

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 192**

51 Int. Cl.:

C07D 235/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.06.2015 PCT/US2015/033962**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2015 WO15187818**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2015 E 15802538 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 3152194**

54 Título: **Derivados del bencimidazol**

30 Prioridad:

03.06.2014 US 201462007321 P

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

13.02.2020

73 Titular/es:

**ARIZONA BOARD OF REGENTS ON BEHALF OF
THE UNIVERSITY OF ARIZONA (50.0%)
220 W. Sixth Street, 4th Floor
Tucson, AZ 85701, US y
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO
II (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LI, HONG-YU;
FRETT, BRENDAN;
SANTORO, MASSIMO y
CARLOMAGNO, FRANCESCA**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 742 192 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

Derivados del bencimidazol

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

La presente invención reivindica prioridad de la solicitud de patente provisional de EE.UU. n.º 62/007321, presentada el 3 de junio de 2014.

10 **Antecedentes de la invención**

Las proteínas cinasas (PK) son enzimas que catalizan la fosforilación de residuos de serina, treonina o tirosina específicos en proteínas celulares. Estas modificaciones postraduccionales de proteínas sustrato actúan como un interruptor molecular, desempeñando un papel central en diversos procesos biológicos tales como el control del crecimiento celular, el metabolismo, el microentorno tumoral (tal como VEGFR), la diferenciación y la apoptosis. Se ha observado una actividad PK aberrante, excesiva o, más generalmente, inapropiada en muchos estados patológicos que incluyen trastornos proliferativos malignos tales como ganancia RET de mutaciones de función para cáncer medular de tiroides (CMT) y otros tumores malignos humanos, mutaciones DIT (duplicación interna en tándem) en Flt3 para leucemia mielógena aguda (LMA), mutación c-Kit para tumores del estroma gastrointestinal (GIST), y reordenación de Bcr-abl para leucemia mielógena crónica (LMC). Además, la activación y/o sobreexpresión de tirosina cinasas tales como Trk-A, Trk-B, Trk-C y RET se ha asociado a dolor intenso en pacientes con cáncer, especialmente con cáncer pancreático. Muchas tirosina cinasas son homólogas la una a la otra; la inhibición de una tirosina cinasa probablemente también producirá alguna actividad inhibitoria en otras tirosina cinasas. Por ejemplo, se ha utilizado imatinib como agente terapéutico no solo para pacientes con LMC (basándose en la inhibición de Bcr-abl cinasa), sino también en pacientes con cáncer GIST (basándose en la inhibición de c-Kit cinasa). El avance reciente de estudios básicos y clínicos sobre las tirosina cinasas ha demostrado que muchas tirosina cinasas pueden seleccionarse como diana por fármacos. Por ejemplo, se han aprobado en la última década más de una docena de nuevos fármacos que seleccionan como diana VEGFR2, Bcr-abl, Flt3, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) y c-Kit. El documento US 2012/184561 describe inhibidores de PDGFR, VEGFR-2, c-Abl, Flt3, Ret y kit. Se describen de manera breve unas pocas dianas y sus implicaciones para la terapia del cáncer.

RET

35 En 1985, se identificó el gen *RET* (reordenado durante la transfección) como un oncogén novedoso activado a través del reordenamiento del ADN (Takahashi, M. Cell, 1985, 42, 581-588).

El CMT (carcinoma medular tiroideo) es un tumor maligno de las células C en la glándula tiroidea. El CMT puede ser o bien esporádico o bien familiar como parte de síndromes de neoplasia endocrina múltiple de tipo 2 MEN2A y MEN2B. Tanto los CMT familiares (aproximadamente el 95%) como los esporádicos (aproximadamente el 50%) presentan mutaciones puntuales de ganancia de función en el protooncogén *RET* conduciendo a una señalización y a un crecimiento celular prosupervivencia aumentados. La señalización *RET* mantiene la tumorigénesis. Como resultado, el bloqueo de esta señalización *RET* proporciona un camino de tratamiento de "talón de Aquiles" para pacientes con CMT. La neoplasia endocrina múltiple 2B es un síndrome heredado producido principalmente por la mutación M918T en el dominio cinasa del receptor RET, mientras que la neoplasia endocrina múltiple 2A se produce ante todo por la mutación C634 (Santoro, M. *et al.*, Science, 1995, 267, 381). Ninguna mutación se localiza en el sitio de unión de ATP. El CMT familiar aislado se produce por diferentes mutaciones en el dominio o bien extracelular o bien intracelular de *RET*, que incluyen las mutaciones V804M y V804L, las cuales seleccionan como diana el residuo guardián en el sitio de unión de ATP de la cinasa. El tratamiento sistémico convencional para CMT generalmente ha sido poco eficaz, experimentando el 56% de los pacientes recaídas postquirúrgicas debido a la metástasis temprana (Wells, Jr. S.A. *et al.*, Clin. Cancer Res. 2009, 15, 7119-7123).

El PTC (carcinoma papilar tiroideo) surge de células tiroideas foliculares. En PTC, *RET* se selecciona como diana mediante reordenamientos cromosómicos que dan como resultado la fusión en marco de parte de su dominio intracelular con el extremo 5' de genes heterólogos. Aproximadamente, se estimaron 60.000 nuevos casos de cáncer de tiroides en los Estados Unidos en 2012. Se observan metástasis distantes en la presentación en menos del 5% de los pacientes con cáncer de tiroides diferenciado, y la enfermedad recurrente se produce en el 10-15%. El tratamiento de la enfermedad recurrente incluye principalmente cirugía y yodo radiactivo. Sin embargo, el tratamiento de la enfermedad PTC resistente a la radiactividad es todavía una necesidad médica insatisfecha (Schlumberger, M. Thyroid, 2009, 19, 1393-1400).

El cáncer de pulmón es la principal causa de mortalidad relacionada con el cáncer. Los paradigmas de tratamiento para el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), el cual explica la mayoría de todos los cánceres de pulmón, se han alejado desde un diagnóstico histológico hasta un diagnóstico que utiliza subtipos moleculares. Algunas "mutaciones de iniciador molecular" pueden dar como resultado proteínas de señalización de mutantes activos de manera constitutiva, tales como *EGFR* y *ALK*. Recientemente, algunos estudios identificaron fusiones de

la RET cinasa (*KIF5B-RET* y, más raramente, variantes de *RET/PTC*) en aproximadamente el 1% de pacientes con CPCNP de tipo adenocarcinoma. Tan rápidamente como cuatro años después de la identificación de fusiones de *ALK* en cáncer de pulmón, se aprobó un inhibidor de *ALK* para CPCNP por la FDA. Por tanto, los pacientes con CPCNP positivo en *RET* pueden beneficiarse de manera similar de terapias dirigidas específicas (Hutchinson, K.E. Nat. Med. 2012, 18, 349-351).

La LMMC es un trastorno mieloproliferativo que presenta monocitosis. Las neoplasias mieloproliferativas se asocian de manera frecuente con actividad tirosina cinasa constitutiva aberrante que resulta de genes de fusión quiméricos o mutaciones puntuales. Se han informado dos genes de fusión novedosos en LMMC, *BCR-RET* y *FGFR1OP-RET*. La actividad de bloqueo de *RET* en LMMC es importante para restablecer la señalización de la homeostasis, regenerando la diferenciación hematopoyética apropiada, y controlando la señalización tumorigénica aberrante (Ballerini, P. *et al.*, Leukemia 2012, 1-6).

También se identificó recientemente la sobreexpresión de *RET* en un subconjunto de cánceres de mama ER-positivos. La hibridación *in situ* (una técnica para determinar la presencia o ausencia de secuencias genéticas en tejido) de una cohorte de 245 cánceres de mama invasivos detectó ARNm de *RET* y *GFR α 1* en el 29,7% y el 59,4% de los tumores, respectivamente. La mayoría de estos tumores fueron ER-positivos. Se informó un hallazgo similar en un estudio de líneas celulares de cáncer de mama. Además, el análisis qPCR de un pequeño panel de células primarias de tumor de mama detectó expresión preferente de ARNm de *RET* en muestras ER-positivas. Finalmente, estos estudios se fortalecen mediante estudios de microalineamiento mostrando que en un conjunto de 36 muestras de cánceres de mama, la expresión de *RET* se correlacionó de manera positiva con la expresión de ER. La función de *RET* en cáncer de mama resistente a tamoxifeno se validó además en el formato de ensayo basado en células por el Dr. Isacke y sus colaboradores. En células de cáncer de mama ER α -positivas, la activación del receptor tirosina *RET* cinasa por su ligando GDNF dio como resultado la fosforilación de ER α aumentada en Ser118 y Ser167, y la activación independiente de estrógenos de la actividad transcripcional de ER α . La regulación por disminución de *RET* *in vitro* dio como resultado un aumento de 6,2 veces en la sensibilidad de células MCF7 a los efectos antiproliferativos de tamoxifeno, mientras que la estimulación de GDNF tuvo un efecto protector contra el fármaco. En las células MCF7 resistentes a tamoxifeno, seleccionar como diana *RET* restableció la sensibilidad del tamoxifeno. Finalmente, el análisis de dos microalineamientos tisulares independientes de cánceres de mama humanos primarios revelaron que la expresión de proteína *RET* estaba asociada de manera significativa con los tumores ER α -positivos, y que hubo un incremento de dos veces en el número de tumores *RET*-positivos en pacientes que desarrollaron con posterioridad reaparición invasiva después del tratamiento con tamoxifeno adyuvante (Morandi, A. Trends in Mol. Med. 2011, 17, 149-157).

VEGFR

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es una proteína de señalización importante involucrada tanto en vasculogénesis como en angiogénesis. Como su nombre indica, la actividad de VEGF se restringe principalmente a células del endotelio vascular, aunque tiene efectos en un número limitado de otros tipos de células. El VEGF ha demostrado estimular, *in vitro*, la mitogénesis de células endoteliales y la migración celular. El VEGF también potencia la permeabilidad microvascular y a veces se denomina factor de permeabilidad vascular. Las cinasas del VEGFR se han utilizado como diana para tumores sólidos, tales como tumores malignos que son altamente vasculares como el carcinoma renal, el glioblastoma y los cánceres de hígado (Bhargava, P. Curr Oncol Rep, 2011, 103-111).

FLT3

Mientras que las tasas de curación para leucemia mieloide aguda (LMA) han mejorado durante las últimas cuatro décadas, la supervivencia permanece subóptima. La supervivencia de cinco años para pacientes por encima de 60 años es solo del 40%. El tratamiento habitual para la mayoría de pacientes con LMA diagnosticados de manera reciente consiste en quimioterapia de inducción con citarabina infusional y una antraciclina.

Las mutaciones en el gen de tirosina cinasa 3 tal como FMS (*FLT3*) caracterizan más del 30% de casos de LMA. Las mutaciones de duplicación en tándem interna (DIT) de *FLT3*, que explican aproximadamente el 23% de casos de LMA, se asocian con un pronóstico particularmente malo. Las implicaciones pronósticas de mutaciones puntuales de *FLT3/D835* encontradas en el diagnóstico, que comprenden aproximadamente el 7% de casos, todavía no están bien establecidas. La inhibición de *FLT3* y de su mutación sería ventajosa.

c-KIT

El c-Kit es un receptor tirosina cinasa que normalmente controla la función de células hematopoyéticas primitivas, melanocitos y células germinales. Ha quedado claro que la actividad incontrolada de c-Kit contribuye a la formación de una serie de tumores humanos. La actividad no regulada de c-Kit puede ser debida a la sobreexpresión, bucles autocrinos o activación mutacional. Esto convierte a c-Kit en una excelente diana para terapias de cáncer en estos tumores, especialmente en GIST y en LMA (Von Mehren, M. Clin. Colorectal Cancer, 2006, S30-40).

TRK

Las cinasas relacionadas con tropomiosina (Trk) son receptores tirosina cinasa normalmente expresados en tejido neuronal donde desempeñan un papel importante tanto en el desarrollo como en la función. La familia del receptor Trk se compone de tres miembros (A, B y C) activados mediante ligandos específicos denominados neurotrofinas. Cada receptor Trk contiene un dominio extracelular, una región transmembrana y un dominio intracelular, el cual al unirse a su respectivo ligando (factor de crecimiento nervioso (NGF) para TrkA, factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF) y NT-4/5 para TrkB, y NT3 para TrkC), desencadena la oligomerización de los receptores, la fosforilación de residuos tirosina específicos en el dominio cinasa, y rutas de transducción de señales aguas abajo, que incluyen la supervivencia, la proliferación y la diferenciación en células neuronales normales y neoplásicas. La desregulación de TrkA y TrkB y sus ligandos afines se ha descrito en numerosos tipos de cánceres que incluyen próstata, mama, colorrectal, ovario, pulmón, páncreas, melanoma, tiroides y neuroblastoma, y se produce principalmente a través de la sobreexpresión, activación, amplificación y/o mutación del receptor de tipo natural. De manera importante, la activación de Trk aumentada en tejidos tumorales se correlaciona con un fenotipo agresivo y un resultado clínico malo. De manera adicional, las Trk, así como RET, desempeñan un papel para la invasión perineural y el dolor de cáncer asociado.

PDGFR

El factor de crecimiento derivado de plaquetas actúa como un mitógeno potente y un factor quimiotáctico para diversas células tales como fibroblastos, células del músculo liso, células mesenquimatosas y células gliales del cerebro. Se ha propuesto que la proliferación celular inducida por PDGF anómala conduce a trastornos proliferativos. Existe la necesidad de un inhibidor de PDGFR que ofrezca beneficios terapéuticos para trastornos proliferativos tales como tumores del estroma gastrointestinal (GIST), glioma y melanoma.

Breve descripción de los dibujos

El archivo de patente o solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado en color. Se proporcionarán copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujo(s) en color por la oficina a petición y pago de la cuota necesaria.

Figura 1: Fotografías de transferencias que muestran la inhibición de la fosforilación de RET/C634Y y RET/M918T en células intactas mediante Pz-1 o vehículo (NT: no tratadas). Las células NIH3T3 privadas de suero que expresan los mutantes RET/C634Y o RET/M918T se trataron durante 2 h con concentraciones indicadas de Pz-1. Se sometieron a inmunotransferencia 50 µg de lisados celulares totales con anticuerpos RET anti-fosfo-Y1062 (α p1062) o anti-fosfo-Y905 (α p905). Las transferencias se normalizaron utilizando anticuerpos anti-RET (α RET).

Figura 2: Fotografías de transferencias que muestran la inhibición de la fosforilación del mutante puntual RET guardián y de oncoproteínas RET reordenadas mediante Pz-1 o vehículo (NT: no tratadas). Las células HEK293 se transfectaron de manera transitoria con vectores que expresan el mutante RET/C634R-V804M (V804 es el residuo RET guardián) o RET/PTC1 (CCDC6-RET, encontrado en el carcinoma de tiroides papilar y adenocarcinoma de pulmón), RET/PTC3 (NCOA4-RET, encontrado en el carcinoma de tiroides papilar y adenocarcinoma de pulmón), o KIF5B-RET (encontrado en adenocarcinoma de pulmón). Después de 36 h desde la transfección, las células se privaron de suero durante 12 h y luego se trataron durante 2 h con concentraciones indicadas de Pz-1. Se sometieron a inmunotransferencia 50 µg de lisados celulares totales con anticuerpos RET anti-fosfo-Y1062 (α p1062) y anti-fosfo-Y905 (α p905). Las transferencias se normalizaron utilizando anticuerpo anti-RET (α RET).

Figura 3: Fotografías de transferencias que muestran la inhibición de la proteína RET expresada de manera endógena en células TT (línea celular CMT humana que expresa RET/C634W) mediante concentraciones indicadas de Pz-1 o vehículo (NT: no tratadas) y efectos reducidos en células tiroideas Nthy-ori-3-1 no transformadas. Las líneas celulares TT humanas privadas de suero y tiroideas Nthy-ori-3-1 no transformadas se trataron durante 2 h con concentraciones indicadas de Pz-1. Se sometieron a inmunotransferencia 50 µg de lisados celulares totales con anticuerpos RET anti-fosfo-Y1062 (α p1062) y anti-fosfo-905 (α pY905), anticuerpos anti-fosfo-MAPK (α pMAPK, T302/Y304) y anti-fosfo-SHC (α pSHC, Y317). Las transferencias se normalizaron utilizando anti-RET (α RET) y anti-SHC (α SHC).

Figura 4: Fotografías de transferencias que muestran la inhibición de la fosforilación de VEGFR2 expresada de manera ectópica en células HEK293 mediante dosis indicadas de Pz-1 o vehículo (NT: no tratadas). Las células HEK293 se transfectaron de manera transitoria con vector que expresa VEGFR2. 36 h después de la transfección, las células se privaron de suero durante 12 h, se trataron durante 2 h con concentraciones indicadas de Pz-1, y finalmente se trataron con VEGF-A (100 ng/ml) durante 15 min. Se sometieron a inmunotransferencia 50 µg de lisados celulares totales con anticuerpos VEGFR2 anti-fosfo-Y1175 (α pVEGFR2). Las transferencias se normalizaron utilizando anticuerpo anti-VEGFR2 (α VEGFR2).

Figura 5: Efectos ejercidos por concentraciones indicadas de Pz-1 o vehículo (NT: no tratadas) sobre la proliferación de líneas celulares TT (línea celular CMT humana que expresa RET/C634W), Lc-2/ad (CPCNP humana que expresa CCDC6-RET) y Nthy-ori-3-1 (tiroidea no transformada). Los datos son la media \pm DE (desviación estándar) de un experimento realizado por triplicado. Abajo, derecha) CI_{50} de inhibición del crecimiento de Pz-1 para las diferentes líneas celulares: el 95% de los IC (intervalos de confianza) se indican entre paréntesis. Las células se sembraron por triplicado en placas de 60 mm y se almacenaron en suero bovino fetal (Nthy-ori-3-1) al 5% o (TT y Lc-2/ad) al 10%. El día después de sembrar en placa, se añadieron diferentes concentraciones de Pz-1 o vehículo al medio y se cambió cada 2-3 días. Las células se contaron cada 2-3 días y se informaron los números de células \pm DE (desviación estándar). Las dosis de CI_{50} (con intervalos de confianza) se calcularon a través de análisis de ajuste de curvas a partir de curvas del último día de crecimiento utilizando el programa de software PRIZM (Graphpad Software Inc).

Figura 6: Actividad de Pz-1 sobre la proliferación de células Ba/F3 murinas independiente de IL-3 conducidas por el oncogén NCOA4-RET. Las curvas de crecimiento celular muestran la inhibición de la proliferación mediante Pz-1 para Ba/F3-NCOA4-RET pero no para Ba/F3 parental. Las células Ba/F3 y Ba/F3 NCOA4-RET se incubaron con vehículo (NT) o con concentración indicada de Pz-1 en medio completo y se contaron a diferentes puntos de tiempo. Los datos son la media \pm DE de un experimento realizado por triplicado. Las células pro-B Ba/F3 dependientes de interleucina-3 (IL-3) murina fueron de ATCC. Las células Ba/F3 que expresaban de manera estable proteína NCOA4-RET (RET/PTC3) se generaron al transfectar isoformo largo (RET-51) de NCOA4-RET mediante electroporación. Las células Ba/F3-NCOA4-RET y parentales se cultivaron en RPMI 1640 con FBS al 10%; las células parentales también requirieron 10 ng/ml de IL-3. Se indican las dosis de CI_{50} (con intervalos de confianza).

Figura 7: Actividad antitumorigénica de Pz-1 sobre células TT xenoinjertadas en ratones SCID. La figura muestra los efectos de Pz-1 sobre tumores subcutáneos en ratones SCID implantados con células TT y tratados diariamente mediante alimentación por sonda oral con vehículo (n. 10 ratones, 18 tumores), o con 0,3, 1,0 ó 3,0 mg/kg de Pz-1 (n. 29 ratones, 52 tumores). Los volúmenes promedio de tumores se informan \pm DE (desviación estándar). Las células TT ($7,5 \times 10^6$ /ratón) se inocularon de manera subcutánea en porciones dorsales (ambos lados) de 39 ratones hembra SCID (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine). Después de 5 semanas, al menos un tumor estaba presente en cada ratón y un total de 70 tumores fueron visibles: 56 tumores fueron de 40-150 mm³ y 14 tumores fueron de < 40 mm³. Los tumores fueron evidentes en ambos sitios de inyección en 31 ratones; solo un sitio mostró formación de tumor en los restantes 8 ratones. Los animales portadores de tumor se asignaron de manera aleatoria para recibir Pz-1 (0,3, 1,0 ó 3,0 mg/kg, diariamente) (29 ratones, 52 tumores) o vehículo (10 ratones, 18 tumores) mediante alimentación por sonda oral. El tratamiento se administró durante 28 días consecutivos. Los diámetros del tumor se midieron con calibres cada semana. Los volúmenes del tumor (V) se calcularon mediante la fórmula elipsoide rotacional: $V = A \times B^2/2$ (A=diámetro axial; B=diámetro rotacional) y se informaron como volúmenes promedio \pm desviaciones estándar. Para comparar el crecimiento del tumor, se utilizó la prueba Kruskal-Wallis (ANOVA no paramétrica) y la prueba de comparación múltiple de Dunn (programa InStat, software GraphPad). Los valores P fueron estadísticamente significativos a $P < 0,05$.

Figura 8: Actividad antitumorigénica de Pz-1 en ratones desnudos implantados con fibroblastos NIH3T3 transformados RET/C634Y o HRAS(G12V). La figura muestra los efectos de Pz-1 sobre los tumores subcutáneos en ratones tratados mediante alimentación por sonda oral para los periodos de tiempo indicados con Pz-1 (1,0, 3,0 ó 10 mg/kg, diariamente) o vehículo. Se informa el volumen de tumor promedio (\pm DE: desviaciones estándar). Se inocularon de manera subcutánea NIH3T3 RET/C634Y (200.000 células) o NIH3T3 HRAS/G12V (50.000 células) en porción dorsal (ambos lados) de ratones hembra BALB/c nu/nu de 6 semanas de edad (n. 31 ratones/línea celular) (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine). Después de 4 días, antes de que los tumores hubieran aparecido, los animales se asignaron de manera aleatoria para recibir Pz-1 (1,0, 3,0 ó 10 mg/kg, diariamente) (23 ratones/línea celular: 8 ratones/grupo para 1,0 y 3,0 mg/kg de dosis diaria y 7 ratones para 10 mg/kg de dosis diaria) o control de vehículo (8 ratones) mediante alimentación por sonda oral. Los diámetros del tumor se midieron con calibres cada 1-2 días. Los volúmenes del tumor (V) se calcularon mediante la fórmula elipsoide rotacional y se informaron como volúmenes promedio \pm desviaciones estándar. Para comparar el crecimiento del tumor, se utilizó la prueba Kruskal-Wallis (ANOVA no paramétrica) y la prueba de comparación múltiple de Dunn (programa InStat, software GraphPad). Los valores P fueron estadísticamente significativos a $P < 0,05$.

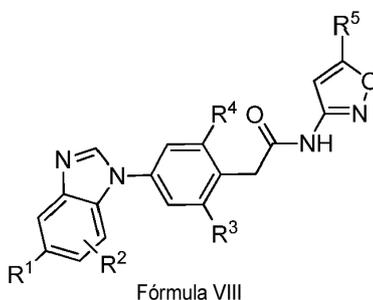
Figura 9: Fotografías de transferencias que muestran los efectos de Pz-1 sobre los eventos de fosforilación celular en tumores inducidos en ratones desnudos (de la figura 8) mediante inyección de fibroblastos NIH3T3 transformados por RET/C634Y o HRAS/G12V. Las transferencias muestran la inhibición mediante el tratamiento con Pz-1 de pVEGFR2 tanto en tumores inducidos por RET/C634Y y HRAS/G12V como en la inhibición de la fosforilación de RET y la señalización intracelular (SHC, MAPK, p70S6K y S6RP) solo en tumores inducidos por RET/C634Y. Algunos de los tumores tratados con vehículo, al final del experimento de crecimiento del tumor descrito en la figura 8, se trataron durante 48 h con diferentes dosis de Pz-1 (TR) o se dejaron sin tratar (NT). Al final del tratamiento, se sometieron a inmunotransferencia 50 μ g de lisados celulares totales con anticuerpos RET anti-fosfo-Y1062 (α p1062) y anti-fosfo-905 (α pY905), anticuerpos anti-fosfo-MAPK (α pMAPK, T302/Y304), anti-fosfo-SHC (α pSHC, Y317), anti-fosfo-p70S6K (α p70S6K, T389), anti-fosfo-S6RP (α pS6RP, S235/S236) y anti-fosfo-VEGFR2 (α pVEGFR2 pY1175). Las transferencias se normalizaron utilizando anticuerpos anti-RET (α RET), anti-SHC (α SHC), anti-MAPK

(α MAPK), anti-p70S6K (α p70S6K), anti-S6RP (α S6RP) o anti-VEGFR2 (α VEGFR2).

Figura 10: Modelos de acoplamiento de Pz-1 (N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida) con la RET cinasa en color rojo y la VEGFR2 cinasa en color verde. Cuatro aminoácidos son diferentes entre RET y VEGFR2, los cuales pueden usarse para el diseño de inhibidores RET selectivos. Se obtuvieron una estructura cristalina DFG-out de VEGFR-2 (PDB n.º 20H4) y la secuencia de aminoácidos de RET (PDB n.º 2IVU). Utilizando el modo de modelado automático SWISS-MODEL (swissmodel.expasy.org), se empleó la secuencia RET para construir un modelo de homología de DFG-out de RET usando la estructura DFG-out de VEGFR2 como plantilla. Utilizando AutoDock Tools: 1) todos los hidrógenos se añadieron como 'Polar Only'; 2) se creó un cuadro de rejilla para el sitio de unión de ATP (centro x = -25,881, centro y = 9,55, centro z = -10,927 / tamaño x = 16, tamaño y = 44, tamaño z = 18). A los compuestos que van a modelarse de manera computacional se les asignaron enlaces giratorios apropiados utilizando AutoDock Tools. Luego, se empleó AutoDock Vina para modelar los compuestos. Los resultados del modelado se visualizaron y se analizaron con Discovery Studio 3.5.

Sumario de la invención

En un primer aspecto amplio de la invención, se proporcionan en el presente documento compuestos de fórmula VIII:



en la que R¹ es arilo o heteroarilo no sustituido o sustituido (con R⁶); R² se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo (C₁-C₃), halo, -CN, -O-alquilo (C₁-C₃), -O-(CH₂)_nX, -N(R⁷)(R⁸), -CONH(CH₂)_nX, -SO₂NH(CH₂)_nX, y -SO₂-alquilo (C₁-C₃); R³ y R⁴ son cada uno independientemente H, alquilo (C₁-C₆), o CN; R⁵ es alquilo (C₁-C₃) o alquilo (C₁-C₃) sustituido con de uno a tres flúor; R⁶ es H, OH, NH₂, alquilo (C₁-C₃), halo, -CN, -O-alquilo (C₁-C₃), -O(CH₂)_nX, -N(R⁷)(R⁸), -CONH₂, -CONH(CH₂)_nX, -SO₂NH(CH₂)_nX, o -SO₂-alquilo (C₁-C₃); X es OR⁹, N(R⁷)(R⁸); R⁷ y son cada uno independientemente hidrógeno o alquilo (C₁-C₄) o alcoxilo (C₁-C₄), y pueden formar un anillo entre sí; n es 2 ó 3; y R⁹ es H o alquilo (C₁-C₃). También se proporcionan sales, estereoisómeros, enantiómeros, racematos, solvatos, hidratos y polimorfos de fórmula VIII.

En determinadas realizaciones de la invención, el compuesto de fórmula VIII se selecciona del grupo que consiste en: N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida (Pz-1); 2-(4-(5-(1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)-N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(2,3-dimetilfenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(2-fluoropiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(2,4-dimetoxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(tiofen-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(2,4-difluorofenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(2,4-diclorofenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(4-(metiltio)fenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(2-metoxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(6-fluoropiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(2-metoxipiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(piridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(6-morfolinopiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(piridin-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(4-(metilsulfonyl)fenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(pirimidin-5-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(piridin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(6-metilpiridin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; y N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-fenil-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida.

En una realización particular de la invención, el compuesto de fórmula VIII es N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida (Pz-1).

También se proporcionan en el presente documento métodos de obtención de inhibidores de tirosina cinasa. Un primer método implica hacer reaccionar una anilina sustituida con un compuesto fluoruro activado en una reacción de adición nucleófila para producir un producto de adición; reducir de manera selectiva el producto de adición para

producir un primer producto de reducción; ciclar el producto reducido para producir un producto intermedio ciclado; acoplar el producto intermedio ciclado con un ácido borónico o derivado de estaño para producir un éster; y reducir el éster para producir un segundo producto de reducción; y aminor el segundo producto de reducción para producir un inhibidor de tirosina cinasa.

5 En determinadas realizaciones, la anilina sustituida comprende un bromo en la posición *para*. En determinadas realizaciones, la reducción selectiva comprende reducir un grupo NO₂ a NH₂ mientras no se reduce el bromo. En determinadas realizaciones, la ciclación comprende activar el producto reducido con un ácido. En realizaciones particulares, el ácido comprende *p*TSA. En determinadas realizaciones, el producto intermedio ciclado comprende 2-(4-(5-bromo-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo.

15 En determinadas realizaciones, el acoplamiento está catalizado por paladio. En determinadas realizaciones, el bromo es un grupo saliente en la etapa de acoplamiento. En determinadas realizaciones, la etapa de acoplamiento comprende acoplamiento de Suzuki. En determinadas realizaciones, el éster se selecciona del grupo que consiste en: 2-(4-(5-(1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; 2-(4-(5-(2,3-dimetilfenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; 2-(4-(5-(2-fluoropiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; 2-(4-(5-(2,4-dimetoxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; 2-(4-(5-(tiofen-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; 2-(4-(5-(2,4-difluorofenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; 2-(4-(5-(2,4-diclorofenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; 2-(4-(5-(4-(metiltio)fenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; 2-(4-(5-(2-metoxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; 2-(4-(5-(6-fluoropiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; 2-(4-(5-(2-metoxipiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; 2-(4-(5-(piridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; 2-(4-(5-(piridin-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; 2-(4-(5-(4-(metilsulfonil)fenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; 2-(4-(5-(pirimidin-5-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; 2-(4-(5-(piridin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; 2-(4-(5-(6-metilpiridin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; y 2-(4-(5-fenil-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo. En determinadas realizaciones, el éster consiste esencialmente en 2-(4-(5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo.

30 En determinadas realizaciones, el segundo producto de reducción comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: 2-(4-(5-(1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(2,3-dimetilfenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(2-fluoropiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(2,4-dimetoxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(tiofen-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(2,4-difluorofenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(2,4-diclorofenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(4-(metiltio)fenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(2-metoxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(6-fluoropiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(2-metoxipiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(piridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(6-morfolinopiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(piridin-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(4-(metilsulfonil)fenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(pirimidin-5-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(piridin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(6-metilpiridin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; y 2-(4-(5-fenil-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio. En determinadas realizaciones, el segundo producto de reducción consiste esencialmente en 2-(4-(5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio.

45 Un segundo método implica hacer reaccionar un éster borónico con un halo-arilo o heteroarilo en presencia de un catalizador y una base para producir un producto intermedio; acoplar el producto intermedio con un ácido borónico o derivado de estaño para producir un precursor de inhibidor de tirosina cinasa; y reducir y aminor el precursor de inhibidor de tirosina cinasa para producir un inhibidor de tirosina cinasa. En determinadas realizaciones, la base comprende acetato de potasio.

55 En determinadas realizaciones, el halo-arilo o heteroarilo comprende pirrolilo, pirazolilo, piranilo, tiopiranilo, furanilo, imidazolilo, piridilo, tiazolilo, triazinilo, ftalimidilo, indolilo, purinilo, benzotiazolilo, o combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, el halo-arilo o heteroarilo comprende un radical heterocíclico seleccionado del grupo que consiste en oxiranilo, azirínilo, aziridinilo, 1,2-oxatiolanilo, tienilo, furilo, tetrahydrofurilo, piranilo, tiopiranilo, tiantrenilo, isobenzofuranilo, benzofuranilo, cromenilo, 2H-pirrolilo, pirrolilo, pirrolinilo, pirrolidinilo, imidazolilo, imidazolidinilo, bencimidazolilo, pirazolilo, pirazinilo, pirazolidinilo, tiazolilo, isotiazolilo, ditiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, piperidilo, piperazinilo, piridazinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, (S-oxo o S,S-dioxo)-tiomorfolinilo, indolizínilo, isoindolilo, 3H-indolilo, indolilo, bencimidazolilo, cumarilo, indazolilo, triazolilo, tetrazolilo, purinilo, 4H-quinolizínilo, isoquinolilo, quinolilo, tetrahydroquinolilo, tetrahydroisoquinolilo, decahydroquinolilo, octahydroisoquinolilo, benzofuranilo, dibenzofuranilo, benzotiofenilo, dibenzotiofenilo, ftalazinilo, naftiridinilo, quinoxalilo, quinazolinilo, quinazolinilo, cinnolinilo, pteridinilo, carbazolilo, beta-carbolinilo, fenantridinilo, acridinilo, perimidinilo, fenantrolinilo, furazanilo, fenazinilo, fenotiazinilo, fenoxazinilo, cromenilo, isocromanilo, y cromanilo.

65 En determinadas realizaciones, el producto intermedio comprende 2-(4-(5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo.

En determinadas realizaciones, el precursor de inhibidor de tirosina cinasa se selecciona del grupo que consiste en: 2-(4-(5-(1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; 2-(4-(5-(2,3-dimetilfenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; 2-(4-(5-(2-fluoropiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; 2-(4-(5-(2,4-dimetoxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; 2-(4-(5-(tiofen-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; 2-(4-(5-(2,4-difluorofenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; 2-(4-(5-(2,4-diclorofenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; 2-(4-(5-(4-(metiltio)fenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; 2-(4-(5-(6-fluoropiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; 2-(4-(5-(2-metoxipiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; 2-(4-(5-(piridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; 2-(4-(5-(6-morfolinopiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; 2-(4-(5-(piridin-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; 2-(4-(5-(4-(metilsulfonil)fenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; 2-(4-(5-(pirimidin-5-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; 2-(4-(5-(piridin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; 2-(4-(5-(6-metilpiridin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo; y 2-(4-(5-fenil-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo. En determinadas realizaciones, el precursor de inhibidor de tirosina cinasa consiste esencialmente en 2-(4-(5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo.

En determinadas realizaciones, el precursor de inhibidor de tirosina cinasa se reduce a un producto de reducción que comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: 2-(4-(5-(1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(2,3-dimetilfenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(2-fluoropiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(2,4-dimetoxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(tiofen-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(2,4-difluorofenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(2,4-diclorofenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(4-(metiltio)fenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(2-metoxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(6-fluoropiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(2-metoxipiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(piridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(6-morfolinopiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(piridin-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(4-(metilsulfonil)fenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(pirimidin-5-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; 2-(4-(5-(piridin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio; y 2-(4-(5-fenil-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio. En determinadas realizaciones, el precursor de inhibidor de tirosina cinasa se reduce a un producto de reducción consiste esencialmente en 2-(4-(5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio.

En otro aspecto amplio, se proporciona en el presente documento una composición farmacéutica. La composición farmacéutica comprende un compuesto de fórmula VIII y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Además se proporcionan métodos de tratar un sujeto con cáncer, inhibiendo la fosforilación, e inhibiendo la proliferación de células incluyendo células de cáncer de tiroides. En determinadas realizaciones, los métodos comprenden administrar una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula VIII a un sujeto o células. En determinadas realizaciones, el compuesto comprende N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida (Pz-1). En determinadas realizaciones, las células de cáncer de tiroides comprenden CMT.

Además se proporciona un método de inhibir una tirosina cinasa, que comprende tratar las células con una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula VIII. En determinadas realizaciones, la tirosina cinasa se selecciona del grupo que consiste en RET, FLT3, c-Kit, VEGFR, Trk-A, Trk-B, Trk-C y PDGFR. En determinadas realizaciones, el compuesto muestra un dominio cinasa con un valor de CI_{50} de menos de 1 μ M.

Además se proporciona un método de tratamiento del dolor asociado al cáncer. El método implica administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula VIII y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable a un paciente que lo necesita.

Además se proporcionan kits. En una primera realización, un kit para la preparación de un inhibidor de tirosina cinasa comprende un primer recipiente que alberga una anilina sustituida, y un segundo recipiente que alberga un compuesto fluoruro activado. En determinadas realizaciones, el kit comprende además uno o más agentes reductores, un ácido borónico, o un derivado de estaño. En una segunda realización, un kit para la preparación de un inhibidor de tirosina cinasa incluye un primer recipiente que alberga un éster borónico, un segundo recipiente que alberga un halo-arilo o heteroarilo, y un catalizador. En determinadas realizaciones, el kit comprende además uno o más agentes reductores. En una tercera realización, un kit para preparación de una composición farmacéutica comprende un primer recipiente que alberga un compuesto de fórmula VIII, y un segundo recipiente que alberga un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

65 Descripción detallada

Se describen diversas realizaciones en la presente divulgación en el contexto de compuestos, métodos de elaboración compuestos, y métodos de uso de compuestos. Los expertos habituales en la técnica se darán cuenta de que la siguiente descripción detallada de las realizaciones es solo ilustrativa y no pretende ser en ningún caso limitativa. Otras realizaciones se sugerirán fácilmente a sí mismas a dichas personas expertas que tengan el beneficio de esta divulgación. La referencia a una "realización", "aspecto", o "ejemplo" en esta divulgación indica que las realizaciones de la invención así descritas pueden incluir un rasgo, una estructura o una característica particular, pero cada realización no necesariamente incluye el rasgo, estructura o característica particular. Además, el repetido uso de la expresión "en una realización" no se refiere necesariamente a la misma realización, aunque puede.

10 Definiciones

Los términos químicos generales usados en el presente documento tienen sus significados habituales en la técnica. Por ejemplo, tal como se usa en el presente documento, el término "alquilo C₁-C₄", solo o en combinación, indica un grupo alquilo C₁-C₄ de cadena lineal o de cadena ramificada que consiste en átomos de carbono y de hidrógeno, cuyos ejemplos son metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, *sec*-butilo, *tert*-butilo, y similares.

Tal como se usa en el presente documento, el término "halo" o "halógeno" representa flúor, cloro, bromo o yodo. Tal como se usa en el presente documento, el término "alquilo C₁-C₆" se refiere a cadenas alifáticas saturadas, monovalentes, de cadena lineal o ramificada, de 1 a 6 átomos de carbono e incluye, pero no se limita a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *t*-butilo, pentilo, isopentilo y hexilo. El término "alquilo C₁-C₆" incluye dentro de su definición los términos "alquilo C₁-C₄" y "alquilo C₁-C₃". El término "carboxilo" se refiere a un ácido carboxílico. El término "carboxamida" se refiere a un carbonilo sustituido con un resto NH₂. El término "oxo" se refiere a un grupo carbonilo.

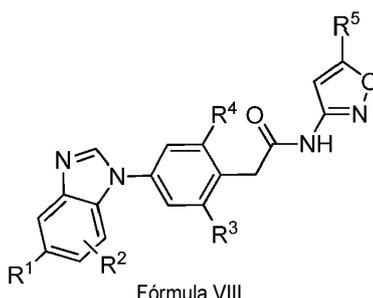
Tal como se usa en el presente documento, el término "heteroarilo" significa un resto arilo que contiene de 1 a 5 heteroátomos seleccionados de O, S, y N. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen pirrolilo, pirazolilo, piranilo, tiopiranilo, furanilo, imidazolilo, piridilo, tiazolilo, triazinilo, ftalimidilo, indolilo, purinilo, y benzotiazolilo. Heteroarilo es especialmente un radical heterocíclico seleccionado del grupo que consiste en oxiranilo, azirínilo, aziridinilo, 1,2-oxatolano, tienilo, furilo, tetrahidrofurilo, piranilo, tiopiranilo, tiantrenilo, isobenzofuranilo, benzofuranilo, cromenilo, 2H-pirrolilo, pirrolilo, pirrolinilo, pirrolidinilo, imidazolilo, imidazolidinilo, bencimidazolilo, pirazolilo, pirazinilo, pirazolidinilo, tiazolilo, isotiazolilo, ditiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, piperidilo, piperazinilo, piridazinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, (S-oxo o S,S-dioxo)-tiomorfolinilo, indolizínilo, isoindolilo, 3H-indolilo, indolilo, bencimidazolilo, cumarilo, indazolilo, triazolilo, tetrazolilo, purinilo, 4H-quinolizínilo, isoquinolilo, quinolilo, tetrahydroquinolilo, tetrahydroisoquinolilo, decahydroquinolilo, octahydroisoquinolilo, benzofuranilo, dibenzofuranilo, benzotiofenilo, dibenzotiofenilo, ftalazinilo, naftiridinilo, quinoxalilo, quinazolinilo, quinazolinilo, cinnolinilo, pteridinilo, carbazolilo, beta-carbolinilo, fenantridinilo, acridinilo, perimidinilo, fenantrolinilo, furazanilo, fenazinilo, fenotiazinilo, fenoxazinilo, cromenilo, isocromanilo y cromanilo.

En el presente documento se usan diversas abreviaturas. El término DCM se refiere a diclorometano. El término DIPEA se refiere a N,N-diisopropiletilamina. El término Pd₂(dba)₃ se refiere a tris(dibencilidenacetona)dipaladio. El término dppf se refiere a 1,1'-bis(difenilfosfina)ferroceno. El término DMA se refiere a N,N-dimetilacetamida. El término DMF se refiere a N,N-dimetilformamida. El término DMSO se refiere a dimetilsulfóxido. El término EDC se refiere a 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida. El término EtOAc se refiere a acetato de etilo. El término EtOH se refiere a alcohol etílico. El término ES se refiere a pulverización de electrones. El término h se refiere a hora(s). El término HOAc se refiere a ácido acético. El término HOAt se refiere a 1-hidroxi-7-azabenzotriazol. El término IPA se refiere a alcohol isopropílico. El término KOAc se refiere a acetato de potasio. El término CL se refiere a cromatografía líquida. El término LiOH se refiere a hidróxido de litio. El término MgSO₄ se refiere a sulfato de magnesio. El término min se refiere a minutos. El término ml se refiere a mililitros. El término mmol se refiere a milimol. El término EM se refiere a espectro de masas. El término NaHCO₃ se refiere a bicarbonato de sodio. El término *p*TSA se refiere a ácido *p*-toluenosulfónico. El término P(CY)₃ se refiere a triciclohexilfosfina. El término TA se refiere a temperatura ambiente. El término THF se refiere a tetrahidrofurano. El término CCF se refiere a cromatografía en capa fina. El término TMOF se refiere a ortoformiato de trimetilo.

Cuando se usa la forma plural para compuestos, sales, preparaciones farmacéuticas, enfermedades, trastornos, y similares, pretende significar también un único compuesto, sal, preparación farmacéutica, enfermedad, o similar. Cuando se usa "un" o "una", se refiere al artículo indefinido, o preferiblemente a "uno/a."

Descripción general

60 Se proporcionan en el presente documento compuestos de fórmula VIII:



en la que R¹ es arilo o heteroarilo no sustituido o sustituido (con R⁶); R² se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo (C₁-C₃), halo, -CN, -O-alquilo (C₁-C₃), -O-(CH₂)_nX, -N(R⁷)(R⁸), -CONH(CH₂)_nX, -SO₂NH(CH₂)X, y -SO₂-alquilo (C₁-C₃); R³ y R⁴ son cada uno independientemente H, alquilo (C₁-C₆), o CN; R⁵ es alquilo (C₁-C₃) o alquilo (C₁-C₃) sustituido con de uno a tres flúor; R⁶ es H, OH, NH₂, alquilo (C₁-C₃), halo, -CN, -O-alquilo (C₁-C₃), -O(CH₂)_nX, -N(R⁷)(R⁸), -CONH₂, -CONH(CH₂)_nX, -SO₂NH(CH₂)_nX, o -SO₂-alquilo (C₁-C₃); X es OR⁹, N(R⁷)(R⁸); R⁷ y R⁸ son cada uno independientemente hidrógeno o alquilo (C₁-C₄) o alcoxilo (C₁-C₄), y pueden formar un anillo entre sí; n es 2 ó 3; y R⁹ es H o alquilo (C₁-C₃). También se proporcionan sales, estereoisómeros, enantiómeros, racematos, solvatos, hidratos y polimorfos del mismo. También se describen en el presente documento profármacos y precursores metabólicos de compuestos de fórmula VIII, tales como ésteres o amidas.

Por medio de un ejemplo no limitativo, los compuestos de fórmula VIII incluyen específicamente, pero no se limitan a, los compuestos listados a continuación:

- 1) N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida;
- 2) 2-(4-(5-(1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)-N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)acetamida;
- 3) N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(2,3-dimetilfenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida;
- 4) N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(2-fluoropiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida;
- 5) N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(2,4-dimetoxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida;
- 6) N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(tiofen-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida;
- 7) N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(2,4-difluorofenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida;
- 8) N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(2,4-diclorofenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida;
- 9) N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(4-(metiltio)fenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida;
- 10) N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(2-metoxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida;
- 11) N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(6-fluoropiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida;
- 12) N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(2-metoxipiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida;
- 13) N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(piridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida;
- 14) N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(6-morfolinopiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida;
- 15) N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(piridin-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida;
- 16) N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(4-(metilsulfonil)fenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida;
- 17) N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(pirimidin-5-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida;
- 18) N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(piridin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida;
- 19) N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(6-metilpiridin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida;
- 20) N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-fenil-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida;

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Debe entenderse que el número que precede al nombre del

compuesto en la lista anterior puede usarse en el presente documento para identificar el compuesto particular al cual corresponde. Debe entenderse además que los compuestos a modo de ejemplo en la lista anterior son simplemente representativos de la invención y no limitantes de ninguna manera. Cualquiera de los compuestos de la presente divulgación es útil como inhibidores de tirosina cinasa.

5 Durante toda la memoria descriptiva, el compuesto 1, un ejemplo de un compuesto de fórmula VIII, puede denominarse compuesto 1, *N*-(5-(*tert*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida, Pz-1, Pz-01, o cualquier combinación de estos términos.

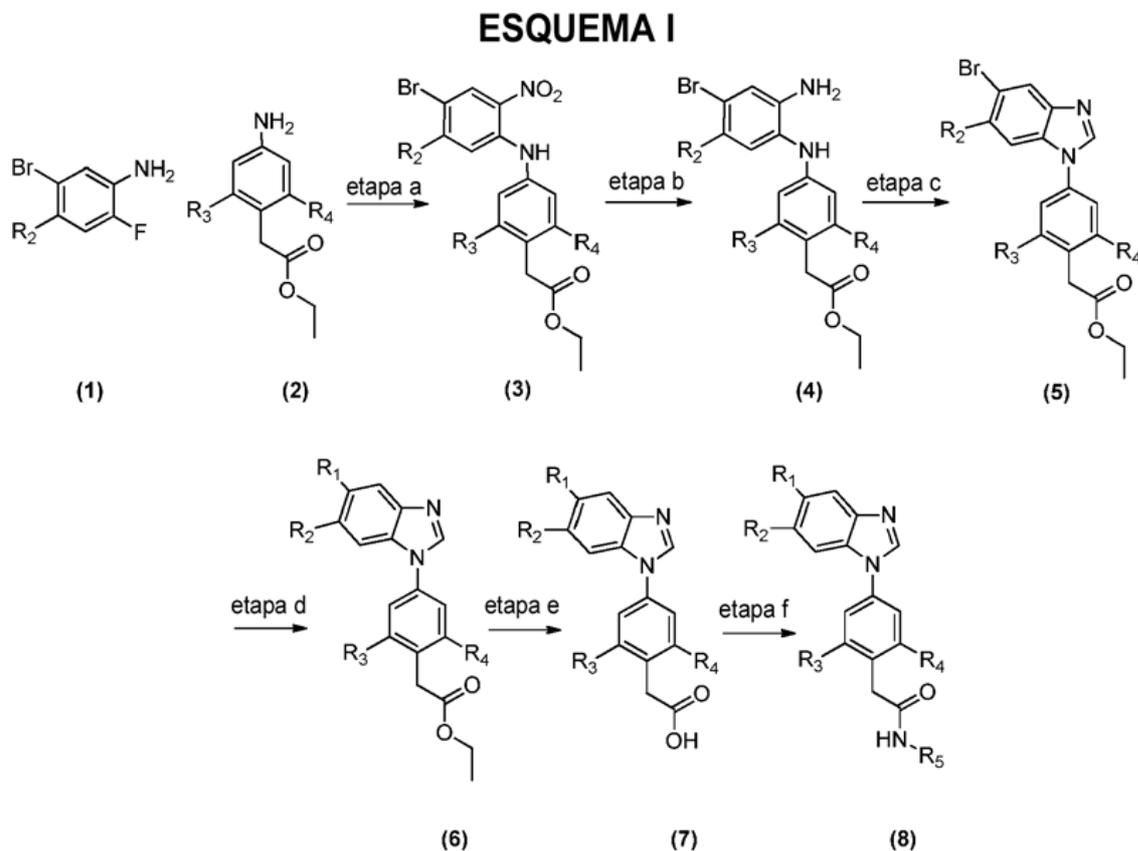
10 El médico experto reconocerá que cualquiera de los compuestos descritos en el presente documento puede formar sales. Por medio de un ejemplo no limitativo, los compuestos descritos reaccionan con cualquier número de ácidos orgánicos o inorgánicos para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables.

Método de elaboración

15 En determinadas realizaciones, los compuestos dados a conocer en el presente documento pueden elaborarse según los siguientes esquemas y ejemplos. Debe entenderse que son posibles muchos otros métodos de elaboración de los compuestos. Por ejemplo, el experto en la técnica apreciará que la introducción de determinados sustituyentes creará asimetría en los compuestos de fórmula VIII. La presente invención contempla todos los enantiómeros y mezclas de enantiómeros, incluyendo racematos. Se prefiere que los compuestos de la invención que contienen centro quirales sean enantiómeros únicos, pero no se requiere.

20 Los compuestos de la presente divulgación pueden prepararse mediante una variedad de procedimientos, algunos de los cuales se ilustran en los esquemas representados a continuación. Un experto en la técnica reconocerá que las etapas individuales en los siguientes esquemas pueden variarse para proporcionar los compuestos de fórmula VIII. El orden particular de etapas requerido para producir los compuestos de fórmula VIII es dependiente del compuesto particular que va a sintetizarse, el(los) compuesto(s) de partida, y la labilidad relativa de los restos sustituidos.

30 En determinadas realizaciones, los compuestos de fórmula VIII se sintetizan a través del esquema I, el cual se representa a continuación.



35 La etapa a del esquema I representa una reacción de adición nucleófila de una anilina sustituida de manera (2) apropiada con un compuesto fluoruro activado (1). La sustitución de *para*-bromo es importante para esta reacción;

no solo acelera el reemplazo de flúor con NH_2 , sino que el átomo de bromo puede permitir también la formación de un enlace carbono-carbono a través de una reacción de Suzuki en el producto intermedio resultante (5). El producto puede aislarse y purificarse mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como precipitación, filtración, extracción, evaporación, cromatografía y recristalización.

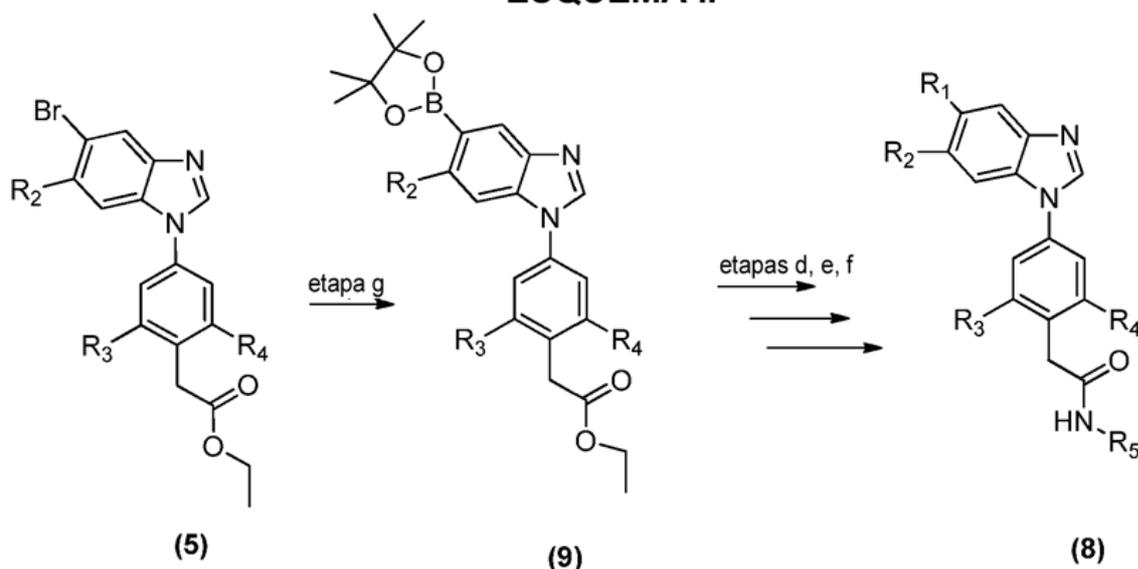
5 En la etapa b del esquema I, se aplican determinadas condiciones a un producto intermedio 3 para dar el producto intermedio 4. Normalmente, la reacción se lleva a cabo en un disolvente adecuado tal como MeOH, EtOH, o ácido para reducir de manera selectiva el grupo NO_2 a NH_2 sin la reducción del bromo, pero son posibles otros métodos. La reacción se lleva a cabo a una temperatura que oscila entre menor que temperatura ambiente (tal como en un
10 baño de hielo) y temperatura ambiental durante 4 a 8 h. El producto puede aislarse y purificarse mediante las técnicas descritas anteriormente.

La etapa c del esquema 1 representa la ciclación del producto intermedio 4 para dar un producto intermedio 5
15 opcionalmente sustituido. Normalmente, el producto intermedio 4 apropiado se activa con un ácido adecuado, preferiblemente pTSA, en un disolvente adecuado o en TMOF puro a temperaturas de 100°C y por encima. Los productos pueden aislarse y purificarse mediante las técnicas descritas anteriormente.

La etapa d del esquema I representa el acoplamiento catalizado por paladio del producto intermedio 5 con un ácido
20 borónico o un derivado de estaño para dar el producto intermedio 6. Normalmente, el haluro, especialmente bromo, del producto intermedio 5 se usa como un grupo saliente en la combinación de ácido borónico o análogos de estaño en presencia de un catalizador adecuado, preferiblemente $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, y una base adecuada, tal como acetato de potasio, para sintetizar además compuestos de fórmula VIII (reacción de Suzuki: véase, por ejemplo, Miyaura, N. *et al.*, Synth. Commun., 1981, 513-518).

25 En determinadas realizaciones, los compuestos de fórmula VIII pueden sintetizarse a través del esquema II, representado a continuación.

ESQUEMA II



30 La etapa e del esquema II representa la síntesis del éster borónico del producto intermedio 9 mediante métodos conocidos en la técnica (Li *et al.*, J. Org. Chem., 2002, 5394-5397). Del mismo modo que en la etapa d, un halo-arilo o heteroarilo puede reaccionar con el producto intermedio 9, en presencia de un catalizador adecuado, tal como $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, y una base adecuada, tal como acetato de potasio, para sintetizar además compuestos de fórmula VIII (reacción de Suzuki: véase, por ejemplo, Miyaura, N. *et al.*, Synth. Commun., 1981, 513-518). Los compuestos 17-
35 20, cuyos nombres de la IUPAC se dan en la lista anterior, pueden sintetizarse a través del esquema II, usando las mismas dos etapas restantes como en el esquema I -- etapas e y f.

Composiciones farmacéuticas

40 Los compuestos de la presente divulgación pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de diversas enfermedades. En determinadas realizaciones, las sales de fórmula VIII son especialmente útiles en composiciones farmacéuticas.

Una composición farmacéutica tal como se describe en el presente documento puede formularse con cualquiera de

los compuestos de fórmula VIII, los cuales son inhibidores de tirosina cinasa, además de cualquier excipiente, diluyente o portador común. Las composiciones pueden comprimirse en comprimidos, o formularse como elixires o disoluciones para la conveniente administración oral o administración mediante vías intramuscular o intravenosa. Los compuestos pueden administrarse por vía transdérmica y pueden formularse como formas de dosificación de liberación sostenida y similares.

Los compuestos, las composiciones, y las formulaciones proporcionados en el presente documento son útiles para tratar animales, tales como seres humanos, para diversas enfermedades. Un método de tratamiento de un paciente humano según la presente divulgación incluye la administración de una cantidad eficaz de un inhibidor de tirosina cinasa o una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de tirosina cinasa. Los inhibidores de tirosina cinasa pueden formularse en composiciones que pueden administrarse por las vías oral y rectal, por vía tópica, por vía parenteral, por ejemplo, mediante inyección y mediante infusión intraarterial continua o discontinua, en la forma de, por ejemplo, comprimidos, pastillas, comprimidos sublinguales, sobres, cachets, elixires, geles, suspensiones, aerosoles, pomadas, por ejemplo, que contienen desde el 1 hasta el 10% en peso del compuesto activo en una base adecuada, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, disoluciones y suspensiones inyectables en medios fisiológicamente aceptables, y polvos envasados estériles adsorbidos sobre un material de soporte para hacer disoluciones inyectables. De manera ventajosa para este propósito, las composiciones pueden proporcionarse en formas unitarias de dosificación, preferiblemente conteniendo cada unidad de dosificación desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 500 mg (desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 50 mg en el caso de administración parenteral o por inhalación, y desde aproximadamente 25 hasta aproximadamente 500 mg en el caso de administración oral o rectal) de los compuestos. Pueden administrarse dosificaciones desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 300 mg/kg por día, preferiblemente de 0,5 a 20 mg/kg, de principio activo aunque fácilmente se entenderá, por supuesto, que la cantidad del compuesto que de hecho va a administrarse se determinará por un médico, a la luz de todas las circunstancias relevantes que incluyen el estado que va a tratarse, la elección del compuesto que va a administrarse, y la elección de la vía de administración. Por tanto, los intervalos de dosificación comentados en el presente documento no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

Las formulaciones útiles para separar la administración de los inhibidores de tirosina cinasa normalmente contienen al menos un compuesto seleccionado de los compuestos de fórmula VIII (los cuales pueden denominarse en el presente documento como principio activo o sustancia activa) mezclado con un portador, o diluidos mediante un portador, o encerrados o encapsulados mediante un portador ingerible en la forma de una cápsula, sobre, cachet, papel u otro recipiente, o mediante un recipiente desechable tal como una ampolla. Un portador o diluyente puede ser un material sólido, semi-sólido o líquido que sirve como un vehículo, excipiente o medio para la sustancia terapéutica activa. Algunos ejemplos de los diluyentes o portadores que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la presente invención son lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, propilenglicol, parafina líquida, parafina blanda blanca, caolín, dióxido de silicio pirogénico, celulosa microcristalina, silicato de calcio, sílice, polivinilpirrolidona, alcohol cetosteárico, almidón, almidones modificados, goma arábiga, fosfato de calcio, manteca de cacao, ésteres etoxilados, aceite de teobroma, aceite de cacahuete, alginatos, tragacanto, gelatina, almíbar, metilcelulosa, monolaurato de polioxietileno sorbitano, lactato de etilo, hidroxibenzoato de metilo y propilo, trioleato de sorbitano, sesquioleato de sorbitano y alcohol oleílico, y propelentes tales como tricloromonofluorometano, diclorodifluorometano y diclorotetrafluoroetano. En el caso de comprimidos, puede incorporarse un lubricante para prevenir el pegado y la unión de los ingredientes pulverizados en las boquillas y en el punzón de la máquina para la preparación de comprimidos. Para dichos propósitos, pueden emplearse por ejemplo estearatos de aluminio, magnesio o calcio, talco, o aceite mineral.

En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación comprenden una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula VIII y/o agentes adicionales, disueltos o dispersos en un portador farmacéuticamente aceptable. Las expresiones "farmacéutico" o "farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen reacciones adversas, alérgicas u otras reacciones negativas cuando se administran a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos un compuesto o principio activo adicional será conocida para los expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación, tal como se ejemplifica por Remington's Pharmaceutical Sciences, 2003. Además, para administración a animales (por ejemplo, ser humano), se entenderá que las preparaciones deben cumplir los criterios de esterilidad, pirogenicidad y seguridad y pureza generales tal como se requiere por la FDA Office of Biological Standards.

Una composición dada a conocer en el presente documento puede comprender diferentes tipos de portadores dependiendo de si van a administrarse en forma sólida, líquida o de aerosol, y de si necesitan ser estériles para dichas vías de administración tales como inyección. Las composiciones dadas a conocer en el presente documento pueden administrarse por vía intravenosa, intradérmica, transdérmica, intratecal, intraarterial, intraperitoneal, intranasal, intravaginal, intrarrectal, intraósea, periprotésica, tópica, intramuscular, subcutánea, mucosa, intrauterina, oral, tópica, local, mediante inhalación (por ejemplo, inhalación de aerosol), mediante inyección, mediante infusión, mediante infusión continua, mediante baño de perfusión localizado de células diana directamente, mediante un catéter, mediante un lavado, en cremas, en composiciones de lípidos (por ejemplo, liposomas), o mediante otro método o cualquier combinación de los anteriores tal como sería conocido para un experto habitual en la técnica

(véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 2003).

La cantidad de dosificación real de una composición dada a conocer en el presente documento administrada a un paciente humano o animal o puede determinarse mediante factores físicos y fisiológicos tales como peso corporal, gravedad del estado, el tipo de enfermedad que va a tratarse, intervenciones terapéuticas previas o concurrentes, idiopatía del paciente y sobre la vía de administración. Dependiendo de la dosificación y de la vía de administración, el número de administraciones de una dosificación y/o una cantidad eficaz preferida puede variar según la respuesta del sujeto. Los compuestos de la presente divulgación son generalmente eficaces sobre un gran intervalo de dosificaciones. El médico responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la concentración de principio(s) activo(s) en una composición y dosis apropiada(s) para el sujeto individual.

En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente el 0,1% de un compuesto activo. En otras realizaciones, un compuesto activo puede comprender entre aproximadamente el 2% y aproximadamente el 75% del peso de la unidad, o entre aproximadamente el 25% y aproximadamente el 60%, por ejemplo, y cualquier intervalo derivado en este respecto. Naturalmente, la cantidad de compuesto(s) activo(s) en cada composición terapéuticamente útil puede prepararse de tal manera que se obtendrá una dosificación adecuada en cualquier dosis unitaria dada del compuesto. Los factores tales como solubilidad, biodisponibilidad, semivida biológica, vía de administración, caducidad del producto, así como otras consideraciones farmacológicas se contemplarán por un experto en la técnica de la preparación de dichas formulaciones farmacéuticas, y como tal, puede ser deseable una variedad de dosificaciones y regímenes de tratamiento.

En otros ejemplos no limitativos, una dosis puede comprender también desde aproximadamente 1 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 10 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 50 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 100 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 200 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 350 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 500 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 1 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 10 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 50 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 100 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 200 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 350 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 500 miligramos/kg/peso corporal, hasta aproximadamente 1000 mg/kg/ peso corporal o más por administración, y cualquier intervalo derivado en este respecto. En los ejemplos no limitativos de un intervalo derivado de los números indicados en el presente documento, un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg/peso corporal hasta aproximadamente 100 mg/kg/peso corporal, de aproximadamente 5 microgramo/kg/peso corporal hasta aproximadamente 500 miligramo/kg/peso corporal, etc., pueden administrarse, basándose en los números descritos anteriormente.

En determinadas realizaciones, una composición y/o agente adicional se formula para administrarse a través de una vía alimentaria. Las vías alimentarias incluyen todas las posibles vías de administración en las que la composición está en contacto directo con el tracto alimentario. Específicamente, las composiciones farmacéuticas dadas a conocer en el presente documento pueden administrarse por vía oral, bucal, rectal o sublingual. Como tal, estas composiciones pueden formularse con un diluyente inerte o con un portador comestible asimilable, o pueden incluirse en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda, o pueden comprimirse en comprimidos, o pueden incorporarse directamente con la comida de la dieta.

En realizaciones adicionales, una composición descrita en el presente documento puede administrarse a través de una vía parenteral. Tal como se usa en el presente documento, el término "parenteral" incluye vías que evitan el tracto alimentario. Específicamente, las composiciones farmacéuticas dadas a conocer en el presente documento pueden administrarse, por ejemplo, pero no limitarse a, por vía intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraarterial, intratecal, subcutánea, o intraperitoneal (patentes estadounidenses 6.753.514, 6.613.308, 5.466.468, 5.543.158; 5.641.515 y 5.399.363).

Las disoluciones de las composiciones dadas a conocer en el presente documento como bases libres o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua mezclada de manera adecuada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos, y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos. Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles (patente estadounidense 5.466.468). En todos los casos la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (es decir, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y/o aceites vegetales. Debe mantenerse una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión, y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede producirse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol,

ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, se prefieren incluir agentes isotónicos, tales como, sin limitarse a, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede producirse mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción tal como, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

5 Para la administración parenteral en una disolución acuosa, por ejemplo, la disolución debe estar tamponada de manera adecuada si fuera necesario, y el primer diluyente líquido hecho isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. Los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos por los expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosificación puede disolverse en 10 1 ml de disolución de NaCl isotónica y o bien añadirse a 1000 ml de líquido de hipodermoclasia o bien inyectarse al sitio propuesto de infusión, (véase por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Alguna variación en la dosificación ocurrirá necesariamente dependiendo del estado del sujeto que va a tratarse. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada 15 para el sujeto individual.

Las disoluciones inyectables estériles se preparan incorporando las composiciones en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con otros diversos componentes enumerados anteriormente, tal como se requieran, seguido por esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando las diversas composiciones esterilizadas en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, algunos métodos de preparación son técnicas de secado a vacío o liofilización que producen un polvo del principio activo más cualquier c deseado adicional a partir de una disolución filtrada de manera estéril previamente de la misma. Una composición pulverizada se combina con un portador líquido tal como, por ejemplo, 20 agua o una solución salina, con o sin un agente estabilizante.

En otras realizaciones, las composiciones pueden formularse para administración a través de diversas vías misceláneas, por ejemplo, administración tópica (es decir, transdérmica), administración mucosa (intranasal, vaginal, etc.) y/o a través de inhalación.

30 Las composiciones farmacéuticas para administración tópica pueden incluir las composiciones formuladas para una aplicación medicinal tal como una pomada, una pasta, una crema o un polvo. Las pomadas incluyen todas las composiciones oleosas, de adsorción, de emulsión y solubles en agua para aplicación tópica, mientras que las cremas y lociones son aquellas composiciones que incluyen solo una base de emulsión. Los medicamentos administrados por vía tópica pueden contener un potenciador de la penetración para facilitar la adsorción de los principios activos a través de la piel. Los potenciadores de la penetración adecuados incluyen glicerina, alcoholes, alquil metil sulfóxidos, pirrolidonas y luarocapram. Las bases posibles para composiciones para aplicación tópica incluyen polietilenglicol, lanolina, crema hidratante y vaselina, así como cualquier otra base adecuada de adsorción, emulsión o pomada soluble en agua. Las preparaciones tópicas pueden incluir también emulsionantes, agentes 40 gelificantes y conservantes antimicrobianos cuando sea necesario para conservar la composición y mantener una mezcla homogénea. La administración transdérmica de las composiciones puede comprender también el uso de un "parche." Por ejemplo, el parche puede suministrar una o más composiciones a una velocidad predeterminada y de una manera continua a lo largo de un periodo de tiempo fijado.

45 En determinadas realizaciones, las composiciones pueden administrarse mediante gotas para los ojos, pulverizadores intranasales, inhalación y/o otros vehículos de administración de aerosol. Los métodos para administrar las composiciones directamente a los pulmones por medio de pulverizadores aerosoles nasales se han descrito en las patentes estadounidenses 5.756.353 y 5.804.212. Del mismo modo, la administración de fármacos utilizando resinas de micropartículas intranasales (Takenaga *et al.*, 1998) y de compuestos de lisofosfatidilglicerol (patente estadounidense 5.725.871) también son bien conocidas en las técnicas farmacéuticas y pueden emplearse para administrar las composiciones descritas en el presente documento. Del mismo modo, la administración transmucosa de fármacos en la forma de una matriz de soporte de politetrafluoroetileno se describe en la patente estadounidense 5.780.045, y puede emplearse para administrar las composiciones descritas en el presente documento.

55 Además se prevé que las composiciones dadas a conocer en el presente documento pueden administrarse a través de un aerosol. El término aerosol se refiere a un sistema coloidal de partículas sólidas o líquidas finamente divididas dispersadas en un propelente gaseoso licuado o presurizado. El aerosol típico para la inhalación consiste en una suspensión de principios activos en un propelente líquido o en una mezcla de propelente líquido y un disolvente adecuado. Los propelentes adecuados incluyen hidrocarburos y éteres de hidrocarburos. Los recipientes adecuados variarán según los requisitos de presión del propelente. La administración del aerosol variará según el peso, la edad del sujeto, y la gravedad y respuesta de los síntomas.

65 Las formas farmacéuticas preferidas de la presente invención son cápsulas, comprimidos, supositorios, disoluciones inyectables, cremas y pomadas. Se prefieren especialmente formulaciones para inhalación, tales como un aerosol, para inyección y para ingestión oral.

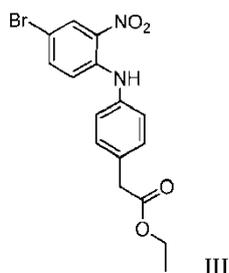
Kits

Se pretende que los compuestos o composiciones dados a conocer en el presente documento puedan envasarse en la forma de un kit que contenga múltiples recipientes. Muchas realizaciones de dichos kits son posibles. En determinadas realizaciones, un kit comprende múltiples componentes para un procedimiento de obtener un compuesto inhibidor de tirosina cinasa. En realizaciones particulares, un kit comprende una anilina sustituida, un compuesto fluoruro activado, uno o más agentes reductores, y un ácido borónico o derivado de estaño. En otras realizaciones, un kit comprende un éster borónico, un haloarilo o heteroarilo, un catalizador, y opcionalmente, uno o más agentes reductores. En otras realizaciones, un kit para preparar una composición farmacéutica comprende un inhibidor de tirosina cinasa, tal como un compuesto de fórmula VIII, y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Se prevén otras muchas variaciones y realizaciones de kits.

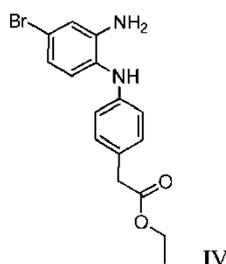
Los kits normalmente incluyen además instrucciones para usar los componentes del kit para practicar métodos objeto, pero no necesitan incluirse dichas instrucciones. Las instrucciones para practicar métodos objeto se registran generalmente en un medio de registro adecuado. Por ejemplo, las instrucciones pueden estar presentes en los kits como un prospecto o en la etiqueta del recipiente del kit o componentes del mismo. En otras realizaciones, las instrucciones están presentes como un archivo de datos de almacenamiento electrónico presente en un medio de almacenamiento legible por ordenador adecuado, tal como un CD-ROM, un disquete o una memoria USB. En otras realizaciones, las instrucciones reales no están presentes en el kit, pero se proporcionan medios para obtener las instrucciones de una fuente remota, tal como a través de internet. Un ejemplo de esta realización es un kit que incluye una dirección web donde pueden verse las instrucciones y/o de la que pueden descargarse las instrucciones. Como con las instrucciones, este medio para obtener las instrucciones se registra en un sustrato adecuado.

EjemplosEjemplo 1. Preparación 1 - Preparación de la fórmula III.

Se añadió 4-aminofenilacetato de etilo (3,67 g, 20,45 mmol) a un vial de microondas de 20 ml junto con 4-bromo-1-fluoro-2-nitrobenzoceno (3,00 g, 13,64 mmol) y DMA (10 ml). Se selló la mezcla de reacción y se situó bajo irradiación microondas durante 30 minutos a 160°C. Se añadió agua a la mezcla de reacción bruta y se extrajo el producto con EtOAc. Se lavó el extracto orgánico con salmuera 1x, con agua acidificada (pH ~4) 2x y con salmuera 2x. Se recogió la fase orgánica, luego se secó con MgSO₄. Se purificó el producto bruto concentrado utilizando cromatografía ultrarrápida con hexanos/EtOAc para proporcionar 2-(4-((4-bromo-2-nitrofenil)amino)fenil)acetato de etilo 3 como un aceite de color rojo sangre (4,2 g, 81%). ESMS *m/z* 379 (M+H)⁺. La estructura de 2-(4-((4-bromo-2-nitrofenil)amino)fenil)acetato de etilo (fórmula III) se representa a continuación:

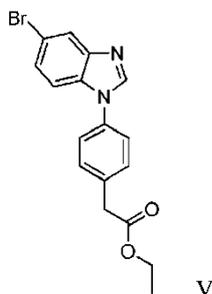
Ejemplo 2. Preparación 2 - Preparación de la fórmula IV.

Se situó 2-(4-((4-bromo-2-nitrofenil)amino)fenil)acetato de etilo (2,026 g, 5,34 mmol) en un matraz de fondo redondo de 100 ml. Se añadieron EtOH (20 ml) y zinc (3,49 g, 53,4 mmol) al matraz, y luego se enfrió la mezcla de reacción en un baño de hielo. Se diluyó ácido acético (2,246 g, 37,4 mmol) con EtOH (10 ml), y luego se añadió gota a gota a la mezcla de reacción a lo largo de 1 h. Se agitó la mezcla de reacción a 0°C durante 5 h, luego se filtró y se evaporó el EtOH. Se basificó la mezcla de reacción con NaHCO₃ acuoso y se extrajo el producto con dietil éter. Se lavó la mezcla de reacción 3x con NaHCO₃ acuoso y se recogió la fase orgánica. Se secó la fase orgánica con MgSO₄, y se evaporó el disolvente para producir 2-(4-((2-amino-4-bromofenil)amino)fenil)acetato de etilo 4 como un sólido de color púrpura claro (1,834 g, 98%). ESMS *m/z* 349 (M+H)⁺. La estructura de 2-(4-((2-amino-4-bromofenil)amino)fenil)acetato de etilo (fórmula IV) se muestra a continuación:



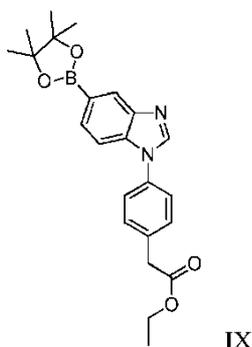
Ejemplo 3. Preparación 3 - Preparación de la fórmula V.

- 5 Se situó 2-(4-((2-amino-4-bromofenil)amino)fenil)acetato de etilo (2 g, 5,73 mmol), tal como se preparó anteriormente, en un matraz de fondo redondo de 50 ml. Se añadió TMOF (15 ml) al matraz, seguido por *p*TSA (0,109 g, 0,573 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a TA durante 3 h. Se evaporó el disolvente en exceso y se lavó la mezcla de reacción con NaHCO₃ acuoso. Se extrajo el producto con éter y se lavó la fase orgánica 2x con NaHCO₃ acuoso y 1x con salmuera. Se recogió la fase orgánica, se secó y se condensó para producir 2-(4-(5-bromo-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo 5 como un sólido marrón (2,04 g, 99%). ESMS *m/z* 359 (M+H)⁺.
 10 La estructura de 2-(4-(5-bromo-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo (fórmula V) se muestra a continuación:



15 Ejemplo 4. Preparación 4 - Preparación de la fórmula IX.

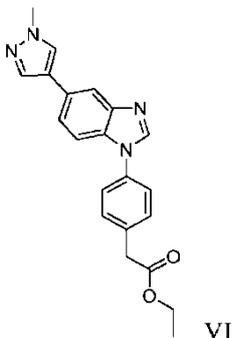
- Se disolvieron 2-(4-(5-bromo-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo (4 g, 11,14 mmol), bis(pinacolato)diboro (8,48 g, 33,4 mmol) y KOAc (3,28 g, 33,4 mmol) en dioxano (100 ml). Se desgasificó la mezcla de reacción con N₂ durante 10 min, y se añadieron Pd₂(dba)₃ (0,102 g, 0,111 mmol) y P(Cy)₃ (0,094 g, 334 mmol). Se selló el tubo y se calentó a presión de N₂ positiva a 85°C durante 12 h o hasta que se consumiera todo el material de partida basándose en CCF y CL-EM. Se evaporó el disolvente y se absorbió el producto sobre sílice. Se purificó el compuesto con cromatografía ultrarrápida para producir el compuesto 2-(4-(5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo 9 (4,09 g, 86%). ESMS *m/z* 407 (M+H)⁺. La estructura de 2-(4-(5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo (fórmula IX) se muestra a continuación:
 20
 25



30 Ejemplo 5. Preparación 5 - Preparación de la fórmula VI.

- Se situó 2-(4-((2-amino-4-bromofenil)amino)fenil)acetato de etilo (800 mg, 2,227 mmol) en un vial de microondas de CEM de 30 ml junto con DMF/agua 4:1 (20 ml). Se añadió al vial éster de pinacol del ácido 1-metilpirazol-4-borónico (556 mg, 2,67 mmol) junto con Na₂CO₃ (1,168 mg, 11,14 mmol). Se desgasificó el recipiente de reacción durante 10 min con N₂, seguido por la adición de Pd(dppf)Cl₂ (91 mg, 0,111 mmol). Se calentó la mezcla de reacción con un reactor de microondas a 130°C durante 20 min, y se evaporó el disolvente. Se absorbió el residuo de reacción sobre sílice y se purificó el producto con cromatografía ultrarrápida para producir el compuesto 2-(4-(5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo 6 como un sólido marrón (1,04 g, 99%). ESMS *m/z* 371 (M+H)⁺. La estructura de 2-(4-(5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo (fórmula VI) se muestra a continuación:
 35

4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo 6 (365 mg, 45,5%). ESMS m/z 361(M+H)⁺. La estructura de 2-(4-(5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo (fórmula VI) se muestra a continuación:

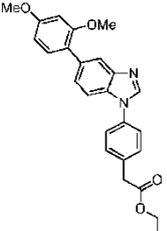
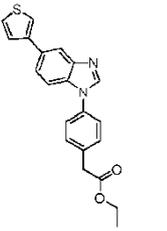
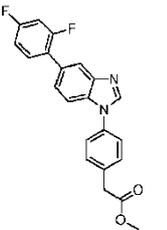
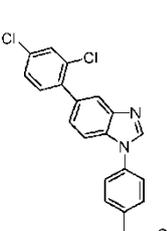
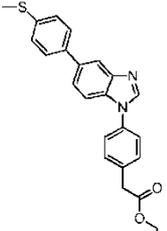


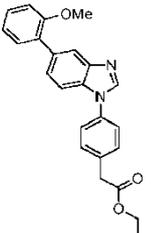
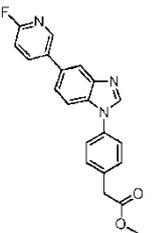
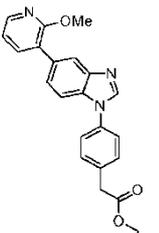
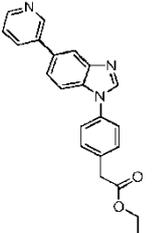
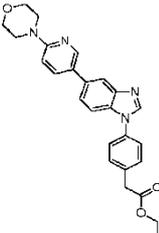
5

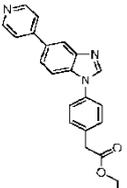
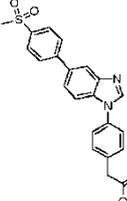
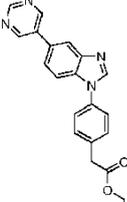
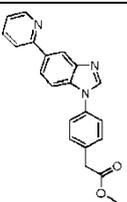
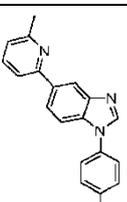
Utilizando el procedimiento de acoplamiento de Suzuki tal como se describió en la preparación 5 anterior, se obtienen los productos intermedios representados en la siguiente tabla 1:

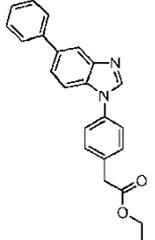
Tabla 1

Preparación	Producto	Material de partida A	Material de partida B	Datos físicos
5a	 2-(4-(5-(1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo	Preparación 3	ácido (1H-pirazol-4-il)borónico	MS ES ⁺ m/z 347 (M+1)
5b	 2-(4-(5-(2,3-dimetilfenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo	Preparación 3	ácido (2,3-dimetilfenil)borónico	MS ES ⁺ m/z 385 (M+1)
5c	 2-(4-(5-(2-fluoropiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo	Preparación 3	2-fluoro-3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)piridina	MS ES ⁺ m/z 376 (M+1)

<p>5d</p>	 <p>2-(4-(5-(2,4-dimetoxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo</p>	<p>Preparación 3</p>	<p>ácido (2,4-dimetoxifenil)borónico</p>	<p>MS ES⁺ m/z 417 (M+1)</p>
<p>5e</p>	 <p>2-(4-(5-(tiofen-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo</p>	<p>Preparación 3</p>	<p>ácido tiofen-3-ilborónico</p>	<p>MS ES⁺ m/z 363 (M+1)</p>
<p>5f</p>	 <p>2-(4-(5-(2,4-difluorofenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo</p>	<p>Preparación 3</p>	<p>ácido (2,4-difluorofenil)borónico</p>	<p>MS ES⁺ m/z 393 (M+1)</p>
<p>5g</p>	 <p>2-(4-(5-(2,4-diclorofenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo</p>	<p>Preparación 3</p>	<p>ácido (2,4-diclorofenil)borónico</p>	<p>MS ES⁺ m/z 426 (M+1)</p>
<p>5h</p>	 <p>2-(4-(5-(4(metiltio)fenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo</p>	<p>Preparación 3</p>	<p>ácido (4-(metiltio)fenil)borónico</p>	<p>MS ES⁺ m/z 403 (M+1)</p>

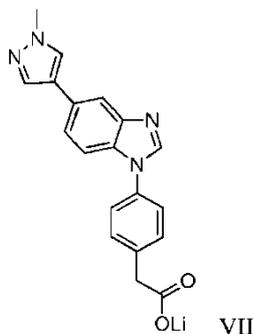
5i	 <p>2-(4-(5-(2-metoxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo</p>	Preparación 3	ácido (2-metoxifenil)borónico	MS ES ⁺ m/z 387 (M+1)
5j	 <p>2-(4-(5-(6-fluoropiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo</p>	Preparación 3	ácido (6-fluoropiridin-3-il)borónico	MS ES ⁺ m/z 376 (M+1)
5k	 <p>2-(4-(5-(2-metoxipiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo</p>	Preparación 3	ácido (2-metoxipiridin-3-il)borónico	MS ES ⁺ m/z 376 (M+1)
5l	 <p>2-(4-(5-(piridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo</p>	Preparación 3	ácido piridin-3-ilborónico	MS ES ⁺ m/z 358 (M+1)
5m	 <p>2-(4-(5-(6-morfolinopiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo</p>	Preparación 3	ácido (6-morfolinopiridin-3-il)borónico	MS ES ⁺ m/z 443 (M+1)

5n	 <p>2-(4-(5-(piridin-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo</p>	Preparación 3	ácido piridin-4-ilborónico	MS ES ⁺ m/z 358 (M+1)
5o	 <p>1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)-(metilsulfonyl)fenil)-acetato de etilo</p>	Preparación 3	ácido (4-(metilsulfonyl)fenil)borónico	MS ES ⁺ m/z 435 (M+1)
5p	 <p>2-(4-(5-(pirimidin-5-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo</p>	Preparación 3	ácido pirimidin-5-ilborónico	MS ES ⁺ m/z 359 (M+1)
5q	 <p>2-(4-(5-(piridin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo</p>	Preparación 4	2-bromopiridina	MS ES ⁺ m/z 358 (M+1)
5r	 <p>2-(4-(5-(6-metilpiridin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo</p>	Preparación 4	2-bromo-6-metilpiridina	MS ES ⁺ m/z 372 (M+1)

5s	 <p>2-(4-(5-fenil-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo</p>	Preparación 4	yodobenceno	MS ES ⁺ m/z 357 (M+1)
----	--	---------------	-------------	-------------------------------------

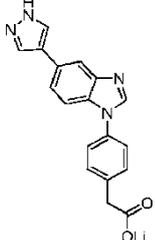
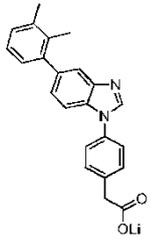
Ejemplo 6. Preparación 6 - Preparación de la fórmula VII.

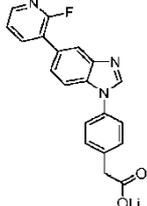
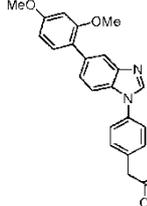
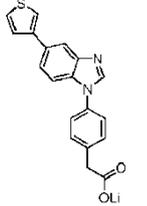
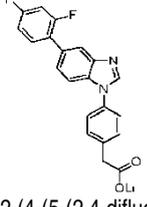
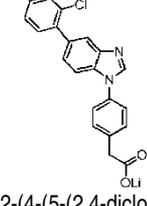
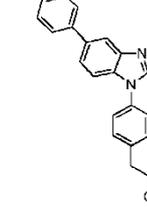
- 5 Se añadió LiOH (72,5 mg, 3,03 mmol) a un vial de microondas de CEM de 30 ml junto con H₂O (4 ml). Se disolvió 2-(4-(5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de etilo (365,3 mg, 1,014 mmol) en THF (4 ml) y se transfirió al vial de microondas. Se calentó la mezcla de reacción en un microondas a 100°C durante 10 min, se verificó la finalización de la hidrólisis mediante CCF y CL-EM, y se evaporó todo el disolvente. Se reconstituyó la mezcla de reacción en H₂O y se lavó una vez con DCM. Luego se condensó la fase acuosa para producir el compuesto 2-(4-(5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio 7 (302 mg, 90%). ESMS *m/z* 331 (M-Li)⁻¹. La estructura de 2-(4-(5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio (fórmula VII) se muestra a continuación:
- 10

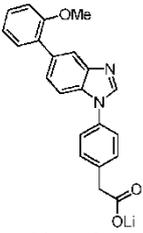
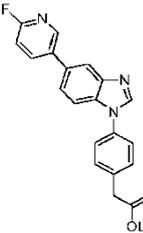
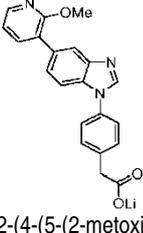
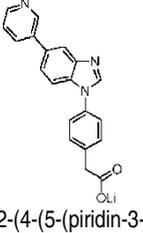
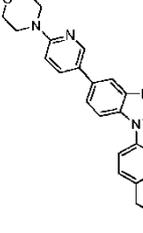
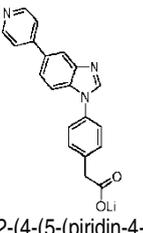


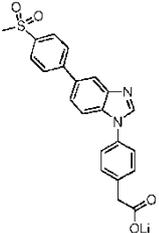
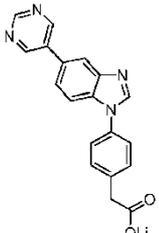
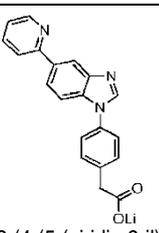
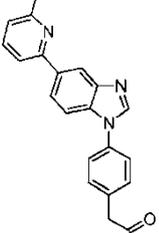
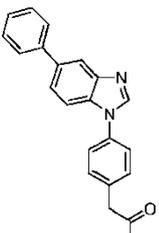
- 15 Utilizando el procedimiento de hidrólisis tal como se describió en la preparación 6 anterior, se obtienen los productos intermedios enumerados en la siguiente tabla 2:

Tabla 2

Preparación	Producto	Material de partida A	Condición de reacción	Datos físicos
6a	 <p>2-(4-(5-(1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio</p>	Preparación 5a		MS ES/ <i>m/z</i> 317 (M-Li)
6b	 <p>2-(4-(5-(2,3-dimetilfenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio</p>	Preparación 5b		MS ES/ <i>m/z</i> 355 (M-Li)

6c	 <p>2-(4-(5-(2-fluoropiridin-3-yl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)fenil)acetato de litio</p>	Preparación 5c		MS ES-m/z 346 (M-Li)
6d	 <p>2-(4-(5-(2,4-dimetoxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)fenil)acetato de litio</p>	Preparación 5d		MS ES-m/z 387 (M-Li)
6e	 <p>2-(4-(5-(tiofen-3-yl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)fenil)acetato de litio</p>	Preparación 5e		MS ES-m/z 333 (M-Li)
6f	 <p>2-(4-(5-(2,4-difluorofenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)fenil)acetato de litio</p>	Preparación 5f		MS ES-m/z 363 (M-Li)
6g	 <p>2-(4-(5-(2,4-diclorofenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)fenil)acetato de litio</p>	Preparación 5g		MS ES-m/z 395 (M-Li)
6h	 <p>2-(4-(5-(4(metil)fenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)fenil)acetato de litio</p>	Preparación 5h		MS ES-m/z 373 (M-Li)

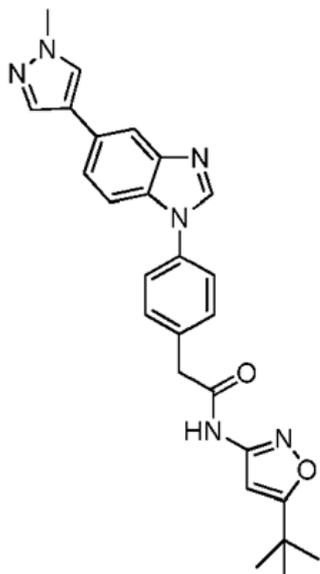
6i	 <p>2-(4-(5-(2-metoxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio</p>	Preparación 5i		MS ES-m/z 357 (M-Li)
6j	 <p>2-(4-(5-(6-fluoropiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio</p>	Preparación 5j		MS ES-m/z 346 (M-Li)
6k	 <p>2-(4-(5-(2-metoxipiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio</p>	Preparación 5k		MS ES-m/z 358 (M-Li)
6l	 <p>2-(4-(5-(piridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio</p>	Preparación 5l		MS ES-m/z 328 (M-Li)
6m	 <p>2-(4-(5-(6-morfolinopiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio</p>	Preparación 5m		MS ES-m/z 413 (M-Li)
6n	 <p>2-(4-(5-(piridin-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio</p>	Preparación 5n		MS ES-m/z 328 (M-Li)

6o	 <p>2-(4-(5-(4-(metilsulfonil)fenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio</p>	Preparación 5o		MS ES-m/z 405 (M-Li)
6p	 <p>2-(4-(5-(pirimidin-5-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio</p>	Preparación 5p		MS ES-m/z 329 (M-Li)
6q	 <p>2-(4-(5-(piridin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio</p>	Preparación 5q		MS ES-m/z 328 (M-Li)
6r	 <p>2-(4-(5-(6-metilpiridin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio</p>	Preparación 5r		MS ES-m/z 342 (M-Li)
6s	 <p>2-(4-(5-fenil-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio</p>	Preparación 5s		MS ES-m/z 327 (M-Li)

Ejemplo 7 - Preparación de la fórmula VIII.

- 5 Se añadieron 2-(4-(5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetato de litio (600 mg, 1,805 mmol), EDC (700 mg, 4,51 mmol), HOAt (246 mg, 1,805 mmol), DIPEA (0,377 ml, 2,166 mmol) y 5-(*terc*-butil)isoxazol-3-amina (380 mg, 2,71 mmol) a un matraz de fondo redondo de 100 ml. Luego, se añadió DMF (15 ml) a la mezcla de reacción y se selló el matraz a presión de nitrógeno positiva y se agitó durante 12 h a TA (~20-25°C). Al punto de tiempo de 12 h, se verificó que todo el material de partida se había consumido mediante CCF y CL-EM, y se purificó la mezcla de reacción con cromatografía ultrarrápida. Se recogió el pico de producto y se condensó para producir *N*-

(5-(*tert*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida 8 (589,2 mg, 71,8%). ESMS m/z 455 (M+H)⁺. La estructura de *N*-(5-(*tert*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida (compuesto 1: un compuesto de fórmula VIII) se muestra a continuación:



Compuesto 1 - un compuesto de fórmula VIII

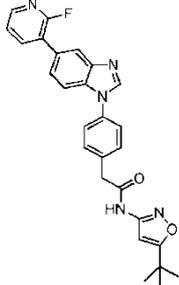
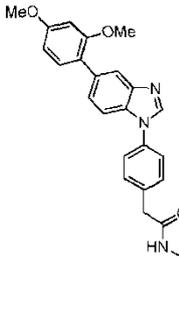
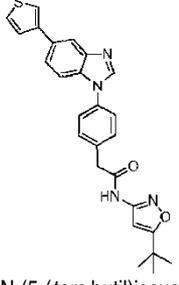
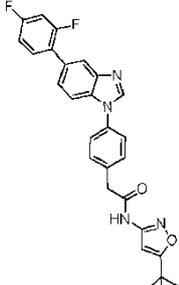
5

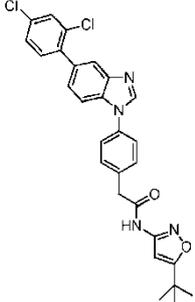
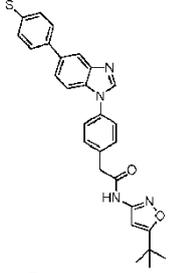
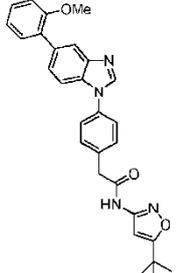
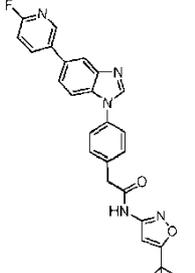
Utilizando el procedimiento de condensación tal como se describió en el ejemplo 1 anterior, se obtienen los productos intermedios enumerados en la siguiente tabla 3:

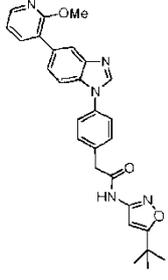
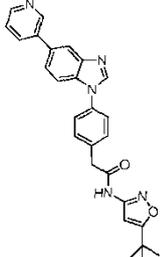
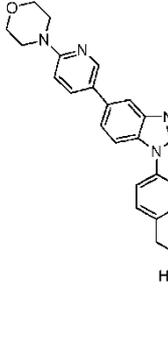
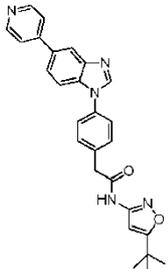
10

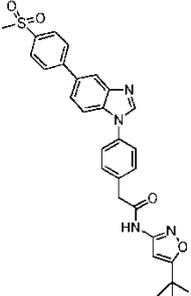
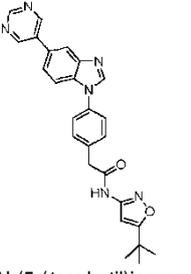
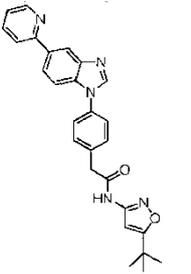
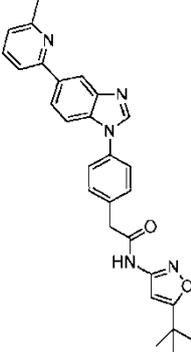
Tabla 3

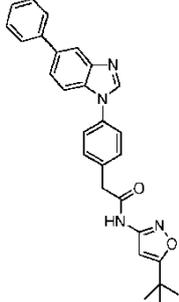
Preparación	producto	Material de partida A	Condición de reacción	Datos físicos
2	 2-(4-(5-(1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)-N-(5-(<i>tert</i> -butil)isoxazol-3-il)acetamida	Preparación 6a		MS ES ⁺ m/z 441 (M+1)
3	 N-(5-(<i>tert</i> -butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(2,3-dimetilfenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida	Preparación 6b		MS ES ⁺ m/z 479 (M+1)

4	 <p>N-(5-(<i>tert</i>-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(2-fluoropiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida</p>	Preparación 6c		MS ES ⁺ m/z 470 (M+1)
5	 <p>N-(5-(<i>tert</i>-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(2,4-dimetoxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida</p>	Preparación 6d		MS ES ⁺ m/z 511 (M+1)
6	 <p>N-(5-(<i>tert</i>-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(tiofen-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida</p>	Preparación 6e		MS ES ⁺ m/z 457 (M+1)
7	 <p>N-(5-(<i>tert</i>-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(2,4-difluorofenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida</p>	Preparación 6f		MS ES ⁺ m/z 487 (M+1)

8	 <p>N-(5-(<i>tert</i>-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(2,4-diclorofenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida</p>	Preparación 6g		MS ES ⁺ m/z 517 (M+1)
9	 <p>N-(5-(<i>tert</i>-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(4-metilfenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida</p>	Preparación 6h		MS ES ⁺ m/z 497 (M+1)
10	 <p>N-(5-(<i>tert</i>-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(2-metoxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida</p>	Preparación 6i		MS ES ⁺ m/z 481 (M+1)
11	 <p>N-(5-(<i>tert</i>-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(6-fluoropiridin-3-yl)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida</p>	Preparación 6j		MS ES ⁺ m/z 470 (M+1)

12	 <p>N-(5-(<i>tert</i>-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(2-metoxipiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida</p>	Preparación 6k		MS ES ⁺ m/z 482 (M+1)
13	 <p>N-(5-(<i>tert</i>-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(piridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida</p>	Preparación 6l		MS ES ⁺ m/z 452 (M+1)
14	 <p>N-(5-(<i>tert</i>-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(6-morfolinopiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida</p>	Preparación 6m		MS ES ⁺ m/z 537 (M+1)
15	 <p>N-(5-(<i>tert</i>-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(piridin-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida</p>	Preparación 6n		MS ES ⁺ m/z 452 (M+1)

16	 <p>N-(5-(<i>tert</i>-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(4-(metilsulfonyl)fenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida</p>	Preparación 6o		MS ES ⁺ m/z 529 (M+1)
17	 <p>N-(5-(<i>tert</i>-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(pirimidin-5-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida</p>	Preparación 6p		MS ES ⁺ m/z 453 (M+1)
18	 <p>N-(5-(<i>tert</i>-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(piridin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida</p>	Preparación 6q		MS ES ⁺ m/z 454 (M+1)
19	 <p>N-(5-(<i>tert</i>-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(6-metilpiridin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida</p>	Preparación 6r		MS ES ⁺ m/z 468 (M+1)

20	 <p data-bbox="323 584 718 638">N-(5-(<i>tert</i>-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-fenil-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida</p>	Preparación 6s		MS ES ⁺ m/z 451 (M+1)
----	--	----------------	--	----------------------------------

Ejemplo 8 - Descubrimiento de un inhibidor dual de cinasa del RET y del VEGFR2.

Establecimiento de un modelo de unión computacional RET y VEGFR2

5 Se ha cristalizado el dominio tirosina cinasa del protooncogén RET con pirazolopirimidina PP1 y 4-anilinoquinazolina ZD6474 (vandetanib). Estos compuestos son inhibidores de tipo I de proteína cinasas y se ha demostrado que se unen a la RET cinasa en la conformación DFG-in. Se determinó cinéticamente la estructura para unir la RET cinasa en la conformación DFG-out (tipo II) a través de un estudio basado en incubación. Se generó un modelo para RET cinasa DFG-out al eliminar los residuos de SER774 a GLN781 en la parte posterior del bolsillo alostérico de la estructura del cristal de ZD6474/RET. Se utilizó este modelo RET cinasa DFG-out refinado para acoplamiento molecular. Se utilizaron Discovery Studio 3.5 Visualizer, AutoDock Vina y AutoDock Tools para el modelado molecular de inhibidores potenciales de moléculas pequeñas. Se confirmó que el modelo DFG-out predecía de manera precisa los modos de unión de inhibidores de tipo II.

Descubrimiento y desarrollo de fármacos

Se establecieron ensayos de detección adecuados para inhibidores de cinasas del RET y del VEGFR2 de moléculas pequeñas (a partir de una biblioteca de fragmentos dirigidos a cinasa (KDF)). El ensayo de RET cinasa utiliza un dispositivo EZ Reader Electrophoresis Mobility Chip Instrument (Caliper Life Science). En el ensayo, se preincuba enzima RET recombinante 2 nM (Invitrogen) con un inhibidor de moléculas pequeñas o un tampón de control durante 30 min para permitir que el inhibidor cinasa de tipo II atrape la conformación DFG-out a la cual se unen los inhibidores. Esta clase de inhibidores es competitiva de manera indirecta con ATP, y una cinética de unión lenta (baja k_d) permite a los inhibidores mostrarse no competitivos y pseudo-irreversibles en la naturaleza. Debido a la naturaleza no competitiva de estos inhibidores, se incorporó una concentración biológicamente más relevante de sustrato de ATP (200 μ M) en este ensayo. Después de 30 min de preincubación, se añadió una mezcla de sustrato que contenía 200 μ M de ATP, 20 mM de $MgCl_2$ y 1,5 μ M de péptido de sustrato de RET marcado de manera fluorescente (Caliper LS, péptido 22; Perkin Elmer, EE.UU.). Luego se determinó el nivel de conversión del péptido de sustrato de RET utilizando el dispositivo EZ Reader Instrument. De manera similar, también se han establecido ensayos de VEGFR2 y RET/V804M cinasas utilizando el mismo sustrato de péptido.

Dado que los sitios activos para ATP de RET y VEGFR2 son altamente homólogos, se centró ante todo la detección y la optimización sobre RET. Se midió la actividad de VEGFR2 solo en inhibidores de RET potentes para determinar la selectividad. Se identificó un análogo de imidazol a través de un fragmento (y/o estructura de privilegio, peso molecular: menos de 300), detección que utilizó una concentración de ATP de 200 μ M para evitar unión no específica y falsos positivos. El modelado de homología de RET cinasa con la conocida estructura cristalina de VEGFR-2 determinó que el bolsillo de DFG de la RET cinasa sería fácilmente accesible con una adición de un grupo lipófilo tal como un grupo *meta*-trifluorometilfenilo. La combinación de la información de la relación estructura-actividad (SAR) y la optimización adicional de sustituciones tanto en el bolsillo de DFG como en la posición 5 del benzimidazol proporcionaron el candidato clínico, Pz-1 (N-(5-(*tert*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-benzod[imidazol-1-il]fenil)acetamida, con actividad en el ensayo bioquímico y un Cl_{50} de menos de 1 nM para RET de tipo salvaje, mutante guardián de RETV804M, y también para VEGFR2. La potencia exacta de Pz-1 estaba más allá del límite medible del ensayo bioquímico.

Se determinó la actividad de pRET y pVEGFR2 en ensayos basados en células, y se inhibieron ambos fosfobiomarcadores de manera equipotente por Pz-1. La actividad para la inhibición de la auto-fosforilación de RET (en la línea celular TT) y de la auto-fosforilación de VEGFR2 (en la línea celular HEK293), mostrada en la figura 3 y la figura 4, respectivamente, indicaron una correlación fuerte con los ensayos bioquímicos de RET y de VEGFR2. El candidato clínico Pz-1 inhibió en el 90% la auto-fosforilación de RET y de VEGFR2 a concentraciones nanomolares en todas las líneas celulares y mutaciones sometidas a prueba (figuras 1-4).

Mecanismo de acción y selectividad de cinasa global

Pz-1 resultó excepcionalmente potente en RET, y en todos los mutantes de RET sometidos a prueba incluyendo los mutantes guardianes RET/V804M a menos de 1 nM (figuras 1-3). El ensayo bioquímico de RET descrito en el presente documento no resultó adecuado para determinar la actividad de inhibidores que tenían un CI_{50} de menos de 1 nM, ya que la concentración de la enzima de RET en el ensayo fue de 2 nM. Por tanto, se utilizó un compuesto intermedio para los estudios cinéticos. La prolongación del tiempo de incubación desde 5 min hasta 20 min ó 60 min resultó en un incremento de tres veces de la CI_{50} (de 100 nM a 30 nM), indicando un cambio conformacional de la DFG-in a la DFG-out, la característica común de un inhibidor de cinasa de tipo II. Se detectó Pz-1 a la concentración de 50 nM contra 91 cinasas en KINOMEScan, representando una diversidad de cada agrupación de cinoma. Los ensayos de cinasas en KINOMEScan fueron más sensibles que los ensayos bioquímicos descritos anteriormente. Aunque hay cinco cinasas (TRKB, TRKC, GKA, FYN y SRC) activas con ~90% de inhibición, Pz-1 fue aún más significativamente selectivo contra estas cinasas basándose en los datos celulares potentes (fuerte inhibición de pRET a 1 nM), indicando una buena selectividad para cinoma global.

15 *Inhibición de la actividad de pRET y de pVEGFR2 por Pz-1 en ensayos basados en células*

Se midió la inhibición de la auto-fosforilación de RET por Pz-1 en muchas líneas celulares diferentes incluyendo fibroblastos NIH3T3 que expresan RET/C634Y o RET/M918T, TT que expresan RET/C634W (CMT), Nthy-ory-3-1 (tiroides, o transformado con RET; control negativo), HEK293/RET/PTC1 (CCDC6-RET que puede encontrarse en PTC y cáncer de pulmón), HEK293/RET-KIF5B (que puede encontrarse en cáncer de pulmón), HEK293/RET/PTC3 (NCOA4-RET, que puede encontrarse en PTC y cáncer de pulmón), y HEK293 transfectado con RET/C634R-V804M (figuras 1-3). Se transfectaron las células HEK293 de manera transitoria con vectores de expresión que comprenden el mutante deseado. Tras 36 h después de la transfección, se privaron de suero a las células durante 12 h y luego se trataron durante 2 h con Pz-1 a las concentraciones indicadas, se sometieron a inmunotransferencia a los lisados celulares totales con anticuerpos RET anti-fosfo-Y1062 (α p1062) y anti-fosfo-Y905 (α p905). Se normalizaron las inmunotransferencias utilizando anticuerpo anti-RET (α RET). A 1 nM, Pz-1 inhibió fuertemente a pRET en todas las líneas celulares (figuras 1-3), incluyendo las células que expresan RET/C634R-V804M. Pz-1 a 1 nM también inhibió fuertemente la auto-fosforilación de VEGFR2 en células HEK 293 transfectadas de manera transitoria con VEGFR2 y estimuladas con VEGF (figura 4). pMAPK es un marcador aguas abajo para muchas vías y señales cinasa a través de la vía RAS/MEK/ERK. En las células TT que albergan mutantes de RET (figura 3), tanto pMAPK como pRET se inhibieron fuertemente de manera similar a 1 nM. Por el contrario, en una línea celular tiroidea (Nthy-ory-3-1, no transformada con RET oncogénico), pMAPK se inhibió solo a 100 nM (figura 3), confirmando selectividad para cinoma global de Pz-1.

35 *Efectos antiproliferativos de Pz-1 en líneas celulares de cáncer impulsadas por RET*

Se sembraron Nthy-ory-3-1 y células TT en placas de 60 mm. Se almacenaron las células en suero de ternero fetal al 2% (Nthy-ori-3-1) o al 10% (TT). Un día después de sembrar en placa, se añadieron diferentes concentraciones de Pz-1 o de vehículo al medio y se cambiaron cada 2-3 días. Se contaron las células cada 2-3 días. Las células Ba/F3 dependen de IL3 para la proliferación y pierden dicha dependencia cuando expresan una cinasa activa de manera constitutiva tal como RET. Se almacenaron las células parentales y las Ba/F3 que expresan RET/PTC en suero de ternero fetal al 10% en 6-multipocillos y se contaron cada día durante 4 días consecutivos, cambiando los medios cada 2 días. Para comparar el crecimiento celular, se realizaron pruebas de la t de Student para datos independientes utilizando el programa de software Instat (Graphpad Software Inc). Todos los valores de p fueron de dos lados. Se calcularon las dosis CI_{50} a través de un análisis de ajuste de curvas a partir de curvas del último día de crecimiento utilizando el programa de software PRISM (Graphpad Software Inc). Pz-1 inhibió la proliferación de células de cáncer impulsada por RET con una CI_{50} de 1,86 nM para células TT (figura 5), 907 pM para células LC-2/ad (figura 5), y 340 pM para las células Ba/F3 transfectadas por RET/PTC3 (figura 6). Pz-1 hasta 1000 nM no redujo de manera significativa el crecimiento de fibroblastos de NIH3T3 parentales cuando se usaron durante 3 días, confirmando su selectividad.

Determinación de la inhibición de la diana in vivo (IVTI) de pRET y pVEGFR2, y eficacia

Modelo.

Se inocularon células TT ($7,5 \times 10^6$ /ratón) de manera subcutánea en porciones dorsales (ambos lados) de 39 ratones SCID (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine). Después de 5 semanas, al menos un tumor estaba presente en cada ratón; los animales portadores de tumor se asignaron de manera aleatoria para recibir Pz-1 (0,3, 1,0 ó 3,0 mg/kg, diariamente) (29 ratones, 52 tumores) o vehículo (10 ratones, 18 tumores) mediante alimentación por sonda oral. Se administró el tratamiento durante 28 días consecutivos. Se midieron los diámetros del tumor con calibres cada semana. Se calcularon los volúmenes del tumor (V) mediante la fórmula elipsoide rotacional: $V = A \times B^2/2$ (A=diámetro axial; B=diámetro rotacional) y se informaron como volúmenes promedio \pm desviaciones estándar. Pz-1 inhibió fuertemente el crecimiento del tumor a todas las dosis sometidas a prueba (figura 7). Se evaluó también la actividad antitumorígena de Pz-1 en ratones desnudos implantados con fibroblastos NIH3T3 transformados por RET/C634Y o HRAS(G12V). En este caso, se inocularon de manera subcutánea las células NIH3T3 RET/C634Y o NIH3T3 HRAS/G12V en la porción dorsal (ambos lados) de ratones BALB/c nu/nu (n. 31 ratones/línea celular)

(Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine). Después de 4 días, antes de que hubieran aparecido los tumores, se asignaron los animales de manera aleatoria para recibir Pz-1 (1,0, 3,0 ó 10 mg/kg diariamente) (23 ratones/línea celular: 8 ratones/grupo para 1,0 y 3,0 mg/kg de dosis diarias y 7 ratones para 10 mg/kg de dosis diarias) o vehículo de control (8 ratones) mediante alimentación por sonda oral. Se midieron los diámetros de los tumores con calibres cada 1-2 días. Se calcularon los volúmenes del tumor (V) mediante la fórmula elipsoide rotacional: $V = A \times B^2/2$ (A=diámetro axial; B=diámetro rotacional) se informaron como volúmenes promedio \pm desviaciones estándar. Mientras que el tratamiento previno totalmente la formación de tumores inducidos por células RET, sólo redujo, pero no suprimió, la formación de tumores impulsados por el oncogén HRAS (figura 8).

Algunos de los tumores tratados con el vehículo, al final del experimento de crecimiento del tumor informado en la figura 8, se trataron durante 48 h con diferentes dosis de Pz-1 (1,0 ó 3,0 mg/kg diariamente) o se dejaron sin tratar. Al final del tratamiento, se sometieron a inmunotransferencia los lisados de proteína con anticuerpos RET anti-fosfo-Y1062 (α p1062) y anti-fosfo-905 (α p905), anticuerpos anti-fosfo-MAPK (α pMAPK, T302/Y304), anti-fosfo-SHC (α pSHC, Y317), anti-fosfo-p70S6K (α p70S6K, T389), anti-fosfo-S6RP (α pS6RP, S235/S236) y anti-fosfo-VEGFR2 (α pVEGFR2, pY1175). El tratamiento con Pz-1 inhibió pVEGFR2 en tumores inducidos tanto por RET/C634Y como por HRAS/G12V, e inhibió la señalización intracelular y fosforilación de RET (SHC, MAPK, p70S6K y S6RP) solo en tumores inducidos por RET/C634Y (figura 9).

Formulación preclínica, PK, PD, y toxicología para Pz-1

Para los estudios PK de Pz-1 en animales, se creó una formulación de disolución para administración oral en 500 μ l de polisorbato 80, 500 μ l de EtOH y 1,0 ml de tampón a pH 2. Para los estudios de toxicidad, se desarrolló una formulación de suspensión en tween 20 (20%) y goma de xantano (0,125%).

Pz-1 tuvo una AUC de 6,5 μ g/h/ml (formulación de disolución) y una semivida de eliminación de 3,8 h a 2 mg/kg en ratones. En un estudio de PK oral en ratas, Pz-1 mostró una alta biodisponibilidad del 97% con una AUC de 19 μ g/h/ml a 10 mg/kg (oral) y una AUC de 1,9 μ g/h/ml a 1 mg/kg (IV). La semivida de eliminación en el estudio oral fue de 4,2 h con un espacio a 9 ml/min/kg y una distribución de volumen de 2,02 l/kg. La $T_{1/2}$ (3-4 h) en ratas estuvo en línea con la $T_{1/2}$ en ratones (4,2 h).

In vitro, Pz-1 es antiproliferativo en líneas celulares TT de CMT que albergan RET^{C134W} a una CI_{50} de 1,86 nM y en células Ba/F3 transfectadas con RET oncogénico (RET/PTC3) a una CI_{50} de 0,34 nM. Pz-1 era activo de manera mínima en el ensayo hERG de registro electrofisiológico de fijación de voltaje, con una CI_{50} para el ensayo hERG de 10 μ M (GenScript). La selectividad para RET con respecto a hERG es de 10.000 veces, lo que demuestra un perfil de toxicidad cardiovascular limpio. Pz-1 es activo de manera mínima tanto en CYP 2D6, con una CI_{50} de 13,8 μ M, como en CYP 3A4, con una CI_{50} de 7,4 μ M, indicando que no hubo problemas de interacción fármaco-fármaco con los dos isoformas CYP principales.

En un estudio de toxicología de una semana de duración en ratones con un aumento de dosis diaria desde 10 mg/kg hasta 100 mg/kg en la formulación de suspensión, no hubo toxicidad significativa. El análisis patológico del órgano en corazón, riñón e hígado no mostró efectos adversos incluso a una dosis de 100 mg/kg. De manera similar, los marcadores de toxicidad que incluyen fósforo, creatinina, bilirrubina total, GGT, ALP, glucosa, proteína total, albúmina, globulina, calcio, colesterol y BUN no se impactaron a ninguna dosis. ALT, un marcador de toxicidad del hígado, aumentó de manera proporcional en suero sanguíneo desde 22 U/l a 10 mg/kg, hasta 51 U/l a 30 mg/kg, y hasta 96 U/l a 100 mg/kg. A la dosis más alta, la concentración de ALT fue ligeramente por encima del nivel normal de ALT de 80 U/l, pero por debajo del umbral de toxicidad de 200 U/l. Los niveles de ALT pueden monitorizarse fácilmente y pueden servir como un marcador de toxicidad reversible en la práctica clínica.

Ejemplo 9 - Métodos.

Ensayo bioquímico RET

El ensayo de RET cinasa utiliza un instrumento basado en microfluidos para la lectura de la actividad de cinasa directa (Caliper Life Science). En el ensayo, se preincubó enzima RET recombinante 1-2 nM (Invitrogen) con el inhibidor de molécula pequeña, o tampón de control, durante 30 min para permitir al inhibidor atrapar la conformación de DFG-out. Esta clase de inhibidores es competitiva de manera indirecta con ATP, y una cinética de unión lenta (k_{off} muy lenta) permite a los inhibidores aparecer no competitivos y pseudo-irreversibles en la naturaleza. Debido a la naturaleza no competitiva de estos inhibidores, se incorporó una concentración más biológicamente relevante de sustrato de ATP en este ensayo. Después de 30 min de preincubación, se añadió una mezcla de sustrato que contenía 180-200 μ M de ATP y 1,0-1,5 μ M de péptido de sustrato RET marcado de manera fluorescente (Caliper LS, péptido 22; Perkin Elmer, EEUU). Se determinó el nivel de conversión del péptido sustrato RET utilizando el instrumento EZ Reader. La concentración de funcionamiento final de componentes tampón fue como sigue: 50 mM de HEPES, Brij-35 al 0,075% (v/v), polisorbato 20 al 0,10% (v/v), NaN₃ al 0,02% (p/v), MgCl₂ 10 mM y DDT 2 mM. Todos los compuestos a modo de ejemplo mostraron dominio RET cinasa con un valor de $CI_{50} < 1$ μ M.

Ensayo bioquímico VEGFR2

5 El ensayo VEGFR-2 fue idéntico al ensayo RET excepto que se utilizó VEGFR-2 recombinante 1-2 nM en lugar de RET. Todos los compuestos a modo de ejemplo mostraron dominio cinasa del VEGFR2 con un valor de $CI_{50} < 1 \mu M$.

Ensayo bioquímico FLT3

10 El ensayo FLT3 fue el mismo que el ensayo RET excepto que se utilizó FLT3 recombinante 1-2 nM en lugar de RET. Además, se añadió 1,0-1,5 μM de péptido de sustrato de FLT3 marcado de manera fluorescente (Caliper LS, péptido 2; Perkin Elmer, EE.UU.) en lugar de péptido 22. Todos los compuestos a modo de ejemplo mostraron dominio del FLT3 con un valor de $CI_{50} < 1 \mu M$.

Ensayos de cultivo celular

15 Se cultivaron fibroblastos transformados por oncogenes RET en DMEM con suero de ternero al 5% (NIH3T3) o suero de ternero fetal al 10% (RAT1), L-glutamina 2 mM y 100 unidades/ml de penicilina-estreptomina (GIBCO, Paisley, PA). Se hicieron crecer células HEK 293 en DMEM complementado con suero de ternero fetal al 10%, L-glutamina 2 mM y 100 unidades/ml de penicilina-estreptomina (GIBCO, Paisley, PA). Se llevaron a cabo
20 transfecciones transitorias con vectores pcDNA-RET/C634R-V804M, pBABE-RET/PTC1 (CCDC6-RET), -RET/PTC3 (NCOA4-RET) o -KIF5B/RET con el reactivo lipofectamina según las instrucciones del fabricante (GIBCO). Los constructos de RET usados para transfectar fibroblastos y HEK 293 codificaron el isoformo corto de la proteína RET (RET-9). Se cultivaron células Ba/F3 y Ba/F3 parentales que expresan de manera estable RET/PTC3 en RPMI complementado con suero de ternero fetal al 10%, L-glutamina 2 mM y 100 unidades/ml de penicilina-estreptomina (GIBCO, Paisley, PA). Las células Ba/F3 que expresan de manera estable proteína RET/PTC3 se generaron al
25 transfectar el isoformo largo RET/PTC3 (RET-51) mediante electroporación. Las células parentales se hicieron crecer en presencia de 10 ng/ml de IL3. La línea celular Nthy-ori-3-1 (NTHY-ORI), derivada de tejido folicular tiroideo normal e inmortalizado por T grande del SV40, se hizo crecer en RPMI con suero de ternero fetal al 10%, L-glutamina 2 mM y 100 unidades/ml de penicilina-estreptomina. La línea celular TT, derivada de un CMT humano que alberga la mutación RET/C634W (Carlomagno, 1995), se cultivó en RPMI con suero de ternero fetal al 20%, L-glutamina 2 mM y 100 unidades/ml de penicilina-estreptomina (GIBCO, Paisley, PA).
30

Ensayos de inmunotransferencia y curva de crecimiento

35 Se prepararon los lisados de proteína según procedimientos convencionales. De manera breve, se lisaron las células en un tampón que contenía ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etanosulfónico 50 mM (HEPES; pH 7,5), Triton X-100 al 1% (vol/vol), NaCl 150 mM, EGTA 5 mM, NaF 50 mM, 50 mM de pirofosfato de sodio 50 mM, vanadato de sodio 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 2 mM y 1 $\mu g/ml$ de aprotinina. Se clarificaron los lisados mediante centrifugación a 10.000 Xg durante 15 min. Los lisados que contenían cantidades comparables de proteínas, estimadas mediante un ensayo Bradford modificado (Bio-Rad, Múnich, Alemania), se sometieron a transferencia de
40 tipo Western directa. Se detectaron los complejos inmunes con el kit de quimioluminiscencia potenciada (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfort, RU). Anti-fosfo-Shc (n.º Y317), que reconoce proteínas SHC cuando se fosforilan en Y317, era de Upstate Biotechnology Inc. (Lake Placid, NY). Anti-Shc (H-108) era de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-MAPK (n.º 9101) y anti-fosfo-MAPK (n.º 9102), específicos para p44/42MAPK (ERK1/2) fosforilados en Tr202/Tir204, eran de Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, EEUU). Anti-fosfo-VEGFR-2/KDR (n.º 2479), específico para VEGFR2/KDR fosforilado en Tir1175, y anti-VEGFR-2/KDR (n.º 2478) eran de Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, EEUU). La proteína ribosómica anti-fosfo-S6 (n.º 2211), específica para la proteína ribosómica S6 fosforilada en Ser235-236, la proteína ribosómica anti-S6 (n.º 2217), cinasa del anti-p70 S6 (p70S6K) (n.º 2708) y anti-fosfo p70 S6 cinasa (T389) (n.º 9234) eran de Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, EE.UU.). Anti-RET es un anticuerpo policlonal manifestado contra los fragmentos de proteína tirosina cinasa de RET humano (Santoro, 1995). Anti-fosfo905 es un anticuerpo policlonal fosfo-específico que reconoce proteínas RET fosforiladas en Y905. Anti-fosfo1062 es un anticuerpo policlonal fosfo-específico que reconoce proteínas RET fosforiladas en Y1062. Los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano eran de Santa Cruz Biotechnology.
50

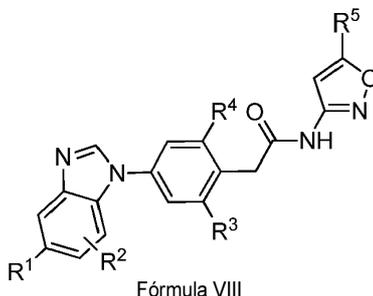
Valores de CI_{50}

60 Para estos ejemplos, se representaron gráficamente curvas de crecimiento dosis-respuesta y dosis CI_{50} utilizando el software PRISM de ajuste de curvas (software GraphPad). Se utilizó una prueba de la t de Student para datos independientes (programa InStat, software GraphPad) para comparar el crecimiento del tumor. Los valores de p fueron estadísticamente significativos a $p < 0.05$.

65 Se definen determinadas realizaciones de los compuestos y métodos dados a conocer en el presente documento en los ejemplos anteriores. Debe entenderse que estos ejemplos, aunque indican realizaciones particulares de la invención, se dan solo a modo de ilustración.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula VIII



5

en la que:

R¹ es arilo o heteroarilo no sustituido o sustituido (con R⁶);

10

R² se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo (C₁-C₃), halo, -CN, -O-alquilo (C₁-C₃), -O-(CH₂)_nX, -N(R⁷)(R⁸), -CONH(CH₂)_nX, -SO₂NH(CH₂)X, y -SO₂-alquilo (C₁-C₃);

R³ y R⁴ son cada uno independientemente H, alquilo (C₁-C₆), o CN;

15

R⁵ es alquilo (C₁-C₃) o alquilo (C₁-C₃) sustituido con de uno a tres flúor;

R⁶ es H, OH, NH₂, alquilo (C₁-C₃), halo, -CN, -O-alquilo (C₁-C₃), -O(CH₂)_nX, -N(R⁷)(R⁸), -CONH₂, -CONH(CH₂)_nX, -SO₂NH(CH₂)_nX, o -SO₂-alquilo (C₁-C₃); X es OR⁹, N(R⁷)(R⁸);

20

R⁷ y R⁸ son cada uno independientemente hidrógeno o alquilo (C₁-C₄) o alcoxilo (C₁-C₄), y pueden formar un anillo entre sí; n es 2 ó 3; y

R⁹ es H o alquilo (C₁-C₃);

25

y sales, estereoisómeros, enantiómeros, racematos, solvatos, hidratos y polimorfos del mismo.

2. Compuesto seleccionado del grupo que consiste en: N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida (Pz-1); 2-(4-(5-(1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)-N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(2,3-dimetilfenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(2-fluoropiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(2,4-dimetoxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(tiofen-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(2,4-difluorofenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(2,4-diclorofenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(4-(metiltio)fenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(2-metoxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(6-fluoropiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(2-metoxipiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(piridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(6-morfolinopiridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(piridin-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(4-(metilsulfonil)fenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(pirimidin-5-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(piridin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(6-metilpiridin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida; y N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-fenil-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida.

45

3. Compuesto según la reivindicación 2, en el que el compuesto consiste en N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-3-il)-2-(4-(5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida (Pz-1).

50

4. Composición farmacéutica que comprende:

un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3; y

un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

55

5. Composición farmacéutica según la reivindicación 4, en la que el compuesto consiste en N-(5-(*terc*-butil)isoxazol-

3-il)-2-(4-(5-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)fenil)acetamida (Pz-1), o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

5 6. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5, para su uso en el tratamiento de cáncer.

7. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 6, en la que dicho cáncer se selecciona de cáncer de tiroides, cáncer de pulmón o cáncer de mama.

10 8. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3, para su uso en el tratamiento de cáncer al inhibir la actividad de una tirosina cinasa.

15 9. Compuesto para su uso según la reivindicación 8, en el que la tirosina cinasa se selecciona del grupo que consiste en RET, Trk-A, Trk-B, Trk-C, FLT3-DIT, c-Kit, VEGFR y PDGFR.

10. Composición farmacéutica según la reivindicación 4 ó 5, para su uso en el tratamiento de dolor asociado al cáncer.

20 11. Kit para la preparación de una composición farmacéutica que comprende:

un primer recipiente que comprende un compuesto según una la reivindicación 1, 2 ó 3; y

un segundo recipiente que comprende un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

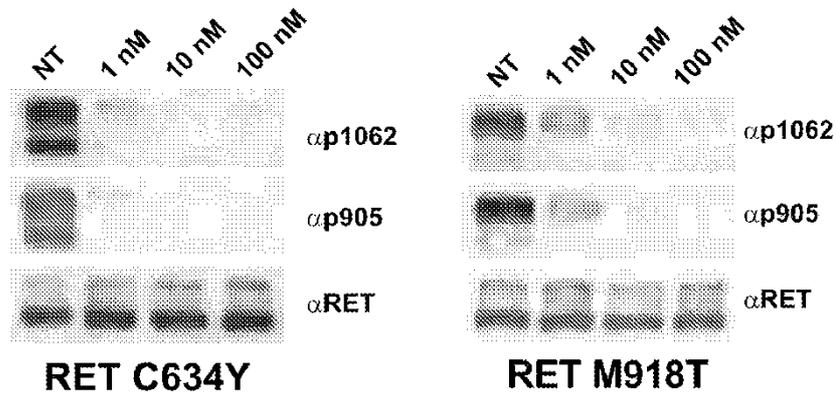


FIG. 1

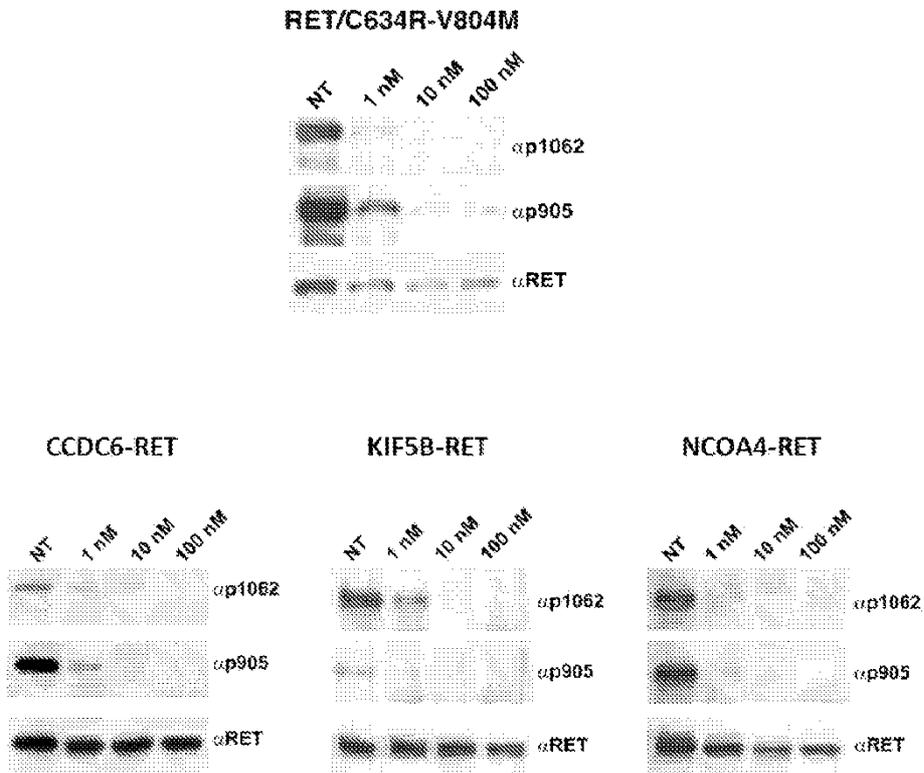


FIG. 2

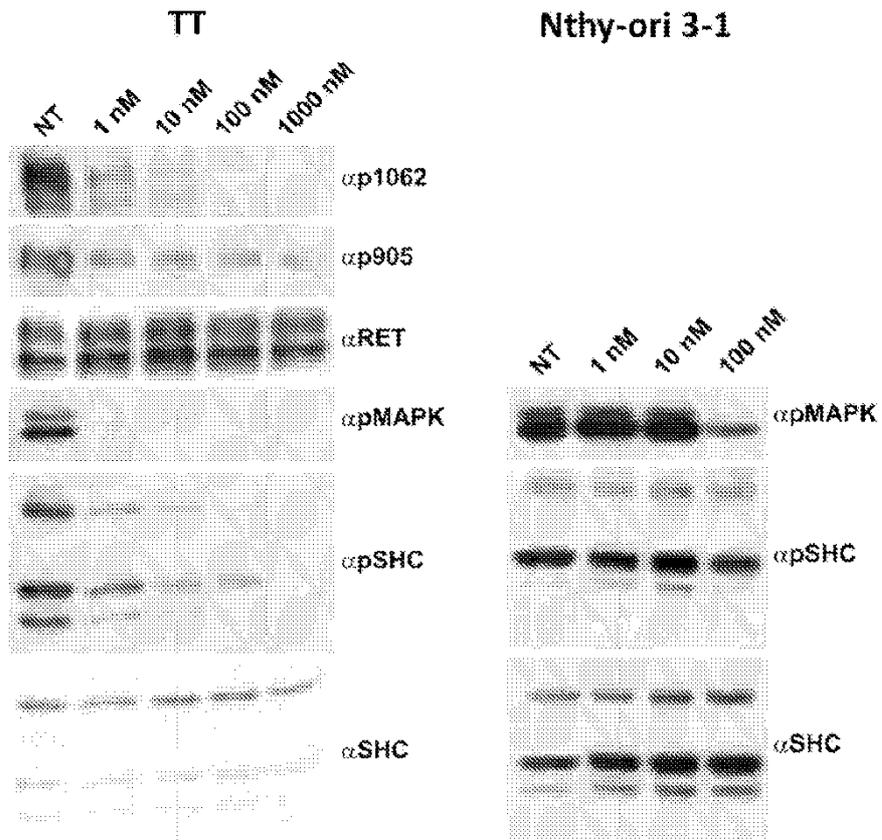


FIG. 3

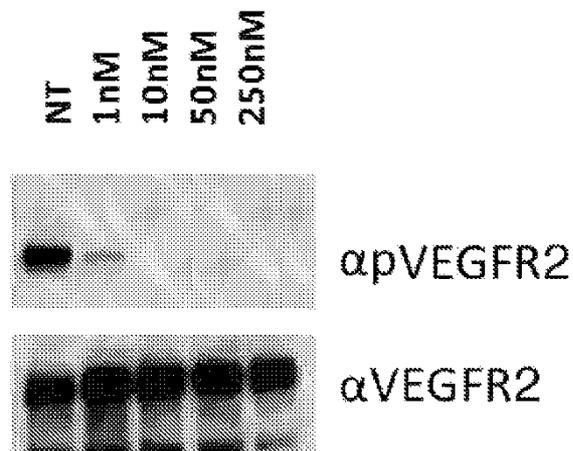


FIG. 4

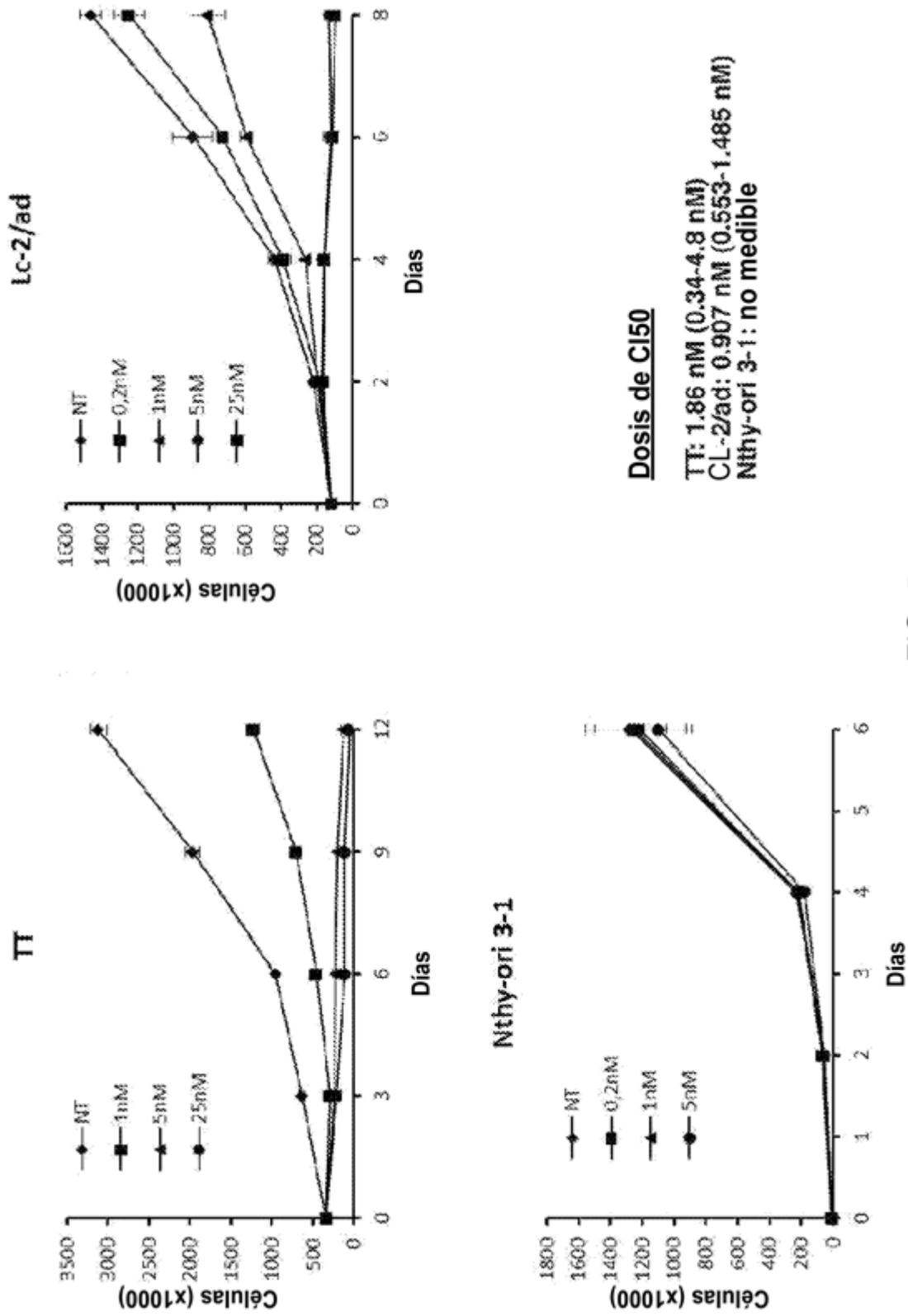


FIG. 5

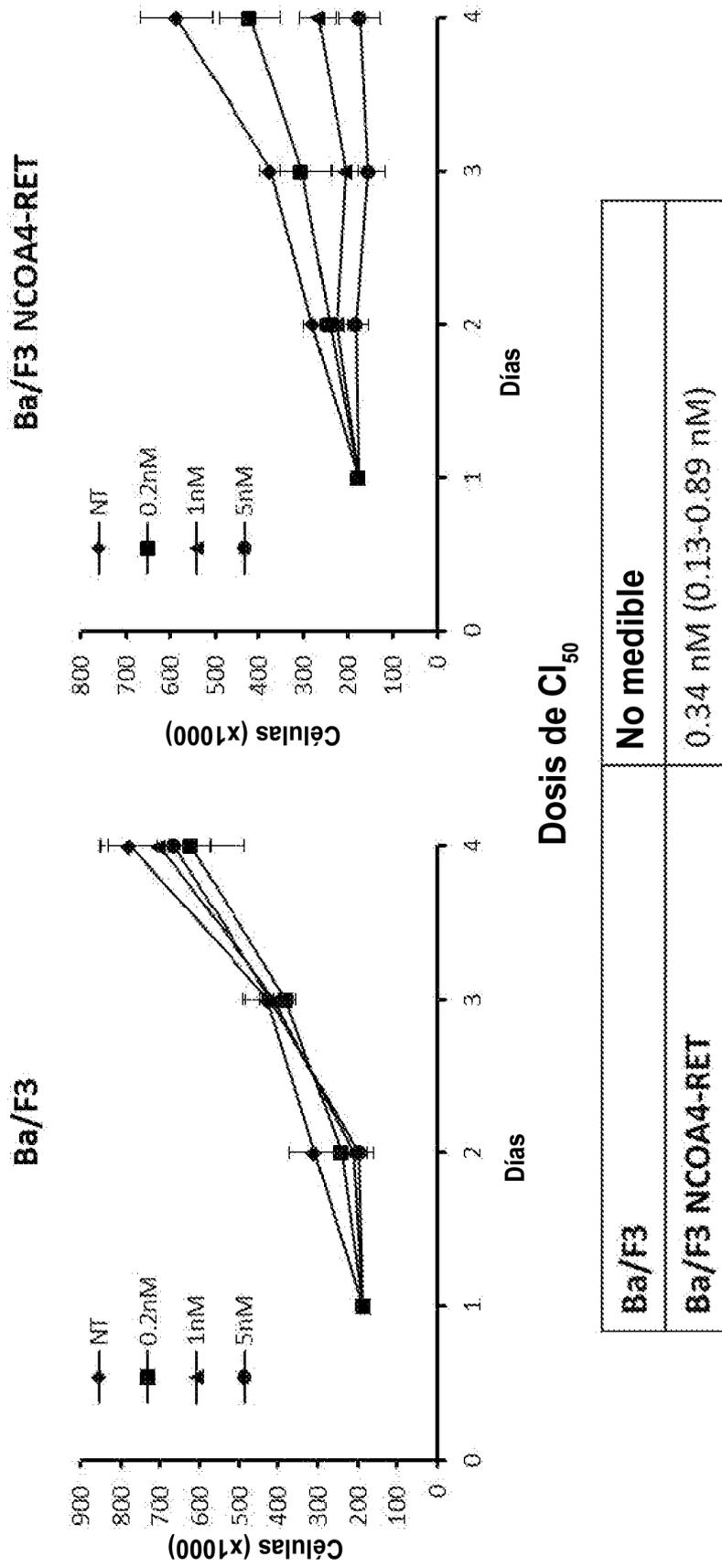


FIG. 6

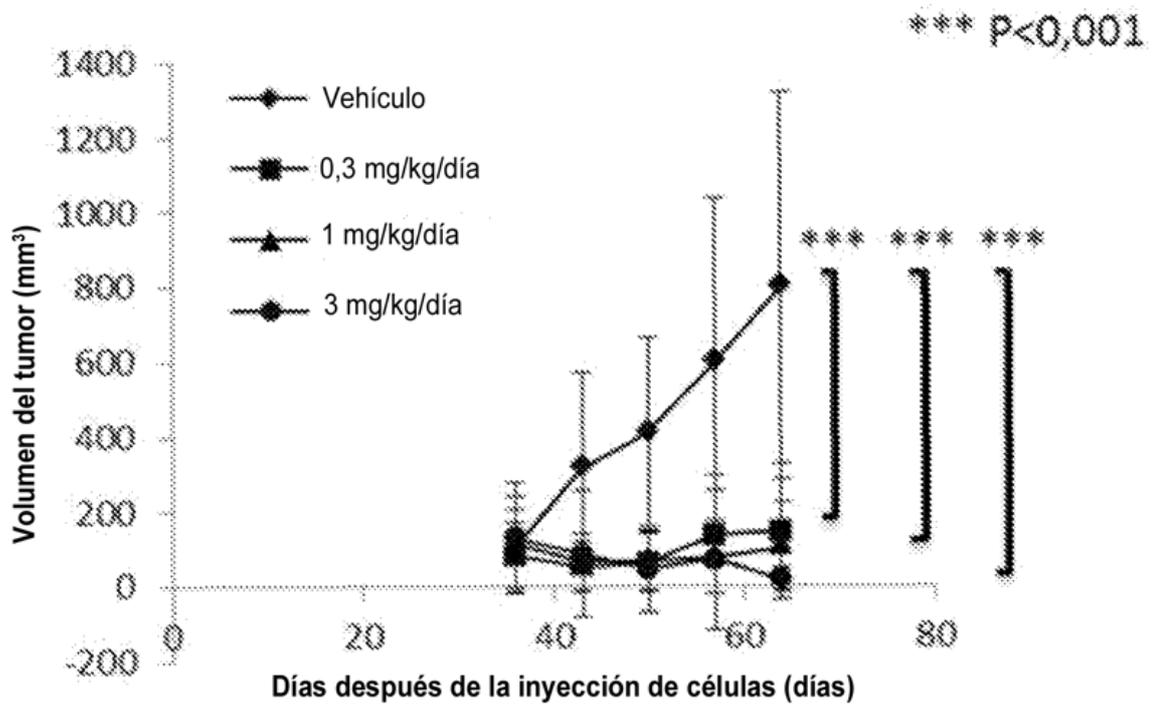


FIG. 7

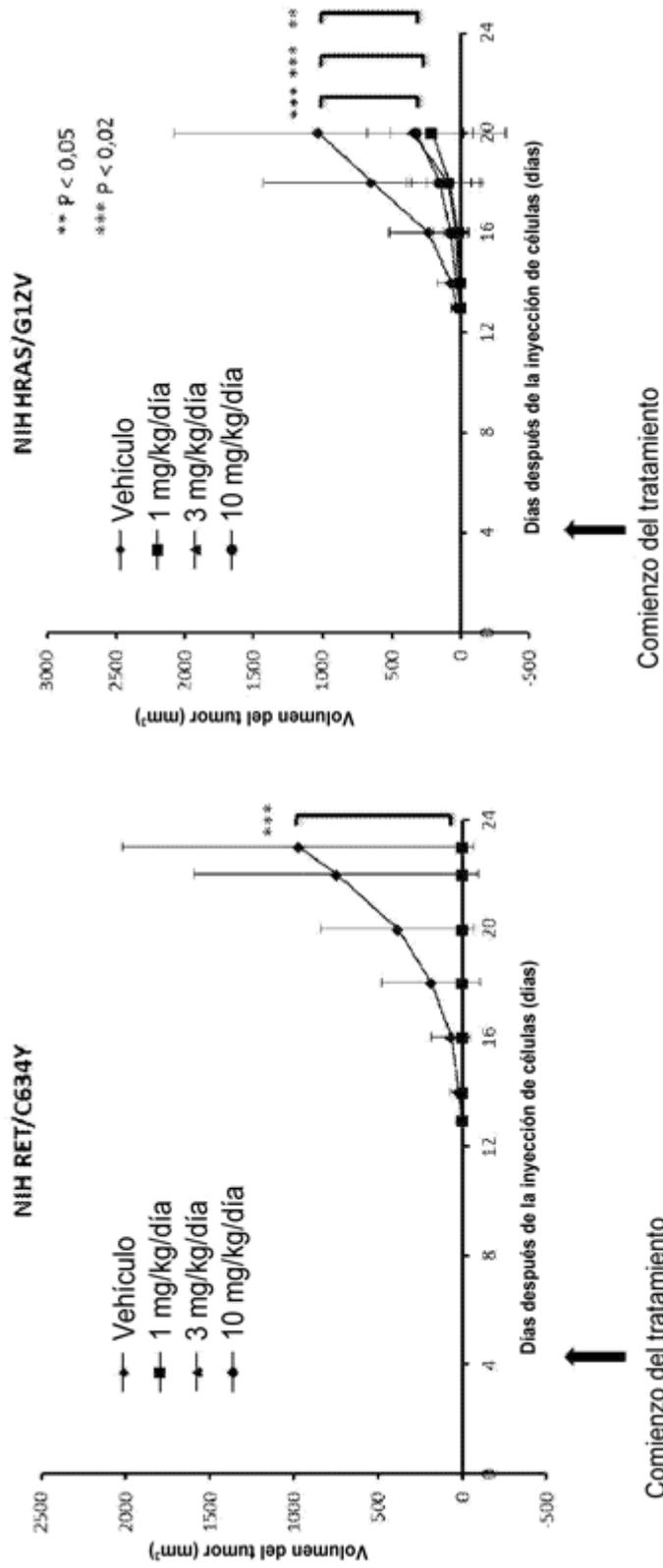
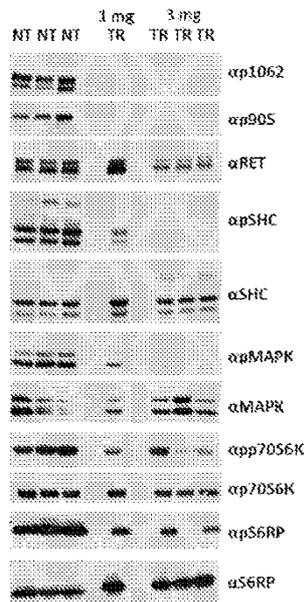


FIG. 8

NIH RET/C634Y



NIH HRAS/G12V

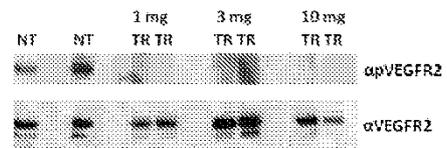
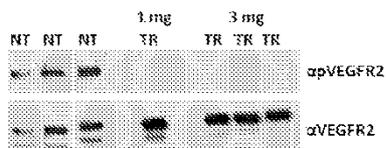
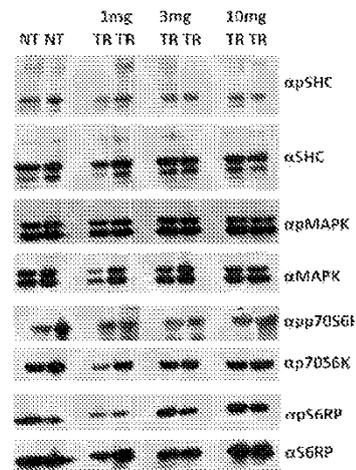


FIG. 9

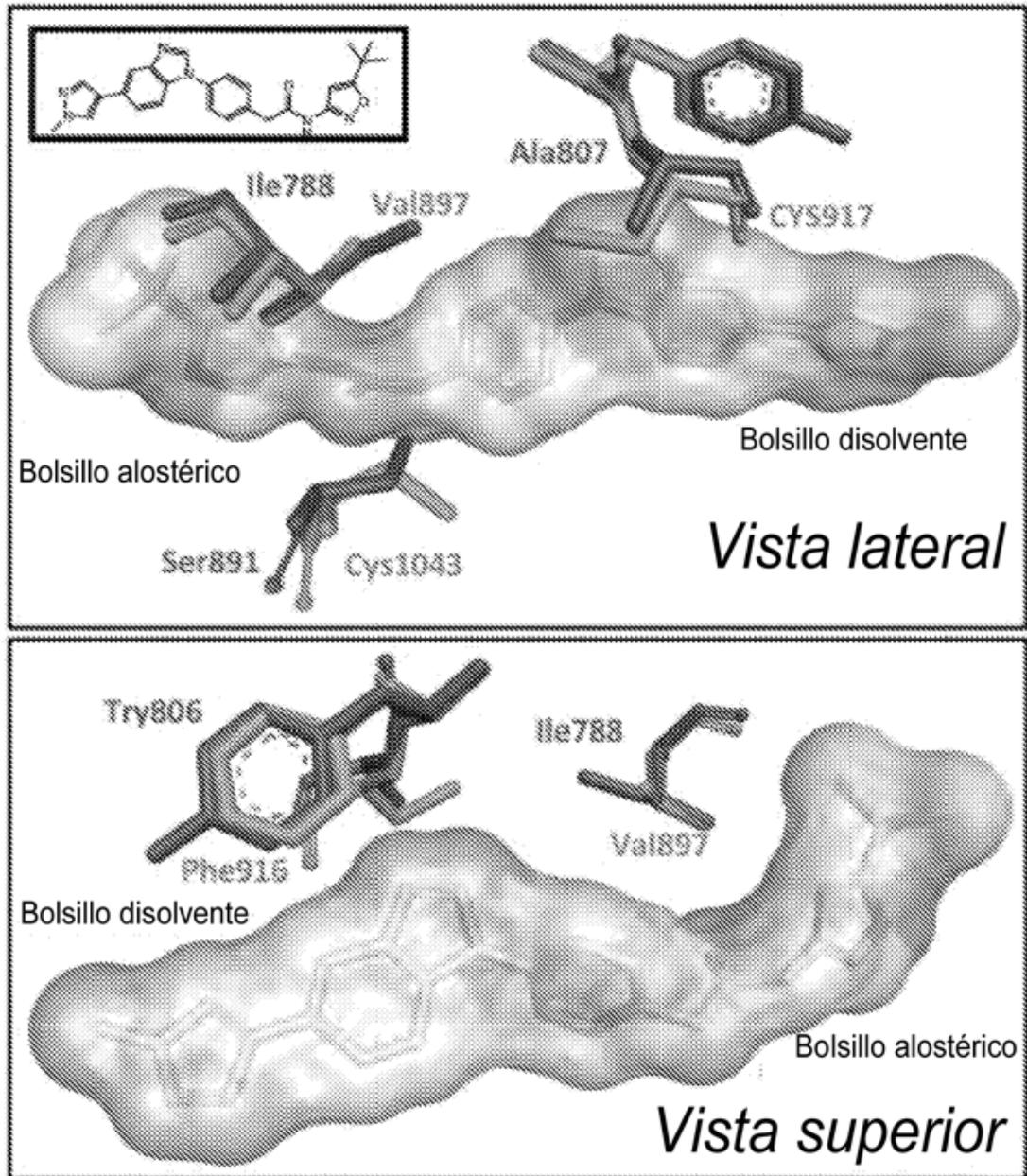


FIG. 10