

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 971 070**

51 Int. Cl.:

C07D 401/14 (2006.01)

C07D 403/06 (2006.01)

A61K 31/404 (2006.01)

A61K 31/454 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.09.2018 PCT/CN2018/106524**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.03.2020 WO20056634**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2018 E 18934491 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2024 EP 3854790**

54 Título: **Derivado de indolona sustituido con pirrol o su sal farmacéuticamente aceptable, y su método de preparación y aplicación**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.06.2024

73 Titular/es:

**SUZHOU GENHOUSE PHARMACEUTICAL
CO., LTD. (50.0%)
Unit 401, Building 8, Zone A, BioBAY Phase III,
No.1 Xinze Road Suzhou Industrial Park,
Suzhou Area China (Jiangsu)
Pilot Free Trade Zone Jiangsu
Suzhou 215123, CN y
SHANDONG NEW TIME PHARMACEUTICAL
CO., LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

HU, LIHONG

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 971 070 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Derivado de indolona sustituido con pirrol o su sal farmacéuticamente aceptable, y su método de preparación y aplicación

5

Campo técnico

La presente divulgación se refiere al campo de la medicina, en particular a un derivado de indolona sustituido con pirrol o sus sales farmacéuticamente aceptables, y a un método de preparación del mismo y a su aplicación.

10

Estado de la técnica

La leucemia es un tipo de enfermedad clonal maligna de las células madre hematopoyéticas, también conocida como cáncer de sangre. La leucemia mieloide aguda (AML) es la leucemia aguda más común en adultos y representa el 40% de la incidencia total de leucemia y aproximadamente el 80% de la incidencia total de leucemia aguda. La causa de la AML es la proliferación y diferenciación anormales de células progenitoras mieloides inmaduras resultantes de la diferenciación anormal de células madre hematopoyéticas primitivas y células progenitoras (Gilliland, D. G. et al. Cancer Cell, 2002, 1, 417). Los métodos de tratamiento actuales para la AML incluyen principalmente la terapia con medicamentos y el trasplante de médula ósea. La terapia farmacológica se refiere principalmente a la quimioterapia tradicional, que se puede dividir en dos etapas de tratamiento de inducción de remisión y tratamiento posremisión. En la actualidad, el tratamiento de inducción de la remisión de la AML todavía se basa en antibióticos antitumorales con antraciclina combinados con citarabina. El tratamiento posremisión incluye tratamiento intensivo de consolidación, tratamiento de mantenimiento y prevención y tratamiento de la leucemia del sistema nervioso central, y generalmente se elige quimioterapia combinada con citarabina en dosis altas. En los últimos años, mediante la mejora del tratamiento de apoyo y el aumento de la intensidad de la quimioterapia, se ha mejorado la eficacia de la quimioterapia. La tasa de remisión total completa de la quimioterapia para pacientes con AML puede alcanzar entre el 50% y el 70%, y la tasa de supervivencia libre de enfermedad a largo plazo es del 25% al 30%. Sin embargo, debido a la importante heterogeneidad individual y la alta tasa de recurrencia de la AML, una proporción considerable de pacientes todavía tienen malos resultados o recaídas. El trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT) es un método confiable para curar la AML. Sin embargo, los pacientes todavía corren el riesgo de recaer después del trasplante. La tasa de recurrencia de los pacientes de riesgo estándar es del 8% al 12%, y para los pacientes de alto riesgo la tasa de recurrencia puede alcanzar del 39% al 74%. La recurrencia postrasplante es una de las principales razones del fracaso del trasplante.

15

20

25

30

La investigación y el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la AML para mejorar la tasa efectiva de la terapia farmacológica y prolongar la supervivencia sigue siendo una necesidad urgente para los pacientes con AML. La tirosina quinasa 3 (FLT3) similar a FMS es un nuevo objetivo terapéutico para la AML que ha atraído mucha atención en los últimos años.

35

40

Los estudios muestran que la proteína FLT3 se expresa principalmente en precursores de células mieloides y linfoides normales, y se expresa en 70 % al 90 % de las células de AML y de leucemia linfocítica aguda. La proteína FLT3 pertenece a la familia de la proteína tirosina quinasa (PTK), que fue descubierta de forma independiente y por separado por el grupo de investigación de Rosnet y el grupo de investigación de Matthews en 1991. La proteína FLT3 pertenece a la familia del receptor III de proteína tirosina y consiste en un dominio extracelular que contiene cinco inmunoglobulinas, un dominio transmembrana, un fragmento yuxtamembrana y una región citoplasmática. Una gran cantidad de estudios muestran que la mutación y la activación anormal de la proteína tirosina quinasa FLT3 están estrechamente relacionadas con la aparición y el desarrollo de la AML (Marrin, C. et al. Blood, 2014, 124, 3). El primer tipo de mutación es la duplicación en tándem del fragmento de yuxtamembrana (duplicación interna en tándem, ITD), que representa aproximadamente el 23% de las mutaciones de la proteína FLT3. El segundo tipo de mutación es la mutación puntual de un dominio de activación (dominio tirosina quinasa, TKD), que representa aproximadamente el 8% de las mutaciones en la proteína FLT3. El tercer tipo de mutación es la mutación puntual en el fragmento yuxtamembrana, que representa aproximadamente el 2% de la mutación de la proteína FLT3. Después de la mutación de la proteína FLT3, inducirá la dimerización de la proteína FLT3, lo que a su vez conduce a la autofosforilación del receptor. Al mismo tiempo, el dominio de activación en el citoplasma se acerca a la membrana y el sustrato intracelular se combina más fácilmente con el sitio de unión activo de FLT3, lo que resulta en la activación de FLT3. Después de la activación de FLT3, FLT3 activa la vía descendente de Ras y la vía de fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K), y luego regula los factores apoptóticos y antiapoptóticos en las vías para afectar el crecimiento, la proliferación y la supervivencia celular para lograr el efecto de inhibición del crecimiento tumoral (Choudhary, C. et al., Int. J. Hematol., 2005, 82, 93-99). En vista del papel de FLT3 en la aparición y desarrollo de AML, la proteína FLT3 puede usarse como un objetivo importante para el tratamiento de la AML. Por lo tanto, el desarrollo de inhibidores de FLT3 eficientes, seguros y poco tóxicos tiene cierto valor científico y significado social para el tratamiento de la AML.

45

50

55

60

El sunitinib es un inhibidor de la tirosina quinasa de múltiples objetivos desarrollado por Pfizer. Inhibe principalmente PDGFR-β y VEGFR-2 en las células endoteliales vasculares para ejercer un efecto de antineoangiogénesis, y también puede actuar sobre células tumorales con RTK anormalmente activadas para ejercer un efecto antitumoral directo. La

65

FDA aprobó la comercialización de sunitinib en 2006 para el tratamiento de tumores del estroma gastrointestinal y carcinoma de células renales, y posteriormente fue aprobado para el tratamiento de tumores neuroendocrinos pancreáticos progresivos (pNET) que no se pueden extirpar quirúrgicamente o se han diseminado (metástasis). Sunitinib tiene un fuerte efecto inhibidor sobre VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- β , c-Kit, FLT3 y otros receptores tirosina quinasa: VEGFR-1 (IC₅₀: 15.1 nM), VEGFR-2 (IC₅₀: 38.1 nM), VEGFR-3 (IC₅₀: 30.6 nM), PDGFR- β (IC₅₀: 55.1 nM), c-Kit (IC₅₀: 211.34 nM), CSF-1R (IC₅₀: 35.6 nM), FLT3 (IC₅₀: 21.5 nM) (PWManley et al. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1697, 17). Aunque FLT3 puede inhibirse a nivel nM, Sunitinib también tiene una actividad inhibidora considerable contra VEGFR, PDGFR y similares relacionados con la neoangiogénesis. Se ha demostrado que sunitinib es un inhibidor no selectivo de FLT3 y tiene una fuerte actividad inhibidora contra FLT3-ITD y FLT3-TKD con mutación de FLT3. Sunitinib puede inhibir la fosforilación mediada por FLT3 *in vitro*, inducir la apoptosis celular e inhibir la proliferación *in vitro* de cepas celulares positivas para FLT3-ITD. La administración oral de 20 mg/kg/d mostró un efecto inhibidor tumoral significativo en el modelo de tumor de xenoinjerto de ratón desnudo MV-4-11 (FLT3-ITD). Una sola administración puede mantener el efecto inhibidor de la fosforilación de FLT3-ITD durante 16 horas. (Anne-Marie O'Farrell, Tinya J. Abrams, et al., *Blood*, 2003, 101(9), 3597).

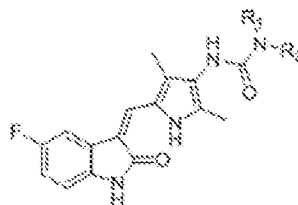
En un estudio clínico de fase I, se seleccionaron 29 pacientes con AML que eran refractarios y recayeron o no eran adecuados para el tratamiento estándar para recibir una dosis única de Sunitinib de 50 mg a 350 mg. Se observó la tolerabilidad y se realiza un estudio de correlación de PK/PP. El resultado mostró que se observaron reacciones adversas relacionadas con el medicamento en el 31% de los pacientes, principalmente reacciones gastrointestinales como diarrea y vómitos, y se limitaron a una dosis no menor a 250 mg, con un grado de 1/2. Se observó un fuerte efecto inhibidor sobre la fosforilación de FLT3 en más del 50% de los pacientes con una dosis de no menos de 200 mg, y se inhibieron las vías de señalización posteriores relacionadas (Anne-Marie O'F, James M. F, et al. *ClinicalCancer Research*, 2003, 9(15), 5465).

En un estudio clínico de fase I de sunitinib para AML realizado por Fiedler et al., 16 pacientes con AML en recaída o refractaria se dividieron en dos grupos A y B, y fueron tratados con diferentes administraciones (grupo A: 50 mg d⁻¹, esquema 4/2, grupo B: 75 mg d⁻¹, esquema 4/1). Los resultados mostraron que 1 caso tuvo una reacción morfológica, 5 casos tuvieron una reacción parcial (PR), la reacción tóxica del grupo de 50 mg fue similar a la de los ensayos clínicos en tumores sólidos, pero la incidencia de supresión de la médula ósea aumentó, mientras que la tolerancia de los pacientes en el grupo de 75 mg disminuyó, lo que resultó en fatiga e hipertensión de grado 4 que limitan la dosis (Fiedler, W. et. al. *Blood*, 2005, 105, 986). Se puede observar que, aunque los primeros estudios clínicos de Sunitinib mostraron ciertos efectos terapéuticos sobre la AML, sus efectos secundarios tóxicos fueron relativamente fuertes, la dosis tolerada fue baja y no se pudo lograr la exposición plasmática requerida para la actividad inhibidora de FLT3. Sunitinib no tuvo éxito cuando se usó como inhibidor de FLT3 en el tratamiento de la AML. Por lo tanto, es necesario optimizar su estructura química para reducir los efectos secundarios tóxicos, optimizar la farmacología y encontrar un fármaco ideal más seguro y eficaz.

Resumen de la divulgación

En vista de las deficiencias de la técnica anterior mencionadas anteriormente, un objetivo de la presente divulgación es proporcionar un derivado de indolinona sustituido con pirrol o sus sales farmacéuticamente aceptables, y un método de preparación del mismo y su aplicación, para resolver los problemas en la técnica anterior.

Para lograr el objetivo anterior y otros objetivos relacionados, un primer aspecto de la presente divulgación proporciona un compuesto o sales farmacéuticamente aceptables del mismo. La fórmula estructural del compuesto es la que se muestra en la Fórmula I:



Fórmula I

donde,

R₁ se selecciona de H, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo;

R₂ se selecciona de heterocicloalquilo sustituido o no sustituido;

o R₁ y R₂ forman grupos como se muestra a continuación con un átomo de nitrógeno:

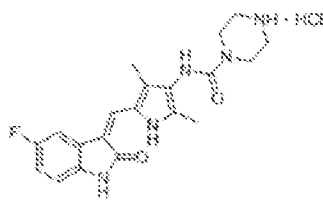


en donde Ra se selecciona de alquilo C1-C3 lineal o ramificado; Rb se selecciona de amino; alquilo C1-C3 lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, y un sustituyente se selecciona de amino.

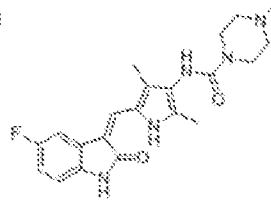
5 En algunas realizaciones de la presente divulgación, R₂ se selecciona de heterocicloalquilo de 5 o 6 miembros monosustituido, polisustituido o no sustituido, y el sustituyente se selecciona de alquilo C1-C3 lineal o ramificado.

10 En algunas realizaciones de la presente divulgación, R₂ se selecciona de 4-piperidinilo y N-metil-4-piperidinilo.

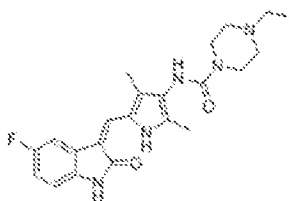
15 En algunas realizaciones de la presente divulgación, el compuesto o sus sales farmacéuticamente aceptables se seleccionan de un compuesto de Fórmula 1, un compuesto de Fórmula 2, un compuesto de Fórmula 3, un compuesto de Fórmula 4, un compuesto de Fórmula 5, un compuesto de Fórmula 6, un compuesto de Fórmula 7 y un compuesto de Fórmula 8, mostrándose las fórmulas estructurales de los compuestos como sigue:



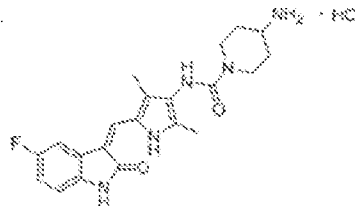
Fórmula 1



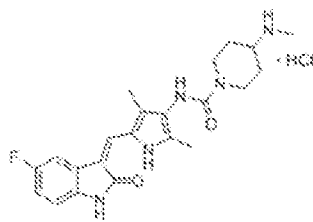
Fórmula 2



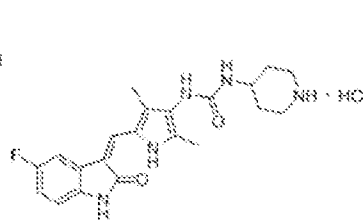
Fórmula 3



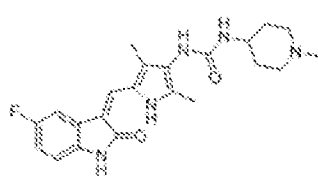
Fórmula 4



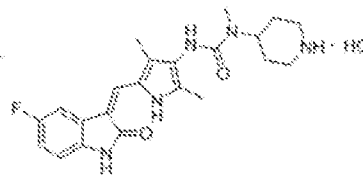
Fórmula 5



Fórmula 6



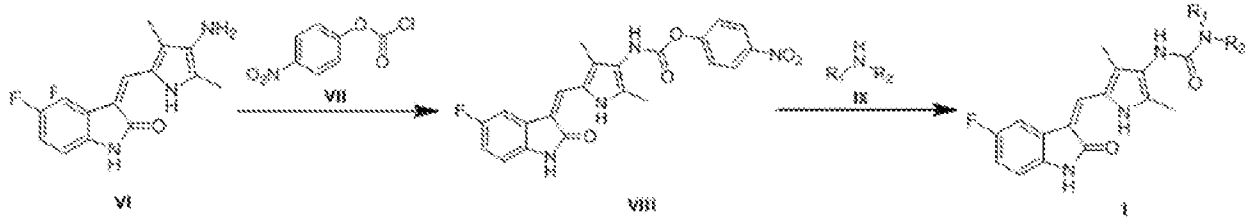
Fórmula 7



Fórmula 8

Un segundo aspecto de la presente divulgación proporciona un método para preparar el compuesto o sus sales farmacéuticamente aceptables, que comprende la siguiente etapa: un compuesto de Fórmula VI reacciona con un

compuesto de Fórmula VII y un compuesto de Fórmula IX en presencia de un álcali, respectivamente, para producir el compuesto de Fórmula I. La ecuación de reacción es la siguiente:



5

en donde, R₁ y/o R₂ en el compuesto de Fórmula IX tienen la misma definición que la del compuesto de Fórmula I.

Un tercer aspecto de la presente divulgación proporciona un compuesto o sales farmacéuticamente aceptables del mismo para su uso como inhibidores del receptor de tirosina quinasa.

10

En algunas realizaciones de la presente divulgación, el inhibidor es un inhibidor de tirosina quinasa del receptor multidiana.

15

En algunas realizaciones de la presente divulgación, el receptor de tirosina quinasa es FLT3 o mutantes del mismo.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, el inhibidor es un inhibidor selectivo, más específicamente un inhibidor selectivo para FLT3 o sus mutantes.

20

Un cuarto aspecto de la presente divulgación proporciona el compuesto o sus sales farmacéuticamente aceptables para su uso en el tratamiento de tumores. El tumor se selecciona preferiblemente de AML.

Un quinto aspecto de la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto o sus sales farmacéuticamente aceptables.

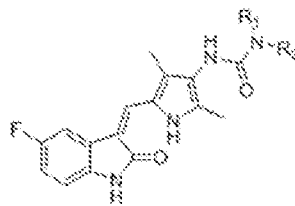
25

Realizaciones

A través de mucha práctica e investigación, el inventor de la presente divulgación proporciona un derivado de indolinona sustituido con pirrol, que tiene un efecto inhibidor notable sobre el receptor de tirosina quinasa (RTK) y tiene las características de efectos secundarios poco tóxicos. Sobre esta base, se ha completado la presente divulgación.

30

Un aspecto de la presente divulgación proporciona un compuesto o sus sales farmacéuticamente aceptables. El compuesto es un derivado de indolinona sustituido con pirrol. La fórmula estructural del compuesto se muestra en la Fórmula I:



35

Fórmula I

donde,

40

R₁ se selecciona de H, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo;
R₂ se selecciona de heterocicloalquilo sustituido o no sustituido;
o R₁ y R₂ forman grupos como se muestra a continuación con un átomo de nitrógeno:



45

En la presente divulgación, "alquilo" se refiere a un grupo alifático saturado.

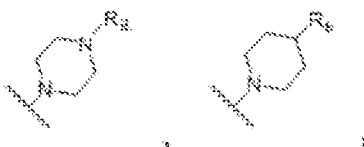
En la presente divulgación, "heterocicloalquilo" se refiere a un hidrocarburo cíclico saturado o insaturado (pero no aromático), que puede estar opcionalmente no sustituido, monosustituido o polisustituido y que tiene en su estructura al menos un heteroátomo seleccionado entre N, O o S.

5 En la presente divulgación, "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a cualquier sal que sea fisiológicamente tolerante (generalmente no tóxica) cuando se usa para el tratamiento de una manera adecuada, especialmente cuando el objeto de aplicación es humano y/o mamífero. Más específicamente, las sales farmacéuticamente aceptables suelen ser sales formadas por el compuesto (normalmente protonado) proporcionado por la presente divulgación y al menos un anión fisiológicamente tolerante. Por ejemplo, las sales pueden estar formadas por ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido metanosulfónico, ácido fórmico, ácido acético, ácido oxálico, ácido succínico, ácido málico, ácido tartárico, ácido mandélico, ácido fumárico, ácido láctico, ácido cítrico o similar.

15 En el compuesto de Fórmula I proporcionado por la presente divulgación, R₁ puede seleccionarse más específicamente entre H, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo.

20 En el compuesto de Fórmula I proporcionado por la presente divulgación, R₂ se selecciona de heterocicloalquilo de 5 o 6 miembros monosustituido, polisustituido o no sustituido, y el sustituyente puede ser alquilo C1-C3 lineal o ramificado, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo o isopropilo. En algunas realizaciones de la presente divulgación, R₂ se selecciona de 4-piperidinilo y N-metil-4-piperidinilo.

25 En el compuesto de Fórmula I como se describió anteriormente, R₁ y R₂ pueden formar heterocicloalquilo de 5 o 6 miembros monosustituido, polisustituido o no sustituido con el átomo de nitrógeno unido por puente, y el heterocicloalquilo formado puede incluir uno o dos átomos de nitrógeno. Al calcular los átomos de nitrógeno, se incluye el átomo de nitrógeno unido por puente. El sustituyente puede ser alquilo C1-C3 lineal o ramificado, amino, etc. Por ejemplo, el heterocicloalquilo formado por R₁ y R₂ y el átomo de nitrógeno unido por puente puede ser heterocicloalquilo de 6 miembros, que puede incluir dos átomos de nitrógeno y puede estar sustituido por uno o más grupos alquilo y que también pueden incluir un átomo de nitrógeno y pueden estar sustituidos por uno o más grupos amino. De acuerdo con una realización específica de la presente divulgación, R₁ y R₂ y el átomo de nitrógeno unido por puente forman un grupo como se muestra a continuación:



donde,

35 Ra se selecciona de alquilo C1-C3 lineal o ramificado (por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo); y Rb se selecciona de amino, alquilo C1-C3 lineal o ramificado (por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo).

40 El compuesto de Fórmula I o sus sales farmacéuticamente aceptables proporcionado por la presente divulgación puede ser específicamente un compuesto de Fórmula 1, un compuesto de Fórmula 2, un compuesto de Fórmula 3, un compuesto de Fórmula 4, un compuesto de Fórmula 5, un compuesto de Fórmula 6, un compuesto de Fórmula 7 o un compuesto de Fórmula 8. Las fórmulas estructurales de los compuestos de Fórmulas 1 a 8 se muestran en la Tabla 1:

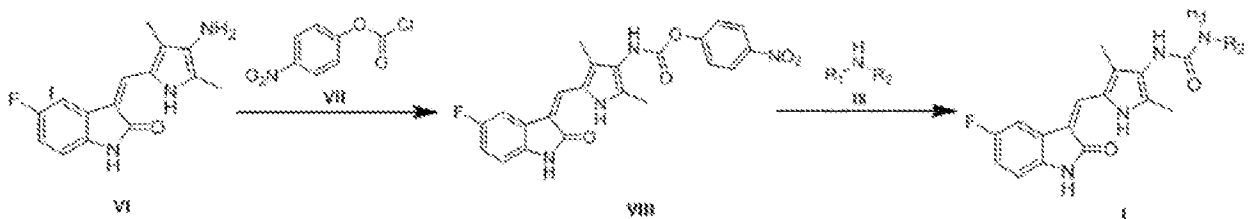
Tabla 1

Número de serie del compuesto	Fórmula estructural del compuesto
1	
2	

(continuación)

Número de serie del compuesto	Fórmula estructural del compuesto
3	
4	
5	
6	
7	
8	

5 Otro aspecto de la presente divulgación proporciona un método para preparar el compuesto, que comprende la siguiente etapa: un compuesto de Fórmula VI reacciona con un compuesto de Fórmula VII y un compuesto de Fórmula IX respectivamente en presencia de un álcali para producir el compuesto de Fórmula I. La ecuación de la reacción es la siguiente:



10

en donde, R₁ y/o R₂ en el compuesto de Fórmula IX tienen la misma definición que la del compuesto de Fórmula I.

15

En la reacción anterior, el compuesto de Fórmula VI reacciona con el compuesto de Fórmula VII en presencia de un álcali para producir un compuesto de Fórmula VIII, y el compuesto de Fórmula VIII reacciona además con el compuesto de Fórmula IX en la presencia de un álcali para producir el compuesto de Fórmula I.

En la reacción de preparación del compuesto de Fórmula I a partir del compuesto de Fórmula VI, la cantidad del compuesto de Fórmula VII y/o el compuesto de Fórmula IX usados normalmente es igual o mayor que la cantidad del compuesto utilizado de Fórmula VI. Por ejemplo, la relación molar del compuesto de Fórmula VII con respecto al compuesto de Fórmula VI puede ser 1-1.5:1, y la relación molar del compuesto de Fórmula IX con respecto al compuesto de Fórmula VI puede ser 1-5:1.

En la reacción de preparación del compuesto de Fórmula I a partir del compuesto de Fórmula VI, el álcali puede ser normalmente un álcali orgánico, por ejemplo, DIPEA o similares. La cantidad de álcali utilizada suele ser igual o mayor que la cantidad del compuesto de Fórmula VI. Por ejemplo, la relación molar del álcali con respecto al compuesto de Fórmula VI puede ser 1-1.5:1.

En la reacción de preparación del compuesto de Fórmula I a partir del compuesto de Fórmula VI, la reacción se puede llevar a cabo en un disolvente, y el disolvente normalmente puede ser un disolvente aprótico. Los expertos en la técnica pueden seleccionar un tipo adecuado de disolvente y una cantidad apropiada de disolvente de acuerdo con las materias primas en la reacción, de modo que las materias primas tengan buena solubilidad en el disolvente. Por ejemplo, el disolvente puede ser tetrahidrofurano (THF) o similares.

En la reacción de preparación del compuesto de Fórmula I a partir del compuesto de Fórmula VI, la temperatura de reacción puede ser desde temperatura ambiente hasta la temperatura de reflujo del disolvente; por ejemplo, la reacción se puede llevar a cabo a temperatura ambiente. La reacción normalmente se puede llevar a cabo bajo condiciones de protección de gas. El gas utilizado para crear la condición de gas de protección puede ser nitrógeno, gas inerte, etc., y más específicamente el gas inerte puede ser helio, neón, argón, criptón, xenón, etc. Los expertos en la técnica pueden ajustar el tiempo de reacción de acuerdo con el proceso de reacción. El proceso de reacción se puede controlar mediante métodos como TLC y HPLC. El tiempo de reacción puede ser de 0.1 a 24 h. Una vez completada la reacción, el producto de reacción se puede desolvatar y purificar para obtener el compuesto de Fórmula I. Los expertos en la técnica pueden elegir un método adecuado para la purificación. Por ejemplo, se puede utilizar un disolvente adecuado para enjuagar el producto. Además, por ejemplo, el disolvente que se puede utilizar puede ser agua, acetato de etilo (EA), metanol, etc. o una combinación de varios de ellos. El compuesto de Fórmula I puede formar además sales farmacéuticamente aceptables del mismo con un ácido adecuado.

Además, el método de preparación del compuesto de Fórmula VI puede incluir la siguiente etapa: el compuesto de Fórmula V se somete a una reacción de reducción en una solución de electrolito para producir el compuesto de Fórmula VI. La ecuación de reacción es la siguiente:



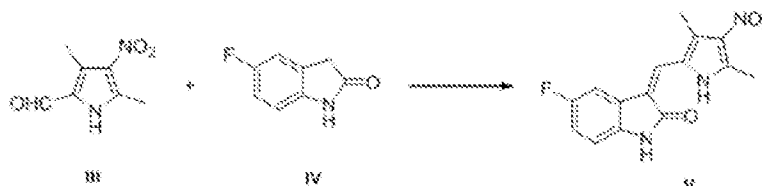
En la reacción de preparación del compuesto de Fórmula VI a partir del compuesto de Fórmula V, el agente reductor usado en la reacción de reducción normalmente puede ser, por ejemplo, uno de Zn en polvo, Fe en polvo, etc. o una combinación de varios de ellos. La cantidad de agente reductor utilizada normalmente es igual o mayor que la del compuesto de Fórmula V. Por ejemplo, la relación molar del agente reductor al compuesto de Fórmula V puede ser 1-50:1.

Los expertos en la técnica pueden seleccionar una solución electrolítica adecuada para reducir el compuesto de Fórmula V al compuesto de Fórmula VI. Por ejemplo, el electrolito puede ser cloruro de amonio, etc. o una combinación de varios de ellos, y la concentración del electrolito en la solución puede ser de 1/10 a 1/2 de su concentración de saturación. Además, por ejemplo, el disolvente para formar la solución electrolítica puede ser agua, tetrahidrofurano, metanol, etc. o una combinación de varios de ellos. Además, por ejemplo, la concentración del compuesto de Fórmula V en la solución de electrolito puede ser de 1-20 mmol/L. En una realización específica de la presente divulgación, el disolvente para formar la solución de electrolito es una mezcla de agua, tetrahidrofurano y metanol, en la que la relación en volumen de agua, tetrahidrofurano y metanol es 1:0.5-3:0.5-3.

En la reacción de preparación del compuesto de Fórmula VI a partir del compuesto de Fórmula V, la temperatura de reacción de la reacción de reducción puede ser desde temperatura ambiente hasta la temperatura de reflujo del disolvente; por ejemplo, la reacción se puede llevar a cabo a aproximadamente 50°C. La reacción normalmente se puede llevar a cabo bajo condiciones de protección de gas. El gas utilizado para crear la condición de gas de protección puede ser nitrógeno, gas inerte, etc., y más específicamente el gas inerte puede ser helio, neón, argón, criptón, xenón, etc. Los expertos en la técnica pueden ajustar el tiempo de reacción de acuerdo con el proceso de reacción. El proceso de reacción se puede controlar mediante métodos como TLC y HPLC. El tiempo de reacción puede ser de 0.5-24 h. Una vez completada la reacción, se puede eliminar al menos parte del disolvente orgánico en el producto de reacción, se ajusta el pH a alcalino y se realiza la extracción con disolvente orgánico y la desolvatación de la fase orgánica para

obtener el compuesto de Fórmula VI. El disolvente orgánico usado durante la extracción puede ser, por ejemplo, acetato de etilo.

Además, el método de preparación del compuesto de Fórmula V puede incluir la siguiente etapa: un compuesto de Fórmula III y un compuesto de Fórmula IV tienen una reacción de condensación para producir el compuesto de Fórmula V. La ecuación de reacción es la siguiente:



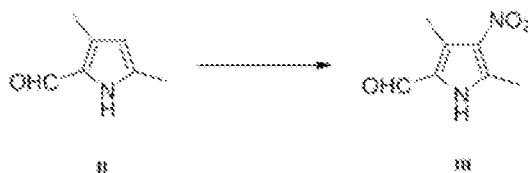
En la reacción de preparación del compuesto de Fórmula V a partir del compuesto de Fórmula III, la reacción normalmente se lleva a cabo en presencia de un catalizador. Los expertos en la técnica pueden seleccionar un tipo y cantidad adecuados de catalizador para la reacción de condensación del compuesto de Fórmula III y el compuesto de Fórmula IV. Por ejemplo, el catalizador puede ser pirrolidina o similar y, por ejemplo, la relación molar del catalizador con respecto al compuesto de Fórmula III puede ser 1-1.5:1.

En la reacción de preparación del compuesto de Fórmula V a partir del compuesto de Fórmula III, la cantidad del compuesto de Fórmula IV utilizada normalmente es igual o mayor que la del compuesto de Fórmula III. Por ejemplo, la relación molar del compuesto de Fórmula III con respecto al compuesto de Fórmula IV puede ser 1:1-1.5.

En la reacción de preparación del compuesto de Fórmula V a partir del compuesto de Fórmula III, la reacción se puede llevar a cabo en un disolvente, y el disolvente normalmente puede ser un disolvente prótico polar. Los expertos en la técnica pueden seleccionar un tipo y cantidad adecuados de disolvente de acuerdo con las materias primas en la reacción, de modo que las materias primas tengan buena solubilidad en el disolvente. Por ejemplo, el disolvente puede ser etanol (EtOH) o similar.

En la reacción de preparación del compuesto de Fórmula V a partir del compuesto de Fórmula III, la temperatura de reacción de la reacción de reducción puede ser desde temperatura ambiente hasta la temperatura de reflujo del disolvente; por ejemplo, la reacción se puede llevar a cabo a aproximadamente 50°C. La reacción normalmente se puede llevar a cabo bajo condiciones de protección de gas. El gas utilizado para crear la condición de gas de protección puede ser nitrógeno, gas inerte, etc., y más específicamente el gas inerte puede ser helio, neón, argón, criptón, xenón, etc. Los expertos en la técnica pueden ajustar el tiempo de reacción, de acuerdo con el proceso de reacción. El proceso de reacción se puede controlar mediante métodos como TLC y HPLC. El tiempo de reacción puede ser de 0.5-24 h. Una vez completada la reacción, el producto de la reacción puede pasar por una separación sólido-líquido y la sustancia de la fase sólida es el compuesto de Fórmula V.

Además, el método de preparación del compuesto de Fórmula III puede incluir la siguiente etapa: nitrar un compuesto de Fórmula II en presencia de un agente nitrante y un agente deshidratante para producir el compuesto de Fórmula III. La ecuación de reacción es la siguiente:



En la reacción de preparación del compuesto de Fórmula III a partir del compuesto de Fórmula II, los expertos en la técnica pueden seleccionar un tipo y cantidad adecuados del agente nitrante y/o agente deshidratante para llevar a cabo la reacción de nitración. Por ejemplo, el agente nitrante puede ser ácido nítrico, nitrato, etc., y el nitrato puede ser, por ejemplo, nitrato de potasio, etc. La cantidad del agente nitrante usado generalmente puede ser igual o mayor que la del compuesto de Fórmula II. Por ejemplo, la relación molar del agente nitrante con respecto al compuesto de Fórmula II puede ser 1-1.5:1; y el agente deshidratante puede ser ácido sulfúrico concentrado y similares.

En la reacción de preparación del compuesto de Fórmula III a partir del compuesto de Fórmula II, la temperatura de reacción suele ser inferior a la temperatura ambiente; por ejemplo, la reacción se puede llevar a cabo a aproximadamente -10°C. La reacción normalmente se puede llevar a cabo bajo condiciones de protección de gas. El gas utilizado para crear la condición de gas de protección puede ser nitrógeno, gas inerte, etc., y más específicamente el gas inerte puede ser helio, neón, argón, criptón, xenón, etc. Los expertos en la técnica pueden ajustar el tiempo de reacción de acuerdo con el proceso de reacción. El proceso de reacción se puede controlar mediante métodos como

5 TLC y HPLC. El tiempo de reacción puede ser de 0.5-24 h. Una vez completada la reacción, el producto de reacción se puede diluir con agua y pasar por extracción con disolvente orgánico y desolvatación en fase orgánica (después de la desolvatación, el producto de reacción se puede enjuagar adicionalmente con un disolvente orgánico) para obtener el compuesto de Fórmula III. El disolvente orgánico usado para la extracción y/o el enjuague puede ser, por ejemplo, acetato de etilo, etc.

10 Otro aspecto de la presente divulgación proporciona el uso del compuesto o sus sales farmacéuticamente aceptables en la preparación de inhibidores del receptor de tirosina quinasa. El compuesto o sus sales farmacéuticamente aceptables es específicamente un inhibidor del receptor de tirosina quinasa multidiana, y más específicamente puede ser un inhibidor de FLT3 o sus mutantes (tirosina quinasa tipo Fms, tirosina quinasa 3 tipo FMS, por ejemplo, FLT3, FLT3 -ITD, FLT3 D835Y, etc.), siendo la FLT3 o sus mutantes miembros de la familia del receptor de tirosina quinasa tipo III. El inhibidor puede ser un inhibidor selectivo, y la inhibición selectiva puede significar que, en comparación con KDR (receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular humano, VEGFR2), el compuesto o sus sales farmacéuticamente aceptables tienen un mejor efecto inhibidor sobre FLT3 o sus mutantes. Por ejemplo, en comparación con KDR, el compuesto o sus sales farmacéuticamente aceptables tienen una concentración IC₅₀ que puede no ser superior al 10 % para FLT3 o sus mutantes.

20 Otro aspecto de la presente divulgación proporciona el uso del compuesto o sus sales farmacéuticamente aceptables en la preparación de un medicamento para tratar tumores. El compuesto o sus sales farmacéuticamente aceptables pueden inhibir el crecimiento de células tumorales y, por lo tanto, pueden usarse para preparar fármacos para el tratamiento de tumores, y el tumor puede ser más específicamente leucemia mielocítica aguda (AML) y similares.

25 Otro aspecto de la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica, que incluye el compuesto o sus sales farmacéuticamente aceptables, y más específicamente puede incluir una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto o sus sales farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica también puede incluir vehículos, aditivos, adyuvantes o excipientes farmacéuticamente aceptables y similares.

30 De acuerdo con la presente divulgación, "cantidad terapéuticamente eficaz" generalmente se refiere a una cantidad que puede lograr un efecto terapéutico después de un período de administración adecuado. En términos generales, la reducción de uno o más síntomas o indicadores clínicos significa que el tratamiento es eficaz. Un efecto satisfactorio significa que el tratamiento puede reducir médicamente uno o más síntomas del tumor o eliminar completamente el tumor, o bloquear o retrasar la aparición del tumor y/o reducir el riesgo de desarrollo o deterioro del tumor.

35 El derivado de indolinona sustituido con pirrol o sus sales farmacéuticamente aceptables preparado de acuerdo con la presente divulgación no sólo es simple de sintetizar, fácil de preparar y rico en materias primas sintéticas, sino que también tiene un efecto inhibidor sobre una variedad de tirosina quinasas, especialmente tiene una mayor actividad inhibidora selectiva contra FLT3 y sus mutantes en comparación con KDR (VEGFR2), y puede evitar los efectos secundarios tóxicos causados por la inhibición de KDR, por ejemplo, los efectos secundarios tóxicos relacionados con la inhibición de la angiogénesis extensa, que puede aumentar la dosis tolerada. Además, experimentos relacionados muestran además que este tipo de compuesto puede inhibir selectivamente el crecimiento tumoral, lo que indica que este tipo de compuesto puede usarse para tratar una variedad de enfermedades tumorales, tales como la AML. Además, el derivado de indolinona sustituido con pirrol o sus sales farmacéuticamente aceptables proporcionado de acuerdo con la presente divulgación tiene efectos secundarios tóxicos muy bajos, de modo que tal tipo de compuesto tiene una mejor perspectiva de aplicación.

45 A continuación, se describen los modos de implementación de la presente divulgación con referencia a ejemplos específicos. Los expertos en la técnica pueden comprender fácilmente otras ventajas y efectos de la presente divulgación a partir del contenido divulgado en el presente documento.

50 Cabe señalar que los aparatos o dispositivos de proceso no explicados específicamente en los siguientes ejemplos son todos aparatos o dispositivos convencionales en la técnica.

55 Además, debe entenderse que una o más etapas en los métodos mencionados en la presente divulgación no excluyen otras etapas que pueden existir antes o después de las etapas combinadas u otras etapas que pueden interponerse entre estas etapas expresamente establecidas, a menos que se especifique lo contrario. Además, a menos que se especifique lo contrario, la numeración de las etapas respectivas solo sirve como una herramienta conveniente para identificar cada etapa, no para limitar la secuencia de las etapas ni limitar el alcance de implementación de la presente divulgación. El cambio o ajuste de la relación relativa entre las etapas, sin un cambio sustancial en el contenido técnico, debe considerarse dentro del alcance de implementación de la presente divulgación. Todos los disolventes de los ejemplos se redestilaron antes de su uso, y todos los disolventes anhidros utilizados se obtuvieron del tratamiento de secado de acuerdo con métodos estándar.

60 En cada ejemplo, se midió RMN de¹H con un equipo Varian Mercury AMX300, 400, 500, y se midió MS con un equipo VG ZAB-HS o VG-7070 y Esquire 3000 plus-01005.

A menos que se especifique lo contrario, todas las reacciones se llevaron a cabo bajo la protección de argón y seguidas de TLC, y pasaron por un proceso de enjuague con salmuera saturada y secado con sulfato de magnesio anhidro durante el postratamiento. A menos que se especifique lo contrario, la purificación del producto utilizó cromatografía en columna de gel de sílice, y el gel de sílice utilizado fue de malla 200-300. GF₂₅₄ es producido por Qingdao Ocean Chemical Plant o Yantai Yuanbo Silica Gel Company.

Ejemplo 1

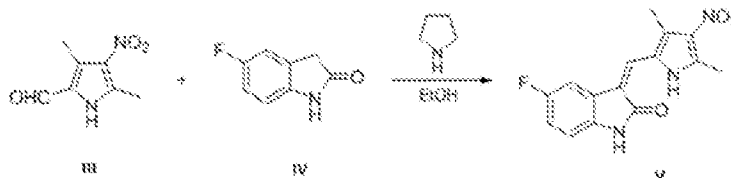
Preparación del compuesto de Fórmula 1:

Preparación del compuesto de Fórmula III:



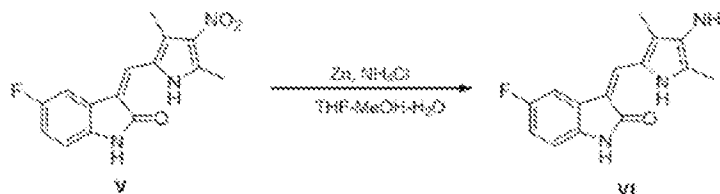
Se pusieron 60 mL de ácido sulfúrico concentrado en un matraz de fondo redondo con un volumen de 250 mL y se añadió lentamente una materia prima de 3,5-dimetil-2-pirrolcarbaldehído (compuesto de Fórmula II, 5 g, 40 mmol). El sistema se mantuvo por debajo de -10°C durante el proceso de adición. Después del proceso de adición, se añadió lentamente nitrato de potasio (4.35 g, 42 mmol) en lotes a esta temperatura, y este proceso de adición se completó en aproximadamente 2 horas. En este proceso, la temperatura se mantuvo a -10°C y se agitó a esta temperatura durante aproximadamente 2 horas después del proceso de adición. Después de que la TLC detectó que la reacción se había completado, la solución se añadió a 1 L de agua con hielo y se extrajo dos veces con 1 L de acetato de etilo, y la capa orgánica se enjuagó con salmuera saturada, se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el disolvente orgánico se evaporó hasta sequedad a presión reducida para obtener 7 g de producto bruto, que se añadió a 10-20 mL de acetato de etilo, se agitó vigorosamente y se filtró para obtener 5 g del compuesto objetivo III puro. RMN de ^1H (400 MHz, cloroformo-d) δ : 10.22 (br s, 1H), 9.68 (s, 1H), 2.71 (s, 3H), 2.66 (s, 3H).

Preparación del compuesto de Fórmula V:



Se añadieron el compuesto III (1.68 g, 10 mmol) y el compuesto IV (1.8 g, 12 mmol) a 50 mL de alcohol etílico absoluto y se añadió tetrahidropirrol (850 mg, 12 mmol) a temperatura ambiente. Después de la adición, el color del sistema se volvió amarillo, la temperatura se elevó a 50°C y la reacción continuó durante 2 horas a esta temperatura. Después de completarse la reacción, el sistema se filtró directamente y la torta de filtración se enjuagó con una pequeña cantidad de etanol y acetato de etilo para obtener 2.7 g del compuesto objetivo V puro. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 11.14 (s, 1H), 7.88 (dd, J = 9.2, 2.4 Hz, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.05-6.97 (m, 1H), 6.88 (dd, J = 8.5, 4.5 Hz, 1H), 2.64 (s, 3H), 2.58 (s, 3H).

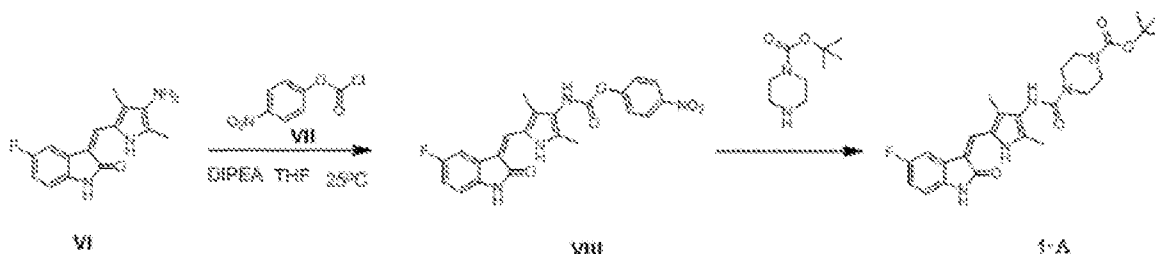
Preparación del compuesto de Fórmula VI:



Se puso el compuesto V (900 mg, 3 mmol) en una botella de dos bocas con un volumen de 500 mL, y luego se añadieron 200 mL de tetrahidrofurano, 100 mL de metanol, 60 mL de agua y 60 mL de solución saturada de cloruro de amonio, respectivamente. Después de la adición, la temperatura se elevó a 50°C , luego se añadió polvo de zinc (1.8 g, 30 mmol) mientras se agitaba y luego la reacción continuó durante 2 horas en esta condición, durante las cuales el sistema se volvió transparente y luego nuevamente turbio. Después de que el sistema se volvió turbio, la LC-MS detectó la finalización de la reacción. Una vez completada la reacción, la solución se evaporó hasta sequedad y se añadió solución saturada de carbonato de sodio para ajustar el sistema a alcalinidad y se extrajo dos veces con 2 litros

de acetato de etilo. La capa de acetato de etilo se lavó con salmuera saturada, se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el disolvente orgánico se evaporó hasta sequedad bajo presión reducida para obtener el compuesto objetivo VI (800 mg). RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 13.55 (s, 1H), 10.62 (s, 1H), 7.63 - 7.55 (m, 1H), 7.47 (s, 1H), 6.82 - 6.79 (m, 1H), 6.79 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 4.01 (s, 2H), 2.25 (s, 3H), 2.15 (s, 3H). Preparación del compuesto de Fórmula 1-A:

5



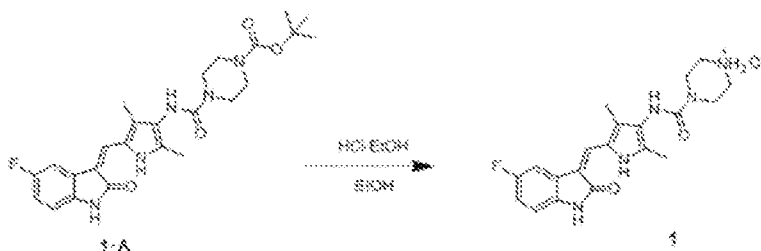
Se disolvió el compuesto VI (100 mg, 0.37 mmol) en tetrahidrofurano (5 mL), se añadió DIPEA (0.1 mL, 0.55 mmol) a temperatura ambiente y después se añadió cloroformiato de p-nitrofenilo (110 mg, 0.55 mmol). Después de la adición, la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos y la TLC detectó la finalización de la reacción. Una vez completada la reacción, se añadió al sistema N-BOC-piperazina (275 mg, 1.48 mmol) y se agitó durante 30 minutos. La LC-MS detectó la finalización de la reacción. Una vez completada la reacción, el disolvente se evaporó hasta sequedad, se batió con EA, se filtró y se enjuagó con metanol para obtener el producto puro. RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 13.55 (s, 1H), 10.78 (s, 1H), 7.68 (dd, $J = 9.5, 2.2$ Hz, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 6.87 (ddd, $J = 9.5, 9.1, 2.2$ Hz, 1H), 6.82 (dd, $J = 8.4, 4.7$ Hz, 1H), 3.37-3.20 (m, 4H), 2.20 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 1.82-1.88 (m, 4H).

10

15

Preparación del compuesto de Fórmula 1:

20



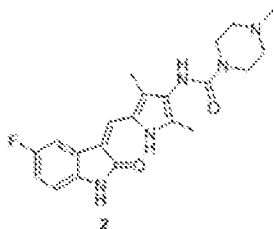
Se disolvió el compuesto de Fórmula 1-A (100 mg, 0.21 mmol) en 3 mL de etanol, después se añadieron 3 mL de solución de ácido clorhídrico en etanol y se agitó durante 30 minutos. La LC-MS detectó la finalización de la reacción y la mezcla se secó directamente por centrifugación para obtener el compuesto puro de Fórmula 1. RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 13.57 (s, 1H), 10.81 (s, 1H), 9.35 (s, 2H), 8.07 (s, 1H), 7.68 (dd, $J = 9.5, 2.5$ Hz, 1H), 7.65 (s, 1H), 6.88 (ddd, $J = 9.5, 9.0, 2.5$ Hz, 1H), 6.83 (dd, $J = 8.4, 4.7$ Hz, 1H), 3.68 (t, $J = 5.2$ Hz, 4H), 3.11 (t, $J = 5.2$ Hz, 4H), 2.20 (s, 3H), 2.17 (s, 3H).

25

Ejemplo 2

30

Preparación del compuesto de Fórmula 2:



35

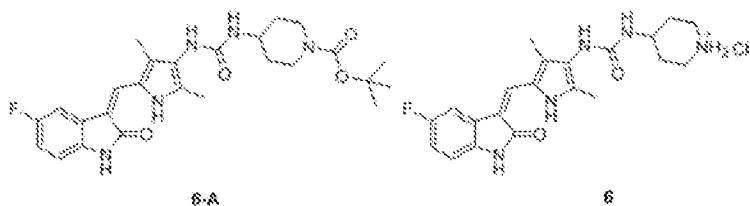
El método de preparación se refería a la síntesis del compuesto de Fórmula 1, en el que la N-BOC-piperazina se sustituyó con N-metilpiperazina para obtener el compuesto diana de Fórmula 2. RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 13.56 (s, 1H), 10.78 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.68 (dd, $J = 9.5, 2.3$ Hz, 1H), 7.65 (s, 1H), 6.88 (ddd, $J = 9.5, 9.1, 2.3$ Hz, 1H), 6.83 (dd, $J = 8.3, 4.7$ Hz, 1H), 3.45-3.39 (m, 4H), 2.33-2.28 (m, 4H), 2.20 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 2.16 (s, 3H).

40

ES 2 971 070 T3

Ejemplo 6

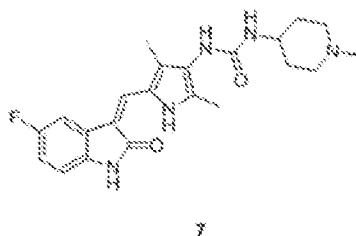
Preparación del compuesto de Fórmula 6:



El método de preparación se refería a la síntesis del compuesto de Fórmula 1, en el que se sustituyó N-BOC-piperazina con 1-BOC-4-aminopiperidina para obtener el compuesto diana de Fórmula 6-A, y luego se eliminó BOC mediante solución de ácido clorhídrico en etanol para obtener el compuesto de Fórmula 6. RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 13.56 (s, 1H), 10.80 (s, 1H), 8.78 (br s, 1H), 8.69 (brs, 1H), 7.68 (dd, $J = 9.5, 2.4$ Hz, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 6.88 (ddd, $J = 9.5, 9.0, 2.4$ Hz, 1H), 6.83 (dd, $J = 8.4, 4.7$ Hz, 1H), 6.49 (brs, 1H), 3.78-3.65 (m, 1H), 3.28-3.18 (m, 2H), 3.02-2.90 (m, 2H), 2.20 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.00-1.84 (m, 2H), 1.69-1.51 (m, 2H).

10 Ejemplo 7

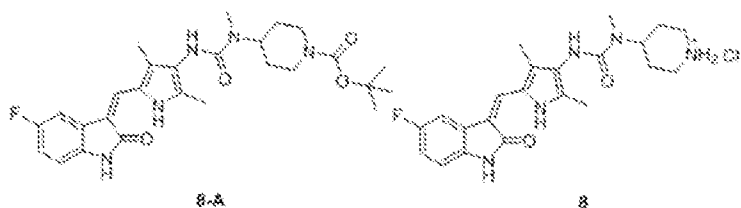
Preparación del compuesto de Fórmula 7:



El método de preparación se refería a la síntesis del compuesto de Fórmula 1, en el que la N-BOC-piperazina se sustituyó con 1-amino-4-metilpiperazina para obtener el compuesto diana de Fórmula 7. RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 13.55 (s, 1H), 10.79 (s, 1H), 7.68 (dd, $J = 9.5, 2.4$ Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 6.87 (ddd, $J = 9.4, 9.0, 2.5$ Hz, 1H), 6.82 (dd, $J = 8.4, 4.7$ Hz, 1H), 5.96 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 3.45-3.36 (m, 1H), 2.65 (d, $J = 11.4$ Hz, 2H), 2.19 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 1.94 (t, $J = 10.6$ Hz, 2H), 1.76-1.69 (m, 2H), 1.45-1.32 (m, 2H).

Ejemplo 8

Preparación del compuesto de Fórmula 8:



El método de preparación se refería a la síntesis del compuesto de Fórmula 1, en el que se sustituyó N-BOC-piperazina con 1-BOC-4-metilaminopiperidina para obtener el compuesto diana de Fórmula 8-A, y luego se eliminó BOC mediante solución de ácido clorhídrico en etanol para obtener el compuesto de Fórmula 8. RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 13.56 (s, 1H), 10.80 (s, 1H), 8.83 (br s, 2H), 7.70~7.63 (m, 3H), 6.88 (td, $J = 9.5, 9.0, 2.4$ Hz, 1H), 6.83 (dd, $J = 8.4, 4.8$ Hz, 1H), 4.37-4.22 (m, 1H), 3.32-3.28 (m, 2H), 3.02-2.90 (t, $J = 12.6$ Hz, 2H), 2.82 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.04-1.88 (m, 2H), 1.76-1.66 (m, 2H).

35 Ejemplo 9

Preparación de clorhidrato del compuesto de Fórmula 2:

Se diluyeron diez veces 0.5 mL de solución saturada de cloruro de hidrógeno en etanol con etanol absoluto, se añadió el compuesto de Fórmula 2 (397 mg, 1 mmol) y se agitó durante 5~10 minutos, y la solución de reacción se concentró a presión reducida y se enjuagó con una pequeña cantidad de metanol para obtener clorhidrato del compuesto de Fórmula 2.

Los clorhidratos de todos los demás compuestos se pueden preparar haciendo reaccionar los compuestos correspondientes con una solución diluida de ácido clorhídrico en etanol mediante este método.

Ejemplo 10

Determinación de la actividad bioquímica *in vitro* de la tirosina quinasa

- 5 La actividad inhibidora *in vitro* de los compuestos sobre la tirosina quinasa se midió mediante el método HTRF (fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo).

10 Los compuestos se diluyeron en serie con DMSO en una placa de 96 pocillos en 8 soluciones de diferentes concentraciones con 100 veces la concentración final. Luego, se diluyó en una placa de 96 pocillos una solución tampón, que se preparó añadiendo MgCl₂ 5 mM y DTT 1 mM al tampón enzimático 1 vez proporcionado por el kit, en una solución con 5 veces la concentración final.

15 Los compuestos diluidos se añadieron a una placa de 384 pocillos, respectivamente, y se proporcionaron pocillos dobles para cada concentración. Luego se agregaron 0.25 ng de quinasa por pocillo. Al mismo tiempo, se proporcionaron pocillos negativos y positivos, y se tomó como control el pocillo al que se añadió DMSO al 5 % del mismo volumen. La concentración final de DMSO fue del 1% y el pocillo negativo no contenía quinasa. La incubación previa se realizó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadió un sustrato con una concentración final de 1 μM y ATP con una concentración final de 120 μM y se incubó a temperatura ambiente durante 90 minutos. Luego, se agregaron un aceptor fluorescente (estreptavidina marcada con XL665) con una concentración final de 0.0625 μM y un donante fluorescente 1 vez (anticuerpo TK marcado con criptato de europio) con una concentración final de 0.0625 μM, y se incubaron a temperatura ambiente durante 60 minutos. Las placas se leyeron mediante un lector de microplacas en las condiciones de λ_{ex}=330 nm, λ_{em}=620 nm y λ_{em}=665 nm. Se calculó una relación entre la lectura a 665 nm y la lectura a 620 nm, y la tasa de inhibición se calculó de acuerdo con esta relación.

25 Los resultados mostraron que todos los compuestos de los ejemplos mencionados anteriormente (compuestos de Fórmulas 1-8) tenían una actividad inhibidora significativa contra FLT3, con IC₅₀<20 nM. Aunque tenían cierta actividad inhibidora contra KDR (VEGFR2), la actividad inhibidora fue relativamente débil (IC₅₀>200 nM), mostrando actividad inhibidora selectiva de FLT3. El compuesto de Fórmula 5 exhibió una fuerte actividad inhibidora contra FLT3, FLT3-ITD, FLT3 D835Y, y cierta actividad inhibidora contra PDGFRβ, c-Kit, RET, KDR, AXL, etc., con IC₅₀>100 nM, lo que
30 indica que era un inhibidor selectivo de FLT3.

Tabla 1. Actividad inhibidora de los compuestos de Fórmula 5 contra diversas tirosina quinasas

tirosina quinasas	IC ₅₀ (nM)
FLT3	8.8
FLT3-ITD	< 1.5
FLT3 D835Y	17.3
PDGFRβ	189.7
KDR	891.3
c-Kit	286.4
ALK	4987.8
RET	109.9
FGFR1	2338.8
AXL	284.5

Ejemplo 11

35 La célula de leucemia aguda humana MV-4-11 es una cepa de células mutantes Flt-3. Se utilizó el método de MTS para determinar la actividad antiproliferativa *in vitro* del compuesto contra MV-4-11 (derivado de ATCC): tripsinizar las células en la fase de crecimiento logarítmico, contarlas, resuspender un número apropiado de células en la solución de cultivo, añadiendo la solución de cultivo a la placa de 96 pocillos a razón de 150 μL por pocillo y cultivándolas durante la noche. Después de eso, se añadieron a cada pocillo 50 μL de compuesto de prueba diluido en serie 4 veces o solución de cultivo de control y se cultivaron durante 72 horas. Se drenó la solución de cultivo y se añadieron a cada pocillo 120 μL de solución de detección de MTS (100 μL de medio de cultivo fresco y 20 μL de solución de MTS), se incubó a 37 °C y se leyó el valor de OD490. Se utilizó el software GraphPad PrismS para analizar y procesar los datos para obtener IC₅₀.

45 Los resultados mostraron que todos los compuestos 1-8 en los ejemplos anteriores exhibieron actividad antiproliferativa significativa contra MV-4-11, y algunos compuestos tenían la misma o mayor actividad que Sunitinib (véase la Tabla 2).

50

Tabla 2. Efecto inhibitor de los compuestos de Fórmulas 1-8 sobre la proliferación *in vitro* de la cepa celular MV-4-11 humana

Compuestos	IC ₅₀ (nM)
1	59.3
2	178.1
3	138.0
4	62.2
5	66.0
6	103.0
7	82.2
8	82.3
Sunitinib	74.3

Ejemplo 12

Efecto inhibitor sobre el tumor MV-4-11 trasplantado por vía subcutánea en ratones desnudos *in vivo*

5 Se cultivaron y expandieron *in vitro* células MV-4-11 (cepa de células de leucemia mieloide bifenotípica aguda humana mutante FLT3-ITD, ATCC), y las células en la fase de crecimiento logarítmico se recogieron y se resuspendieron en una solución de cultivo EMEM sin suero, y la suspensión celular se inyectó por vía subcutánea con una jeringa en la axila de la extremidad delantera derecha de ratones desnudos Balb/c macho. Se observó periódicamente el crecimiento de los animales y del tumor trasplantado; cuando el volumen del tumor creció hasta aproximadamente 100-300 mm³, los animales con un tamaño de tumor moderado se dividieron aleatoriamente en diferentes grupos, consistiendo cada grupo en 6 animales, y se les administró disolvente como blanco (CMC al 0.5%) o el compuesto de Fórmula 5 en los ejemplos anteriores (el compuesto era clorhidrato, con dosis de 2.5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 80 mg/kg, 160 mg/kg), el compuesto de Fórmula 1 en los ejemplos anteriores (clorhidrato, con dosis de 5 mg/kg, 160 mg/kg) o Sunitinib (con dosis de 10 mg/kg, 80 mg/kg), respectivamente, administración intragástrica, una vez al día, y un ciclo de administración sucesivo de 3 semanas; y durante el periodo de administración, se monitorizó el diámetro del tumor y el peso del animal, y se observó el estado de vida del animal; y el experimento se terminó después de 3 semanas de administración, y los animales fueron sacrificados con CO₂ y diseccionados.

20 La fórmula para calcular el volumen del tumor (TV) es $TV = 1/2 \times a \times b^2$, donde a representa el diámetro largo del tumor y b representa el diámetro corto del tumor.

25 Los resultados mostraron que después de la administración intragástrica durante 21 días (el día 36 después de la inoculación), el tumor en el grupo de control con disolvente aumentó hasta casi 6.6 veces el volumen inicial, y el compuesto de Fórmula 5 mostró un efecto antitumoral significativo. Con una dosis de 2.5 mg/kg, el compuesto de Fórmula 5 mostró una inhibición notable sobre el crecimiento del tumor trasplantado, y con una dosis de no menos de 5 mg/kg el tumor trasplantado disminuyó. El efecto antitumoral a una dosis de 10 mg/kg fue obviamente más fuerte que el de Sunitinib a la misma dosis, y fue equivalente al de Sunitinib a una dosis de 80 mg/kg. Además, incluso a una dosis de 160 mg/kg, el compuesto de Fórmula 5 no mostró toxicidad evidente para los animales (no se detectó nada anormal en los síntomas clínicos y la anatomía generales, y el peso del animal sólo disminuyó ligeramente). Ambas dosis del compuesto de Fórmula 1 hicieron que los tumores trasplantados de los ratones desnudos desaparecieran casi por completo y no hubo ningún cambio evidente en el peso de los animales. Sin embargo, con Sunitinib a una dosis de 80 mg/kg, el peso del animal disminuyó significativamente y la toxicidad fue evidente, cercana a la dosis máxima tolerada.

Tabla 3. Efecto inhibitor del clorhidrato del compuesto de Fórmula 5 sobre el tumor trasplantado MV-4-11 en ratones desnudos

	Dosis (mg/kg)	N (inicio/final)	Volumen promedio del tumor (mm ³)	
			d15	d36
Control del disolvente	-	6/6	167.59 ± 13.50	1118.58±76.62
Sunitinib	10	6/6	167.64± 12.88	178.93±13.89**
	80	6/6	167.62±13.27	22.17±1.95**
	160	6/6	167.76± 11.65	359.18 ±49.62**
Compuesto de Fórmula 5	2.5	6/6	167.76 ± 11.65	359.18 ±49.62**
	5	6/6	167.69 ± 11.70	34.71±4.32**
	10	6/6	167.75± 11.59	28.41±3.38**
	80	6/6	167.79 ± 13.04	19.60±4.21**
	160	6/6	167.59 ± 11.93	20.74±1.38**
Compuesto de Fórmula 1	5	6/6	167.89 ± 15.27	18.60±5.46**
	160	6/6	167.70± 12.15	21.60±8.29**

Datos en la Tabla 3: volumen medio del tumor (mm³) ± DE, n = 6

** : P < 0.01, comparado con el grupo de control con disolvente

40 A partir de los resultados experimentales de tumores trasplantados MV-4-11 en ratones desnudos, se puede encontrar que el compuesto de Fórmula 5 (clorhidrato) y el compuesto de Fórmula 1 (clorhidrato) de acuerdo con la presente divulgación tienen un efecto antitumoral selectivo sobre las células de AML humana (MV-4-11) con mutación FLT3-ITD

trasplantadas por vía subcutánea en ratones desnudos. En comparación con Sunitinib, el compuesto de Fórmula 5 (clorhidrato) y el compuesto de Fórmula 1 (clorhidrato) tienen una dosis efectiva más pequeña, una toxicidad más baja, una ventana terapéutica más grande y tienen un mejor valor de desarrollo.

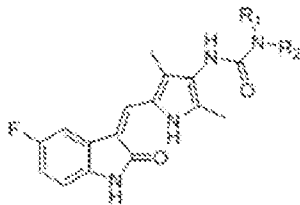
5 En resumen, la presente divulgación supera eficazmente varias deficiencias de la técnica anterior y tiene un alto valor industrial.

10 Se entiende que los ejemplos descritos en el presente documento solo pretenden explicar los principios y efectos de la presente divulgación, en lugar de limitar la presente divulgación. Cualquiera que esté familiarizado con esta tecnología puede modificar o cambiar los ejemplos anteriores sin apartarse del alcance de la presente divulgación.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto o sus sales farmacéuticamente aceptables, mostrándose la fórmula estructural del compuesto en la Fórmula I:

5



Fórmula I

10 donde,

R₁ se selecciona de H, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo;
 R₂ se selecciona de heterocicloalquilo sustituido o no sustituido;
 o R₁ y R₂ forman grupos como se muestra a continuación con un átomo de nitrógeno:

15



en donde Ra se selecciona de alquilo C1-C3 lineal o ramificado; Rb se selecciona de amino; alquilo C1-C3 lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, y un sustituyente se selecciona de amino.

20

2. El compuesto o sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R₂ se selecciona de heterocicloalquilo de 5 o 6 miembros monosustituido, polisustituido o no sustituido, y el sustituyente se selecciona de alquilo C1-C3 lineal o ramificado.

25

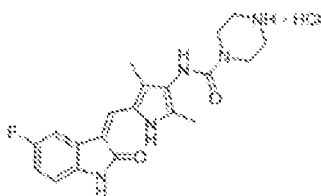
3. El compuesto o sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R₂ se selecciona de 4-piperidinilo y N-metil-4-piperidinilo.

4. El compuesto o sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R₁ se selecciona de H, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo,
 R₂ se selecciona de 4-piperidinilo y N-metil-4-piperidinilo.

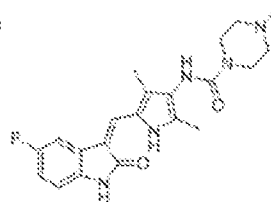
30

5. El compuesto o sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto o sus sales farmacéuticamente aceptables se seleccionan de un compuesto de Fórmula 1, un compuesto de Fórmula 2, un compuesto de Fórmula 3, un compuesto de Fórmula 4, un compuesto de Fórmula 5, un compuesto de Fórmula 6, un compuesto de Fórmula 7 y un compuesto de Fórmula 8, mostrándose las fórmulas estructurales de los compuestos como sigue:

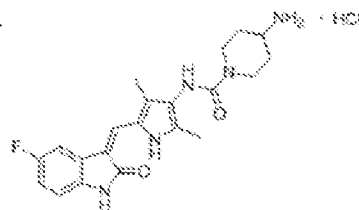
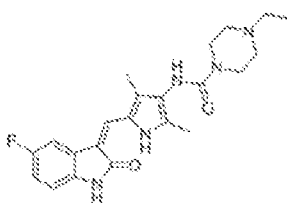
35



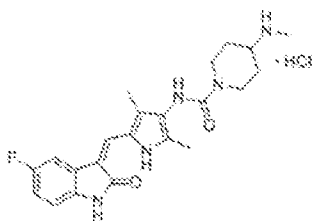
Fórmula 1



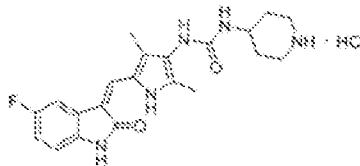
Fórmula 2



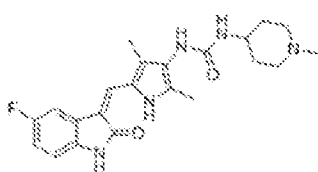
Fórmula 3



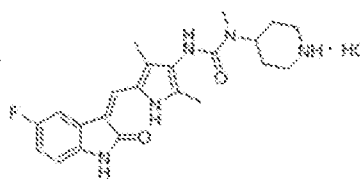
Fórmula 4



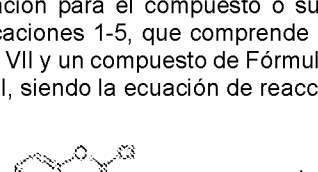
Fórmula 5



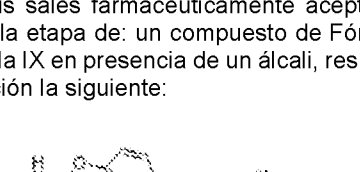
Fórmula 6



Fórmula 7

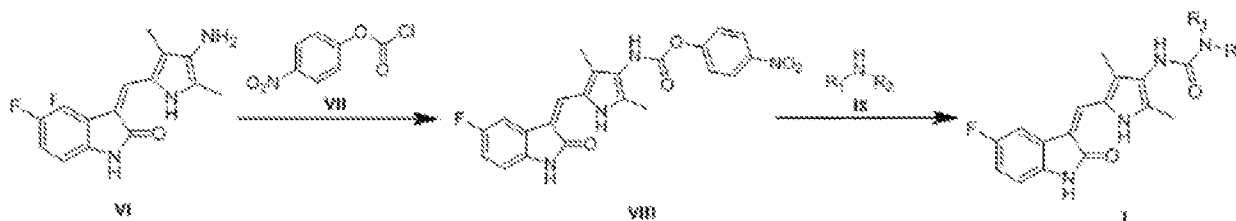


Fórmula 8



6. Un método de preparación para el compuesto o sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende la etapa de: un compuesto de Fórmula VI que reacciona con un compuesto de Fórmula VII y un compuesto de Fórmula IX en presencia de un álcali, respectivamente, para producir el compuesto de Fórmula I, siendo la ecuación de reacción la siguiente:

5



en donde, R₁ y/o R₂ en el compuesto de Fórmula IX tienen la misma definición que la del compuesto de Fórmula I.

7. Compuesto o sales farmacéuticamente aceptables del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para uso como inhibidor del receptor de tirosina quinasa.

10

8. El compuesto o sus sales farmacéuticamente aceptables para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el inhibidor es un inhibidor del receptor de tirosina quinasa multidiana;

15

y/o, el receptor de tirosina quinasa es FLT3 o mutantes del mismo;

y/o el inhibidor es un inhibidor selectivo, en particular un inhibidor selectivo de FLT3 o mutantes del mismo.

9. El compuesto o sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para uso en el tratamiento de tumores, en el que el tumor se selecciona preferiblemente de leucemia mieloide aguda.

20

10. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto o sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

25