

(11) Número de Publicação: **PT 1845990 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 31/497 (2011.01) **A61P 35/00** (2011.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2006.01.27**

(30) Prioridade(s): **2005.01.27 US 647568 P**
2005.04.06 US 669245 P
2005.09.29 US 722053 P

(43) Data de publicação do pedido: **2007.10.24**

(45) Data e BPI da concessão: **2011.09.28**
244/2011

(73) Titular(es):

NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS, INC.
INTELLECTUAL PROPERTY - R440 P.O. BOX
8097 EMERYVILLE, CA 94662-8097 **US**

(72) Inventor(es):

DANIEL LOPES DE MENEZES **US**
CARLA HEISE **US**
XIAOHUA XIN **US**

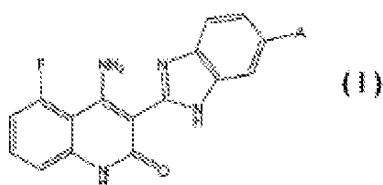
(74) Mandatário:

ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA **PT**

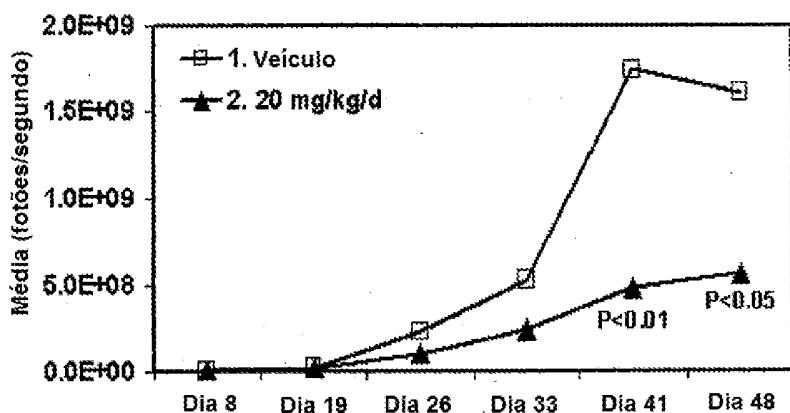
(54) Epígrafe: **TRATAMENTO DE TUMORES METASTATIZADOS**

(57) Resumo:

O PRESENTE INVENTO REFERE-SE A MÉTODOS PARA TRATAR O CANCRO TAL COMO TUMORES METASTATIZADOS INCLUINDO A ADMINISTRAÇÃO DE UM COMPOSTO DA ESTRUTURA I, UM TAUTÓMERO DO COMPOSTO, UM SAL FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL DO COMPOSTO, UM SAL FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL DO TAUTÓMERO, OU UMA SUA MISTURA A UM SUJEITO. O COMPOSTO, TAUTÓMERO, SAL DO COMPOSTO, SAL DO TAUTÓMERO OU SUA MISTURA PODE SER UTILIZADO PARA PREPARAR MEDICAMENTOS PARA TRATAR O CANCRO METASTÁTICO. A VARIÁVEL A TEM OS VALORES AQUI DEFINIDOS.

RESUMO**"TRATAMENTO DE TUMORES METASTATIZADOS"**

Tratamento com Composto 1 Demonstrou uma Contagem de Fotões Média Significativamente Inferior em Comparação com o Tratamento com Veículo



O presente invento refere-se a métodos para tratar o cancro tal como tumores metastatizados incluindo a administração de um composto da Estrutura I, um tautómero do composto, um sal farmaceuticamente aceitável do composto, um sal farmaceuticamente aceitável do tautómero, ou uma sua mistura a um sujeito. O composto, tautómero, sal do composto, sal do tautómero ou sua mistura pode ser utilizado para preparar medicamentos para tratar o cancro metastático. A variável A tem os valores aqui definidos.

DESCRIÇÃO**"TRATAMENTO DE TUMORES METASTATIZADOS"****DOMÍNIO DO INVENTO**

Este invento refere-se, de uma maneira geral, a composições para tratar tumores metastatizados em sujeitos. Mais particularmente, o presente invento proporciona a utilização de um composto tal como a 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona e tautómeros, sais e suas misturas no tratamento e preparação de medicamentos para tratar tumores metastatizados.

ANTECEDENTES DO INVENTO

Os vasos capilares atingem quase todos os tecidos do corpo humano e fornecem oxigénio e nutrientes aos tecidos, assim como removem produtos residuais. Sob condições típicas, as células endoteliais que revestem os vasos capilares não se dividem e os vasos capilares, por isso, não aumentam normalmente de número ou dimensão num adulto humano. Sob certas condições normais, contudo, tal como quando um tecido é danificado, ou durante certas partes do ciclo menstrual, os vasos capilares começam a proliferar rapidamente. Este processo de formação de novos vasos capilares a partir de vasos sanguíneos pré-existentes

é conhecido como angiogénesse ou neovascularização. Ver Folkman, J. *Scientific American* 275, 150-154 (1996). A angiogénesse durante o sarar dos ferimentos é um exemplo da neovascularização patofisiológica durante a vida adulta. Durante o sarar dos ferimentos, os vasos capilares adicionais proporcionam um fornecimento de oxigénio e nutrientes, promovem a granulação dos tecidos e auxiliam a remoção dos resíduos. Após o término do processo de cura, os vasos capilares normalmente regredem. Lymboussaki, A. "Vascular Endothelial Growth Factors and their Receptors in Embryos, Adults and in Tumors" Academic Dissertation, University of Helsinki, Molecular Cancer Biology Laboratory and Department of Pathology, Haartman Institute, (1999).

A angiogénesse também desempenha um importante papel no crescimento das células cancerígenas. É sabido que uma vez que um ninho de células cancerígenas atinja uma certa dimensão, cerca de 1 a 2 mm de diâmetro, as células cancerígenas têm que desenvolver um fornecimento sanguíneo de modo a que o tumor cresça dado que a difusão não será suficiente para abastecer as células cancerígenas com oxigénio e nutrientes suficientes. Deste modo, espera-se que a inibição da angiogénesse pare o crescimento das células cancerígenas.

Os receptores de tirosina cinase (RTKs, da sigla em inglês) são polipeptídos transmembrana que regulam o desenvolvimento do crescimento celular e a diferenciação, remodelação e regeneração de tecidos adultos. Mustonen, T.

e tal., J. Cell Biology 129, 895-898 (1995); van der Geer, P. et al. Ann rev. Cell Biol. 10, 251-337 (1994). Os ligandos polipéptidos conhecidos como factores de crescimento ou citoquinas, são conhecidos como activando os RTKs. A sinalização dos RTKs envolve a ligação com ligando e uma alteração da conformação no domínio externo do receptor, resultando na sua dimerização. Lymoussaki, A. "Vascular Endothelial Growth Factors and their Receptors in Embryos, Adults and in Tumors" Academic Dissertation, University of Helsinki, Molecular/Cancer Biology Laboratory and Department of Pathology, Haartman Institute, (1999); Ulrich, A. et al., Cell 61, 203-212 (1990). A ligação do ligando ao RTK resulta na transfosforilação do receptor em resíduos de tirosina específicos e subsequente activação do domínio catalítico para a fosforilação de substratos citoplasmáticos. Id.

Duas subfamílias de RTKs são específicas do endotélio vascular. Estas incluem a família do factor de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e a subfamília do receptor Tie. Os RTKs de Classe V incluem VEGFR1 (FLT-1), VEGFR2 (KDR (humano), Flk (rato)) e VEGFR3 (FLT-4). Shibuya, M et al., Oncogene 5, 519-525 (1990); Terman, B. et al., Oncogene 6, 1677-1683 (1991); Apreikova, O. et al., Cancer Res. 52, 746-748 (1992).

O cancro é uma doença que envolve defeitos genéticos múltiplos que conduzem à proliferação das células tumorais. Por isso, estratégias que simultaneamente inibam

vias de sinalização de células múltiplas podem conduzir a resultados terapêuticos mais favoráveis. A sobre-expressão de RTK e/ou mutações de activação estão frequentemente presentes em células tumorais e estão implicadas no crescimento do tumor. Blume-Jensen, P e Hunter, T., "Oncogenic Kinase Signaling", *Nature*, 411, p. 355-365 (2001); Carnellet, P., "Manipulating Angiogenesis in Medicine", *J. Intern. Med.*, 255, p. 538-61 (2004). A maior parte dos RTKs comprehende um domínio extracelular, que está associado à ligação com ligando e domínios de cinase intracelular que mediam a autofosforilação, recrutando ou sinalizando as moléculas a jusante que despoletam uma cascata de eventos de transdução de sinal. Existem mais do que 30 RTKs implicados no cancro, por exemplo, RTKs do tipo III (PDGFR, CSF-1R, FLT3 e c-KIT), tipo IV (FGFR1-4) e tipo V (VEGFR1-3).

O mieloma múltiplo (MM) uma doença de células B malignas, é caracterizado pela acumulação de células de plasma clonais na medula óssea (BM, da sigla em inglês) e lesões osteolíticas dos ossos. O transplante das células estaminais autólogas (ASCT, da sigla em inglês) e avanços em cuidados auxiliares tiveram um impacto significativo na doença e na sobrevivência a longo prazo. Attal, M. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1996; 335: 91-97; e Barlogie, B. et al., *Blood*, 1997, 89: 789-793. Contudo, os doentes têm reincidência invariavelmente e o MM permanece uma doença fatal universal. A identificação das translocações cromossomais não aleatórias no MM resultou no desenvolvimento de

poderosas ferramentas de prognóstico e na identificação de novos alvos moleculares. Quase metade dos doentes com MM sobre-expressam um oncogene putativo, desregulado por uma de cinco altas translocações de imunoglobulina recorrente (IgH): 11q13 (cyclina D1), 6p21 (cyclina D3), 4p16 (FGFR3 e MMSET), 16q23 (c-maf) e 20q11 (mafB). Kuehl, W. M. et al., *Nat Rev Cancer*, 2002; 2: 175-187; e Avet-Loiseau, H. et al., *Blood*, 2002; 99: 2185-2191. Estas translocações parecem representar um evento precoce e possivelmente seminal no desenvolvimento de MM. Mais recentemente, tornou-se claro que estas translocações de IgH específicas conferem significância prognóstica. Particularmente, a translocação t(4;14) que ocorre em aproximadamente 15% dos doentes parece conferir um prognóstico particularmente fraco do MM, sem benefício terapêutico aparente do ASCT. Fonseca, R. et al., *Blood*, 2003; 101: 4569-4575; Keats, J. J. et al., *Blood*, 2003; 101: 1520-1529; Moreau, P. et al., *Blood*, 2002; 100: 1579-1583; e Chang, H. et al. *Br. J. Haematol.*, 2004; 125: 64-68. Claramente, são necessárias novas aproximações de tratamento para estes doentes.

A translocação t(4;14) não é usual pelo facto de parecer desregular dois oncogenes potenciais, MMSET em der(4) e FGFR3 em der(14). Chesi, M. et al., *Nat. Genet.*, 1997; 16:260-265; e Chesi, M. et al., *Blood*, 1998; 92:3025-3034. Se, quer a desregulação quer um ou ambos os genes são críticos para a patogénese do MM isso não é sabido, contudo várias evidências apoiam um papel para o FGFR3 na iniciação e progressão do tumor. A activação de WT FGFR3, um RTK,

promove a proliferação e a sobrevivência em células de mieloma e transforma-se fracamente num modelo de rato hematopoético. Plowright, E. E. et al., Blood, 2000; 95:992-998; Chesi, M. et al., Blood, 2001; 97:729-736; e Pollett, J. B. et al., Blood, 2002; 100:3819-3821. A aquisição subsequente de mutações activantes de FGFR3 nalguns MM está associada à progressão até um estágio terminal de mieloma e transforma-se fortemente em vários modelos experimentais. Chesi, M. et al., Blood, 2001; 97:729-736; and Li, Z. et al., Blood, 2001; 97:2413-2419. Estudos *in vitro* sugerem que o FGFR3 pode conferir quimioresistência, uma observação apoiada por dados clínicos que demonstram fracas respostas à quimioterapia convencional e uma mais curta sobrevida média de doentes com MM t(4;14). Fonseca, R. et al., Blood, 2003; 101:4569-4575; Keats, J. J. et al., Blood, 2003; 101:1520-1529; Moreau, P. et al., Blood, 2002; 100:1579-1583; e Chang, H. et al., Br. J. Haematol., 2004; 125:64-68. Estas descobertas sugerem que a expressão ectópica de FGFR3 pode desempenhar um papel significativo, embora não singular, na oncogénese do mieloma, tornando assim este RTK um alvo para terapia de base molecular.

A inibição de FGFR3 em linhas de células de MM t(4;14) induz respostas citotóxicas que demonstram que estas células permanecem dependentes da sinalização de FGFR3 apesar da complexicidade das alterações genéticas nestas células derivadas de doentes em estado terminal. Trudel, S. et al., Blood, 2004; 103:3521-3528; Paterson, J. L. et al., Br. J. Haematol., 2004; 124:595-603; e Grand, E.

K. et al., Leukemia, 2004; 18:962-966. Estas observações estão congruentes com os resultados da inactivação do receptor da tirosina numa gama de malignidades humanas em que os sucessos clínicos foram documentados e encoraja o desenvolvimento clínico de inibidores de FGFR3 para o tratamento destes doentes com fraco prognóstico. Druker, B. J. et al., N. Engl. J. Med., 2001; 344:1031-1037; Demetri, G. D. et al., N. Engl. J. Med., 2002; 347:472-480; Slamon, D. J. et al., N. Engl. J. Med. 2001; 344:783-792; e Smith, B. D. et al., Blood, 2004; 103:3669-3676.

A leucemia mielóide aguda (AML, da sigla em inglês) é um cancro agressivo e representa 90% de todas as leucemias agudas dos adultos, com uma incidência de 3,9 por 100 000 e uma estimativa de 10 500 novos casos em cada ano. Redaelli, A. et al., Exper. Rev. Anticancer. Ther., 3:695-710 (2003). Os agentes citotóxicos (AraC + antraciclina) podem induzir a remissão até 70% de doentes de AML. Contudo, uma grande fracção reincide reflectindo a necessidade de terapias mais eficazes. Weick, J.K. et al., Blood, 88:2841-2851 (1996); Vogler, W.R. et al., J. Clin. Oncol., 10:1103-1111 (1992). A genotipagem das células tumorais indica que 25-35% de blastos AML acarretam mutações de tirosina cinase do tipo fms (flt3/Flik2/Stk-2), enquanto uma maior fracção (>70%) expressam o tipo selvagem de FLT3. Gilliland, D.G. et al., Curr. Opin. Hematol., 9:274-281 (2002); Nakao, M. et al., Leukemia, 10:1911-1918 (1996); Yokota, S. et al., Leukemia, 11:1605-1609 (1997). O receptor FLT3 é um membro do receptor de tirosina

cinase (RTK) de Classe III, que induz CSF-1R, c-KIT, PDGFR, e é funcionalmente conhecido como desempenhando um papel importante na proliferação, diferenciação e sobrevivência das células hematopoiéticas, células dendríticas, células assassinas naturais (NK, da sigla em inglês) e células B progenitoras. McKenna, H.J. et al., Blood, 95:3489-3497 (2000); Mackarehtschian, K. et al., Immunity, 3:147-161 (1995). O FLT3, como outros RTKs, é caracterizado por cinco domínios extracelulares do tipo IG e contém um domínio inserido de cinase hidrofílica. Blume-Jensen, P. et al., Nature, 411:355-365 (2001). A transdução de sinal a seguir à ligação do FLT3 modula múltiplas vias a jusante, incluindo STAT5 (trandutor de sinal e activador da transcrição 5), Ras/MAPK (proteína cinase activada por mitogéneo) e PI3K. Hayakawa, F. et al., Oncogene, 19:624-631 (2000); Takahashi, S. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 316:85-92 (2004); Zhang, S. et al., J. Exp. Med., 192:719-728 (2000); Rosnet, O. et al., Acta Haematol., 95:218-223 (1996). Em células com FLT3 mutante, a sinalização oncogénica foi ligada à activação da cinase constitutiva (na ausência de ligação FLT3) que é originada na activação da cinase desregulada e/ou perda de função do domínio autoinibidor. Stirewalt, D.L. et al., Nat. Rev. Cancer, 3:650-665 (2003); Brown, P. et al., Eur. J. Cancer, 40:707-721 (2004). A caracterização molecular destas mutações de FLT3 revelaram quer duplicações em tandem internas (ITD, da sigla em inglês) na região da justamembrana de FLT3 quer mutações pontuais no domínio da cinase (ASP835/836), com 17-34% sendo ITD de FLT3 e

aproximadamente 7% de mutações pontuais. Yamamoto, Y. et al., *Blood*, 97:2434-2439 (2001); Thiede, C., et al., *Blood*, 99:4326-4335 (2002); Abu-Duhier, F.M. et al., *Br. J. Haematol.*, 113:983-988 (2001). Para além disso, existe uma evidência considerável que implica as mutações ITD de FLT3 como de prognóstico negativo em AML, correlacionando com o aumento da reincidência da doença, e diminuição da sobrevivência global. Thiede, C. et al., *Blood*, 99:4326-4335 (2002); Schnittger, S. et al., *Blood*, 100: 59-66 (2002). Dada a relevância das mutações de FLT3 na AML, um certo número de aproximações alvo utilizando anticorpos/inibidores de cinase de moléculas pequenas de FLT3 são correntemente exploradas nas fases pré-clínicas ou precoces do desenvolvimento de fármacos. Brown, P. et al., *Eur. J. Cancer*, 40:707-721 (2004); O'Farrell, A.M. et al., *Clin. Cancer Res.*, 9:5464-5476 (2003); Weisberg, E., et al., *Cancer Cell*, 1:433-443 (2002); Smith, B.D. et al., *Blood*, (2004); Kelly, L.M. et al., *Cancer Cell*, 1:421-432 (2002).

Nos tumores da próstata, adicionalmente ao papel de VEGFR e PDGFR na angiogénesse, vários factores de crescimento de fibroblastos (FGFs, da sigla em inglês) e os seus receptores (FGFRs) facilitam a comunicação estromal-epitelial chave no desenvolvimento e homeostase da próstata humana. Griffioen, A.W. e Molema, G., "Angiogenesis: Potentials for Pharmacologic Intervention in the Treatment of Cancer, Cardiovascular Diseases, and Chronic Inflammation," *Pharmacol. Rev.*, 52, p. 237-68 (2000); Ferrara, N.. "VEGF: an Update on Biological and Therapeutic

Aspects," Curr. Opin. Biotechnol., 11, p. 617-24 (2000); Kwabi-Addo, B., Ozen, M., e Ittmann, M., "The Role of Fibroblast Growth Factors and their Receptors in Prostate Cancer," Endocr. Relat. Cancer, 11, p. 709-24 (2004); e Gowardhan, B., Douglas, D.A., Mathers, M.E., et al., "Evaluation of the Fibroblast Growth Factor System as a Potential Target for Therapy in Human Prostate Cancer", Br. J. Cancer, 92, p. 320-7 2005). As alterações na sinalização do factor de crescimento de fibroblasto (FGF, da sigla em inglês) têm sido implicados na patogénese do cancro da próstata. Ozen, M., Giri, D., Ropiquet, F., Mansukhani, A., e Ittmann, M., "Role of Fibroblast Growth Factor Receptor Signaling in Prostate Cancer Cell Survival," J. Natl. Cancer Inst., 93, p. 1783-90 (2001). Em muitos casos o cancro da próstata metastatiza preferencialmente nos ossos e os doentes têm assim um risco acrescido de desenvolver complicações esqueléticas, e/ou fracturas, o que é uma das muitas causas de morbidez e mortalidade em doentes com cancro da próstata. Existe uma necessidade de métodos para tratar o cancro da próstata e de métodos para evitar a metástase do cancro da próstata para os ossos em doentes com cancro da próstata.

Vários compostos substituídos com indolilo foram recentemente descritos nos documentos WO 01/29205, WO 01/62251 e WO 01/62252 e vários compostos de benzimidazolilo foram recentemente descritos no documento WO 01/28993. Estes compostos são descritos como sendo capazes de inibir, modular e/ou regular a transdução de sinal das

tirosina cinases quer do tipo receptor quer não receptor. Alguns dos compostos descritos contêm um fragmento de quinolona ligado ao grupo indolilo ou benzimidazolilo.

A síntese da 4-hidroxiquinolona e derivados de 4-hidroxiquinolona é descrita num certo número de referências que são aqui incorporadas como referência na sua globalidade para todos os fins, tal como aqui completamente apresentado. Por exemplo, Ukrainianets et al. descreveu também a síntese da 3-(benzimidazol-2-il)-4-hidroxi-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina. Ukrainianets, I. et al., Tet. Lett. 42, 7747-7748 (1995); Ukrainianets, I. et al., Khimiya Geterotsiklicheskikh Soediniii, 2, 239-241(1992). Ukrainianets descreveu também a síntese, a actividade anticonvulsiva e antitiróide de outras 4-hidroxiquinolonas e análogos tio tais como a 1H-2-oxo-3-(2-benzimidazolil)-4-hidroxiquinolina. Ukrainianets, I. et al., Khimiya Geterotsiklichesklkh Soediniii, 1, 105-108 (1993); Ukrainianets, I. et al., Khimiya Geterotsiklichesklkh Soediniii, 8, 1105-1108 (1993); Ukrainianets, I. et al., Chem. Heterocyclic Comp. 33, 600-604. (1997).

A síntese de vários derivados de quinolina é descrita no documento WO 97/48694. Estes compostos são descritos como capazes de ligação a receptores de hormona lineares e sendo úteis para estimular a proliferação de osteoblastos e o crescimento ósseo. Os compostos são também descritos como sendo úteis no tratamento ou na prevenção de doenças associadas às famílias de receptor de hormona nuclear.

Vários derivados de quinolina em que o anel benzeno da quinolona é substituído com um grupo enxofre são descritos no documento WO 92/18483. Estes compostos são descritos como sendo úteis em formulações farmacêuticas e como medicamentos.

Os derivados de quinolona e de cumarina foram descritos como tendo utilização numa variedade de aplicações não relacionadas com a medicina e formulações farmacêuticas. As referências que descrevem a preparação de derivados de quinolona para utilização em composições fotopolimerizáveis ou para propriedades luminescentes incluem: a Patente U.S. No. 5.801.212 concedida a Okamoto et al.; JP 8-29973; JP 7-43896; JP 6-9952; JP 63-258903; EP 797376; e DE 23 63 459 que são todas aqui incorporadas como referência na sua globalidade para todos os fins tal como aqui globalmente apresentado.

Vários compostos de quinolinona benzimidazole úteis para a inibição da angiogénese e receptor de tirosina cinases do factor de crescimento endotelial vascular e a inibição de outras tirosina e sorinetreonina cinases incluindo a 4-amino-5-fluoro-3-[5-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona ou um seu tautómero são descritos nos seguintes documentos: patente U.S. No. 6,605,617; patente U.S. No. 6,756,383; pedido de patente U.S. No. 10/116,117 apresentado (publicado em 6 de Fevereiro de 2003, como US 2003/0028018 A1); pedido de

patente U.S. No. 10/644,055 (publicado em 13 de Maio de 2004, pedido de patente U.S. No. 2004/0092535); pedido de patente U.S. No. 10/983,174; pedido de patente U.S. No. 10/706,328 (publicado a 4 de Novembro de 2004, como 2004/0220196); pedido de patente U.S. No. 10/982,757; pedido de patente U.S. No. 10/982,543; e WO 2005/082340.

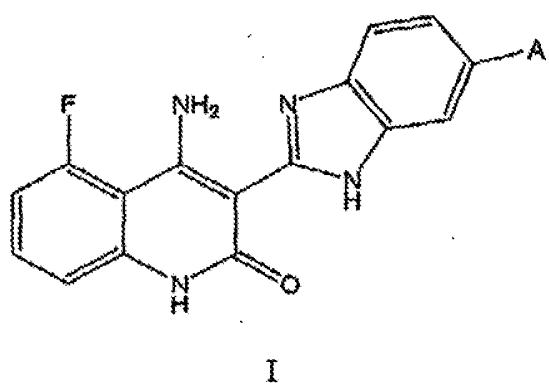
Apesar dos avanços recentes em métodos para tratar tumores e cancro, existe ainda uma importante necessidade de novos métodos para tratar o cancro e, especialmente, novos métodos e composições para tratar o cancro metastático, tal como os tumores metastatizados. Métodos para tratar o mieloma múltiplo, a leucemia mielóide aguda e o cancro da próstata são ainda requeridos.

SUMÁRIO DO INVENTO

O invento proporciona a utilização de compostos, seus tautómeros, seus sais e suas misturas na utilização de formulações farmacêuticas e medicamentos para tratar o cancro metastático.

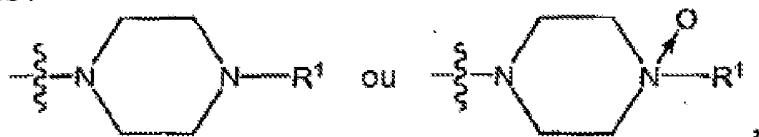
Num aspecto, o presente invento proporciona a utilização de compostos na preparação de um medicamento para tratar cancro metastático num sujeito, tal como um doente humano com cancro. A utilização inclui a administração a um sujeito de uma quantidade eficaz de um composto de Estrutura I, um tautómero do composto, um sal farmaceuticamente aceitável do composto, um sal farma-

ceuticamente aceitável do tautómero ou uma sua mistura. A estrutura I tem a fórmula seguinte:



em que,

A é um grupo possuindo uma das seguintes estruturas:

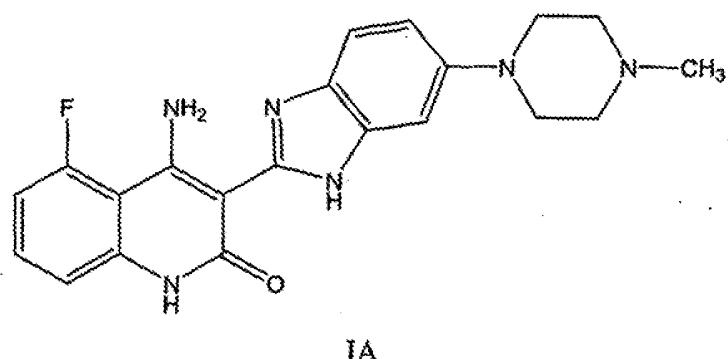


em que

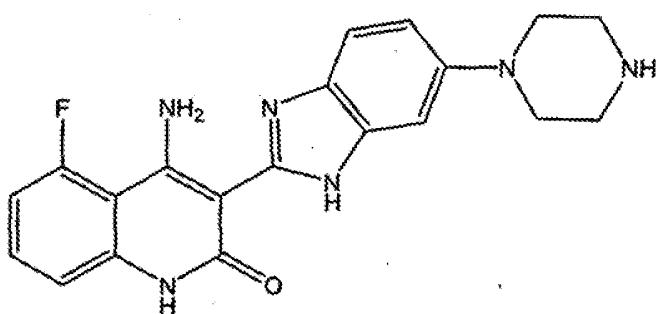
R¹ é seleccionado de H ou grupos alquilo de cadeia linear ou ramificada possuindo de 1 a 6 átomos de carbono.

Em várias formas de concretização da utilização do invento, o crescimento do cancro ou dos tumores metastatizados (no sujeito) é inibido após administração.

Nalgumas formas de concretização, R¹ é um grupo metilo e o composto da estrutura I tem a estrutura IA

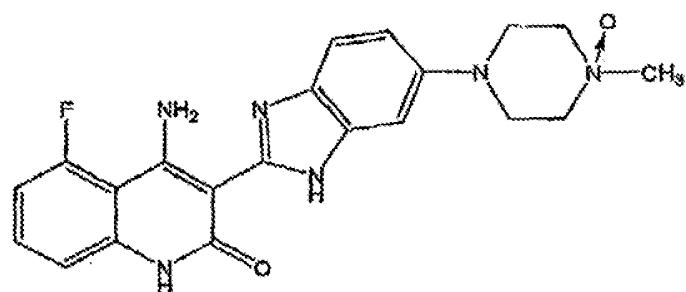


Nalgumas formas de concretização, R¹ é hidrogénio e o composto da estrutura I tem a estrutura IB



IB

Nalgumas formas de concretização R¹ é um grupo metilo e o composto da estrutura I tem a estrutura IC



Nalgumas formas de concretização, o composto é

administrado sistemicamente. Mais particularmente o compostos de estrutura I é administrado oralmente ou intravenosamente.

Nalgumas formas de concretização, um segundo agente é administrado ao sujeito. Mais particularmente, o segundo agente é para o tratamento da osteoporose, tal como um bisfosfonato. Noutras formas de concretização o segundo agente é um agente anticancerígeno.

Nalgumas formas de concretização, o composto é o composto de estrutura I, IA, IB ou IC e o sal lactato do composto ou o tautómero é administrado ao sujeito.

Nalgumas formas de concretização, o tumor é o mieloma múltiplo e o sujeito é um doente com mieloma múltiplo com translocação cromossómica t(4:14). Mais particularmente o tumor é um tumor hematológico.

Nalgumas formas de concretização, o tumor é o mieloma múltiplo e o sujeito é um doente com mieloma múltiplo e o mieloma múltiplo expressa o receptor 3 do factor de crescimento de fibroblasto.

Nalgumas formas de concretização, o tumor é o mieloma múltiplo e o sujeito é um doente com mieloma múltiplo e o mieloma múltiplo metastatizou-se para um osso do doente, tal como para a medula óssea.

Nalgumas formas de concretização, o tumor é o mieloma múltiplo e o sujeito é um doente com mieloma múltiplo e o doente é um ser humano.

Num aspecto, o invento proporciona a utilização de um composto de estrutura I, IA, IB e/ou IC, um tautómero do composto, um sal farmaceuticamente aceitável do composto, um sal farmaceuticamente aceitável do tautómero, ou uma sua mistura na preparação de um medicamento ou de uma formulação farmacêutica para utilização em qualquer uma das formas de concretização do invento.

Outros objectivos, características e vantagens do invento serão evidenciados a partir da descrição detalhada e desenhos seguintes.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 é um gráfico que mostra que os ratos SCID-bege injectados com células KMS-11-luc e tratado com 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (20 mg/kg/d) apresentaram uma contagem de fotões média significativamente inferior do que a dos tratados com veículo.

As Figuras 2-5 são gráficos que mostram a actividade antitumoral da 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (Composto 1) num modelo de xenoenxerto subcutâneo de tumores

leucémicos humanos MV4;11 ou RS4;11 em ratos SCID-NOD. (FIGURA 2) MV4;11 ou (Figura 3) RS4;11 as células foram implantadas s.c. no flanco direito de ratos SCID-NOD ($n = 10$ ratos/grupo). Em estudos de MV4;11, Veículo (◊) ou Composto 1 foi administrado oralmente com doses de 1 (●), 5 (▲), ou 30 (■) mg/kg/d durante 15 dias quando os tumores tinham ~ 300 mm³. Em estudos de RS4;1, Veículo (◊) ou Composto 1 foi administrado oralmente em doses de 10 (▲), 30 (■), 100 (◆) ou 150 (●) mg/kg/d durante 8 dias quando os tumores tinham ~ 300 mm³. (FIGURA 4) Efeito dos regimes de dosagem diárias, intermitentes e cíclicos de Composto 1 na eficácia dos tumores MV4;11. O Composto 1 foi administrado oralmente com uma dose de 30 mg/kg quer diariamente (■), quer dia sim dia não/q.o.d. (●) quer ciclicamente 7 dias sim/7 dias não (X). (FIGURA 5) o Composto 1 induz a regressão de tumores MV4;11 grandes. Tumores s.c. MV4;11 ($n = 10$ ratos/grupo) foram classificados em 300 (▲), 500 (■) ou 1000 (●). Os dados são expressos como volume de tumor médio \pm SE (da sigla em inglês, erro padrão) ($n = 10$ ratos/grupo).

A FIGURA 6 é um gráfico que mostra que a 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (Composto 1) prolonga a sobrevivência dos ratos SCID-NOD tendo células MV4;11 intravenosas. Ratos SCID-NOD irradiados foram implantados com MV4;11 (1×10^7 células, i.v.) i.v. Os tratamentos foram iniciados no dia 23, consistindo quer de veículo (◆) quer de Composto 1 a 20 mg/kg administrados diariamente (▲) ou programados 7 dias

sim/7 dias não (■) dos dias 23-98. Os ratos em que aparecem sinais precoces de parálise dos membros dianteiros ou uma fraca condição de saúde foram eutanizados. A FIGURA 6 ilustra os gráficos de Kaplan-Meler de percentagem de sobrevivência vs. tempo (n = 10-12 ratos/grupo).

A FIGURA 7 inclui gráficos que mostram a contagem de fotões individuais (em escala logarítmica) gerados das áreas abdominal, cabeça e pernas de ratos nus injectados com células PC-3M-luc e então tratados com veículo, taxol ou Composto 1. Os gráficos mostram que o tratamento com o Composto 1 (154258) demonstrou uma tendência de inibição da contagem de fotões PC-3M-luc e inibe o crescimento das células PC-3M-luc que se disseminaram para os ossos.

A FIGURA 8 é um gráfico do volume de tumor versus o dia de tratamento.

DESCRÍÇÃO DETALHADA DO INVENTO

O presente invento proporciona a utilização de compostos no fabrico de um medicamento para tratar cancro metastático, particularmente mieloma múltiplo metastatizado.

As abreviaturas e as definições seguintes são utilizadas ao longo deste pedido de patente:

"AML" é uma abreviação que significa leucemia mielóide aguda.

"ALS" é uma abreviação que significa esclerose lateral amiotrópica.

"AD" é uma abreviação que significa doença de Alzheimer.

"APP" é uma abreviação que significa proteína precursora amilóide.

"ASCT" é uma abreviação que significa transplante de célula estaminal autóloga.

"BM" é uma abreviação que significa medula óssea.

"bFGF" é uma abreviação que significa factor de crescimento de fibroblasto básico.

"FGFR1" também referido como bFGFR, é uma abreviação que significa uma tirosina cinase que interage com o factor de crescimento de fibroblasto FGF.

"Cdc 2" é uma abreviação que significa ciclo 2 de divisão celular.

"Cdk 2" é uma abreviação que significa cinase 2 dependente da ciclina.

"Cdk 4" é uma abreviação que significa cinase 4 dependente da ciclina.

"Cdk 1" é uma abreviação que significa cinase 1 dependente da ciclina.

"CK1 " é uma serina/treonina cinase que significa caseína cinase 1 (epsilon).

"c-ABL" é uma abreviação para tirosina cinase que significa um produto oncogénico originalmente isolado a partir do vírus da leucemia de Abelson.

"C-Klt" é também conhecido como receptor do factor de crescimento das células estaminais ou receptor do factor de crescimento dos mastócitos.

"FGF" é uma abreviação para factor de crescimento de fibroblasto que interage com FGFR1.

"FGFR3" é uma abreviação que significa a tirosina cinase do receptor 3 do factor de crescimento de fibroblasto que é frequentemente expresso nos cancros tipo mieloma múltiplo.

"Flk-1" é uma abreviação que significa tirosina cinase 1 de fígado fetal, também conhecida como tirosina cinase do domínio da inserção de cinase ou KDR (humano), também conhecido como receptor 2 do factor de crescimento endotelial vascular ou VEGFR1 (KDR (humano), Flk-1 (rato)).

"FLT-1" é uma abreviação que significa tirosina cinase 1 do tipo fms, também conhecido como receptor 1 do factor de crescimento endotelial vascular ou VEGFR1.

"FLT-3" é uma abreviação que significa tirosina cinase-3 do tipo fms, também conhecido como tirosina cinase I da célula estaminal (STK I).

"FLT-4" é uma abreviação que significa tirosina cinase 4 do tipo fms, também conhecida como VEGFR3.

"Fyn" é uma abreviação que significa cinase de oncogene FYN relacionada com SRC, FGR, YES.

"GSK-3" é uma abreviação que significa sintase cinase 3 de glicogénio.

"PAR-1" é uma abreviação que significa uma cinase também conhecida como cinase associada desordenada, também conhecida como HDAC.

"Lck" é uma abreviação que significa tirosina cinase de proteína específica de linfócito.

"MEK1" é uma abreviação que significa uma serina treonina cinase na via de transdução de sinal MAPK (cinase de proteína activada por mitogénio) num módulo que é formado por raf-MEK1-ERK. MEK 1 fosforilatos ERK (cinase regulada extracelular).

"MM" é uma abreviação que significa mieloma múltiplo.

"NEK-2" é uma abreviação que significa cinase regulada com NIM-A.

"NIM-A" é uma abreviação que significa nunca em mitose.

"PDGF" é uma abreviação que significa factor de crescimento derivado de plaquetas. PDGF interage com as tirosina cinases PDGFR α e PDGFR β .

"Rsk2" é uma abreviação que significa cinase 2 S6 ribosomal.

"Raf" é uma serina/treonina cinase na via da transdução de sinal MAPK.

"RTK" é uma abreviação que significa tirosina cinase receptor.

"Tle-2" é uma abreviação que significa tirosina cinase com domínios de homologia Ig e EGF.

"VEGF" é uma abreviação que significa factor de crescimento endotelial vascular.

"VEGF-RTK" é uma abreviação que significa tiro-sina cinase do receptor do factor de crescimento endotelial vascular.

A palavra "metástase" refere-se à disseminação de células cancerígenas a partir de um tumor para outras partes do corpo. As células cancerígenas são geralmente disseminadas sistemicamente através do sistema linfático ou da corrente sanguínea.

A inibição do crescimento de um tumor metastatizado significa a inibição directa do crescimento do tumor e/ou a inibição sistémica das células cancerígenas que foram originadas no tumor.

Geralmente, a referência a um certo elemento tal como hidrogénio ou H significa a inclusão de todos os isótopos desse elemento. Por exemplo, se um grupo na estrutura do composto é suspenso ou mostrado como H, então este é definido como incluindo hidrogénio ou H, deutério e tritio.

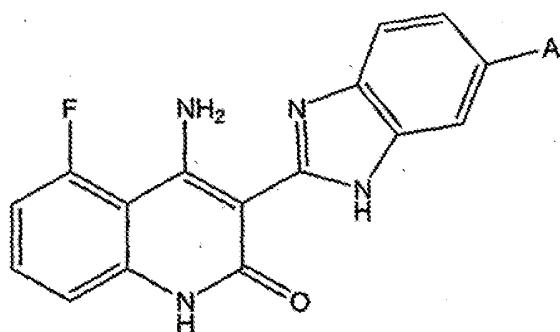
A frase "grupos alquilo de cadeia linear ou ramificada possuindo de 1 a 6 átomos de carbono" refere-se a grupos alquilo não contendo heteroátomos e incluindo 1 a 6 átomos de carbono. Deste modo, a frase inclui grupos alquilo de cadeia linear tais como metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo e semelhantes. A frase também inclui isómeros de cadeia ramificada de grupos alquilo de

cadeia linear, incluindo mas não limitados aos seguintes que são proporcionados como exemplo: $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, e outros. Nalgumas formas de concretização, os grupos alquilo incluem grupos alquilo de cadeia linear ou ramificada possuindo de 1 a 6 átomos de carbono. Noutras formas de concretização os grupos alquilo têm de 1 a 4 átomos de carbono. Ainda noutras forma de concretização, o grupo alquilo é um grupo alquilo de cadeia linear possuindo 1 ou 2 átomos de carbono (grupo metilo ou etilo). Ainda noutras formas de concretização, o grupo alquilo tem apenas um átomo de carbono e é um grupo metilo ($-\text{CH}_3$).

Um "sal farmaceuticamente aceitável" inclui um sal com uma base inorgânica, uma base orgânica, um ácido inorgânico, um ácido orgânico, ou um aminoácido básico ou acídico. Como sais de bases inorgânicas, o invento inclui, por exemplo, metais alcalinos, tais como sódio e potássio; metais alcalino-terrosos, tais como cálcio e magnésio ou alumínio; e amoníaco. Como sais de bases orgânicas, o invento inclui, por exemplo, trimetilamina, trietilamina, piridina, picolina, etanolamina, dietanolamina e trietanolamina. Como sais de ácidos inorgânicos, o presente invento inclui, por exemplo, ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico e ácido fosfórico. Como sais de ácidos orgânicos, o presente invento inclui, por exemplo, ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoro-

acético, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico, ácido metanossulfónico, ácido benzenossulfónico e ácido p-toluenossulfónico. Como sais de aminoácidos básicos, o presente invento inclui, por exemplo, arginina, lisina e ornitina. Aminoácidos acídicos incluem, por exemplo, ácido aspártico e ácido glutâmico.

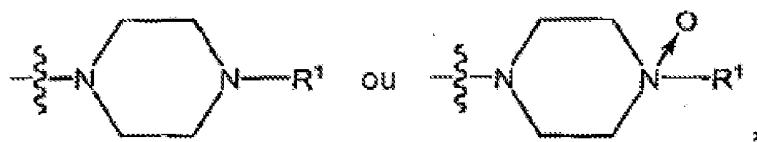
Num aspecto, o presente invento proporciona a utilização de compostos na produção de um medicamento para tratar o cancro metastático num sujeito, tal como um doente com cancro humano. A utilização inclui a administração a um sujeito que disso necessite, de uma quantidade eficaz de um composto com a Estrutura I, um tautómero do composto, um sal farmaceuticamente aceitável do composto, um sal farmaceuticamente aceitável do tautómero, ou uma sua mistura. A Estrutura I possui a fórmula seguinte:



I

em que

A é um grupo que possui uma das seguintes Estruturas:

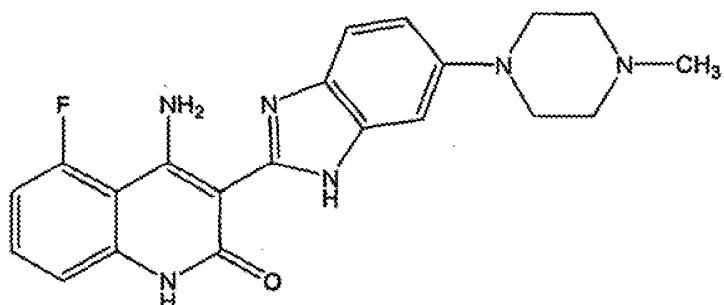


em que

R^1 é seleccionado de H ou grupos alquilo de cadeia linear ou ramificada possuindo de 1 a 6 átomos de carbono, e

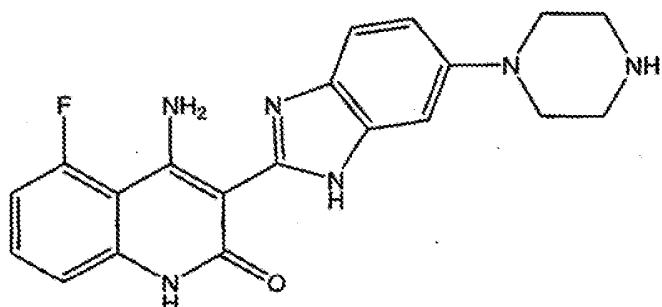
Nalgumas formas de concretização, o crescimento do cancro ou dos tumores metastatizados é inibido após a administração do composto de Estrutura I, do tautómero do composto, do sal farmaceuticamente aceitável do composto, do sal farmaceuticamente aceitável do tautómero ou de sua mistura.

Nalgumas formas de concretização, R^1 é um grupo metilo e o composto de Estrutura I tem a Estrutura IA

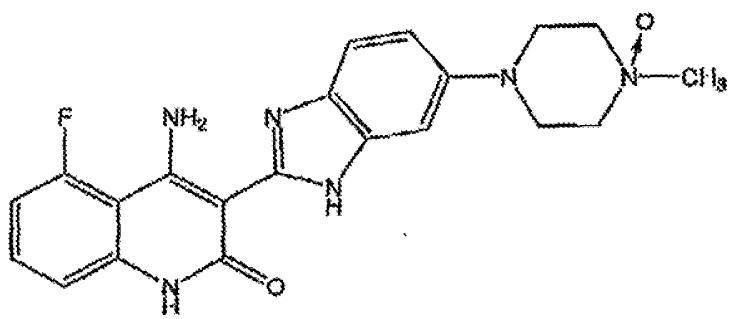


IA

Nalgumas formas de concretização, R^1 é hidrogénio e o composto de estrutura I tem a Estrutura IB



Nalgumas formas de concretização, R¹ é um grupo metilo e o composto de Estrutura I tem a Estrutura IC



Nalgumas formas de concretização, o composto é administrado sistemicamente. Mais particularmente, o composto de Estrutura I é administrado oralmente ou intravenosamente.

Nalgumas formas de concretização, um segundo agente é administrado ao sujeito. Mais particularmente o segundo agente é para o tratamento da osteoporose, tal como um bisfosfonato. Noutras formas de concretização o segundo agente é um agente anticancerígeno.

Nalgumas formas de concretização, o composto é o

composto de Estrutura I, IA, IB ou IC e o sal lactato do composto ou o tautómero é administrado ao sujeito.

Nalgumas formas de concretização, a taxa de sobrevivência é prolongada no sujeito após administração da Estrutura I, o tautómero do composto, o sal farmaceuticamente aceitável do composto, o sal farmaceuticamente aceitável do tautómero ou sua mistura.

Os tumores metastatizados que podem ser tratados de acordo com o invento são o mieloma múltiplo. Nalgumas formas de concretização, o tumor é mieloma múltiplo e o sujeito é um doente com mieloma múltiplo com translocação cromossomal $t(4;14)$.

Nalgumas formas de concretização, o tumor é mieloma múltiplo, o sujeito é um doente com mieloma múltiplo e o mieloma múltiplo expressa o receptor 3 do factor de crescimento de fibroblasto.

Nalgumas formas de concretização, o tumor é mieloma múltiplo, o sujeito é um doente com mieloma múltiplo e o mieloma múltiplo metastatizou para um osso do doente, tal como para a medula óssea do doente. Dado que os compostos do invento se concentram no osso, estes são particularmente úteis e eficazes no tratamento de tumores hematológicos metastatizados.

Nalgumas formas de concretização, o invento

proporciona um método para tratar um doente que tem um cancro que se metastatizou para o osso. Tais cancros podem ser hematológicos ou tumores sólidos. Nalgumas formas de concretização, o cancro é um mieloma múltiplo.

Nalgumas formas de concretização, o tumor é mieloma múltiplo, o sujeito é um doente com mieloma múltiplo e o doente é um humano.

Num aspecto, o invento proporciona a utilização de um composto de Estrutura I, IA, IB e/ou IC, um tautómero do composto, um sal farmaceuticamente aceitável do composto, um sal farmaceuticamente aceitável do tautómero, ou sua mistura, na preparação de um medicamento ou de uma formulação farmacêutica para utilização em qualquer uma das formas de concretização do invento.

Os compostos de Estrutura I são rapidamente sintetizados utilizando os procedimentos descritos na seguinte secção de Exemplos e descritos nos documentos seguintes: patente U.S. No. 6.605.617, pedido de patente publicado U.S. No. 2004/0092535, pedido de patente U.S. No. 10/963.174, pedido de patente publicado U.S. No. 2004/0220196, pedido de patente U.S. No. 10/962.757 e pedido de patente U.S. No. 10/962.543.

Os compostos de Estrutura I, tautómeros dos compostos, sais farmaceuticamente aceitáveis dos compostos, sais farmaceuticamente aceitáveis dos tautómeros e suas

misturas podem ser utilizados para preparar medicamentos, que podem ser utilizados para os fins aqui descritos e podem ser utilizados para tratar várias condições biológicas, tal como aqui descrito.

Formulações farmacêuticas podem incluir qualquer um dos compostos, tautómeros ou sais de qualquer uma das formas de concretização anteriores em combinação com um portador farmaceuticamente aceitável tal como os aqui descritos.

O presente invento proporciona também composições que podem ser preparadas misturando um ou mais compostos do presente invento, ou tautómeros de sais farmaceuticamente aceitáveis destes, ou suas misturas com portadores, excipientes, ligantes, diluentes ou semelhantes farmaceuticamente aceitáveis para tratar e melhorar doenças relacionadas com tumores metastatizados. As composições dos inventos podem ser utilizadas para criar formulações utilizadas para tratar tumores metastatizados tal como aqui descrito. Tais composições podem estar sob a forma, por exemplo, de grânulos, pós, comprimidos, cápsulas, xaropes, supositórios, injecções, emulsões, elixires, suspensões ou soluções. As presentes composições podem ser formuladas através de várias vias de administração, por exemplo através de administração oral, administração nasal, administração rectal, injecção subcutânea, injecção intravenosa, injecções intramusculares ou injecção intraperitoneal. As formas de dosagem seguinte são dadas como exemplo e não devem ser construídas, como limitativas do presente invento.

Para administração oral, bucal e sublingual, pós, suspensões, grânulos, comprimidos, pílulas, cápsulas, cápsulas de gel e caplets são aceitáveis como formas de dosagem sólidas. Estas podem ser preparadas, por exemplo, misturando um ou mais compostos do presente invento, sais farmaceuticamente aceitáveis, tautómeros ou suas misturas, com pelo menos um aditivo, tal como um amido ou outro aditivo. Aditivos adequados são a sacarose, lactose, açúcar de celulose, manitol, maltitol, dextrano, amido, agar, alginatos, quitinas, quitosanas, pectinas, goma de tragacanto, goma arábica, gelatinas, colagénios, caseína, albumina, polímeros sintéticos ou semi-sintéticos ou glicéridos. Opcionalmente, as formas de dosagem oral podem conter outros ingredientes para auxiliar a administração, tal como um diluente inactivo, ou lubrificantes, tais como estearato de magnésio, ou conservantes, tais como parabeno ou ácido sórbico, ou anti-oxidantes, tais como o ácido ascórbico, tocoferol ou cisteína, um agente de desintegração, ligan tes, espessantes, tampões, adoçantes, agentes de sabor ou agentes para perfumar. Os comprimidos e as pílulas podem ser ainda tratados com materiais de revestimento conhecidos na técnica.

As formas de dosagem líquidas para administração oral podem ser sob a forma de emulsões, xaropes, elixires, suspensões e soluções farmaceuticamente aceitáveis, que podem conter um diluente activo, tal como água. Formulações

farmacêuticas e medicamentos podem ser preparados como suspensões ou soluções líquidas utilizando um líquido estéril, tal como, mas não limitados a, um óleo, água, um álcool e suas combinações. Tensioactivos, agentes de suspensão, agentes de emulsificação farmaceuticamente aceitáveis, podem ser adicionados para administração oral ou parentérica.

Tal como verificado acima, as suspensões podem incluir óleos. Tais óleos incluem, mas não estão limitados a, óleo de amendoim, óleo de sésamo, óleo de semente de algodão, óleo de milho e azeite. A preparação em suspensão pode também conter ésteres de ácidos gordos, tais como oleato de etilo, miristato de isopropilo, glicéridos de ácidos gordos, e glicéridos de ácidos gordos acetilados. As formulações em suspensão podem incluir álcoois, tais como, mas não limitados a, etanol, álcool, isopropílico, álcool hexadecílico, glicerol e propilenoglicol. Éteres tais como, mas não limitados a, polietilenoglicol, hidrocarbonetos de petróleo, tais como óleo mineral e petrolato; e água podem ser também utilizados em formulações em suspensão.

Para administração nasal, as formulações farmacêuticas e os medicamentos podem ser uma pulverização ou um aerosol contendo solvente(s) adequado(s) e, opcionalmente, outros compostos tais como, mas não limitados a, estabilizantes, agentes antimicrobianos, antioxidantes, modificadores de pH, tensioactivos, modificadores de biodisponibilidade e suas combinações. Um propelsores para uma

formulação de aerosol pode incluir ar comprimido, azoto, dióxido de carbono ou um solvente de baixo ponto de fusão à base de hidrocarbonetos.

As formas de dosagem injectáveis incluem geralmente suspensões aquosas ou suspensões oleosas que podem ser preparadas utilizando um dipersante adequado ou um agente de molhabilidade e um agente de suspensão. As formas injectáveis podem estar em fase de solução ou em forma de uma suspensão, que é preparada com um solvente ou um diluente. Solventes ou veículos aceitáveis incluem água esterilizada, solução de Ringer, ou uma solução salina aquosa isotónica. Alternativamente, podem ser empregues óleos estéreis como solventes ou agentes de suspensão. Preferencialmente, o óleo ou o ácido gordo é não volátil, incluindo óleos naturais sintéticos, ácidos gordos, mono, di ou triglicéridos.

Para injecção, a formulação farmacêutica e/ou o medicamento pode ser um pó adequado para reconstituição com uma solução adequada tal como descrito acima. Exemplos destes incluem, mas não estão limitados a, pós secos por congelação, secos em evaporador rotativo e secos por pulverização, pós amorfos, grânulos, precipitados ou sob a forma de partículas. Para injecção, as formulações podem, opcionalmente, conter estabilizantes, modificadores de pH, tensioactivos, modificadores de biodisponibilidade e suas combinações.

Para administração rectal, as formulações farmacêuticas e os medicamentos podem estar sob a forma de um supositório, um unguento, um enema, um comprimido ou um creme para a libertação do composto nos intestinos, na zona sigmóide e/ou no recto. Os supositórios rectais são preparados misturando um ou mais compostos do presente invento, ou sais farmaceuticamente aceitáveis ou tautómeros do composto, com veículos aceitáveis, por exemplo, manteiga de cacau ou polietilenoglicol, que estão presentes numa fase sólida às temperaturas de armazenamento normais e presentes numa fase líquida àquelas temperaturas adequadas para libertar um fármaco dentro do corpo, tal como no recto. Podem ser também empregues óleos na preparação de formulações do tipo gelatina mole e supositórios. Água, solução salina, dextrose aquosa e soluções de açúcar relacionadas e gliceróis podem ser empregues na preparação de formulações de suspensão que podem também conter agentes de suspensão tais como pectinas, carbómeros, metilcelulose, hidroxipropilcelulose ou carboximetilcelulose, assim como tampões e conservantes.

Apesar destas formas de dosagem representativas descritas acima, os excipientes e portadores farmaceuticamente aceitáveis são, de um modo geral, conhecidos pelos especialistas na matéria e estão, deste modo, incluídos no presente invento. Tais excipientes e portadores são descritos, por exemplo, em "Remingtons Pharmaceutical Sciences" Mack Pub. Co., New Jersey (1991), que é aqui incorporado como referência na sua globalidade para todos os fins tal como aqui completamente apresentado.

As formulações do invento podem ser projectadas para serem de actuação curta, de libertação rápida, de actuação longa e de libertação sustentada, tal como descrito abaixo. Deste modo, as formulações farmacêuticas podem ser também formuladas para libertação controlada ou para libertação lenta.

As presentes composições podem também compreender, por exemplo, micelas ou lipossomas, ou alguma outra forma encapsulada, ou podem ser administradas numa libertação prolongada para proporcionar um efeito de armazenamento prolongado e/ou de administração. Em consequência, as formulações farmacêuticas e os medicamentos podem ser comprimidos em peletes ou cilindros e implantados intramuscularmente ou subcutaneamente como injecções do tipo depot ou como implantes, tais como endopróteses. Tais implantes empregam materiais inertes conhecidos, tais como silicone e polímeros biodegradáveis.

As dosagens específicas podem ser ajustadas dependendo das condições da doença, da idade, do peso corporal, das condições gerais de saúde, do sexo e da dieta do sujeito, dos intervalos de dose, das vias de administração, da taxa de excreção, e das combinações de fármacos. Qualquer uma das formas de dosagem anteriores contendo quantidades eficazes estão bem dentro dos limites da experimentação de rotina e, em consequência, bem dentro do domínio do presente invento.

Uma dose terapeuticamente eficaz pode variar dependendo da via de administração e da forma de dosagem. O composto ou compostos preferidos do presente invento é/são uma formulação que apresenta um elevado índice terapêutico. O índice terapêutico é a razão de dose entre os efeitos tóxicos e terapêuticos que podem ser expressados como razão entre LD₅₀ e ED₅₀. O LD₅₀ é a dose letal para 50% da população e o ED₅₀ é a dose terapeuticamente eficaz em 50% da população. O LD₅₀ e o ED₅₀ são determinados através de procedimentos farmacêuticos correntes em culturas de células animais ou animais experimentais.

"Tratamento" dentro do contexto do presente invento, significa um alívio dos sintomas associados a um distúrbio ou doença, ou a paragem de maior progressão ou o piorar daqueles sintomas, ou a prevenção ou a profilaxia do distúrbio ou da doença. Por exemplo, dentro do contexto do tratamento de doentes com um tumor metastatizado, um tratamento útil pode incluir uma redução na proliferação de vasos capilares que alimentam o(s) tumor(es) ou tecido com doença, um alívio dos sintomas relacionado com um crescimento canceroso ou tumor, proliferação de vasos capilares, ou tecido com doença, uma paragem da proliferação capilar, ou uma paragem da progressão de uma doença tal como cancro ou no crescimento das células cancerosas. O tratamento pode também incluir a administração das formulações farmacêuticas do presente invento em combinação com outras terapias. Por exemplo, os compostos e as formulações

farmacêuticas do presente invento podem ser administrados antes, durante, ou após procedimento cirúrgico e/ou terapia de radiação. Os compostos do invento podem ser também administrados em conjunção com outros fármacos anticancerígenos incluindo aqueles utilizados em terapia antissentido e genética. As combinações adequadas podem ser determinadas pelos especialistas nas técnicas da oncologia e da medicina.

Formulações farmacêuticas e medicamentos de acordo com o invento incluem os compostos de estrutura I ou os tautómeros, sais, ou suas misturas em combinação com um portador farmaceuticamente aceitável. Deste modo, os compostos do invento podem ser utilizados para preparar medicamentos e formulações farmacêuticas. Tais medicamentos e formulações farmacêuticas podem ser utilizados no método de tratamento aqui descrito.

Os compostos e as formulações do presente invento são particularmente adequados para utilização em terapia de combinação dado que demonstraram efeito sinergístico quando utilizados em combinação com fármacos anticancerígenos, tais como camptotecina, doxorubicina, cisplatina, irinotecano (CPT-11), agentes de alquilação, inibidores de topo-isomerase I e II e tratamento por radiação. Em consequência, o invento proporciona formulações farmacêuticas que incluem o composto de Estrutura I e tautómeros, sais e/ou misturas destes em combinação com um fármaco anticancerígeno. O invento proporciona também a utilização de

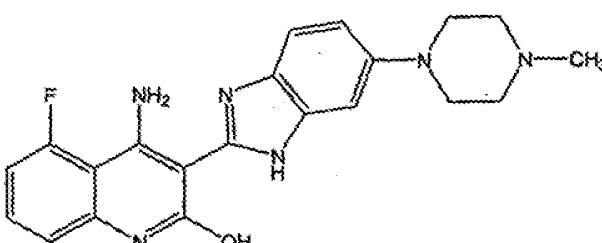
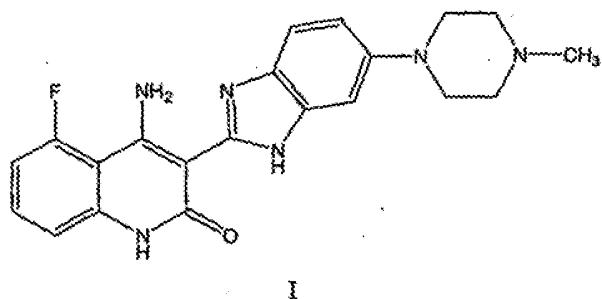
compostos, tautómeros, sais e/ou misturas na criação de tais formulações e medicamentos.

Noutro aspecto, o presente invento proporciona um método para tratar cancro metastático administrando um composto do presente invento e um fármaco anticancerígeno adicional. O método inclui a administração a um sujeito que disso necessite um fármaco anticancerígeno seleccionado de mesilato de imatinib (Gleevac), BAY43-9006, Brostalicina, lenalidomida (Revlimid), talidomida (Thalomid), docetaxel (Taxotere), erlotinib (Tarceva), vatalinib (PTK-787), VEGF-trap, fenretidina, bortezomib, bevazizumab (Avastin), pertuzumab e/ou rituximab e um composto do invento, um tautómero do composto, um sal do composto, ou sal do tautómero, uma sua mistura ou uma composição farmacêutica compreendendo o composto, o tautómero, o sal do composto, o sal do tautómero ou a sua mistura.

Os compostos do invento podem ser utilizados para tratar uma variedade de sujeitos. Os sujeitos adequados incluem animais, tais como mamíferos e humanos. Mamíferos adequados incluem, mas não estão limitados a, primatas, tais como, mas não limitados a lémures, chimpanzés e macacos; roedores, tais como ratazanas, ratos e cobaias; coelhos e lebres; vacas; cavalos; porcos; cabras; ovelhas; marsupiais; e carnívoros, tais como felinos, caninos e ursinos. Nalgumas formas de concretização, o sujeito ou o doente é um humano. Noutras formas de concretização, o

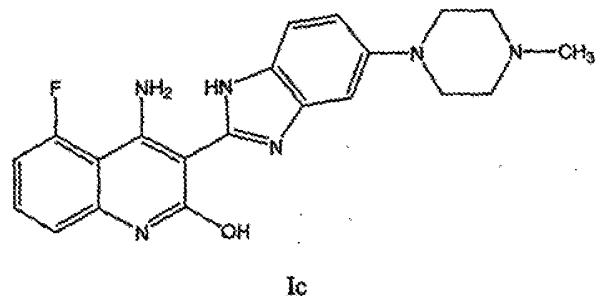
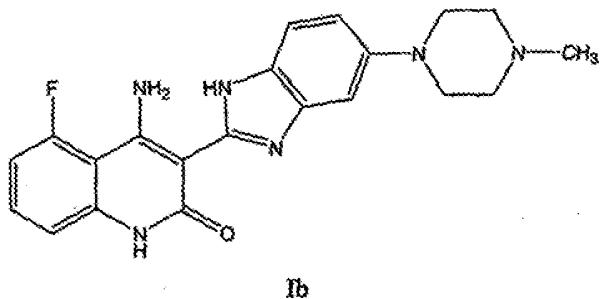
sujeito ou o doente é um roedor, tal como um rato ou uma ratazana. Nalgumas formas de concretização, o sujeito ou o doente é um animal que não um humano e nalgumas formas de concretização, ou sujeito ou o doente é um mamífero que não um humano.

Deve ser entendido que os compostos utilizados no invento podem apresentar o fenómeno de tautomerismo. Como as estruturas químicas no âmbito desta descrição podem apenas representar uma das formas tautoméricas possíveis, deve ser entendido que o invento engloba qualquer forma tautomérica da estrutura desenhada. Por exemplo, a Estrutura IA é mostrada abaixo com um tautómero, o Tautómero Ia:



Ia

Outros tautómeros de Estrutura IA, o Tautómero Ib e o Tautómero Ic, são mostrados abaixo:



O presente invento descrito, deste modo, de uma maneira geral, será entendido mais prontamente com referência aos exemplos seguintes, que são proporcionados como ilustração e não pretendem ser limitativos do presente invento.

EXEMPLOS

As abreviaturas seguintes são utilizadas ao longo desta descrição no que respeita à terminologia química:

ATP:	Trifosfato de adenosina
Boc:	N-terc-butixicarbonilo
BSA:	Albumina de Soro Bovino
DMSO:	Sulfóxido de dimetilo
DTT:	DL-Ditiotreitol
ED ₅₀ :	Dose terapeuticamente eficaz em 50% da população

EDTA: Ácido etilenodiaminotetraacético
EtOH: Etanol
HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Pressão
Valor IC₅₀: A concentração de um inibidor que provoca uma redução de 50% numa actividade medida
KHMDS: Bis(trimetilsilil)amida de potássio
LC/MS: Cromatografia Líquida/Espectroscopia de Massa
THF: Tetra-hidrofurano

Purificação e Caracterização dos Compostos

Os compostos do presente invento foram caracterizados por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), utilizando um sistema cromatográfico Waters Millenium com um 2690 Separation Module (Milford, Massachusetts). As colunas analíticas eram Altima C-18 de fase inversa, 4,6 x 250 mm da ALtech (Deerfield, Illinois). Foi utilizada uma eluição com gradiente, começando tipicamente com 5% de acetonitrilo/95% de água e progressão até 100% de acetonitrilo ao longo de um período de 40 minutos. Todos os solventes continham 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA, da sigla em inglês). Os compostos foram detectados por absorção de luz ultravioleta (UV) quer a 220 quer a 254 nm. Os solventes de HPLC eram da Burdick and Jackson (Muskegan, Michigan), ou Fischer Scientific (Pittsburg, Pensilvânia). Nalguns casos, a pureza foi avaliada por cromatografia em camada fina (TLC, da sigla em inglês) utilizando placas de

sílica gel depositada em vidro ou plástico, tal como por exemplo, as folhas flexíveis Baker-Flex Silica Gel 1 B2-F. Os resultados de TLC foram rapidamente detectados visualmente sob luz ultravioleta ou empregando o bem conhecido de vapor de iodo e outras técnicas de coloração.

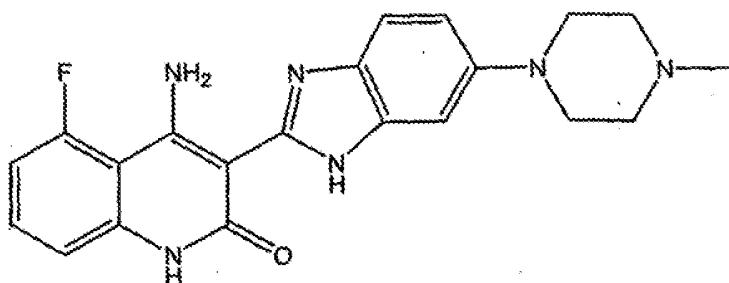
A análise por espectrometria de massa foi realizada em um ou dois equipamentos LCMS; um Waters System (HPLC Alliance HT e um espetrómetro de massa Micromass ZQ; Coluna: Eclipse XDB-C18, 2,1 x 50 mm; Sistema de solventes: 5-95% de acetonitrilo em água com 0,05% TFA; Caudal de 0,8 ml/minuto; gama de peso molecular 150-850; Voltagem de Cone 20 V; Temperatura da coluna 40°C) ou um Hewlett Packard System (HPLC Série 1100; Coluna: Eclipse XDB-C18, 2,1 x 50 mm; Sistema de solvente: 1-95% de acetonitrilo em água com 0,05% de TFA; Caudal de 0,4 ml/minuto; Gama de peso molecular 150-850; Voltagem de Cone 20 V; Temperatura da coluna 30°C). Todas as massas são relatadas como as dos iões-mãe protonados.

Análise por GCMS foi realizada num equipamento Hewlett Packard (cromatógrafo gasoso HP6890, com um Detector Selectivo de Massa 5973; volume do injector: 1 μ l; temperatura inicial da coluna: 50°C; Temperatura final da coluna: 250°C; tempo da rampa: 20 minutos; Caudal do gás: 1 ml/minuto; Coluna: 5% de Fenilmetilsiloxano, Modelo #HP 190915-443, Dimensões: 30,0 m x 25 μ m x 0,25 μ m).

As separações preparativas foram realizadas utilizando quer um sistema cromatográfico Flash 40 quer um

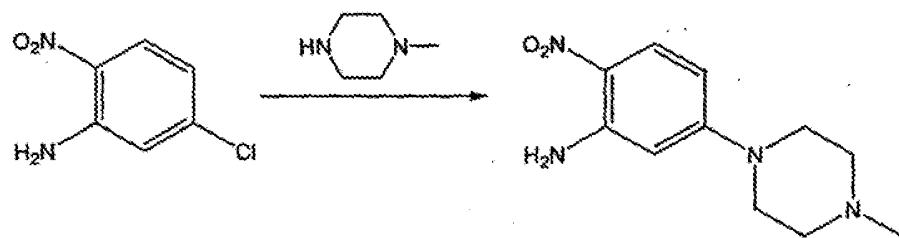
KP-Sil, 60A (Biotage, Charlottesville, Virginia) ou por HPLC utilizando uma coluna C-18 de fase inversa. Solventes típicos empregues no sistema Flash 40 Biotage foram o diclorometano, metanol, acetato de etilo, hexano e trietilamina. Solventes típicos empregues para a HPLC de fase inversa foram concentrações variadas de acetonitrilo e água com ácido trifluoroacético 0,1%.

Síntese de 4-Amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona



A. Síntese de 5-(4-Metilpiperazin-1-il)-2-nitroanilina

Procedimento A



5-Cloro-2-nitroanilina (500 g, 2,898 mol) e 1-metilpiperazina (871 g, 8,693 mol) foram colocados num

balão de 2000 ml montado com um condensador e purgado com N₂. O balão foi colocado num banho de óleo a 199°C e aquecido até a 5-cloro-2-nitroanilina ter reagido completamente (tipicamente durante a noite), tal como determinado por HPLC. Após a HPLC ter confirmado o desaparecimento da 5-cloro-2-nitroanilina, a mistura reacional foi deitada directamente (ainda quente) em 2500 ml de água à temperatura ambiente com agitação mecânica. A mistura reacional foi agitada até atingir a temperatura ambiente e então foi filtrada. O sólido amarelo assim obtido foi adicionado a 1000 ml de água e agitado durante 30 minutos. A mistura resultante foi filtrada e o sólido resultante foi lavado com TBME (500 ml, 2X) e então seco sob vácuo durante uma hora utilizando uma peça de borracha. O sólido resultante foi transferido para um tabuleiro de secagem e seco numa estufa de vácuo a 50°C até peso constante para dar origem a 670 g (97,8%) do composto do título sob a forma de um pó amarelo.

Procedimento B

A 5-cloro-2-nitroanilina (308,2 g, 1,79 mol) foi adicionada a um balão de 4 tubuladuras de 5000 ml de fundo redondo montado superiormente com um agitador, condensador, entrada de gás, funil de adição e sonda de termómetro. O balão foi então purgado com N₂. 1-Metilpiperazina (758,1 g, 840 ml, 7,57 mmol) e etanol 200 proof (508 ml) foram adicionados ao balão reacional com agitação. O balão foi então novamente purgado com N₂ e a reacção foi mantida sob

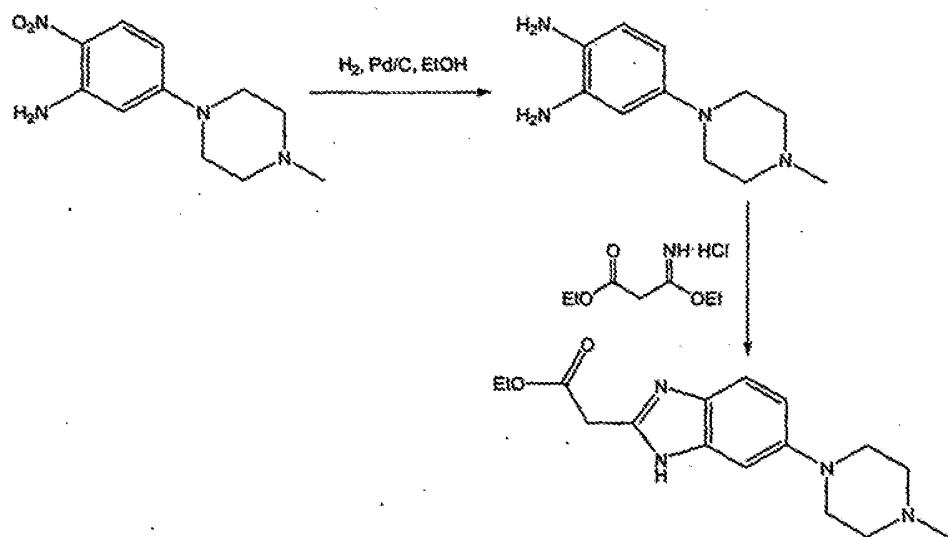
atmosfera de N₂. O balão foi aquecido numa manta de aquecimento até uma temperatura interna de 97°C (+/- 5°C) e mantido a essa temperatura até a reacção ficar completa (tipicamente cerca de 40 horas), tal como determinado por HPLC. Após a reacção se ter completado, o aquecimento foi descontinuado e a mistura reaccional foi arrefecida até uma temperatura interna de cerca de 20°C a 25°C, com agitação e a mistura reaccional foi agitada durante 2 a 3 horas. Cristais semente (0,20 g, 0,85 mmol) de 5-(4-metilpipera-zin-1-il)-2-nitroanilina foram adicionados à mistura reaccional a menos que precipitação tenha já ocorrido. Água (2450 ml) foi adicionada à mistura reaccional agitada ao longo de um período de cerca de uma hora enquanto a temperatura interna foi mantida a uma temperatura variando de cerca de 20°C a 30°C. Após a adição de água se ter completado, a mistura resultante foi agitada durante cerca de uma hora a uma temperatura de 20°C a 30°C. A mistura resultante foi então filtrada e o balão e o bolo de filtração foram lavados com água (3 x 2,56 l). O produto sólido amarelo dourado foi seco até um peso constante de 416 g (98,6% de rendimento) sob vácuo a cerca de 50°C numa estufa de vácuo.

Procedimento C

A 5-cloro-2-nitroanilina (401 g, 2,32 mol) foi adicionada a um balão de 4 tubuladuras de 12 l de fundo redondo montado superiormente com um agitador, um condensador, uma entrada de gás, um funil de adição e uma sonda de termómetro. O balão foi então purgado com N₂. 1-

Metilpiperazina (977 g, 1,06 l, 9,75 mol) e etanol 100% (650 ml) foram adicionados ao balão reaccional com agitação. O balão foi novamente purgado com N₂ e a reacção foi mantida sob atmosfera de N₂. O balão foi aquecido numa manta de aquecimento até uma temperatura interna de 97°C (+/- 5°C) e mantido a essa temperatura até a reacção ficar completa (tipicamente cerca de 40 horas) tal como determinado por HPLC. Após a reacção se ter completado, o aquecimento foi descontinuado e a mistura reaccional foi arrefecida até uma temperatura interna de cerca de 80°C, com agitação e foi adicionada água (3,15 l) à mistura através de um funil de adição ao longo de um período de 1 hora enquanto a temperatura interna era mantida a 82°C (+/- 3°C). Após a adição de água se ter completado, o aquecimento foi descontinuado e a mistura agitada foi deixada a arrefecer ao longo de um período de não menos de 4 horas até uma temperatura interna de 20-25°C. A mistura reaccional foi então agitada durante uma hora adicional a uma temperatura interna de 20°C-30°C. A mistura resultante foi então filtrada e o balão e o bolo de filtração foram lavados com água (1 x 1 l), etanol a 50% (1 x 1 l) e etanol a 95% (1 x 1 l). O produto sólido amarelo dourado foi colocado num recipiente de secagem e seco até um peso constante de 546 g (99% de rendimento) sob vácuo a cerca de 50°C numa estufa de vácuo.

B. Síntese do éster etílico do ácido [6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]-acético

Procedimento A

Um balão de 5000 ml, de 4 tubuladuras foi montado com um agitador, um termómetro, um condensador e uma entrada/saída de gás. O balão equipado foi carregado com 265,7 g (1,12 mol, 1,0 eq.) de 5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitroanilina e 2125 ml de EtOH 200 proof. A solução resultante foi purgada com N_2 durante 15 minutos. A seguir, foi adicionado 20,0 g de Pd/C 5% (50% H_2O p/p). A mistura reaccional foi agitada vigorosamente a 40–50°C (temperatura interna) ao mesmo tempo que H_2 foi borbulhado através da mistura. A mistura reaccional foi monitorizada de hora a hora em relação ao desaparecimento da 5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitroanilina por HPLC. O tempo de reacção típico foi de 6 horas.

Após toda a 5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitroanilina ter desaparecido da mistura reaccional, a solução

foi purgada com N₂ durante 15 minutos. A seguir, 440,0 g (2,25 mol) de cloridrato de 3-etoxi-3-iminopropionato de etilo foi adicionado como um sólido. A mistura reaccional foi agitada a 40-50°C (temperatura interna) até a reacção se ter completado. A reacção foi monitorizada seguindo o desaparecimento do composto diamino por HPLC. O tempo de reacção típico foi de 1-2 horas. Após a reacção se ter completado, a mistura reaccional foi arrefecida até à temperatura ambiente e filtrada através de um tampão de material de filtração de Celite. O material de filtração de Celite foi lavado com EtOH absoluto (2 x 250 ml) e o filtrado foi concentrado sob pressão reduzida proporcionando um óleo castanho/laranja espesso. O óleo resultante foi tomado em 850 ml de uma solução de HCl a 9,37%. NaOH sólido (25 g) foi então adicionado numa porção e formou-se um precipitado. A mistura resultante foi agitada durante 1 hora e então filtrada. O sólido foi lavado com H₂O (2 x 400 ml) e seco a 50°C numa estufa de vácuo proporcionando 251,7 g (74,1%) de éster etílico do ácido [6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]-acético sob a forma de um pó amarelo pálido.

Procedimento B

Um balão de 5000 ml, de 4 tubuladuras foi montado com um agitador mecânico, um condensador, uma sonda de termómetro, uma entrada de gás e um borbulhador de óleo. O balão equipado foi carregado com 300 g (1,27 mol) de 5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitroanilina e 2400 ml de EtOH 200

proof (a reacção pode ser e foi efectuada com etanol a 95% e não é necessário utilizar etanol 200 proof para esta reacção). A solução resultante foi agitada e purgada com N₂ durante 15 minutos. A seguir, 22,7 g de Pd/C 5% (50% H₂O p/p) foi adicionado ao balão reaccional. O vaso reaccional foi purgado com N₂ durante 15 minutos. Após a purga com N₂, o vaso reaccional foi purgado com H₂ mantendo um fluxo lento mas constante de H₂ no balão. A mistura reaccional foi agitada a 45-55°C (temperatura interna) enquanto H₂ foi borbulhado na mistura até a 5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitroanilina se ter completamente consumido, tal como determinado por HPLC. O tempo de reacção típico foi de 6 horas.

Após toda a 5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitroanilina ter desaparecido da reacção, a solução foi purgada com N₂ durante 15 minutos. O intermediário diamina é sensível ao ar pelo que houve o cuidado de evitar a exposição ao ar. 500 g (2,56 mol) de cloridrato do 3-etoxy-3-iminopropionato de etilo foi adicionado à mistura reaccional ao longo de um período de cerca de 30 minutos. A reacção foi agitada a 45-55°C (temperatura interna) sob atmosfera de N₂ até a diamina ter sido completamente consumida, tal como determinado por HPLC. O tempo de reacção típico foi de cerca de 2 horas. Após a reacção se ter completado, a mistura reaccional foi filtrada ainda quente através de um tampão de Celite. O balão reaccional e a Celite foram então lavados com EtOH 200 proof (3 x 285 ml). Os filtrados foram combinados num balão de 5000 ml e

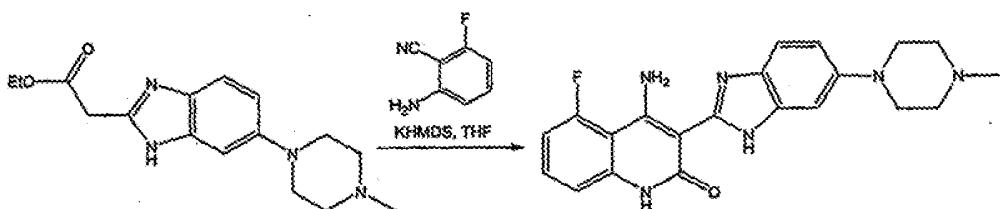
cerca de 3300 ml de etanol foi removido sob vácuo para produzir um óleo laranja. Água (530 ml) e então HCl 1M (350 ml) foram adicionados ao óleo resultante e a mistura resultante foi agitada. A solução resultante foi vigorosamente agitada enquanto NaOH a 30% (200 ml) foi adicionado ao longo de um período de 20 minutos, mantendo a temperatura interna a cerca de 25-30°C enquanto o pH era levado até entre 9 e 10. A suspensão resultante foi agitada durante cerca de 4 horas enquanto se mantinha a temperatura interna a cerca de 25-30°C. A mistura resultante foi filtrada e o bolo de filtração foi lavado com H₂O (3 x 300 ml). O sólido recolhido foi seco até peso constante a 50°C sob vácuo numa estufa de vácuo proporcionando 345,9 g (90,1%) de éster etílico do ácido [6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzoimidazol-2-il]-acético sob a forma de um pó amarelo pálido. Num procedimento alternativo, os filtrados foram combinados e o etanol foi removido sob vácuo até, pelo menos, cerca de 90% ter sido removido. Água com um pH neutro foi então adicionado ao óleo resultante e a solução foi arrefecida até cerca de 0°C. Uma solução aquosa de NaOH a 20% foi então adicionada lentamente com agitação rápida para elevar o pH até 9,2 (lido com um medidor de pH). A mistura resultante foi então filtrada e seca, tal como descrito atrás. O procedimento alternativo proporcionou um produto entre o castanho claro e o amarelo claro com rendimentos tão elevados como 97%.

Método para Reduzir o Teor de Água do éster etílico do ácido [6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]-acético

O éster etílico do ácido [6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]-acético (120,7 g) que foi previamente utilizado e seco até um teor de H₂O de cerca de 8-9% foi colocado num balão de fundo redondo de 2000 ml e dissolvido em etanol absoluto (500 ml). A solução ambar foi concentrada num óleo espesso utilizando um evaporador rotativo com aquecimento até todo o solvente ter sido removido. O procedimento foi repetido mais duas vezes. O óleo espesso assim obtido foi deixado no balão e colocado numa estufa de vácuo aquecida a 50°C durante a noite. Os resultados de uma análise de Karl Fisher indicaram um teor de água de 5,25%. O teor de água mais baixo obtido através deste método proporcionou maiores rendimentos no procedimento do Exemplo seguinte. Outros solventes, tais como tolueno e THF, podem ser utilizados em vez de etanol para este processo de secagem.

C. Síntese da 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona

Procedimento A



O éster etílico do ácido [6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]-acético (250 g, 820 mmol) (seco

com etanol, tal como descrito atrás) foi dissolvido em THF (3800 ml) num balão de 5000 ml montado com um condensador, um agitador mecânico, uma sonda de temperatura e purgado com árgon. 2-Amino-6-fluoro-benzonitrilo (95,3 g, 700 mmol) foi adicionado à solução e a temperatura interna foi elevada até 40°C. Quando todos os sólidos se tinham dissolvido e a temperatura da solução tinha atingido 40°C, KHMDS sólido (376,2 g, 1890 mmol) foi adicionado ao longo de um período de 5 minutos. Quando a adição da base de potássio se completou, foi obtido uma solução amarela heterogénea e a temperatura interna tinha-se elevado a 62°C. Após um período de 60 minutos, a temperatura interna diminuiu até 40°C e a reacção foi determinada por HPLC como estando completa (não estava presente material de partida ou intermediário não ciclizado). A mistura reaccional espessa foi então extinta deitando-a em H₂O (6000 ml) e agitação da mistura resultante até ter atingido a temperatura ambiente. A mistura foi então filtrada e o tampão de filtro foi lavado com água (1000 ml 2X). O sólido amarelo vivo foi colocado num tabuleiro de secagem e seco numa estufa de vácuo a 50°C durante a noite, proporcionando 155,3 g (47,9%) da desejada 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona.

Procedimento B

Um balão de 5000 ml de 4 tubulações com uma camisa foi equipado com um equipamento de destilação, uma sonda de temperatura, uma entrada de gás N₂, um funil de adição e um agitador mecânico. Éster etílico do ácido [6-

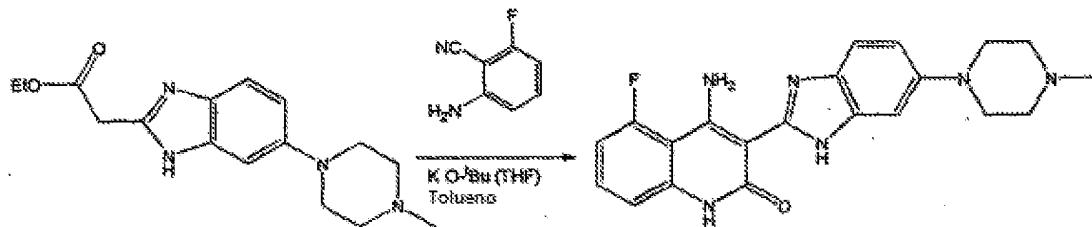
(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]-acético (173,0 g, 570 mmol) foi carregado para o reactor e o reactor foi purgado com N₂ durante 15 minutos. THF seco (2600 ml) foi então carregado para o balão com agitação. Após todo o sólido se ter dissolvido, o solvente foi removido por destilação sob vácuo ou atmosférica (a temperatura superior ajuda a remover a água) utilizando calor como necessário. Após 1000 ml de solvente ter sido removido, a destilação foi parada e a mistura reaccional foi purgada com N₂. 1000 ml de THF seco foi então adicionado ao vaso reaccional e quando todo o sólido ficou dissolvido, foi feita novamente destilação (vácuo ou atmosférica) até mais outros 1000 ml de solvente serem removido. Este processo de adição de THF seco e de remoção de solvente foi repetido pelo menos 4 vezes (na 4^a destilação, 60% do solvente é removido em vez de apenas 40% tal como nas primeiras 3 destilações) após o que 1 ml de amostra foi removido para análise de Karl Fisher para determinar o teor de água. Se a análise mostrava que a amostra continha menos do que 0,20% de água, então a reacção era continuada, tal como descrito no parágrafo seguinte. Contudo, se a análise demonstrava mais de 0,20% de água, então o processo de secagem descrito atrás continuava até ser atingido um teor de água inferior a 0,20%.

Após se ter atingido um teor de água inferior a ou de cerca de 0,20% utilizando o procedimento descrito no parágrafo anterior, o equipamento de destilação foi substituído com um condensador de refluxo e a mistura

reaccional foi carregada com 2-amino-6-fluoro-bazonitrilo (66,2 g, 470 mmol) (nalguns procedimentos é utilizado 0,95 equivalentes). A mistura reaccional foi então aquecida até uma temperatura interna de 38-42°C. Quando a temperatura interna atingiu 38-42°C, uma solução de KHMDS (1313 g, 1,32 mol, KHMDS a 20% em THF) foi adicionada à mistura reaccional através do funil de adição ao longo de um período de 5 minutos mantendo a temperatura interna a cerca de 38-50°C durante a adição. Quando a adição da base de potássio se completou, a mistura reaccional foi agitada durante 3,5 a 4,5 horas (nalguns exemplos foi agitada durante 30 a 60 minutos e a reacção pode completar-se nesse prazo de tempo) ao mesmo tempo que se mantinha uma temperatura interna de 38-42°C. Uma amostra da mistura reaccional foi então removida e analisada por HPLC. Se a reacção não estava completa, era adicionada solução de KHMDS adicional ao balão durante um período de 5 minutos e a mistura reaccional era agitada a 38-42°C durante 45-60 minutos (a quantidade da solução de KHMDS adicionada foi determinada da seguinte maneira: se a razão IPC é < 3,50, então 125 ml foi adicionado; se $10,0 \geq$ razão IPC $\geq 3,50$, então 56 ml foi adicionado; se $20,0 \geq$ razão IPC ≥ 10 , então 30 ml foi adicionado. A razão IPC é igual à área correspondente à 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona) dividida pela área correspondente ao intermediário não ciclizado). Uma vez a reacção completada (razão IPC > 20), o reactor foi arrefecido até uma temperatura interna de 25-30°C e água (350 ml) foi carregada para o reactor ao longo de um período de 15 minutos ao mesmo tempo que mantinha a

temperatura interna a 25-35°C (numa alternativa, a reacção é conduzida a 40°C e água é adicionada no espaço de 5 minutos. A extinção mais rápida reduz a capacidade de impurezas que se formam ao longo do tempo). O condensador de refluxo foi então substituído por um equipamento de destilação e foi removido solvente por destilação (vácuo ou atmosférica) utilizando calor como requerido. Após ter sido removido 1500 ml de solvente, a destilação foi descontinuada e a mistura reaccional foi purgada com N₂. Água (1660 ml) foi então adicionada ao balão reaccional ao mesmo tempo que se mantinha a temperatura interna a 20-30°C. A mistura reaccional foi então agitada a 20-30°C durante 30 minutos antes de se arrefecer até uma temperatura interna de 5-10°C e então agitou-se durante 1 hora. A suspensão resultante foi filtrada e o balão e o bolo de filtração foram lavados com água (3 x 650 ml). O sólido assim obtido foi seco até um peso constante sob vácuo a 50°C numa estufa de vácuo para proporcionar 103,9 (42,6% de rendimento) de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona) sob a forma de um pó amarelo.

Procedimento C

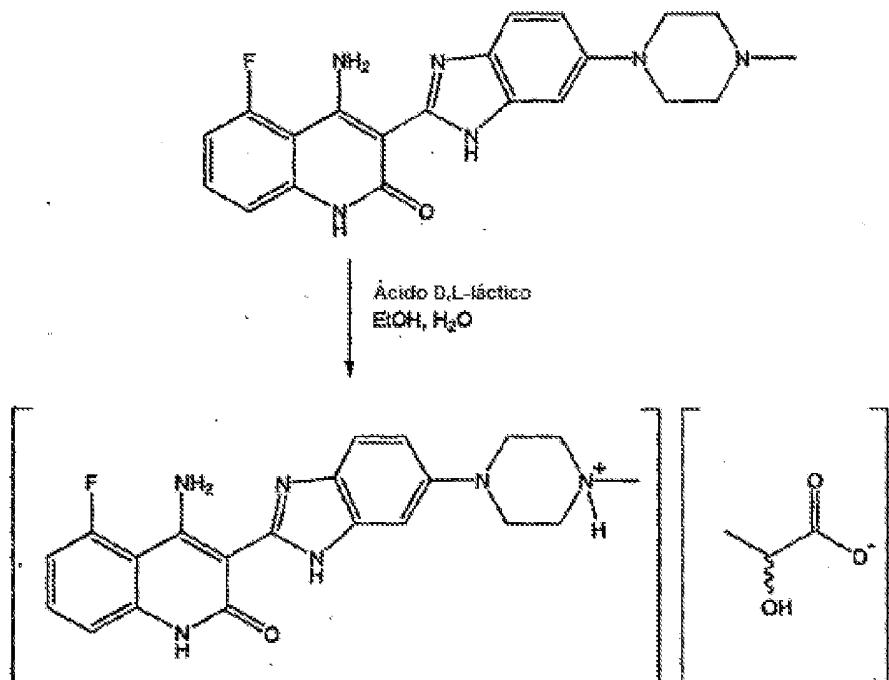


Éster etílico do ácido [6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]-acético (608 g, 2,01 mol) (seco)

e 2-amino-6-fluoro-benzonitrilo (274 g, 2,01 mol) foram carregados para um balão de 4 tubuladuras de 12 l assente numa manta de aquecimento e adaptado com um condensador, um agitador mecânico, uma entrada de gás e uma sonda de temperatura. O vaso reaccional foi purgado com N₂, e tolueno (7,7 l) foi carregado para a mistura reaccional enquanto se agitava. O vaso reaccional foi novamente purgado com N₂ e mantido sob atmosfera de N₂. A temperatura interna da mistura foi elevada até ser atingida uma temperatura de 63°C (+/-3°C). A temperatura interna da mistura foi mantida a 63°C (+/-3°C) enquanto aproximadamente 2,6 l de tolueno foi destilado do balão sob pressão reduzida (380 +/- 10 torr, cabeça de destilação t = 40°C (+/- 10°C) (foi utilizada análise de Karl Fisher para verificar o teor de água da mistura. Se o teor de água era superior a 0,03% então mais 2,6 l de tolueno foi adicionado e a destilação foi repetida. Este processo foi repetido até ser atingido um teor de água inferior a 0,03%). Após ser atingido um teor de água inferior a 0,03%, o aquecimento foi descontinuado e a mistura reaccional foi arrefecida sob atmosfera de N₂ até uma temperatura interna de 17-19°C. t-Butóxido de potássio em THF (20% em THF; 3,39 kg, 6,04 moles de t-butóxido de potássio) foi então adicionado à mistura reaccional sob atmosfera de N₂ numa quantidade de forma a que a temperatura interna da mistura reaccional fosse mantida abaixo de 20°C. Após a adição do t-butóxido de potássio se ter completado, a mistura reaccional foi agitada a uma temperatura interna de menos do que 20°C durante 30 minutos. A temperatura foi então elevada até 25°C e a mistura reaccional foi agitada durante, pelo

menos, 1 hora. A temperatura foi então elevada até 30°C e mistura reaccional foi agitada durante, pelo menos, 30 minutos. A reacção foi então monitorizada para ver se estava completada utilizando HPLC para verificar o consumo dos materiais de partida (tipicamente em 2,3 horas, ambos os materiais de partida eram consumidos (menos do que 0,5% em % em área de HPLC)). Se a reacção não estiver completa após 2 horas outros 0,05 equivalentes de t-butóxido de potássio foi adicionado nessa altura, e o processo foi completado até o HPLC mostrar que a reacção estava completa. Após a reacção estar completa, foi adicionado 650 ml de água à mistura reaccional agitada. A mistura reaccional foi então aquecida até uma temperatura interna de 50°C e o THF foi removido por destilação (cerca de 3 l em volume) sob pressão reduzida a partir da mistura reaccional. Água (2,6 l) foi então adicionada gota a gota à mistura reaccional utilizando um funil de adição. A mistura foi então arrefecida até à temperatura ambiente e agitada durante, pelo menos, 1 hora. A mistura foi então filtrada e o bolo de filtração foi lavado com água (1,2 l), com 70% de etanol (1,2 l) e com 95% de etanol (1,2 l). O sólido amarelo vivo foi colocado num tabuleiro de secagem e seco numa estufa de vácuo a 50°C até se obter peso constante proporcionando 674 g (85,4%) da desejada 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona.

Purificação do Sal de Ácido Láctico da 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona)



Um balão de 3000 ml de 4 tubuladuras encamisado foi adaptado com um condensador, uma sonda de temperatura, uma entrada para o gás de N₂ e um agitador mecânico. O vaso reaccional foi purgado com N₂ durante, pelo menos, 15 minutos e então carregado com 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-on (484 g, 1,23 mol). Uma solução de ácido D,L-láctico (243,3 g, 1,72 mol de monómero – ver o parágrafo seguinte), água (339 ml) e etanol (1211 ml) foi preparada e então carregada para o balão reaccional. A agitação foi iniciada com uma velocidade média e a mistura reaccional foi aquecida até uma temperatura interna de 68-72°C. A temperatura interna da mistura reaccional foi mantida a 68-72°C durante 15-45 minutos e então o aquecimento foi descontinuado. A mistura resultante foi filtrada através de uma frita de 10-20 micron recolhendo o filtrado num balão

de 12 l. O balão de 12 l foi equipado com uma sonda de temperatura interna, um condensador de refluxo, um funil de adição uma entrada e uma saída de gás e um agitador superior. O filtrado foi então agitado com uma velocidade média e aquecido sob refluxo (temperatura interna de cerca de 78°C). Enquanto se mantinha um refluxo suave, foi carregado etanol (3596 ml) ao balão ao longo de um período de cerca de 20 minutos. O balão reaccional foi então arrefecido até uma temperatura interna variando de 64-70°C no espaço de 15-25 minutos e esta temperatura foi mantida durante um período de cerca de 30 minutos. O reactor foi inspeccionado no que se refere a cristais. Se não estavam presentes cristais, então os cristais do sal de ácido láctico da 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona (484 mg, 0,1% mole) foram adicionados ao balão e a mistura reaccional foi agitada a 64-70°C durante 30 minutos antes de nova inspecção do balão em relação aos cristais. Quando os cristais estavam presentes, a agitação foi reduzida até uma baixa velocidade e mistura reaccional foi agitada a 64-70°C durante 90 minutos adicionais. A mistura reaccional foi então arrefecida, até cerca de 0°C, ao longo de um período de cerca de 2 horas e a mistura resultante foi filtrada através de uma frita de filtração de 25-50 micron. O reactor foi lavado com etanol (484 ml) e agitou-se até a temperatura interna ser de cerca de 0°C. O etanol frio foi utilizado para lavar o bolo de filtração e este procedimento foi repetido mais 2 vezes. O sólido recolhido foi seco até peso constante a 50°C sob vácuo, numa estufa de

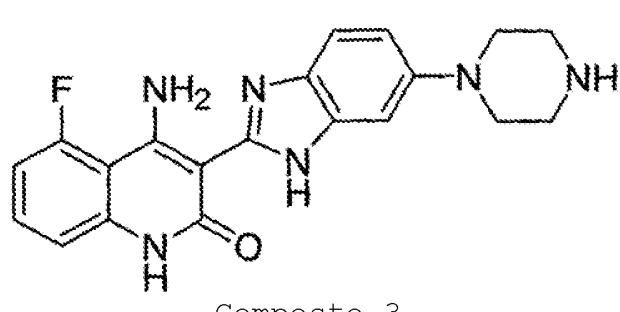
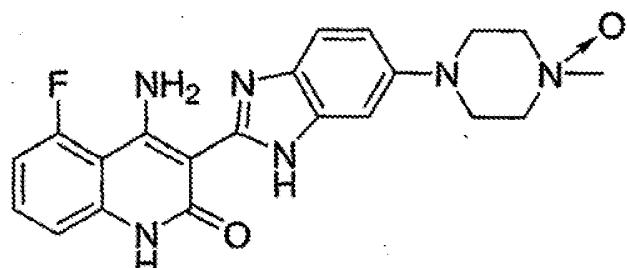
vácuo, originando 510,7 g (85,7%) do sal de ácido láctico amarelo cristalino da 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona.

Uma peça de borracha ou condições inertes foram tipicamente utilizadas durante o processo de filtração. Embora o sólido seco não pareça ser muito higroscópico, o bolo de filtração tende a assimilar água e a tornar-se pegajoso. Foram tomadas precauções para evitar uma exposição prolongada à atmosfera do bolo de filtração húmido.

O ácido láctico comercial contém geralmente cerca de 8-12% p/p de água e contém dímeros e trímeros adicionais ao ácido láctico monomérico. A razão molar de dímero de ácido láctico em relação ao monómero é geralmente de cerca de 1,0:4,7. O ácido láctico de grau comercial pode ser utilizado no processo descrito no parágrafo precedente como sal monolactato que precipita preferencialmente a partir da mistura reaccional.

Identificação de Metabolitos

Dois metabolitos de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona (Composto 1) foram identificados e caracterizados em plasma de ratazana seleccionado num estudo toxicológico de 2 semanas tal como descrito nas referências aqui incorporadas. Os dois metabolitos identificados foram o composto de N-óxido de piperazina (Composto 2) e o composto N-desmetilado (Composto 3) mostrados abaixo.



IC₅₀ dos Compostos 1-3

A actividade da cinase de um certo número de proteína tirosina cinases foi medido utilizando os procedimentos apresentados abaixo para os Compostos 1-3 para proporcionar os valores de IC₅₀ mostrados na tabela seguinte.

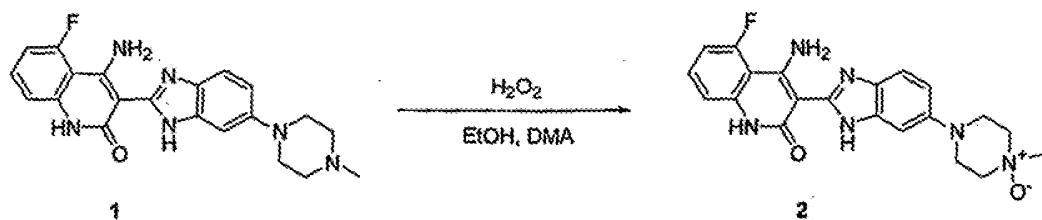
Tabela. IC₅₀ dos Compostos 1-3

Composto	IC₅₀ (μM)					
	VEGFR flt	VEGFR flk1	bFGFR	PDGFR	Flt3	c-kit
Composto 1	0,010	0,013	0,008	0,027	0,0001	0,0015
Composto 2	0,004	0,009	0,005	0,010	0,0004	0,0002
Composto 3	0,019	0,012	0,019	0,037	0,0001	0,0002

Síntese da 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-oxido-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]-quinolin-2(1H)-ona (Composto 2) e 4-amino-5-fluoro-3-(6-piperazin-1-il-1H-benzimidazol-2-il)-quinolin-2(1H)-ona (Composto 3)

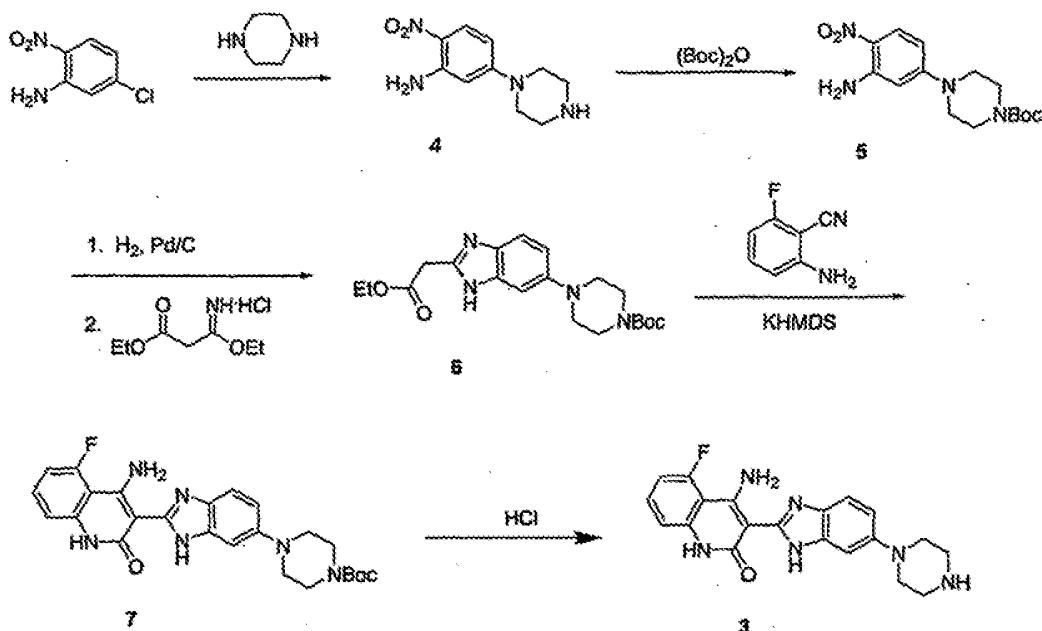
Para confirmar as estruturas dos metabolitos identificados do Composto 1, os metabolitos foram independentemente sintetizados.

O Composto 2, o metabolito N-óxido do Composto 1, foi sintetizado tal como mostrado no esquema abaixo. O Composto 1 foi aquecido numa mistura de etanol, dimetilacetamida e peróxido de hidrogénio. Após se ter completado a reacção, o Composto 2 foi isolado por filtração e lavado com etanol. Se necessário, o produto pode ser ainda purificado através de cromatografia em coluna.



O Composto 3, o metabolito N-desmetilo do Composto 1, foi sintetizado tal como mostrado no esquema abaixo. 5-Cloro-2-nitroanilina foi tratada com piperazina para dar origem a 4 que foi subsequentemente protegido com um grupo butiloxicarbonilo (Boc) para dar origem a 5. A redução do grupo nitro seguido de condensação com éster etílico do ácido 3-etoxy-3-iminopropiónico deu origem a 6.

A condensação de 6 com 6-fluoroantranilonitrilo utilizando hexametildisilazida de potássio como base deu origem a 7. 7 em bruto foi tratado com HCl aquoso para dar origem ao metabolito desejado sob a forma de um sólido amarelo/castanho após purificação.



Procedimentos de Ensaio

Serina/Treonina Cinases

A actividade da cinase de várias proteína serina/treonina cinases foi medida proporcionando ATP e um péptido ou proteína adequado contendo um resíduo de aminoácido serina ou treonina para fosforilação e realizando a transferência da porção fosfato para o resíduo serina ou treonina. As proteínas recombinantes contendo os domínios de cinase das enzimas GSK-3, RSK-2, PAR-1, NEK-2 e CHK1 foram expressos em células de insecto S19 utilizando

um sistema de expressão de Baculovirus (inVitrogen) e purificadas através interacção de anticorpo Glu (constructos marcados com epítopo Glu) ou por Cromatografia de Ião Metálico (para constructos marcados Hls₆ (SEQ ID NO:1)). Cdc2 (constructo de fusão GST) e ciclina B foram co-expressos em células de insecto S19 utilizando um sistema de expressão de Baculovirus. Cdk2/ciclina A activa recombinante está comercialmente disponível e foi adquirida na Upstate Biotechnology. O enzima Cdc2 purificado utilizado no ensaio estava comercialmente disponível e pode ser adquirido na New England Bio Labs. Para cada ensaio, os compostos de teste foram diluídos em série em DMSO e então misturados com o tampão reacional de cinase adequado mais ATP 5-10 nM marcado com ³³P gama. A proteína cinase e o substrato de péptido biotinilado adequado foram adicionados para dar origem a um volume final de 150 µl. As misturas reacionais foram incubadas durante 3-4 horas à temperatura ambiente e então parou-se a reacção transferindo para uma placa de microtitulação branca revestida com estreptavidina (Thermo Labsystems) contendo 100 µl do tampão reacional de paragem. O tampão reacional de paragem consiste de ATP 50 mM não marcado e de EDTA 30 mM. Após 1 hora de incubação, as placas de estreptavidina foram lavadas com PBS e foi adicionado 200 µl de fluido de cintilação Microscint 20 por poço. As placas foram seladas e contadas utilizando TopCount. A concentração de cada composto para 50% de inibição (IC₅₀) foi calculado empregando regressão não linear utilizando um programa informático de análise de dados XL Flt.

O tampão reaccional continha Tris-HCl₂ 30 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, DTT 2 mM, EDTA 4 mM, betaglicerofosfato 25 mM, MnCl₂ 5mM, 0,01% de BSA/PBS, substrato de péptido 0,4 µM e ATP 1 µM não marcado. O enzima GSK-3 foi utilizado a 27 nM, CHK 1 a 5 nM, Cdc2 a 1 nM, Cdk2 a 5 nM e Rsk2 a 0,044 unidades/ml. Para o ensaio de GSK-3, foi utilizado péptido biotina-CREB (biotina-SGSGKRREILSRRP(pS)YR-NH₂ (SEQ ID No. 5)). Para os ensaios de Cdc2 e Cdk2, foi utilizado um péptido biotina-Histidona H1 ([IcBiotin]GGGGPKTPKKAKKL[CONH₂] (SEQ ID No. 6)). No ensaio Rsk2, foi utilizado um péptido biotina-p70, MgCl₂ 15 mM, DTT 1 mM, EDTA 5 mM, péptido inibidor 2,7 µM PKA e um péptido inibidor 2,7 µM PKC.

Tirosina Cinases

A actividade da cinase de várias proteína tirosina cinases foi medida proporcionando ATP e um péptido ou proteína adequado contendo um resíduo de aminoácido tirosina para fosforilação e realizando a transferência da porção fosfato para o resíduo tirosina. As proteínas recombinantes correspondentes aos domínios citoplásmicos dos receptores FLT-1 (VEGFR1), VEGFR2, VEGFR3, Tle-2, PDGFR α , PDGFR β e FGFR1 foram expressos em células de insecto S19 utilizando um sistema de expressão de Baculovirus (InVitrogen) e podem ser purificadas e purificadas através interacção de anticorpo Glu (constructos marcados com epítopo Glu) ou por Cromatografia de Ião Metálico (para constructos marcados Hls₆ (SEQ ID NO:1)). Para cada ensaio os compostos de teste foram diluídos em série em DMSO e

então misturados com um tampão reaccional de cinase adequado mais ATP. A proteína cinase e um substrato de péptido biotinilado adequado foram adicionados para dar origem a um volume final de 50-100 µl, as misturas reaccionais foram incubadas durante 1-3 horas à temperatura ambiente e então parou-se a reacção por adição de 25-50 µl de EDTA 45 mM, Hepes 50 mM pH 7,5. A mistura reaccional parada (75 µl) foi transferida para uma placa de microtitulação revestida com estreptavidina (Boehringer Manheim) e incubada durante 1 hora. O produto de péptido fosforilado foi medido com o sistema de fluorescência resolvida no tempo DELFIA (Wallac ou PE Biosciences), utilizando anticorpo PT66 antifosforilirosina marcado com Európio com a modificação de que o tampão de ensaio DELFIA foi suplementado com MgCl₂ 1 mM para a diluição do anticorpo. A fluorescência resolvida no tempo foi lida num fluorómetro Wallac 1232 DELFIA ou num leitor de sinal múltiplo PE Victor II. A concentração de cada composto para 50% de inibição (IC₅₀) foi calculado empregando regressão não linear utilizando um programa informático de análise de dados XL Flt.

As cinases FLT-1, VEGFR2, VEGFR3, FGFR3, Tle-2 e FGFR1 foram testadas em Hepes 50 mM pH 7,0, MgCl₂ 2 mM, MnCl₂ 10 mM, NaF 1 mM, DTT 1 mM, BSA 1 mg/ml, ATP 2 µM e substrato de péptido biotinilado correspondente 0,20-0,50 µM. As cinases FLT-1, VEGFR2, VEGFR3, Tle-2 e FGFR1 foram adicionadas em concentrações de 0,1 µg/ml, 0,05 µg/ml ou 0,1 µg/ml, respectivamente. Para o teste da cinase PDGFR,

enzima a 120 µg/ml com as mesmas condições tampão como atrás foi utilizado excepto no que se refere à alteração das concentrações de ATP e de substrato de péptido para ATP 1,4 µM e substrato de péptido biotina-GGLFDDPSY-VNVQNL-NH₂ (SEQ ID No. 2) 0,25 µM.

As cinases de tirosina recombinante e activa Fyn, e Lck estão comercialmente disponíveis e foram adquiridas na Upstate Biotechnology. Para cada ensaio, os compostos de teste foram diluídos em série em DMSO e então misturados com um tampão reacional de cinase adequado mais ATP marcado com ³³P gama 10 nM. A proteína cinase e o substrato de péptido biotinilado adequado foram adicionados para dar origem a um volume final de 150 µl. As misturas reacionais foram incubadas durante 3-4 horas à temperatura ambiente e então parou-se a reacção transferindo para uma placa de microtitulação branca revestida com estreptavidina (Thermo Labsystems) contendo 100 µl de tampão reacional para parar a reacção de EDTA 100 mM e ATP não marcado 50 µM. Após 1 hora de incubação, as placas de estreptavidina foram lavadas com PBS e 200 µl de fluido de cintilação Microscint 20 foi adicionado por poço. As placas foram vedadas e contadas utilizando um TopCount. A concentração de cada composto para 50% de inibição (IC₅₀) foi calculada empregando regressão não linear utilizando um programa informático de análise de dados XL Flt.

O tampão reacional de cinase para Fyn, Lck e c-ABL continha Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgCl₂ 15 mM, MnCl₂ 30

mM, DTT 2 mM, EDTA 2 mM, fosfato de beta-glicerol 25 mM, BSA/PBS 0,01%, 0,5 µM do substrato de péptido adequado (substrato de péptido Src biotinilado; biotina-GGGGKVEKI-GEGTYGVVYK-NH₂ (SEQ ID No. 3) para Fyn e Lck), ATP não marcado 1 µM e cinase 1 nM.

As actividades da cinase de c-Kit e FLT-3 foram medidas proporcionando ATP e um péptido ou proteína contendo um resíduo de aminoácido tirosina para fosforilação e proporcionando a transferência da porção fosfato para o resíduo tirosina. As proteínas recombinantes correspondentes aos domínios citoplásmicos dos receptores c-Kit e FLT-3 foram adquiridas (Proquinase). Para teste, um composto de exemplo, por exemplo, 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, foi diluído em DMSO e então misturado com o tampão reacional de cinase descrito acima mais ATP. A proteína cinase (c-Kit ou FLT-3) e o substrato de péptido biotinilado (biotina-GGLFDDPSYVNVQNL-NH₂ (SEQ ID No. 2)) foram adicionados para dar origem a um volume final de 100 µl. Estas misturas reacionais foram incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente e então a reacção foi parada por adição de 50 µl de EDTA 45 mM, HEPES 50 mM, pH 7,5. A mistura reacional com a reacção parada (75 µl) foi transferida para uma placa de microtitulação revestida com estreptavidina (Boehringer Mannheim) e incubou-se durante 1 hora. O produto de péptido fosforilado foi medido com o sistema de fluorescência resolvida no tempo DELPHIA (Wallac ou PT Biosciences), utilizando anticorpo antifosftirosina marcado com Európio,

PT66, com a modificação de que o tampão de teste de DELFIA foi suplementado com MgCl₂ 1 mM, para a diluição do anticorpo. Os valores de fluorescência resolvida no tempo foram determinados num fluorómetro Wallac 1232 DELFIA ou num leitor de sinal múltiplo PE Victor II. A concentração de cada composto para 50% de inibição (IC₅₀) foi calculado empregando regressão não linear utilizando um programa informático de análise de dados XL Fit.

As cinases FLT-3 e c-Kit foram testadas em Hepes 50 mM pH 7,5, NaF 1 mM, MgCl₂ 2 mM, MnCl₂ 10 mM e BSA 1 mg/ml, ATP 8 µM e 1 µM do substrato de péptido biotinilado correspondente (biotina-GGLFDDPSYVNVNL-NH₂ (SEQ ID NO.2)). A concentração das cinases FLT-3 e c-Kit foram ensaiadas a 2 nM.

Avaliação por Imagiologia em Tempo Real e Abrangente da Eficácia da 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona num Modelo de Mieloma Múltiplo Pré-clínico

O mieloma múltiplo (MM), um neoplasma de células B caracterizado por uma expansão clonal de células de plasma na medula óssea hematopoiética, permanece uma malignidade hematológica fatal devido ao desenvolvimento de resistência aos fármacos intrínseca e adquirida apesar da introdução de quimioterapia de alta dosagem convencional. Foi demonstrado que o microambiente da medula óssea, em que as células MM preferencialmente residem e crescem, desem-

penha um papel crucial no desenvolvimento da resistência a terapias convencionais e novas para o MM. Por isso, agentes com alvo molecular visando não apenas as células MM mas também a interacção célula MM-microambiente da medula óssea oferecem uma oportunidade potencial para tratar o MM. Avanços recentes na compreensão da patologia molecular do MM proporcionaram novos alvos terapêuticos para o tratamento desta doença. O FGFR-3 ectopicamente expressado e desregulado, que ocorre aproximadamente em 15% dos doentes de MM resultando de translocação cromossomal t(4,14) e que confere um prognóstico fraco em clínica, tornou-se num alvo terapêutico atractivo para o MM.

A 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (Composto 1) é um inibidor de molécula pequena que tem como alvo tirosina cinases de receptor múltiplo incluindo VEGFR-2 e PDGFR (IC_{50} s ~20 nM em ensaios de cinase) e FGFR-3 (IC_{50} ~5 nM em ensaios de cinase). Foi demonstrado que a 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona inibe a autofosforilação de FGFR-3 e a proliferação celular em células MM mutantes FGFR-3 (S. Trudel et al.; Blood; em publicação). Para avaliar a eficácia antimieloma da 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, foi desenvolvido um modelo MM pré-clínico *in vivo* em que as lesões MM multi-órgão desenvolvidas após injecção i.v. da veia da cauda de células KMS-11-Luc humanas expressando FGFR-3 mutante (Y373C) são transfectadas estavelmente com

um constructo de luciferase. Imagiologia bioluminescente (BLI) foi empregue para monitorizar não invasivamente *in vivo* o crescimento e a metástase de tumores MM KMS-11-Luc. A detecção precoce e a monitorização abrangente em série do crescimento das lesões metastáticas foi efectuada com sucesso através de BLI com este modelo. Verificou-se que quase todos os animais injectados com células tumorais KMS-11-Luc desenvolviam lesões MM tão cedo como no dia 26, que estavam principalmente localizadas na coluna vertebral, no crânio e na pélvis resultando no desenvolvimento frequente de parálise neste modelo. A eficácia antimieloma da 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona neste modelo MM KMS-11-luc injectado i.v. *in vivo*, foi investigada e verificou-se que a administração oral de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona a 20 mg/kg, uma dose que se demonstrou inibir a fosforilação de ERK em tumores KMS-11, *in vivo*, resultou numa inibição significativa do crescimento do tumor KMS-11, como detectado por imagiologia BLI em série. Para além disso, a actividade de crescimento antitumoral da 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona traduziu-se numa melhoria significativa na taxa de sobrevivência dos animais em comparação com o tratamento com veículo. Estes estudos proporcionam ainda uma base pré-clínica para os ensaios clínicos da 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona em doentes com MM e garantem ainda a avaliação da 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-

benzimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona em terapia de combinação com agentes convencionais ou com outros alvos moleculares neste modelo *in vivo* KMS-11-luc.

Método

Um grupo de 18 fêmeas (com cerca de 8 semanas de idade) de ratos SCID-bege imunodeficientes foi obtido no The Jakson Laboratory (Bar Harbor, ME) e foram guardados numa instalação vedada em gaiolas com topo em filtro estéril com ciclos de 12 horas de luz/escuridão. Todas as experiências foram realizadas numa instalação acreditada pela Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International e de acordo com todas as linhas de orientação do Institutional Animal Care and Use Committee e o Guide for The Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council). As células MM KMS-11-luc acolhendo mutantes FGFR-3 (Y373C) foram desenvolvidas em cultura em Meio Iscove + FBS 10% + L-glutamina e passadas duas vezes por semana numa gama 1:2 a 1:4. As células foram implantadas através de injecção intravenosa na veia da cauda a 10×10^6 células por 100 μ l HBSS por rato. Os ratos foram irradiados a 3 GY (3,2 minutos) no dia da implantação das células. Os animais receberam um tratamento oral diário de 20 mg/kg de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona ou veículo ($n = 9$ cada grupo) começando 48 horas após as células KMS-11-luc terem sido injectadas. Imagens bioluminescentes (BLI) foram obtidas utilizando um IVIS®

Imaging System (Xenogen) que incluía uma câmara CCD arrefecida altamente sensível montada numa câmara estanque à luz. As imagens e as medições dos sinais bioluminescentes, quantificados por fotões/segundo, foram obtidos no dia 8 e uma vez por semana depois disso, após injecção de substrato de luciferase. O peso do corpo dos animais foi monitorizado duas vezes por semana e as observações clínicas foram registadas diariamente. De acordo com a regulamentação e as linhas de orientação do cuidado com os animais, os ratos foram sacrificados por inalação de CO₂ no caso de parálise ou de compromissos graves da sua qualidade de vida.

Resultados

No dia 8 após as células KMS-11-luc terem sido injectadas intravenosamente em ratos SCID-bege, imangiologia de corpo inteiro demonstrou o desenvolvimento do crescimento celular e, possivelmente, lesões MM principalmente localizadas nas regiões extra-esqueléticas incluindo nos pulmões, fígado e baço. Lesões esqueléticas múltiplas difusas típicas incluindo crânio, pélvis e coluna vertebral eram claramente observadas na maioria dos ratos entre o dia 41 e o dia 48 (como visto em imagens BLI) o que estava associado à parálise dos membros posteriores, resultando no sacrifício dos ratos de acordo com o protocolo.

A eficácia antimieloma da 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]quinolin-

2(1H)-ona foi testada em KMS-11-luc neste modelo *in vivo*. Os ratos começaram a receber um tratamento oral diário de Composto 1 a 20 mg/kg 48 horas após as células KMS-11-luc terem sido injectadas ($n = 9$ ratos/grupo). Uma monitorização abrangente e em série da contagem de fotões em cada animal foi realizada com uma periodicidade semanal. Foi demonstrada uma contagem de fotões média inferior significativa no grupo tratado com 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona em comparação com o tratamento com veículo tal como mostrado na FIGURA 1. Isto foi facilmente observado em comparação com as imagens BLI de todo o corpo dos ratos injectados com KMS-11-luc tratados com veículo e os tratados com 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona. De forma interessante, o padrão de disseminação das células de mieloma múltiplo KMS-11-luc em ratos tratados com Composto 1 estava significativamente menos disperso. A metástase estava restringida a áreas do abdómen e das costas e não se encontrava extensivamente nas regiões cranianas, vertebrais ou membros posteriores.

A redução da contagem de fotões em ratos tratados com 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona refelectiu também um aumento significativo no tempo de sobrevivência em comparação com ratos tratados com veículo. No dia 91, 5 de 9 animais nos ratos tratados com 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-

ona permaneciam vivos com condições suadáveis globais. Ao contrário, a maior parte dos animais no grupo tratado com veículo foram sacrificados à volta do dia 50. Para além disso, os ratos tratados com 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, toleraram este tratamento bem durante o longo período deste estudo. Por causa da melhoria óbvia do tempo de sobrevivência dos ratos tratados com 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, o estudo foi terminado no dia 91 devido a considerações práticas.

Outros estudos em relação à inibição da cinase em geral, inibição de FGFR-3 e tratamento de cancros incluindo mieloma múltiplo com 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona são apresentados na publicação do Pedido de Patente U.S. No. 2004/0092535 e no Pedido de Patente U.S. No. 10/983.174, Pedido de Patente U.S. No. 2004/0220196 e Pedido de Patente U.S. No. 6.605.617.

Actividade da 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (Composto 1) em Modelos Experimentais de Xenoenxerto de Tumor de AML Humana

A 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (Composto 1) é uma nova pequena molécula multialvo oralmente activa que

apresenta uma potente actividade contra a cinase FLT3 e RTKs de Classe III, IV e V envolvidos na proliferação endotelial e de células tumorais. Dada a relevância das mutações FLT3 na leucemia mielóide aguda (AML, da sigla em inglês), o Composto 1 foi testado em duas linhas de células leucémicas humanas com diferente estado mutacional FLT3 (MV4; 11 FLT3 ITD vs. RS4; 11 FLT3 WT). A actividade antiproliferativa do Composto 1 contra MV4; 11 era ~24 vezes maior em comparação com RS4; 11, indicando uma inibição mais potente do FLT3 constitutivamente activado. A modulação dependente da dose da fosforilação do receptor e a sinalização a jusante (STAT5 e ERK/MAPK) em células MV4; 11 com o mecanismo molecular de acção do Composto 1. A modulação alvo de pFLT3, pERK em tumores MV4; 11 foi conseguida com doses biologicamente activas do Composto 1. As regressões dos tumores e a erradicação das células AML da medula óssea (BM, da sigla em inglês) foram demonstradas em modelos de xenoenxerto leucémico subcutâneo ou de enxerto. As respostas dos tumores foram caracterizadas por uma proliferação celular diminuída e coloração imuno-histoquímica positiva de caspase-3 activa e PARP separado, sugerindo que a morte celular foi mediada por apoptose. Estes dados apoiam a avaliação clínica do Composto 1 em AML.

Linhos de Células

Células leucémicas humanas MV4; 11 (FLT3 ITD) e

RS4; 11 (FLT3 WT) foram obtidas da American Tissue Culture Collection (Rockville, MD) 24-26. Células MV4; 11 foram desenvolvidas em Iscoves modificado com meio Dulbeco (IMBM) suplementado com soro bovino fetal a 10% (FBS, Gibco Life Technologies, Galtherburg, MD) contendo L-glutamina 4 mM, factor de estimulação da colónia de granulocitomacrófago 5 ng/ml (GM-CST, R&D Systems, Minneapolis, MN) e Penicilina 1% e Estreptomicina. RS3; 11 foi desenvolvido em meio RPMI-1640 contendo FBS 10%, piruvato de sódio 1 mM e HEPES 10 mM (pH 7,4). As células foram desenvolvidas em culturas em suspensão e mantidas numa atmosfera humidificada a 37°C e CO₂ a 5%.

Ensaios de Cinase

Ensaios de cinase FLT3 *in vitro* foram realizados com enzima FLT3 2 nM (Upstate Biotechnology, Charlottesville, VA) na presença de ATP 8 µM e diluições em série de Composto 1. O substrato de péptido fosforilado com uma concentração final de 1 µM foi incubado com um anticorpo antifosftotirosina marcado com Európio (PT 66) (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA). O Európio foi detectado utilizando fluorescência resolvida no tempo. O IC₅₀ foi calculado utilizando regressão não linear.

Ensaios de Proliferação

As células foram plaqueadas em placas de microtitulação de 96 poços (10 000 células/poço) e diluições em

série de Composto 1 foram adicionadas. Células RS4; 11 foram estimuladas com ligando FLT3 (100 ng/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN). No final, do período de incubação (72 h a 37°C) a viabilidade das células foi determinada através do ensaio MTS (Promega, Madison, WI). Os valores de EC₅₀ foram calculados utilizando regressão não linear e definidos como a concentração necessária para uma redução de 50% de absorvância de células tratadas vs. controlos não tratados.

Análise de Imunoprecipitação e Western Blot

Para experiências *in vitro* células MV4;11 e RS4;11 foram tratadas com Composto 1 durante 3 horas. As células RS4;11 foram estimuladas com ligando FLT3 (100 ng/ml) durante 15 minutos após incubação com Composto 1. Após a incubação com o fármaco, as células foram recolhidas, lavadas com PBS arrefecido com gelo e lisadas com tampão RIPA (Nonidet P-40 1%, desoxicócolato de sódio 0,5%, dodecilsulfato de sódio 0,1% em solução salina tamponada com 1X fosfato, pH 7,2) contendo inibidores de protease (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) e inibidores de fosfatase (Sigma, St. Louis, MO). Para análises de modulação alvo *in vitro*, tumores ressecados foram congelados rapidamente, pulverizados e armazenados a -70°C antes de lise com NaCl 150 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Hepes 50 mM, pH 7,5, glicerol a 10%, Triton X-100 a 1,0%, EGTA 1 mM, NaF 50 mM, Na₃VO₄ 1 mM, Pefabloc 2 mM (Roche) e um coctail de inibidor de protease completo (Roche). O teor de

proteína dos lisados foi determinado utilizando o ensaio BCA (Bio-Rad, Hercules, CA). A análise Western Blot de pERK foi realizada com um anticorpo de rato para pERK (1:1000, Cell Signaling, Beverly, MA) e incubado a 4°C durante a noite. O nível de ERK total foi avaliado reavaliando com um anticorpo contra ERK total (Cell Signaling). As membranas foram então incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente com 1:5000 de IgG anticoelho conjugado com peroxidase de râbano (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA). Para imunoprecipitação para detectar FLT3, quantidades iguais de proteínas (500 µg para STAT5; 1000 µg para FLT3) foram incubadas com anticorpos contra FLT3 ou STAT5 humano (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) durante a noite a 4°C e com proteína A-agarose durante 2 horas a 4°C. A fosforilação de FLT3 ou STAT5 foi medida utilizando um anticorpo antifosfotirosina (anticorpo anti-pFLT3 da Cell Signaling e anti-pSTAT5 da Upstate). As proteínas foram detectadas utilizando quimioluminescência melhorada (ECL; Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra) e visualizadas após exposição a uma película Kodak. Densitometria de varrimento foi realizada para quantificar as intensidades das bandas. Para verificar carga igual, as manchas foram removidas e reaplicaram-se anticorpos quer anti-FLT3 (Santa Cruz Biotechnology) quer anti-STAT5 (BD Biosciences) para medir a proteína FLT3 ou STAT5 total, respectivamente. A quantidade de pFLT3, pERK ou pSTAT5 foi normalizada aos níveis de proteína FLT3, ERK ou STAT5 total e comparada com os controlos de veículo e não tratados.

Ensaios de Citometria de Fluxo

Células MV4;11 foram tratadas com Composto 1, durante 3 horas, sob condições de falta de soro (durante a noite em meio OptiMEM). Para a detecção de pSTAT5, as células foram fixadas com formaldeído a 1% e permeabilizadas com metanol arrefecido com gelo a 90%. As células permeabilizadas ($0,5 - 1 \times 10^6$) foram incubadas com anticorpo anti-pSTAT (Cell Signaling) durante 30 minutos. IgG de coelho purificado (Oncogene, San Diego, CA) com a mesma concentração foi utilizado como controlo de isótipo. Anticorpo secundário foi um IgG anticoelho F(ab')2 de cabra conjugado com PE (Jackson Immunoresearch). As amostras foram armazenadas a 4°C , no escuro, antes das análises utilizando um citómetro de fluxo FACScan (Becton, Dickinson, San Jose, CA). A intensidade fluorescente média (MFI, da sigla em inglês) foi determinada por coloração pSTAT5 utilizando um programa informático CellQuest (Becton Dickinson) e a MFI específica era a diferença da MFI do anticorpo de controlo isótipo.

Para o processamento das células da medula óssea (BM, da sigla em inglês) do modelo de enxerto MV4;11 do rato, os fêmures foram purgados com solução salina fria e as células dos glóbulos vermelhos lisadas com tampão de lise FACS (Becton, Dickinson). O enxerto em percentagem de células leucémicas humanas em BM de rato foi determinada através de coloração de HLA-A,B,C-FITC anti-humano (vs. contro de anticorpo-FITC correspondente a isótipo) (BD Pharmigen).

ELISA VEGF

Células MV4;11 foram desenvolvidas em cultura num meio contendo FBS a 10% com várias concentrações (0-1 µM) de Composto 1 durante 48 horas. Os sobrenadantes foram recolhidos após centrifugação e os níveis de VEGF foram medidos por ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). As concentrações de proteína foram determinadas utilizando o ensaio de proteína BIO-RAD (Hercules, CA) e os resultados foram normalizados numa concentração de proteína.

Estudos de Eficácia In Vivo

Ratos SCID-NOD fêmeas (4-6-semanas de idade, 18-22 g) foram obtidos da Charles River (Wilmington, MA) e aclimatados durante 1 semana num recinto livre de patogénios antes do início do estudo. Os animais receberam ração para roedores estéril e água *ad libitum* e foram abrigados em gaiolas com topo em filtro estéril com ciclos de 12 horas de luz/escuridão. Todas as experiências seguiram as linhas de orientação da Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International.

Modelo Subcutâneo

Células MV4;11 e RS4;11 foram passadas a partir de tumores subcutâneos (s.c.) em ratos SCID-NOD. As células

(5×10^6 células/rato) form reconstituídas com Matrigel a 50% (Becton Dickinson) e implantadas s.c. no flanco direito de ratos SCID-NOD. Os tratamentos foram iniciados quando os tumores tinham 200-1000 mm³, tal como referido em desenhos de estudo específicos. Os ratos foram distribuídos aleatoriamente por grupos (tipicamente 10 ratos/grupo para estudos de eficácia e 3-5 ratos/grupo para estudos farmacodinâmicos (PD, da sigla em inglês)). O Composto 1 foi administrado como uma solução através de alimentação oral. Os volumes dos tumores e os pesos corporais foram avaliados 2-3 vezes por semana. Medições com craveira dos tumores foram convertidas no volume de tumor médio utilizando a fórmula: $\frac{1}{2} (\text{comprimento} \times (\text{largura})^2)$. A percentagem de inibição de crescimento dos tumores (TGI, da sigla em inglês) foi comparada com a de ratos tratados com veículo. As taxas de resposta foram definidas como respostas completas CR (da sigla em inglês) (sem tumor palpável) ou respostas parciais PR (da sigla em inglês) (50-99% de regressão) em comparação com o volume do tumor no início do tratamento.

**Modelo de Enxerto Intravenoso da Medula Óssea
(BM, da sigla em inglês)**

Ratos SCID-NOD foram irradiados (3 Gy) antes da injecção na veia da cauda de 1×10^7 células MV4;11 em 0,2 ml de solução salina. Os tratamentos com Composto 1 ou veículo foram iniciados 3 semanas após a inoculação das células. Os ratos foram monitorizados diariamente e foram eutanizados quando moribundos ou com sinais precoces de perda da mobilidade dos membros posteriores. Um maior tempo de vida

(ILS, da sigla em inglês) dos ratos tratados foi calculado como o aumento da percentagem no tempo de sobrevivência médio (MST, da sigla em inglês) vs. ratos de controlo tratados com veículo.

Modulação Alvo *In vivo*

Tumores MV4;11 em ratos SCID-NOD (n=3 ratos/grupo) foram levados ao estágio de 300 mm³ e os tratamentos consistiram quer de veículo quer de Composto 1 ser administrado oralmente a 10 mg/kg durante 5 dias. Para caracterizar as propriedades PD do composto 1, amostras de tumor foram recolhidas em vários tempos (N = 3 ratos/ponto de tempo) a seguir à dosagem do Composto 1.

Imuno-histoquímica

Tumores ressecados foram colocados em formalina tamponada neutra a 10% durante a noite à temperatura ambiente, transferidos para etanol a 70% e processados para embutimento em parafina utilizando um processador de tecidos Thermo Electron Excelsior (Pittsburgh, PA). Amostras de osso (fémur) foram descalcificadas (ProtocolTM, Fisher Diagnostics, Middletown, VA). Blocos de parafina foram seccionados até uma espessura de 4 µm e colocados em lâminas de vidro carregadas positivamente. Os tecidos foram corados utilizando uma máquina de deslizamento automatizado Discovery (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). As lâminas foram tratadas com tampão de citrato (pH 6,0) num gerador de vapor pressurizado para recuperar antígeno para a

coloração de KI-67, pERK e PARP e caspase-3 foi recuperada com o reagente CC1 Ventana. Os anticorpos primários utilizados foram KI-67 (diluição 1:750, NovoCastra Laboratories, Reino Unido), pERK (diluição 1:100, Biosource, Camarillo, CA), mitocôndria anti-humana (1:200, Chemicon, Temecula, CA), caspase-3 separada (1:200, Cell Signaling) e PARP separado (1:100, Biosource). O anticorpo secundário era um anticorpo biotinilado F(ab')2 anticoelho de cabra, diluição 1:100 (Jackson ImmunoResearch). As lâminas foram contrastadas com hematoxilina e montadas com uma lamela a cobrir. A morfologia do tecido geral foi também avaliada utilizando coloração com hematoxilina e eosina.

Análises Estatísticas

Foi realizada regressão linear utilizando o Excel da Microsoft (Redmond, WA). Foi utilizado o teste t de Student para medir a significância estatística entre os dois grupos de tratamento. Foram feitas comparações múltiplas utilizando análise de variância de uma via (ANOVA) e foram realizados testes posteriores comparando diferentes meios de tratamento utilizando o teste de Student-Newman Keul (SigmaStat, San rafael, CA). Para estudos de sobrevivência, foi utilizado o teste de Mantel-Cox para determinar a significância entre as curvas de sobrevivência de vários tratamentos vs. grupos de veículo (Prism, San Diego, CA). Os ratos sacrificados com um estado de saúde normal no término do estudo foram considerados sobrevidentes a longo prazo e censurados nesta análise. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas a $p < 0,05$.

RESULTADOS**O Composto 1 Demonstra uma Inibição Potente da Actividade de Cinase FLT3**

A especificidade do Composto 1 foi testada contra um painel diverso de RTKs utilizando ensaios de ligação competitivos com ATP com enzimas purificados tal como descrito atrás. Verificou-se que o Composto 1 era altamente potente contra FLT3 (1 mM) com actividade nanomolar contra c-KIT (2 mM), VEGFR1/2/3 (10 mM); FGFR1/3 (8 nM); PDGFR β (27 nM) e CSF-1R (36 nM) (ver a Tabela seguinte). Para conformar a selectividade contra RTKs da Classe III, IV e V, o Composto 1 foi testado contra outras cinases nas vias PI3K/Akt e MAPK(K) e verificou-se que tinha uma actividade negligenciável ($IC_{50} > 10 \mu M$) (Ver a Tabela seguinte).

Tabela. Actividade da 4-Amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona

Contra Vários RTKs

RTK	IC_{50} (μM)
FLT3	0,001
c-KIT	0,002
CSF-1R	0,036
FGFR1	0,008
FGFR3	0,009

(continuação)

RTK	IC ₅₀ (μM)
VEGFR1/Flt1	0,01
VEGFR2/Flt1	0,013
VEGFR3/Flt4	0,008
PDGFRβ	0,027
PDGFRα	0,21
EGFR1	2
c-MET	>3
EphA2	4
TIE2	4
IGFR1, HER2, PI-3K, Akt1/3, Raf, ERK-1/2, MEK, p38-α, β, γ	>10

Os ensaios de RTK *in vitro* utilizados para preparar a tabela anterior foram realizados com várias diluições do Composto 1 na presença de enzimas purificados e ATP, tal como descrito atrás. Os substratos de péptido fosforilados (1 μM) foram incubados com anticorpos antifosfoespecíficos marcados com Európio e o Európio foi detectado utilizando fluorescência resolvida no tempo.

Efeitos Antiproliferativos Potentes do Composto 1 em Células MV4;11 (FLT3 ITD)

Para determinar se a inibição de FLT3 se traduz numa inibição do crescimento *in vitro*, a actividade do Composto 1 foi testada em relação a células MV4;11 e RS4;11 utilizando o ensaio MTS. MV4;11 ou RS4;11 (na presença do ligando FLT3) foram incubadas com diluições em série de

Composto 1. A viabilidade das células foi determinada através do ensaio MTS após um período de incubação de 72 horas. Os valores de EC₅₀ foram calculados utilizando regressão não linear e definidos como a concentração necessária para uma redução de 50% na absorvância de células tratadas vs. de controlo não tratadas. O Composto 1 inibiu potencialmente a proliferação das células MV4;11 de modo dependente da dose com EC₅₀ = 13 nM. Embora efeitos na proliferação dependentes da concentração semelhantes tenham sido observados com células RS4;11, estas eram aproximadamente 24 vezes menos sensíveis ao Composto 1 (EC₅₀ = 315 nM). O efeito antiproliferativo do Composto 1 foi também testado nas células mutantes FLT3 ITD, MOLM13 e MOLM14 com concentrações EC₅₀ semelhantes às vistas com MV4:11 (EC50 ~6 nM). Estes dados sugerem que o Composto 1 é activo quer em células leucémicas FLT3 IDT quer WT, com o receptor activo componente sendo mais sensível à inibição.

Efeitos In Vitro do Composto 1 na Sinalização Mediada por FLT3 em Células Leucémicas

A actividade celular *in vitro* do Composto 1 foi investigada em duas linhas de células leucémicas humanas MV4;11 e RS4;11 com o estado mutacional FLT3 contrastante (Confirmado utilizando RT-PCR). Nestas experiências células MV4;11 (ITD) ou RS4;11 (WT) sem soro foram incubadas com uma concentração crescente de Composto 1, durante 3 horas, antes da lise das células. As células RS4;11 foram estimuladas com ligando FLT3 (100 ng/ml) durante 15 minutos. Todos os lisados de células foram imunoprecipitados com

anticorpo FLT3 anti-humano, resolvido por SDS-PAGE. Os imuno-blots foram tratados com anticorpo antifosfotirosina. As membranas foram também removidas e retratadas com anti-FLT3 para demonstrar uma carga igual de FLT3. As alterações em pFLT3 são registadas como percentagem da linha base (sem tratamento) utilizando densitometria. As células MV4;11 possuem uma mutação de duplicação em tandem interna (ITD, da sigla em inglês) no receptor FLT3, resultando em FLT3 activado. Levis M. et al., Blood, 99:3885-3891 (2002); O'Farrell A.M. et al., Blood, 101:3597-3605 (2003). Esta activação resulta em autofosforilação de FLT3 na ausência de estimulação de ligando exógeno. Células MV4;11 sem soro foram tratadas com Composto 1 durante 3 horas e os efeitos directos na activação do receptor FLT3 foram determinados através da análise do estado da sua fosforilação. A exposição de células MV4;11 a concentrações crescentes de Composto 1 inibiu potencialmente pFLT3 de modo dependente da dose com EC₅₀ entre 1-10 nM.

Embora os FLT3-ITD sejam prevalescentes em aproximadamente 20% dos blastos de doentes com AML, a maior parte das leucemias agudas expressam WT FLT3. Os efeitos do Composto 1 nas células leucémicas RS2;11 foram também investigados (FLT3 WT) a seguir ao ligando FLT3 exógeno (100 ng/ml, 15 minutos) para activar a fosforilação do receptor FLT3. As células RS4;11 FLT3 WT têm baixos níveis basais de pFLT3 na ausência de estimulação do ligando FLT3. O tratamento com o Composto 1 diminuiu os níveis de pFLT3 em células RS4;11. Contudo, comparativamente, foram necessárias concentrações mais elevadas para a modulação de

WT FLT3 vs. ITD. A inibição completa foi obtida com concentrações > 0,5 µM.

O Composto 1 Modula ERK e STAT5, Alvos a Jusante da Inibição de FLT3

Para caracterizar ainda mais os efeitos do Composto 1 na inibição de FLT3, foi investigada a modulação de alvos a jusante de FLT3, ou seja, STAT5 e ERK, que são proteínas chave na sobrevivência e proliferação das células. As células MV4;11 foram tratadas com concentrações crescentes de Composto 1 durante 3 horas e processadas por citometria de fluxo e Western blot para a detecção de pERK e p-STAT5. As alterações em pERK e pSTAT5 são relatadas como percentagem da linha base (sem tratamento). Em células MV4;11, devido à sinalização activa de FLT3, as células têm elevados níveis basais de pERK e pSTAT5. O Composto 1 inibiu a fosforilação de ERK e STAT5 de modo dependente da dose. Observou-se uma inibição substancial de pERK e pSTAT5 (>50%) com concentrações > 0,1 µM (fluxo citométrico e Western blot). Os efeitos inibidores do Composto 1 em pERK e pSTAT5 eram mais potentes em MV4;11 em comparação com células RS4;11 estimulada pelo ligando FLT3.

O Composto 1 Inibe a Produção de VEGF Autócrino em Células MV4;11 *In Vitro*

Para se verificar o efeito do Composto 1 na produção de VEGF *in vitro*, foi realizado um teste ELISA nos sobrenadantes da cultura de MV4;11. Nestas experiências as

células MV4;11 foram desenvolvidas em cultura em FBS a 10% contendo meio com concentrações crescentes (0 - 1 µM) de Composto 1 durante 48 horas. Na ausência de tratamento com fármaco, as células MV4;1 excretam VEGF substancial (180 pg/ml), enquanto que o Composto 1 inibiu a produção de VEGF de modo dependente da dose, com um EC₅₀ entre 0,001 e 0,01 µM e a inibição completa a concentrações de > 0,5 µM.

O Composto 1 Modula da Sinalização de FLT3 In Vivo

Para examinar a modulação alvo *in vivo*, ratos tendo o tumor MV4;11 (no estágio 300-500 mm³) foram administrados com Composto 1 (10 mg/kg/d) ou veículo durante 5 dias. Os tumores foram ressecados no dia 5 às 4, 8, 24 e 48h após a dose, pulverizados e imediatamente rapidamente congelados (-70°C). Os tumores que foram recolhidos após pontos de tempo seleccionados, foram homogeneizados e analisados em relação aos níveis de pFLT3 e pSTAT5 através de IP/Western blot. Para a modulação de pFLT3 ou pSTAT5: os lisados de tumor foram imunoprecipitados com anticorpo anti-humano FLT3 ou anti-STAT5, resolvidos por SDS-PAGE. Os imunoblots foram tratados com anticorpo antifosfotirosina adequado. As membranas foram removidas e voltou a tratar-se com anti-FLT3 ou anti-STAT5 para determinação da proteína total FLT3 ou STAT5 como controlos de carga. Observaram-se reduções significativas em pFLT3 e pSTAT5 tão cedo como 4 horas após a dose quer com dose única quer com doses múltiplas de Composto 1, sem efeitos na proteína total FLT3 ou STAT5. A fosforilação quer de FLT3 quer de STAT5 diminuiu

relativamente à linha base atingindo uma inibição máxima de ~90% às 8 horas após a dose e permaneceu suprimida durante 24 horas (~85% de inibição). O fosfo-FLT3 voltou para mais próximo dos níveis da linha base, enquanto o p-STAT5 estava ainda inibido (~60% de inibição) 48 horas após a dose. As diminuições dos níveis de pERK foram também observados, indicando bloqueamento da sinalização de FLT3 a jusante.

Estudos de Eficácia *In Vivo***Efeitos de Resposta à Dose do Composto 1 em Tumores MV4;11 e RS4;11 *In Vivo***

Para se certificar se os efeitos *in vitro* do Composto 1 se correlacionam com a inibição do crescimento tumoral *in vivo*, a eficácia do Composto 1 foi examinada em relação a xenoenxertos de tumor MV4;11 ou RS4;11 em ratos SCID-NOD. Os ratos foram implantados s.c. com células do tumor e os tratamentos com Composto 1 foram iniciados quando os tumores tinham 200–300 mm³. Nos estudos de eficácia de resposta à dose, o Composto 1 foi administrado oralmente numa gama de dose de 1 – 30 mg/kg/d para os tumores MV4;11 e 10 – 150 mg/kg/d para os tumores RS4;11.

O Composto 1 era altamente potente contra tumores MV4;11, revelando um bom efeito de resposta à dose com uma inibição de crescimento tumoral significativa para doses > 5 mg/kg/d (FIGURA 2). Doses de 30 mg/kg/d induziram regressão do tumor (9/10 respostas do tumor), que consistia de respondedores quer parciais quer completos (1CR, 8PR).

Inibição modesta do crescimento do tumor foi observada a 1 mg/kg/d (23%) após 2 semanas de dosagem, e foi identificada como a dose eficaz estatisticamente mínima neste modelo ($p < 0,01$ vs. veículo). Em ratos tendo tumores RS4;11, o tratamento com o Composto 1 resultou na inibição do crescimento tumoral, contudo não se observaram regressões (FIGURA 3). Os efeitos inibidores do Composto 1 eram mais potentes contra os tumores MV4;11 em comparação com os tumores RS4;11, definido pelas respectivas doses eficazes mínimas em cada modelo (dia 8: 100 mg/kg/d; TGI 40%, $p < 0,01$ contra tumores RS4;11 vs. 1 mg/kg/d, TGI 23%, $p < 0,01$ contra tumores MV4;11).

Esquemas de Dose Alternada de Composto 1 são Igualmente Potentes

Os efeitos de doses intermitentes e cíclicas de Composto 1 contra tumores xenoenxertados MV4;11 foram também examinados (FIGURA 4). O Composto 1 foi administrado oralmente a 30 mg/kg/d diariamente, dia sim dia não (q.o.d.) ou ciclicamente, 7 dias sim, seguido de 7 dias não durante 2 ciclos (FIGURA 4). Similarmente à dosagem diária, os regimes de dosagem intermitentes produziram regressões dos tumores significativas no espaço de dias do tratamento com o fármaco (TGI >94%). Todos os três regimes resultaram numa actividade antitumoral equivalente (dia 29, $p > 0,05$) e o número de respostas visto com q.o.d. (6PR) e 7 dias sim/7 dias não (9PR) eram semelhantes às vistas com o tratamento diário (1CR, 9PR).

**O Composto 1 é Eficaz Contra Tumores Grandes
MV4;11**

Os efeitos do Composto 1 em tumores MV4;11 grandes de várias dimensões; 300, 500 ou 1000 mm³ foram também investigados. Tratamento com o Composto 1 (30 mg/kg/d) induziram regressão significativa em todos os tumores MV4;11 que era independente das dimensões dos tumores iniciais no início do tratamento (FIGURA 5). As regressões dos tumores eram evidentes no espaço de 3-5 dias de tratamento com fármaco. Todos os tumores tratados responderam (n=27), com 15% de respostas completas e 70% de respostas parciais. Os remanescentes 15% foram respostas menores ou permaneceram estáveis. A dosagem foi descontinuada após 50 dias. Nenhum tumor regrediu durante o tratamento de 50 dias, indicando que a resistência conta o Composto 1, não se desenvolveu. A durabilidade das respostas após descontinuação do tratamento foi também examinada. Um CR de aproximadamente 50% dos PRs foi durável durante 40 dias após a cessação da dosagem do Composto 1. Os dez tumores que regrediram (até 600-2000 mm³) foram retratados com 30 mg/kg/d de Composto 1 começando no dia de estudo 90 (40 dias após a cessação da dosagem) e continuou durante 60 dias. Todos os tumores responderam ao segundo ciclo do Composto 1 (2CR, 8 PR), indicando claramente a falta de resistência do tumor ao Composto 1.

Evolução Histológica da Actividade Biológica In Vivo

Adicionalmente ao volume do tumor e aos pontos finais da modulação alvo, leituras imuno-histoquímicas foram utilizadas como indicadores da actividade do fármaco. Foram avaliados a apoptose/necrose do tumor e a proliferação celular em tumores MV4;11 ou RS4;11 em ratos SCID-NOD tratados com 30 mg/kg de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (Composto 1) utilizando histologia e análises imuno-histoquímicas. Neste estudo, ratos SCID-NOD tendo tumores MV4;11 s.c. ($n = 3-5/\text{grupo}$) foram tratados quer com Veículo quer com Composto 1 a 30 mg/kg/d durante 5 dias. Os tumores foram ressecados nos dias 2-5. Tumores embutidos em parafina foram quer corados com hematoxilina e com eosina quer imunocorados com KI67 (marcador de proliferação), pERK (marcador farmacocinético mecanístico), caspase-3 separada (para apoptose) ou PARP (para apoptose) (com coloração de contador de hematoxilina). Os efeitos temporais da administração do Composto 1 (30 mg/kg/dia) foram investigados em tumores MV4;11 após 1 a 5 doses. A avaliação morfológica utilizando coloração H&E, revelou que os tumores tratados com veículo consistiam de células tumorais MV4;11 com assinalável hiperplasia mielóide hipercelularmente indicativa. No grupo de tratamento com veículo as células tumorais foram fortemente coradas com KI67 indicando uma composição de tumor com células altamente proliferativas. Às 24 horas após doseamento, os tumores tratados com Composto 1 demonstraram uma redução em células densamente empacotadas e

consistiam de áreas dispersas de células apoptóticas/necróticas (dia 1). As áreas de apoptose/necrose eram mais pronunciadas após 5 doses com áreas significativas de tumor não viável coincidente com a coloração com KI67. A modulação alvo foi confirmada *in vivo* a partir de coloração imuno-histoquímica de pERK. O fosfo-ERK foi significativamente diminuído em tumores tratados com Composto 1 durante o período de doseamento de 5 dias corroborando as análises Western de pERK em tumores. O Composto 1 indiziou apoptose, evidenciada pela caspase-3 activada aumentada e pela coloração de PARP separado em tumores no dia 5 em comparação com controlos tratados com veículo. Também se examinou a imuno-histoquímica dos tumores RS4;11 a seguir a tratamento com 30 mg/kg de Composto 1. Os tumores RS4;11 ($n = 3-5$ / grupo) foram tratados com quer com Veículo quer com Composto 1 a 30 mg/kg/d. Os tumores foram ressecados nos dias 9. Tumores embutidos em parafina foram quer corados com Hematoxilina e Eosina quer imunocorados com KI67, ou pERK (tal como descrito atrás). Efeitos semelhantes a nível da celularidade e da proliferação diminuídas assim como pERK reduzido foram evidenciados em tumores RS4,11 tratados com o Composto 1 (30 mg/kg/d).

Adicionalmente, foi avaliada a histologia de tumores que foram definidos como de resposta parcial (>50% de inibição de tumor) ou completa (sem massa de tumor palpável). Nestes estudos, ratos SCID-NOD tendo tumores MV4;11 s.c. ($n = 3-5$ / grupo) foram tratados quer com Veículo quer com Composto 1 a 30 mg/kg/d. Tumores tratados com Veículo foram ressecados no dia 15 e os tumores

tratados com Composto 1 foram ressecados no dia 89 (50 doses diárias de Composto 1 + 39 dias sem tratamento). Tumores embutidos em parafina foram quer corados com Hematoxilina e Eosina quer imunocorados com KI 67 (com coloração de contador de hematoxilina). Os respondedores completos estavam totalmente isentos de células tumorais MV4;11, apresentando apenas reminescências de necrose e/ou tecido cicatricial. Em respostas parciais, bolsas de células tumorais proliferativas positivas a KI67 foram observadas na periferia dos tumores.

Composto 1 Prolonga o Tempo de Sobrevida de Ratos Tendo Células de Leucemia Humana Disseminadas

A eficácia do Composto 1 foi testada no modelo de leucemia MV4;11 em que células foram inoculadas na veia da cauda de ratos SCID-NOD (FIGURA 6). Neste modelo as células MV4;11 disseminaram-se para a medula óssea (BM, da sigla em inglês), mimetando patologicamente um padrão de doença semelhante à leucemia humana. Os ratos foram injectados com células MV4;11 no dia 1 e os tratamentos com o Composto 1 (20 mg/kg, diariamente ou 7 dias sim/7 dias não, n = 10-12/grupo) foram iniciados no dia 23, após células MV4;11 enxertadas na BM. Ratos de controlo (tratados com veículo) tipicamente ficam com parálise dos membros posteriores como consequência das células tumorais se infiltrarem na BM, com um tempo de sobrevida médio (MST, da sigla em inglês) de 51 dias (FIGURA 6). Em estudos de sobrevida, o tratamento diário com o Composto 1 (dias 23-100) atrasava significativamente o tempo para a progressão da doença (MST

= 134 dias) em comparação com controlos tratados com veículo (MST = 51 dias) ($p < 0,0001$), demonstrando um aumento do tempo de vida (ILS, da sigla em inglês) de 163% (FIGURA 6). Surpreendentemente, com o tratamento com o Composto 1 diariamente, 4 ratos foram sobreviventes de longo prazo (MST > 160 dias). Análises histológicas e citometria de fluxo foram utilizadas para quantificar a % de enxerto das células MV4;11 na BM. Nas análises de citometria de fluxo, células humanas MV4;11 foram identificadas na BM do rato com um anticorpo anti-humano HLA-A,B,C que se liga a um epítopo no MHCl humano. Nos ratos tratados com veículo, aproximadamente 2-19% do total das células BM isoladas consistia de células MV4;11 enxertadas (dia 51). Isto foi também corroborado por imuno-histoquímica com um anticorpo de mitocôndria humana que provoca coloração das células MV4;11 identificando as células humanas na matriz de BM do rato. O Composto 1 doseado diariamente (20 mg/kg) ao longo de 25 dias reduziu significativamente a carga leucémica (< 1% de células MV4;11 em BM) vs. veículo de tratamento. É interessante que os ratos sobreviventes após tratamento com o Composto 1 não mostravam imuno-histoquimicamente evidência de células tumorais (visto como ausência de células anti-humanas mitocondriais positivas no dia 167) na BM e foram definidos como "curas". O doseamento cíclico de Composto 1 (7 dias sim/7 dias não, 5 ciclos) resultou também num aumento significativo dos tempos de sobrevivência (MST = 118 dias, ILS 131% vs. veículo, $p = 0,0001$), mas não era tão eficaz como o regime diário ($p = 0,007$, FIGURA 6).

**Eficácia do Composto 1 no Tratamento de Linhas de
Células de Cancro da Próstata**

Dado que o Composto 1 tem selectividade de cinase multialvo em relação aos receptores de tirosina cinase de Classe III, IV e V (RTKs), a actividade do Composto 1 foi examinada num modelo metastático de cancro da próstata. A eficácia antitumoral do Composto 1 foi avaliada utilizando tumores PC-3M que expressam RTKs chave VEGFR e FGFR que são inibidos pelo Composto 1. Foi demonstrado que as células PC-3M metastizavam para os ossos, e este modelo foi assim utilizado para investigar a actividade do Composto 1 num modelo de xenoenxerto metastático experimental de cancro da próstata humano em ratos nus.

Linhos de Células. A linha de células PC-3M de próstata humana metastática expressando null p53, del PTEN, VEGFR, FGFR e transfectada estavelmente com um constructo de luciferase foi obtida sob licença da Xenogen.

Estudos de Eficácia In Vivo. Ratos nus macho (nu/nu) (4-6- semanas de idade, 18-22 g) foram obtidos na Charles River (Wilmington, MA) e aclimatados durante uma semana num recinto sem patogéneos antes do inicio do estudo. Os animais receberam ração para roedores estéril e água ad libitum e foram colocados em gaiolas com o topo em filtro estéreis com ciclos de 12 horas de luz/escuridão. Todas as experiências foram realizadas segundo as linhas de orientação da Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International.

Modelo metastático dos ossos PC-3M luc. Células PC-3M-luc da linha de células de cancro da próstata humano ($1,5 \times 10^6$ células) estavelmente transfectadas com um constructo de luciferase foram injectadas através de injecções intracardíacas. Imagiologia bioluminescente (sistema de imagiologia IVIS® da Xenogen) foi utilizada para monitorizar não invasivamente o crescimento *in vivo* e a metástase de tumores PC-3M-luc após inoculação das células. Quase todos os animais injectados com células tumorais PC-3M-luc desenvolveram lesões da próstata, que estavam principalmente localizadas no fémur e mandíbulas. Tratamentos com Composto 1, taxol, ou veículo (n=7/grupo) foram iniciados 4 semanas após a inoculação das células (dia 0 do estudo). Os ratos foram monitorizados diariamente e foram eutanizados quando moribundos.

Informação de grupo.

A dosagem foi iniciada 4 semanas após a inoculação das células (dia 0 do estudo)

1. Veículo (n=8)
2. Composto 1, 50 mg/kg, p.o. (n=7)
3. Taxol, 15 mg/kg, i.p., 3 vezes por semana (n=7)

Pontos finais. Eficácia (imagiologia em tempo real de tumores *in vivo* utilizando o sistema de imagiologia IVIS® da Xenogen).

Imuno-histoquímica. Amostras de ossos (fémures, mandíbulas) foram descalcificadas (ProtocolTM, Fischer Diagnostics, Middletown, VA). Blocos de parafina foram seccionados até uma espessura de 4 mm e colocados em lamelas de vidro carregadas positivamente. Os tecidos foram corados com hematoxilina e eosina para morfologia do tecido e identificação das células PC-3M nos ossos.

Ratos nus machos inoculados com células PC-3M-luc através de injecção intracardíaca apresentaram um crescimento disseminado das células PC-3M após inoculação intercardíaca tal como detectado por imagiologia de corpo inteiro em série de células tumorais PC-3M-luc *in vivo* e por avaliações histológicas (FIGURA 7). Às quatro semanas após inoculação das células PC-3M em ratos nus, imagiologia de corpo inteiro demonstrou o desenvolvimento do crescimento celular e de lesões metastáticas localizadas principalmente na cabeça e nas áreas abdominais, o que foi confirmado por avaliação histológica que as células PC-3M metastizam para os ossos (fémur e mandíbulas). Nalguns ratos, as células tumorais foram também detectadas nas áreas torácicas, que são possivelmente algumas células residuais a seguir à inoculação intracardial.

O tratamento com o Composto 1 foi iniciado quatro semanas após a inoculação das células, uma vez os tumores terem metastizado para os ossos (dia 0). A presença de tumores nos ossos foi também confirmada através de

imagiologia de corpo inteiro dos ratos. O Composto 1 foi administrado oralmente com uma dose de 50 mg/kg/dia e demonstrou uma tendência para inibir o crescimento metástatico das células tumorais PC-3M luc em ratos nus em comparação com o tratamento com veículo, tal como determinado por varrimento em série dos ratos. Os ratos tratados com o Composto 1 apresentaram uma diminuída densidade de fotões média (inibição) em comparação com ratos tratados com veículo nos dias 0, 8 e 15/18. A inibição do crescimento de tumores com o tratamento com o Composto 1 foi também avaliada utilizando a inibição mediana das contagens de fotões (FIGURA 7). O tratamento diário com o Composto 1 (50 mg/kg/d) era também mais eficaz do que o tratamento com taxol (15 mg/kg) tal como mostrado na FIGURA 7. Não se observou diferença na eficácia do tratamento entre o tratamento com taxol e tratamento com veículo (FIGURA 7).

Sumário dos Resultados. Foi testada a eficácia do Composto 1 no tratamento de um tumor sólido que se metastizou para a medula óssea. Neste modelo, ratos nus foram inoculados intracardiacamente com células PC-3M-luc. As células PC-3M-luc são uma linha de células de cancro da próstata humano que foi estavelmente transfetada com luciferase. Por inoculação, as células PC-3M-luc disseminaram-se para múltiplos órgãos incluindo os ossos. As células tumorais disseminadas foram visualizadas utilizando equipamento de imagiologia *in vivo* comercialmente disponível na Xenogen, Corp.

Ratos nus foram inoculados intracardiacamente com células PC-3M-luc com $1,5 \times 10^6$ células. Quatro semanas após inoculação, a dosagem foi iniciada (dia 0) com veículo (n=8), Composto 1 a 50 mg/kg, p.o., diariamente (n=7) e taxol a 15 mg/kg, i.p., três vezes por semana, (n=7). As linhas de células PC-3M-luc foram adquiridas na Xenogen e os ratos foram sujeitos a imagiologia utilizando o sistema de imagiologia IVIS® da Xenogen.

Nos ratos tratados com o Composto 1 os ratos mostraram uma tendência para uma diminuída contagem de fotões em relação aos ratos tratados com veículo e com taxol. As contagens de fotões medianas e um gráfico gerado a partir das áreas da cabeça e das pernas dos ratos são mostrados na FIGURA 7. Esta experiência estabelece que o tratamento com o Composto 1 inibe potencialmente o crescimento das células PC-3M-luc que se tinham disseminado para os ossos.

Eficácia do Composto 1 no Modelo de Tumor de Mama de Murídeo 4T1

O estudo seguinte avaliou a dosagem oral diária de Composto 1 no modelo de tumor de mama de murídeo 4T1 metastático espontâneo.

Ratos fêmea BALB/c, com 9 semanas de idade (Charles River, Wilmington, MA), foram implantados com $2,5 \times 10^5$ células 4T1 (células derivadas de um nódulo no fígado

metastático) subcutaneamente no flanco direito. O tratamento começou 13 dias mais tarde quando o volume médio dos tumores era de 140 mm³. Este foi designado como o dia 1 do estudo. O Composto 1 foi formulado como uma solução em água purificada e administrado por gavagem oral diariamente durante 17 dias.

Os grupos de tratamento incluíam, (n=10/grupo): Veículo (água); Cinco Grupos de Composto com doses de 10, 30, 60, 100 e 150 mg/kg.

Os parâmetros dos estudos incluíram crescimento do tumor, observações dos animais e enumeração das metástases no pulmão e no fígado. Comparações aos pares de grupos de tratamento vs. veículo foram avaliadas utilizando o teste t de Student. As diferenças entre os grupos de tratamento foram comparadas utilizando um sistema ANOVA não paramétrico (Kruskal-Wallis) seguido do método de Dunn para comparações aos pares múltiplas. O estudo foi terminado no dia 18, com base no volume do tumor do grupo do veículo.

Sumário dos Resultados. O crescimento de tumor primário foi estatisticamente significativamente inibido em todos os grupos excepto no da dose de 10 mg/kg 4 dias após o início do tratamento. A inibição máxima do crescimento do tumor para as doses de 10, 30, 60, 100 e 150 mg/kg foi de 32, 45, 50, 74 e 82%, respectivamente (Figura 25, Tabela X). Uma comparação entre os grupos revelou diferenças ($p <$

0,05) entre as doses de 10, 30 e 60 mg/kg versus a dose de 150 mg/kg e entre os grupos de 10 e 100 mg/kg.

As metástases nos pulmões e no fígado foram enumeradas através de inspecção visual em tecidos removidos no dia 18. Os ratos de controlo tratados com veículo não desenvolveram tumores nos pulmões na extensão observada em estudos prévios (diminuição de ~50%) o que influenciou as comparações estatísticas. As metástases nos pulmões foram reduzidas por administração de Composto 1 versus o veículo, especificamente: no grupo de dose de 150 mg/kg, em 91% e nos tratamentos com 30, 60 e 100 mg/kg reduziu-se o número de nódulos tumorais no fígado em $\geq 77\%$ versus o controlo (Tabela Y).

Tabela X. Sumário da Inibição do Crescimento do Tumor

Principal 4T1 pelo Composto 1

Dose de Composto 1 no dia 18	Volume Médio de Tumor (mm^3)	DP	Tratado/ Controlo no dia 18	% inibição máxima (dia de estudo)	Valor p vs. veículo
Veículo (n=9)	2248	780			
10 mg/kg (n=8)	1798	513	0,80	32 (d11)	0,187
30 mg/kg (n=10)	1246	318	0,55	45 (d18)	0,002
60 mg/kg (n=10)	1248	295	0,56	50 (d11)	0,002
100 mg/kg (n=10)	624	184	0,28	74 (d14)	<0,001
150 mg/kg (n=9)	402	95	0,18	82d(18)	<0,001

Tabela Y. Eficácia do Composto 1 em Metástases Espontâneas no Fígado e nos Pulmões 17 dias após dosagem

Dose de Composto 1	a) Metástases no fígado				b) Metástases nos pulmões			
	Incidência	# Metástases média ± DP	%inibição vs. veículo	Valor p vs. veículo	Incidência	# Metástases média ± DP	%inibição vs. veículo	Valor p vs. veículo
Veículo (n=9)	8/9	18 ± 15	n/a	n/a	9/9	27 ± 154	n/a	n/a
10 mg/kg (n=8)	7/8	22 ± 32	0	0,810	8/8	36 ± 32	0	0,926
30 mg/kg (n=10)	6/10	3 ± 4	83	0,014	10/10	26 ± 26	0	0,926
60 mg/kg (n=10)	5/10	1 ± 1	94	0,002	10/10	24 ± 11	11	0,606
100 mg/kg (n=10)	1/10	4 ± 13	77	0,010	10/10	24 ± 30	13	0,756
150 mg/kg (n=9)	0/9	0 ± 0	100	0,002	5/10	2 ± 3	91	<0,001

Em resumo, a eficácia da dosagem oral diária de Composto no modelo de tumor da mama em murídeo 4T1 foi confirmada nesta experiência. Observou-se uma significativa inibição do crescimento do tumor primário após 4 dias de tratamento. As doses de Composto 1 de 30, 60, 100 e 150 mg/kg inibiram o crescimento de tumor primário em 45%, 50%, 74% e 82%, respectivamente. O tratamento com Composto 1 resultou numa inibição significativa das metástases espontâneas nos pulmões e no fígado. O número de metástases do fígado foi completamente inibido com a dose de 150 mg/kg e significativamente reduzido com as doses de 30, 60 e 100 mg/kg. As metástases nos pulmões foram reduzidas com significado estatístico (91% de inibição) com a dose de 150 mg/kg.

DISCUSSÃO

As vias para tornar alvo a sinalização da cinase intracelular anómala implicadas na proliferação de células tumorais podem romper os processos celulares e provocar a inibição do crescimento dos tumores. Isto foi exemplificado pela aprovação de dois agentes alvo de molécula pequena imatinib (Gleevec) em CML (Bcr-Abl) e tumores estromais gastrointestinais (c-Kit) e gefitinib (Irressa) em cancro do pulmão de célula não pequena avançado refractário ou metastático (EGFR). Druker B.J. Oncogene, 21:8541-8546 (2002); Giaccone G. Clin Cancer Res. 10:4233S-4237S (2004). Ambos os compostos têm como alvo defeitos moleculares específicos em células tumorais e este sucesso conduziu à

investigação em terapias com alvos moleculares para outras cinases oncogénicas, incluindo FLT3 15,20-23. As mutações no gene FLT3, são a alteração genética mais comum na AML, em que próximo de 35% de doentes têm mutações activadoras. As mutações FLT3 demonstraram conferir um fraco prognóstico clínico implicando, deste modo, o FLT3 como agente terapêutico em AML. Thiede C. et al., Blood, 99:4326-4335 (2002); Schnittger S, et al., Blood, 2002;100:59-66 (2002).

O Composto 1 é um inibidor de cinase multialvo com potência nanomolar contra RTKs de classe III, IV e V envolvidos na proliferação dos tumores e na angiogénesse. Ensaios bioquímicos de cinase demonstraram que o Composto 1 tem uma potente actividade contra FLT3 (IC_{50} de 1 nM). A actividade do Composto 1 em duas linhas de células leucémicas foi caracterizado com estado FLT3 contrastante, MV4;11 (FLT3 ITD) e RS4;11 (FLT3 WT). Foi demonstrado que o Composto 1 reduzia a fosforilação do FLT3 de maneira dependente da dose, confirmando a actividade molecular nas células. *In vitro*, o Composto 1 bloqueou as moléculas de sinalização a jusante subsequente nas vias mitogénicas de MAPK e STAT5, ambos reguladores chave nas vias proliferativas das células. Interessantemente, a actividade na modulação alvo de FLT3 foi mais pronunciada nas células MV4;11 do que nas RS4;11 como foram os efeitos do Composto 1 em ensaios de citotoxicidade/proliferação das células. Efeitos diferenciais semelhantes contra FLT3-ITD e FLT3 do tipo selvagem foram relatados para outros inibidores de FLT3. Pode-se concluir que as células FLT3 ITD MV4;11

possuem sinais activos constitutivamente (Ras, STAT5) que accionam a proliferação das células e diferem das células FLT3 WT (RS4;11) que podem sustentar o crescimento independentemente da activação do FLT3 e/ou podem apoiar-se noutras vias oncogénicas. Minami Y. et al., Blood, 102:2969-2975 (2003); Kiyoi H. et al., Oncogene, 21:2555-2563 (2002); Spiekermann K. et al., Clin Cancer Res. 9:2140-2150 (2003).

Os resultados dos estudos *in vivo* demonstraram que o Composto 1 tinha uma potente actividade contra tumores sólidos e modelos de BM disseminada de leucemia. A actividade molecular do Composto 1 em modelos pré-clínicos foi avaliada utilizando parâmetros PD para estudar a extensão e a duração da modulação alvo. O Composto 1 demonstrou que regulava substancialmente para baixo quer pFLT3 quer pERK em tumores MV4;11. A modulação alvo (pFLT3) foi observada às 4 horas e foi mantida em tumores até às 24 horas a seguir a uma dose única ou doses múltiplas de Composto 1. Os efeitos biológicos eram também evidentes a partir da histopatologia do tumor, em que pERK, respostas de proliferação e apoptose diminuídos em tumores foram observados no espaço de 1-2 dias de tratamento com fármaco. Nos xenoenxertos de tumores sólidos de MV4;11, as regressões dos tumores foram também manifestadas no espaço de dias de tratamento com fármaco. É possível que potentes efeitos inibidores de Composto 1 no modelo MV4;11 se possam obter a partir da inibição directa de FLT3 em combinação com a inibição de outros RTKs. Os dados (RT-PCR, não

mostrados) indicam que as células MV4;11 também expressam VEGFR1, cKit, PDGFR β , FGFR1 e CSF-1R, todos RTKs potencialmente inibidos pelo Composto 1. O Composto 1 tem uma actividade < 10 nM contra as cinases VEGF 1/2/3 e os dados demonstram claramente que o Composto 1 pode inibir os níveis de VEGF autócrino em culturas *in vitro* de células MV4;11. *In vivo*, a inibição autócrina ou parácrina de VEGF ou FGF excretado pelas células tumorais ou células estromais do tumor (incluindo células endoteliais) pode inibir a proliferação e a sobrevivência destas células. Ferrara N. et al., Nat Med., 9:669-676 (2003); Compagni A. et al., Cancer Res. 60:7163-7169 (2000); Carmeliet P. Nat Med., 9:653-660 (2003). Actividade adicional do Composto 1 em tumores sólidos pode surgir a partir dos seus efeitos potentes contra PDGFR β por recrutamento de pericitos impactante e maturação de vasos sanguíneos durante a angiogéneses. Carmeliet P. Nat. Med. 9:653-660 (2003); Ostman A. Cytokine Growth Factor Rev., 15:275-286 (2004). No modelo AML BM, demonstrou-se que o Composto 1 melhorava a sobrevivência dos ratos e em alguns ratos erradicava a doença. Isto representa o potencial do Composto 1 para erradicar quer os blastos circulantes quer a doença da BM através de efeitos antiproliferativos directos ou regulação da angiogéneses da medula óssea, que pode desempenhar um papel na sobrevivência dos blastos. Carow C.E. et al., Blood, 87:1089-1096 (1996); Drexler H.G. Leukemia, 10:588-599 (1996).

Composto 1, foram estudados esquemas de administração de doses intermitentes e cílicos. Esquemas de dosagem alterada do Composto 1 demonstraram uma actividade semelhante em comparação com doses diárias de Composto 1, sugerindo o potencial de regimes de dosagem flexíveis em clínica. Doses múltiplas de Composto 1 foram capazes de suprimir continuamente o crescimento de tumores e verificou-se que quaisquer tumores recorrentes após a cessação do tratamento eram igualmente sensíveis ao re-tratamento com fármaco. Estas descobertas são relevantes se traduzidas no ajuste clínico, dado que se demonstrou que alguns doentes com AML têm recaídas com o tratamento com inibidores de cinase apesar do tratamento continuado. Fiedler W. et al., Blood, (2004); Cools J. et al., Cancer Res. 64:6385-6389 (2004). Mecanismos múltiplos incluindo metabolismo ou efluxo cellular (através da expressão de transportadores de fármaco, tais como a P-glicoproteína), ou mutações nos domínios de ligação de ATP dos locais activos do enzima que interferem com a ligação ao fármaco, demonstraram estar correlacionados com a resistência a inibidores de cinase. Bagrintseva K. et al., Blood, 103:2266-2275 (2004); Grundler R. et al., Blood, 102:646-651 (2003). O Composto 1 não é um substrato P-GP e as respostas duráveis ao longo do decurso do tratamento com fármaco podem implicar que o desenvolvimento de resistência pode ser evitado com o Composto 1.

O desenvolvimento clínico de inibidores de FLT3 (SU11248 PKC412, CEP-701, MLN518) para a AML está ainda nos

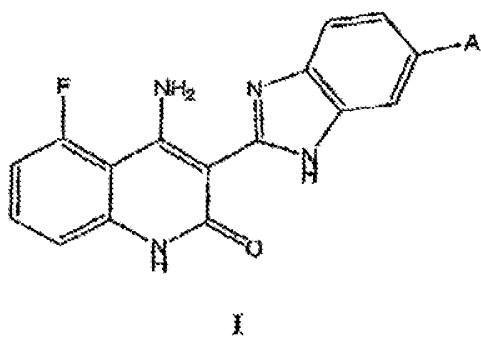
estágios iniciais. O'Farrell A.M. et al., Clin. Cancer Res. 9:5465-5476 (2003); Fiedler W. et al., Blood, (2004); Stone R.M. et al., Ann Hematol. 83 Suppl 1:S89-90 (2004); Smith B.D. et al., Blood, 103:3669-3676 (2004); DeAngelo D.J. et al., Blood, 102:65a (2003). A selecção de terapias de agente único ainda não produziu respostas significativas e o futuro desenvolvimento clínico dos inibidores de FLT3 em AML pode depender da combinação destes agentes quer com fármacos citotóxicos quer com outros agentes com alvos moleculares. Os dados registados aqui para o Composto 1, um potente inibidor de FLT3 com actividade adicional nos RTKs conhecidos como desempenhando papéis na patogénese da AML garante a sua avaliação clínica.

Outros compostos de Estrutura 1, tais como os Compostos de Estrutura IB e IC foram preparados tal como descrito atrás. Estudos utilizando estes compostos são realizados utilizando a metodologia descrita atrás para a 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona. Estes estudos mostrarão que estes compostos são também úteis no tratamento de tumores metastatizados incluindo tumores hematológicos, em ratos, seres humanos e outros sujeitos mamíferos.

Lisboa, 6 de Dezembro de 2011

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de um composto de Estrutura I, um tautómero do composto, um sal farmaceuticamente aceitável do composto, um sal farmaceuticamente aceitável do tautómero, ou uma sua mistura, na preparação de um medicamento para o alívio dos sintomas, ou a paragem da progressão do mieloma múltiplo num sujeito possuindo um tumor de mieloma múltiplo metastatizado



em que

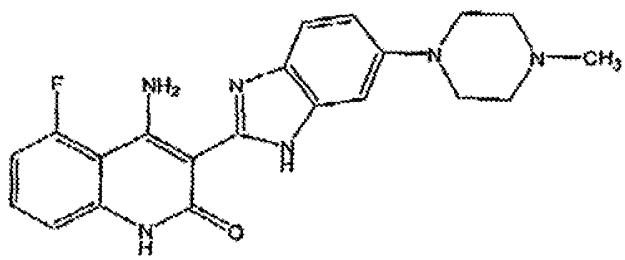
A é um grupo possuindo a Estrutura seguinte:



em que R¹ é seleccionado de grupos alquilo de cadeia linear ou ramificada possuindo de 1 a 6 átomos de carbono, e ainda em que, o crescimento de tumor de mieloma múltiplo metastatizado no sujeito é inibido após administração do composto de Estrutura I, do tautómero do composto, do sal

farmaceuticamente aceitável do composto, do sal farmaceuticamente aceitável do tautómero ou da sua mistura ao sujeito.

2. Utilização da reivindicação 1, em que R¹ é um grupo metilo, e o composto de Estrutura I tem a estrutura IA



IA

3. Utilização da reivindicação 1, em que o medicamento comprehende ainda um segundo agente.

4. Utilização da reivindicação 1, em que o sal lactato do composto de Estrutura I ou o seu tautómero é utilizado para preparar o medicamento.

5. Utilização de qualquer uma das reivindicações 1-4, em que o sujeito é um doente com mieloma múltiplo com translocação cromossómica t(4; 14).

7. Utilização de qualquer uma das reivindicações 1-4, em que o mieloma múltiplo expressa o receptor 3 do factor de crescimento do fibroblasto.

8. Utilização de qualquer uma das reivindicações 1-4, em que o mieloma múltiplo se metastatizou para um osso do doente.

9. Utilização de qualquer uma das reivindicações 1-4, em que o sujeito é um doente com mieloma múltiplo e o doente é um humano.

10. Utilização da reivindicação 3, em que o segundo agente é para o tratamento da osteoporose.

11. Utilização da reivindicação 9, em que o segundo agente é bifosfonato.

12. Utilização da reivindicação 3, em que o segundo agente é um agente anticancerígeno.

Lisboa, 6 de Dezembro de 2011

FIGURA 1

Tratamento com Composto 1 Demonstrou uma Contagem de Fotões Média Significativamente Inferior em Comparação com o Tratamento com Veículo

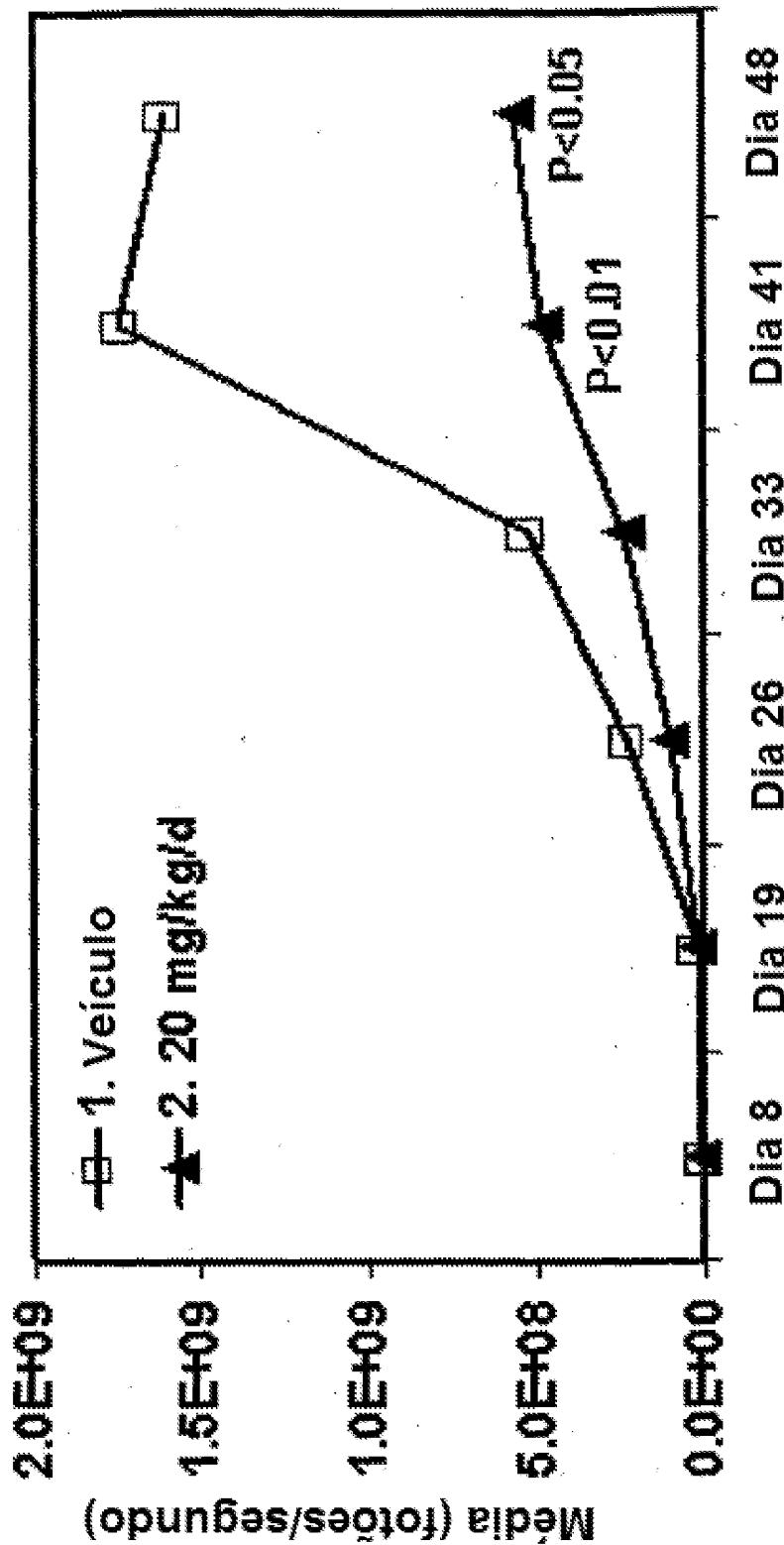


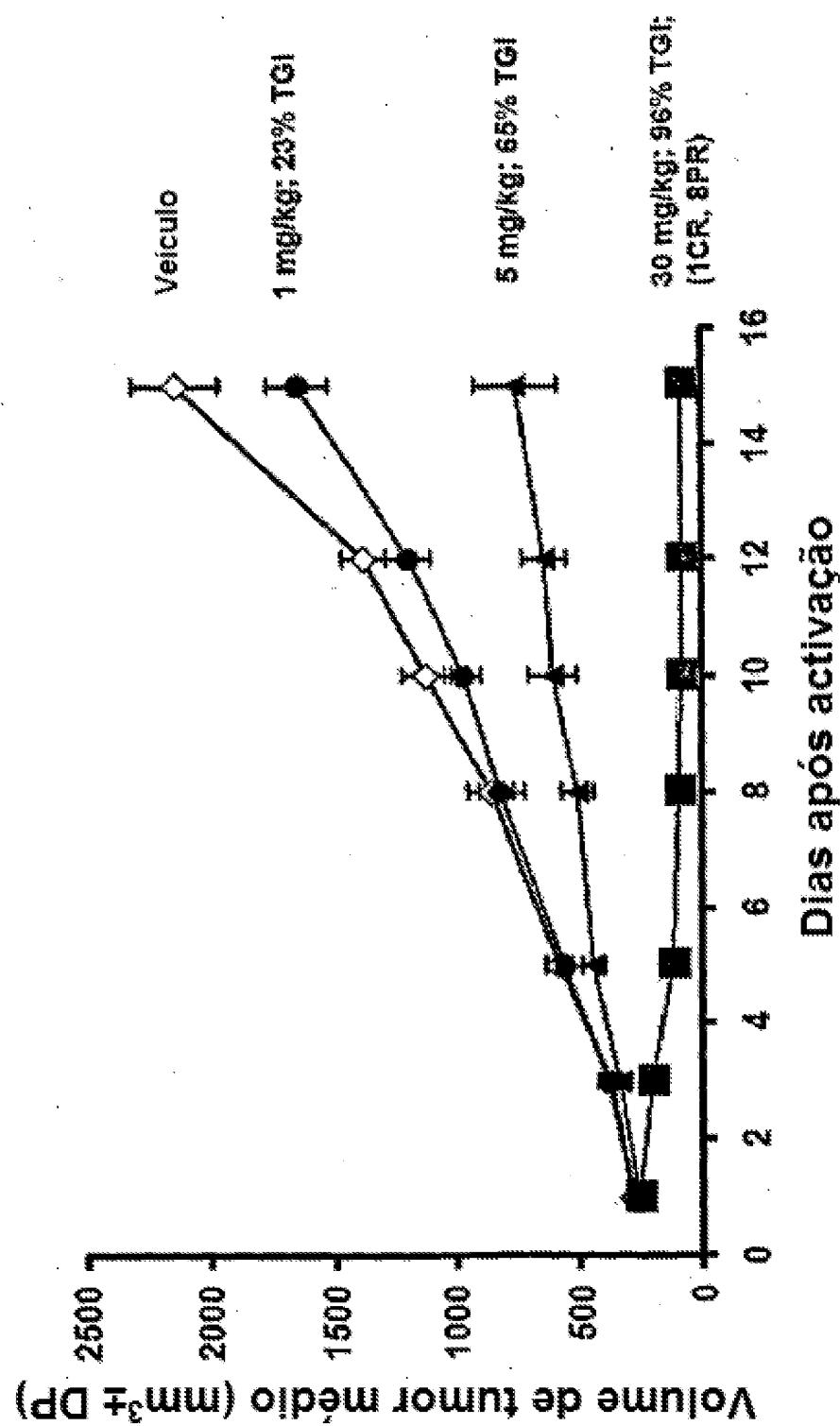
FIGURA 2

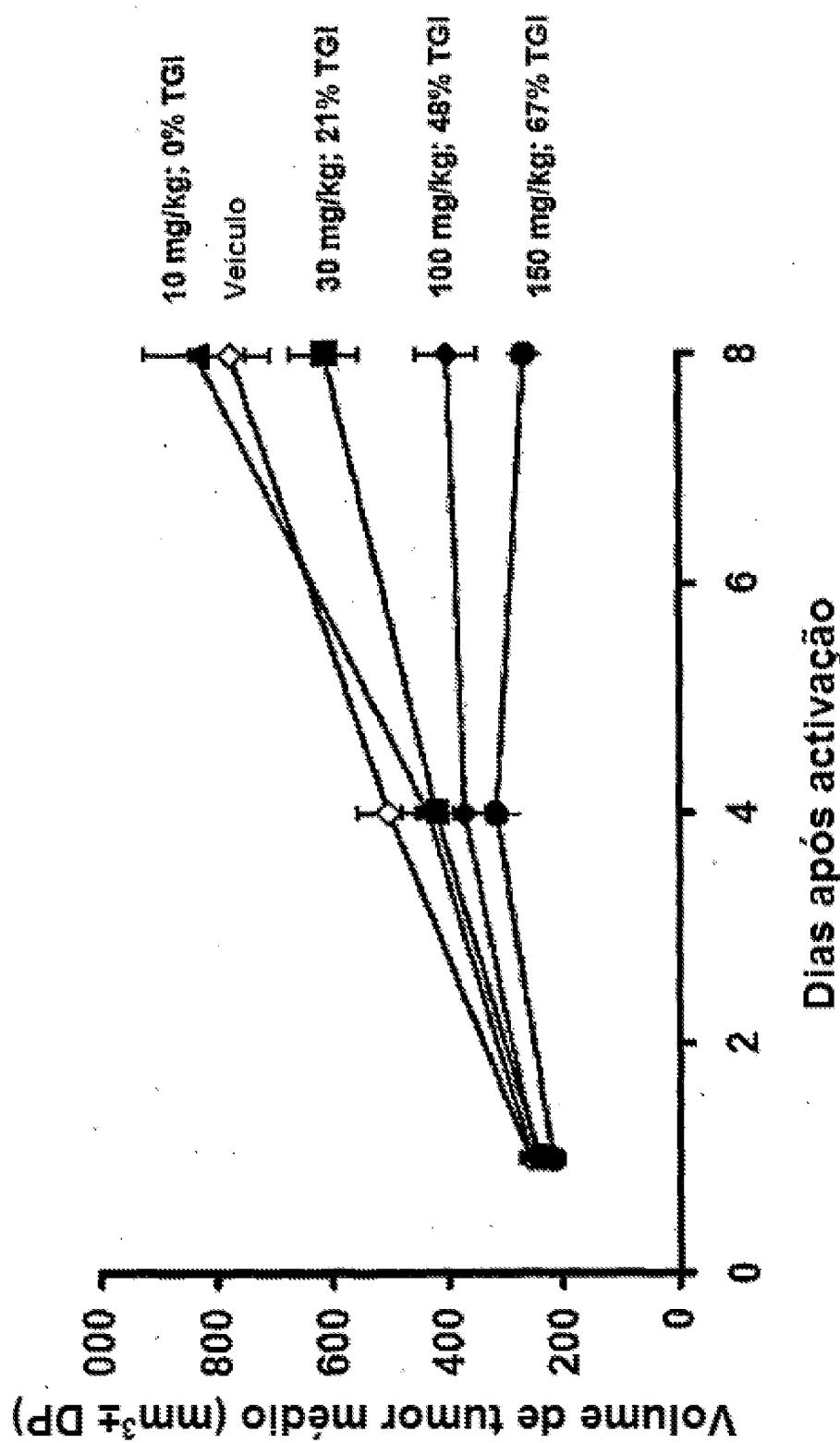
FIGURA 3

FIGURA 4

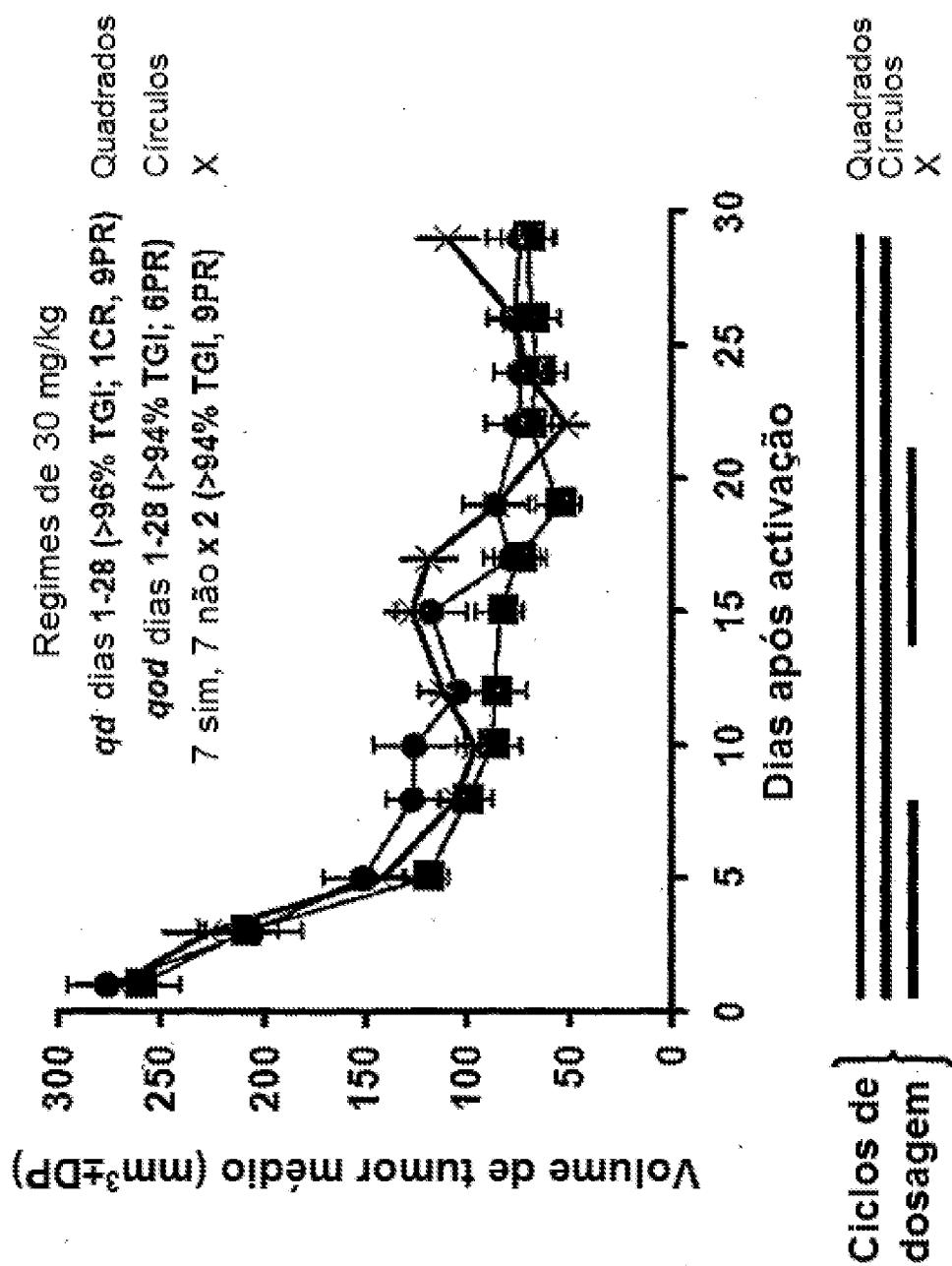


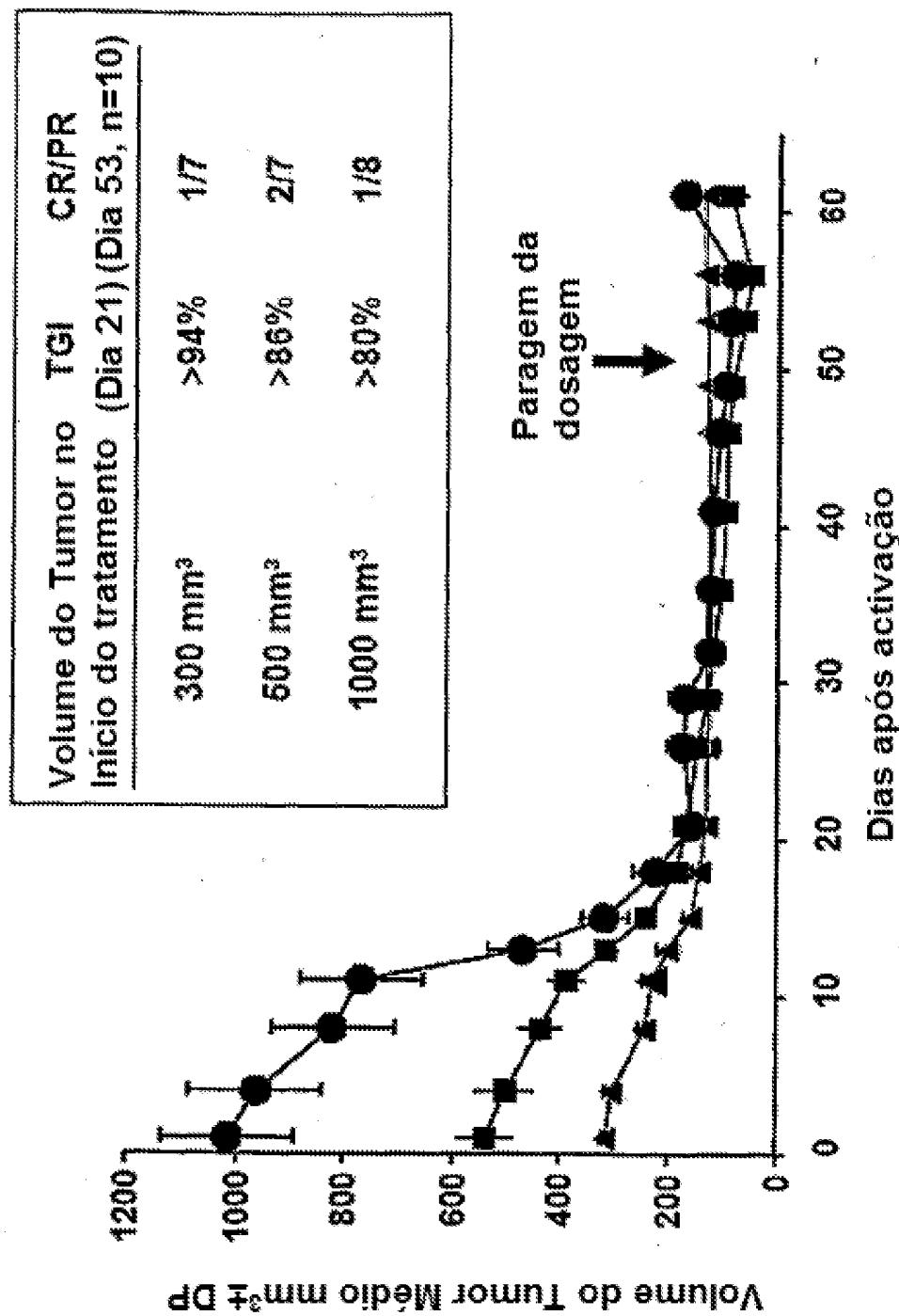
FIGURA 5

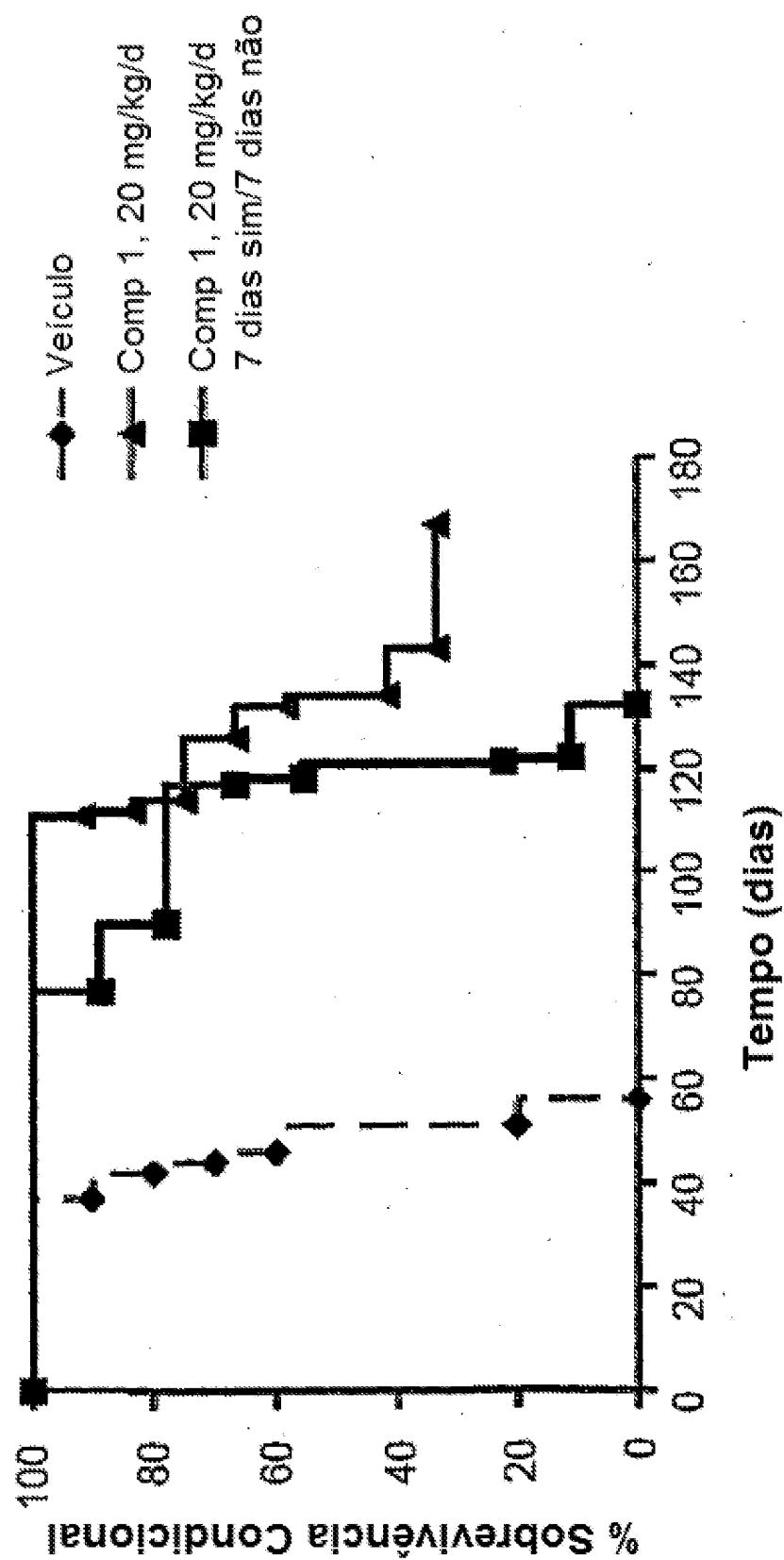
FIGURA 6

FIGURA 7

Imagiologia em tempo real de ratos (fotões/seg, Xenogen)
 (Contagem de Fotões Total na Cabeça e Áreas Abdominais)

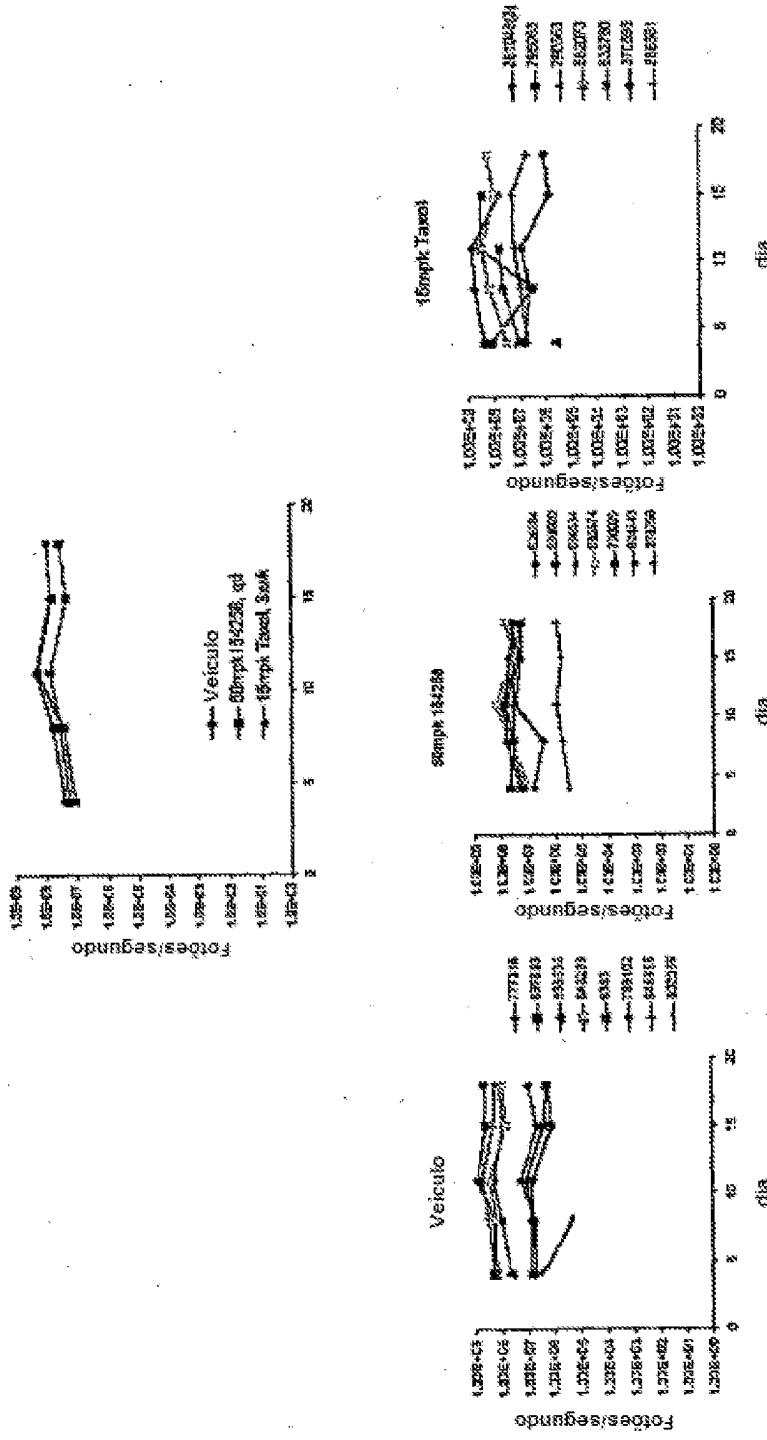
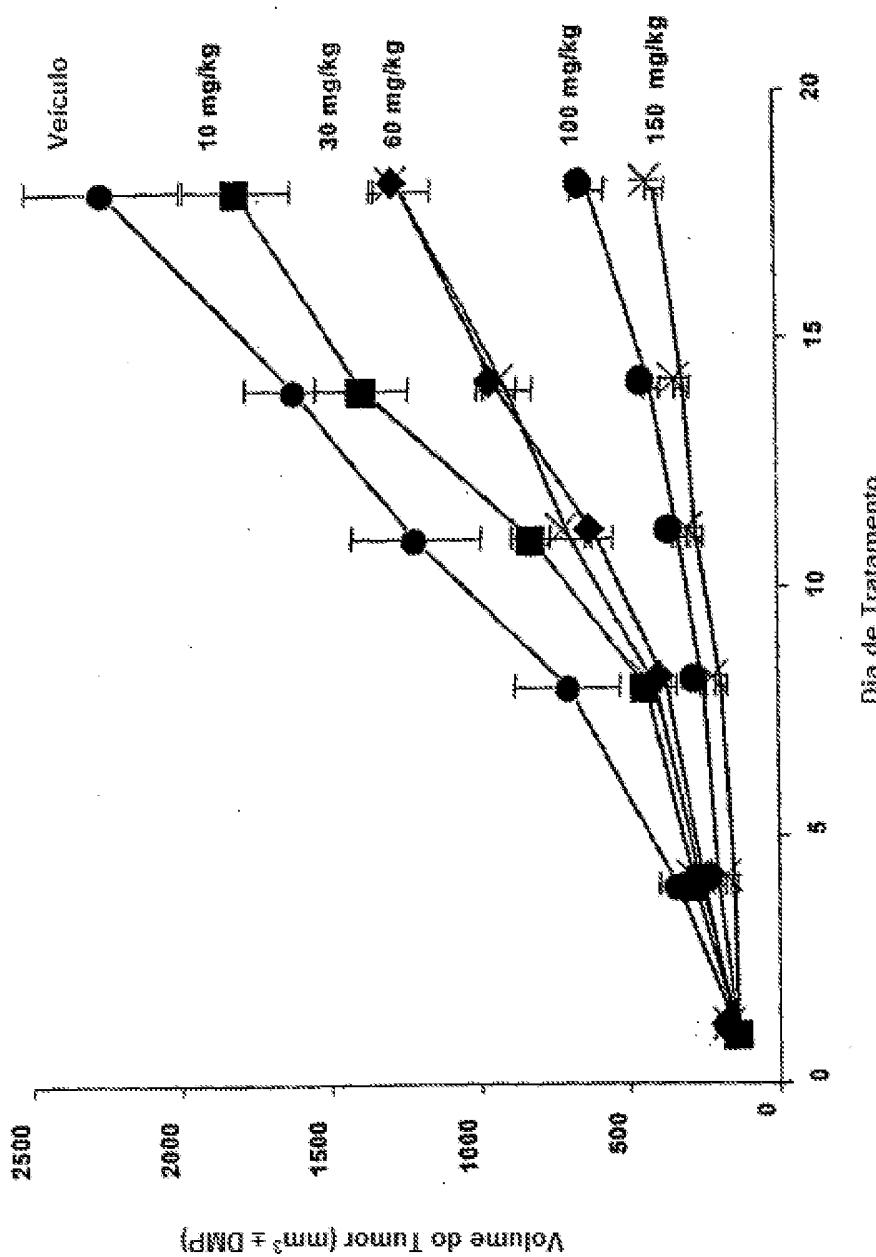


FIGURA 8

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- WO 0129025 A
- WO 0162251 A
- WO 0162252 A
- WO 0128993 A
- WO 9748694 A
- WO 9218483 A
- US 5801212 A
- JP 8028973 A
- JP 7043896 A
- JP 6009952 A
- JP 63258903 A
- EP 797376 A
- DE 2363459
- US 6605617 B
- US 6756383 B
- US 11611703 A
- US 20030028018 A1
- US 644055 A
- US 20040082535 A
- US 983174 A
- US 70632804 A
- US 200402220196 A
- US 982757 A
- US 982643 A
- WO 2005082340 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- FOLKMAN, J. *Scientific American*, 1996, vol. 275, 150-154
- LYMBOUSSAKI, A. *Vascular Endothelial Growth Factors and their Receptors in Embryos, Adults, and in Tumors*. Heartman Institute, 1999
- MUSTONEN, T. et al. *J. Cell Biology*, 1995, vol. 129, 895-898
- VAN DER GEER, P. et al. *Ann Rev. Cell Biol.*, 1994, vol. 10, 251-337
- ULLRICH, A. et al. *Cell*, 1990, vol. 61, 203-212
- SHIBUYA, M. et al. *Oncogene*, 1990, vol. 5, 519-525
- TERMAN, B. et al. *Oncogene*, 1991, vol. 6, 1877-1883
- APRELIKHOVA, O. et al. *Cancer Res.*, 1992, vol. 52, 746-748
- BLUME-JENSEN, P ; HUNTER, T. *Oncogenic K-Ras Signalling*. *Nature*, 2001, vol. 411, 355-355
- CARMELIET, P. *Manipulating Angiogenesis in Medicine*. *J. Intern. Med.*, 2004, vol. 255, 538-61
- ATTAL, M. et al. *N. Engl. J. Med.*, 1996, vol. 335, 91-97
- BARLOGIE, B. et al. *Blood*, 1997, vol. 89, 789-793
- KUEHL, W. M. et al. *Nat Rev Cancer*, 2002, vol. 2, 175-187
- AVET-LOISEAU, H. et al. *Blood*, 2002, vol. 99, 2185-2191
- FONSECA, R. et al. *Blood*, 2003, vol. 101, 4589-4575
- KEATS, J. J. et al. *Blood*, 2003, vol. 101, 1520-1529
- MOREAU, P. et al. *Blood*, 2002, vol. 100, 1579-1583
- CHANG, H. et al. *Br. J. Haematol.*, 2004, vol. 125, 64-66
- CHESI, M. et al. *Nat. Genet.*, 1997, vol. 16, 260-265
- CHESI, M. et al. *Blood*, 1998, vol. 92, 3025-3034
- PLOWRIGHT, E. E. et al. *Blood*, 2000, vol. 95, 992-998
- CHESI, M. et al. *Blood*, 2001, vol. 97, 729-736
- POLLETT, J. B. et al. *Blood*, 2002, vol. 100, 3819-3821
- LI, Z. et al. *Blood*, 2001, vol. 97, 2413-2419
- TRUDEL, S. et al. *Blood*, 2004, vol. 103, 3521-3526
- PATERSON, J. L. et al. *Br. J. Haematol.*, 2004, vol. 124, 595-603
- GRAND, E. K. et al. *Leukemia*, 2004, vol. 18, 962-966
- DRUKER, B. J. et al. *N. Engl. J. Med.*, 2001, vol. 344, 1031-1037
- DEMETRI, G. D. et al. *N. Engl. J. Med.*, 2002, vol. 347, 472-480
- SLAMON, D. J. et al. *N. Engl. J. Med.*, 2001, vol. 344, 783-792
- SMITH, B. D. et al. *Blood*, 2004, vol. 103, 3669-3676
- REDAELLI, A. et al. *Exper. Rev. Anticancer Ther.*, 2003, vol. 3, 695-710

- WEICK, J.K. et al. *Blood*, 1998, vol. 88, 2841-2851
- VOGLER, W.R. et al. *J. Clin. Oncol.*, 1992, vol. 10, 1103-1111
- GILLILAND, D.G. et al. *Curr. Opin. Hematol.*, vol. 9, 274-281
- NAKAO, M. et al. *Leukemia*, 1996, vol. 10, 1911-1918
- YOKOTA, S. et al. *Leukemia*, 1997, vol. 11, 1605-1609
- MCKENNA, H.J. et al. *Blood*, 2000, vol. 95, 3488-3497
- MACKAREHTSCHIAN, K. et al. *Immunity*, 1995, vol. 3, 147-161
- BLUME-JENSEN, P. et al. *Nature*, 2001, vol. 411, 355-365
- HAYAKAWA, F. et al. *Oncogene*, 2000, vol. 19, 624-631 [0019]
- TAKAHASHI, S. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, vol. 316, 85-92
- ZHANG, S. et al. *J. Exp. Med.*, 2000, vol. 192, 719-728
- ROSNET, O. et al. *Acta Haematol.*, 1996, vol. 95, 218-223
- STIREWALT, D.L. et al. *Nat. Rev. Cancer*, 2003, vol. 3, 650-665
- BROWN, P. et al. *Eur. J. Cancer*, 2004, vol. 40, 707-721
- YAMAMOTO, Y. et al. *Blood*, 2001, vol. 97, 2434-2439
- THIEDE, C. et al. *Blood*, 2002, vol. 99, 4326-4335
- ABU-DUHIER, F.M. et al. *Br. J. Haematol.*, 2001, vol. 113, 983-988
- SCHNITTGER, S. et al. *Blood*, 2002, vol. 100, 59-66
- O'FARRELL, A.M. et al. *Clin. Cancer Res.*, 2003, vol. 9, 5464-5476
- WEISBERG, E. et al. *Cancer Cell*, 2002, vol. 1, 433-443
- SMITH, B.D. et al. *Blood*, 2004
- KELLY, L.M. et al. *Cancer Cell*, 2002, vol. 1, 421-432
- GRIFFIOEN, A.W. ; MOLEMA, G. Angiogenesis: Potentials for Pharmacologic Intervention in the Treatment of Cancer, Cardiovascular Diseases, and Chronic Inflammation. *Pharmacol. Rev.*, 2000, vol. 52, 237-268
- FERRARA, N. VEGF: an Update on Biological and Therapeutic Aspects. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2000, vol. 11, 617-24
- KWABI-ADDO, B. ; OZEN, M. ; ITTMANN, M. The Role of Fibroblast Growth Factors and their Receptors in Prostate Cancer. *Endocr. Relat. Cancer*, 2004, vol. 11, 709-24
- GOWARDHAN, B. ; DOUGLAS, D.A. ; MATHERS, M.E. et al. Evaluation of the Fibroblast Growth Factor System as a Potential Target for Therapy in Human Prostate Cancer. *Br. J. Cancer*, 2005, vol. 92, 320-7
- OZEN, M. ; GIRI, D. ; ROPIQUET, F. ; MANSUKHANI, A. ; ITTMANN, M. Role of Fibroblast Growth Factor Receptor Signaling in Prostate Cancer Cell Survival. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2001, vol. 93, 1783-90
- UKRAINETS, I. et al. *Tet. Lett.*, 1995, vol. 42, 7747-7748
- UKRAINETS, I. et al. *Khimya Geterotsiklicheskikh Soedinil.*, 1992, vol. 2, 239-241
- UKRAINETS, I. et al. *Khimya Geterotsiklicheskikh Soedinil.*, 1993, vol. 1, 105-108
- UKRAINETS, I. et al. *Khimya Geterotsiklicheskikh Soedinil.*, 1993, vol. 2, 1105-1108
- *Chem. Heterocyclic Comp.*, 1997, vol. 33, 600-604
- LEVIS, M. et al. *Blood*, 2002, vol. 99, 3885-3891
- O'FARRELL, A.M. et al. *Blood*, 2003, vol. 101, 3597-3605
- DRUKER, B.J. *Oncogene*, 2002, vol. 21, 8541-8548
- GIACCONE, G. *Clin. Cancer Res.*, 2004, vol. 10, 4233S-4237S
- THIEDE, C. et al. *Blood*, 2002, vol. 99, 4326-4335
- SCHNITTGER, S. et al. *Blood*, 2002, vol. 100, 59-66
- MINAMI, Y. et al. *Blood*, 2003, vol. 102, 2969-2975
- KIYOI, H. et al. *Oncogene*, 2002, vol. 21, 2555-2563
- SPIEKERMANN, K. et al. *Clin. Cancer Res.*, 2003, vol. 9, 2140-2150
- FERRARA, N. et al. *Nat. Med.*, 2003, vol. 9, 669-676
- COMPAGNI, A. et al. *Cancer Res.*, 2000, vol. 60, 7163-7169
- CARMELIET, P. *Nat. Med.*, 2003, vol. 9, 653-660
- CARMELIET, P. *Nat. Med.*, 2003, vol. 9, 653-660
- OSTMAN, A. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2004, vol. 15, 275-286
- CAROW, C.E. et al. *Blood*, 1996, vol. 87, 1089-1096
- DREXLER, H.G. *Leukemia*, 1996, vol. 10, 586-599
- FIEDLER, W. et al. *Blood*, 2004
- COOLS, J. et al. *Cancer Res.*, 2004, vol. 64, 6385-6389
- BAGRINTSEVA, K. et al. *Blood*, 2004, vol. 103, 2266-2275

- GRUNDLER R. et al. *Blood*, 2003, vol. 102, 648-653
- O'FARRELL A.M. et al. *Clin. Cancer Res.*, 2003, vol. 9, 5465-5476
- STONE R.M. et al. *Ann Hematol.*, 2004, vol. 83 (1), 89-90
- SMITH S.D. et al. *Blood*, 2004, vol. 103, 3689-3678
- DEANGELO D.J. et al. *Blood*, 2003, vol. 102, 65a