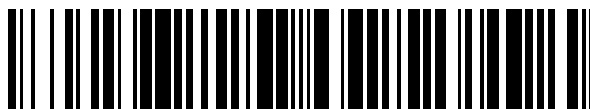


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 777 924**

51 Int. Cl.:

C07D 213/81 (2006.01) **C07D 253/065** (2006.01)
C07D 213/87 (2006.01)
C07D 215/50 (2006.01)
C07D 231/14 (2006.01)
C07D 239/42 (2006.01)
C07D 239/48 (2006.01)
C07D 239/84 (2006.01)
C07D 401/12 (2006.01)
C07D 405/12 (2006.01)
C07D 409/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2005** **E 11180106 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020** **EP 2447252**

54 Título: **Moduladores de teramuteína**

30 Prioridad:

23.05.2004 US 573962 P
03.12.2004 US 633013 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
06.08.2020

73 Titular/es:

HMI MEDICAL INNOVATIONS, LLC. (100.0%)
16800 West Twelve Mile Rd., Suite 201
Southfield, MI 48076, US

72 Inventor/es:

HOUSEY, GERARD M.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 777 924 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

Moduladores de teramuteína

5 Antecedentes de la invención

El desarrollo progresivo de la resistencia a los medicamentos en un paciente es el sello distintivo del tratamiento crónico con muchas clases de medicamentos, especialmente en las áreas terapéuticas de cáncer y enfermedades infecciosas. Se han identificado mecanismos moleculares que median ciertos tipos de fenómenos de resistencia a los medicamentos, mientras que en otros casos los mecanismos de resistencia adquirida y nueva siguen siendo desconocidos en la actualidad.

Un mecanismo de resistencia inducida (adquirida) a medicamentos que originalmente se creía relevante en el área de la terapia contra el cáncer implica una mayor expresión de una proteína conocida como P-glicoproteína (P-gp). P-gp se encuentra en la membrana celular y funciona como una bomba de flujo de medicamentos. La proteína es capaz de bombear agentes químicos tóxicos, incluidos muchos medicamentos clásicos contra el cáncer, fuera de la célula. En consecuencia, la sobreexpresión de la glicoproteína P generalmente produce resistencia a múltiples medicamentos. La sobreexpresión de la glicoproteína P en las células tumorales puede representar un mecanismo de defensa que ha evolucionado en las células de mamíferos para evitar daños por agentes químicos tóxicos. Ahora se han identificado otras proteínas relacionadas con la resistencia a los medicamentos con funciones similares a la P-gp, incluidos los miembros de la familia de proteínas asociadas a la resistencia a múltiples medicamentos, tales como MRP 1 y ABCG2. En cualquier caso, con el advenimiento del desarrollo de compuestos que son específicos para una proteína objetivo dada, y menos tóxicos, la importancia de la glucoproteína P y las proteínas transportadoras relacionadas con el casete de unión a ATP (ABC) en la resistencia a medicamentos clínicamente significativa ha disminuido.

Otro posible mecanismo molecular de resistencia farmacológica adquirida es que las vías de señal alternativas son responsables de la supervivencia y el metabolismo de las células, a pesar de que el medicamento original sigue siendo eficaz contra su objetivo. Además, las alteraciones en el metabolismo intracelular del medicamento también pueden conducir a la pérdida de eficacia terapéutica. Además, pueden ocurrir cambios en la expresión génica, así como eventos de amplificación génica, lo que resulta en una mayor o menor expresión de una proteína objetivo dada, y con frecuencia requiere dosis crecientes del medicamento para mantener los mismos efectos (Adcock y Lane, 2003).

La resistencia al medicamento inducida por mutación es un evento frecuente en el área de enfermedades infecciosas. Por ejemplo, se han desarrollado varios medicamentos que inhiben la transcriptasa inversa viral o la proteasa viral codificada en el genoma viral de la inmunodeficiencia humana (VIH). Está bien establecido en la literatura que el tratamiento repetido de pacientes con SIDA infectados con VIH usando, por ejemplo, un inhibidor de la transcriptasa inversa eventualmente da lugar a formas mutantes del virus que han reducido la sensibilidad al medicamento que resultó de las mutaciones que se han producido en el gen que codifica la transcriptasa inversa que hace que la forma mutante de la enzima se vea menos afectada por el medicamento.

La aparición de resistencia a los medicamentos durante el curso del tratamiento del VIH no es sorprendente teniendo en cuenta la velocidad a la que se introducen los errores en el genoma del VIH. Se sabe que la enzima transcriptasa inversa del VIH es particularmente propensa a errores, con una tasa de mutación directa de aproximadamente $3,4 \times 10^{-5}$ mutaciones por par de bases por ciclo de replicación (Mansky et al., J. Virol 69: 5087-94 (1995)). Sin embargo, las tasas de mutación análogas para genes endógenos codificados en células de mamíferos son más de un orden de magnitud menor.

Nueva evidencia muestra que la resistencia a los medicamentos también puede surgir de un evento mutacional que involucra el gen que codifica el medicamento objetivo (Gorre et al., Science, 2001; PCT/US02/18729). En este caso, la exposición del paciente a una sustancia terapéutica específica, tal como un medicamento dado contra el cáncer que se dirige a una proteína de interés específica (POI o proteína "objetivo") puede ser seguida por la excrecencia de un grupo de células que albergan una mutación que ocurre en el gen que codifica la proteína que es el objetivo de la sustancia terapéutica. Si la excrecencia de esta población de células es el resultado de un pequeño porcentaje de células preexistentes en el paciente que ya albergan una mutación que da lugar a una POI resistente a los medicamentos, o si tales mutaciones surgen de novo durante o después de la exposición del animal o ser humano a un agente terapéutico capaz de activar o inhibir dicha POI, actualmente se desconoce. En cualquier caso, tales eventos de mutación pueden dar como resultado una proteína mutada (definida a continuación como una *teramuteína*) que se ve menos afectada, o tal vez completamente no afectada, por dicha sustancia terapéutica.

La leucemia mielógena crónica (LMC) se caracteriza por una proliferación excesiva de progenitores mieloides que retienen la capacidad de diferenciación durante la fase estable o crónica de la enfermedad. Múltiples líneas de evidencia han establecido la desregulación de la tirosina quinasa Abl como el oncogén causante en ciertas formas de LMC. La desregulación se asocia comúnmente con una translocación cromosómica conocida como el cromosoma Filadelfia (Ph), que da como resultado la expresión de una proteína de fusión compuesta por el producto

del gen *BCR* fusionado con la tirosina quinasa Abelson, formando así p210^{Bcr-Abl} que tiene actividad tirosina quinasa. Una proteína de fusión relacionada, denominada p190^{Bcr-Abl}, que surge de un punto de corte diferente en el gen *BCR*, y se ha demostrado que ocurre en pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA) positiva para el cromosoma Filadelfia (Ph+) (Melo, 1994; Ravandi et al., 1999). La transformación parece ser el resultado de la activación de múltiples vías de señal, incluidas las que involucran RAS, MYC y JUN. El mesilato de imatinib ("STI-571" o "Gleevec®") es una 2-fenilamino pirimidina que se dirige al sitio de unión a ATP del dominio de quinasa de Abl (Druker et al., NEJM 2001, página 1038). Posteriormente, también se ha encontrado por otros métodos que es un inhibidor del receptor β del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el Kit tirosina quinasa, el último de los cuales está involucrado en el desarrollo de tumores del estroma gastrointestinal (véase más abajo).

Hasta hace poco, no se había observado que durante el curso del tratamiento con un inhibidor específico de una proteína celular endógena dada que una mutación en su gen *endógeno* correspondiente pudiera conducir a la expresión de variantes de proteínas cuyo funcionamiento celular fuera resistente al inhibidor. El trabajo de Charles Sawyers y colegas (Gorre et al., Science 293: 876-80 (2001); PCT/US02/18729) demostró por primera vez que el tratamiento de un paciente con un medicamento capaz de inhibir la tirosina quinasa de p210^{Bcr-Abl} (es decir, STI-571) podría ser seguido por la aparición de una población clínicamente significativa de células dentro de dicho paciente que alberga una mutación en el gen que codifica la proteína objetivo que causa el cáncer p210^{Bcr-Abl} que contiene el dominio tirosina quinasa Abelson. Varias de estas mutaciones dieron lugar a formas mutantes de p210^{Bcr-Abl} que respondían menos al tratamiento con Gleevec que la versión original causante del cáncer. En particular, las mutaciones que surgieron le otorgaron a la proteína mutante una resistencia relativa a los efectos del medicamento inhibidor de la proteína quinasa, al tiempo que mantienen un cierto grado de especificidad de sustrato original de la proteína quinasa mutante. Antes del trabajo de Gorre et al., los expertos en la técnica generalmente creían que los tipos de resistencia que se observarían en pacientes expuestos a un compuesto que inhibiera la proteína quinasa Abelson, tal como STI-571, resultarían de uno o más de los otros mecanismos de resistencia a los medicamentos enumerados anteriormente, o de algún otro mecanismo aún desconocido, pero que, en cualquier caso, dicha resistencia implicaría un objetivo (proteína o de otro tipo) que era distinto de la POI objetivo del medicamento.

Por consiguiente, la capacidad para tratar formas mutantes resistentes de proteínas clínicamente relevantes que de otro modo serían los objetivos de una terapia existente sería extremadamente útil. Dichas proteínas mutadas (teramuteínas como se define a continuación) están comenzando a ser reconocidas y entendidas como objetivos importantes en los cánceres recurrentes, y también se volverán importantes en otras enfermedades. Existe la necesidad de agentes terapéuticos que sean activos contra tales formas variantes de proteínas celulares resistentes a los medicamentos que pueden surgir antes, durante o después de terapias farmacológicas normalmente eficaces. Un objetivo clave de esta invención es proporcionar compuestos que puedan servir como agentes terapéuticos potenciales útiles para superar la resistencia a medicamentos inducida por mutación en proteínas que se producen endógenamente.

LaRosse et al., Canc Res 62 (2002), 7149-7153 se ocupa del análisis de la actividad inhibitoria de PD180970 contra las isoformas de Bcr-Abl que causan resistencia al mesilato de imatinib (Gleevec, STI571). Gorre et al., Science 293 (2001), 876-880 se ocupa de la identificación de mutaciones en el gen Bcr-Abl que hace que la proteína sea resistente contra STI571. Huron et al., Clin Canc Res 9 (2003), 1267-1273 enseña el cribado de una familia de tirosina quinasas de Bcr-Abl *in vitro*. El documento WO 2004/033680 A1 enseña el diseño clásico de medicamentos mediante el cribado y el diseño de nuevos medicamentos *in silico* y en ensayos sin células. Wisniewski et al., Canc Res 62 (2002), 4244-4255 informa sobre experimentos con unos pocos potentes preseleccionados en inhibidores del Bcr-Abl y el receptor tirosina quinasas c-kit, en el que se han utilizado líneas celulares que expresan la proteína Bcr-Abl de tipo silvestre. El documento EP 1 224 460 B1 enseña ensayos para el cribado de agentes bioactivos que afectan la proliferación celular determinando el efecto del agente sobre la proteína KSP de quinesina humana recombinante. El documento US 2001/016329 A1 explota la mayor actividad enzimática de las enzimas intracelulares endógenas asociadas con células y tejidos enfermos resistentes a la terapia frente a células y tejidos normales y no se basa en la inhibición de la enzima.

Breve resumen de la invención

Esta invención se refiere a métodos para identificar agentes que son inhibidores o activadores de formas variantes de proteínas endógenas como se caracteriza en las reivindicaciones. De particular interés son los inhibidores y activadores de variantes de proteínas endógenas, codificadas por genes que han mutado, cuyas variantes a menudo surgen o se identifican al menos primero como surgidas después de la exposición a un agente químico que se sabe que es un inhibidor o activador de la correspondiente proteína endógena no mutada. Dichas variantes de proteínas (proteínas mutantes) se denominan en el presente documento "teramuteínas", pueden ocurrir espontáneamente en un organismo (y pueden ser mutaciones preexistentes en algunos casos), o dichos mutantes pueden surgir como resultado de una presión selectiva que resulta cuando el organismo se trata con un agente químico dado capaz de inhibir la forma no mutada de dicha teramuteína (en el presente documento denominada "prototeramuteína"). Se entenderá que, en algunos casos, una prototeramuteína puede ser una forma de "tipo silvestre" de POI (por ejemplo, una proteína que da lugar a una enfermedad debido a la desregulación). En otros casos, la prototeramuteína será una variante causante de la enfermedad de una proteína de "tipo silvestre", que ya ha mutado y por lo tanto contribuye al desarrollo del estado enfermo como resultado de dicha mutación previa. Un ejemplo del último tipo de prototeramuteína es la oncoproteína P210^{Bcr-ABL}, y una forma mutante de esta proteína que alberga una mutación

de treonina (T) a isoleucina (I) en la posición 315 se denomina P210^{BCR-ABL-T315I} y es un ejemplo de una teramuteína. Como se usa en el presente documento, la designación "P210^{BCR-ABL}" es sinónimo del término "p210^{Bcr-Abl}", la "proteína Bcr-Abl de tipo silvestre" y similares.

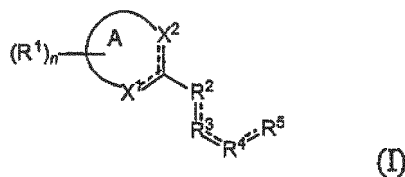
Las teramuteínas son una clase rara de proteínas endógenas que albergan mutaciones que hacen que dichas proteínas sean resistentes a los medicamentos que se sabe que inhiben o activan de manera terapéuticamente efectiva a sus contrapartes no mutadas. Actualmente se sabe que los genes endógenos que codifican algunas de tales proteínas exhiben tales mutaciones bajo ciertas circunstancias. Esta solicitud describe composiciones que inhiben ciertos mutantes resistentes a los medicamentos (teramuteínas) de la proteína tirosina quinasa Abelson, originalmente denominada P210-Bcr-Abl en la literatura, que está involucrada en el desarrollo de leucemia mielógena crónica. La invención también está dirigida a métodos generales de identificación de compuestos que inhiben o activan cualquier teramuteína.

El presente método está particularmente dirigido a la identificación de inhibidores *específicos* o activadores *específicos* de teramuteínas. El uso del término "específico" en el contexto de los términos "inhibidor" o "activador" (véanse las definiciones a continuación) significa que dicho inhibidor o activador se une a la teramuteína e inhibe o activa el funcionamiento celular de la teramuteína sin también unirse y activando o inhibiendo una amplia variedad de otras proteínas u objetivos no proteicos en la célula. El investigador experto es consciente de que existe un cierto grado de variabilidad en la literatura médica con respecto al concepto de un *inhibidor específico* o un *activador específico*, y del concepto relacionado de "especificidad" de proteínas objetivo cuando se discuten las acciones de los inhibidores o activadores de una proteína. En consecuencia, para los fines de esta invención, una sustancia es un inhibidor específico o un activador específico de una teramuteína dada si dicha sustancia es capaz de inhibir o activar dicha teramuteína a una concentración dada de tal manera que una fenorrespuesta correspondiente se modula de la manera apropiada, sin tener un efecto apreciable a la misma concentración dada sobre la fenorrespuesta de una célula de control correspondiente que esencialmente no expresa ni la teramuteína ni su prototeramuteína correspondiente.

En ciertas realizaciones, una sustancia puede ser un modulador de la prototeramuteína así como de la teramuteína. En otras realizaciones, además de ser un modulador de la prototeramuteína y la teramuteína, una sustancia también puede modular las actividades de proteínas que tienen funciones similares. Como se discutió anteriormente, además de inhibir la tirosina quinasa p210^{BcrAbl}, el mesilato de imatinib también es capaz de inhibir el producto oncogénico c-kit (también una tirosina quinasa) que se sobreexpresa en ciertos tumores del estroma gastrointestinal, así como el receptor del PDGF β (también una tirosina quinasa), que se expresa en ciertas leucemias mielomonocíticas crónicas (LMMC). Tal compuesto a veces se denomina inhibidor "moderadamente específico".

La invención también proporciona un método general que puede usarse para identificar sustancias que activarán o inhibirán una teramuteína, en el mismo grado, y preferiblemente en un grado aún mayor que una sustancia farmacológica conocida que sea capaz de inhibir el correspondiente forma de "tipo silvestre" de esa proteína. (Sin embargo, el experto en la materia sabe muy bien que dichas formas de "tipo silvestre" de tales proteínas pueden haber mutado ya en el entretanto para dar lugar a la correspondiente enfermedad en la que participa dicha proteína).

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona inhibidores de la teramuteína P210^{BCR-ABL-T315I} que tiene la fórmula I



en la que:

el anillo A es un anillo de 5, 6 o 7 miembros o un anillo bicíclico fusionado de 7 a 12 miembros;

X¹ se selecciona de N, N-R⁰ o C-R¹;

X² se selecciona de N, N-R⁰ o C-R¹;

las líneas punteadas representan enlaces opcionales;

cada R¹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, CN, CF₃, NO₂, OR¹¹, -(CH₂)_pC(O)(CH₂)_qR¹¹, -(CH₂)_pC(O)N(R¹²)(R¹³), -(CH₂)_pC(O)O(CH₂)_qR¹¹, -(CH₂)_pN(R¹¹)C(O)R¹¹, -(CH₂)_pN(R¹²)(R¹³), -N(R¹¹)SO₂R¹¹, -OC(O)N(R¹²)(R¹³), -SO₂N(R¹²)(R¹³), halo, arilo y un anillo heterocíclico, y adicionalmente o alternativamente, dos grupos R¹ en átomos del anillo adyacente forman un anillo fusionado de 5 o 6 miembros que contiene de 0 a 3 heteroátomos;

n es 0 a 6,

cada R¹¹ se selecciona independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;

cada R¹² y R¹³ se seleccionan independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, arilo y un

anillo heterocíclico; o R^{12} y R^{13} pueden tomarse juntos con el nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de 5 a 7 miembros que puede contener opcionalmente un heteroátomo adicional;

p es de 0 a 4;

q es de 0 a 4;

5

R^2 se selecciona de $-CR^{21}_a$ -, $-NR^{22}_b$ - y $-(C=R^{23})$ -;

cada R^{21} se selecciona independientemente de H, halo, $-NH_2$, $-N(H)(\text{alquilo } C_{1-3})$, $-N(\text{alquilo } C_{1-3})_2$, $-O-(\text{alquilo } C_{1-3})$, OH y alquilo C_{1-3} ;

10 cada R^{22} se selecciona independientemente de H y alquilo C_{1-3} ;

R^{23} se selecciona de O, S, $N-R^0$ y $N-OR^0$;

R^3 se selecciona de $-CR^{31}_c$ -, $-NR^{32}_d$ - y $-(C=R^{33})$ -;

15 cada grupo R^{31} se selecciona de H, halo, $-NH_2$, $-N(H)(R^0)$, $-N(R^0)_2$, $-OR^0$, OH y alquilo C_{1-3} ;

cada grupo R^{32} se selecciona de H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, CO_2R^0 , $C(O)R^0$, arilo y un anillo heterocíclico;

R^{33} se selecciona de O, S, $N-R^{34}$ y $N-OR^0$;

R^{34} se selecciona de H, NO_2 , CN, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;

20

R^4 se selecciona de $-CR^{41}_e$ -, $-NR^{42}_f$ -, $-(C=R^{43})$ - y $-O$ -;

cada R^{41} se selecciona de H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, CO_2R^0 , $C(O)R^0$, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;

25 cada grupo R^{42} se selecciona de H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, CO_2R^0 , $C(O)R^0$, arilo y un anillo heterocíclico;

cada R^{43} se selecciona de O, S, $N-R^0$ y $N-OR^0$;

30 con la condición de que cuando R^2 sea $-NR^{22}_b$ - y R^4 sea $-NR^{42}_f$ -, entonces R^3 no sea $-NR^{32}_d$ -; y que tanto R^3 como R^4 no se seleccionan simultáneamente de $-(C=R^{33})$ - y $-(C=R^{43})$ -, respectivamente;

R^5 se selecciona de $-Y-R^6$ y $-Z-R^7$;

Y se selecciona de un enlace químico, O, NR^0 ,

R^6 se selecciona de alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;

35 Z es una cadena hidrocarbonada que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, y opcionalmente sustituida con uno o más de halo, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, CO_2R^0 , $C(O)R^0$, $C(O)N(R^0)_2$, CN, CF_3 , $N(R^0)_2$, NO_2 y OR^0 ;

R^7 es H o se selecciona de arilo y un anillo heterocíclico;

cada R^0 se selecciona independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;

40 a es 1 o 2;

b es 0 o 1;

c es 1 o 2;

d es 0 o 1;

e es 1 o 2; y

45 f es 0 o 1.

La invención proporciona una forma fundamentalmente nueva de tratar el cáncer y otras enfermedades donde el tratamiento con un compuesto farmacológico existente, por cualquier mecanismo, es seguido por resistencia a medicamentos mediada por teramuteína identificable (clínicamente significativa), proporcionando medicamentos alternativos que pueden ser administrados a medida que surgen las teramuteínas y se identifican como tales (Wakai et al., 2004, informan un ejemplo en el que puede surgir una teramuteína durante el curso de un régimen de tratamiento continuo), o preventivamente antes del crecimiento de poblaciones clínicamente significativas de células que expresan teramuteína. Además, cuando un tratamiento farmacológico para una enfermedad particular es menos eficaz en un subconjunto de individuos que expresan una cierta teramuteína de una proteína a la que se dirige el medicamento, la invención permite la adaptación de tratamientos para esos sujetos al proporcionar sustancias farmacológicas alternativas que serán eficaces contra dicho teramuteína.

1. La invención proporciona un método para determinar si un agente químico es al menos tan efectivo como modulador de una teramuteína en una célula como una sustancia conocida es un modulador de una prototeramuteína correspondiente. El método implica poner en contacto una célula de control que expresa la prototeramuteína y es capaz de exhibir una característica fenotípica sensible (vinculada al funcionamiento de la prototeramuteína en la célula) con el modulador conocido de la prototeramuteína, poniendo en contacto una célula de prueba que expresa la teramuteína y es también capaz de exhibir la característica fenotípica sensible (vinculada al funcionamiento de la teramuteína en la célula) con el agente químico, y comparar la respuesta de la célula de prueba tratada con la respuesta de la célula de control tratada; para determinar que el agente químico sea al menos tan efectivo, un modulador de la teramuteína como la sustancia conocida es un modulador de la prototeramuteína.

En ciertas otras realizaciones, un tipo de célula de control puede no expresar la prototeramuteína en absoluto. En otras realizaciones, la célula de control puede expresar aproximadamente la misma cantidad de la prototeramuteína que la célula de prueba expresa de la teramuteína. En otras realizaciones más, la célula de control puede ser capaz de exhibir la característica fenotípica sensible en aproximadamente la misma extensión que la célula de prueba en ciertas condiciones.

2. Las teramuteínas que son de particular interés son aquellas involucradas en la función reguladora, tales como enzimas, proteína quinasas, tirosina quinasas, receptor tirosina quinasas, serina treonina proteína quinasas, proteínas de doble especificidad quinasas, proteasas, metaloproteinasas de matriz, fosfatasas, proteínas de control del ciclo celular, proteínas de acoplamiento tales como los miembros de la familia del IRS, receptores de la superficie celular, proteínas G, canales iónicos, proteínas de unión a ADN y ARN, polimerasas y similares. No se pretende ninguna limitación sobre el tipo de teramuteína que puede usarse en la invención. En la actualidad, se conocen tres teramuteínas: BCR-ABL, c-Kit y EGFR.

3. Cualquier característica fenotípica sensible que pueda vincularse a la presencia de la teramuteína (o prototeramuteína) en la célula puede emplearse para su uso en el método, incluyendo, por ejemplo, propiedades de crecimiento o cultivo, el estado de fosforilación (u otra modificación) de un sustrato de la teramuteína, y cualquier tipo de característica transitoria de la célula, como se definirá y discutirá en detalle.

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el efecto sobre el crecimiento y la viabilidad de diferentes concentraciones del Compuesto 2 (C2) para células Ba/F3 de control del vector no transformadas (que son dependientes de IL-3) así como células Ba/F3 que expresan el p210^{Bcr-Abl} de "tipo silvestre" (designado p210^{Bcr-Abl-wt}), y células Ba/F3 que expresan el mutante resistente a medicamentos p210^{Bcr-Abl-T315I}. Los recuentos de células y la viabilidad se determinaron en un contador celular automatizado como se describe en detalle en la memoria descriptiva. Los recuentos de células se muestran mediante las barras de color sólido; la viabilidad celular se muestra mediante las barras troceadas. Téngase en cuenta que STI-571 inhibe potentemente el crecimiento de la línea celular P210 (barra gris) mientras que es incapaz de inhibir el crecimiento de la línea celular T315I (barra blanca) incluso a una concentración de 10 µM. C2 500 nM muestra la mayor brecha de especificidad dentro de esta serie de respuesta a la dosis. Compárese STI-571 a 10 µM con C2 a 500 nM en la línea celular T315I (barras blancas). Abreviaturas: DMSO: dimetilsulfóxido (disolvente utilizado para la disolución del medicamento).

La Figura 2 muestra el efecto sobre el crecimiento y la viabilidad de diferentes concentraciones del Compuesto 6 (C6) para células Ba/F3 de control del vector no transformadas, así como células Ba/F3 que expresan el mutante resistente a medicamentos p210^{Bcr-Abl-T315I}. Todos los demás detalles son como en la Figura 1.

La Figura 3 muestra varias determinaciones de la brecha de especificidad comparando los efectos de varios compuestos identificados en el cribado en términos de sus efectos sobre las líneas celulares que expresan prototeramuteína y teramuteína. El compuesto 3 (C3) muestra el mejor ejemplo de la capacidad del método para identificar un compuesto que ejerce un efecto aún mayor sobre la teramuteína que sobre su correspondiente prototeramuteína. (Panel E). Panel A: tratamientos de control con DMSO; B: brecha de especificidad heteróloga negativa; C: brecha de especificidad heteróloga ligeramente positiva; D: gran brecha de especificidad homóloga positiva; E: brecha de especificidad heteróloga positiva. Véase el texto para las explicaciones. Panel A: tratamientos de control con DMSO; B: brecha de especificidad heteróloga negativa; C: brecha de especificidad heteróloga ligeramente positiva; D: gran brecha de especificidad homóloga positiva; véase el texto para las explicaciones.

La Figura 4 muestra una autorradiografía de dominios de quinasa mutante P210 Bcr-Abl recombinante de tipo silvestre y T315I ensayados para determinar la actividad de autofosforilación. Se incubaron 200 ng de proteína con sustancias de prueba durante 10 minutos en condiciones de reacción de autofosforilación estándar y luego se añadió ATP radiomarcado y las reacciones continuaron durante 30 minutos a 30°C, después de lo cual las muestras se separaron por SDS-PAGE. Los geles se tiñeron con plata, se secaron al vacío y se expusieron a una película de rayos X. Téngase en cuenta que mientras que STI 571 10 µM es eficaz contra P210 Bcr-Abl de tipo silvestre, es prácticamente ineficaz contra el dominio de quinasa T315I, incluso a concentraciones de hasta 100 µM. C2 y C6 son los dos mejores compuestos identificados, seguidos por C5, C7 y C4. Todos los compuestos probados positivamente hasta cierto punto "línea celular P210" se refieren a células que expresan p210^{BCR-ABL-wt}. La "línea celular T315I" se refiere a células que expresan p210^{BCR-ABL-T315I}.

La Figura 5 muestra las estructuras químicas de compuestos representativos.

La Figura 6 muestra las estructuras químicas de compuestos representativos.

La Figura 7 muestra las estructuras químicas de compuestos representativos.

La Figura 8 muestra las estructuras químicas de compuestos representativos.

La Figura 9 muestra las estructuras químicas de compuestos representativos.

La Figura 10 muestra las estructuras químicas de compuestos representativos.

La Figura 11 muestra las estructuras químicas de compuestos representativos.

5 La Figura 12 muestra las estructuras químicas de compuestos representativos.

La Figura 13 muestra las estructuras químicas de compuestos representativos.

Descripción detallada de la invención

10

La presente invención se refiere a las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

El término "halo" o "halógeno" como se usa en este documento incluye flúor, cloro, bromo y yodo.

15

El término "alquilo" como se usa en el presente documento contempla radicales alquilo de cadena lineal y ramificada sustituidos y no sustituidos que tienen de 1 a 6 átomos de carbono. Los grupos alquilo preferidos incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, tert-butilo y similares. Además, el grupo alquilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre halo, CN, CO₂R, C(O)R, C(O)NR₂, NR₂, amino cíclico, NO₂ y OR.

20

El término "cicloalquilo" como se usa en el presente documento contempla radicales alquilo cíclicos sustituidos y no sustituidos. Los grupos cicloalquilo preferidos son aquellos con un solo anillo que contiene de 3 a 7 átomos de carbono e incluye ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo y similares. Se pueden seleccionar otros grupos cicloalquilo de sistemas bicíclicos C₇ a C₁₀ o de sistemas tricíclicos C₉ a C₁₄. Además, el grupo cicloalquilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre halo, CN, CO₂R, C(O)R, C(O)NR₂, NR₂, amino cíclico, NO₂ y OR.

25

El término "alquenilo" como se usa en el presente documento contempla radicales alqueno de cadena lineal y ramificada sustituidos y no sustituidos. Los grupos alquenilo preferidos son aquellos que contienen de dos a seis átomos de carbono. Además, el grupo alquenilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de halo, CN, CO₂R, C(O)R, C(O)NR₂, NR₂, amino cíclico, NO₂ y OR.

30

El término "alquinilo" como se usa en el presente documento contempla radicales alquino de cadena lineal y ramificada sustituidos y no sustituidos. Los grupos alquinilo preferidos son aquellos que contienen de dos a seis átomos de carbono. Además, el grupo alquinilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de halo, CN, CO₂R, C(O)R, C(O)NR₂, NR₂, amino cíclico, NO₂ y OR.

35

El término "aralquilo" como se usa en el presente documento contempla un grupo alquilo que tiene como sustituyente un grupo aromático, cuyo grupo aromático puede estar sustituido y no sustituido. El grupo aralquilo puede estar opcionalmente sustituido en el arilo con uno o más sustituyentes seleccionados de halo, CN, CF₃, NR₂, amino cíclico, NO₂, OR, CF₃, -(CH₂)_xC(O)(CH₂)_yR, -(CH₂)_xC(O)N(R')(R''), -(CH₂)_xC(O)O(CH₂)_yR, -(CH₂)_xN(R')(R''), -N(R)SO₂R, -O(CH₂)_xC(O)N(R)(R''), -SO₂N(R')(R''), -(CH₂)_xN(R)-(CH₂)_yR, -(CH₂)_xN(R)-C(O)-(CH₂)_yR, -(CH₂)_xN(R)-C(O)-O-(CH₂)_yR, -(CH₂)_xC(O)-N(R)-(CH₂)_yR, -(CH₂)_xC(O)N(R)-(CH₂)_yR, -O-(CH₂)_xC(O)-N(R)-(CH₂)_yR, alquilo sustituido y no sustituido, cicloalquilo sustituido y no sustituido, aralquilo sustituido y no sustituido, alquenilo sustituido y no sustituido, alquinilo sustituido y no sustituido, arilo sustituido y no sustituido, y un anillo heterocíclico sustituido y no sustituido, en el que el alquilo sustituido, cicloalquilo sustituido, aralquilo sustituido, alquenilo sustituido, alquinilo sustituido, arilo sustituido, y el anillo heterocíclico sustituido puede estar sustituido con uno o más halo, CN, CF₃, CO₂R, C(O)R, C(O)NR₂, NR₂, amino cíclico, NO₂ y OR.

40

El término "grupo heterocíclico" o "anillo heterocíclico" como se usa en el presente documento contempla radicales cíclicos aromáticos y no aromáticos que tienen al menos un heteroátomo como miembro del anillo. Los grupos heterocíclicos preferidos son aquellos que contienen 5 o 6 átomos en el anillo que incluyen al menos un heteroátomo e incluyen aminas cíclicas tales como morfolino, piperidino, pirrolidino y similares, y éteres cíclicos, tales como tetrahydrofurano, tetrahydropirano y similares. Los grupos heterocíclicos aromáticos, también denominados grupos "heteroarilo", contemplan grupos heteroaromáticos de anillo único que pueden incluir de uno a tres heteroátomos, por ejemplo, pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, triazol, pirazol, piridina, pirazina, piridazina, pirimidina y similares. El término heteroarilo también incluye sistemas hetero-aromáticos policíclicos que tienen dos o más anillos en los que dos átomos son comunes a dos anillos adyacentes (los anillos están "fusionados") en los que al menos uno de los anillos es un heteroarilo, por ejemplo, los otros anillos pueden ser cicloalquilos, cicloalquenilos, arilo, heterociclos y/o heteroarilos. Los ejemplos de sistemas heteroaromáticos policíclicos incluyen quinolina, isoquinolina, tetrahydroisoquinolina, quinoxalina, quinaxolina, bencimidazol, benzofurano, purina, imidazopiridina, benzotriazol y similares. Además, los grupos heterocíclicos pueden estar opcionalmente sustituidos con halo, CN, CF₃, NR₂, amino cíclico, NO₂, OR, CF₃, -(CH₂)_xC(O)(CH₂)_yR, -(CH₂)_xC(O)N(R')(R''), -(CH₂)_xC(O)O(CH₂)_yR, -(CH₂)_xN(R')(R''), -N(R)SO₂R, -O(CH₂)_xC(O)N(R)(R''), -SO₂N(R')(R''), -(CH₂)_xN(R)-(CH₂)_yR, -(CH₂)_xN(R)-C(O)-(CH₂)_yR, -(CH₂)_xN(R)-C(O)-O-(CH₂)_yR, -(CH₂)_xC(O)-N(R)-(CH₂)_yR, -(CH₂)_xC(O)N(R)-(CH₂)_yR, -O-(CH₂)_xC(O)-N(R)-(CH₂)_yR, alquilo sustituido y no sustituido, cicloalquilo sustituido y no sustituido, aralquilo sustituido y no sustituido, alquenilo

55

60

65

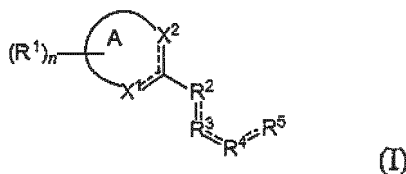
sustituido y no sustituido, alquinilo sustituido y no sustituido, arilo sustituido y no sustituido y un anillo heterocíclico sustituido y no sustituido, en el que el alquilo sustituido, cicloalquilo sustituido, aralquilo sustituido, alquenilo sustituido, alquinilo sustituido, arilo sustituido y anillo heterocíclico sustituido pueden estar sustituidos con uno o más de halo, CN, CF₃, CO₂R, C(O)R, C(O)NR₂, NR₂, amino cíclico, NO₂ y OR.

El término "arilo" o "grupo aromático" como se usa en el presente documento contempla grupos aromáticos de un solo anillo (por ejemplo, fenilo, piridilo, pirazol, etc.) y sistemas de anillos policíclicos (naftilo, quinolina, etc.). Los anillos policíclicos pueden tener dos o más anillos en los que dos átomos son comunes a dos anillos adyacentes (los anillos están "fusionados") en los que al menos uno de los anillos es aromático, por ejemplo, los otros anillos pueden ser cicloalquilos, cicloalquenos, arilo, heterociclos y/o heteroarilos. Además, los grupos arilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados de halo, CN, CF₃, NR₂, amino cíclico, NO₂, OR, CF₃, -(CH₂)_xC(O)(CH₂)_yR, -(CH₂)_xC(O)N(R')(R''), -(CH₂)_xC(O)O(CH₂)_yR, -(CH₂)_xN(R')(R''), -N(R)SO₂R, -O(CH₂)_xC(O)N(R)(R''), -SO₂N(R')(R''), -(CH₂)_xN(R)-(CH₂)_yR, -(CH₂)_xN(R)-C(O)-(CH₂)_yR, -(CH₂)_xN(R)-C(O)-O-(CH₂)_yR, -(CH₂)_xC(O)-N(R)-CH₂-R, -(CH₂)_xC(O)N(R)-(CH₂)_yR, -O-(CH₂)_xC(O)-N(R)-(CH₂)_yR, alquilo sustituido y no sustituido, cicloalquilo sustituido y no sustituido, aralquilo sustituido y no sustituido, alquenilo sustituido y no sustituido, alquinilo sustituido y no sustituido, arilo sustituido y no sustituido, y un anillo heterocíclico sustituido y no sustituido, en el que el alquilo sustituido, cicloalquilo sustituido, aralquilo sustituido, alquenilo sustituido, alquinilo sustituido, arilo sustituido, y el anillo heterocíclico sustituido puede estar sustituido con uno o más de halo, CN, CF₃, CO₂R, C(O)R, C(O)NR₂, NR₂, amino cíclico, NO₂ y OR.

El término "heteroátomo", particularmente como un heteroátomo de anillo, se refiere a N, O y S.

Cada R se selecciona independientemente de H, alquilo sustituido y no sustituido, cicloalquilo sustituido y no sustituido, aralquilo sustituido y no sustituido, arilo sustituido y no sustituido y un anillo heterocíclico sustituido y no sustituido, en el que el alquilo sustituido, cicloalquilo sustituido, aralquilo sustituido, arilo sustituido y el anillo heterocíclico sustituido pueden estar sustituidos con uno o más de halo, CN, CF₃, OH, CO₂H, NO₂, alquilo C₁₋₆, -O-(alquilo C₁₋₆), -NH₂, -NH(alquilo C₁₋₆), -N(alquilo C₁₋₆)₂. Cada R' y R'' se seleccionan independientemente de H, o alquilo sustituido y no sustituido, cicloalquilo sustituido y no sustituido, aralquilo sustituido y no sustituido, arilo sustituido y no sustituido y un anillo heterocíclico sustituido y no sustituido, en el que el alquilo sustituido, cicloalquilo sustituido, aralquilo sustituido, arilo sustituido y anillo heterocíclico sustituido pueden estar sustituidos con uno o más de halo, CN, CF₃, OH, CO₂H, NO₂, alquilo C₁₋₆, -O-(alquilo C₁₋₆), -NH₂, -NH(alquilo C₁₋₆) y -N(alquilo C₁₋₆)₂; o R' y R'' pueden tomarse junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de 5 a 7 miembros que puede contener opcionalmente hasta tres heteroátomos adicionales. Cada x y cada y se seleccionan independientemente de 0 a 4.

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona inhibidores de la teramutina P210^{BCR-ABL-T315I} que tiene la fórmula I



en la que:

el anillo A es un anillo de 5, 6 o 7 miembros o un anillo bicíclico fusionado de 7 a 12 miembros;

X¹ se selecciona de N, N-R⁰ o C-R¹;

X² se selecciona de N, N-R⁰ o C-R¹;

las líneas punteadas representan enlaces opcionales;

cada R¹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, CN, CF₃, NO₂, OR¹¹, -(CH₂)_pC(O)(CH₂)_qR¹¹, -(CH₂)_pC(O)N(R¹²)(R¹³), -(CH₂)_pC(O)O(CH₂)_qR¹¹, -(CH₂)_pN(R¹¹)C(O)R¹¹, -(CH₂)_pN(R¹²)(R¹³), -N(R¹¹)SO₂R¹¹, -OC(O)N(R¹²)(R¹³), -SO₂N(R¹²)(R¹³), halo, arilo y un anillo heterocíclico, y adicionalmente o alternativamente, dos grupos R¹ en átomos del anillo adyacente forman un anillo fusionado de 5 o 6 miembros que contiene de 0 a 3 heteroátomos;

n es 0 a 6,

cada R¹¹ se selecciona independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;

cada R¹² y R¹³ se seleccionan independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico; o R¹² y R¹³ pueden tomarse junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de 5 a 7 miembros que puede contener opcionalmente un heteroátomo adicional;

p es de 0 a 4;

q es de 0 a 4;

R^2 se selecciona de $-CR^{21}_a-$, $-NR^{22}_b-$ y $-(C=R^{23})-$;

cada R^{21} se selecciona independientemente de H, halo, $-NH_2$, $-N(H)(\text{alquilo } C_{1-3})$, $-N(\text{alquilo } C_{1-3})_2$, $-O-(\text{alquilo } C_{1-3})$, OH y alquilo C_{1-3} ;

5 cada R^{22} se selecciona independientemente de H y alquilo C_{1-3} ;

R^{23} se selecciona de O, S, $N-R^0$ y $N-OR^0$;

R^3 se selecciona de $-CR^{31}_c-$, $-NR^{32}_d-$ y $-(C=R^{33})-$;

10 cada grupo R^{31} se selecciona de H, halo, $-NH_2$, $-N(H)(R^0)$, $-N(R^0)_2$, $-OR^0$, OH y alquilo C_{1-3} ;

cada grupo R^{32} se selecciona de H, alquilo, cicloalquilo, alquenoilo, alquinoilo, aralquilo, CO_2R^0 , $C(O)R^0$, arilo y un anillo heterocíclico;

R^{33} se selecciona de O, S, $N-R^{34}$ y $N-OR^0$;

R^{34} se selecciona de H, NO_2 , CN, alquilo, cicloalquilo, alquenoilo, alquinoilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;

15 R^4 se selecciona de $-CR^{41}_e-$, $-NR^{42}_f-$, $-(C=R^{43})-$ y $-O-$;

cada R^{41} se selecciona de H, alquilo, cicloalquilo, alquenoilo, alquinoilo, CO_2R^0 , $C(O)R^0$, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;

20 cada grupo R^{42} se selecciona de H, alquilo, cicloalquilo, alquenoilo, alquinoilo, aralquilo, CO_2R^0 , $C(O)R^0$, arilo y un anillo heterocíclico;

cada R^{43} se selecciona de O, S, $N-R^0$ y $N-OR^0$;

25 con la condición de que cuando R^2 sea $-NR^{22}_b-$ y R^4 sea $-NR^{42}_f-$, entonces R^3 no sea $-NR^{32}_d-$; y que tanto R^3 como R^4 no se seleccionan simultáneamente de $-(C=R^{33})-$ y $-(C=R^{43})-$, respectivamente;

R^5 se selecciona de $-Y-R^6$ y $-Z-R^7$;

Y se selecciona de un enlace químico, O, NR^0 ,

R^6 se selecciona de alquilo, cicloalquilo, alquenoilo, alquinoilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;

30 Z es una cadena hidrocarbonada que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, y opcionalmente sustituida con uno o más de halo, alquilo, cicloalquilo, alquenoilo, alquinoilo, aralquilo, CO_2R^0 , $C(O)R^0$, $C(O)N(R^0)_2$, CN, CF_3 , $N(R^0)_2$, NO_2 y OR^0 ;

R^7 es H o se selecciona de arilo y un anillo heterocíclico;

cada R^0 se selecciona independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;

35 a es 1 o 2;

b es 0 o 1;

c es 1 o 2;

d es 0 o 1;

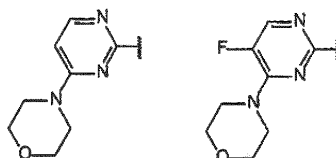
e es 1 o 2; y

40 f es 0 o 1.

Un componente importante y una enseñanza conceptual de la divulgación descrita en el presente documento es que ni las posiciones R^2 ni R^3 de los compuestos son miembros de ninguna estructura de anillo aromático o no aromático. Se ha descubierto que los compuestos que tienen las posiciones R^2 y/o R^3 como miembros de cualquier estructura de anillo aromático o no aromático no inhiben efectivamente la teramuteína T315I, mientras que los compuestos de la invención que carecen de dicho componente del anillo en esta posición, además de tener otros grupos químicos preferidos, son inhibidores potentes de la teramuteína T315I.

En realizaciones preferidas de la divulgación, el anillo A es un anillo aromático.

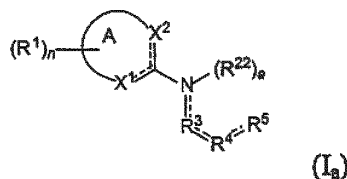
En las realizaciones preferidas de la divulgación, X^1 o X^2 es N. En otra realización preferida, tanto X^1 como X^2 son N. En las realizaciones particularmente preferidas de la divulgación, el anillo A es un anillo de piridina o un anillo de pirimidina. En aún otras realizaciones preferidas, el anillo A se selecciona de las estructuras proporcionadas a continuación:



En una realización preferida, si R^2 o R^4 se selecciona para ser NR^{22}_b- o NR^{42}_f- , respectivamente, entonces R^{31} no se selecciona de halo, $-NH_2$, $-N(H)(R^0)$, $-N(R^0)_2$, $-OR^0$ u OH.

En una realización preferida adicional, la presente divulgación proporciona inhibidores de la teramuteína P210^{BCR-ABL}.

T³¹⁵¹ que tiene la fórmula I_a

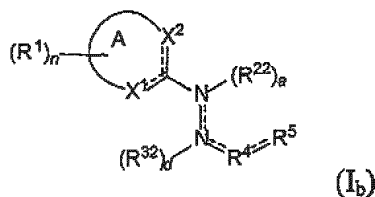


en la que:

- 5 el anillo A es un anillo de 5, 6 o 7 miembros o un anillo bicíclico fusionado de 7 a 12 miembros;
 X^1 se selecciona de N, N-R⁰ o C-R¹;
 X^2 se selecciona de N, N-R⁰ o C-R¹;
 las líneas punteadas representan dobles enlaces opcionales;
- 10 cada R¹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, CN, CF₃, NO₂, OR¹¹, -(CH₂)_pC(O)(CH₂)_qR¹¹, -(CH₂)_pC(O)N(R¹²)(R¹³), -(CH₂)_pC(O)O(CH₂)_qR¹¹, -(CH₂)_pN(R¹¹)C(O)R¹¹, -(CH₂)_pN(R¹²)(R¹³), -N(R¹¹)SO₂R¹¹, -OC(O)N(R¹²)(R¹³), -SO₂N(R¹²)(R¹³), halo, arilo y un anillo heterocíclico, y adicional o alternativamente, dos grupos R¹ en átomos del anillo adyacente forman un anillo fusionado de 5 o 6 miembros que contiene de 0 a 3 heteroátomos;
- 15 n es 0 a 6,
- cada R¹¹ se selecciona independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;
- 20 cada R¹² y R¹³ se seleccionan independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico; o R¹² y R¹³ pueden tomarse junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de 5 a 7 miembros que puede contener opcionalmente un heteroátomo adicional;
 p es de 0 a 4;
 q es de 0 a 4;
- 25 cada R²² se selecciona independientemente de H y alquilo C₁₋₃;
 R^3 se selecciona de -CR³¹_c-, -NR³²_d- y -(C=R³³)_e-;
- cada grupo R³¹ se selecciona de H, halo, -NH₂, -N(H)(R⁰), -N(R⁰)₂, -OR⁰, OH y alquilo C₁₋₃;
- 30 cada grupo R³² se selecciona de H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, CO₂R⁰, C(O)R⁰, arilo y un anillo heterocíclico;
 R^{33} se selecciona de O, S, N-R³⁴ y N-OR⁰;
 R^{34} se selecciona de H, NO₂, CN, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;
- 35 R^4 se selecciona de -CR⁴¹_e-, -NR⁴²_f-, -(C=R⁴³)_g- y -O-;
- cada R⁴¹ se selecciona de H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, CO₂R⁰, C(O)R⁰, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;
- 40 cada grupo R⁴² se selecciona de H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, CO₂R⁰, C(O)R⁰, arilo y un anillo heterocíclico;
- cada R⁴³ se selecciona de O, S, N-R⁰ y N-OR⁰;
- con la condición de que cuando R⁴ sea -NR⁴²_f-, entonces R³ no sea -NR³²_d-; y que tanto R³ como R⁴ no se seleccionan simultáneamente de -(C=R³³)_e- y -(C=R⁴³)_g-, respectivamente;
- 45 R⁵ se selecciona de -Y-R⁶ y -Z-R⁷;
- Y se selecciona de un enlace químico, O, N-R⁰;
- R⁶ se selecciona de alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;
- Z es una cadena hidrocarbonada que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, y opcionalmente sustituida con uno o más de halo, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, CO₂R⁰, C(O)R⁰, C(O)N(R⁰)₂, CN, CF₃, N(R⁰)₂, NO₂ y OR⁰;
- 50 R⁷ es H o se selecciona de arilo y un anillo heterocíclico;
- cada R⁰ se selecciona independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;
- 55 a es 1 o 2;
 b es 0 o 1;
 c es 1 o 2;
 d es 0 o 1;
 e es 1 o 2; y
 f es 0 o 1.

60 En una realización preferida adicional, la presente divulgación proporciona inhibidores de la teramutefina P210^{BCR-ABL}-

T315I que tiene la fórmula Ib



5 en la que:

el anillo A es un anillo de 5, 6 o 7 miembros o un anillo bicíclico fusionado de 7 a 12 miembros;

X¹ se selecciona de N, N-R⁰ o C-R¹;

X² se selecciona de N, N-R⁰ o C-R¹;

10 las líneas punteadas representan dobles enlaces opcionales;

cada R¹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, CN, CF₃, NO₂, OR¹¹, -(CH₂)_pC(O)(CH₂)_qR¹¹, -(CH₂)_pC(O)N(R¹²)(R¹³), -(CH₂)_pC(O)O(CH₂)_qR¹¹, -(CH₂)_pN(R¹¹)C(O)R¹¹, -(CH₂)_pN(R¹²)(R¹³), -N(R¹¹)SO₂R¹¹, -OC(O)N(R¹²)(R¹³), -SO₂N(R¹²)(R¹³), halo, arilo y un anillo heterocíclico, y adicionalmente o alternativamente, dos grupos R¹ en átomos del anillo adyacente forman un anillo fusionado de 5 o 6 miembros que contiene de 0 a 3 heteroátomos;

n es 0 a 6,

cada R¹¹ se selecciona independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;

20 cada R¹² y R¹³ se seleccionan independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico; o R¹² y R¹³ pueden tomarse junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de 5 a 7 miembros que puede contener opcionalmente un heteroátomo adicional;

p es de 0 a 4;

q es de 0 a 4;

25 cada R²² se selecciona independientemente de H y alquilo C₁₋₃;

cada grupo R³² se selecciona de H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, CO₂R⁰, C(O)R⁰, arilo y un anillo heterocíclico;

R⁴ se selecciona de -CR⁴¹_e-, -(C=R⁴³)-, y -O-;

30 cada R⁴¹ se selecciona de H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, CO₂R⁰, C(O)R⁰, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;

cada R⁴³ se selecciona de O, S, N-R⁰ y N-OR⁰;

35 R⁵ se selecciona de -Y-R⁶ y -Z-R⁷;

Y se selecciona de un enlace químico, O, N-R⁰;

R⁶ se selecciona de alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;

40 Z es una cadena hidrocarbonada que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, y opcionalmente sustituida con uno o más de halo, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, CO₂R⁰, C(O)R⁰, C(O)N(R⁰)₂, CN, CF₃, N(R⁰)₂, NO₂ y OR⁰;

R⁷ es H o se selecciona de arilo y un anillo heterocíclico;

cada R⁰ se selecciona independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;

45 a es 1 o 2;

b es 0 o 1;

c es 1 o 2;

d es 0 o 1;

e es 1 o 2; y

f es 0 o 1.

50 En las realizaciones preferidas de la divulgación, R², R³ y R⁴ de fórmula I se seleccionan para dar los siguientes grupos químicos:

-N(R²²)-N=C(R⁴¹)-

55 -N(R²²)-N(R³²)-C(=O)-

-N(R²²)-N(R³²)-C(R⁴¹)(R⁴¹)-

-N(R²²)-C(R³¹)(R³¹)-C(R⁴¹)(R⁴¹)-

-N(R²²)-C(R³¹)(R³¹)-C(=O)-

-C(R²¹)=C=C(R⁴¹)-

60 -C(R²¹)=C(R³¹)-C(=O)-

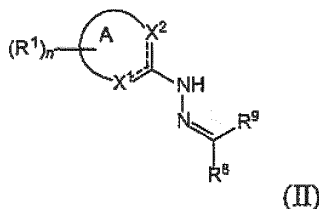
-C(R²¹)=C(R³¹)-C(R⁴¹)(R⁴¹)-
 -C(R²¹)(R²¹)-C(R³¹)=C(R⁴¹)-
 -C(R²¹)(R²¹)-C(R³¹)(R³¹)C(=O)-
 -C(R²¹)(R²¹)-C(R³¹)(R³¹)-C(R⁴¹)(R⁴¹)-
 5 -C(R²¹)(R²¹)-N(R³²)-C(=O)-
 -C(R²¹)(R²¹)-N(R³²)-C(R⁴¹)(R⁴¹)-
 -N(R²²)-C(=O)-C(R⁴¹)(R⁴¹)-
 -N(R²²)-C(=O)-N(R⁴¹)-
 -N(R²²)-C(=O)-O-
 10 -C(R²¹)(R²¹)-C(=O)-C(R⁴¹)(R⁴¹)-
 -C(R²¹)(R²¹)-C(=O)-N(R⁴²)-
 -N(R²²)-C(=NR³⁴)-N(R⁴²)-
 -C(=O)-(R³²)-N(R⁴²).

Los grupos químicos particularmente preferidos para R², R³ y R⁴ incluyen:

-N(R²²)-N=C(R⁴¹)-
 -N(R²²)-N(R³²)-C(=O)-
 -N(R²²)-C(R³¹)(R³¹)-C(R⁴¹)(R⁴¹)-
 20 -N(R²²)-C(R³¹)(R³¹)-C(=O)-
 -C(R²¹)(R²¹)-C(=O)-C(R⁴¹)(R⁴¹)-
 -C(R²¹)(R²¹)-C(O)-N(R⁴²)-
 -N(R²²)-C(=NR³⁴)-N(R⁴²)-
 -C(=O)-N(R³²)-N(R⁴²).

En una realización preferida adicional, R⁶ o R⁷ es un grupo arilo, que puede estar opcionalmente sustituido. Los grupos arilo particularmente preferidos incluyen fenilo y piridilo sustituido o no sustituido. En realizaciones adicionales o alternativas, se prefiere que los sustituyentes R²¹ y R²² se seleccionen independientemente de grupos que tienen un volumen estérico pequeño y se seleccionan preferiblemente de H y CH₃, y más preferiblemente son H.

En una realización preferida adicional, la presente divulgación proporciona inhibidores de la teramuteína P210^{BCR-ABL-T3151} que tiene la fórmula II



donde

el anillo A es un anillo de 5, 6 o 7 miembros o un anillo bicíclico fusionado de 7 a 12 miembros;

X¹ se selecciona de N, N-R⁰ o C-R¹;

X² se selecciona de N, N-R⁰ o C-R¹;

las líneas punteadas representan dobles enlaces opcionales;

cada R¹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, CN, CF₃, NO₂, OR¹¹, -(CH₂)_pC(O)(CH₂)_qR¹¹, -(CH₂)_pC(O)N(R¹²)(R¹³), -(CH₂)_pC(O)O(CH₂)_pR¹¹, -(CH₂)_pN(R¹¹)C(O)R¹¹, -(CH₂)_pN(R¹²)(R¹³), -N(R¹¹)SO₂R¹¹, -OC(O)N(R¹²)(R¹³), -SO₂N(R¹²)(R¹³), halo, arilo y un anillo heterocíclico, y adicionalmente o alternativamente, dos grupos R¹ en átomos del anillo adyacente forman un anillo fusionado de 5 o 6 miembros que contiene de 0 a 3 heteroátomos;

n es 0 a 6,

cada R¹¹ se selecciona independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;

cada R¹² y R¹³ se seleccionan independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico; o R¹² y R¹³ pueden tomarse junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de 5 a 7 miembros que puede contener opcionalmente un heteroátomo adicional;

p es 0 a 4;

q es de 0 a 4;

R⁸ se selecciona del grupo que consiste en se selecciona de H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, CO₂R⁰, C(O)R⁰, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;

R⁹ se selecciona de -Y-R⁶ y -Z-R⁷;

Y se selecciona de un enlace químico, O, N-R⁰,

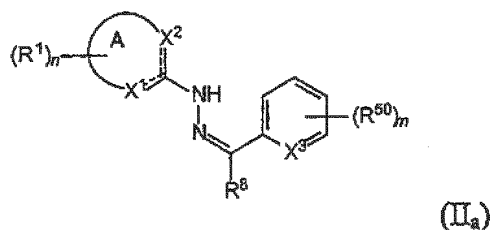
R⁶ se selecciona de alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;

Z es una cadena hidrocarbonada que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, y opcionalmente sustituida con uno o más de halo, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, CO₂R⁰, C(O)R⁰, C(O)N(R⁰)₂, CN, CF₃, N(R⁰)₂, NO₂ y OR⁰;

R⁷ es H o se selecciona de arilo y un anillo heterocíclico; y

cada R⁰ se selecciona independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico.

En una realización preferida adicional, la presente divulgación proporciona inhibidores de la teramuteína P210^{BCR-ABL-T315I} que tiene la fórmula II_a



en la que

el anillo A es un anillo de 5, 6 o 7 miembros o un anillo bicíclico fusionado de 7 a 12 miembros;

X¹ se selecciona de N, N-R⁰ o C-R¹;

X² se selecciona de N, N-R⁰ o C-R¹;

las líneas punteadas representan dobles enlaces opcionales;

cada R¹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, CN, CF₃, NO₂, OR¹¹, -(CH₂)_pC(O)(CH₂)_qR¹¹, -(CH₂)_pC(O)N(R¹²)(R¹³), -(CH₂)_pC(O)O(CH₂)_qR¹¹, -(CH₂)_pN(R¹¹)C(O)R¹¹, -(CH₂)_pN(R¹²)(R¹³), -N(R¹¹)SO₂R¹¹, -OC(O)N(R¹²)(R¹³), -SO₂N(R¹²)(R¹³), halo, arilo y un anillo heterocíclico, y adicionalmente o alternativamente, dos grupos R¹ en átomos del anillo adyacente forman un anillo fusionado de 5 o 6 miembros que contiene de 0 a 3 heteroátomos;

n es 0 a 6,

cada R¹¹ se selecciona independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;

cada R¹² y R¹³ se seleccionan independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico; o R¹² y R¹³ pueden tomarse junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de 5 a 7 miembros que puede contener opcionalmente un heteroátomo adicional;

p es 0 a 4;

q es de 0 a 4;

R⁸ se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, CO₂R⁰, C(O)R⁰, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;

X³ es N, CH o C-R⁵⁰;

cada R⁵⁰ se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, CN, CF₃, NO₂, OR⁵¹, -(CH₂)_rC(O)(CH₂)_sR⁵¹, -(CH₂)_rC(O)N(R⁵²)(R⁵³), -(CH₂)_rC(O)O(CH₂)_sR⁵¹, -(CH₂)_rN(R⁵¹)C(O)R⁵¹, -(CH₂)_rN(R⁵²)(R⁵³), -N(R⁵¹)SO₂R⁵¹, -OC(O)N(R⁵²)(R⁵³), -SO₂N(R⁵²)(R⁵³), halo, arilo y un anillo heterocíclico, y adicionalmente o alternativamente, dos grupos R⁵⁰ en átomos del anillo adyacente forman un anillo fusionado de 5 o 6 miembros que contiene de 0 a 3 heteroátomos;

R⁵¹ se selecciona de H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;

R⁵² y R⁵³ se seleccionan independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico; o R⁵² y R⁵³ pueden tomarse junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de 5 a 7 miembros que puede contener opcionalmente un heteroátomo adicional;

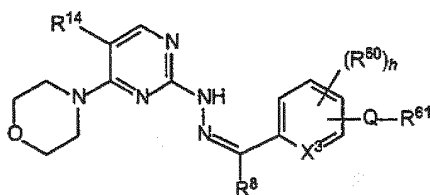
r es 0 a 4;

s es 0 a 4;

m es 0 a 4; y

cada R⁰ se selecciona independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico.

En una realización preferida adicional, la presente divulgación proporciona inhibidores de la teramuteína P210^{BCR-ABL-T315I} que tiene la fórmula II_b

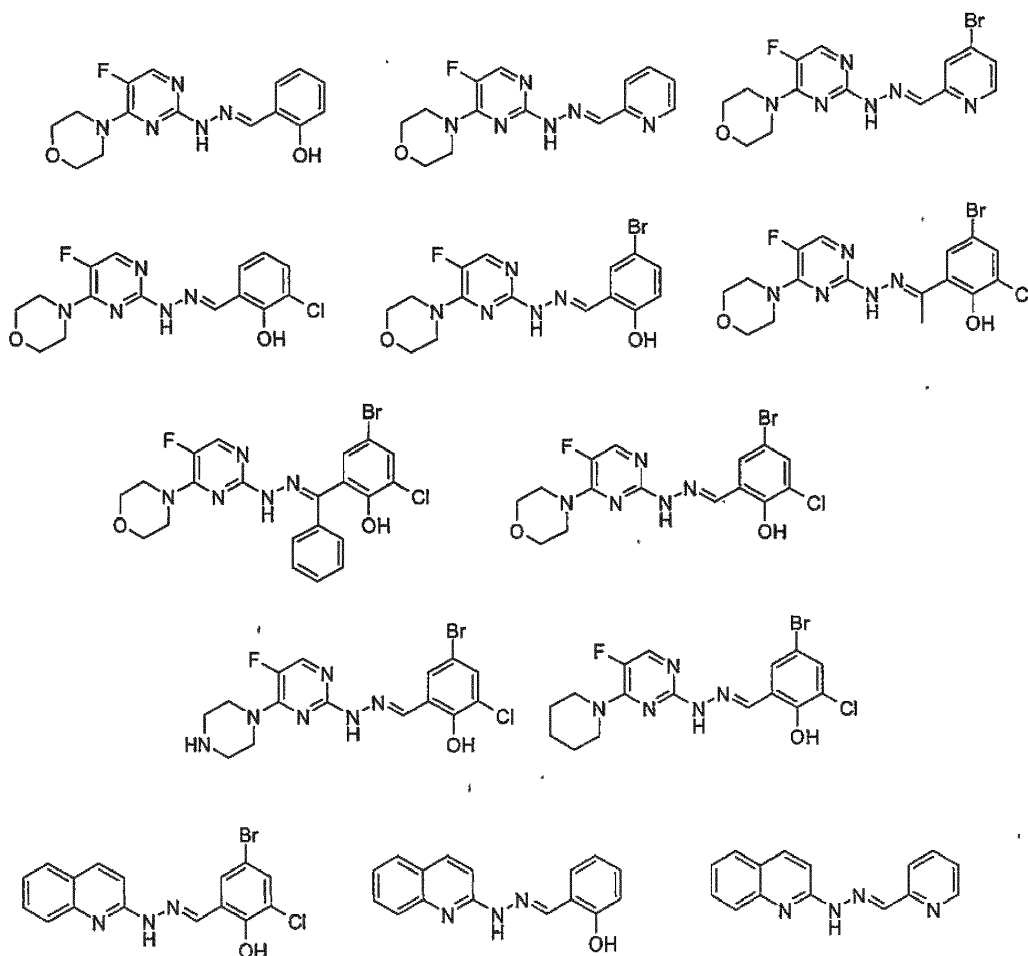


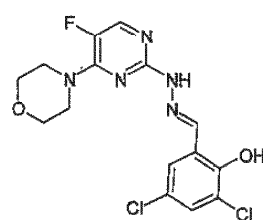
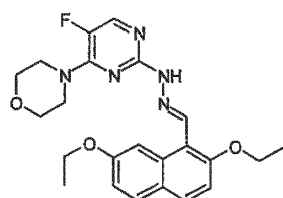
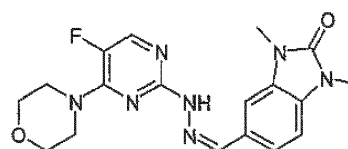
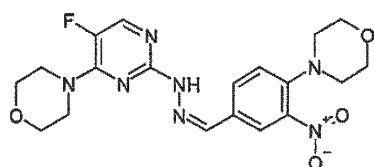
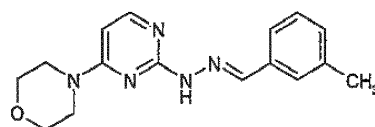
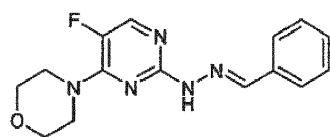
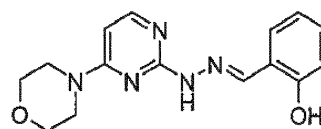
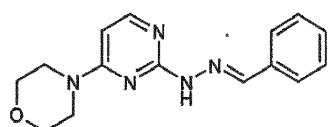
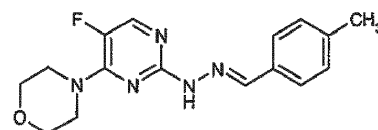
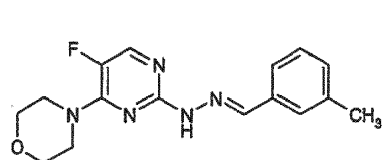
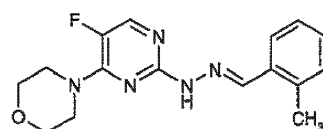
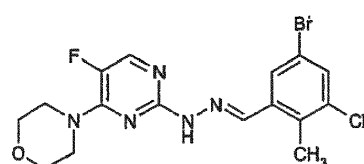
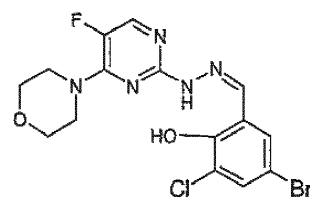
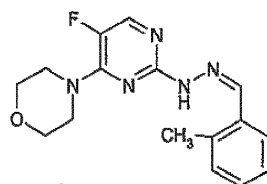
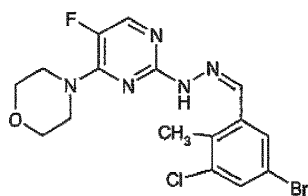
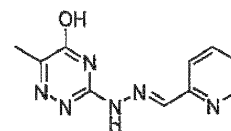
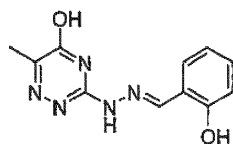
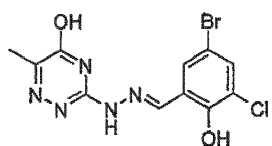
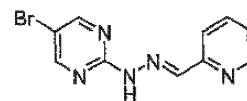
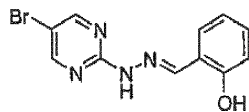
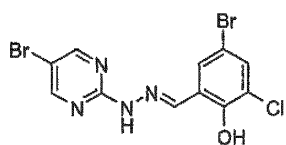
en la que:

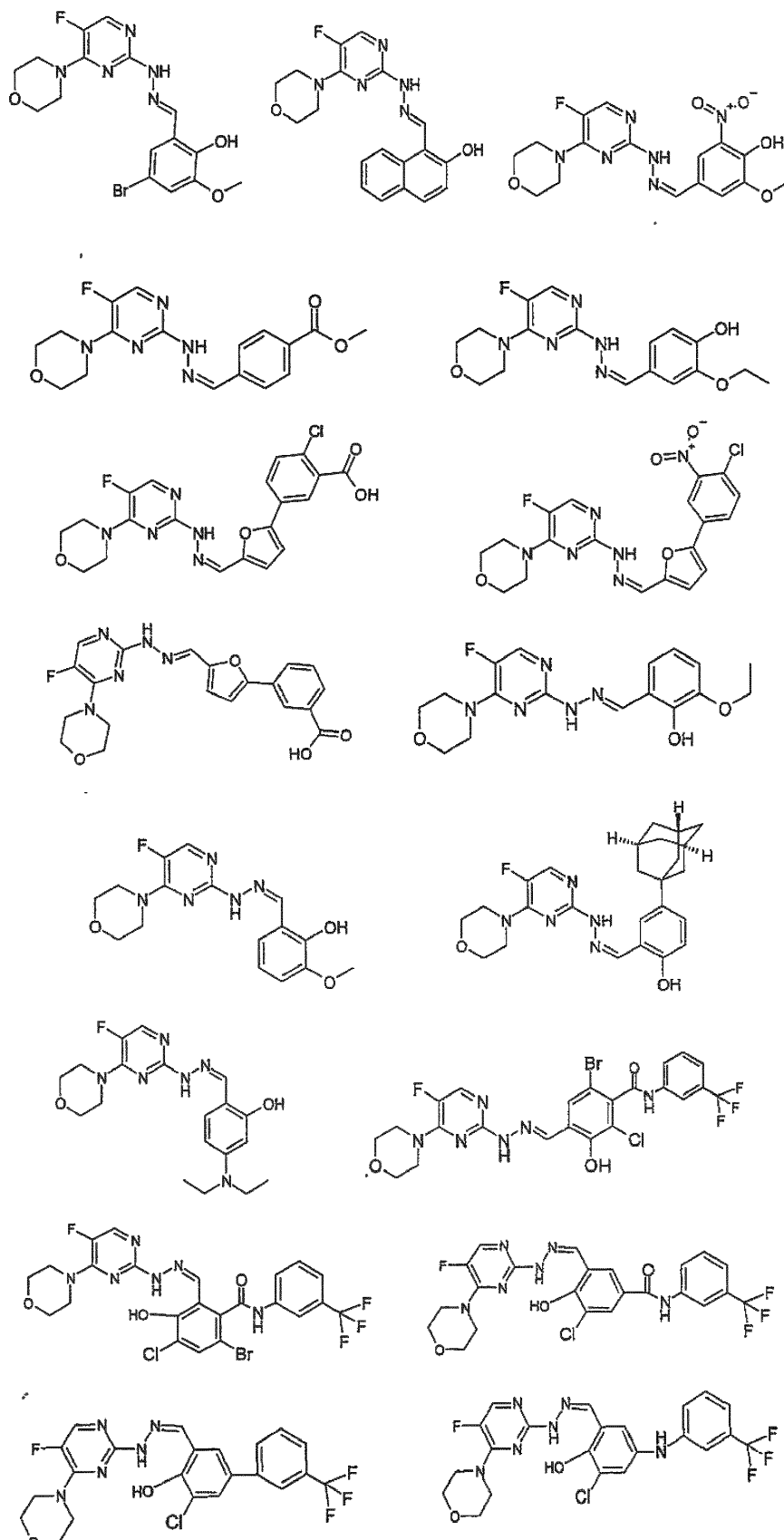
- 5 R^{14} se selecciona de H y F;
 R^8 se selecciona del grupo que consiste en se selecciona de H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, $CO_2 R^0$, $C(O)R^0$, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;
 X^3 es N, CH o C- R^{60} ;
 cada R^{60} se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo,
 10 aralquilo, CN, CF_3 , NO_2 , OR^0 , halo, arilo y un anillo heterocíclico;
 R^{61} se selecciona de arilo y un anillo heterocíclico;
 Q se selecciona de un enlace químico o un grupo que tiene la fórmula $-O-$, $-(CH_2)_i-$, $-(CH_2)_iC(O)(CH_2)_j-$, $-(CH_2)_i-$
 $N(R^{62})-(CH_2)_j-$, $-(CH_2)_iC(O)-N(R^{62})-(CH_2)_j-$, $-(CH_2)_iC(O)O(CH_2)_j-$, $-(CH_2)_iN(R^{62})C(O)-(CH_2)_j-$, $-(CH_2)_iOC(O)N(R^{62})-$
 $(CH_2)_j-$, y $-O-(CH_2)_iC(O)N(R^{62})-(CH_2)_j-$;
 15 R^{62} se selecciona de arilo y un anillo heterocíclico;
 cada R^0 se selecciona independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;
 h es de 0 a 4;
 i es de 0 a 4; y
 j es de 0 a 4.

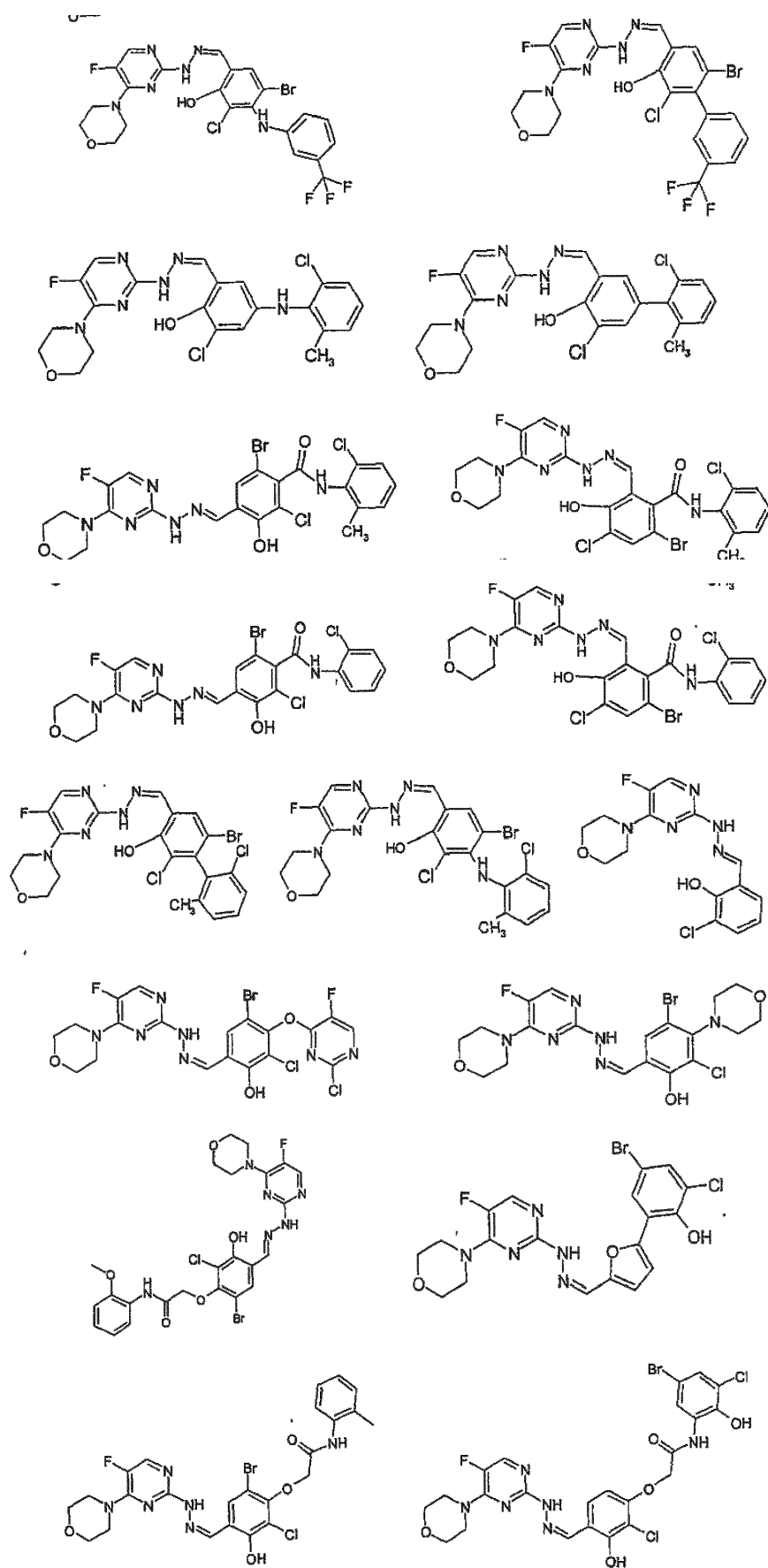
20 En realizaciones preferidas de compuestos de la fórmula IIb, R^{60} se selecciona de halo, CF_3 y OH.

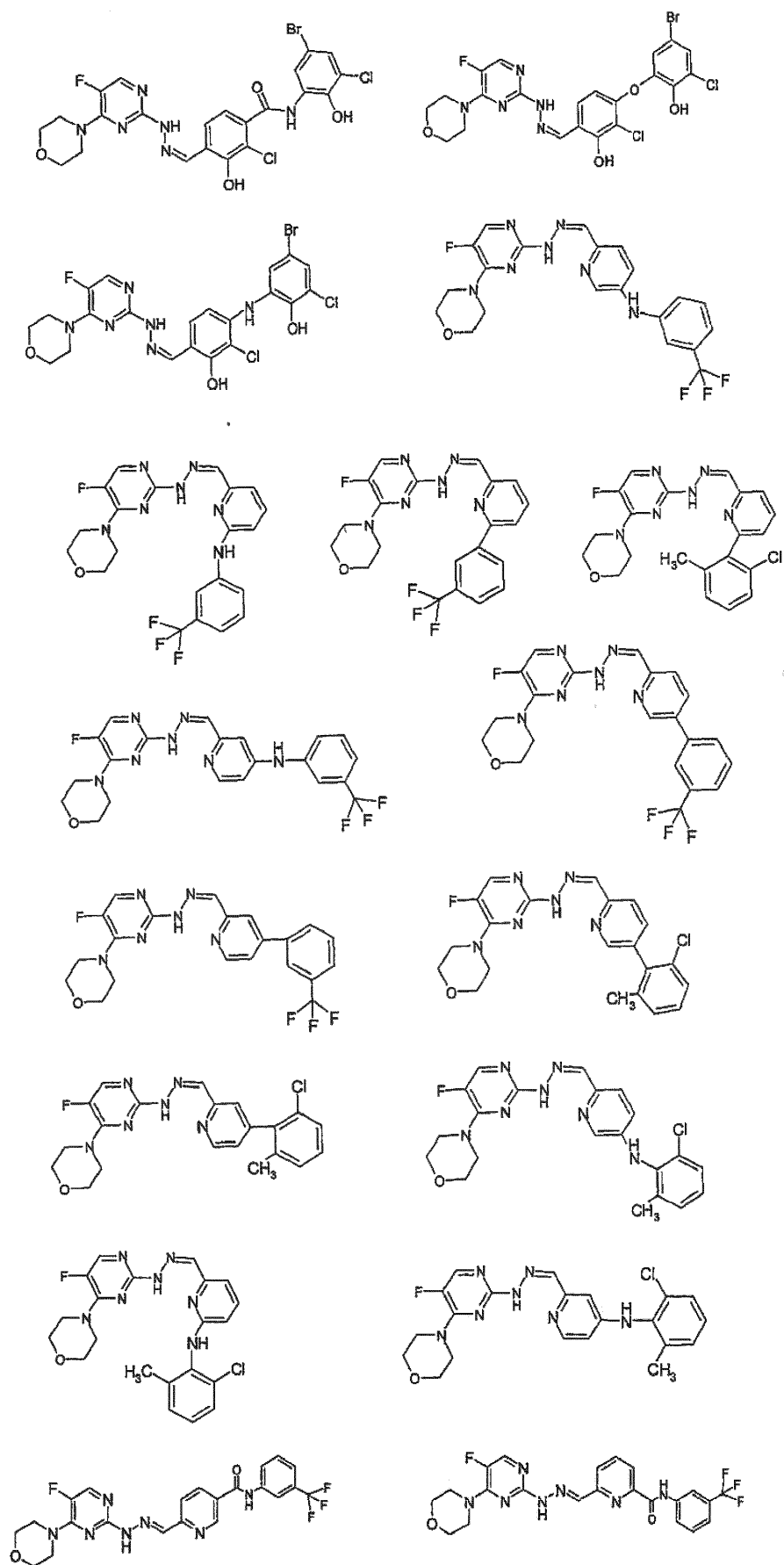
Los ejemplos de compuestos de la fórmula II, IIa o IIb incluyen las siguientes estructuras:

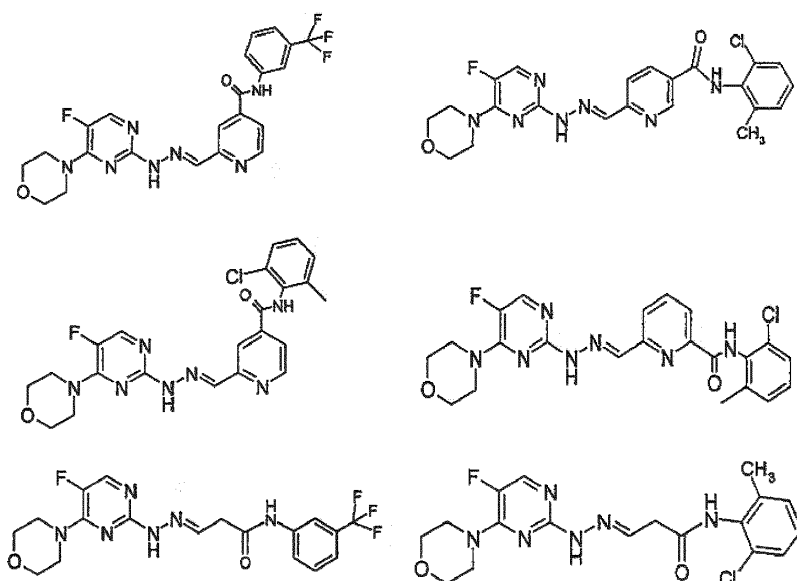




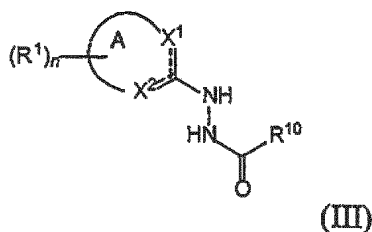






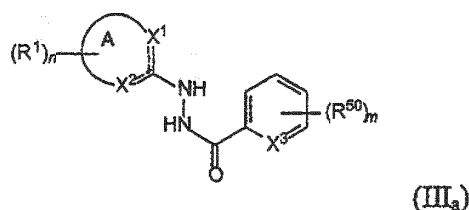


5 En una realización preferida adicional, la presente divulgación proporciona inhibidores de la teramuteína P210^{BCR-ABL-T315I} que tiene la fórmula III



- 10 en la que
- 15 el anillo A es un anillo de 5, 6 o 7 miembros o un anillo bicíclico fusionado de 7 a 12 miembros;
 X^1 se selecciona de N, N-R⁰ o C-R¹;
 X^2 se selecciona de N, N-R⁰ o C-R¹;
 las líneas punteadas representan dobles enlaces opcionales;
 cada R¹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, cicloalquilo, alquenoilo, alquinilo, aralquilo, CN, CF₃, NO₂, OR¹¹, -(CH₂)_pC(O)(CH₂)_qR¹¹, -(CH₂)_pC(O)N(R¹²)(R¹³), -(CH₂)_pC(O)O(CH₂)_qR¹¹, -
 20 (CH₂)_pN(R¹¹)C(O)R¹¹, -(CH₂)_pN(R¹²)(R¹³), -N(R¹¹)SO₂R¹¹, -OC(O)N(R¹²)(R¹³), -SO₂N(R¹²)(R¹³), halo, arilo y un anillo heterocíclico, y adicionalmente o alternativamente, dos grupos R¹ en átomos del anillo adyacente forman un anillo fusionado de 5 o 6 miembros que contiene de 0 a 3 heteroátomos;
 n es 0 a 6,
- 25 cada R¹¹ se selecciona independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, alquenoilo, alquinilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;
 cada R¹² y R¹³ se seleccionan independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, alquenoilo, alquinilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico; o R¹² y R¹³ pueden tomarse junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de 5 a 7 miembros que puede contener opcionalmente un heteroátomo adicional;
- 30 p es 0 a 4;
 q es de 0 a 4;
- R¹⁰ se selecciona de -Y'-R¹⁸;
 Y' se selecciona de un enlace químico, O, NR⁰, y una cadena hidrocarbonada que tiene de 1 a 4 átomos de
 35 carbono, y opcionalmente sustituida con uno o más de halo, alquilo, cicloalquilo, alquenoilo, alquinilo, aralquilo, CO₂R⁰, C(O)R⁰, C(O)N(R⁰)₂, CN, CF₃, N(R⁰)₂, NO₂ y OR⁰;
 R¹⁸ se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo, cicloalquilo, alquenoilo, alquinilo, aralquilo, CF₃, arilo y un anillo heterocíclico; y
 cada R⁰ se selecciona independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico.

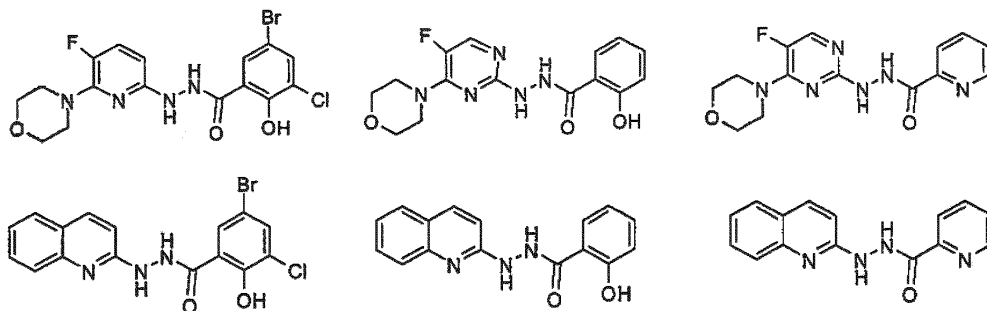
40 En una realización preferida adicional, la presente divulgación proporciona inhibidores de la teramuteína P210^{BCR-ABL-T315I} que tiene la fórmula III_a

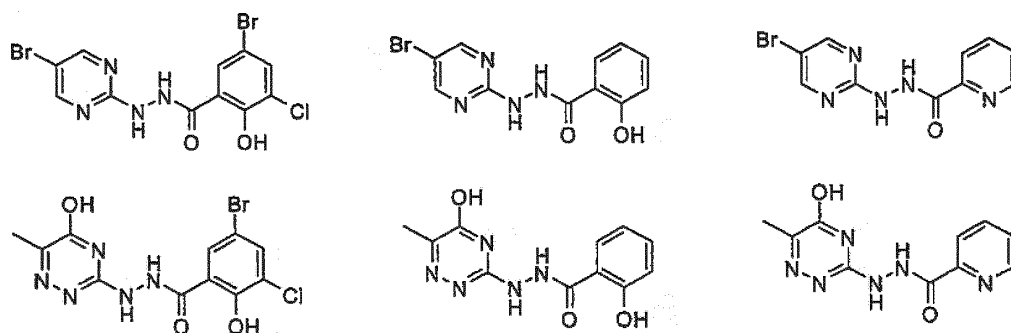


en la que:

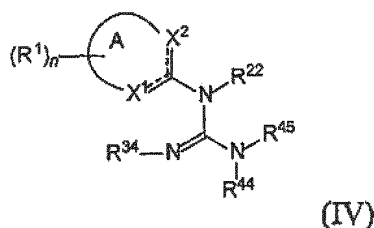
- 5 el anillo A es un anillo de 5, 6 o 7 miembros o un anillo bicíclico fusionado de 7 a 12 miembros;
 X^1 se selecciona de N, N-R⁰ o C-R¹;
 X^2 se selecciona de N, N-R⁰ o C-R¹;
 las líneas punteadas representan dobles enlaces opcionales;
 cada R¹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo,
 10 aralquilo, CN, CF₃, NO₂, OR¹¹, -(CH₂)_pC(O)(CH₂)_qR¹¹, -(CH₂)_pC(O)N(R¹²)(R¹³), -(CH₂)_pC(O)O(CH₂)_qR¹¹, -(CH₂)_p
 N(R¹¹)C(O)R¹¹, -(CH₂)_pN(R¹²)(R¹³), -N(R¹¹)SO₂R¹¹, -OC(O)N(R¹²)(R¹³), -SO₂N(R¹²)(R¹³), halo, arilo y un anillo
 heterocíclico, y adicionalmente o alternativamente, dos grupos R¹ en los átomos del anillo adyacente forman un
 anillo fusionado de 5 o 6 miembros que contiene de 0 a 3 heteroátomos;
 n es 0 a 6,
 15 cada R¹¹ se selecciona independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, arilo y un anillo
 heterocíclico;
 cada R¹² y R¹³ se seleccionan independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, arilo y un
 anillo heterocíclico; o R¹² y R¹³ pueden tomarse junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de 5
 20 a 7 miembros que puede contener opcionalmente un heteroátomo adicional;
 p es de 0 a 4;
 q es de 0 a 4;
 X^3 es N, CH o C-R⁵⁰;
 25 cada R⁵⁰ se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo,
 aralquilo, CN, CF₃, NO₂, OR⁵¹, -(CH₂)_rC(O)(CH₂)_sR⁵¹, -(CH₂)_rC(O)N(R⁵²)(R⁵³), -(CH₂)_rC(O)O(CH₂)_sR⁵¹, -
 (CH₂)_rN(R⁵¹)C(O)R⁵¹, -(CH₂)_rN(R⁵²)(R⁵³), -N(R⁵¹)SO₂R⁵¹, -OC(O)N(R⁵²)(R⁵³), -SO₂N(R⁵²)(R⁵³), halo, arilo y un anillo
 heterocíclico, y adicionalmente o alternativamente, dos grupos R⁵⁰ en átomos del anillo adyacente forman un anillo
 fusionado de 5 o 6 miembros que contiene de 0 a 3 heteroátomos;
 30 R⁵¹ se selecciona de H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;
 R⁵² y R⁵³ se seleccionan independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, arilo y un anillo
 heterocíclico; o R⁵² y R⁵³ pueden tomarse junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de 5 a 7
 miembros que puede contener opcionalmente un heteroátomo adicional;
 35 r es de 0 a 4;
 s es de 0 a 4;
 m es de 0 a 4; y
 cada R⁰ se selecciona independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico.

Los ejemplos de compuestos de la fórmula III o III incluyen las siguientes estructuras:





- 5 En una realización adicional, la presente divulgación proporciona inhibidores de la teramutefina P210^{BCR-ABL T315I} que tiene la fórmula IV



- 10 en la que:

el anillo A es un anillo de 5, 6 o 7 miembros o un anillo bicíclico fusionado de 7 a 12 miembros;

X^1 se selecciona de N, N- R^0 o C- R^1 ;

X^2 se selecciona de N, N- R^0 o C- R^1 ;

- 15 las líneas punteadas representan dobles enlaces opcionales;

cada R^1 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, CN, CF_3 , NO_2 , OR^{11} , $-(CH_2)_pC(O)(CH_2)_qR^{11}$, $-(CH_2)_pC(O)N(R^{12})(R^{13})$, $-(CH_2)_pC(O)O(CH_2)_qR^{11}$, $-(CH_2)_pN(R^{11})C(O)R^{11}$, $-(CH_2)_pN(R^{12})(R^{13})$, $-N(R^{11})SO_2R^{11}$, $-OC(O)N(R^{12})(R^{13})$, $-SO_2N(R^{12})(R^{13})$, halo, arilo y un anillo heterocíclico, y adicionalmente o alternativamente, dos grupos R^1 en los átomos del anillo adyacente forman un anillo fusionado de 5 o 6 miembros que contiene de 0 a 3 heteroátomos;

n es 0 a 6,

cada R^{11} se selecciona independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;

- 25 cada R^{12} y R^{13} se seleccionan independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico; o R^{12} y R^{13} pueden tomarse junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de 5 a 7 miembros que puede contener opcionalmente un heteroátomo adicional;

p es de 0 a 4;

q es de 0 a 4;

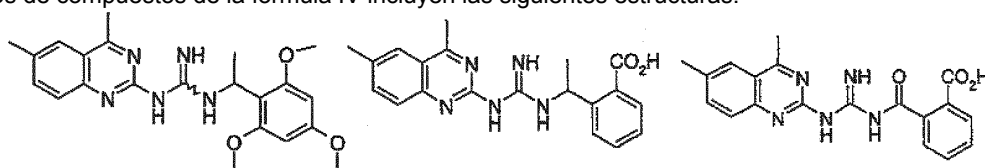
- 30 R^{22} se selecciona de H y alquilo C_{1-3} ;
- R^{34} se selecciona de H, NO_2 , CN, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;
- R^{44} se selecciona de H, alquilo, cicloalquilo, $-(C=O)R^0$, alqueno, alquino, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;
- R^{45} se selecciona de $-Y''-R^{19}$;

- 35 Y'' se selecciona de un enlace químico, O, NR^0 , y una cadena hidrocarbonada que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, y opcionalmente sustituida con uno o más de halo, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, CO_2R^0 , $C(O)R^0$, $C(O)N(R^0)_2$, CN, CF_3 , $N(R^0)_2$, NO_2 y OR^0 ;

R^{19} se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, CF_3 , arilo y un anillo heterocíclico; y

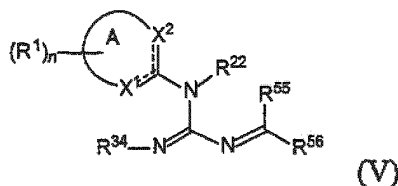
- 40 cada R^0 se selecciona independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico.

Los ejemplos de compuestos de la fórmula IV incluyen las siguientes estructuras:



- 45 En una realización adicional, la presente divulgación proporciona inhibidores de la teramutefina P210^{BCR-ABL T315I} que

tiene la fórmula V



5 en la que:

el anillo A es un anillo de 5, 6 o 7 miembros o un anillo bicíclico fusionado de 7 a 12 miembros;

X¹ se selecciona de N, N-R⁰ o C-R¹;

X² se selecciona de N, N-R⁰ o C-R¹;

10 las líneas punteadas representan dobles enlaces opcionales;

cada R¹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, CN, CF₃, NO₂, OR¹¹, -(CH₂)_pC(O)(CH₂)_qR¹¹, -(CH₂)_pC(O)N(R¹²)(R¹³), -(CH₂)_pC(O)O(CH₂)_qR¹¹, -(CH₂)_pN(R¹¹)C(O)R¹¹, -(CH₂)_pN(R¹²)(R¹³), -N(R¹¹)SO₂R¹¹, -OC(O)N(R¹²)(R¹³), -SO₂N(R¹²)(R¹³), halo, arilo y un anillo heterocíclico, y adicionalmente o alternativamente, dos grupos R¹ en los átomos del anillo adyacente forman un

15 anillo fusionado de 5 o 6 miembros que contiene de 0 a 3 heteroátomos;

n es 0 a 6,

cada R¹¹ se selecciona independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;

20 cada R¹² y R¹³ se seleccionan independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico; o R¹² y R¹³ pueden tomarse junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de 5 a 7 miembros que puede contener opcionalmente un heteroátomo adicional;

p es de 0 a 4;

q es de 0 a 4;

25 R²² se selecciona de H y alquilo C₁₋₃;

R³⁴ se selecciona de H, NO₂, CN, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;

R⁵⁵ se selecciona de H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;

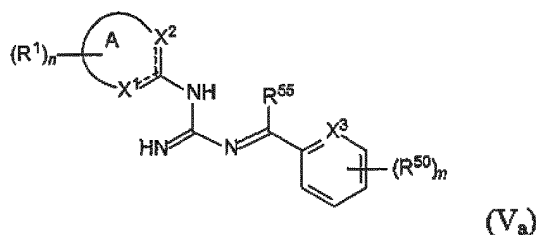
R⁵⁶ se selecciona de -Y"-R¹⁹;

30 Y" se selecciona de un enlace químico, O, NR⁰-, y una cadena hidrocarbonada que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, y opcionalmente sustituida con uno o más de halo, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, CO₂R⁰, C(O)R⁰, C(O)N(R⁰)₂, CN, CF₃, N(R⁰)₂, NO₂ y OR⁰;

R¹⁹ se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, CF₃, arilo y un anillo heterocíclico; y

35 cada R⁰ se selecciona independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico.

En una realización adicional, la presente divulgación proporciona inhibidores de la teramuteína P210^{BCR-ABL-T315I} que tiene la fórmula V_a



40

en la que:

el anillo A es un anillo de 5, 6 o 7 miembros o un anillo bicíclico fusionado de 7 a 12 miembros;

45 X¹ se selecciona de N, N-R⁰ o C-R¹;

X² se selecciona de N, N-R⁰ o C-R¹;

las líneas punteadas representan dobles enlaces opcionales;

cada R¹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, CN, CF₃, NO₂, OR¹¹, -(CH₂)_pC(O)(CH₂)_qR¹¹, -(CH₂)_pC(O)N(R¹²)(R¹³), -(CH₂)_pC(O)O(CH₂)_qR¹¹, -(CH₂)_pN(R¹¹)C(O)R¹¹, -(CH₂)_pN(R¹²)(R¹³), -N(R¹¹)SO₂R¹¹, -OC(O)N(R¹²)(R¹³), -SO₂N(R¹²)(R¹³), halo, arilo y un anillo heterocíclico, y adicional o alternativamente, dos grupos R¹ en átomos del anillo adyacente forman un anillo condensado de 5 o 6 miembros que contiene de 0 a 3 heteroátomos;

50

n es 0 a 6,

cada R^{11} se selecciona independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;

5 cada R^{12} y R^{13} se seleccionan independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico; o R^{12} y R^{13} pueden tomarse junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de 5 a 7 miembros que puede contener opcionalmente un heteroátomo adicional;

p es de 0 a 4;

q es de 0 a 4;

10 R^{55} se selecciona de H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;

X^3 es N o C- R^{50} ;

15 cada R^{50} se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, CN, CF_3 , NO_2 , OR^{51} , $-(CH_2)_rC(O)(CH_2)_sR^{51}$, $-(CH_2)_rC(O)N(R^{52})(R^{53})$, $-(CH_2)_rC(O)O(CH_2)_sR^{51}$, $-(CH_2)_rN(R^{51})C(O)R^{51}$, $-(CH_2)_rN(R^{52})(R^{53})$, $-N(R^{51})SO_2R^{51}$, $-OC(O)N(R^{52})(R^{53})$, $-SO_2N(R^{52})(R^{53})$, halo, arilo y un anillo heterocíclico, y adicionalmente o alternativamente, dos grupos R^{50} en átomos del anillo adyacente forman un anillo fusionado de 5 o 6 miembros que contiene de 0 a 3 heteroátomos;

R^{51} se selecciona de H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;

20 R^{52} y R^{53} se seleccionan independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico; o R^{52} y R^{53} pueden tomarse junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de 5 a 7 miembros que puede contener opcionalmente un heteroátomo adicional;

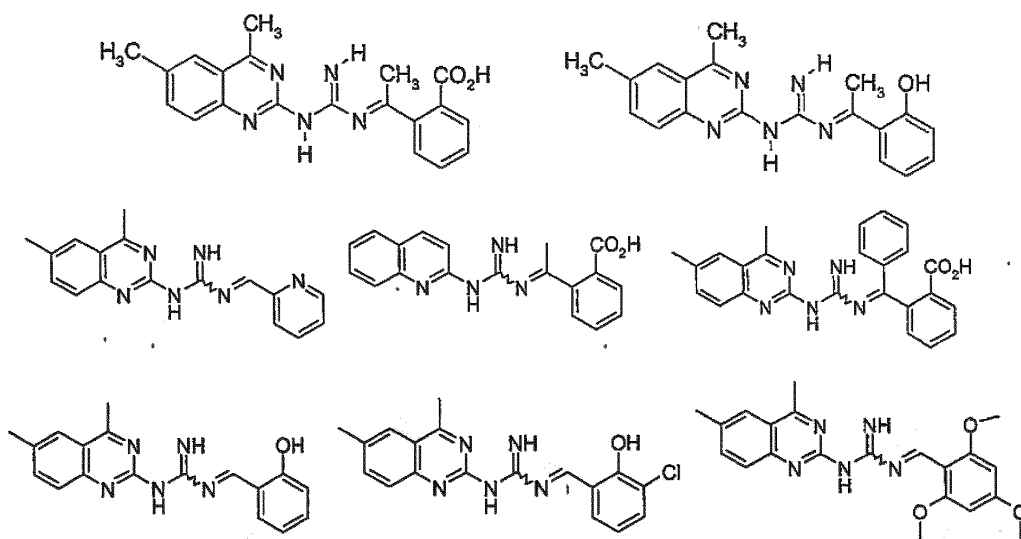
r es de 0 a 4;

s es de 0 a 4;

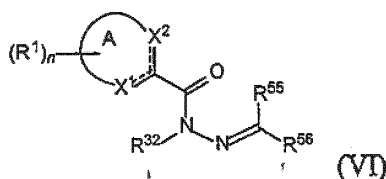
25 m es de 0 a 4; y

cada R^0 se selecciona independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico.

Los ejemplos de compuestos de la fórmula V o V_a incluyen las siguientes estructuras:



En una realización adicional, la presente divulgación proporciona inhibidores de la teramutefina P210^{BCR-ABL-T315I} que tiene la fórmula VI



en la que:

45 el anillo A es un anillo de 5, 6 o 7 miembros o un anillo bicíclico fusionado de 7 a 12 miembros;

X^1 se selecciona de N, N- R^0 o C- R^1 ;

X^2 se selecciona de N, N- R^0 o C- R^1 ;

las líneas punteadas representan dobles enlaces opcionales;

cada R^1 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, CN, CF_3 , NO_2 , OR^{11} , $-(CH_2)_pC(O)(CH_2)_qR^{11}$, $-(CH_2)_pC(O)N(R^{12})(R^{13})-(CH_2)_pC(O)O(CH_2)_qR^{11}$, $-(CH_2)_pN(R^{11})C(O)R^{11}$, $-(CH_2)_pN(R^{12})(R^{13})$, $-N(R^{11})SO_2R^{11}$, $-OC(O)N(R^{12})(R^{13})$, $-SO_2N(R^{12})(R^{13})$, halo, arilo y un anillo heterocíclico, y adicionalmente o alternativamente, dos grupos R^1 en los átomos del anillo adyacente forman un anillo fusionado de 5 o 6 miembros que contiene de 0 a 3 heteroátomos;

n es 0 a 6,

cada R^{11} se selecciona independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;

cada R^{12} y R^{13} se seleccionan independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico; o R^{12} y R^{13} pueden tomarse junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de 5 a 7 miembros que puede contener opcionalmente un heteroátomo adicional;

p es de 0 a 4;

q es de 0 a 4;

R^{55} se selecciona de H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;

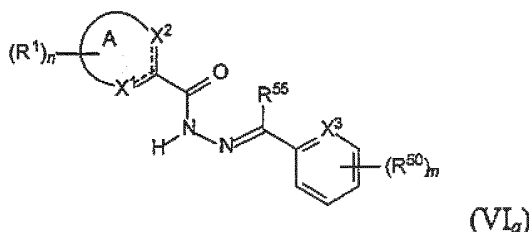
R^{56} se selecciona de $-Y''-R^{19}$;

Y'' se selecciona de un enlace químico, O, NR^0 , y una cadena hidrocarbonada que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, y opcionalmente sustituida con uno o más de halo, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, CO_2R^0 , $C(O)R^0$, $C(O)N(R^0)_2$, CN, CF_3 , $N(R^0)_2$, NO_2 y OR^0 ;

R^{19} se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, CF_3 , arilo y un anillo heterocíclico; y

cada R^0 se selecciona independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico.

En una realización adicional, la presente divulgación proporciona inhibidores de la teramutefina P210^{BCR-ABL-T3151} que tiene la fórmula VI_a



en la que:

el anillo A es un anillo de 5, 6 o 7 miembros o un anillo bicíclico fusionado de 7 a 12 miembros;

X^1 se selecciona de N, $N-R^0$ o $C-R^1$;

X^2 se selecciona de N, $N-R^0$ o $C-R^1$;

las líneas punteadas representan dobles enlaces opcionales;

cada R^1 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, CN, CF_3 , NO_2 , OR^{11} , $-(CH_2)_pC(O)(CH_2)_qR^{11}$, $-(CH_2)_pC(O)N(R^{12})(R^{13})$, $-(CH_2)_pC(O)O(CH_2)_qR^{11}$, $-(CH_2)_pN(R^{11})C(O)R^{11}$, $-(CH_2)_pN(R^{12})(R^{13})$, $-N(R^{11})SO_2R^{11}$, $-OC(O)N(R^{12})(R^{13})$, $-SO_2N(R^{12})(R^{13})$, halo, arilo y un anillo heterocíclico, y adicionalmente o alternativamente, dos grupos R^1 en los átomos del anillo adyacente forman un anillo fusionado de 5 o 6 miembros que contiene de 0 a 3 heteroátomos;

n es 0 a 6,

cada R^{11} se selecciona independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;

cada R^{12} y R^{13} se seleccionan independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico; o R^{12} y R^{13} pueden tomarse junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de 5 a 7 miembros que puede contener opcionalmente un heteroátomo adicional;

p es de 0 a 4;

q es de 0 a 4;

R^{55} se selecciona de H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;

X^3 es N o $C-R^{50}$;

cada R^{50} se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, CN, CF_3 , NO_2 , OR^{51} , $-(CH_2)_pC(O)(CH_2)_sR^{51}$, $-(CH_2)_pC(O)N(R^{52})(R^{53})$, $-(CH_2)_pC(O)O(CH_2)_sR^{51}$, $-(CH_2)_pN(R^{51})C(O)R^{51}$, $-(CH_2)_pN(R^{52})(R^{53})$, $-N(R^{51})SO_2R^{51}$, $-OC(O)N(R^{52})(R^{53})$, $-SO_2N(R^{52})(R^{53})$, halo, arilo y un anillo heterocíclico, y adicional o alternativamente, dos grupos R^{50} en átomos del anillo adyacente forman un anillo fusionado de 5 o 6 miembros que contiene de 0 a 3 heteroátomos;

R^{51} se selecciona de H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico;
 R^{52} y R^{53} se seleccionan independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico; o R^{52} y R^{53} pueden tomarse junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de 5 a 7

miembros que puede contener opcionalmente un heteroátomo adicional;

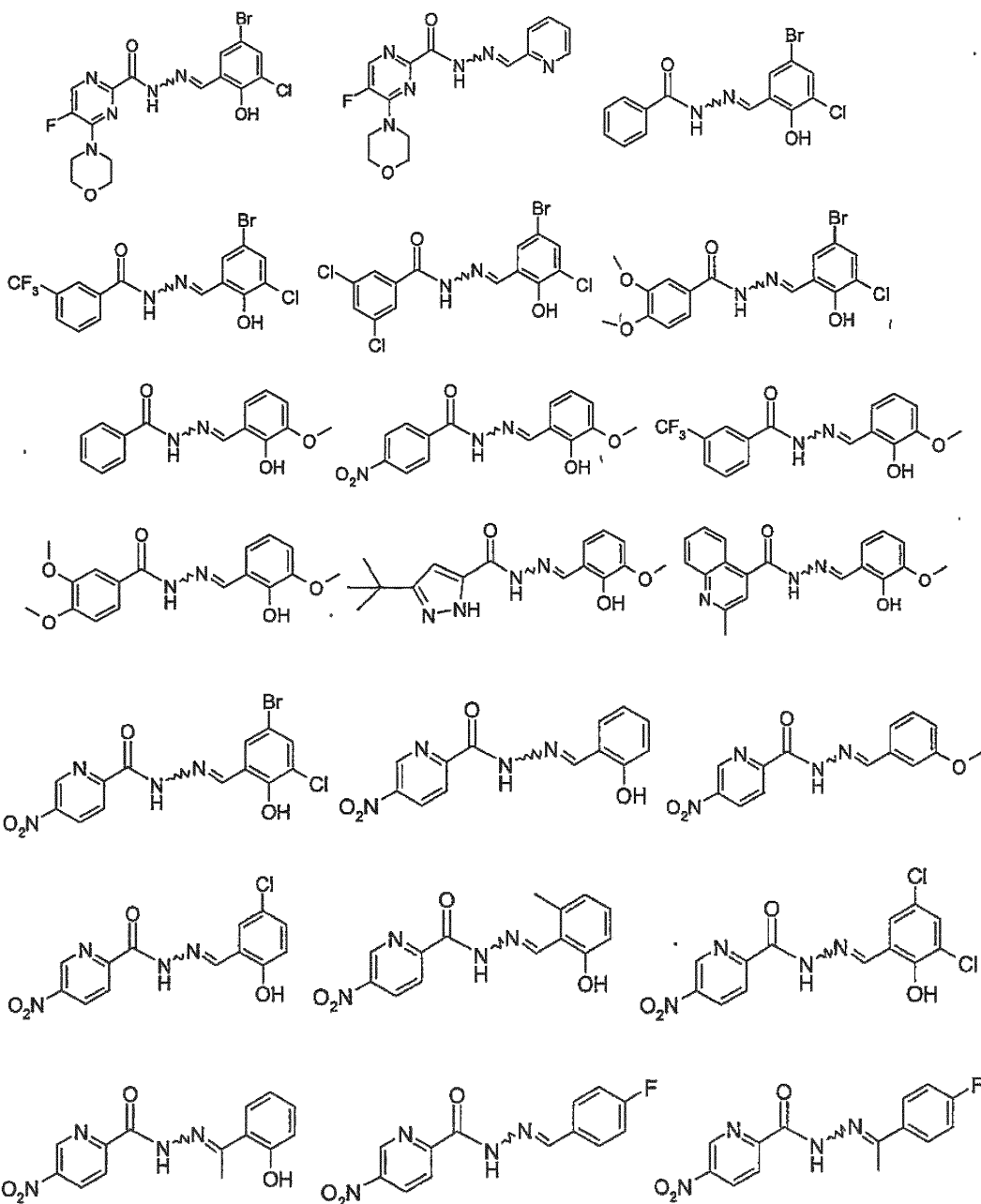
r es de 0 a 4;

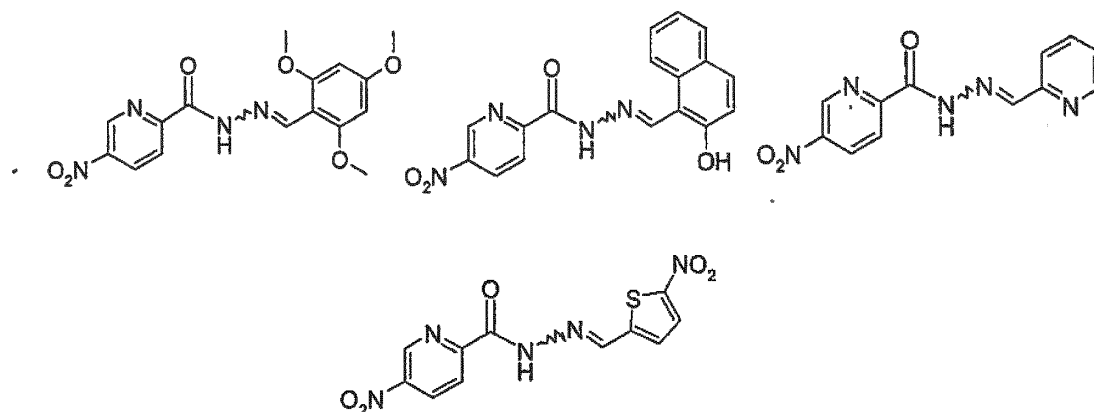
s es de 0 a 4;

m es de 0 a 4; y

cada R^0 se selecciona independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, aralquilo, arilo y un anillo heterocíclico.

Los ejemplos de compuestos de la fórmula VI o VI_a incluyen las siguientes estructuras:





Como se usa en el presente documento, la definición de cada expresión, por ejemplo, alquilo, m, n, R, R' etc., cuando ocurre más de una vez en cualquier estructura, pretende ser independiente de su definición en cualquier otro lugar de la misma estructura.

Para cada una de las descripciones anteriores de compuestos de las estructuras I, Ia, Ib, II, IIa, IIb, III, IIIa, IV, IVa, V, Va, VI y VIa, cada mención de los términos grupo halo, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, aralquilo, arilo, heterocíclico o anillo heterocíclico, se seleccionan independientemente de las definiciones de estos términos que se proporcionan al comienzo de esta sección.

Se entenderá que las estructuras químicas proporcionadas en el presente documento incluyen la condición implícita de que la sustitución está de acuerdo con la valencia permitida del átomo sustituido y el o los sustituyentes, y que la sustitución da como resultado un compuesto estable, por ejemplo, que no se somete espontáneamente a una transformación como reordenamiento, ciclación, eliminación, etc.

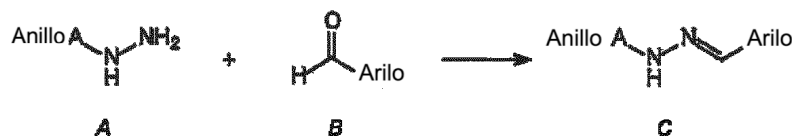
Cuando uno o más centros quirales están presentes en los compuestos de la presente invención, los isómeros individuales y sus mezclas (por ejemplo, racematos, etc.) pretenden estar abarcados por las fórmulas representadas en el presente documento.

Cuando uno o más dobles enlaces están presentes en los compuestos, tanto los isómeros cis como los trans están destinados a estar abarcados por las fórmulas representadas en el presente documento. Aunque las estructuras químicas (tales como, por ejemplo, las estructuras II, IIa, V, Va, VI y VIa) se representan aquí en cualquiera de las configuraciones cis o trans, ambas configuraciones están abarcadas por cada una de las fórmulas.

En ciertas realizaciones, los compuestos pueden existir en varias formas tautoméricas. Por consiguiente, las estructuras químicas representadas en el presente documento abarcan todas las formas tautoméricas posibles de los compuestos ilustrados.

Los compuestos generalmente se pueden preparar a partir de materiales de partida disponibles comercialmente y técnicas químicas conocidas. Las realizaciones pueden sintetizarse como sigue. Un experto en la técnica de la química medicinal o sintética estaría fácilmente familiarizado con los procedimientos y las técnicas necesarias para lograr los enfoques sintéticos dados a continuación.

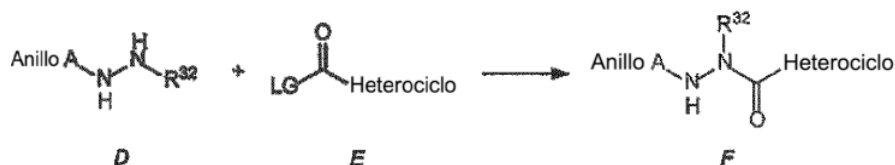
Realizaciones en las que $R^2 = \text{NH}$, $R^3 = \text{N}$, $R^4 = \text{CH}$ y $R^5 = \text{-arilo}$ pueden prepararse por reacción de un compuesto de hidracina apropiado, tal como **A**, y un aldehído apropiado, tal como **B**, en condiciones similares a las descritas en la página 562 de Gineinah, et al., (Arch. Pharm. Med. Chem. 2002, 11, 556-562).



Por ejemplo, el calentamiento de **A** con 1,1 equivalentes de **B** durante 1 a 24 horas en un disolvente prótico tal como un alcohol C_1 a C_6 , seguido de enfriamiento y recolección del precipitado, proporcionaría **C**. Alternativamente, el producto **C** puede aislarse por evaporación del disolvente y purificación por cromatografía usando gel de sílice, alúmina o medio de fase inversa C_4 a C_{18} . Metodología similar sería aplicable en los casos en que "Arilo" se reemplaza por otros grupos definidos en R^5 .

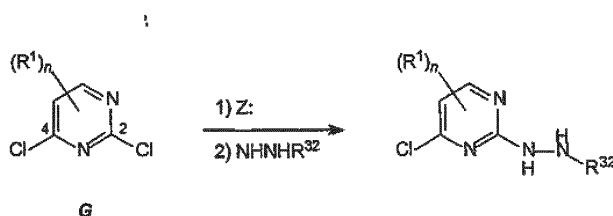
Realizaciones en las que $R^2 = \text{NH}$, $R^3 = \text{NR}^{32}$, $R^4 = \text{C(O)}$ y $R^5 = \text{un anillo heterocíclico}$ se pueden preparar por reacción de un compuesto de hidracina apropiado, tal como **D**, y un ácido carboxílico activado tal como **E**, en el que

GS es un grupo saliente tal como halo, 1-oxibenzotriazol, pentafluorofenoxi, p-nitrofenoxi o similares, o el Compuesto **E** también puede ser un anhídrido de ácido carboxílico simétrico, por lo que condiciones similares a las descritas en la página 408 de Nair y Mehta (Indian J. Chem. 1967 5,403-408) se pueden usar.

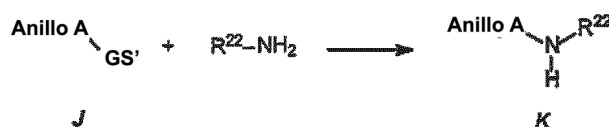


Por ejemplo, el tratamiento de **D** con un éster activo tal como Heterociclo-C(O)-OC₆F₅ en un solvente inerte tal como diclorometano, 1,2-dicloroetano o N,N-dimetilformamida, opcionalmente en presencia de una base tal como piridina o otra amina terciaria, y opcionalmente en presencia de un catalizador tal como 4-N,N-dimetilaminopiridina, a una temperatura apropiada que varía de 0°C al punto de ebullición del disolvente, proporcionaría **F**, que puede aislarse por evaporación del disolvente seguido de cromatografía usando gel de sílice, alúmina o medio de fase inversa C₄ a C₁₈. El ejemplo de éster activo anterior de **E** se prepararía fácilmente a partir del ácido carboxílico y el pentafluorofenol correspondientes usando una carbodiimida tal como dicitclohexilcarbodiimida como agente de condensación. Metodología similar sería aplicable en los casos en los que el "Heterociclo" se reemplaza por otros grupos definidos bajo R⁵.

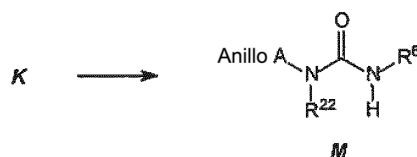
Los precursores tales como **A** y **D** pueden prepararse por reacción de un nucleófilo apropiado, por ejemplo, un derivado de hidracina, con un compuesto heteroaromático que porta un sustituyente halo en una posición adyacente a un átomo de nitrógeno. Por ejemplo, el uso de métodos análogos a los descritos por Wu, et al., (J. Heterocyclic Chem. 1990, 27, 1559-1563), Breshears, et al., (J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, 3789-3792), o Gineinah, et al., (Arch. Pharm. Med. Chem. 2002, 11, 556-562), se pueden preparar ejemplos de compuestos **A** y **D** a partir de, por ejemplo, un derivado de 2,4-dihalopirimidina, muchos de los cuales están disponibles comercialmente o bien son fácilmente preparados por un experto en la materia. Por lo tanto, el tratamiento de un derivado **G** apropiado de 2,4-dihalopirimidina con una amina u otro nucleófilo (Z), opcionalmente en presencia de una base añadida, desplaza selectivamente el sustituyente 4-halo en el anillo de pirimidina. El tratamiento posterior del producto con un segundo reactivo nucleófilo como la hidracina o un derivado de la hidracina, opcionalmente en un disolvente como un alcohol C₁ a C₆ y opcionalmente en presencia de una base añadida, desplaza el sustituyente 2-halo en el anillo de pirimidina, para proporcionar compuestos que son ejemplos de las estructuras **A** y **D** anteriores.



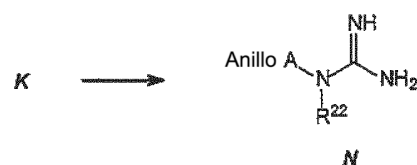
Las realizaciones en las que R² es -NR²² y R³ es -C(=R³³) se pueden sintetizar mediante métodos tales como los siguientes, o modificaciones directas de los mismos. La síntesis puede realizarse partiendo de un derivado **J** apropiado del anillo A que porta un grupo saliente (GS) adyacente al nitrógeno del anillo requerido. La Estructura **G** anterior y el producto de reacción de la estructura **G** con el nucleófilo Z, como se ilustró anteriormente, son ejemplos de tales derivados **J** apropiados del anillo A. Los grupos GS' adecuados son halo, alquiltio, alquilsulfonilo, alquilsulfonato o arilsulfonato. El tratamiento de **J** con una amina R¹²NH₂ afecta el desplazamiento de GS' para proporcionar intermedios **K**. Capps, et al., J. Agric. Food Chem. 1993, 41, 2411-2415, reportan un ejemplo de esta transformación química en la que R¹² es H y GS' es CH₃SO₂-. y un ejemplo en el que R¹² es H y GS' es C₁ se reporta en Marshall, et al. J. Chem. Soc. 1951, 1004-1015.



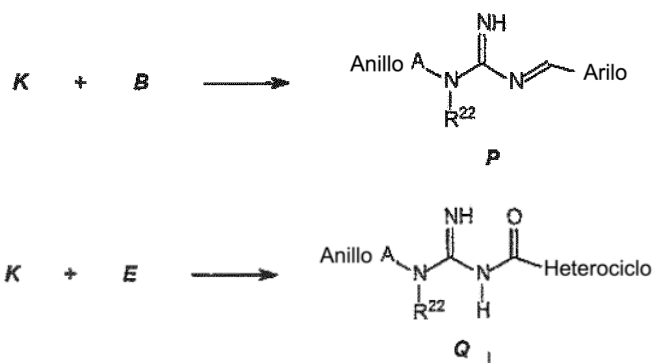
Los compuestos intermedios de estructura **K** se transforman en compuestos mediante la introducción simultánea o secuencial de los elementos, de R³, R⁴ y R⁵. Por ejemplo, el tratamiento de los compuestos intermedios de estructura **K** con isocianatos individuales R⁶-N=C=O proporciona en una sola etapa compuestos de estructura **M**, que son compuestos en los que R² = -NR²², R³ = -C=O-, R⁴ = -NH-, y R⁵ = -enlace químico-R⁶. Los expertos en la técnica conocen bien métodos alternativos para convertir compuestos de estructura **K** en compuestos de estructura **M**, en los que R³ junto con un grupo saliente (por ejemplo, p-nitrofenoxi o cloro) se introduce primero, seguido de un desplazamiento posterior del grupo saliente, por ejemplo, por una amina R⁶-NH₂, para introducir R⁵ y R⁶.



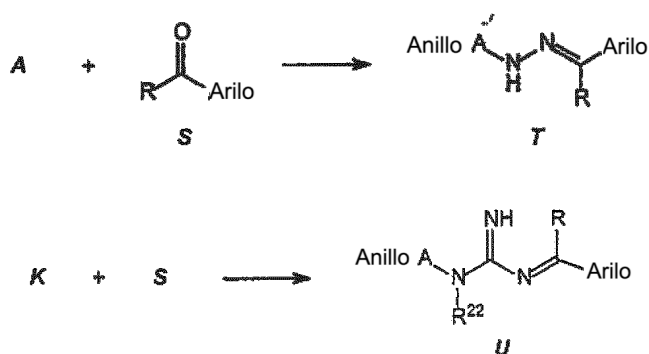
Como alternativa, el tratamiento de compuestos intermedios de estructura **K** con un reactivo tal como cianamida ($\text{NH}_2\text{-CN}$), típicamente en condiciones de calentamiento y opcionalmente en presencia de ácido en un disolvente tal como acetato de etilo o dioxano, proporciona compuestos intermedios **N**. Las alternativas a la cianamida son la nitroguanidina o el ácido amidinosulfónico ($\text{KH}_2\text{-C(=NH)-SO}_3\text{H}$). Un ejemplo de tal transformación usando cianamida es reportado por Latham et al., J. Org. Chem 1950,15, 884. un ejemplo usando nitroguanidina es reportado por Davis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1925, 11, 72. El uso de ácido amidinosulfónico fue reportado por Shearer, et al. Bioorg. Medicina. Chem Lett. 1997, 7, 1763.



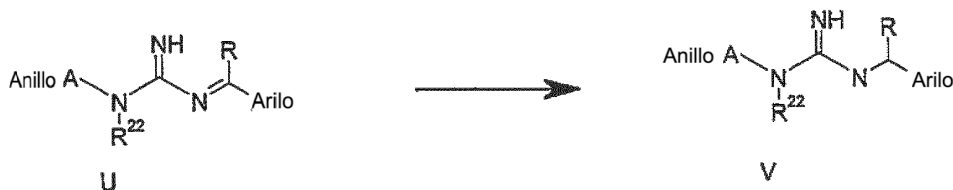
En analogía a la conversión de los compuestos intermedios **A** o **D** en realizaciones representadas por **C** o **F**, los compuestos intermedios **K** se convierten, respectivamente, en compuestos representados por **P** o **Q**.



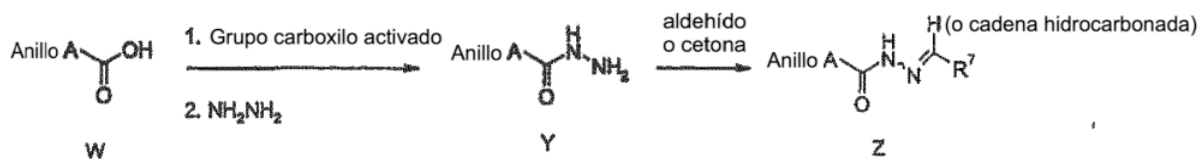
El tratamiento de **A** o **K** con una cetona **S**, en la que R es como se definió anteriormente, en lugar de un aldehído **B** en los esquemas anteriores, proporciona compuestos de estructura **T** o **U**, respectivamente.



El doble enlace carbono-nitrógeno no guanidino de **U** puede reducirse selectivamente mediante un agente reductor apropiado tal como reactivos de hidruro de metal (boro, aluminio, silicio, etc.), preferiblemente uno con propiedades básicas para producir compuestos **V**.

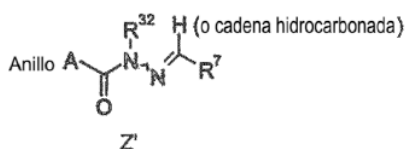


Realizaciones en las que $R^2 = \text{CO}$, $R^3 = -\text{NR}^{32}$, $R^4 = \text{N-}$ y $R^5 = \text{ZR}^7$, en la que Z es una cadena hidrocarbonada y R^7 es como se definió anteriormente, pueden prepararse de la siguiente manera. Cuando $R^{32} = \text{H}$, un ácido carboxílico **W** derivado del anillo A se activa por conversión en el cloruro de ácido correspondiente, o alternativamente en un éster activo, o en un derivado activado análogo, muchos de los cuales son bien conocidos en la técnica. El tratamiento del ácido carboxílico activado con hidracina proporciona la hidracida **Y** correspondiente. El tratamiento de **Y** con un aldehído o cetona (en condiciones de calentamiento y/o catálisis con ácido suave si es necesario) proporciona el producto final deseado **Z**.



Si no están disponibles comercialmente, los ácidos carboxílicos **W** derivados del anillo A pueden prepararse mediante tratamiento del material de partida **J** anterior con ión cianuro, opcionalmente con calentamiento o catálisis con metal de transición, para reemplazar el grupo saliente GS' con un residuo ciano. La hidrólisis básica o ácida del grupo ciano proporciona el compuesto intermedio **W** del ácido carboxílico deseado.

Cuando R^{32} no es H, se puede usar una forma protegida de hidracina monosustituida en el esquema anterior en lugar de hidracina. Por lo tanto, el tratamiento del ácido carboxílico activado de **W** con $R^{32}\text{NHNH-PG}$, en la que PG es un grupo protector de nitrógeno tal como benciloxycarbonilo o t-butoxicarbonilo, seguido de desprotección y tratamiento con un aldehído o cetona apropiado como anteriormente produce **Z'**.



Será evidente para un profesional experto en la técnica de síntesis de moléculas orgánicas que los procesos de reacción ilustrados anteriormente son representativos de un conjunto más amplio de métodos que son extensiones lógicas de los procesos ilustrados. Por lo tanto, las realizaciones adicionales que incorporan variantes adicionales en R^2 , R^3 , R^4 y R^5 se preparan mediante modificaciones obvias de los procesos anteriores.

Como reconocería una persona experta en la técnica, puede ser ventajoso emplear un grupo protector temporal para lograr el producto final. La frase "grupo protector", como se usa en el presente documento, significa modificaciones temporales de un grupo funcional potencialmente reactivo que lo protege de las transformaciones químicas no deseadas. Los ejemplos de tales grupos protectores incluyen ésteres de ácidos carboxílicos, silil éteres de alcoholes y acetales y cetales de aldehídos y cetonas, respectivamente. El campo de la química del grupo protector ha sido revisada (Greene, T. W. ; Wuts, P. G. M. Protective Groups in Organic Synthesis, 2ª edición; Wiley: Nueva York, 1991).

Una "muteína" es una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que se altera como resultado de una mutación que se ha producido en su gen correspondiente (Weigel et al., 1989). Dichas mutaciones pueden dar como resultado cambios en una o más de las características de la proteína codificada. Por ejemplo, una variante enzimática que tiene actividad catalítica modificada como resultado de un cambio en uno o más aminoácidos es una muteína.

Esta invención se refiere a proteínas que albergan una alteración de al menos un residuo de aminoácido (los términos "cambio de secuencia de aminoácidos" o "alteración de secuencia de aminoácidos" incluyen cambios, eliminaciones o adiciones, de al menos un residuo de aminoácido), o cualquier combinación de eliminaciones, adiciones, cambios) de modo que la muteína resultante se haya vuelto (como resultado de la mutación) resistente a un agente terapéutico conocido en relación con la sensibilidad de la versión no mutada de dicha proteína al agente terapéutico. Esta clase especializada de muteínas se denomina en lo sucesivo **teramuteína**, y la proteína correspondiente que carece de la mutación se denomina en este documento como **prototeramuteína**.

Como se usa en el presente documento, "prototeramuteína" se refiere a una proteína que ocurre endógenamente en una célula que es susceptible a la mutación que confiere insensibilidad relativa (es decir, resistencia) a un compuesto terapéutico que de otra manera inhibe o activa la proteína. Por consiguiente, "teramuteína" se refiere a una proteína o porción de una proteína que se encuentra endógenamente en una célula que contiene al menos una alteración de la secuencia de aminoácidos en relación con una forma endógena de la proteína, en la que el cambio de secuencia de aminoácidos es o fue identificado o se vuelve identificable, y es o ha demostrado ser clínicamente significativo para el desarrollo o la progresión de una enfermedad dada, *después de la exposición de al menos un ser humano a una sustancia que se sabe que inhibe o activa la prototeramuteína*. Solo con el propósito de definir la oración anterior, una sustancia no necesita limitarse a un agente químico con el propósito de definir primero la existencia de una teramuteína. Por lo tanto, **por definición**, una teramuteína es una proteína que alberga una mutación en su gen endógeno correspondiente, en el que dicha mutación está asociada con el desarrollo de resistencia clínica en un paciente a un fármaco que normalmente es capaz de activar o inhibir la proteína no mutada. Con respecto a una teramuteína dada, el término "prototeramuteína correspondiente" se refiere a la prototeramuteína que, por mutación, da lugar a dicha teramuteína. De manera similar, con respecto a una prototeramuteína dada, la "teramuteína correspondiente" se refiere a la teramuteína que ha surgido por mutación de dicha prototeramuteína.

Por consiguiente, es evidente para un experto en la materia que, dado que los genes que codifican las teramuteínas están limitados a genes endógenos, la definición de una teramuteína excluye las proteínas codificadas por agentes infecciosos que causan enfermedades, tales como virus y bacterias. Como se usa en el presente documento, el término "gen endógeno" se refiere a un gen que ha estado presente en los cromosomas del organismo al menos en su forma no mutada, desde el inicio. El término "célula", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula eucariota viva ya sea en un organismo o mantenida en condiciones apropiadas de cultivo de tejidos u órganos de laboratorio fuera de un organismo.

En un aspecto de la invención, una teramuteína es una proteína que se altera por primera vez con respecto a una forma de "tipo silvestre" de la proteína (es decir, la prototeramuteína). En otro aspecto de la invención, una teramuteína es una variante de una proteína (prototeramuteína) que, en sí misma, ya es una muteína. En otra realización más, una teramuteína puede mutarse adicionalmente en comparación con una teramuteína previamente existente. En tales casos, la primera teramuteína (tal como el mutante T315I de p210 BCR-ABL (véase más abajo), puede considerarse como una teramuteína "primaria", mientras que las mutaciones posteriores de la variante T315I (ya mutada) pueden denominarse una teramuteína secundaria, una teramuteína terciaria, etc. Como se ejemplifica a continuación, una muteína de la invención es una variante de la tirosina quinasa Bcr-Abl que escapa a la inhibición por un inhibidor de la Bcr-Abl de "tipo silvestre". Dicha muteína Bcr-Abl se altera con respecto a una forma más común o de "tipo silvestre" de Bcr-Abl (que también es una muteína) de tal manera que se altera una propiedad de la proteína.

Se entenderá que una muteína de interés primario es una teramuteína que puede tener la misma, aumentada o disminuida, actividad específica con respecto a su prototeramuteína, y que no se inhibe o es pobremente inhibida por un agente que es capaz de inhibir la prototeramuteína. Del mismo modo, otra teramuteína de interés primario es aquella que tiene la misma aumentada o disminuida, actividad específica (en relación con su prototeramuteína) y que no está activada o está pobremente activada por un agente que es capaz de activar la prototeramuteína. Otras variaciones son obvias para el experto en la técnica. Se apreciará además que las teramuteínas pueden incluir variantes de una proteína de origen natural o comúnmente observadas, por ejemplo, variantes que se expresan a partir de diferentes alelos de un gen particular. En algunos casos, tales variantes pueden no ser notables con respecto a su función celular normal, con diferencias funcionales que se vuelven evidentes solo en presencia de agentes que inhiben o activan diferencialmente la función celular de las variantes. Por ejemplo, las variantes naturales de una enzima particular pueden tener perfiles de actividad que no son sustancialmente diferentes, pero un agente terapéutico que modula uno puede ser ineficaz para modular el otro.

Se apreciará que, mientras que un aspecto de la invención es la identificación de un agente que es activo contra una teramuteína que surge o se vuelve dominante (por cualquier mecanismo) durante el curso de un tratamiento para una enfermedad dada, otro aspecto es la identificación de un agente que es activo contra una muteína que es común dentro de una población de individuos no afectados, pero en el que dicha muteína es menos susceptible a la modulación por un fármaco aprobado, y en el que la variación en el perfil de actividad de la muteína se vuelve importante (y, por lo tanto, se identifica por primera vez como una teramuteína) en un estado de enfermedad, como cuando se sobreexpresa o participa en un proceso de señalización que, de lo contrario, se ha regulado de manera anormal. Por ejemplo, una enfermedad neoplásica puede ser causada por una regulación anormal de un componente celular que no sea la teramuteína o su prototeramuteína, y aún ser tratable con un inhibidor de la prototeramuteína, mientras que el mismo tratamiento sería menos efectivo o ineficaz cuando la teramuteína estuviera presente. Esto puede ser un problema en el que se observa que la respuesta de un tipo de tumor particular a un agente anticancerígeno varía entre los individuos que expresan diferentes variantes de una enzima contra la cual se dirige el agente anticancerígeno (Lynch et al., 2004). En el presente documento, las variantes no habrían surgido o se habrían convertido en predominantes durante el curso del tratamiento de la enfermedad, pero son preexistentes en la población sana y se detectan solo por su capacidad de respuesta alterada a un curso particular

de tratamiento terapéutico establecido.

Como se usa en el presente documento, los términos "agonista" y "activador" de una proteína se usan indistintamente. Un activador (agonista) se limita a una sustancia que se une y activa el funcionamiento de una proteína determinada. A menos que se indique explícitamente lo contrario, un "activador", un "agonista" y un "activador de una proteína" tienen un significado idéntico. La activación por un activador puede ser parcial o completa. Asimismo, como se usa en este documento, los términos "antagonista" e "inhibidor" de una proteína se usan indistintamente. Un inhibidor (antagonista) se limita a una sustancia que se une e inhibe el funcionamiento de una proteína determinada. Para afirmar que una sustancia "inhibe" una proteína significa que la sustancia se une a la proteína y reduce la actividad de la proteína en la célula sin reducir materialmente la cantidad de la proteína en la célula. Del mismo modo, afirmar que una sustancia "activa" una proteína, tal como una prototeramuteína o teramuteína, es afirmar que la sustancia aumentó la función definida de la proteína en la célula sin alterar sustancialmente el nivel de la proteína en la célula. A menos que se indique explícitamente lo contrario, un "inhibidor", un "antagonista" y un "inhibidor de una proteína" también son sinónimos. La inhibición por un inhibidor puede ser parcial o completa. Un modulador es un activador o un inhibidor. A modo de ejemplo, un "activador de PKC β_1 " debe interpretarse como una sustancia que se une y activa PKC β_1 . Del mismo modo, un "inhibidor de p210^{Bcr-Abl}" es una sustancia que se une e inhibe el funcionamiento de p210^{Bcr-Abl}, para afirmar que una sustancia "inhibe una proteína" se requiere que la sustancia se una a la proteína para ejercer su efecto inhibidor. Del mismo modo, afirmar que una sustancia "activa la proteína X" es indicar que la sustancia se une y activa la proteína X. Los términos "unión", "que se une" y "se une a" tienen sus significados comunes en el campo de la bioquímica en términos de describir la interacción entre dos sustancias (por ejemplo, enzima-sustrato, proteína-ADN, receptor-ligando, etc.). Como se usa en el presente documento, el término "se une a" es sinónimo de "interactúa con" en el contexto de discutir la relación entre una sustancia y su proteína objetivo correspondiente. Como se usa en el presente documento, para afirmar que una sustancia "actúa sobre" una proteína, afecta "una proteína", ejerce su efecto sobre "una proteína", etc., y todos los términos relacionados significan de manera uniforme (como bien sabe el investigador experto) que dicha sustancia activa o inhibe dicha proteína.

El concepto de inhibición o activación de una forma mutada de una proteína endógena en mayor medida que la correspondiente proteína homóloga no mutada se define por primera vez y se hace referencia en este documento como una **"brecha de especificidad"** positiva. En términos generales, *y usando un caso de inhibidor como ejemplo*, la **brecha de especificidad** se refiere a la diferencia entre la capacidad de una sustancia dada, en condiciones comparables para inhibir las teramuteínas en un sistema de ensayo basado en células en comparación con:

- a) la capacidad de la misma sustancia en condiciones comparables para inhibir la prototeramuteína, o
- b) la capacidad de una segunda sustancia (generalmente un inhibidor conocido de la prototeramuteína) para inhibir la teramuteína en condiciones comparables, o
- c) la capacidad de la segunda sustancia para inhibir la prototeramuteína en condiciones comparables.

Cuando se realiza la comparación entre los efectos de dos sustancias distintas (probadas individualmente) en la teramuteína sola, el resultado se denomina determinación de la **brecha de especificidad homóloga**.

Como alternativa, cuando se hace una comparación entre los efectos de dos sustancias distintas (generalmente, pero no siempre), una de las cuales se prueba en la teramuteína y la otra en la prototeramuteína, respectivamente, el resultado se denomina determinación de la **brecha de especificidad heteróloga (SG)**. Por lo tanto, (a) y (c) como se indicó anteriormente son ejemplos de determinaciones de brecha de especificidad heteróloga (SG) (aunque se utiliza la misma sustancia en ambos casos), mientras que (b) es un ejemplo de determinación de brecha de especificidad homóloga.

La referencia a la Figura 3 es informativa para comprender y dilucidar estos conceptos.

Se aplican problemas análogos cuando el caso se refiere a un activador. Será inmediatamente obvio para el experto en la materia que el término "condiciones comparables" incluye probar dos compuestos diferentes, por ejemplo, a la misma concentración (tal como comparar dos compuestos estrechamente relacionados para determinar la potencia relativa), o al comparar los efectos de dos diferentes compuestos probados en sus respectivos valores de IC₅₀ en la correspondiente prototeramuteína y teramuteína. El investigador experto reconocerá fácilmente otras variaciones útiles y condiciones comparables.

Por lo tanto, en una realización de la aplicación de este enfoque, las sustancias que son más efectivas contra una teramuteína tienen una "brecha de especificidad positiva". Una brecha de especificidad "cero, nula o ninguna" indica que no existe una diferencia apreciable significativa entre el efecto de una sustancia sobre la teramuteína en comparación con su efecto sobre la prototeramuteína (sin embargo, tales compuestos pueden ser bastante útiles en su capacidad para inhibir o activar tanto una teramuteína como su correspondiente prototeramuteína), y una "brecha de especificidad negativa" indica una sustancia que a una concentración dada es menos efectiva contra la teramuteína dada que contra una forma de la prototeramuteína correspondiente u otra forma comparativa de la teramuteína (tal como una que pueda albergar una mutación diferente). La última categoría es generalmente de menor interés que las categorías anteriores de compuestos, excepto en el caso en el que el compuesto es tan

potente que su efecto relativamente menor sobre la teramuteína no es una preocupación real desde la perspectiva de la eficacia terapéutica. El investigador experto puede reconocer fácilmente una variedad de enfoques para cuantificar la evaluación de la brecha de especificidad de una manera adaptada a sus necesidades.

La invención también proporciona un medio para identificar compuestos que exhiben una brecha de especificidad deseada. Dichos compuestos se pueden identificar y determinar su capacidad para inhibir o activar la teramuteína utilizando un sistema de ensayo basado en células *in vitro* en el que el efecto de una sustancia sobre el funcionamiento celular de la forma endógena mutada de la proteína se compara con el efecto del mismo fármaco sobre el funcionamiento celular de una forma endógena no mutada de la proteína.

Por lo tanto, el sistema permite el descubrimiento de compuestos capaces de unirse a una teramuteína y ejercer un mayor efecto modulador sobre el funcionamiento celular de dicha teramuteína que sobre su correspondiente prototeramuteína. Además, el sistema permite el descubrimiento de compuestos capaces de unirse a una teramuteína y ejercer al menos un efecto modulador tan grande o mayor sobre el funcionamiento celular de una teramuteína que los compuestos previamente conocidos pueden ejercer sobre la prototeramuteína correspondiente. En una realización particular de la invención, un compuesto puede ser seleccionado e identificado porque 1) es al menos tan efectivo contra la teramuteína como el fármaco original es contra la prototeramuteína, y/o 2) es igualmente efectivo contra la prototeramuteína que contra la teramuteína (es decir, muestra una brecha de especificidad pequeña o esencialmente cero).

En una realización de la invención, las células que sobreexpresan una teramuteína de interés se usan para identificar agentes químicos que son inhibidores o activadores de (es decir, que se unen e inhiben o que se unen y activan) al menos la teramuteína seleccionada. Los agentes químicos también pueden ser inhibidores o activadores de la prototeramuteína o incluso otras teramuteínas de la misma prototeramuteína. Como se usa en el presente documento, los términos "agente químico" y "compuesto" se usan indistintamente, y ambos términos se refieren exclusivamente a sustancias que tienen un peso molecular hasta de pero no incluyen, 2000 unidades de masa atómica (Dalton). Tales sustancias a veces se denominan "moléculas pequeñas". A menos que se indique lo contrario en el presente documento, el término sustancia como se usa en el presente documento se refiere exclusivamente a agentes/compuestos químicos, y no se refiere a **agentes biológicos**. Como se usa en el presente documento, "**agentes biológicos**" son moléculas que incluyen proteínas, polipéptidos y ácidos nucleicos, y tienen pesos moleculares iguales o mayores a 2000 unidades de masa atómica (Daltons).

De acuerdo con la invención, se selecciona una teramuteína y se usa en un sistema de ensayo basado en células diseñado para identificar agentes que son inhibidores o activadores de la teramuteína. Cuando se conocen dos o más teramuteínas distintas que se originan a partir de la misma prototeramuteína, es preferible seleccionar la teramuteína más resistente disponible para usar en el sistema de ensayo. En general, el grado de resistencia de una teramuteína a un agente químico dado se determina en relación con su contraparte no mutada (prototeramuteína) utilizando el fármaco que se administró por primera vez y se sabe que inhibe o activa la prototeramuteína y contra la cual "surgió" la teramuteína. Los métodos para determinar el grado de dicha resistencia, por ejemplo mediante el análisis de los valores de IC₅₀ o AC₅₀, son bien conocidos y estándar en la técnica y no se reiterarán en el presente documento. Sin embargo, no es necesaria ni debe inferirse ninguna relación causal entre el tratamiento del paciente con un agente terapéutico determinado y la aparición posterior de una teramuteína. Más bien, lo que se requiere para practicar la invención es que una teramuteína verdadera se seleccione adecuadamente de acuerdo con las enseñanzas de la presente memoria.

Por lo tanto, por ejemplo, los mutantes dirigidos al sitio generados al azar de proteínas conocidas que se crean en el laboratorio pero que **no** han demostrado que sean clínicamente relevantes no son muteínas apropiadas para su uso dentro del alcance de esta invención. Tales muteínas, por supuesto, no se clasificarían adecuadamente como teramuteínas.

Por ejemplo, en un esfuerzo por obtener inhibidores potenciales de mutantes de p210^{Bcr-Abl} Huron et al., (2003) utilizaron una preparación recombinante de c-abl y seleccionaron una serie de compuestos que se sabe que inhiben la actividad de la tirosina quinasa c-src. Los autores realizaron ensayos de la quinasa c-abl en sus compuestos e identificaron el compuesto más potente como un inhibidor 8 nM contra c-abl. Cuando este compuesto (PD166326) se probó contra varias teramuteínas p210^{Bcr-Abl}, sin embargo, mostró actividad contra algunos de los mutantes tales como p210^{Bcr-Abl-E255K}, pero la teramuteína p210^{Bcr-Abl-T315I} se encontró que permanecía 10 veces más resistente (Huron et al., 2003, Tabla 3). Además, en cada caso, el compuesto todavía era aún marcadamente **menos eficaz** sobre las teramuteínas p210^{Bcr-Abl} que en el caso contra las p210^{Bcr-Abl} de tipo silvestre. Cuando el compuesto se probó contra la actividad mutante p210^{Bcr-Abl-T315I}, no pudo inhibir la actividad en ningún grado apreciable (página, 1270, columna de la izquierda, segundo párrafo; véase también la Fig. 4). Por lo tanto, el compuesto descrito fue capaz de inhibir una teramuteína que es parcialmente resistente a STI-571, pero no tuvo actividad contra el mutante T315I de Bcr-Abl, que en ese momento ya se sabía que era la teramuteína que exhibía la mayor resistencia a STI-571. Por lo tanto, pura y simplemente, la metodología de Huron no logró identificar un inhibidor efectivo de la teramuteína p210^{Bcr-Abl-T315I}.

De hecho, antes de la divulgación de esta invención, que incluye tanto la metodología detallada descrita por primera

vez en el presente documento como las composiciones proporcionadas en el presente documento, *nadie en ningún lugar del mundo* ha logrado identificar un agente químico, y mucho menos una metodología que sea capaz de identificar un agente químico que inhiba eficazmente la teramuteína p210^{Bcr-Abl-T315I} en un grado igual o mayor que STI-571 es capaz de hacer con respecto a la proteína p210^{Bcr-Abl} de tipo silvestre. (Véase Shah et al., Science, agosto de 2004; O'Hare et al., Blood, 2004; Tipping et al., Leukemia, 2004; Weisberg et al., Leukemia, 2004).

No se puede enfatizar demasiado que tales compuestos serían inmensamente útiles, porque en la actualidad no hay alternativa para los pacientes que progresan a un estado de resistencia al mesilato de imatinib mediada por la teramuteína p210^{Bcr-Abl-T315I}. *Una vez que los pacientes desarrollan tal resistencia, no hay otro tratamiento alternativo efectivo disponible, y la muerte es segura. El método descrito en el presente documento proporciona el primer enfoque reportado para identificar, caracterizar farmacológicamente y sintetizar químicamente inhibidores eficaces de la teramuteína p210^{Bcr-Abl-T315I}. Además, el investigador experto reconocerá de inmediato la aplicabilidad y generalización de este enfoque a cualquier teramuteína altamente resistente a los medicamentos.*

En la presente invención, se usa una célula de prueba que muestra una característica fenotípica cuidadosamente seleccionada (como se define a continuación) que está vinculada a la presencia y actividad funcional de la teramuteína de interés particular (TOI) en la célula bajo condiciones apropiadas. Esto debería ser cualitativamente igual a la característica fenotípica que muestra una célula que expresa la prototeramuteína. Una característica fenotípica (es decir, una característica no genotípica de la célula) es una propiedad que se observa (mide), selecciona y/o define para su uso posterior en un método de ensayo como se describe en el presente documento. La expresión de la característica fenotípica responde a la actividad total de la teramuteína en la célula y es el resultado de la cantidad absoluta de la teramuteína y su actividad específica. A menudo, la característica fenotípica es observable como resultado de niveles elevados de actividad de teramuteína y no es evidente en las células que expresan cantidades bajas de teramuteína o cantidades bajas de su correspondiente prototeramuteína. Además, a menudo se puede demostrar que la característica fenotípica se modula modulando la actividad específica de la teramuteína con un inhibidor o activador de la teramuteína, aunque esto no siempre es así, ya que un inhibidor o activador de la TOI no siempre está disponible en el momento en que el investigador experto emprende dicho proyecto. Por lo tanto, con el fin de definir la característica fenotípica que se utilizará posteriormente con una célula de prueba dada para fines de ensayo, el investigador experto también puede usar una sustancia capaz de aumentar o disminuir la expresión del teratógeno, lo que a su vez conducirá a aumentos o disminuciones del nivel de la teramuteína correspondiente. Esto permite al investigador experto simular los efectos de ciertos tipos de activadores o inhibidores de la teramuteína (como un inhibidor suicida de la teramuteína, que es una clase de agente químico que se une irreversiblemente y modifica covalentemente la TOI, dejándolo permanentemente inactiva), sin tener realmente acceso a dicho compuesto, con el fin de refinar la característica fenotípica apropiada para establecer posteriormente un sistema de ensayo celular útil. Los ejemplos conocidos por un experto en la materia que serían útiles para tales propósitos incluyen el uso de oligonucleótidos de ADN antisentido, ARN pequeños de interferencia, otras metodologías basadas en ARN de interferencia y constructos de vectores que contienen sistemas promotores inducibles. De esta manera, la característica fenotípica seleccionada está vinculada a la actividad de la teramuteína en la célula de prueba. Notablemente para las teramuteínas, la característica fenotípica seleccionada generalmente también se muestra en una célula que sobreexpresa la prototeramuteína y en la que la característica fenotípica es modulada por inhibidores o activadores conocidos de la prototeramuteína.

Una característica fenotípica es simplemente una característica de una célula distinta de una característica genotípica de la célula. Excepto por los requisitos específicos de una característica fenotípica definida adecuadamente como se describe en el presente documento con el fin de crear sistemas de ensayo celular útiles de acuerdo con las enseñanzas de algunas de las realizaciones de la invención, no hay otra limitación del término característica fenotípica de ningún tipo o naturaleza, previsto o apropiado para practicar de manera adecuada y efectiva la invención. De hecho, el experto en la materia debe poder seleccionar cualquier característica de la célula que maximice la utilidad de establecer el ensayo adecuado basado en células para sus necesidades. La característica fenotípica puede ser cuantitativa o cualitativa y ser observable o medible directamente (por ejemplo, observable a simple vista o con un microscopio), pero lo más común es que la característica se mida indirectamente utilizando un equipo de laboratorio automatizado estándar y procedimientos de ensayo que son conocidos por aquellos expertos en la técnica. El término "observable" significa que una característica puede medirse o detectarse en condiciones apropiadas por cualquier medio, incluido el uso de cualquier tipo de instrumentación de laboratorio disponible. El término "detectable" no es lo mismo que "detectado". Una característica puede ser detectable por un experto en la técnica sin ser detectada en un momento dado, dependiendo de cómo el investigador elija diseñar el sistema de ensayo. Por ejemplo, al buscar activadores de una prototeramuteína (o teramuteína), puede ser deseable que la característica fenotípica relevante se detecte solo después de la adición de un activador conocido o sustancia de prueba capaz de activar la POI. Esto proporciona la capacidad de maximizar la intensidad de la señal generada por la célula de prueba en el ensayo.

Las características fenotípicas incluyen, pero no se limitan a, características de crecimiento, estado de transformación, estado de diferenciación, estado de fosforilación del sustrato, actividad catalítica, flujo de iones a través de la membrana celular (calcio, sodio, cloruro, potasio, iones de hidrógeno, etc.), cambios del pH, fluctuaciones de moléculas del segundo mensajero u otras especies químicas intracelulares tales como AMPc, fosfoinosítidos, nucleótidos cíclicos, modulaciones de la expresión génica y similares. La característica de la célula

puede ser observable o medible de forma continua (por ejemplo, la tasa de crecimiento de una célula), o después de un período de tiempo (por ejemplo, la densidad terminal de un cultivo celular), o transitoriamente (por ejemplo, la modulación de una muteína provoca un cambio transitorio en la fosforilación de un sustrato de la muteína, o un flujo transitorio en el flujo de iones a través de la membrana, o elevaciones o reducciones en los niveles intracelulares de AMPc). En ciertas realizaciones, una característica fenotípica seleccionada puede detectarse solo en presencia de un modulador de la prototeramuteína o la teramuteína. No se prevén limitaciones con respecto a una característica que puede seleccionarse para la medición. Como se usa en el presente documento, los términos "característica de una célula" y "característica fenotípica", y simplemente "característica", cuando se usan para referirse a la propiedad medible particular de la célula intacta o una fracción subcelular de la célula después del tratamiento de una célula de prueba con una sustancia, son idénticas. Por ejemplo, una característica fenotípica puede ser la formación de un foco que se vuelve observable cuando una célula que sobreexpresa una proteína seleccionada se cultiva en presencia de un activador de la proteína, o puede ser un aumento o disminución transitoria en el nivel de un metabolito intracelular o iones, tales como AMPc, calcio, sodio, cloruro, potasio, litio, fosfatidilinositol, GMPc, bicarbonato, etc. Es obvio para un experto en la técnica que después de que una célula se expone a una sustancia de prueba, la característica así medida (analizada) puede determinarse en una fracción subcelular de la célula. Sin embargo, el tratamiento inicial de la célula con una sustancia, que por lo tanto hace que la sustancia entre en contacto con la célula, debe realizarse en la célula intacta, no en una fracción subcelular.

La característica seleccionada para la medición dentro de la célula no debe ser una propiedad física o química intrínseca de la teramuteína o la propia prototeramuteína (como la mera cantidad (masa) de la proteína dentro de la célula), sino que debe ser una característica que resulta de la actividad de la teramuteína dentro de la célula, afectando así una característica de la célula que es distinta de la teramuteína en sí misma, como se discutió en detalle anteriormente. Por ejemplo, cuando la teramuteína es una proteína quinasa que es capaz de experimentar autofosforilación, un proceso por el cual la enzima es capaz de catalizar la fosforilación de sí misma mediante la transferencia de un grupo fosfato terminal de ATP sobre sí misma, NO sería apropiado seleccionar el estado de fosforilación de la TOI como una característica fenotípica apropiada de la célula para la medición. Esto se debe a que dicha característica no refleja la actividad de la TOI en otros componentes celulares. Como sabe el investigador experto, la autofosforilación no refleja necesariamente la actividad de una proteína quinasa en una célula, ya que se sabe que los mutantes de las proteínas quinasas retienen la actividad enzimática suficiente para experimentar autofosforilación, pero han perdido la capacidad de participar en eventos de transducción de señales dentro de la célula. El clásico artículo de White et al., (1988) es a la vez educativo y notable a este respecto.

El término "característica fenotípica sensible" significa una característica de la célula que es sensible a inhibidores o activadores de una proteína dada (prototeramuteína o teramuteína). El término "agente terapéutico conocido" se define como cualquier agente que se haya administrado a un ser humano para el tratamiento de una enfermedad en un país del mundo.

Una característica fenotípica útil, como se ejemplifica en el presente documento en asociación con p210^{Bcr-Abl} y sus teramuteínas, es la desregulación del crecimiento y la proliferación celular. Se observa que el mismo ensayo o un ensayo similar puede ser apropiado para usar con muchas proteínas diferentes de interés. Por ejemplo, las desregulaciones del crecimiento, la proliferación y/o la diferenciación son características fenotípicas comunes que pueden resultar de la sobreexpresión de una variedad de proteínas celulares diferentes. Una enseñanza importante de esta invención es que al sobreexpresar una proteína seleccionada para causar la aparición de una característica fenotípica de este tipo, la característica se vincula a la presencia, cantidad y actividad específica de esa proteína seleccionada en condiciones adecuadas, y este enlace permite al investigador experto identificar inhibidores o activadores de una teramuteína de interés (TOI) según se desee. Por consiguiente, la característica fenotípica es sensible a los cambios en el nivel y/o actividad específica de la proteína seleccionada. Dicha característica fenotípica sensible se denomina en el presente documento una "fenorrespuesta".

Aunque no siempre es necesario, a menudo será ventajoso emplear células que expresen altos niveles de teramuteína y seleccionar una característica fenotípica que resulte de la sobreexpresión de la teramuteína. Esto se debe a que las características fenotípicas relacionadas con el funcionamiento de la teramuteína generalmente se vuelven más distinguibles (más fáciles de medir) a medida que una teramuteína se sobreexpresa en mayor medida. Además, las fenorrespuestas que se observan en respuesta a los moduladores de la teramuteína a menudo se amplifican a medida que aumenta el nivel funcional de la teramuteína. Expresado de otra manera, la fenorrespuesta seleccionada observada en las células que sobreexpresan la teramuteína es particularmente sensible a los moduladores de la teramuteína.

Preferiblemente, la teramuteína se expresa de forma estable en una célula de prueba. La expresión estable da como resultado un nivel de teramuteína en la célula que permanece relativamente sin cambios durante el transcurso de un ensayo. Por ejemplo, la estimulación o activación de un componente de una ruta de señalización puede ir seguida de un período refractario durante el cual se inhibe la señalización debido a la subregulación del componente. Para las teramuteínas de la invención, dicha subregulación generalmente se supera suficientemente sobreexpresando artificialmente la teramuteína. Expresado de otra manera, la expresión se mantiene lo suficiente como para que los cambios en una característica fenotípica que se observan durante el curso de un ensayo se deban principalmente a la inhibición o activación de la teramuteína, en lugar de un cambio en su nivel, incluso si la submodulación de la

teramuteína se produce posteriormente. Por estas razones, aunque se prefiere la expresión estable de la teramuteína, se puede emplear la transfección seguida de la expresión transitoria de la teramuteína, siempre que la característica fenotípica seleccionada sea medible y la duración del sistema de ensayo sea corta en relación con la disminución progresiva en los niveles de la teramuteína expresada transitoriamente que se espera en tales sistemas con el tiempo. Por estas razones, se prefieren las líneas celulares que la expresan de manera estable (patente de los Estados Unidos No. 4.980.281).

Un método preferido de detección de fármacos de la presente invención implica lo siguiente:

1) Identificación de una teramuteína para la cual se desea un nuevo inhibidor o activador. La identificación de una teramuteína apropiada se puede realizar utilizando técnicas estándar (Véase, Gorre et al., Science, 2001; véase también el documento PCT/US02/18729). En resumen, se identifican pacientes que han recibido un tratamiento terapéuticamente efectivo utilizando un activador o inhibidor de una prototeramuteína conocida o sospechada y que posteriormente han mostrado signos y síntomas clínicos consistentes con recaída de la enfermedad, y se obtienen muestras de células o tejidos derivadas de dichos pacientes. Usando técnicas de laboratorio estándar tales como RT-PCR, se determina la secuencia de la prototeramuteína y se compara con la secuencia de ácido nucleico previamente determinada del gen de prototeramuteína conocido o secuencia de ADNc. Las mutaciones, si están presentes, se identifican y se correlacionan con la resistencia funcional de la función de la prototeramuteína, ya sea en sistemas de ensayo basados en células o, más comúnmente, libres de células, nuevamente utilizando metodología estándar. Una vez que se confirman las mutaciones inductoras de resistencia, dichos uno o más mutantes confirmados comprenden una teramuteína definida que puede usarse en los métodos posteriores como se describe en el presente documento.

2) Provisión de una célula de prueba que expresa una teramuteína de interés y muestra una característica fenotípica observable (medible) que previamente se ha demostrado que responde a los inhibidores o activadores de la teramuteína o, más comúnmente, la correspondiente prototeramuteína. Dicha característica fenotípica específica que previamente se ha demostrado que responde a los inhibidores o activadores de la teramuteína de interés (TOI), y/o la prototeramuteína de interés (pTOI) se define en el presente documento por primera vez como una "fenorrespuesta". Una realización de esta invención es el uso definitivo de la fenorrespuesta con el fin de identificar compuestos que probablemente sean inhibidores o activadores de la TOI. Esto se puede lograr mediante el uso de un cribado de alto rendimiento utilizando una línea celular que sobreproduce una TOI dada y para la cual se ha identificado y caracterizado una fenorrespuesta apropiada. Alternativamente, se puede utilizar un cribado primario de alto rendimiento utilizando una característica fenotípica más genérica de una línea celular (que no califica como fenorrespuesta de acuerdo con las enseñanzas de este documento) y luego utilizar un cribado secundario de acuerdo con las enseñanzas de este documento para distinguir entre compuestos que son verdaderos "aciertos" positivos, es decir, inhibidores o activadores de la teramuteína de interés, a partir de compuestos falsos positivos que no son inhibidores o activadores de la teramuteína de interés. En una realización, se selecciona una célula que expresa naturalmente la teramuteína de manera que está presente una característica fenotípica sensible en condiciones de cultivo adecuadas que son obvias para un experto en la materia. En otras realizaciones, la teramuteína se sobreexpresa, en algunos casos en una célula huésped que de otro modo no expresa la teramuteína. Esto generalmente implica la construcción de un vector de expresión a partir del cual la teramuteína puede introducirse en una célula huésped adecuada y sobre expresarse usando sistemas y metodología de vector estándar. (Gorre et al., 2001; Housey et al., 1988). En una realización, la sobreexpresión da como resultado un nivel de teramuteína que es al menos aproximadamente 3 veces la cantidad de la proteína generalmente presente en una célula. Alternativamente, la cantidad es al menos aproximadamente 10 veces la cantidad generalmente presente en una célula. En otra realización, la cantidad es al menos aproximadamente 20 veces o más preferiblemente al menos aproximadamente 50 veces la cantidad generalmente presente en una célula.

3) Provisión de una célula de control que expresa la prototeramuteína correspondiente que corresponde a la teramuteína de interés. Como algunas de las muteínas que se describen en el presente documento también son enzimas, generalmente retienen la actividad catalítica y, por lo tanto, la célula de control generalmente muestra sustancialmente la misma característica fenotípica que la célula de prueba. Sin embargo, la característica fenotípica no necesita ser cuantitativamente similar en ambas células. Por ejemplo, una mutación que conduce a la reactivación de la prototeramuteína también puede aumentar, disminuir o afectar su actividad específica con respecto a uno o más de sus sustratos en la célula. Como resultado, puede exhibir la característica fenotípica seleccionada en mayor o menor medida. En consecuencia, puede ser deseable en algunos casos ajustar la expresión de una o ambas de la prototeramuteína y la teramuteína de manera que las células de prueba y control exhiban la característica fenotípica en aproximadamente el mismo grado. Esto se puede hacer, por ejemplo, expresando las proteínas de los promotores cuya actividad se puede ajustar ajustando la cantidad de inductor presente, todo utilizando una metodología estándar (véase, por ejemplo, Maniatis et al.).

Será obvio para un experto en la materia que una fenorrespuesta adecuadamente definida puede ser *cuantitativamente* diferente entre las líneas celulares que expresan prototeramuteína y teramuteína como resultado de las diferencias en la actividad específica (si existe) entre la teramuteína y su correspondiente prototeramuteína. Las mutaciones inductoras de teramuteína pueden aumentar o disminuir la actividad específica de dicha teramuteína en relación con la correspondiente prototeramuteína. Cuando se compara una línea celular que expresa teramuteína con una línea celular que expresa prototeramuteína, es preferible que la fenorrespuesta seleccionada sea cualitativamente igual en ambos tipos de células. Por lo tanto, el investigador experto puede elegir normalizar la actividad de la línea celular que expresa teramuteína a la de la línea celular que expresa prototeramuteína, o

viceversa. Tales métodos de normalización son estándar en la técnica. Véase, por ejemplo, Bolstad et al., (2003)

Alternativamente, el investigador experto también puede desear usar células huésped no modificadas o células huésped que alberguen el vector de expresión solo como células de control para ciertos procedimientos experimentales. (Las células huésped son las células en las que se introdujo un vector de expresión que codifica la teramuteína para generar las células de prueba). Este puede ser el caso en el que el investigador solo está interesado en identificar un inhibidor o activador específico de la teramuteína de interés, independientemente de si dicho compuesto también es activo contra la prototeramuteína de interés (pTOI) o no. [Reemplazar el trabajo activo]

4) Las células de prueba y control se mantienen o propagan (aunque no necesariamente al mismo tiempo) en medios de crecimiento (o incluso en animales intactos) en condiciones adecuadas de modo que la fenorrespuesta pueda expresarse y analizarse. Las células de control que expresan la prototeramuteína pueden tratarse con un modulador conocido de la prototeramuteína, o con una sustancia de prueba, y las células de prueba se tratan con compuestos de prueba para determinar si son activas contra la teramuteína, según lo medido por la capacidad de dichas sustancias para modular la fenorrespuesta de la manera esperada. Alternativamente, las células de control que no expresan la prototeramuteína también pueden ser sustituidas, dependiendo de la fenorrespuesta particular que el investigador experto haya elegido para el estudio. Las sustancias se pueden analizar en las células de prueba y, opcionalmente, en las células de control al mismo tiempo o en otro momento, y se pueden comparar los resultados.

En una realización de la invención, las sustancias que son activas con respecto a las células de prueba se pueden identificar rápidamente por su capacidad para modular la fenorrespuesta de las células de prueba de la misma manera que, por ejemplo, el modulador conocido de la prototeramuteína altera la fenorrespuesta de las células de control que expresan prototeramuteína. En otra realización, las sustancias activas pueden identificarse por su capacidad para modular la actividad de la teramuteína en las células de prueba mientras tienen poco o ningún efecto sobre las células de control no modificadas (que no expresan prototeramuteína y/o teramuteína). El investigador experto apreciará fácilmente las muchas variaciones de este enfoque que pueden utilizarse para identificar, por ejemplo, moduladores que son más efectivos contra la teramuteína, o que son igualmente efectivos contra la prototeramuteína y una o más teramuteínas específicas correspondientes.

Se pueden observar y/o medir otras fenorrespuestas e incluyen, por ejemplo, la detección de sustratos de la prototeramuteína y la detección de cambios en la expresión génica que están regulados por la actividad de la teramuteína. En los términos más simples, cualquier característica de la célula que el investigador experto haya correlacionado previamente con la actividad funcional de la teramuteína puede ser adecuada para usar con tales métodos. Sin embargo, al seleccionar una característica dada, el investigador experto primero debe verificar que dicha característica cumpla los criterios de ser una fenorrespuesta de acuerdo con las enseñanzas que se dan en detalle en este documento. El investigador experto también puede desear normalizar la fenorrespuesta con las células que expresan teramuteína con aquella de las células que expresan prototeramuteína.

Las características adecuadas para la detección pueden medirse mediante una variedad de métodos muy conocidos por los expertos en la materia. Dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, detección de fluorescencia de proteínas adecuadamente marcadas (FACS), inmunohistoquímica (IHC) para la detección de la expresión de proteínas, ensayos de unión competitiva a radioligandos, técnicas de transferencia de matriz sólida, tales como transferencias Northern, Southern y Western de extractos celulares, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), ensayos de inmunosorción ligada a enzimas (ELISA), ensayos de fosforilación, ensayos de retardo de gel, perturbaciones potenciales de membrana y similares. La característica fenotípica relevante puede detectarse en la célula intacta después del tratamiento con una sustancia de prueba o, alternativamente, en una fracción subcelular de la célula después del tratamiento de la célula intacta con una sustancia de prueba.

Una vez que se identifican los compuestos que tienen el efecto deseado sobre las células de prueba que expresan teramuteína, puede ser deseable (pero no necesario) verificar independientemente que los compuestos identificados están ejerciendo sus efectos sobre la teramuteína a través de un mecanismo de unión directa, es decir que los compuestos cumplen los criterios de ser inhibidores o activadores (según se desee) de la teramuteína de acuerdo con las enseñanzas de la invención (se remite al lector a las definiciones de los términos "activador" e "inhibidor" como se dieron anteriormente). Esto se puede lograr con numerosos ensayos de unión estándar conocidos por un experto en la materia, que incluyen muestras de proteínas purificadas o ensayos de unión celular intactos usando células transfectadas con la prototeramuteína o teramuteína apropiadas junto con controles apropiados según lo dictado por métodos científicos sólidos. Dado que tales métodos están bien establecidos en la técnica, no se reiterarán en el presente documento. Numerosos textos de referencia discuten ampliamente tales técnicas (véase, por ejemplo, Foreman y Johansen, 2002; Enna S.J. et al., (1991) *Current Protocols in Pharmacology*, Wiley & Sons, Incorporated; Bonifacino, J.S. et al., (1999) *Current Protocols in Cell Biology*, Wiley & Sons, Incorporated). Véase también Housey, G.M. 1988, Capítulo 4, y las referencias citadas allí; véase también Horowitz et al., 1981.

En una realización particular de la invención, el método se usa para identificar sustancias que son inhibidores de la teramuteína p210^{Bcr-Abl-T315l}. La prototeramuteína y la teramuteína se expresan cada una en células Ba/F3 (murinas) utilizando una metodología estándar y las fenorrespuestas que se observan son características de crecimiento (densidad celular terminal para un cultivo celular cuidadosamente definido y crecimiento en ausencia de interleucina-

3 (IL-3). Las células huésped no modificadas, o las células huésped que contienen el vector de expresión solamente o ambos, también pueden usarse opcionalmente. En otra realización más, las células de prueba solas pueden usarse con o sin referencia a un inhibidor o activador conocido.

5 Otro ensayo útil es la determinación del estado de fosforilación de un sustrato directo de p210^{Bcr-Abl-T315I}, uno de tales sustratos es Crkl (Gorre et al., Science 293: 876-80 (2001)), una proteína adaptadora que media la conexión entre Bcr-Abl y Ras. El estado de fosforilación de CRKL es representativo de la actividad de señalización de p210^{Bcr-Abl} en una célula. Otro sustrato secuencia abajo es p62DOK. Cualquiera de estos sustratos sería suficiente para estos fines, siempre que, por supuesto, se haya demostrado que la fosforilación de dicho sustrato se produce dentro de la
10 célula, y no es simplemente un evento de autofosforilación de la TOI o PTOI como se discutió anteriormente. También se pueden monitorear otros componentes en cascada de la transducción de señales, incluidas las quinasas de la familia src, STAT5, PI3 quinasa, raf quinasa, RAS, MEK, ERK1 y ERK2, JNK1, 2 y 3, MLK1, 2 y 3, MKK4, MKK7, AKT, mTOR, HSP90 y otras.

15 Como se ejemplifica en el presente documento, se han identificado inhibidores de la teramuteína T315I. Además, estos inhibidores también son activos en diferentes grados contra la prototeramuteína p210^{Bcr-Abl-Wt} de tipo silvestre.

De acuerdo con la presente invención, una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos que modulan la actividad funcional de una teramuteína p210^{Bcr-Abl} se administra a un mamífero que la necesita. El
20 término "administrar" como se usa en el presente documento significa administrar los compuestos de la presente invención a un mamífero mediante cualquier método que pueda lograr el resultado buscado. Se pueden administrar, por ejemplo, por vía oral, parenteral (intravenosa o intramuscular), tópica, transdérmica o por inhalación. El término "mamífero" como se usa en el presente documento pretende incluir, pero no se limita a, humanos, animales de laboratorio, mascotas domésticas y animales de granja. "Cantidad terapéuticamente efectiva" significa una cantidad
25 de un compuesto que, cuando se administra a un mamífero, es eficaz para producir el efecto terapéutico deseado, tal como inhibir la actividad de la quinasa, inhibir el crecimiento y la división de las células cancerosas, etc.

La divulgación proporciona un método para tratar la enfermedad en un mamífero mediante la administración al
30 mamífero de una cantidad efectiva, de un modulador de una teramuteína. Las enfermedades adecuadas para ser tratadas de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, trastornos neoplásicos recurrentes u otros trastornos proliferativos que se han vuelto resistentes a fármacos administrados previamente. El método también es útil para superar la variación entre individuos con respecto a la susceptibilidad al tratamiento farmacológico que resulta de las diferencias alélicas entre los objetivos de la terapia. Por ejemplo, el papel de la señalización de la tirosina quinasa p210^{Bcr-Abl} en LMC se ha demostrado ampliamente, al igual que el papel de las
35 teramuteínas de p210^{Bcr-Abl} en la recurrencia resistente a fármacos de LMC. Además, las diferentes muteínas de p210^{Bcr-Abl} exhiben una sensibilidad variable a los inhibidores de p210^{Bcr-Abl}. Aunque algunas teramuteínas surgen durante la terapia con medicamentos, otras pueden preexistir en la población. Estos últimos ejemplos no se reconocerán como teramuteínas hasta el momento en que se produzca el estado de enfermedad y sea seguido por un tratamiento con una clase conocida de agentes terapéuticos. Solo después de dicho tratamiento se revelarán
40 tales teramuteínas preexistentes, como clínicamente significativas en términos de falta de respuesta relativa que conducen a la progresión de la enfermedad en el paciente que alberga la teramuteína.

En una realización de la divulgación, los moduladores de teramuteína se administran en combinación con uno o más
45 de otros agentes antineoplásicos. Se puede usar cualquier agente antineoplásico adecuado, tal como un agente quimioterapéutico, radiación o combinaciones de los mismos. El agente antineoplásico puede ser un agente alquilante o un antimetabolito. Los ejemplos de agentes alquilantes incluyen, pero no están limitados a, cisplatino, ciclofosfamida, melfalan y dacarbazina. Los ejemplos de antimetabolitos incluyen, pero no se limitan, doxorubicina, daunorubicina y paclitaxel, gemcitabina e inhibidores de topoisomerasa irinotecano (CPT-11), aminocampotecina, camptotecina, DX-8951f, topotecano (inhibidor de topoisomerasa I) y etopósido (VP-16; inhibidor de topoisomerasa
50 II) y tenipósido (VM-26; inhibidor de topoisomerasa II). Cuando el agente antineoplásico es radiación, la fuente de radiación puede ser externa (radioterapia de haz externo - EBRT) o interna (braquiterapia - BT) para el paciente que está siendo tratado. La dosis de agente antineoplásico administrada depende de numerosos factores, que incluyen, por ejemplo, el tipo de agente, el tipo y la gravedad del tumor que se está tratando y la vía de administración del agente. Sin embargo, debe enfatizarse que la presente invención no se limita a ninguna dosis particular, vía de
55 administración o combinación de agentes quimioterapéuticos u otros regímenes terapéuticos que se combinan con la administración de moduladores de teramuteína.

Los agentes antineoplásicos que se conocen actualmente en la técnica o que se están evaluando se pueden agrupar en una variedad de clases que incluyen, por ejemplo, inhibidores mitóticos, agentes alquilantes,
60 antimetabolitos, antibióticos intercalantes, inhibidores del factor de crecimiento, inhibidores del ciclo celular, enzimas, inhibidores de la topoisomerasa, agentes anti supervivencia, modificadores de la respuesta biológica, antihormonas y agentes anti-angiogénesis, todos los cuales pueden administrarse con inhibidores o activadores de teramuteínas.

Un modulador de una teramuteína puede administrarse con anticuerpos que neutralizan otros receptores implicados
65 en el crecimiento tumoral. Además, un modulador de una teramuteína se puede administrar con un compuesto que de otro modo modula un componente de una ruta de transducción de señales, preferiblemente un componente de la

ruta de transducción de señales en el que la teramuteína está activa y que es común a una o más vías de transducción de señales. En una realización de la divulgación, se usa un modulador de teramuteína en combinación con un antagonista del receptor que se une específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Particularmente preferidas son las proteínas de unión a antígeno que se unen al dominio extracelular de EGFR y bloquean la unión de uno o más de sus ligandos y/o neutralizan la activación de EGFR inducida por ligando. Un antagonista de EGFR puede ser un anticuerpo que se une a EGFR o un ligando de EGFR e inhibe la unión de EGFR a su ligando. Los ligandos para EGFR incluyen, por ejemplo, EGF, TGF- α , amfirregulina, EGF de unión a heparina (HB-EGF) y betacelulina. Se cree que EGF y TGF- α son los ligandos endógenos principales que dan como resultado la estimulación mediada por EGFR, aunque se ha demostrado que TGF- α es más potente para promover la angiogénesis. Debe apreciarse que el antagonista de EGFR puede unirse externamente a la porción extracelular de EGFR, que puede o no inhibir la unión del ligando, o internamente al dominio de tirosina quinasa en el caso de agentes químicos. Los ejemplos de antagonistas de EGFR que se unen a EGFR incluyen, sin limitación, agentes biológicos tales como anticuerpos (y equivalentes funcionales de los mismos) específicos para EGFR, y agentes químicos (moléculas pequeñas), tales como inhibidores de quinasas sintéticas que actúan directamente sobre el dominio citoplasmático de EGFR.

Otros ejemplos de receptores del factor de crecimiento implicados en la tumorigénesis son los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VDGFR-1 y VEGFR-2), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), factor de crecimiento nervioso (NGFR), factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), y otros.

En una terapia de combinación, el inhibidor de teramuteína se administra antes, durante o después de comenzar la terapia con otro agente, así como cualquier combinación de los mismos, es decir, antes y durante, antes y después, durante y después, o antes, durante y después de comenzar la terapia con agente antineoplásico. Por ejemplo, el inhibidor de teramuteína puede administrarse entre 1 y 30 días, preferiblemente 3 y 20 días, más preferiblemente entre 5 y 12 días antes de comenzar la radioterapia. En una realización preferida de la divulgación, la quimioterapia se administra antes de, concurrentemente con o, más preferiblemente, después de la terapia con anticuerpos.

En la presente divulgación, se puede usar cualquier método o ruta adecuados para administrar los inhibidores de teramuteína, y opcionalmente, para administrar conjuntamente agentes antineoplásicos y/o antagonistas de otros receptores. Los regímenes de agente antineoplásico utilizados incluyen cualquier régimen que se considere óptimo para el tratamiento de la afección neoplásica del paciente. Diferentes tumores malignos pueden requerir el uso de anticuerpos antitumorales específicos y agentes antineoplásicos específicos, que se determinarán con base en cada paciente. Las rutas de administración incluyen, por ejemplo, administración oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. La dosis de antagonista administrada dependen de numerosos factores, que incluyen, por ejemplo, el tipo de antagonistas, el tipo y la gravedad del tumor a tratar y la vía de administración de los antagonistas. Sin embargo, debe enfatizarse que la presente divulgación no se limita a ningún método o vía de administración particular.

Los vehículos adecuados incluyen, por ejemplo, uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. Los portadores pueden comprender además cantidades menores de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que mejoran la vida útil o la efectividad del modulador de teramuteína como ingrediente activo. Las composiciones pueden, como es bien conocido en la técnica, formularse para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada del ingrediente activo después de la administración al mamífero.

Las composiciones pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación sólidas, semisólidas y líquidas, tales como tabletas, píldoras, polvos, soluciones líquidas, dispersiones o suspensiones, liposomas, supositorios, soluciones inyectables e infusibles. La forma preferida depende del modo de administración previsto y la aplicación terapéutica.

Tales composiciones se preparan de una manera bien conocida en la técnica farmacéutica. Al preparar la composición, el ingrediente activo generalmente se mezclará con un vehículo, o se diluirá con un vehículo y/o se incluirá dentro de un vehículo que puede, por ejemplo, tener la forma de una cápsula, bolsita, papel u otro recipiente. Cuando el vehículo sirve como diluyente, puede ser un material sólido, semisólido o líquido, que actúa como vehículo, excipiente o medio para el ingrediente activo. Por lo tanto, la composición puede estar en forma de tabletas, pastillas, bolsitas, cápsulas lisas, elixires, suspensiones, aerosoles (tal como un sólido o en un medio líquido), ungüentos que contienen, por ejemplo, hasta 10% en peso del compuesto activo, cápsulas de gelatina blandas y duras, supositorios, soluciones de inyección, suspensiones, polvos envasados estériles y como un parche tópico.

Debe apreciarse que los métodos y composiciones pueden administrarse a cualquier mamífero adecuado, tal como un conejo, rata o ratón. Más preferiblemente, el mamífero es un humano.

Los compuestos también pueden estar presentes como sales. En el contexto de la divulgación, se da preferencia a sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables se refieren a una sal de adición de

ácido o una sal de adición de base de un compuesto en la que se entiende que el contraión resultante en la técnica es generalmente aceptable para usos farmacéuticos. Las sales farmacéuticamente aceptables pueden ser sales de los compuestos de acuerdo con la invención con ácidos inorgánicos u orgánicos. Se da preferencia a sales con ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico o ácido sulfúrico, o sales con ácidos carboxílicos o sulfónicos orgánicos, tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido maleico, ácido fumárico, ácido, ácido málico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido benzoico o ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido fenilsulfónico, ácido toluenosulfónico o ácido naftalenodisulfónico. Las sales farmacéuticamente aceptables también pueden ser sales metálicas o de amonio de los compuestos. Se da preferencia particular a, por ejemplo, sales de sodio, potasio, magnesio o calcio, y también a sales de amonio que se derivan de amoníaco o aminas orgánicas, tales como, por ejemplo, etilamina, dietilamina o trietilamina, dietanolamina o trietanolamina, dicitclohexilamina, dimetilaminoetanol, arginina, lisina, etilendiamina o 2-feniletilamina. (véase, Berge et al., J. Pharm. Sci, 1977, 66, 1-19).

1. a través de toda la solicitud, se ha hecho referencia a varias publicaciones, textos de referencia, libros de texto, manuales técnicos, patentes y solicitudes de patentes. Las enseñanzas y divulgaciones de estas publicaciones, patentes, solicitudes de patentes y otros documentos describen el estado de la técnica a la que pertenece la presente invención.

3. Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención. Las descripciones detalladas de los métodos convencionales, tales como los empleados en la construcción de vectores y plásmidos, la inserción de genes que codifican polipéptidos en dichos vectores y plásmidos, la introducción de plásmidos en las células huésped y la expresión y determinación de los mismos de los genes y productos génicos se pueden obtener de numerosas publicaciones, incluyendo Sambrook, J et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Coligan, J. et al. (1994) Current Protocols in Immunology, Wiley & Sons, Incorporated; Enna, S.J. et al. (1991) Current Protocols in Pharmacology, Wiley & Sons, Bonifacino, J.S. et al. (1999) Current Protocols in Cell Biology, Wiley & Sons, y la patente de los Estados Unidos No. 4.980.281.

Ejemplos

El p210^{Bcr-Abl-T315I} es una teramuteína de la proteína p210^{Bcr-Abl} (p210^{Bcr-Abl}) que es resistente a la inhibición por el mesilato de imatinib (Gleevec, STI-571). La mutación en la posición 315 convierte una treonina en un residuo de isoleucina y es una de varias mutaciones que se observan en pacientes resistentes o en recaída. Este mutante en particular, sin embargo, es la teramuteína más resistente hasta ahora identificada.

Se determinó una fenorrespuesta para una línea celular Ba/F3 modificada para sobreexpresar la teramuteína p210^{Bcr-Abl-T315I}. La fenorrespuesta se determinó en relación con las células Ba/F3 no transformadas y las células Ba/F3 que expresan la prototeramuteína p210^{Bcr-Abl-wt}. La fenorrespuesta fue la capacidad de los mutantes T315I de crecer a una densidad de saturación celular más alta en condiciones de cultivo análogas en comparación con la línea celular Ba/F3 no transformada de control, y crecer en ausencia de interleucina 3 (IL-3), que se requiere para el mantenimiento de la línea celular Ba/F3 de control no transformada. La fenorrespuesta se definió y caracterizó de acuerdo con las enseñanzas dadas anteriormente.

El sistema de detección utilizado fue un sistema de conteo y obtención de imágenes de células de alta velocidad en el que se inyectaron secuencialmente 3 µL de volúmenes de muestra de células a través de una microcelda óptica de 5 µL, se digitalizaron imágenes y se almacenaron electrónicamente, escanearon y luego contaron, todo bajo un sistema de control basado en un microordenador. El sistema tiene la capacidad de realizar recuentos celulares directos en muestras de cultivos tan pequeños como 500 µL y proporciona recuentos de células totales estadísticamente significativos de muestras de cultivo que contienen tan pocas como 12.500 células. Todas las figuras que muestran el recuento celular y los ensayos de viabilidad utilizaron este sistema para la adquisición y análisis de datos. Simultáneamente con el recuento de células realizado, el sistema también es capaz de determinar la viabilidad celular general al distinguir las células contadas que formaron imágenes que han excluido el azul de tripano (contadas como células "viables") de las células que han incorporado el colorante azul de tripano (contadas como células "no viables"). La inyección de azul de tripano en la muestra celular se produce inmediatamente antes de que la muestra se inyecte secuencialmente en la microcelda para el conteo y la obtención de imágenes simultáneas.

El sistema puede integrarse en el flujo de trabajo de dispositivos de detección de alto rendimiento para proporcionar un sistema de conteo de células sensible y preciso y de ensayo de viabilidad celular que sea más confiable y menos propenso a los efectos de confusión de los ensayos celulares basados en la viabilidad metabólica tales como XTT o azul Alamar.

Inicialmente, se seleccionaron aproximadamente 113.000 compuestos a concentraciones que generalmente varían de 10 a 20 µM para identificar un subconjunto que fue capaz de afectar el crecimiento de las células Ba/F3 (células Ba/F3 T315I) que sobreexpresan la teramuteína p210^{Bcr-Abl-T315I} por cualquier medio.

Un total de aproximadamente 11.760 compuestos mostró más del 50% de inhibición del crecimiento, que se pensó que correspondían a aproximadamente 4500 clases químicas distintas. La reevaluación de estos compuestos con la

misma línea celular arrojó una base de datos de capacidad de respuesta del compuesto que luego se clasificó y ordenó de acuerdo con aquellos compuestos que exhiben la inhibición general más alta de crecimiento. A partir de esta base de datos ordenada por rango, los 130 compuestos con la puntuación más alta (basados en el mayor grado de inhibición del crecimiento observado en las concentraciones más bajas que se probaron los compuestos) se volvieron a analizar en un sistema de ensayo definido basado en células usando Ba/F3 T315I como células de prueba y Ba/F3 de tipo silvestre como células de control de acuerdo con los métodos de la presente invención. Los compuestos de interés fueron aquellos que inhibieron diferencialmente el crecimiento de células Ba/F3 que expresan la teramuteína p210^{Bcr-Abl-T315I} en relación con las células Ba/F3 de tipo silvestre no transformadas. Se identificaron seis compuestos que cumplían los criterios deseados, y algunos de estos compuestos se analizaron con más detalle utilizando la línea de células Ba/F3 p210^{Bcr-Abl-wt} (células Ba/F3 P210) también. Un compuesto no estaba disponible para pruebas adicionales debido a la falta de disponibilidad de material adicional del proveedor de productos químicos. Los cinco compuestos restantes se evaluaron independientemente en ensayos adicionales basados en células usando las líneas celulares mencionadas anteriormente, así como en un ensayo de proteína quinasa purificada libre de células usando fragmentos humanos de dominio de quinasa de 120 Kd producidos de forma recombinante, aislados tanto de p210^{Bcr-Abl} de tipo silvestre como del dominio de quinasa mutante P210 T315I.

Los cinco compuestos inhibieron la actividad de p210^{Bcr-Abl-T315I} de 120 Kd medida por inhibición de la actividad de autofosforilación, como se muestra en la Figura 4. Por lo tanto, de los 6 compuestos con la puntuación más alta de más de 113.000 compuestos seleccionados, al menos 5 de los seis inhibieron directamente el mutante p210^{Bcr-Abl-T315I}. Es de destacar que el Compuesto 5 parece extender la banda de proteína recombinante en el gel de SDS-PAGE. Esto también fue evidente en el gel teñido con plata (datos no mostrados). Es posible que este compuesto en realidad sea un inhibidor "suicida" que sea capaz de entrecruzar covalentemente la POI para inhibir permanentemente su actividad, pero esto requerirá más estudio.

En conjunto, las enseñanzas y los resultados descritos en este documento proporcionan una prueba concluyente de que el sistema es capaz de identificar inhibidores o activadores de la teramuteína seleccionada, y el investigador experto reconocerá de inmediato que dicho sistema puede aplicarse fácilmente a cualquier otra teramuteína con solo modificaciones obvias y menores.

En las Figuras 1 y 2 se muestran ejemplos representativos de los resultados del ensayo basado en células que demuestran la inhibición selectiva del crecimiento de la línea celular Ba/F3 T315I en relación con las células Ba/F3 no transformadas de tipo silvestre. Los compuestos inhibieron el crecimiento y redujeron la viabilidad de las células que expresan la teramuteína T315I a concentraciones bajo las cuales el crecimiento y la viabilidad de las células no transformadas Ba/F3 de tipo silvestre (que no expresan p210^{Bcr-Abl-wt} o p210^{Bcr-Abl-T315I}) no se vieron relativamente afectados, mientras que las células que expresaban tanto la prototeramuteína como la teramuteína se inhibieron sustancialmente. En algunos casos, las células que expresan T315I se inhibieron en un grado aún mayor que las células que expresan prototeramuteína P210. (Véase, por ejemplo, Figura 3, lado derecho, resultados del Compuesto 3 contra células P210 y T315I.

En resumen, los métodos presentados en este documento proporcionan un avance fundamental en la forma de un enfoque generalizable para crear o identificar moduladores de cualquier teramuteína dada. Los resultados demuestran de manera concluyente el poder del método para identificar compuestos críticamente necesarios para superar un tipo específico de resistencia adquirida a los medicamentos que es uniformemente fatal en ciertas poblaciones de pacientes y actualmente no es tratable. Además, es evidente para un experto en esta técnica que las técnicas y métodos descritos en el presente documento pueden, utilizando modificaciones obvias, generalizarse directamente a cualquier teramuteína potencial de importancia clínica.

Es notable que de un cribado primario de más de 100.000 compuestos en el que aproximadamente 10.000 compuestos exhibieron algún grado de inhibición del crecimiento, cuando las sustancias inhibitoras del crecimiento más potentes se volvieron a analizar utilizando el método descrito en detalle en este documento, se identificaron 6 compuestos distintos y todos los compuestos que se probaron posteriormente exhibieron actividad inhibitoria en un ensayo de proteína quinasa purificada libre de células usando el mutante T315I (un compuesto no estaba disponible para pruebas adicionales). Sobre la base de resultados tan notables, para el experto en la materia queda claro de inmediato que *el método puede aplicarse eficazmente para la identificación de inhibidores o activadores de cualquier teramuteína* con base en la selección y definición adecuadas de la fenorrespuesta de acuerdo con las enseñanzas en las secciones presentadas anteriormente y los documentos citados. Por ejemplo, con el conocimiento de lo anterior, un experto en la materia podría diseñar fácilmente un sistema de ensayo para identificar inhibidores de las teramuteínas derivadas de otras prototeramuteínas que se sabe que exhiben mutaciones que confieren resistencia a los medicamentos, tal como el producto del gen c-kit o el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (EGFR), o el receptor α y β del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). No se debe inferir ninguna limitación sobre la utilidad del método con respecto a su capacidad para ser utilizado con cualquier teramuteína dada expresada en cualquier tipo de célula de mamífero para la que se pueda detectar una fenorrespuesta correspondiente.

Referencias de patentes

- Senechal, K., Halpern, J., Sawyers, C.L. The CRKL Adaptor Protein Transforms Fibroblasts and Functions in Transformation by the BCR-ABL Oncogene. *The Journal of Biological Chemistry*, Volumen 271 (Septiembre 20, 1996) Páginas 23255-23261.
- 5 Daley, G. Q., Van Etten, R. A., Baltimore, D. Induction of Chronic Myelogenous Leukemia in Mice by the P210bcr/abl Gene of the Philadelphia Chromosome. *Science*, Vol 247 (Febrero 16, 1990) Páginas 824-830.
- Druker, B. J., M.D., Talpaz, M., M.D., Resta, D.J., R.N., Peng, B., Ph.D., Buchdunger, E., Ph.D., Ford, J.M., M.D., Lydon, N. B., Ph.D., Kantarjian, H., M.D., Capdeville, R., M.D., Ohno-Jones, S., B.S., Sawyers, C. L., M.D. Efficacy and Safety of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in Chronic Myeloid Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, Volumen 344 (Abril 5, 2001) Páginas 1031-1037.
- 10 Druker, B.J., M.D., Sawyers, C.L., M.D., Kantarjian, H., M.D., Resta, D. J., R.N., Reese, S.F., M.D., Ford, J.M., M.D., Capdeville, R., M.D., Talpaz, M., M.D. Activity of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in the Blast Crisis of Chronic Myeloid Leukemia and Acute Lymphoblastic Leukemia with the Philadelphia Chromosome. *The New England Journal of Medicine*, Volumen 344 (Abril 5, 2001) Páginas 1038-1042.
- 15 Faderl, S., M.D., Talpaz, M., M.D., Estrov, Z., M.D., O'Brien, S., M.D., Kurzrock, R., M.D., Kantarjian, H. M., M.D. The Biology of Chronic Myeloid Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, Volumen 341 (Julio 15,1999) Páginas 164-172.
- 20 Sawyers, C.L. M.D. Chronic Myeloid Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, Volumen 340 (Abril 29,1999) Páginas 1330-1340.
- Schindler, T., Bornmann, W., Pellicena, P., Miller, W. T., Clarkson, B., Kuriyan, J. Structural Mechanism for STI-571 Inhibition of Abelson Tyrosine Kinase. *Science*, Volumen 289 (Septiembre 15,2000) Páginas 1938-1942.
- 25 Corbin, A. S., Buchdunger, E., Pascal, F., Druker, B. J. Analysis of the Structural Basis of Specificity of Inhibition of the Abl Kinase by STI571. *The Journal of Biological Chemistry*, Volumen 277 (Agosto 30, 2002) Páginas 32214-32219.
- 30 La Rosee, P., Corbin, A. S., Stoffregen, E. P., Deininger, M.W., Druker, B. J. Activity of the Bcr-Abl Kinase Inhibitor PD180970 Against Clinically Relevant Bcr-Abl Isoforms That Cause Resistance to Imatinib Mesylate (Gleevec, STI-571). *Cancer Research*, Volumen 62 (Diciembre 15, 2002) Páginas 7149-7153.
- 35 Weisberg, E., Griffin, J. D. Mechanism of Resistance to the ABL Tyrosine Kinase Inhibitor STI 571 in BCR/ABL Transformed Hematopoietic Cell Lines. *Blood*, Volumen 95 (Junio 1, 2000) Páginas 3498-3505.
- Le Coutre, P., Tassi, E., Varella-Garcia, M., Barni, R., Mologni, L., Cabrita, G., Marchesi, E., Supino, R., Gambacorti-Passerini, C. Induction of Resistance to the Abelson Inhibitor STI571 in Human Leukemic Cells Through Gene Amplification. *Blood*, Volumen 95 (Marzo 1, 2000) Páginas 1758-1766.
- 40 Mahon, F. X., Deininger, M. W.N., Schultheis, B., Chabrol, J., Reiffers, J., Goldman, J.M., Melo, J.V. Selection and Characterization of BCR-ABL Positive Cell Lines with Differential Sensitivity to the Tyrosine Kinase Inhibitor STI571: Diverse Mechanisms of Resistance. *Blood*, Volumen 96 (Agosto 1, 2000) Páginas 1070-1079.
- 45 Allen, P.B., Wiedemann, L.M. An Activating Mutation in the ATP Binding Site of the ABL Kinase Domain. *The Journal of Biological Chemistry*, Volumen 271 (Agosto 9, 1996) Páginas 19585-19591.
- 50 Branford, S., Rudzki, Z., Walsh, S., Grigg, A., Arthur, C., Taylor, K., Hermann, R., Lynch, K.P., Hughes, T.P. High Frequency of Point Mutations Clustered Within the Adenosine Triphosphate-Binding Region of BCR/ABL in Patients with Chronic Myeloid Leukemia or Ph-positive Acute Lymphoblastic Leukemia Who Develop Imatinib (STI571) Resistance. *Blood*, Volumen 99 (Mayo 1, 2002) Páginas 3472-3475.
- 55 Druker, B. J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G.M., Fanning, S., Zimmermann, J., Lydon, N.B. Effects of a Selective Inhibitor of the Abl Tyrosine Kinase on the Growth of Bcr-Abl Positive Cells. *Nature Medicine*, Volumen 2 (Mayo 1996) Páginas 561-566.
- Gambacorti-Passerini, C., Barni, R., Le Coutre, P., Zucchetti, M., Cabrita, G., Cleris, L., Rossi, F., Gianazza, E., Brueggen, J., Cozens, R., Pioltelli, P., Pogliani, E., Corneo, G., Formelli, F., D'Incalci, M. Role of $\alpha 1$ Acid Glycoprotein in the In Vivo Resistance of Human BCR-ABL+ Leukemic Cells to the Abl Inhibitor STI571. *Journal of the National Cancer Institute*, Volumen 92 (Octubre 18, 2000) Páginas 1641-1650.
- 60 Gorre, M.E., Mohammed, M., Ellwood, K., Hsu, N., Paquette, R., Rao, P.N., Sawyers, C.L. Clinical Resistance to STI-571 Cancer Therapy Caused by BCR- ABL Gene Mutation or Amplification. *Science*, Volumen 293 (Agosto 3, 2001) Páginas 876-880.
- 65

- Hofmann, W. K., Jones, L.C., Lemp, N.A., DeVos, S., Gschaidmeier, H., Hoelzer, D., Ottmann, O. G., Koeffler, H. P. Ph+ Acute Lymphoblastic Leukemia Resistant to the Tyrosine Kinase Inhibitor STI571 has a Unique BCR-ABL Gene Mutation. *Blood*, Volumen 99 (Marzo 1, 2002) Páginas 1860-1862.
- 5 Senechal, K., Heaney, C., Druker, B., Sawyers, C.L. Structural Requirements for Function of the Crkl Adapter Protein in Fibroblasts and Hematopoietic Cells. *Molecular and Cellular Biology*, Volumen 18 (Septiembre 1998) Páginas 5082-5090.
- 10 Barthe, C., Cony-Makhoul, P., Melo, J.V., Reiffers, J., Mahon, F.X. Roots of Clinical Resistance to STI- 571 Cancer Therapy. *Science*, Volumen 293 (Septiembre 21, 2001) Página 2163a.
- Von Bubnoff, N., Schneller, F., Peschel, C., Duyster, J. BCR-ABL Gene Mutations in Relation to Clinical Resistance of Philadelphia-Chromosome-Positive Leukaemia to STI571: A Prospective Study. *The Lancet*, Volumen 359 (Febrero 9, 2002) Páginas 487-491.
- 15 Cunningham, B.C., De Vos, A.M., Mulkerrin, M.G., Ultsch, M, Wells, J.A. **Selecting Ligand Agonists and Antagonists**. patente de los Estados Unidos No. 5.506.107 (Abril 9,1996).
- 20 Cunningham, B.C., Wells, J.A., Clark, R. G., Olson, K., Fuh, G.G. **Method for Inhibiting Growth Hormone Action**, patente de los Estados Unidos No. 6.004.931 (Diciembre 21, 1999).
- Wakai, T., Kanda, T., Hirota, S., Ohashi, A., Shirai, Y. Hatakeyama, K. Late Resistance to Imatinib Therapy in a Metastatic Gastrointestinal Stromal Tumour is Associated with a Second KIT Mutation. *British Journal of Cancer* (Abril 20, 2004) Páginas 1-3.
- 25 Weigel, U., Meyer, M., Sebald, W. Mutant Proteins of Human Interleukin 2. Renaturation Yield, Proliferative Activity and Receptor Binding. *European Journal of Biochemistry*, Volumen 180 (Marzo 15, 1989) Páginas 295-300.
- 30 Hou, Y.Y., Tan, Y.S., Sun, M.H., Wei, Y.K., Xu, J.F., Lu, S.H., A-Ke-Su, S.J., Zhou, Y.N., Gao, F., Zheng, A.H., Zhang, T.M., Hou, W.Z., Wang, J., Du, X., Zhu, X.Z. C-kit Gene Mutation in Human Gastrointestinal Stromal Tumors. *World Journal of Gastroenterology*, Volumen 10 (Mayo 1, 2004) Páginas 1310-1314.
- 35 Noble, M.E.M., Endicott, J.A., Johnson, L.N. Protein Kinase Inhibitors: Insights into Drug Design from Structure. *Science*, Volumen 303 (Marzo 19, 2004) Páginas 1800-1805.
- Lynch, T.J., M.D., Bell, D.W., Ph.D., Sordella, R., Ph.D., Gurubhagavatula, S., M.D., Okimoto, R.A., B.S., Brannigan, B.W., B.A., Harris, P.L., M.S., Haserlat, S.M., B.A., Supko, J.G., Ph.D., Haluska, F.G., M.D., Ph.D., Louis, D.N., M.D., Christiani, D.C., M.D., Settleman, J., Ph.D., Haber, D.A., M.D., Ph.D. Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *The New England Journal of Medicine*, Volumen 350 (Mayo 20, 2004) Páginas 2129-2139.
- 40 Marx, J. Why a New Cancer Drug Works Well, in Some Patients. *Science*, Volumen 304 (Abril 30, 2004) Páginas 658-659.
- 45 Paez, J.G., Jänne, P.A., Lee, J.C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., Kaye, F.J., Lindeman, N., Boggon, T.J., Naoki, K., Sasaki, H., Fujii, Y., Eck, M.J., Sellers, W.R., Johnson, B.E., Meyerson, M. EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy. *Scienceexpress* (Abril 29, 2004) Páginas 1-4.
- 50 Leonard, G.D., Fojo, T., Bates, S.E. The Role of ABC Transporters in Clinical Practice. *The Oncologist*, Volumen 8 (2003) Páginas 411-424.
- Adcock, I.M., Lane, S.J. Mechanisms of Steroid Action and Resistance in Inflammation. *Journal of Endocrinology*, Volumen 178 (2003) Páginas 347-355.
- 55 Loutfy, M.R., Walmsley, S.L. Salvage Antiretroviral Therapy in HIV Infection. *Expert Opinion*, Volumen 3 (2002) Páginas 81-90.
- 60 Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001, Volumen 1-3.
- 65 Foreman, J. C. and Johansen, T. *Textbook of Receptor Pharmacology* CRC Press, 2002; Boca Raton 11: *Blood*. 2004 Septiembre 30; A cell-based screen for resistance of Bcr-Abl positive leukemia identifies the mutation pattern for PD166326, an alternative Abl kinase inhibitor. Von Bubnoff N, Veach DR, Van Der Kuip H, Aulitzky WE, Sanger J, Seipel P, Bornmann WG, Peschel C, Clarkson B, Duyster J.

White, MF, Livingston, JM, Backer, Lauris, V, Dull, TJ, Ullrich A, Kahn, CR. Mutation of the Insulin Receptor at Tyrosine 960 Inhibits Signal Transmission but Does Not Affect Its Tyrosine Kinase Activity. Cell, Vol. 54, 641-649; 1988.

- 5 Leukemia. 2004 Oct 21 Histone deacetylase inhibitor NVP-LAQ824 has significant activity against myeloid Leukemia cells in vitro and in vivo. Weisberg E, Catley L, Kujawa J, Atadja P, Remiszewski S, Fuerst P, Cavazza C, Anderson K, Griffin JD.
- 10 3: Blood. 2004 Oct 15; 104(8): 2532-9. Epub 2004 Jul 15. Related Articles, Links Inhibition of wild-type and mutant Bcr-Abl by AP23464, a potent ATP-based oncogenic protein kinase inhibitor: implications for LMC. O'Hare T, Pollock R, Stoffregen EP, Keats JA, Abdullah OM, Moseson EM, Rivera VM, Tang H, Metcalf CA 3rd, Bohacek RS, Wang Y, Sundaramoorthi R, Shakespeare WC, Dalgarno D, Clackson T, Sawyer TK, Deininger MW, Druker BJ.
- 15 5: Leukemia. Agosto de 2004; 18 (8): 1352-6. Related Articles, Links Efficacy of dual-specific Bcr-Abl and Src-family kinase inhibitors in cells sensitive and resistant to imatinib mesylate. Tipping AJ, Baluch S, Barnes DJ, Veach DR, Clarkson BM, Bornmann WG, Mahon FX, Goldman JM, Melo JV.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para detectar o identificar una sustancia de prueba que es un inhibidor o activador de una proteína endógena que alberga una mutación que hace que dicha proteína (teramuteína) sea resistente a un fármaco que se sabe que inhibe o activa de manera terapéuticamente efectiva su contraparte no mutada (prototeramuteína), que es capaz de provocar una fenorrespuesta detectable, que comprende:
 - a) incubar una primera célula que expresa la teramuteína a un nivel sustancialmente constante con sustancias de prueba;
 - b) incubar una segunda célula que expresa la prototeramuteína correspondiente a un nivel sustancialmente constante con un inhibidor o activador conocido de la prototeramuteína;
 - c) comparar una fenorrespuesta de la segunda célula con el inhibidor o activador conocido de la prototeramuteína para la fenorrespuesta de la primera célula a las sustancias de prueba; y
 - d) determinar que la fenorrespuesta de la primera célula se inhibe o activa al menos en el mismo grado que la fenorrespuesta de la segunda célula es inhibida o activada por el inhibidor o activador conocido de la prototeramuteína, identificando así una sustancia como un inhibidor o un activador de la teramuteína.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la fenorrespuesta de la célula que expresa la teramuteína a la sustancia es mayor que la fenorrespuesta de la célula que expresa la prototeramuteína al inhibidor o activador conocido de la prototeramuteína.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la teramuteína o prototeramuteína es un componente de una cascada de transducción de señales.
4. El método de la reivindicación 1, en el que la teramuteína o prototeramuteína es una enzima.
5. El método de la reivindicación 1, en el que la teramuteína o prototeramuteína es una proteína quinasa.
6. El método de la reivindicación 1, en el que la teramuteína o prototeramuteína es una tirosina quinasa.
7. El método de la reivindicación 1, en el que la teramuteína o prototeramuteína es un receptor tirosina quinasa.
8. El método de la reivindicación 1, en el que la prototeramuteína es p210^{Bcr-Abl}.
9. El método de la reivindicación 1, en el que la teramuteína es el mutante T315I de p210^{Bcr-Abl}.
10. El método de la reivindicación 1, en el que la fenorrespuesta es un cambio en una característica cultural, morfológica o transitoria de la célula.
11. El método de la reivindicación 1, en el que la fenorrespuesta incluye fosforilación de un sustrato intracelular de la teramuteína.
12. El método de la reivindicación 1, en el que la fenorrespuesta se detecta en una fracción subcelular de la célula.

Figura 1: Compuesto 2 (C2) de prueba de crecimiento y viabilidad de líneas celulares BaF3

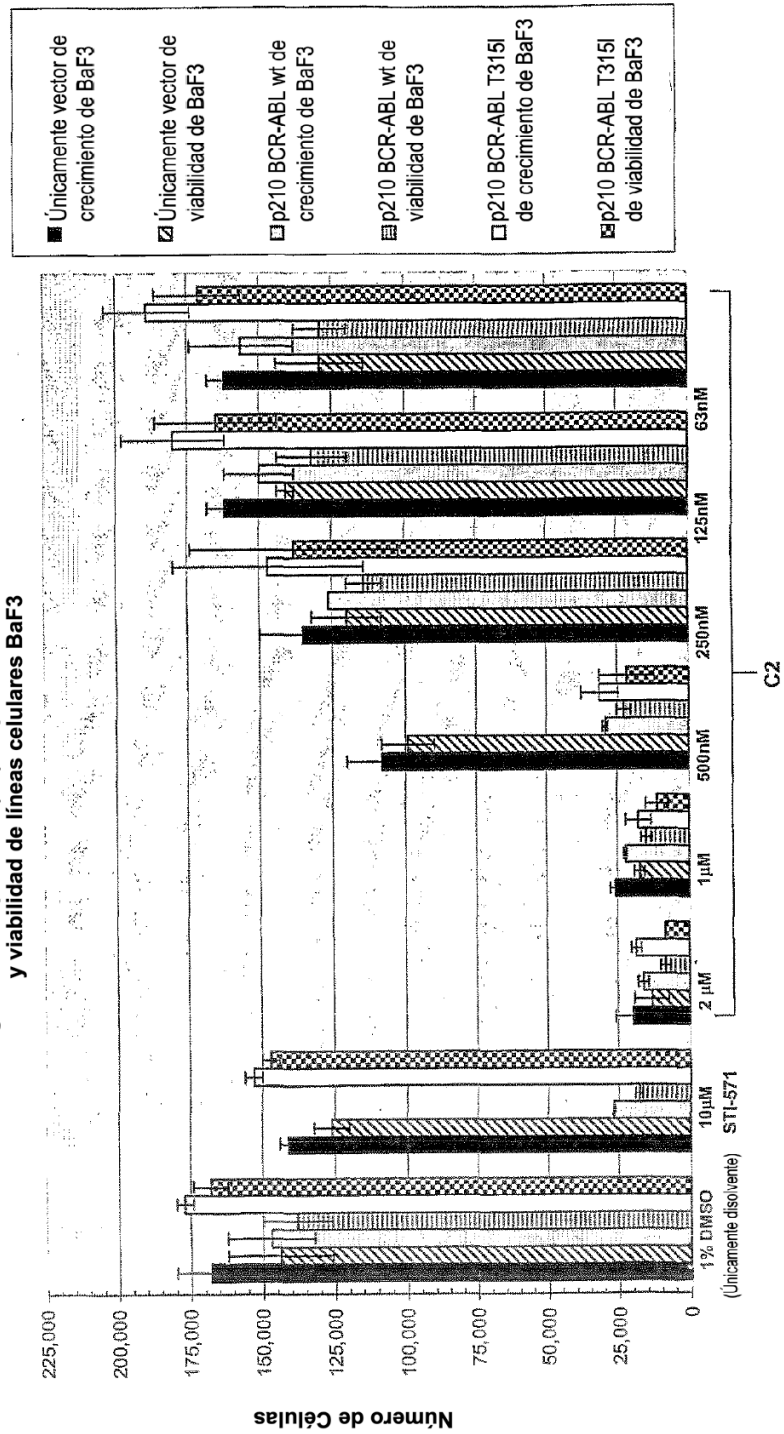
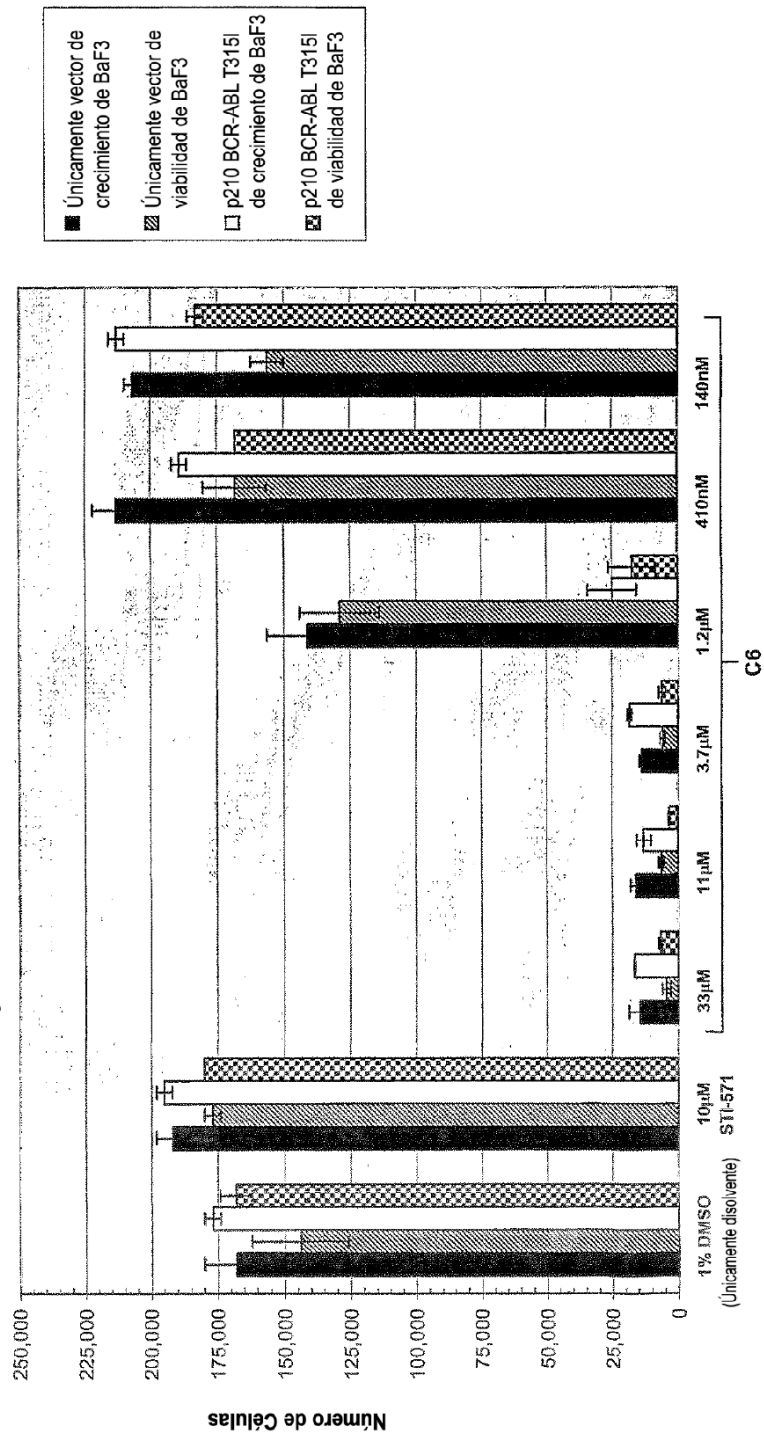


Figura 2: Compuesto 6 (C6) de prueba de crecimiento y viabilidad de líneas celulares BaF3



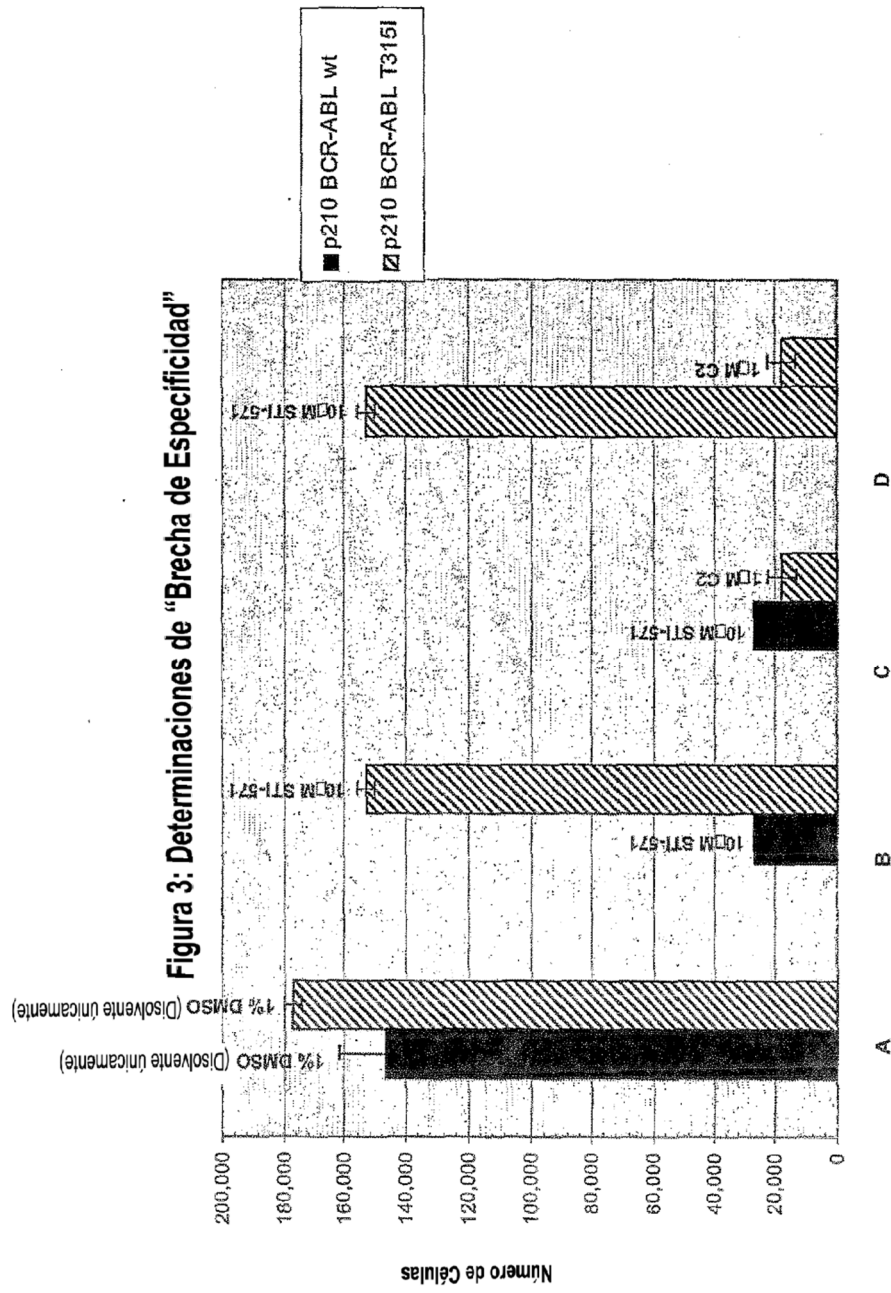
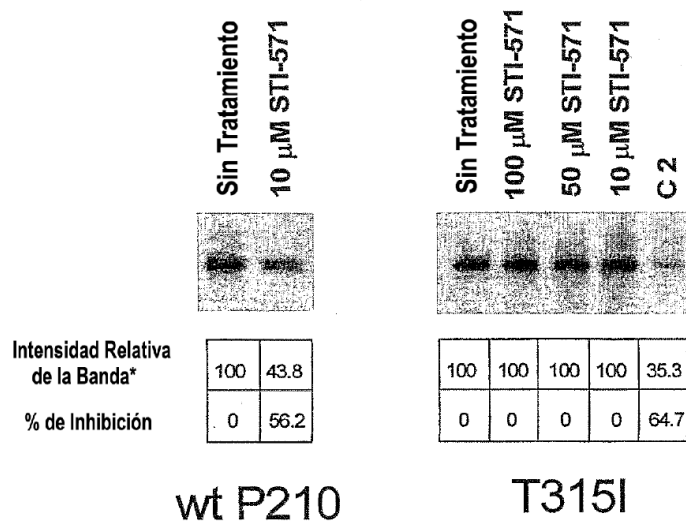


Figura 4: Nuevo Inhibidor de la Quinasa Mutante T315I Abelson



*Determinado por el Análisis Digital de Imágenes Escaneadas

Figura 5

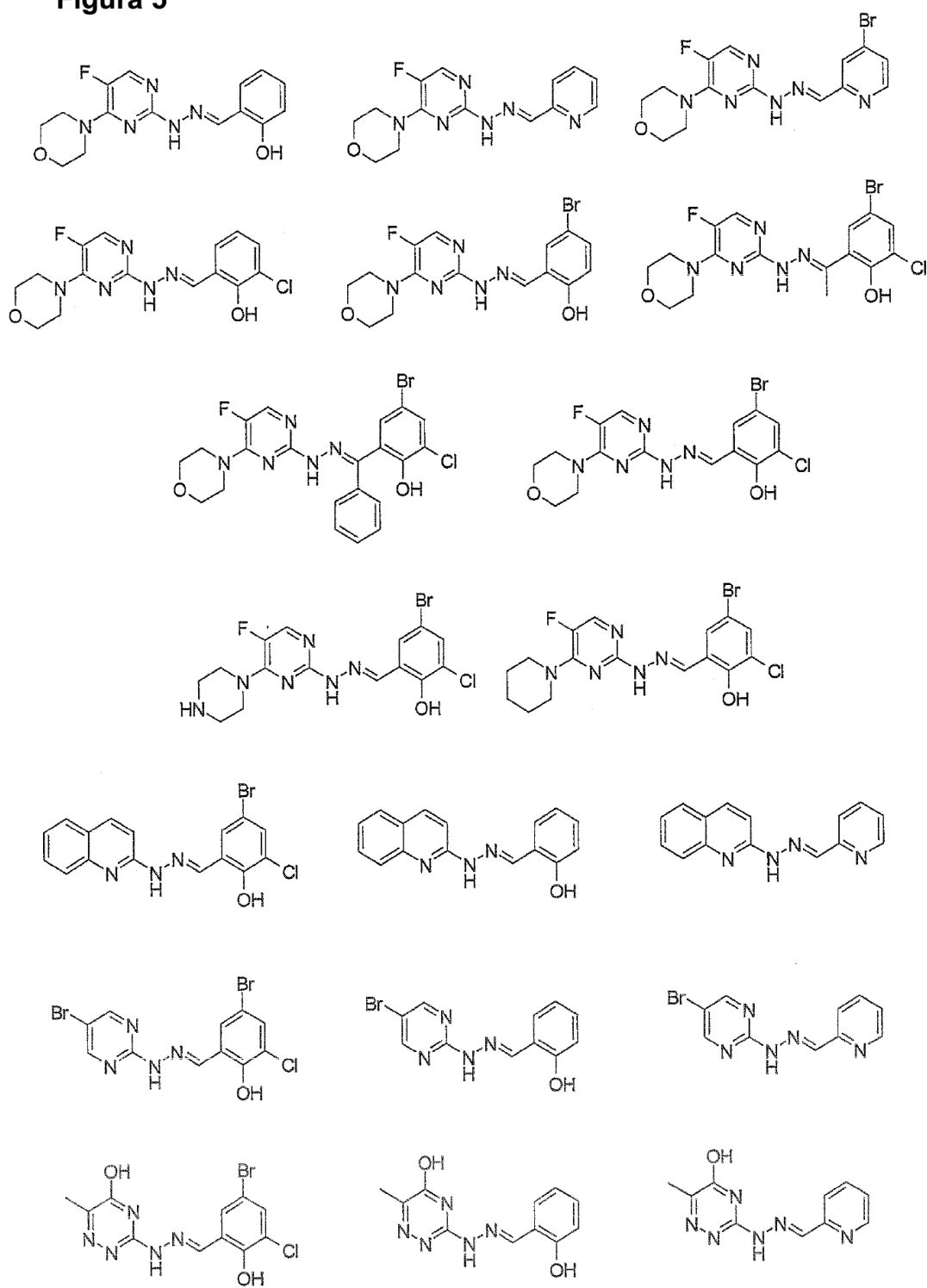


Figura 6

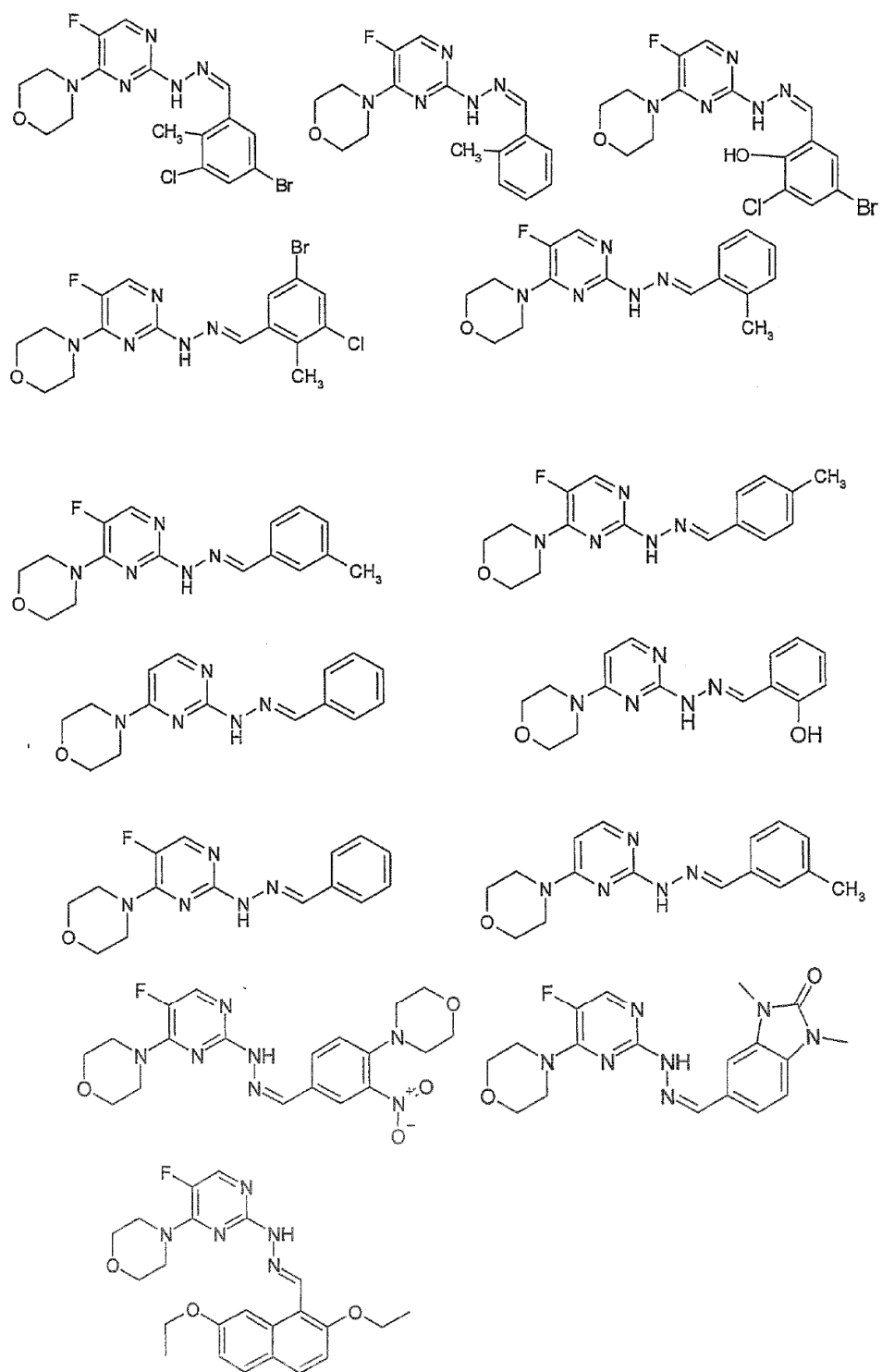


Figura 7

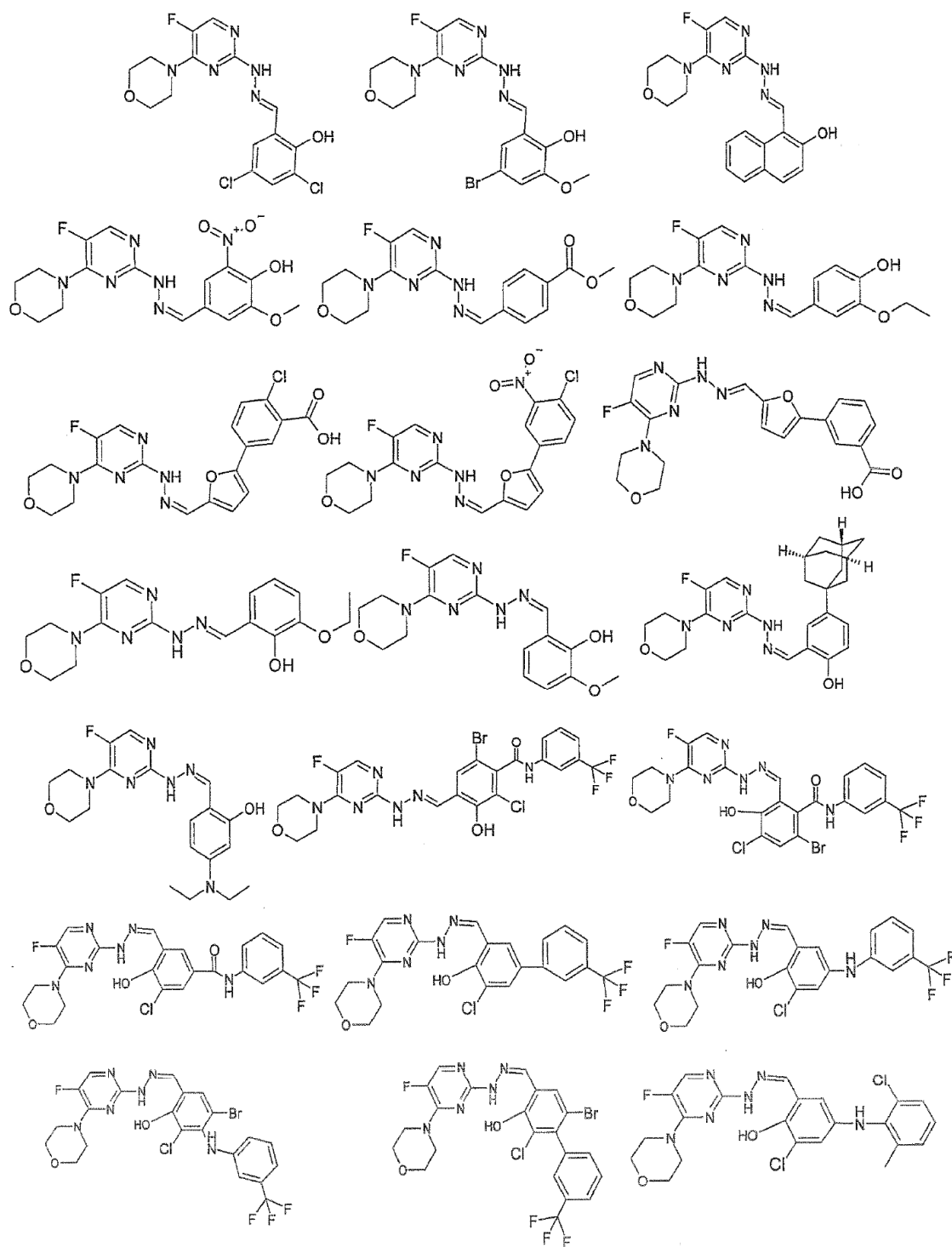


Figura 8

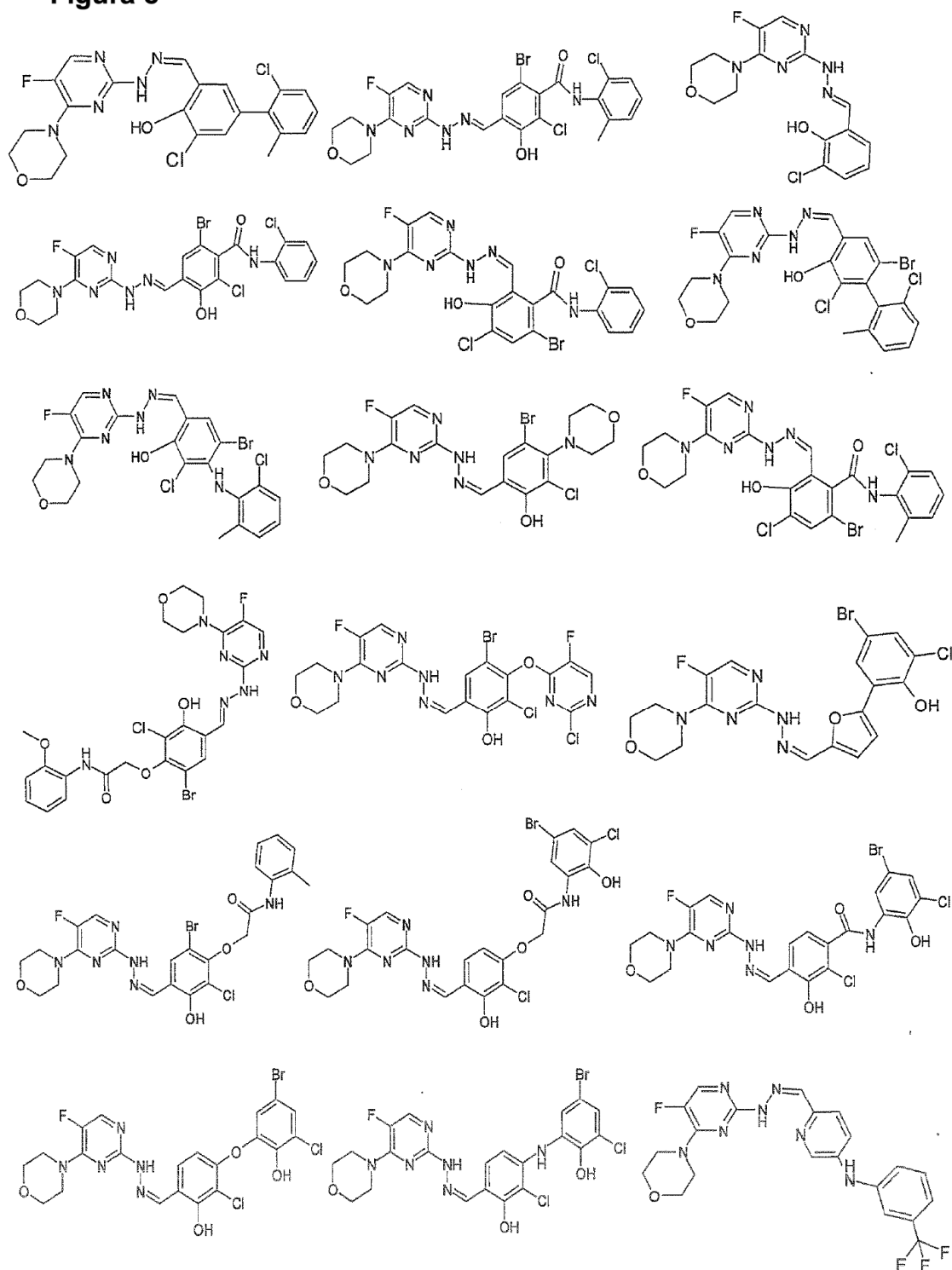


Figura 9

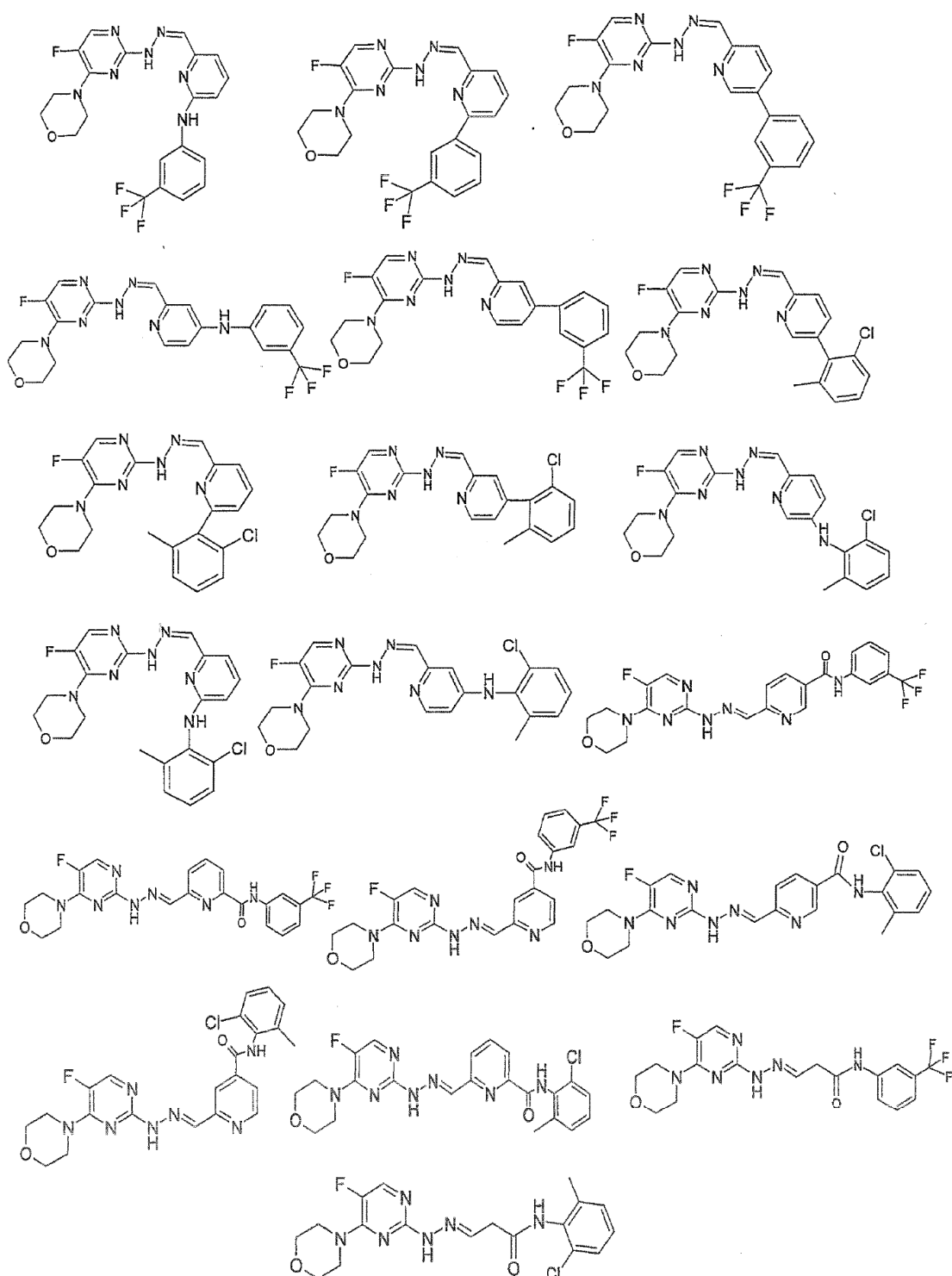


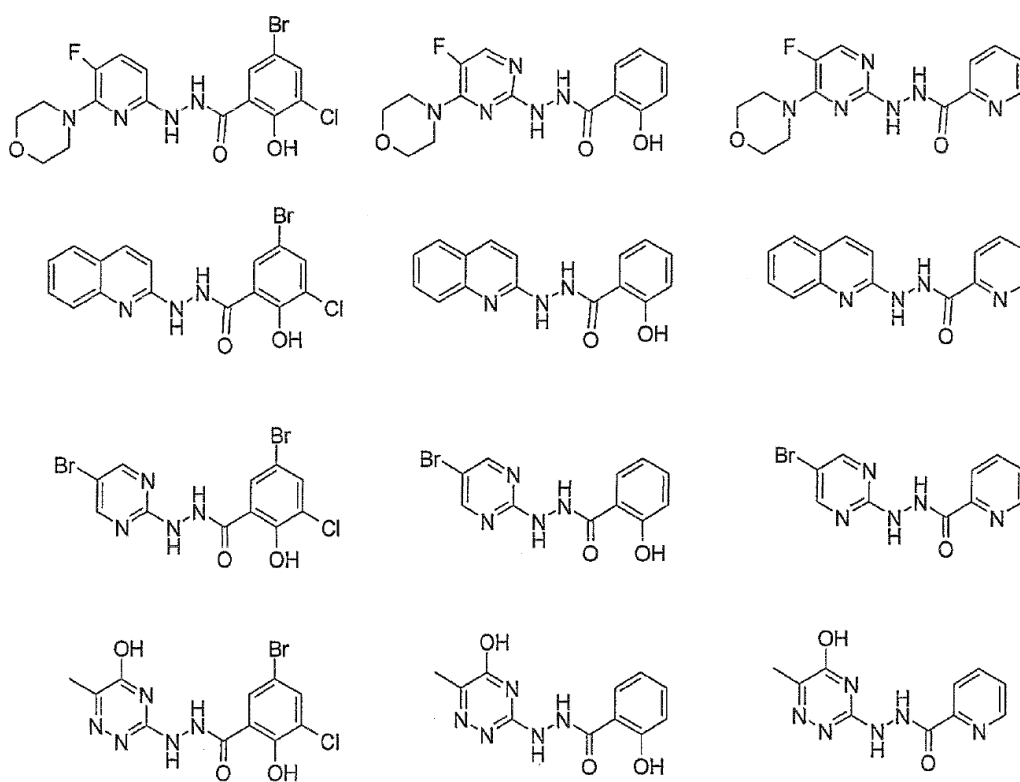
Figura 10

Figura 11

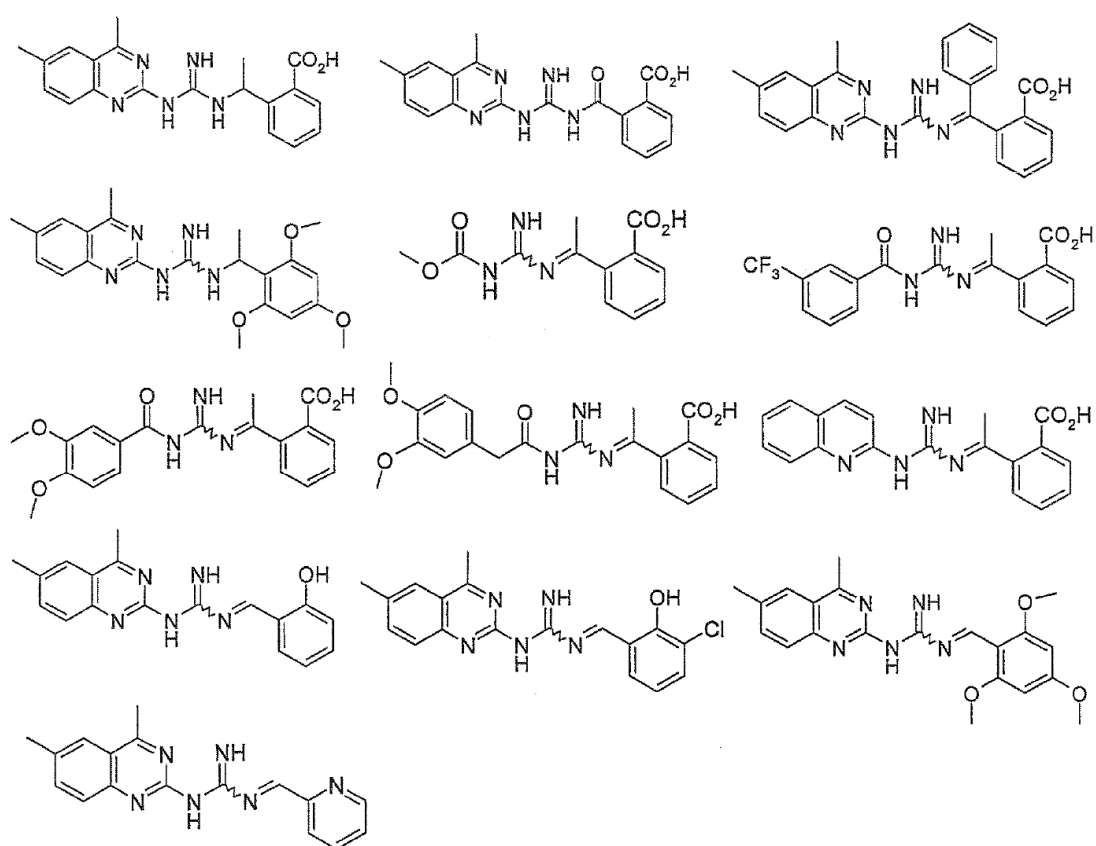


Figura 12

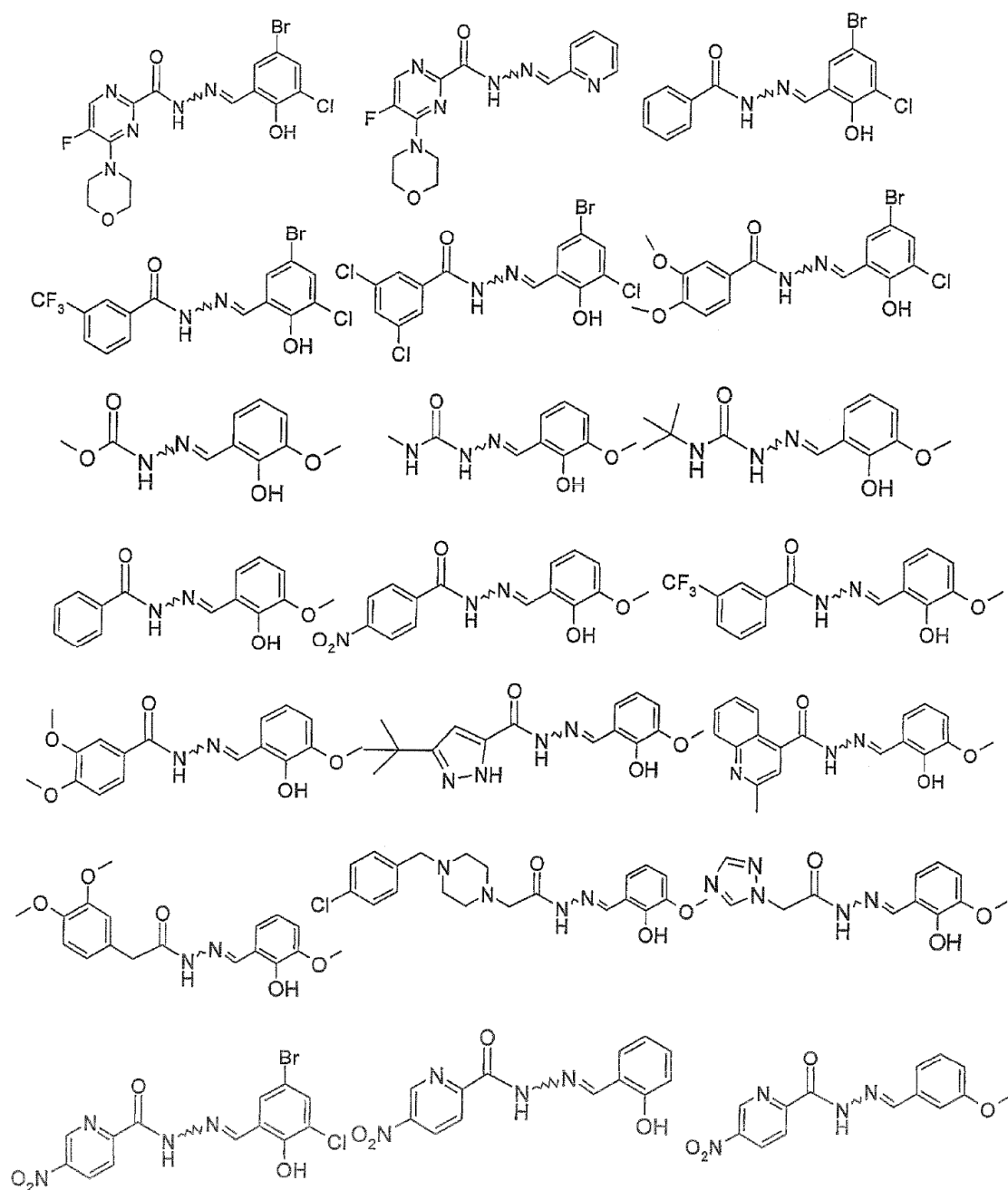


Figura 13

