar un grupo heterociclilo que forma un anillo de 4 a 9 miembros que puede contener 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S;

- R₉ se selecciona independientemente de entre un hidrógeno; un átomo de halógeno; un alquilo (C1-C10) opcionalmente sustituido; un alquilo (C1-C10) lineal o ramificado sustituido por uno o más átomos de halógeno, un hidroxilo, un alcoxi; un alqueno (C2-C10) opcionalmente sustituido; un alquino (C2-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalqueno (C5-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquino (C8-C10) opcionalmente sustituido; un alcoxi (C1-C10) opcionalmente sustituido; un hidroxilo; un nitro; un ciano; un NR₅R₆; un (CO)-R₇; un (CO)-O-R₇; un (CO)-NR₅R₆; un O-(CO)-R₇; un O-(CO)-NR₅R₆; un NR₅-(CO)-R₇; un NR₅-(CO)-OR₇; un NR₅-(CO)-NR₅R₆; un SO₂-R₇; un NR₅-SO₂-R₇; un SO₂-NR₅R₆; un alquilo (C1-C10) sustituido con NR₅R₆; un NR₅-alquilo (C2-C10)-NR₅R₆; un -(O-CH₂CH₂)_m-OR₁₁; un -(O-CH₂CH₂)_m-NR₁₁R₁₁'; un arilo (C6-C10) opcionalmente sustituido; un bencilo opcionalmente sustituido; un anillo de 5 a 8 miembros de heteroarilo opcionalmente sustituido que comprende 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S; un grupo heterociclilo opcionalmente sustituido que forma un anillo de 4 a 9 miembros que puede contener 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S; un -NR₅R₁₀; un -O-R₁₀;

- R₁₀ se selecciona independientemente de entre un hidrógeno; un arilo (C6-C12) sustituido o no por R₁₂; un bencilo sustituido o no por R₁₂; un heteroarilo de anillo de 5 a 8 miembros que comprende 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S sustituido o no por R₁₂; un heteroarilo fusionado como se ha definido que comprende de 8 a 13 átomos que incluyen 1, 2, 3, 4 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S, y que comprende por lo menos 2 átomos de carbono sustituido o no por R₁₂; un heterociclilo que forma un anillo de 4 a 9 miembros que puede contener 0, 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S sustituido o no por R₁₂;

- R₁₁ y R₁₁' se seleccionan independientemente de entre un átomo de hidrógeno; un alquilo (C2-C10) opcionalmente sustituido; un alqueno (C3-C10) opcionalmente sustituido; un alquino (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalqueno (C5-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquino (C8-C10) opcionalmente sustituido; un alquilo (C2-C10) lineal o ramificado sustituido o no por uno o más átomos de halógeno; o R₁₁ y R₁₁' se une entre sí con el átomo de nitrógeno al que están unidos covalentemente para formar un grupo heterociclilo que forma un anillo saturado o insaturado de 4 a 9 miembros que puede contener 1, 2 o 3 heteroátomos adicionales seleccionados de entre O, N y S;

- R₁₂ se selecciona de entre un átomo de hidrógeno; un átomo de halógeno; un alquilo (C1-C10) lineal o ramificado sustituido o no por uno o más átomos de halógeno, hidroxilo, alcoxi, NR₁₁R₁₁'; un alqueno (C2-C10); un alquino (C2-C10); un cicloalquilo (C3-C10); un cicloalqueno (C5-C10); un cicloalquino (C8-C10); un alcoxi (C1-C10); un hidroxilo; un nitro; un ciano; un NR₁₁R₁₁'; un O-(R₇); un (CO)-R₇; un (CO)-O-R₇; un (CO)-NR₁₁R₁₁'; un O-(CO)-R₇; un O-(CO)-NR₁₁R₁₁'; un NR₁₁-(CO)-R₇; un NR₁₁-(CO)-OR₁₁'; un NR₁₁-(CO)-NR₁₁R₁₁'; un -(O-CH₂CH₂)_m-OR₁₁; un -(O-CH₂CH₂)_m-NR₁₁R₁₁'; un SO₂-R₇; un NR₅-SO₂-R₇; un SO₂NR₁₁R₁₁'; un NR₁₁-alquilo (C2-C6)-NR₁₁R₁₁'; un arilo opcionalmente sustituido; un bencilo opcionalmente sustituido; un heteroarilo opcionalmente sustituido de anillo de 5 a 8 miembros que comprende 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S; un heteroarilo fusionado opcionalmente sustituido como se ha definido que comprende de 8 a 13 átomos que incluyen 1, 2, 3, 4 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S, y que comprende por lo menos 2 átomos de carbono; un heterociclilo opcionalmente sustituido de anillo de 4 a 9 miembros saturado o insaturado que comprende 1, 2 o hasta 3 heteroátomos seleccionados independientemente de entre O, N y S;

- n puede representar un número entero igual que puede presentar cualquiera de los valores 0, 1, 2, 3 o 4;

- m puede representar un número entero igual que puede presentar cualquiera de los valores 1, 2 o 3;

- w puede representar un número entero igual que puede presentar cualquiera de los valores 0 o 1;

en el que la expresión "opcionalmente sustituido" significa opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes

- 5 seleccionados independientemente de entre un átomo de halógeno, un alquilo (C1-C10) lineal o ramificado sustituido o no por uno o más átomos de halógeno, un alqueno (C2-C10) lineal o ramificado sustituido o no por uno o más átomos de halógeno, un alquino (C2-C10) lineal o ramificado sustituido o no por uno o más átomos de halógeno, un cicloalquilo (C3-C10) sustituido o no por uno o más átomos de halógeno, un cicloalqueno (C5-C10) sustituido o no por uno o más átomos de halógeno, un cicloalquino (C8-C10) sustituido o no por uno o más átomos de halógeno, un alcoxi (C1-C10), un hidroxilo, un ciano, un nitro, un NR₈R₈' (con R₈ y R₈' como se han descrito anteriormente); y
- 10 cualquier sal, solvato, estereoisómeros o mezclas de estereoisómeros o solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo.
- 15 2. Compuesto según la reivindicación 1 seleccionado de entre 2-(4-clorofenilamino)-4-(4-*terc*-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (1-5); 2-(4-clorobencilamino)-4-(4-*terc*-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (2-2); 2-[3-metil-4-(pirimidin-2-ilamino)fenilamino]-4-(4-*terc*-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (3-4); 2-{4-[4-(piridin-3-il)-2-pirimidinamino]-3-metil-fenilamino}-4-(4-*terc*-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (4-2) o sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos.
- 20 3. Compuesto según la reivindicación 1 seleccionado de entre sal clorhidrato de 2-(4-clorofenilamino)-4-(4-*terc*-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (1-6); sal clorhidrato de 2-(4-clorobencilamino)-4-(4-*terc*-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (2-3); sal clorhidrato de 2-[3-metil-4-(pirimidin-2-ilamino)fenilamino]-4-(4-*terc*-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (3-5); sal clorhidrato de 2-{4-[4-(piridin-3-il)-2-pirimidinamino]-3-metil-fenilamino}-4-(4-*terc*-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (4-3) o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos.
- 25 4. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 5. Composición farmacéutica según la reivindicación 4, que comprende además en combinación uno o más agentes antineoplásicos.
6. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 4 y 5, en la que la cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 se formula o coformula en nanopartículas.
- 35 7. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, en la que las nanopartículas comprenden una composición biodegradable polimérica.
- 40 8. Composición farmacéutica según la reivindicación 7, en la que el polímero está basado en poli(ácido DL-láctico-co-glicólico) que presenta un peso molecular de 7 a 240 kDa; o un copolímero de poliácido láctico (PLA) y poliácido glicólico (PGA) en el que la relación molecular es de entre 95:5 y 50:50.
9. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, en la que las nanopartículas comprenden una composición biodegradable lisosómica.
- 45 10. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, en la que las nanopartículas comprenden un polímero o copolímero biocompatible.
- 50 11. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, en la que las nanopartículas comprenden una formulación liposómica.
12. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, en la que las nanopartículas están asociadas de manera covalente o no covalente con un polietilenglicol (PEG).
- 55 13. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, en la que las nanopartículas presentan un tamaño medio de desde aproximadamente 80 a aproximadamente 600 nm.
- 60 14. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13, en la que el compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 está asociado con por lo menos un agente anticanceroso terapéuticamente activo.
- 65 15. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 14, que es adecuada para la administración oral, parenteral, ocular, transdérmica, nasal o para inhalación.
16. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, en la que las nanopartículas comprenden un artículo seleccionado de entre nanopartículas de PLGA, nanopartículas de PLGA-PEG (de tipo de bloques AB, BA, ABA o BAB, en los que A = PLGA y B = PEG) y nanopartículas dirigidas.

17. Composición farmacéutica según las reivindicaciones 16, en la que la nanopartícula es una nanopartícula dirigida que contiene un motivo de señalización.
- 5 18. Composición farmacéutica que comprende una combinación de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes antineoplásicos, en la que los componentes que constituyen dicha combinación son para la utilización simultánea, por separado o secuencial en el tratamiento del cáncer.
- 10 19. Composición farmacéutica según la reivindicación 5 o 18, en la que el agente antineoplásico se selecciona de entre el grupo que consiste en everolimus, cloroquina, hidroxiclороquina, trabectedina, abraxano, TLK 286, AV-299, DN-101, pazopanib, GSK690693, RTA 744, ON 0910.Na, AZD 6244 (ARRY-142886), AMN-107, TKI-258, GSK461364, AZD 1152, enzastaurina, vandetanib, ARQ-197, MK-0457, MLN8054, PHA-739358, R-763, AT-9263, pemetrexed, erlotinib, dasatanib, nilotinib, decatanib, panitumumab, amrubicina, oregovomab, Lep-etu, nolatrexed, azd2171, batabulina, ofatumumab, zanolimumab, edotecarina, tetrandrme, rubitecán, tesmilifeno, oblimersenol, ticilimumab, ipilimumab, gosipol, Bio 111, 131-I-TM-601, ALT-110, BIO 140, CC 8490, cilengitida, gimatecán, IL13-PE38QQR, TNO 1001, IPdR1 KRX-0402, lucantona, LY 317615, neuradiab, vitespán, Rta 744, Sdx 102, talampanel, atrasentán, Xr 311, romidepsina, ADS-100380, sunitinib, 5-fluorouracilo, vorinostat, etopósido, gemcitabina, doxorubicina, irinotecán, doxorubicina liposómica, 5'-desoxi-5-fluorouridina, vincristina, temozolomida, ZK-304709, seliciclib, PD0325901, AZD-6244, capecitabina, ácido L-glutámico, sal heptahidratada de N-[4-[2-(2-amino-4,7-dihidro-4-oxo-1H-pirroló[2,3-d]pirimidin-5-il)etil]benzoil]-disodio, camptotecina, irinotecán marcado con PEG, tamoxifeno, citrato de toremifeno, anastrozol, exemestano, letrozol, DES(dietilestilbestrol), estradiol, estrógeno, estrógeno conjugado, bevacizumab, IMC-1C11, CHIR-258, 3-[5-(metilsulfonilpiperadinmetil)-indolil]-quinolona, vatalanib, AG-013736, AVE-0005, la sal acetato de acetato de [D-Ser(But)₆Azgly₁₀](piro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(But)-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH₂), acetato de goserelina, acetato de leuprolida, pamoato de triptorelina, acetato de medroxiprogesterona, caproato de hidroxiprogesteronol, acetato de megestrol, raloxifeno, bicalutamida, flutamida, nilutamida, acetato de megestrol, CP-724714; TAK-165, HKI-272, erlotinib, lapatanib, canertinib, anticuerpo ABX-EGF, erbitux, EKB-569, PKI-166, GW-572016, lonafamib, BMS-214662, tipifarnib; amifostina, NVP-LAQ824, ácido suberoil-analida-hidroxiácido, ácido valproico, tricostatina A, FK-228, SU11248, sorafenib, KRN951, aminoglutetimida, amsacrina, anagrelida, L-asparaginasa, vacuna de Bacillus Calmette-Guerin (BCG), bleomicina, buserelina, busulfán, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, cladribina, clodronato, ciproterona, citarabina, dacarbacina, dactinomicina, daunorrubicina, dietilestilbestrol, epirubicina, fludarabina, fludrocortisona, fluoximesterona, flutamida, gemcitabina, gleevec, hidroxiurea, idarrubicina, ifosfamida, imatinib, leuprolida, levamisol, lomustina, mecloretamina, melfalán, 6-mercaptopurina, mesna, metotrexato, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, nilutamida, octreotida, oxaliplatinol, pamidronato, pentostatina, plicamicina, porfímero, procarbazona, raltitrexed, rituximab, estreptozocina, tenipósido, testosterona, talidomida, tioguanina, tiotepa, tretinoína, vindesina, ácido 13-cis-retinoico, mostaza de fenilalanina, mostaza de uracilo, estramustina, altretamina, floxuridina, 5-desoxiuridina, citosina arabinósido, 6-mecaptopurina, desoxicoformicina, calcitriol, valrubicina, mitramicina, vinblastina, vinorelbina, topotecán, razoxina, marimastat, COL-3, neovastat, BMS-275291, escualamina, endostatina, SU5416, SU6668, EMD121974, interleucina-12, 1M862, angiostatina, vitaxina, droloxifeno, idoxifeno, espironolactona, finasterida, cimitidina, trastuzumab, denileucina difitox, gefitinib, bortezomib, paclitaxel, irinotecán, topotecán, doxorubicina, docetaxel, vinorelbina, bevacizumab (anticuerpo monoclonal) y erbitux, paclitaxel exento de cremophor, epilitona B, BMS-247550, BMS-310705, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, piperidoxifeno, ERA-923, arzoxifeno, fulvestrant, acolbifeno, lasofoxifeno, idoxifeno, TSE-424, HMR-3339, ZK186619, PTK787/ZK 222584, VX-745, PD 184352, rapamicina, 40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicina, temsirolimus, AP-23573, RAD001, ABT-578, BC-210, LY294002, LY292223, LY292696, LY293684, LY293646, wortmannina, ZM336372, L-779,450, PEG-filgrastim, darbepoetina, eritropoyetina, factor estimulante de colonias de granulocitos, zolendronato, prednisona, cetuximab, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, histrelinol, interferón alfa-2a pegilado, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b pegilado, interferón alfa-2b, azacitidina, PEG-L-asparaginasa, lenalidomida, gemtuzumab, hidrocortisona, interleucina-11, dextrazoxano, alemtuzumab, ácido all-transretinoico, ketoconazol, interleucina-2, megestrol, mostaza de nitrógeno, metilprednisolona, ibritgumomab tiuxetán, andrógenos, decitabina, hexametilmelamina, bexaroteno, tositumomab, trióxido de arsénico, cortisona, editronato, mitotano, ciclosporina, daunorrubicina liposómica, Edwina-asparaginasa, estroncio 89, casopitant, netupitant, un antagonista del receptor de NK-1, palonosetrón, aprepitant, difenhidramina, hidroxicina, metoclopramida, lorazepam, alprazolam, haloperidol, droperidol, dronabinol, dexametasona, metilprednisolona, proclorperacina, granisetron, ondansetrón, dolasetron, tropisetron, pegfilgrastim, epoetina alfa y darbepoetina alfa, ipilimumab, vemurafenib, inhibidor de FLT-3, un inhibidor de VEGFR, un inhibidor de EGFR TK, un inhibidor de aurora cinasa, un modulador de PIK-1, un inhibidor de Bcl-2, un inhibidor de HDAC, un inhibidor de c-MET, un inhibidor de PARP, un inhibidor de Cdk, un inhibidor de EGFR TK, un inhibidor de IGFR-TK, un anticuerpo anti-HGF, un inhibidor de PI3 cinasa, un inhibidor de mTOR, un inhibidor de AKT, un inhibidor de JAK/STAT, un inhibidor de punto de control-1 o 2, un inhibidor de cinasa de adhesión focal, un inhibidor de cinasa de Map cinasa (MEK), un anticuerpo de trampa de VEGF y mezclas de los mismos.
- 65 20. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 19, que es adecuada para una liberación lenta o prolongada.

21. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para una utilización en un tratamiento.

5 22. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para una utilización como una sustancia terapéuticamente activa para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad proliferativa y/o neoplásica.

10 23. Compuesto para una utilización según la reivindicación 22, en el que la enfermedad proliferativa y/o neoplásica se selecciona de entre el grupo que consiste en: carcinoma; cabeza, riñón, hígado, pulmón, nasofaríngeo, cuello, ovario, mama, cuello uterino, páncreas, próstata o estómago; una leucemia (por ejemplo, leucemia mielógena aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia promielocítica aguda (APL), leucemia linfoblástica de linfocitos T aguda, leucemia de linfocitos T de adulto, leucemia basófila, leucemia eosinófila, leucemia granulocítica, tricoleucemia, leucemia leucopénica, leucemia linfática, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, leucemia megacariocítica, leucemia micromieloblástica, leucemia monocítica, leucemia neutrófila y leucemia de células troncales); un linfoma maligno, un melanoma maligno; enfermedades mieloproliferativas; un sarcoma; un tumor del sistema nervioso central; un tumor de estirpe germinal; cáncer de testículos; cáncer de tiroides; astrocitoma; cáncer de esófago; cáncer de colon y un tipo mixto de neoplasia.

15 24. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 20 para una utilización en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad proliferativa y/o neoplásica.

20 25. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 20, para una utilización en la inhibición del crecimiento o la diferenciación de una célula troncal cancerosa (CSC), una célula iniciadora de tumor, una célula de tipo mesenquimatoso asociada con cáncer, una célula cancerosa mesenquimatosa o una célula mesenquimatosa.

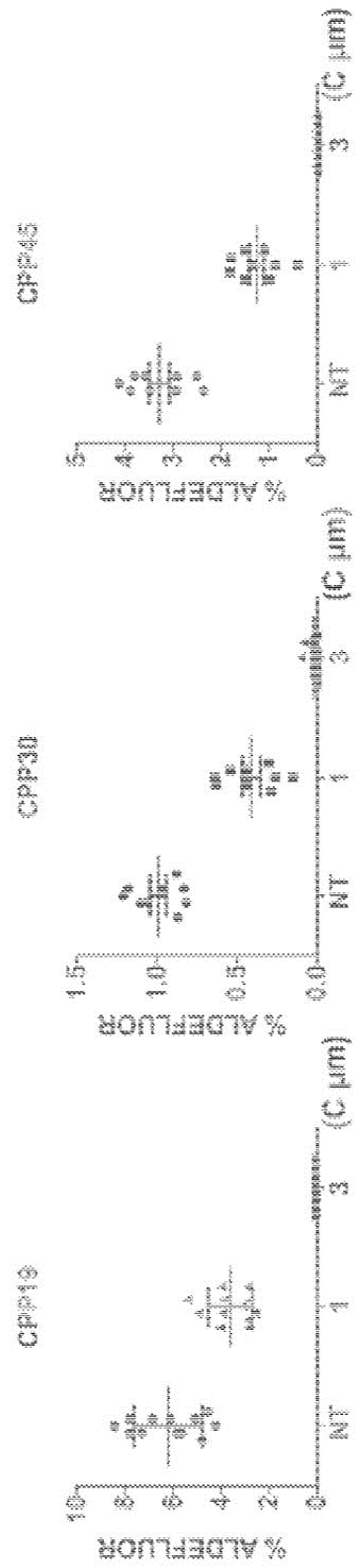


Figura 1

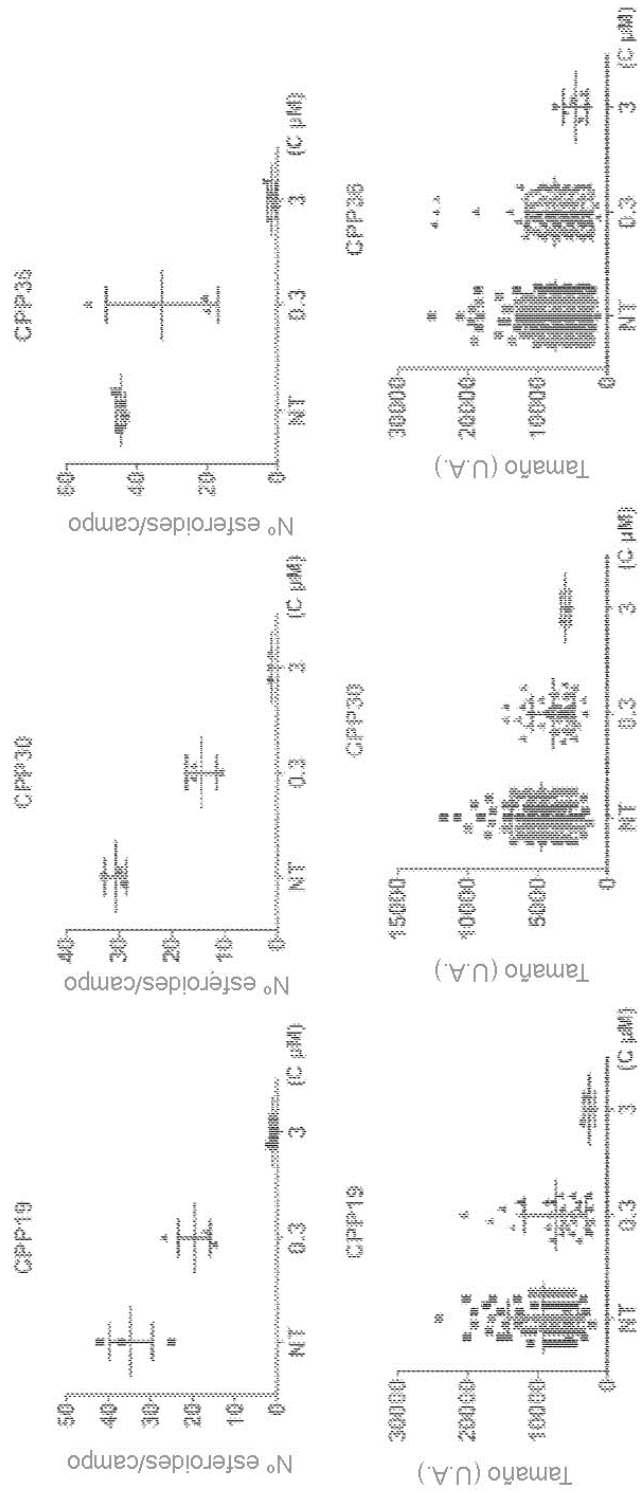


Figura 2

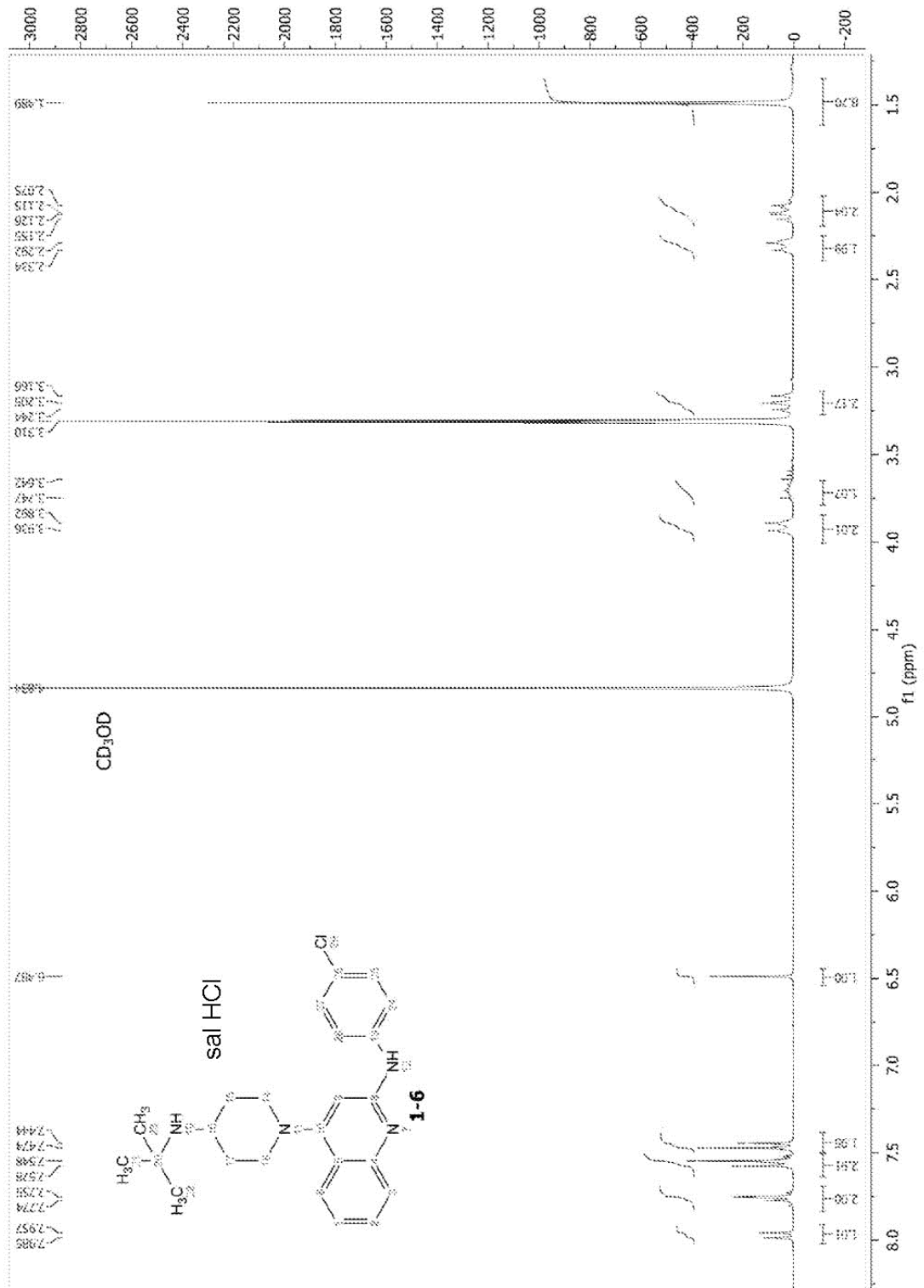


Figura 3

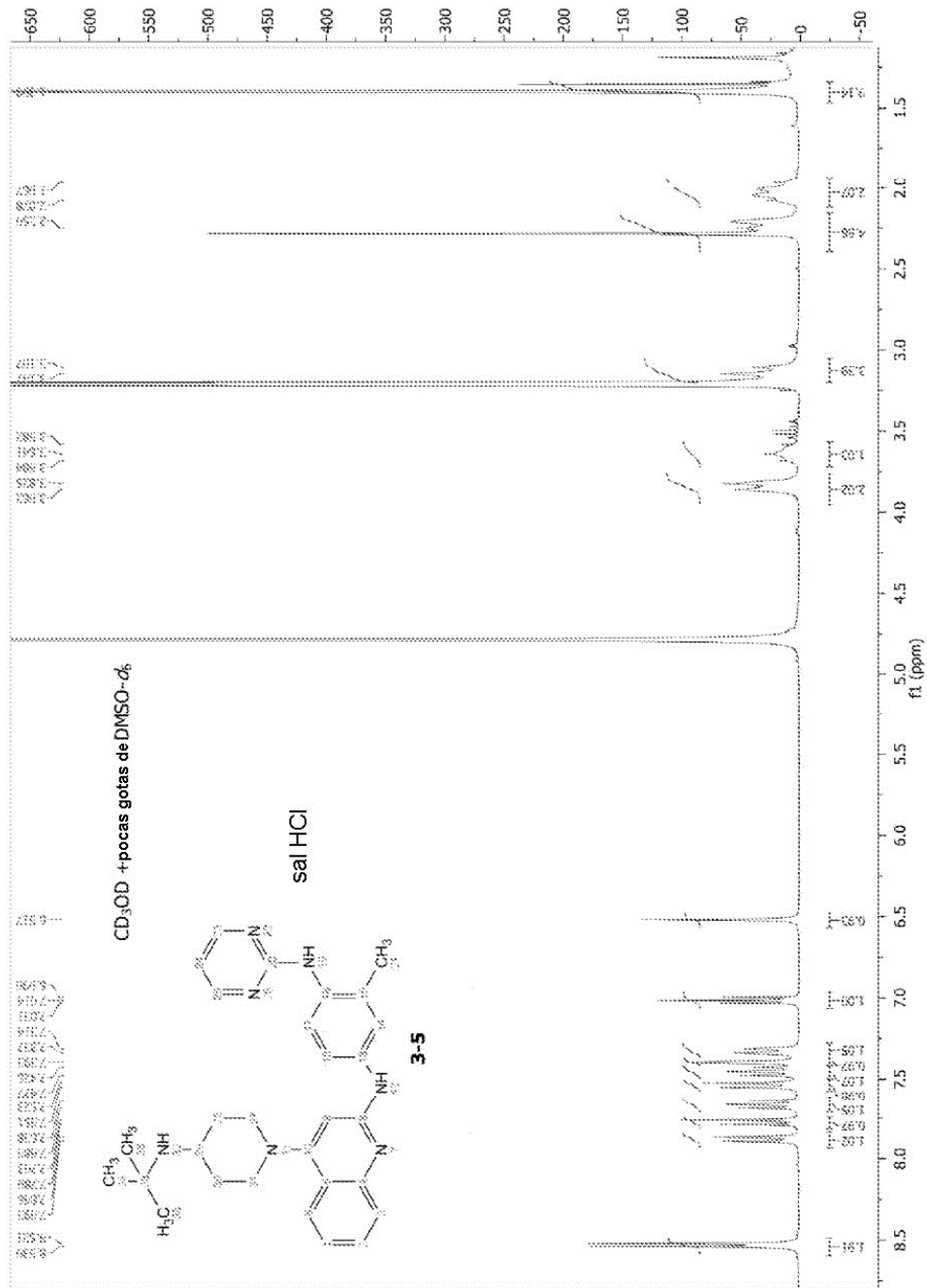


Figura 5

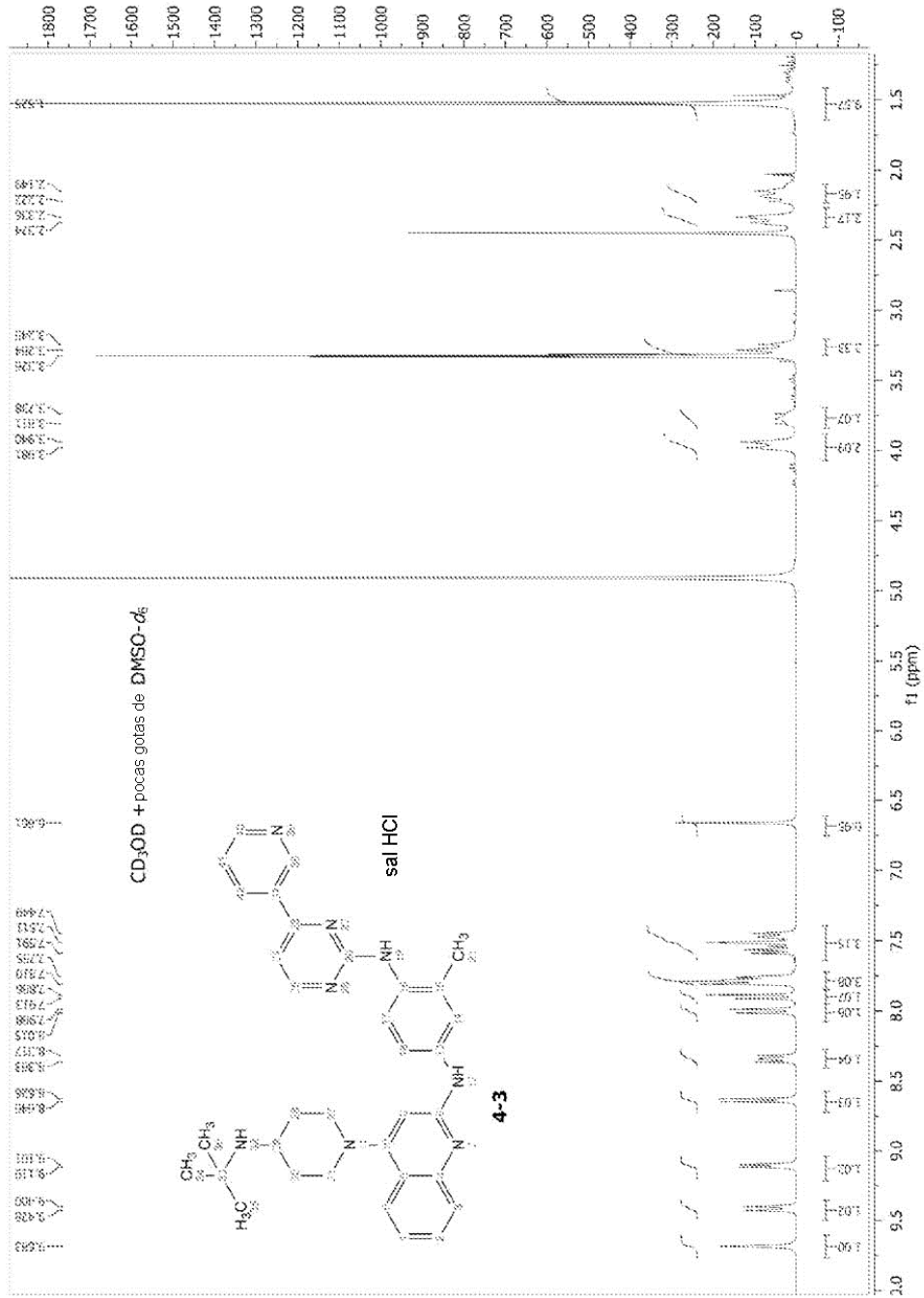


Figura 6