

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0808714-8 A2



* B R P I 0 8 0 8 7 1 4 A 2 *

(22) Data de Depósito: 07/03/2008

(43) Data da Publicação: 12/08/2014
(RPI 2275)

(51) Int.Cl.:

A61K 31/4375

A61K 31/4709

A61K 31/496

A61P 35/04

(54) Título: USO DE COMPOSTOS, TAIS COMO 4-AMINO-5-FLUORO-3-[6-(4-METIL PIPERAZINIL-1)- 1H-BENZIMIDAZOLIL-2] QUINOLINONA-(1H)-2 E TAUTÔMEROS, SAIS, E MISTURAS DOS MESMOS NO PREPARO DE MEDICAMENTOS PARA O TRATAMENTO DO MELANOMA

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 09/03/2007 US 60/894,046,
12/04/2007 US 60/911,406

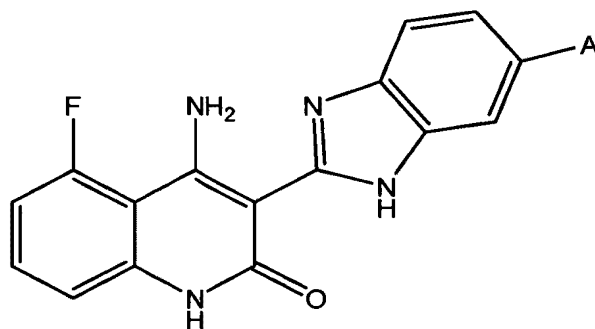
(73) Titular(es): Novartis AG

(72) Inventor(es): Carla C. Heise, Daniel Menezes, Katherine Rendahl, Marion Wiesmann, Nancy Pryer, Paul Hollenbach

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2008056122 de
07/03/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/112509de
18/09/2008



Descritivo da Patente de Invenção para **"USO DE COMPOSTOS, TAIS COMO 4-AMINO-5-FLUORO-3-[6-(4-METIL PIPERAZINIL-1)-1H-BENZIMIDAZOLIL-2] QUINOLINONA-(1H)-2 E TAUTÔMEROS, SAIS, E MISTURAS DOS MESMOS NO PREPARO DE MEDICAMENTOS PARA O TRATAMENTO DO MELANOMA"**.

CAMPO DA INVENÇÃO.

A presente invenção refere-se geralmente a métodos e composições para o tratamento do melanoma em pacientes. Mais particularmente, a presente invenção refere-se ao uso de compostos, tais como 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil piperazinil-1)-1H-benzimidazolil-2] quinolinona-(1H)-2 e tautômeros, sais, e misturas dos mesmos no tratamento do melanoma e no preparo de medicamentos para o tratamento do melanoma.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO.

As veias capilares penetram em quase todos os tecidos do corpo humano e abastecem os tecidos com oxigênio e nutrientes bem como removem produtos inúteis. Sob condições típicas, as células endoteliais que formam as veias capilares não se dividem, e as veias capilares, desse modo, não aumentam normalmente em número ou tamanho em um adulto humano. Sob certas condições normais, entretanto, tal como quando um tecido é danificado, ou durante certas partes do ciclo menstrual, as veias capilares começam a proliferar rapidamente. esse processo de formar novas veias capilares a partir de vasos sanguíneos de preexistentes é conhecido como angiogênese ou neovascularização. Ver Folkman, *J. Scientific American* 275, 150-154 (1996). A angiogênese durante a cura de um ferimento é um exemplo de neovascularização patofisiológica durante a vida adulta. Durante a cura de um ferimento, veias capilares adicionais fornecem abastecimento de oxigênio e nutrientes, promovem o tecido de granulação, e a auxiliam na remoção de resíduos. Depois do final do processo de cura, as veias capilares normalmente retrocedem. 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).

1a

A angiogênese também desempenha um papel importante no crescimento das células do câncer. Conhece-se que uma vez que um aglomerado das células do câncer atinge certo tamanho, rudemente de 1 a 2 mm

Segue-se folha 2

no diâmetro, as células de câncer devem desenvolver-se um sangue abas-
tecem para o tumor para tornar-se maiores como a difusão não será sufici-
ente abastecer às células de câncer bastante oxigênio e nutrientes. Assim,
espera-se que a inibição da angiogênese pare o crescimento das células do
5 câncer.

As quinases de tirosina de receptor (RTKs) são polipeptídios de
transmembrana que regulam o crescimento e desenvolvimneto da célula e
diferenciação, a remodelagem e a regeneração de tecidos adultos. Musto-
nen, T. et al., *J. Cell Biology* 129, 895-898 (1995); van der Geer, P. et al. *Ann*
10 *Rev. Cell Biol.* 10, 251-337 (1994). Os ligantes de polipeptídio conhecidos
como fatores de crescimento ou citocinas, são conhecidos por ativar RTKs.
A sinalização de RTKs envolve o ligante se ligando e uma troca na confor-
mação no domínio externo do receptor resultando na sua dimerização. Lym-
boussaki, A. "*Vascular Endothelial Growth Factors and their Receptors in*
15 *Embryos, Adults, and in Tumors*" Academic Dissertation, University of Hel-
sinki, Molecular/Cancer Biology Laboratory and Department of Pathology,
Haartman Institute, (1999); Ullrich, A. et al., *Cell* 61, 203-212 (1990). A liga-
ção do ligante ao RTK resulta na trans-fosforilação de receptor em resíduos
de tirosina específicos e ativação subsequente dos domínios catalíticos para
20 a fosforilação de substratos citoplasmáticos. Ibd.

Duas subfamílias de RTKs são específicas para o endotélio
vascular. Entre elas incluem-se a subfamília do fator de crescimento endote-
lial vascular (VEGF) e a subfamília do receptor da Tie. As RTKs classe V
incluem as VEGFR1 (FLT-1), VEGFR2 (KDR (humana), Flk-1 (camundon-
25 go)) e a VEGFR3 (FLT-4). Shibuya, M. et al., *Oncogene* 5, 519-525 (1990);
Terman, B. et al., *Oncogene* 6, 1677-1683 (1991); Aprelikova, O. et al., *Can-
cer Res.* 52, 746-748 (1992).

O câncer é uma doença que envolve múltiplos defeitos genéti-
cos que orientam a proliferação das células do tumor. Desse modo, as estra-
30 tégias que inibam simultaneamente caminhos sinalizadores de múltiplas cé-
lulas podem levar a resultados terapêuticos mais favoráveis. A sobre-
expressão de RTK e/ou a ativação de mutações está muitas vezes presente

em células tumorais e está envolvida com o crescimento de tumor. Blume-Jensen, P and Hunter, T., "*Oncogenic Kinase Signaling*", *Nature*, 411, páginas 355-65 (2001); Carmeliet, P., "*Manipulating Angiogenesis in Medicine*", *J. Intern. Med.*, 255, páginas 538-61 (2004). A maior parte das RTKs compreende um domínio extracelular, que está associado com um ligante de acoplamento e domínios de quinase intracelular que medeiam a autofosforilação, o recrutamento de moléculas sinalizadoras a jusante que provocam uma cascata de eventos de transdução de sinal. Existem mais do que 30 RTKs implicadas no câncer, por exemplo RTKs do tipo III (PDGFR, CSF-1R, FLT3, e C-KIT), do tipo IV (FGFR1-4), e do tipo V (VEGFR1-3).

O melanoma é um tumor maligno de melanócitos, que são as células que produzem o pigmento da cor da pele, a melanina. Os melanomas tipicamente surgem na pele, mas podem ocorrer nas superfícies da mucosa ou em qualquer lugar que os melanócitos podem ser encontrados no corpo. Os melanomas podem ser categorizados pelo seu surgimento e comportamento característicos tais como 1) melanoma de extensão superficial (SSM), 2) melanoma nodular (NM), 3) melanoma acral lentiginoso (ALM), 4) melanoma lentigo maligno (LMM), e 5) melanoma lentiginoso da mucosa (MLM). O SSM é o tipo mais comum de melanoma e muitas vezes aparece como uma marca escura, chata, ou ligeiramente elevada na pele de várias cores. Na sua fase radial, inicial, o câncer expande-se pela epiderme e o prognóstico para uma cura é bom. Uma vez que o SSM introduza a fase de crescimento vertical, expande-se na derme e nas estruturas subjacentes e fica mais perigoso e difícil de curar. O NM é o tipo mais agressivo do melanoma, surgindo rapidamente e crescendo tanto ascendente como internamente simultaneamente. Tipicamente aparece como um nódulo na pele uniformemente colorido de preto, embora outras cores sejam possíveis. O ALM é outra forma agressiva do melanoma que ocorre mais frequentemente em pacientes de pele morena. Pode ser marrom, preto ou de cores variadas e pode ser plano ou noduloso. O LMM é o melanoma menos comum e tipicamente ocorre no nariz e nas faces das pessoas idosas. As lesões são planas, podem ser bege, marrons, pretas ou outras cores, e podem tornar-se

bastante grandes (3 cm a 6 cm). O LMM espalha-se lentamente e não tende a metastasear. O MLM é semelhante na aparência ao ALM e ocorre em vários sítios das mucosas, incluindo a cavidade oral, esôfago, ânus, vagina, e conjuntiva. Quando o melanoma permanece localizado, é cirurgicamente ressectado, e as taxas de cura são frequentemente boas. Entretanto, uma vez que o melanoma tenha metastasiado-se além da lesão primária, por exemplo, no sistema linfático e sítios mais distantes, tais como o sistema nervoso central, fígado, ou pulmões, tornando-se muito difícil de tratar. Em 2006 nos Estados Unidos, é estimado que mais de 62.000 novos casos de melanoma ocorreram e mais de 7.900 pacientes morreram de melanoma.

Vários compostos de indolila substituída foram recentemente descritas nas WO 01/29025, WO 01/62251, e WO 01/62252, e vários compostos de benzimidazol foram recentemente descritos na WO 01/28993. Esses compostos são reportadamente capazes da inibição, da modulação e/ou da regulação do sinal de transdução de ambos os tipos de receptor e de não receptor das quinases de tirosina. Alguns dos compostos descritos contêm um fragmento de quinolinona ligado com os grupos indolila ou benzimidazoli-la.

A síntese de derivados 4-hidróxi quinolinona e 4-hidróxi quinolina é descritas em diversas referências estão sendo incorporadas pela referência na sua totalidade com todos os seus objetivos como se totalmente estivessem aqui apresentadas. Por exemplo, Ukrainets et al. descreveram a síntese da 3-(benzimidazolil-2)-4-hidróxi-2-oxo-1,2-di-hidroquinolina. Ukrainets, I. et al., *Tet. Lett.* 42, 7747-7748 (1995); Ukrainets, I. et al., *Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinii*, 2, 239-241 (1992). Ukrainets também descreveu a síntese, a atividade anticonvulsiva e antitireoide de outras 4-hidróxi quinolinonas e tio análogos tais como a 1H-2-oxo-3-(2 benzimidazolil) -4-hidroxiquinolina. Ukrainets, I. et al., *Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinii*, 1, 105-108 (1993); Ukrainets, I. et al., *Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinii*, 8, 1105-1108 (1993); Ukrainets, I. et al., *Chem. Heterocyclic Comp.* 33, 600-604, (1997).

A síntese de vários derivados da quinolina é descrita na WO

97/48694. Esses compostos são descritos como sendo capazes de ligarem-se a receptores hormonais nucleares e sendo úteis para a estimulação da proliferação de osteoblasto e crescimento de ossos. Os compostos são também descritos como sendo úteis no tratamento ou na prevenção de doenças associadas com famílias de receptor hormonais nucleares.

Os vários derivados da quinolina nos quais o anel benzênico da quinolina é substituído com um grupo contendo enxofre são descritos na WO 92/18483. Esses compostos são descritos como sendo úteis em formulações farmacêuticas e como medicamentos.

Os derivados da quinolona e da cumarina foram descritos como possuindo uso em várias aplicações não relacionadas com medicamentos e formulações farmacêuticas. As referências que descrevem a preparação de derivados de quinolona para uso em composições fotopolimerizáveis ou para propriedades luminescentes incluem: Patente dos Estados Unidos Nº US 5.801.212 emitida para et al Okamoto.; JP 8-29973; JP 7-43896; JP 6-9952; JP 63-258903; EP 797376; e DE 23 63459 que são todas aqui incorporadas pela referência na sua totalidade com todos os objetivos como se estivessem completamente aqui apresentadas.

Os vários compostos de benzimidazol de quinolinona úteis na inibição da angiogênese, na inibição das quinases de tirosina do receptor do fator de crescimento endotelial vascular e na inibição de outras quinases de tirosina e serina/treonina que incluem a 4-amino-5-fluoro-3-[5-(4-metil piperazinil-1)-1H-benzimidazolil-2] quinolinona-(1H)-2, ou tautômero da mesma, são descritos nos seguintes documentos que são, cada um, aqui incorporados pela referência nas suas totalidades e com todos os objetivos como se estivessem completamente aqui apresentados: Patente dos Estados Unidos Nº US 6.605.617; Patente dos Estados Unidos Nº US 6.756.383; Pedido Patente dos Estados Unidos Nº 10/116.117 arquivado (publicado no dia 6 de fevereiro de 2003, como US 2003/0028018); Pedido Patente dos Estados Unidos Nº 10/644.055 (publicado no dia 13 de maio de 2004, Publicação de Pedido de Patente dos Estados Unidos Nº 2004/0092535); Pedido Patente dos Estados Unidos Nº 10/983.174; Pedido Patente dos Estados Unidos Nº

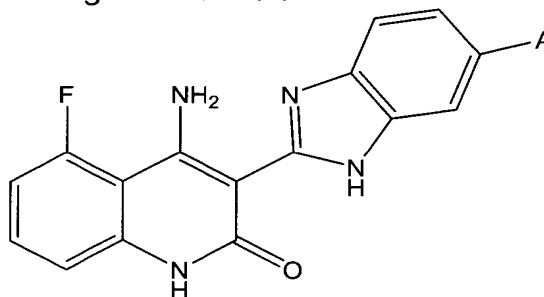
10/706.328 (publicado no dia 4 de novembro de 2004, como US 2004/0220196); Pedido Patente dos Estados Unidos Nº 10/982.757 (publicado no dia 3 de junho de 2005 como US 2005/0137399); Pedido Patente dos Estados Unidos Nº 10/982.543 (publicado no dia 22 de setembro de 2005 como US 2005/0209247).

Apesar dos avanços recentes nos métodos de tratamento de tumores e de câncer, ainda existe uma necessidade importante para novos métodos de tratamento do câncer e especialmente para novos métodos e composições para tratamento do melanoma.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO.

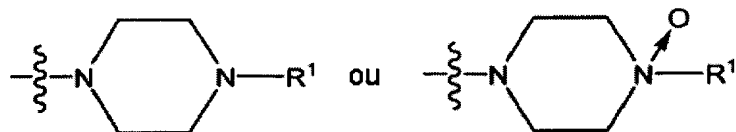
A presente invenção fornece métodos de tratamento do melanoma e particularmente melanoma metastasiado. A presente invenção também fornece o uso de compostos, tautômeros dos mesmos, sais dos mesmos e misturas dos mesmos, utilizados em formulações farmacêuticas e medicamentos para o tratamento do melanoma.

Em um aspecto, a presente invenção fornece métodos de tratamento do melanoma em um paciente, tais como um paciente de melanoma humano. O melanoma pode ser um melanoma cutâneo ou um melanoma extracutâneo. Em algumas modalidades, é fornecido um método de tratamento dos melanomas metastasiados. Os métodos incluem a administração em um paciente de uma quantidade eficaz de um composto da Estrutura I, um tautômero do composto, um sal farmacêuticamente aceitável do composto, um sal farmacêuticamente aceitável do tautômero, ou uma mistura dos mesmos. A Estrutura I tem a seguinte fórmula:



I

A é um grupo que tem uma das seguintes Estruturas:

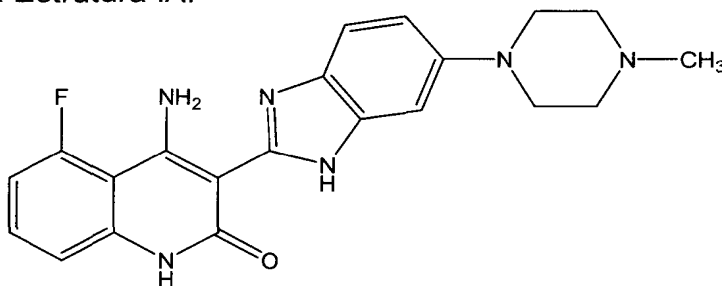


em que,

R¹ é selecionado de H ou grupos alquila de cadeia reta ou ramificada possuindo de 1 a 6 átomos de carbono.

5 Em várias modalidades dos métodos da presente invenção, o crescimento do melanoma no paciente é inibido, a doença regride ou é estabilizada, depois da administração de um composto tal como o aqui divulgado, ou alternativamente, o tamanho e/ou a extensão do melanoma é reduzida no paciente depois da administração.

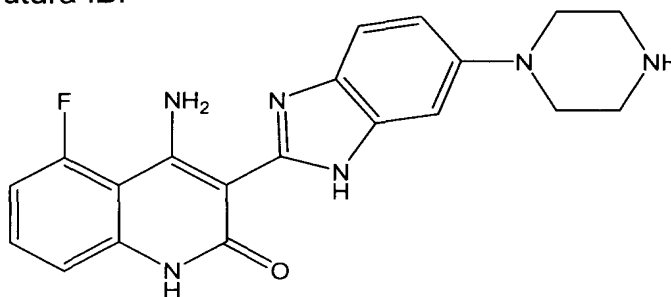
10 Em algumas modalidades, R¹ é um grupo metila, e o composto da Estrutura I tem a Estrutura IA:



IA

O composto da Estrutura IA é também aqui referido como "Composto 1", "TKI258", ou 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil piperazinil-1)-1H-benzimidazolil-2]-1H-quinolinona-2.

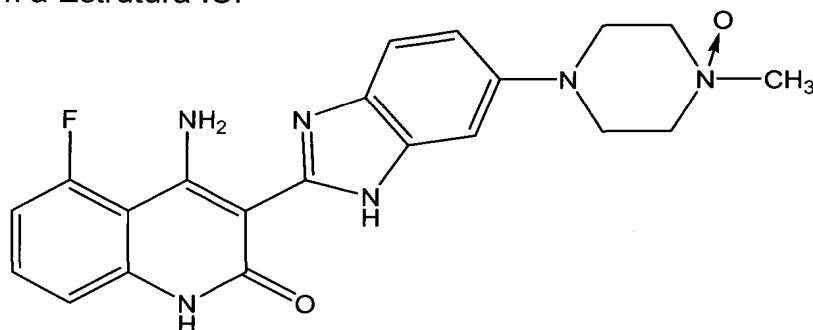
15 Em algumas modalidades, R¹ é um hidrogênio, e o composto da Estrutura I tem a Estrutura IB:



IB

O composto da Estrutura IB é também aqui referido como "Composto 2" ou 4-amino-5-fluoro-3-[6-(piperazinil-1)-1H-benzimidazolil-2]-1H-quinolinona-2.

Em algumas modalidades, R¹ é um grupo metila, e o composto da Estrutura I tem a Estrutura IC:



IC

O composto da Estrutura IC é também aqui referido como "Composto 3", ou 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-4-oxidopiperazinil-1)-1H-benzimidazolil-2]-1H-quinolinona-2.

Em algumas modalidades, o composto é um composto da Estrutura I, IA, IB, ou IC, e o sal de lactato do composto ou o tautômero é administrado ao paciente.

Em algumas modalidades, o melanoma expressa o receptor 1, 2, 3 e/ou 4 do fator de crescimento de fibroblasto do tipo selvagem ou mutante. Em outras modalidades, o melanoma expressa a c-Kit tipo selvagem ou mutante. Em ainda outras modalidades, o melanoma expressa os receptores 1 e 2, 1 e 3, 1 e 4, 2 e 3, 2 e 4, 3 e 4, ou 1, 2, e 3, ou 1, 2, 3, e 4 do fator de crescimento de fibroblasto. Em certos melanomas que podem ser tratados de acordo com métodos aqui descritos, são expressados um ou mais FGFR1, FGFR2, FGFR3, ou FGFR4 do tipo selvagem ou mutante. Os melanomas de queratina que podem ser tratados pelos métodos aqui descritos expressam c-Kit do tipo selvagem ou mutante. Em ainda outras modalidades, o melanoma expressa as proteínas do Raf tipo selvagem, o Raf mutante, o Ras tipo selvagem, o Ras mutante, c-Kit tipo selvagem e/ou c-Kit mutante.

Vários tipos diferentes de melanoma podem ser tratados de a-

cordo com os presentes métodos incluindo, por exemplo, melanoma de extensão superficial, melanoma nodular, melanoma acral lentiginoso, melanoma lentigo maligno, e melanoma lentiginoso da mucosa. O melanoma primário também pode ser cutâneo ou extracutâneo. Os melanomas malignos primários extracutâneos incluem o melanoma ocular e o sarcoma de célula clara dos tecidos mols. As indicações adicionais incluem melanomas raros ou lesões pré-cancerosas onde a relevância dos alvos de RTK pode ser implicada. Os presentes métodos são também úteis no tratamento do melanoma que tenha metastasiado.

Os métodos de tratamento do melanoma também incluem a administração de um ou mais fármacos anticâncer para o tratamento do melanoma com um composto tal como aqui definido. Por exemplo, os fármacos anticâncer para o tratamento do melanoma, especialmente do melanoma metastático, podem ser selecionados da alquilação dos fármacos anticâncer, tais como dacarbazina, temozolomida, mecloretamina, e nitrosoureas, tais como carmustina, lomustina, e fotemustina; taxanos, tais como paclitaxel e docetaxel; alcaloides da vinca, tais como vinblastina; inibidores da topoisomerase, tais como irinotecano; talidomida; antibióticos anticâncer, tais como estreptozocina e dactinomicina; ou fármacos anticâncer à base de platina, tais como cisplatina e carboplatina. Os compostos da presente invenção podem ser acrescentados a regimes poliquimioterapêuticos, tais como o regime Dartmouth, CVD (cisplatina, vinblastina e dacarbazina) e BOLD (bleomicina, vincristina, lomustina, e dacarbazina). Em algumas modalidades, os fármacos anticâncer são selecionadas de interferons tais como, mas não limitados a, interferon-alfa-2a, interferon alfa-2b, interferons PEG-lados, tais como interferon-alfa 2b PEG-lado. Interleucinas, tais como interleucina 2 também podem ser usadas em combinação com os compostos aqui descritos.

Nos métodos de tratamento do melanoma aqui descritos, a quantidade terapeuticamente eficaz do composto pode variar de aproximadamente 0,25 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal do paciente. Em algumas modalidades, a quantidade terapeuticamente eficaz do

composto pode variar de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, ou de aproximadamente 1 ou 2 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Em outras modalidades, a quantidade do composto administrado ao paciente varia de aproximadamente 25 a aproximadamente 1.500 mg/dia e, preferivelmente, de aproximadamente 100 ou 200 mg/dia a aproximadamente 500 ou 600 mg/dia.

Em algumas modalidades, os métodos de tratamento do melanoma aqui descritos também compreendem a administração do composto de acordo com a fórmula I, IA, IB, ou IC como parte de um ciclo de tratamento. Um ciclo de tratamento inclui uma fase de administração durante a qual o composto de acordo com a fórmula I, IA, IB, ou IC é fornecido ao paciente base sobre uma regular e um intervalo, durante o qual o composto não é administrado. Por exemplo, o ciclo de tratamento pode compreender a administração de uma quantidade do composto de acordo com a fórmula I diariamente por 7, 14, 21, ou 28 dias, seguidos por 7 ou 14 dias sem a administração do composto. Em algumas modalidades, o ciclo de tratamento compreende a administração de uma quantidade do composto diariamente durante 7 dias, seguidos por 7 dias sem a administração do composto. Um ciclo de tratamento pode ser repetido uma ou mais vezes, tal como duas, quatro ou seis vezes, para fornecer um curso de tratamento. Mais genericamente, um curso do tratamento refere-se a um período do tempo durante o qual o paciente submete-se ao tratamento do melanoma pelos presentes métodos. Desse modo, um curso de tratamento pode referir-se ao período de tempo durante o qual o paciente recebe doses diárias ou intermitentes do composto aqui divulgado, bem como o período do tempo que estende por um ou mais ciclos de tratamento. Além disso, o composto pode ser administrado uma vez, duas vezes, três vezes ou quatro vezes, diariamente, durante a fase de administração do ciclo de tratamento. Em outras modalidades, os métodos também compreendem a administração de uma quantidade do composto uma vez, duas vezes, três vezes, ou quatro vezes diariamente ou

um dia sim, um dia não, durante um curso do tratamento.

Assim, a presente invenção também fornece métodos para o tratamento do melanoma compreendendo a administração, a um paciente que tem câncer, de um composto possuindo fórmula I, IA, IB, ou IC, um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, tautômero do mesmo, ou um sal farmacologicamente aceitável do tautômero, em que a quantidade do composto administrado em um primeiro ciclo de tratamento é 25 mg por dia, e a quantidade do composto administrado é aumentada com cada ciclo de tratamento subsequente, até que 1.500 mg do composto sejam administrados ao paciente por dia ou a dose-limite de toxicidade seja observada no paciente. Tipicamente em tais métodos, a quantidade do composto administrado é dobrada com cada ciclo de tratamento subsequente depois do primeiro. Por exemplo, um primeiro ciclo de tratamento podendo incluir a administração de 25 mg/dia ao paciente e o ciclo de tratamento subsequente pode compreender a administração de 50 mg/dia ao paciente. Em algumas modalidades, o ciclo de tratamento compreende a administração da mesma quantidade do composto diariamente durante 7 dias, seguidos por 7 dias sem administração do composto.

Em um aspecto, a presente invenção fornece o uso de um composto da Estrutura I, IA, IB, e/ou IC, um tautômero do composto, um sal farmacologicamente aceitável do composto, um sal farmacologicamente aceitável do tautômero, ou uma mistura dos mesmos para a preparação de um medicamento ou uma formulação farmacêutica para uso em qualquer uma das modalidades de qualquer um dos métodos da presente invenção.

Em outro aspecto, a presente invenção fornece um kit incluindo um reservatório compreendendo um composto da Estrutura I, IA, IB, e/ou IC, um tautômero do composto, um sal farmacologicamente aceitável do composto, um sal farmacologicamente aceitável do tautômero, ou uma mistura dos mesmos. O kit podendo incluir outro composto para uso no tratamento do melanoma. O kit podendo incluir também uma descrição por escrito com orientações para executar os métodos da presente invenção. Em algumas modalidades, a descrição por escrito pode ser incluída como um documento de

papel que é separado do reservatório do kit, enquanto que em outras modalidades, a descrição por escrito pode ser escrita sobre um rótulo que é afixado ao reservatório do kit.

Os objetivos adicionais, as características e as vantagens da presente invenção serão evidentes a partir da seguinte descrição detalhada e dos desenhos.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS.

FIGURA 1: Mostra a caracterização da expressão da FGFR 1 a 4 por Western blot em células de melanoma.

FIGURA 2: O Composto 1 exibe uma potente atividade antiangiogênica em um ensaio de tampão de matrigel dirigido por bFGF.

FIGURA 3: É um gráfico mostrando o efeito antitumoral significativo sobre o volume médio do tumor pelo Composto 1 no Modelo de xenoinxerto de melanoma humano A375M (Mutante B-Raf).

FIGURA 4: É um gráfico mostrando o efeito antitumoral significativo sobre o volume médio do tumor pelo Composto 1 no Modelo de xenoinxerto de melanoma humano CHL-1 (B-Raf Tipo Selvagem).

FIGURA 5: É um gráfico mostrando o efeito antitumoral significativo sobre o volume médio do tumor da terapia de combinação com Composto 1, carboplatina e paclitaxel sobre o melanoma A375M (BRaf mutante) modelo em camundongos nu/nu.

FIGURA 6: É um gráfico mostrando o significativo efeito antitumoral, sobre o volume médio do tumor, da administração do Composto 1 em doses diárias e/ou semanais de carboplatina e paclitaxel contra tumores de melanoma CHL-1 em camundongos Nu/Nu fêmeas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO.

Presente invenção fornece métodos de tratamento do melanoma, particularmente do melanoma metastasiado. A invenção também fornece o uso de compostos (por exemplo, compostos da Estrutura I, IA, IB, e IC), tautômeros, sais, e misturas dos mesmos na preparação de medicamentos ou formulações farmacêuticas para o tratamento do melanoma. Não desejando ficar presos pela teoria, os efeitos surpreendentemente eficazes dos

compostos descritos no tratamento do melanoma são acreditados como resultantes da atividade dupla dos compostos. Os compostos da presente invenção são considerados como exercendo um efeito antitumoral sobre o melanoma pela inibição das células do melanoma expressando um ou mais receptores FGF e pela inibição da angiogênese relacionada ao melanoma pelo bloqueio das VEGFR, FGFR e PDGFR β . Os compostos aqui descritos também podem ser eficazes contra melanomas do tipo selvagem ou genótipos dos mutantes Raf ou Ras.

As seguintes abreviaturas e definições são usadas em todas as partes do presente pedido:

"bFGF" é uma abreviatura que representa o fator de crescimento de fibroblasto básico.

"C-kit" também é conhecido como receptor do fator de célula-tronco ou receptor do fator de crescimento de mastócito.

"CSF-1R" é uma abreviatura para o receptor 1 do fator estimulante de colônia.

"FGF" é uma abreviatura do fator de crescimento de fibroblasto que interage com FGFR1, FGFR2, FGFR3, e FGFR4.

"FGFR1", também referido como bFGFR, é uma abreviatura que representa uma quinase de tirosina que interage com o fator de crescimento de fibroblasto, FGF. As quinases de tirosina de receptor relacionadas incluem FGFR2, FGFR3, e FGFR4. Uma ou mais dessas quinases são frequentemente expressadas no melanoma (ver Exemplos).

"Flk-1" é uma abreviatura que representa a quinase 1 de tirosina de fígado fetal, também conhecido como domínio de inserção da quinase da quinase de tirosina ou KDR (humana), também conhecido como receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2 ou VEGFR2 (KDR (humana), Flk-1 (camundongo)).

"FLT-1" é uma abreviatura que representa a quinase 1 de tirosina similar à fms, também conhecida como receptor do fator de crescimento endotelial vascular 1 ou VEGFR1.

"FLT-3" é uma abreviatura que representa a quinase 3 de tirosi-

na semelhante à fms, também conhecida como quinase 1 de tirosina da célula-tronco (STK I).

"FLT-4" é uma abreviatura que representa a quinase 4 de tirosina semelhante à fms, também conhecida como VEGFR3.

5 "MIA" representa a atividade inibidora de melanoma. A proteína MIA tal como aqui utilizado, refere-se a uma proteína solúvel de 12 kDa publicamente disponível no banco de dados GenBank sob o número de acesso NP_006524, codificado pelo cDNA enumerado sob número de acesso do GenBank NM_006533, e os homólogos mamíferos ou um fragmento do
10 mesmo compreendendo pelo menos dez resíduos consecutivos da proteína MIA. A proteína MIA foi mostrada como estando envolvida no descarte de células de melanoma da matriz extracelular pela ligação da fibronectina com moléculas de laminina, evitando assim interação entre matriz e célula (Brochez L. et al., *Br. J. Dermatol.* 143:256268 (2000)). A presente ou a concentração da proteína MIA medida antes e depois do tratamento podem ser usadas para determinar a resposta de um paciente mamífero ao tratamento
15 com um agente inibidor de melanoma.

"MEK1" é uma abreviatura que representa uma quinase de treonina de serina no caminho de transdução de sinal MAPK (quinase de proteína
20 ativada por mitogene) em um módulo que é formado de Raf-MEK1-ERK. A MEK1 fosforila a ERK (quinase regulada extracelular).

"PDGF" é uma abreviatura que representa o fator de crescimento de derivado de plaqueta. A PDGF interage com as quinases de tirosina PDGFR α e PDGFR β .

25 "Raf" é uma quinase de serina/treonina no caminho de transdução de sinal de MAPK.

"RTK" é uma abreviatura que representa o receptor da quinase de tirosina.

"Tie-2" é uma abreviatura que representa a quinase de tirosina
30 com domínios de homologia de Ig e de EGF.

"VEGF" é uma abreviatura que representa o fator de crescimento endotelial vascular.

"VEGF-RTK" é uma abreviatura que representa a quinase de tirosina de receptor do fator de crescimento endotelial vascular.

Geralmente, referência para certo elemento, tal como hidrogênio ou H tem o significado de para incluir todos os isótopos daquele elemento.

- 5 Por exemplo, se um grupo do composto da estrutura é deixado ou é mostrado como H, então isto é definido para incluir o hidrogênio ou H, o deutério, e o trítio.

A frase "grupos alquila de cadeia reta ou ramificada possuindo de 1 a 6 átomos de carbono" refere-se a grupos alquila acíclicos que não
 10 contêm heteroátomos e incluem de 1 a 6 átomos de carbono. Assim, a frase inclui grupos alquila de cadeia reta tal como, por exemplo, metila, etila, propila, butila, pentila, e hexila. A frase também inclui isômeros de cadeia ramificada de grupos alquila de cadeia reta, incluindo mas não-limitada ao seguinte: $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$,
 15 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, e assim por diante. Em algumas modalidades, os grupos alquila incluem grupos alquila de cadeia reta ou ramificada que têm de 1 a 6 átomos de carbono. Em outras modalidades, os
 20 grupos alquila têm de 1 a 4 átomos de carbono. Em ainda outras modalidades, os grupos alquila são grupos alquila de cadeia reta que têm de 1 a 2 átomos de carbono (grupo metila ou etila). Em ainda outras modalidades, os grupos alquila têm somente 1 átomo de carbono e são um grupo metila ($-\text{CH}_3$).

- 25 "Um sal farmaceuticamente aceitável" inclui um sal com uma base inorgânica, base orgânica, ácido inorgânico, ácido orgânico, ou aminoácido básico ou ácido. Como sais das bases inorgânicas, a invenção inclui, por exemplo, metais alcalinos, tais como sais de potássio ou sódio; metais alcalino-terrosos, tais como cálcio, magnésio ou sais de alumínio; e sais de amônio. Como sais das bases orgânicas, a invenção inclui, por exemplo,
 30 sais formados com trimetilamina, trietilamina, piridina, picolina, etanolamina, dietanolamina, ou trietanolamina. Os sais de ácidos inorgânicos incluem, por

exemplo, ácido clorídrico, ácido borídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, e sais ácidos fosfóricos. Como sais dos ácidos orgânicos, a presente invenção inclui, por exemplo, sais de ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico, ácido metanossulfônico, ácido benzenossulfônico, e ácido p-toluenossulfônico. Como sais dos aminoácidos básicos, a presente invenção inclui, por exemplo, arginina, lisina e sais de ornitina. Os sais de aminoácidos incluem, por exemplo, sais de ácido glutâmico e ácido aspárticos.

Os compostos da Estrutura I são rapidamente sintetizados utilizando o procedimento descrito na seção seguinte dos Exemplos e divulgado nos seguintes documentos que são, cada um, desse modo incorporado pela referência nas suas totalidades e com todos os objetivos como se estivessem completamente aqui apresentados: Patente dos Estados Unidos Nº US 6.605.617, Pedido Patente dos Estados Unidos Nº 10/644.055 (publicado como US 2004/0092535, Pedido Patente dos Estados Unidos Nº 10/983.174 (publicado como US 2005/0261307 dos Estados Unidos), Pedido Patente dos Estados Unidos Nº 10/726.328 publicado como 2004/0220196 dos Estados Unidos, Pedido Patente dos Estados Unidos Nº 10/982.757 (publicado como os US 2005/0137399, Pedido Patente dos Estados Unidos Nº 10/982.543 (publicado como US 2005/209247), e Pedido de Patente de PCT Nº PCT/US2006/019349 (publicado como WO 2006/125130).

Os compostos da Estrutura I, tautômeros dos compostos, os sais farmaceuticamente aceitáveis dos compostos, os sais farmaceuticamente aceitáveis dos tautômeros, e as misturas dos mesmos podem ser usados para preparar medicamentos e formulações farmacêuticas. Tais medicamentos e as formulações farmacêuticas podem ser usados nos métodos do tratamento aqui descrito.

As formulações farmacêuticas podem incluir quaisquer dos compostos, tautômeros, ou sais de quaisquer das modalidades descritas acima em combinação com um veículo farmaceuticamente aceitável, tais como os aqui descritos.

A presente invenção também fornece composições que podem ser preparadas pela mistura de um ou mais compostos da presente invenção, ou tautômeros de sais farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos, ou misturas dos mesmos com veículos farmaceuticamente aceitáveis, excipientes, ligantes, diluentes ou similares para tratar ou melhorar os distúrbios relacionados a tumores metastasiados. As composições da invenção podem ser usadas para criar formulações usadas para tratar tumores metastasiados tal como aqui descrito. Tais composições podem estar na forma de, por exemplo, grânulos, pó, comprimidos, cápsulas, xarope, supositórios, injeções, emulsões, elixires, suspensões ou soluções. As composições instantâneas podem ser formuladas para diversas vias da administração, por exemplo, para administração oral, para administração nasal, para administração retal, injeção subcutânea, injeção intravenosa, injeções intramusculares, ou injeção intraperitoneal. As seguintes formas de dosagem são fornecidas como forma de exemplo e não devem ser interpretadas como limitação da presente invenção.

Para a administração oral, bucal e sublingual, o pó, as suspensões, os grânulos, os comprimidos as pílulas, as cápsulas, as cápsulas gelatinosas, e as drágeas são aceitáveis como formas de dosagem sólida. Essas formas podem ser preparadas, por exemplo, pela mistura de um ou mais compostos da presente invenção, sais farmaceuticamente aceitáveis, tautômeros, ou misturas dos mesmos, com pelo menos um aditivo, tal como um amido ou outro aditivo. Os aditivos adequados são sacarose, lactose, açúcar de celulose, manitol, maltitol, dextrano, amido, ágar, alginatos, quitinas, quitosanas, pectina, goma de tragacanto, goma arábica, gelatina, colágenos, caseína, albumina, polímeros sintéticos ou semissintéticos ou glicerídeos. Opcionalmente, as formas de dosagem oral podem conter outros ingredientes para ajudar na administração, tal como um diluente ou lubrificantes inativos, tais como estearato de magnésio, ou conservantes, tais como parabeno ou ácido sórbico, ou antioxidantes, tais como ácido ascórbico, tocoferol ou cisteína, um agente desagregante, ligantes, espessantes, tampões, adoçantes, agentes aromatizantes ou agentes perfumantes. Os comprimidos e as

pílulas podem ser também tratados com materiais de revestimento adequados conhecidos na técnica.

As formas de dosagem líquidas para administração oral podem estar na forma de emulsões farmaceuticamente aceitáveis, xaropes, elixires, suspensões, e soluções, que podem conter um diluente inativo, tal como a água. As formulações farmacêuticas e os medicamentos podem ser preparados como suspensões ou soluções líquidas usando um líquido estéril, tal como, mas não-limitados a, um óleo, água, um álcool, e combinações dos mesmos. Os tensoativos farmaceuticamente adequados, agentes de suspensão, agentes de emulsificação, podem ser acrescentados para administração oral ou parenteral.

Como observado acima, as suspensões podem incluir óleos. Tal óleo inclui, mas é não-limitado a, óleo de amendoim, óleo de gergelim, óleo de caroço de algodão, óleo de milho e azeite de oliva. A preparação de suspensão também pode conter ésteres de ácidos graxos, tais como oleato de etila, miristato de isopropila, glicerídeos de ácido graxo e glicerídeos de ácido graxo acetilado. As formulações de suspensão podendo incluir álcoois, tal como, mas não-limitadas a, etanol, álcool isopropílico, álcool hexadecílico, glicerol e propileno glicol. Éteres, tais como, mas não-limitados a, poli(etileno glicol), hidrocarboneto de petróleo, tal como óleo mineral e petrolato; e água também pode ser usada em formulações de suspensão.

Para a administração nasal, as formulações farmacêuticas e os medicamentos podem ser um *spray* ou aerossol contendo um solvente apropriado e opcionalmente outros compostos tais como, mas não-limitados a, estabilizadores, agentes antimicrobianos, antioxidantes, modificadores de pH, tensoativos, modificadores de biodisponibilidade e combinações dos mesmos. Um propelente para uma formulação de aerossol pode incluir o ar comprimido, o nitrogênio, o gás carbônico, ou um hidrocarboneto baseado num solvente de baixo ponto de ebulição.

As formas de dosagem injetáveis geralmente incluem suspensões aquosas ou suspensões de óleo que podem ser preparadas utilizando de um dispersante adequado ou agente umectante e um agente de suspen-

são. As formas injetáveis podem estar em fase de solução ou na forma de uma suspensão, que é preparada com um solvente ou diluente. Os solventes ou os veículos aceitáveis incluem a água esterilizada, a solução de Ringer, ou um isotônico de solução salina aquosa. Alternativamente, os óleos estéreis podem ser empregados como agentes de suspensão ou solventes. Preferivelmente, o óleo ou o ácido graxo são não voláteis, incluindo óleos naturais ou sintéticos, ácidos graxos, mono, di ou triglicerídeos.

Para a injeção, a formulação farmacêutica e/ou o medicamento podem ser um pó adequado para a reconstituição tal como descrito acima com uma solução apropriada. Os exemplos dos mesmos incluem, mas não são limitados a, liofilização, secagem rotativa ou pó seco por atomização, pó amorfo, grânulos, precipitados, ou particulados. Para a injeção, as formulações podem conter opcionalmente estabilizadores, modificadores de pH, tensoativos, modificadores de biodisponibilidade e combinações dos mesmos.

Para a administração retal, as formulações farmacêuticas e os medicamentos podem estar na forma de um supositório, uma pomada, um enema, um comprimido ou um creme para liberação do composto nos intestinos, na flexão sigmoide e/ou no reto. Os supositórios retais são preparados pela mistura de um ou mais compostos da presente invenção, ou sais farmacêuticamente aceitáveis ou tautômeros do composto, com veículos aceitáveis, por exemplo, manteiga de cacau ou polietileno glicol, que está presente em uma fase sólida em temperaturas normais de armazenamento, e presente em uma fase líquida naquelas temperaturas adequadas para liberar um fármaco dentro do corpo, tal como no reto. Os óleos também podem ser empregados na preparação de formulações do tipo de gelatina suave e supositórios. A água, a solução salina, a dextrose aquosa e as soluções de açúcar relacionadas, e o glicerois podem ser empregados na preparação de formulações de suspensões que também podem conter agentes de suspensão, tais como pectina, carbâmeros, metil celulose, hidroxipropil celulose ou carboximetil celulose, bem como tampões e conservantes.

Além daquelas formas de dosagem representativas descritas a-

cima, os excipientes farmacologicamente aceitáveis e os veículos são geralmente conhecidos dos versados na técnica e são assim incluídos na presente invenção. Tais excipientes e os veículos são descritos, por exemplo, na "Remingtons Pharmaceutical Sciences", Mack Pub. Co., Nova Jersey (1991),
5 que é incorporado aqui pela referência em sua totalidade com todos os objetivos como se estivessem completamente aqui apresentados.

As formulações da presente invenção podem ser projetadas para serem de rápida atuação, de rápida liberação, ou de ação prolongada, ou de liberação sustentada tal como descrito abaixo. Assim, as formulações
10 farmacêuticas também podem ser formuladas para liberação controlada ou para liberação lenta.

As composições instantâneas também podem compreender, por exemplo, micelas ou lipossomas, ou alguma outra forma encapsulada, ou podem ser administrados em uma forma de liberação extensa para fornecer
15 um armazenamento prolongado e/ou efeito de liberação. Desse modo, as formulações farmacêuticas e os medicamentos podem ser comprimidos em pelotas ou cilindros e implantados intramuscularmente ou subcutaneamente como injeções de depósito ou como implantes, tais como endopróteses expansíveis ("stents"). Tal implante pode empregar materiais inertes conhecidos, tais como silicone e polímeros biodegradáveis.
20

As dosagens específicas podem ser ajustadas dependendo de condições da doença, da idade, do peso corporal, das condições gerais de saúde, do sexo, e da dieta do paciente, dos intervalos das doses, das vias de administração, da taxa de excreção, e das combinações de fármacos. Quais-
25 quer das formas de dosagem acima contendo quantidades eficazes estão bem dentro dos limites da experimentação regular e por isso, bem dentro do alcance da presente invenção.

Uma dose terapeuticamente eficaz pode variar dependendo da via de administração e da forma de dosagem. O composto preferido ou os
30 compostos da presente invenção são uma formulação que exibe um elevado índice terapêutico. O índice terapêutico é a proporção de doses entre efeitos tóxicos e terapêuticos que podem ser expressados como a proporção entre

LD₅₀ e ED₅₀. O LD₅₀ é a dose letal para 50% da população e o ED₅₀ é a dose terapeuticamente eficaz para 50% da população. O LD₅₀ e o ED₅₀ são determinados por procedimentos farmacêuticos-padrão em culturas de célula de animais ou em animais experimentais.

5 Os termos "tratar" e "tratamento" dentro do contexto da presente invenção, significam um alívio, inibição, parada, ou reversão de sintomas associados com um distúrbio ou doença e também a progressão ou a piora daqueles sintomas, ou a prevenção ou a profilaxia da doença ou do distúrbio. Além disso, "tratar" e "tratamento" dentro do contexto da presente invenção, significam a inibição do crescimento do melanoma cutâneo, subcu-
10 tâneo, ou visceral, redução no tamanho do melanoma cutâneo, subcutâneo, ou visceral, redução no número de lesões cutâneas, subcutâneas, ou viscerais, ou redução no tamanho das lesões cutâneas, subcutâneas, ou viscerais. Adicionalmente, "tratar" e "tratamento" dentro do contexto da presente invenção, significam uma alteração em um biomarcador de resposta de do-
15 enças, por exemplo, uma redução nos níveis circulantes da proteína inibidora da atividade do melanoma. Por exemplo, dentro do contexto do tratamento de pacientes portadores de melanoma, o tratamento bem-sucedido pode incluir uma redução da proliferação dos vasos capilares que alimentam o melanoma ou o tecido doente, um alívio dos sintomas relacionados a um
20 crescimento canceroso pelo melanoma, a proliferação de vasos capilares, ou do tecido doente, uma inibição ou interrupção na proliferação capilar, ou uma inibição ou interrupção na progressão do melanoma ou no crescimento ou na metástase de células de melanoma, ou uma regressão ou remissão parcial ou completa do melanoma, estabilização da doença, ou um aumento na sobrevivência total dos pacientes de melanoma.

O tratamento também pode incluir a administração das formulações farmacêuticas da presente invenção em combinação com outras terapias. Por exemplo, os compostos e as formulações farmacêuticas da presente invenção podem ser administrados antes, durante, ou depois de um pro-
30 cedimento cirúrgico e/ou terapia radioativa. Os compostos da presente invenção também podem ser administrados em conjunto com outros fármacos

anticâncer usados no tratamento do melanoma. O termo fármacos anticâncer tem o significado de agentes que são usados para o tratamento de malignidades e crescimentos cancerosos por pessoas versadas na técnica, tais como oncologistas ou outros médicos. Assim, os fármacos anticâncer e os compostos aqui descritos (por exemplo, os compostos da Estrutura I, IA, IB, e IC) podem ser administrados simultaneamente, separadamente ou em sequência. As combinações apropriadas e os regimes de administração podem ser determinados por aqueles versados nas técnicas da medicina e da oncologia.

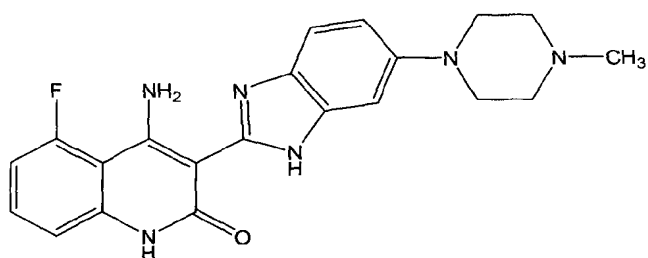
Os compostos e as formulações da presente invenção são particularmente adequados para uso em terapias de combinação já que exibiram, ou é esperado que exibam, um efeito aditivo ou maior do que o efeito aditivo, ou maior que o sinérgico, quando usado em combinação com fármacos anticâncer, tais como taxanos, nitrosoureas, compostos de platina, agentes de alquilação, inibidores das topoisomerasas I e II, alcaloides da vinca, antibióticos anticâncer; interferons, interleucina 2, e tratamento radioativo. Desse modo, em um aspecto, a presente invenção fornece formulações farmacêuticas que incluem o composto da Estrutura I e tautômeros, sais, e/ou misturas dos mesmos, em combinação com um fármaco anticâncer. As combinações podem ser empacotadas separadamente ou em conjunto em kits para administração simultânea, separada, ou sequencial. A invenção também fornece o uso dos compostos, tautômeros, sais, e/ou misturas, para a criação de tais formulações e medicamentos.

Em outro aspecto, a presente invenção fornece um método para tratar o melanoma metastasiado. O método inclui a administração, em um paciente que esteja necessitando do mesmo, de um ou mais fármacos anticâncer selecionados de dacarbazina (DITC-DOME), temozolomida (TEMODAR), carmustina (BCNU, BICNU), lomustina (CCNU, CEENU), fotemustina, paclitaxel (TAXOL), docetaxel (TAXOTERE), vinblastina (VELBAN), irinotecano (CAMPTOSAR); talidomida (THALIDOMID); estreptozocina (zanosar); dactinomicina (COSMEGEN); mecloretamina (MUSTARGEN); cisplatina (PLATINOL-AQ), carboplatina (PARAPLATIN), mesilato de imatinibe (GLE-

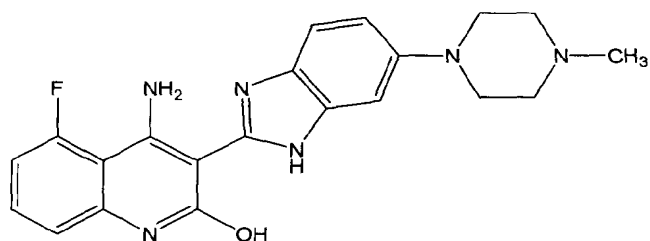
EVEC), sorafenib (BAY43-9006, NEXAVAR), sunitinib (SU1248, AVASTIN), ou erlotinib (TARCEVA). Os compostos da presente invenção podem ser acrescentados a regimes poliquimioterápicos, tais como o regime Dartmouth, CVD (cisplatina, vinblastina, e dacarbazina) e BOLD (bleomicina, vincristina, lomustina, e dacarbazina). Outros agentes quimioterapêuticos adequados para uso em combinação com compostos aqui descritos incluem os discutidos em Lens and Eisen, *Expert Opin Pharmacother*, 2003 4 (12): 2205-2211. Em algumas modalidades, os fármacos anticâncer são selecionados de interferons, tais como, mas não-limitados a, interferon alfa 2a, interferon alfa 2b (INTRON-A), interferons PEG-lados, tais como interferon alfa 2b PEG-lado. Interleucinas, tais como interleucina 2 (proleucina), também podem ser usadas em combinação com os compostos aqui descritos.

Os compostos da presente invenção podem ser usados para o tratamento de vários pacientes. Os pacientes adequados incluem animais, tais como mamíferos e seres humanos. Os mamíferos adequados incluem, mas são não-limitados a, primatas tais como, mas não-limitados a lêmures, símios e macacos; roedores, tais como ratos, camundongos e porcos-da-índia; coelhos e lebres; vacas; cavalos; porcos; cabras; ovelhas; marsupiais; e carnívoros, tais como felinos, caninos e ursinos. Em algumas modalidades, o paciente ou indivíduo é ser humano. Em outras modalidades, o paciente ou indivíduo é um roedor, tal como um camundongo ou um rato. Em algumas modalidades, o paciente ou indivíduo é um animal diferente de um ser humano e em algumas outras modalidades, o paciente ou indivíduo é um mamífero diferente de um ser humano.

Deve se entender que os compostos orgânicos usados na presente invenção podem exibir o fenômeno do tautomerismo. Como as estruturas químicas dentro do presente relatório descritivo podem representar somente uma das formas tautoméricas possíveis, deve se entender que a invenção abrange qualquer forma tautomérica da estrutura desenhada. Por exemplo, a Estrutura IA é mostrada abaixo com um tautômero, o tautômero Ia:

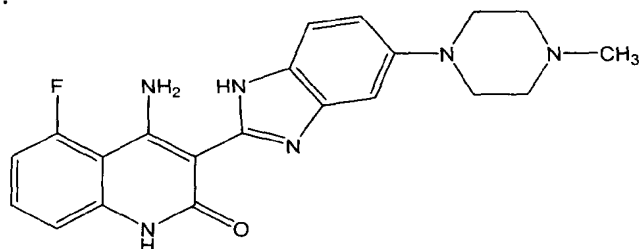


I

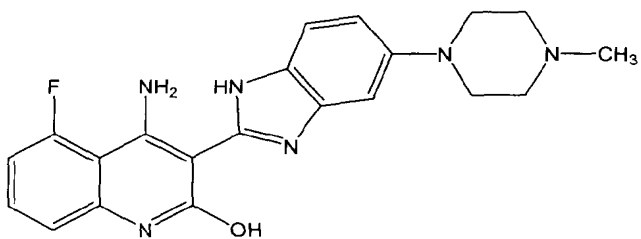


Ia

Outros tautômeros da Estrutura Ia, tautômero Ib e tautômero Ic, são mostrados abaixo:



Ib



Ic

A presente invenção, assim, é geralmente descrita, será entendido mais rapidamente tendo como referência os seguintes exemplos, que
5 são fornecidos como forma de ilustração e não são destinados a limitar a presente invenção.

EXEMPLOS.

As seguintes abreviaturas são usadas em todas as partes do

presente pedido em relação à terminologia química:

- ATP: Trifosfato de adenosine;
 Boc: N-terc-butoxicarbonila;
 BSA: Albumina de Soro Bovina;
 5 DMSO: Dimetilssulfóxido;
 DTT: DL-ditiotreitol;
 DMEM: Modificação da Dulbecco do meio Eagle;
 ED₅₀: Dose terapeuticamente eficaz em 50% da população;
 EDTA: Ácido etileno diamino tetracético;
 10 EGTA: Ácido tetracético etileno glicol;
 EtOH: Etanol;
 FBS: Soro bovino fetal;
 Hepes: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanossulfônico;
 HPLC: cromatografia líquida de alta pressão;
 15 Valor de IC₅₀: Concentração de um inibidor que causa uma redução de 50% em uma atividade medida;
 KHMDS: potássio bis (trimetilsilil) amida;
 LC/MS: Cromatografia líquida / Espectroscopia de massa;
 MOPS: ácido 3-(N-morfolino)-propanossulfônico;
 20 PBS: Salina de Tampão de Fosfato;
 PMSF: Fluoreto de fenil metanossulfonila;
 RIPA: Tampão de lise de célula contendo, por exemplo, 50 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 5 µg/ml de aprotinina, 5 µg/ml Leupeptin, 1% de Triton x-100, desoxicolato de Sódio a
 25 1%, SDS a 0,1%;
 SDS: Dodecil sulfato de sódio;
 TBME: Terc-butil metil éter;
 THF: Tetra-hidrofurano;
 Tris: 2-amino-2-(hidroximetil) propanodiol-1,3
 30 Purificação e Caracterização dos Compostos.

Os compostos da presente invenção são caracterizados por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) utilizando de um sistema

de cromatografia da Waters Millenium com um Módulo de Separação 2690 (Milford, MA). As colunas analíticas são Alltima C-18 fase reversa, 4,6 x 250 mm da Alltech (Deerfield, Illinois). Uma eluição de gradiente foi usada, tipicamente partindo com 5% de acetonitrila/95% de água e progredindo até 100% de acetonitrila durante um período de 40 minutos. Todos os solventes continham o ácido trifluoroacético a 0,1% (TFA). Os compostos são detectados por luz ultravioleta (UV) com absorção em 220 nm ou em 254 nm. Os solventes de HPLC são da Burdick & Jackson (Muskegan, Michigan), ou da Fisher Scientific (Pittsburg, Pensilvânia). Em alguns exemplos, a pureza foi avaliada pela cromatografia em camada fina (TLC) utilizando placas de vidro ou de plástico apoiando sílica-gel, tal como, por exemplo, folhas flexíveis 1B2-F de sílica-gel da Baker-Flex. Os resultados da TLC foram rapidamente detectados visualmente sob ultravioleta, ou empregando vapor de iodo bem conhecido e outras várias técnicas de coloração.

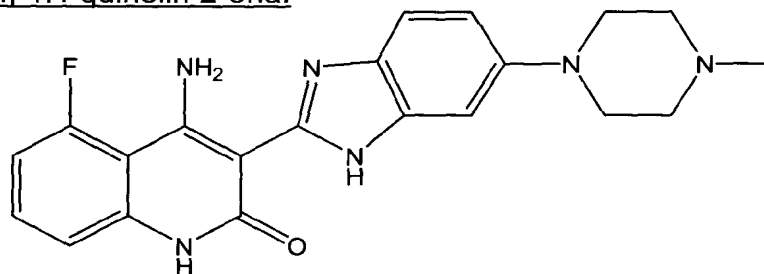
A análise de espectrometria de massa foi executada em um de dois instrumentos LCMS: um Sistema Waters (Alliance HT HPLC e um espectrômetro de massa de ZQ Micromassa; Coluna: Eclipse XDB-C18, 2,1 x 50 mm; sistema solvente: acetonitrila de 5% a 95% em água com TFA a 0,05%; taxa de fluxo 0,8 mL / minuto; faixa de variação de peso molecular 150 a 850; Voltagem de Cone 20 V; temperatura de coluna 40°C) ou um Sistema Hewlett Packard (Série 1100 HPLC; Coluna: Eclipse XDB-C18, 2,1 x 50 mm; sistema solvente: acetonitrila de 1% a 95% em água com TFA a 0,05%; taxa de fluxo 0,4 mL / minuto; faixa de variação de peso molecular de 150 a 850; Voltagem de Cone 50 V; temperatura de coluna 30°C). Todas as massas são informadas como aquelas dos íons originais protonados.

A análise de GC/MS foi executada em um instrumento Hewlett Packard (cromatógrafo de gás Série HP6890 com um Detector Seletivo de massa 5973; volume de injetor: 1 µL; temperatura de coluna Inicial: 50°C; temperatura de coluna Final: 250°C; tempo de variação: 20 minutos; taxa de fluxo de gás: 1 mL / minuto; Coluna: fenil metil siloxano a 5%, Modelo nºHP 190915-443, Dimensões: 30,0 m x 25 µM x 0,25 µm).

As separações preparativas foram realizadas utilizando ou um

sistema de cromatografia rápida 40 e KP-Sil, 60A (Biotage, Charlottesville, Virginia), ou por HPLC utilizando uma coluna de fase reversa C-18. Os solventes típicos empregados para o sistema rápido 40 da Biotage são o diclorometano, o metanol, o acetato de etila, o hexano e a trietilamina. Os solventes típicos empregados para a HPLC de fase reversa são concentrações variadas de acetonitrila e água com o ácido trifluoroacético a 0,1%.

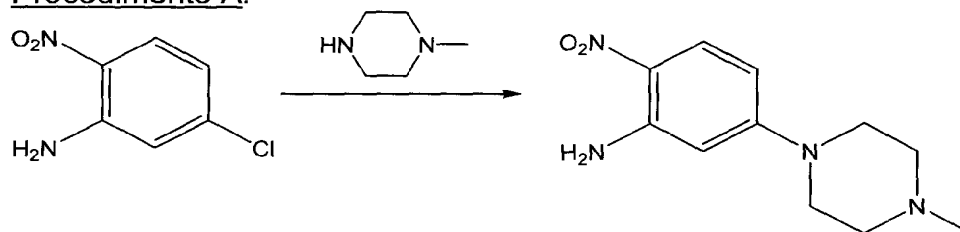
Síntese de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil piperazin-1-il)-1H-benzimidazolil-2-il]-1H-quinolin-2-ona.



A. Síntese de 5-(4-metil-piperazinil-1) -2-nitroanilina.

10

Procedimento A:



A 5-cloro-2-nitroanilina (500 g, 2,898 mmols) e 1 - metil piperazina (871 g, 8,693 mmols) é colocado em um frasco de mL 2000 ajustado com um condensador e purgado com N₂. O frasco foi colocado em um banho de óleo em 100°C e aqueceu-se até que a 5-cloro-2-nitroanilina fosse completamente reagida (tipicamente durante a noite) como determinado por HPLC. Depois que HPLC confirmou o desaparecimento da 5-cloro-2-nitroanilina, a mistura reacional foi vazada diretamente (ainda quente) em 2500 mL de água de temperatura ambiente com a agitação mecânica. A mistura resultante foi agitada até que ele atingisse e depois de temperatura ambiente foi filtrado. O sólido amarelo assim obtido foi acrescentado a 1000 mL de água e agitada durante 30 minutos. A mistura resultante foi filtrada, e o sólido resultante foi lavado com TBME (500 mL, 2X) e depois foi seco sob

vácuo durante uma hora usando uma represa de borracha. O sólido resultante foi transferido para uma bandeja de secagem e secou em um forno de vácuo em 50°C a um peso constante para produzir 670 g (97,8%) do título composto como um pó amarelo.

5 Procedimento B:

 A 5-cloro-2-nitroanilina (308,2 g, 1,79 mol) foi acrescentada a um 5000 mL de 4 gargalos frasco de fundo redondo ajustado com um agitador superior, condensador, entrada de gás, funil de adição, e sensor termos-sensível. O frasco então foi purgado com N₂. 1-metilpiperazina (758,1 g, 840
10 mL, 7,57 mmols) e etanol de ensaio 200 (508 mL) foram adicionados ao frasco de reação com agitação. O frasco foi novamente purgado com N₂, e a reação foi mantida sob N₂. O frasco foi aquecido em um manto acalentador a uma temperatura interna de 97°C (+/- 5°C) e mantido naquela temperatura até que a reação fosse completa (tipicamente aproximadamente 40 horas)
15 como determinado por HPLC. Depois que a reação foi terminada, o aquecimento foi descontinuado e a reação foi resfriada a uma temperatura interna de aproximadamente 20°C a 25°C com agitação, e a reação foi agitada durante 2 para 3 horas. Os cristais de semente (0,20 g, 0,85 mmol) de 5-(4-metil-piperazinil-1) - 2-nitroanilina foram adicionados à mistura reacional a
20 menos que a precipitação já tivesse ocorrido. A água (2.450 mL) foi acrescentada à mistura reacional com agitação durante o período de aproximadamente uma hora enquanto a temperatura interna foi mantida em uma temperatura variando de aproximadamente 20°C a 30°C. Depois que a adição de água foi terminada, a mistura resultante foi agitada durante aproximada-
25 mente uma hora em uma temperatura de 20°C a 30°C. A mistura resultante então foi filtrada, e o frasco e torta da filtração foram lavados com a água (3 x 2,56 L). O produto sólido amarelo de ouro foi seco a um peso constante de 416 g (rendimento de 98,6%) sob vácuo em aproximadamente 50°C em um forno de vácuo.

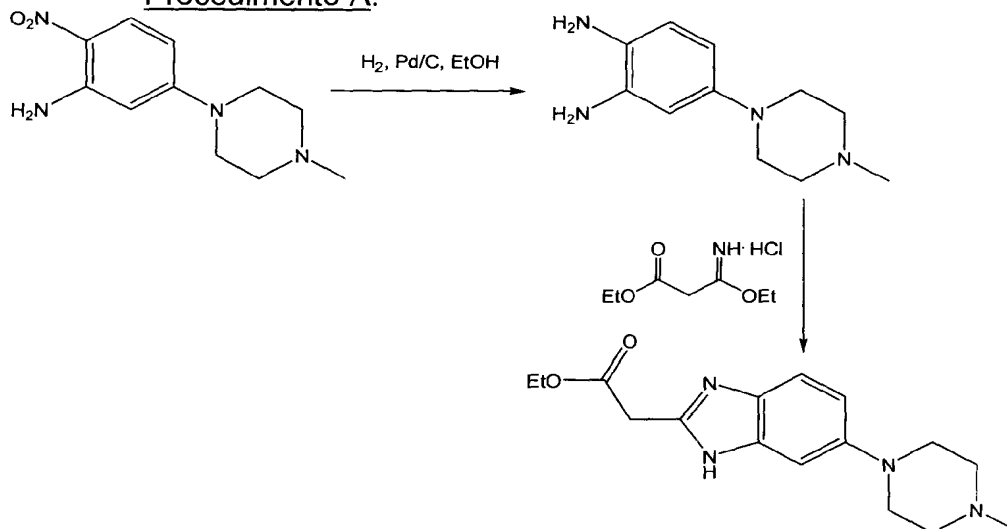
30 Procedimento C.

 A 5-cloro-2-nitroanilina (401 g, 2,32 mmols) foi acrescentada a um frasco de 12 L de 4 gargalos de fundo redondo ajustado com um agitador

superior, condensador, entrada de gás, funil de adição, e sensor termossnsível. O frasco então foi purgado com N₂. 1-metilpiperazina (977 g, 1,08 L, 9,75 mmols) e etanol de 100% (650 mL) foram adicionados ao frasco de reação com agitação. O frasco foi novamente purgado com N₂, e a reação foi mantida sob N₂. O frasco foi aquecido em um manto aquecedor a uma temperatura interna de 97°C (+/- 5°C) e mantido naquela temperatura até que a reação fosse completa (tipicamente aproximadamente 40 horas) como determinado por HPLC. Depois que a reação foi terminada, o aquecimento foi descontinuado e a reação foi resfriada a uma temperatura interna de aproximadamente 80°C com agitação, e a água (3,15 L) foi acrescentada à mistura via um funil de adição durante o período de 1 hora enquanto a temperatura interna foi mantida em 82°C (+/- 3°C). Depois que a adição de água foi terminada, o aquecimento foi descontinuado e permitiu-se que a mistura reacional esfriasse durante um período de não menos que 4 horas a uma temperatura interna de 20°C a 25 °C. A mistura reacional então foi agitada para uma hora adicional em uma temperatura interna de 20°C a 30 °C. A mistura resultante então foi filtrada, e o frasco e torta da filtração foram lavados com a água (1 x 1 L), etanol de 50% (1 x 1L), e etanol de 95% (1 x 1L). O produto sólido amarelo de ouro foi colocado em uma panela que seca e secou a um peso constante de 546 g (rendimento de 99%) sob vácuo em aproximadamente 50°C em um forno de vácuo.

B. Síntese de éster etílico do ácido [6-(4-metil-piperazinil-1)-1H-benzimidazolil-2] – acético.

Procedimento A:



Um frasco de 5000 mL de 4 gargalos foi ajustado com um agitador, termômetro, condensador, e entrada/passagem de gás. O frasco equipado foi carregado com 265,7 g (1,12 mol, 1,0 eq) de 5-(4-metil-piperazinil-1)-2-nitroanilina e 2.125 mL de EtOH de ensaio 200. A solução resultante foi purgada com N_2 durante 15 minutos. Depois 20,0 g de Pd/C de 5% (H_2O de 50%p/p) são acrescentados. A reação foi energeticamente agitada em 40°C a 50°C (temperatura interna) enquanto H_2 foi borbulhado pela mistura. A reação foi controlada de hora em hora observando o desaparecimento de 5-(4-metil-piperazinil-1)-2-nitroanilina por HPLC. O tempo da reação típico foi 6 horas.

Depois que toda a 5-(4-metil-piperazinil-1)-2-nitroanilina tinha desaparecido da reação, a solução foi purgada com N_2 durante 15 minutos. Depois, 440,0 g (2,25 mmols) de cloridrato de 3-etóxi-3-iminopropanoato de etila são acrescentados como um sólido. A reação foi agitada em 40°C a 50°C (temperatura interna) até a reação foi terminada. A reação foi controlada por seguinte do desaparecimento do diamino composto por HPLC. O tempo da reação típico foi de 1 a 2 horas. Depois que a reação foi terminada, foi resfriada à temperatura ambiente e filtrada por uma almofada do material filtrante Celite. O material filtrante Celite foi lavado com EtOH absoluto

(2 x 250 mL), e o filtrado foi concentrado a sob pressão reduzida fornece um óleo espesso marrom/cor de laranja. O óleo resultante foi tomado em 850 mL de uma solução de HCl de 0,37%. NaOH Sólido (25 g) então foi acrescentado em uma porção, e um precipitado formado. A mistura resultante foi agitada de e depois de 1 hora filtrada. O sólido foi lavado com H₂O (2 x 400 mL) e secou em 50°C em um forno de vácuo fornecendo 251,7 g (74,1%) de éster etílico do ácido [6-(4-metil-piperazinil-1)-1H-benzoimidazolil-2] – acético, como um pó amarelo pálido.

Procedimento B.

Um frasco de 5000 mL revestido de 4 gargalos foi ajustado com um agitador mecânico, condensador, sensor de temperatura, entrada de gás, e borbulhador óleo. O frasco equipado foi carregado com 300 g (1,27 mol) de 5-(4-metil-piperazinil-1) - 2-nitroanilina e 2.400 mL de EtOH de ensaio 200 (a reação pode ser e foi conduzida com o etanol de 95% e não é necessário usar etanol de ensaio 200 para esta reação). A solução resultante foi agitada e purgada com N₂ durante 15 minutos. Depois, 22,7 g de Pd/C de 5% (H₂O de 50%p/p) são acrescentados ao frasco de reação. O vaso de reação foi purgado com N₂ durante 15 minutos. Depois de purgar com N₂, o vaso de reação foi purgado com H₂ mantendo um fluxo lento, mas constante de H₂ pelo frasco. A reação foi agitada em 45°C a 55°C (temperatura interna) enquanto H₂ foi borbuhlado pela mistura até os 5-(4-metil-piperazinil-1)-2-nitroanilina foi terminadamente consumido como determinado por HPLC. O tempo da reação típico foi de 6 horas.

Depois que toda a 5-(4-metil-piperazinil-1) -2-nitroanilina tinha desaparecido da reação, a solução foi purgada com N₂ durante 15 minutos. O intermediário da diamina é sensível ao ar assim foram tomadas precauções para evitar a exposição ao ar. 500 g (2,56 mmols) do cloridrato de 3-etóxi-3-iminopropanoato de etila são acrescentados à mistura reacional durante o período de aproximadamente 30 minutos. A reação foi agitada em 45°C a 55°C (temperatura interna) sob N₂ até a diamina ser completamente consumida como determinado por HPLC. O tempo da reação típico foi aproximadamente 2 horas. Depois que a reação foi terminada, o meio reacional

foi filtrado enquanto ainda quente por uma almofada de Celite. O frasco de reação e o Celite foram depois lavados com EtOH de ensaio 200 (3 x 285 mL). Os filtrados foram combinados em um frasco de 5,000 mL, e aproximadamente 3,300 mL de etanol foram removidos sob vácuo produzindo um óleo cor de laranja. Água (530 mL) e depois HCL (350 mL) 1M foram adicionados ao óleo resultante, e a mistura resultante foi agitada. A solução resultante foi energicamente agitada enquanto NaOH de 30% (200 mL) foi acrescentado durante o período de aproximadamente 20 minutos mantendo a temperatura interna em aproximadamente 25°C a 30°C enquanto o pH foi trazido a entre 9 e 10. A suspensão resultante foi agitada durante aproximadamente 4 horas mantendo a temperatura interna em aproximadamente 20°C a 25 °C. A mistura resultante foi filtrada, e a torta da filtração foi lavada com H₂O (3 x 300 mL). O sólido coletado foi seco a um peso constante em 50°C sob vácuo em um forno de vácuo fornecendo 345,9 g (90,1%) de éster etílico do ácido [6-(4-metil-piperazinil-1)-1H-benzoimidazolil-2] –acético, como um pó amarelo pálido. Em um trabalho alternativo ao procedimento, os filtrados foram combinados e o etanol foi removido sob vácuo até que pelo menos aproximadamente 90% tivessem sido removidos. A água em um pH neutro então foi acrescentada ao óleo resultante, e a solução foi resfriada a aproximadamente 0°C. Uma solução de NaOH de 20% aquosa então foi acrescentada lentamente com a agitação rápida a trazer o pH até 9,2 (lido por mediação de pH). A mistura resultante então foi filtrada e tal como descrito acima seco. O trabalho alternativo do procedimento forneceu o produto de cor bege claro a amarelo claro com rendimentos tão altos quanto 97%.

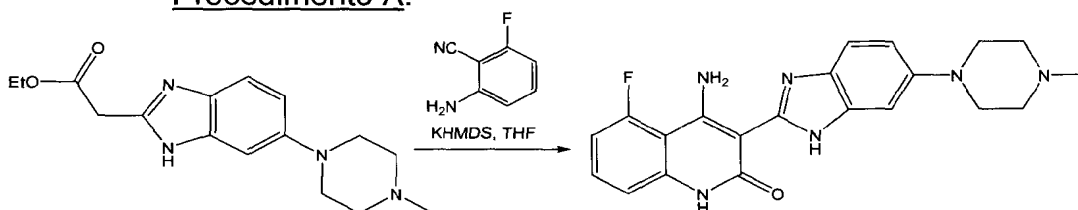
Teor de água de método para a redução de éster etílico do ácido [6-(4-metil-piperazinil-1)-1H-benzoimidazolil-2] – acético.

O éster etílico do ácido [6-(4-metil-piperazinil-1)-1H-benzimidazolil-2] - acético (120,7 gramas) que tinham sido anteriormente trabalhado e seco a um teor de água de H₂O de aproximadamente 8% a 9% foi colocado em um frasco de 2,000 ml de fundo redondo e dissolvido no etanol absoluto (500 mL). A solução âmbar foi concentrada a um óleo espesso usando evaporador rotativo com o aquecimento até que todo o solvente

fosse removido. O procedimento foi repetido mais duas vezes. O óleo espesso assim obtido foi deixado no frasco e colocado em um forno de vácuo aquecido em 50°C durante a noite. Os resultados de análise de Karl Fisher indicaram um teor de água de 5,25%. O teor de água reduzido obtido por esse método forneceu rendimentos aumentados no procedimento do Exemplo seguinte. Outros solventes, tais como tolueno e THF podem ser usados em vez do etanol neste processo de secagem.

C. Síntese de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazinil-1)-1H-benzimidazolil-2]-1H-quinolinona-2.

Procedimento A:



O éster etílico do ácido [6-(4-metil-piperazinil-1)-1H-benzimidazolil-2] - acético (250 g, 820 mmols) (seco com o etanol tal como descrito acima) foi dissolvido em THF (3,800 mL) em um frasco de 5,000 mL ajustado com um condensador, agitador mecânico, sensor de temperatura, e purgado com argônio. A 2-amino-6-fluoro-benzonitrila (95,3 g, 700 mmols) foi acrescentada à solução, e a temperatura interna foi elevada a 40°C. Quando todos os sólidos tinham dissolvido-se e a temperatura de solução tinha atingido 40°C, KHMDS sólido (376,2 g, 1890 mmols) foi acrescentado durante o período de 5 minutos. Quando a adição da base de potássio foi terminada, uma solução amarela heterogênea foi obtida, e a temperatura interna tinha subido a 62°C. Depois de um período de 60 minutos, a temperatura interna diminuiu de volta a 40°C, e decidiu-se que a reação fosse completa por H-PLC (nenhum material inicial ou intermediário não ciclizado estava presente). A mistura reacional espessa foi então extinta por vazamento em H₂O (6,000 mL) e agitação da mistura resultante até que ela tivesse atingido a temperatura ambiente. A mistura então foi filtrada, e o meio filtrante foi lavado com a água (2 x 1000 mL). O sólido amarelo brilhante foi colocado em uma bandeja de secagem e secou em um forno de vácuo em 50°C durante a

noite e forneceu 155,3 g (47,9%) da 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazinil-1)-1H-benzimidazolil-2]-1H-quinolinona-2, desejada.

Procedimento B.

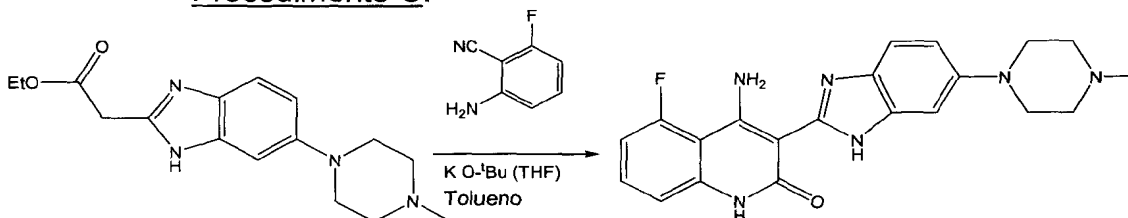
Um frasco de 5.000 mL de 4 gargalos revestido foi equipado de
5 um aparelho de destilação, um sensor de temperatura, uma entrada de gás N₂, um funil de adição, e um agitador mecânico. O éster etílico do ácido [6-(4-metil-piperazinil-1)-1H-benzimidazolil-2-il] - acético (173,0 g, 570 mmols) foi carregado no reator, e o reator foi purgado com N₂ durante 15 minutos. THF seco (2.600 mL) foi então carregado no frasco com agitação. Depois
10 que todo o sólido foi dissolvido, o solvente foi removido pela destilação (vácuo ou atmosférica) a temperatura mais alta ajuda a remover a água usando calor de acordo com a necessidade. Depois que 1.000 mL do solvente tinham sido removidos, a destilação foi parada e a reação foi purgada com N₂. 1.000 mL de THF seco então foram acrescentados ao vaso de reação, e
15 quando todo o sólido foi dissolvido, a destilação (vácuo ou atmosférica) foi novamente conduzida até que outros 1.000 mL do solvente fossem removidos. Esse processo de acrescentar THF seco e remoção solvente foi repetido pelo menos 4 vezes (na 4ª destilação, 60% do solvente são removidos em vez de somente 40% como em 3 primeiras destilações) depois do qual
20 uma amostra de 1 mL foi removida para a análise de Karl Fischer para determinar o teor de água. Se a análise mostrou que a amostra continha menos do que a água de 0,20%, então a reação foi continuada como descrito no parágrafo seguinte. Entretanto, se a análise mostrou mais do que 0,20% de água, então o processo de secagem descrito acima é continuado até que
25 um teor de água menor do que 0,20% seja atingido.

Depois que um teor de água menor do que ou aproximadamente 0,20% foi atingido utilizando o procedimento descrito no parágrafo anterior, o aparelho de destilação foi substituído por um condensador de refluxo, e a reação foi carregada com a 2-amino-6-fluoro-benzonitrila (66,2 g, 470
30 mmols) (em alguns procedimentos 0,95 equivalentes são usados). A reação então foi aquecida a uma temperatura interna de 38°C a 42 °C. Quando a temperatura interna atingiu 38°C a 42 °C, a solução de KHMDS (1.313 g,

1,32 mol, KHMDS em 20% em THF) foi acrescentada à reação via o funil de adição durante um período de 5 minutos mantendo a temperatura interna em aproximadamente 38°C a 50°C durante a adição. Quando a adição da base de potássio foi terminada, a reação foi agitada por 3,5 a 4,5 horas (em alguns exemplos foi agitada durante 30 a 60 minutos e a reação pode ser completada dentro daquele tempo) mantendo a temperatura interna em 38°C a 42 °C. Uma amostra da reação então foi removida e analisada por HPLC. Se a reação não foi completa, uma solução KHMDS adicional foi acrescentada ao frasco durante o período de 5 minutos e a reação foi agitada em 38°C a 42°C durante 45 a 60 minutos (a quantidade da solução KHMDS acrescentada foi determinada pelo seguinte: se a razão de IPC é <3,50, então 125 mL foi acrescentado; se $10,0 \geq \text{razão de IPC} \geq 3,50$, então 56 mL foi acrescentado; se $20,0 \geq \text{razão de IPC} \geq 10$, então 30 mL foi acrescentado. A razão de IPC é igual à área correspondente ao 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazinil-1)-1H-benzimidazolil-2]-1H-quinolinona-2) dividido pela área correspondente ao intermediário não ciclizado). Uma vez que a reação foi terminada (razão de IPC > 20), o reator foi esfriado a uma temperatura interna de 25°C a 30°C, e água (350 mL) foi carregada no reator durante um período de 15 minutos mantendo a temperatura interna em 25°C a 35°C (em uma alternativa, a reação é conduzida em 40°C e a água é acrescentada dentro de 5 minutos. Quanto mais rápido se realiza a extinção menor a quantidade de impureza que se forma dentro do tempo). O condensador de refluxo então foi substituído por um aparelho de destilação e o solvente foi removido por destilação (vácuo ou atmosférica) usando Calor necessário. Depois de 1.500 mL do solvente tinha sido removido, a destilação foi descontinuada e a reação foi purgada com N₂. A água (1.660 mL) então foi acrescentada ao frasco de reação mantendo a temperatura interna de 20°C a 30 °C. A mistura reacional então foi agitada de 20°C a 30°C durante 30 minutos antes de esfriá-lo a uma temperatura interna de 5°C a 10°C e então agitando durante 1 hora. A suspensão resultante foi filtrada, e o frasco e o bolo da filtração foram lavados com a água (3 x 650 mL). O sólido assim obtido foi seco a um peso constante sob vácuo em 50°C em um forno de vácuo

para fornecer 103,9 g (rendimento de 42,6%) de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazinil-1)-1H-benzimidazolil-2]-1H-quinolinona-2, como um pó amarelo.

Procedimento C:



5 O éster etílico do ácido [6-(4-metil-piperazinil-1)-1H-benzimidazolil-2-il] - acético (608 g, 2,01 mmols) (seco) e 2-amino-6-fluoro-benzonitrila (274 g, 2,01 mmols) é carregado em um frasco de 12 L e 4 gargalos assentado sobre uma manta de aquecimento e montado com um condensador, agitador mecânico, entrada de gás, sensor de temperatura. O vaso de reação foi purgado com N₂, e tolueno (7,7 L) foi carregado na mistura reacional enquanto era agitado. O vaso de reação foi novamente purgado com N₂ e mantido sob N₂. A temperatura interna da mistura foi elevada até que uma temperatura de 63°C (+/-3°C) fosse atingida. A temperatura interna da mistura foi mantida em 63°C (+/-3°C) enquanto aproximadamente 2,6 L do tolueno foram destilados do frasco sob pressão reduzida 50,66 +/- 1,33 Kpa (380 +/-10 torr), cabeça de destilação T = 40°C (+/-10°C) (a análise de Karl Fischer foi usada para verificar o teor de água na mistura. Se o teor de água fosse maior do que 0,03%, então outros 2,6 L de tolueno eram acrescentados e a destilação era repetida. Esse processo foi repetido até que um teor de água menor do que 0,03% fosse atingido). Depois que um teor de água menor do que 0,03% foi atingido, o aquecimento foi descontinuado, e a reação foi resfriada sob N₂ a uma temperatura interna de 17°C a 19 °C. T-butoxido de potássio em THF (20% em THF; 3,39 quilogramas, 6,04 mols de 3-terc-butoxido de potássio) então foi acrescentado à reação sob N₂ em uma taxa tal que a temperatura interna da reação foi mantida abaixo 20 °C. Depois que a adição do terc-butoxido de potássio foi terminada, a reação foi agitada em uma temperatura interna menor do que 20°C durante 30 minutos. A temperatura então foi elevada a 25 °C, e a reação foi agitada durante pelo

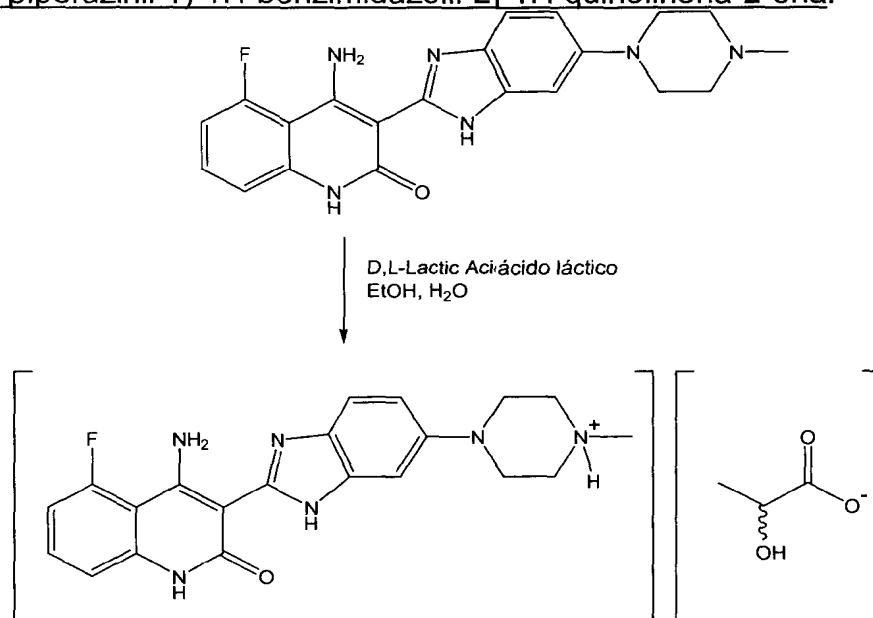
menos 1 hora. A temperatura então foi elevada a 30 °C, e a reação foi agitada durante pelo menos 30 minutos. A reação então foi controlada para a realização usando HPLC para verificar o consumo dos materiais iniciais (tipicamente durante 2 a 3 horas, os materiais iniciais são consumido (menos do
5 que 0,5% por% de área HPLC)). Se a reação não foi terminada depois de 2 horas, outros 0,05 equivalentes do terc-butóxido de potássio são acrescentados de uma vez, e o processo foi conduzido até que o HPLC mostrasse que a reação foi terminada. Depois que a reação foi terminada, 650 mL de água são acrescentados à mistura reacional com agitação. A reação então
10 foi aquecida a uma temperatura interna de 50°C e o THF foi separado por destilação (aproximadamente 3 L por volume) sob pressão reduzida da mistura reacional. A água (2,6 L) então foi acrescentada gota a gota à mistura reacional usando um funil de adição. A mistura então foi resfriada à temperatura ambiente e agitada durante pelo menos 1 hora. A mistura então foi filtrada, e o bolo da filtração foi lavada com água (1,2 L), com etanol a 70%
15 (1,2 L), e com etanol a 95% (1,2 L). O sólido amarelo desperto foi colocado em uma bandeja de secagem e secou em um forno de vácuo em 50°C até que um peso constante fosse obtido fornecendo 674 g (85,4%) de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazinil-1)-1H-benzimidazolil-2]-1H-quinolinona-2-ona desejada.
20

Purificação de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazinil-1)-1H-benzimidazolil-2]-1H-quinolinona-2-ona.

Um frasco de 3.000 mL e com 4 gargalos equipado de um condensador, sensor de temperatura, entrada de gás de N₂, e agitador mecânico foi colocado em um manto aquecedor. O frasco então foi carregado do
25 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazinil-1)-1H-benzimidazolil-2]-1H-quinolinona-2-il (101,0 g, 0,26 mol), e o sólido amarelo foi suspenso em etanol a 95% (1000 mL) e agitado. Em alguns casos uma proporção 8:1 para solvente é usada. A suspensão então foi aquecida a um refluxo suave (temperatura de aproximadamente 76°C) com agitação durante um período de
30 aproximadamente 1 hora. A reação então foi agitada durante 45 a 75 minutos enquanto era refundido. Neste ponto, calor foi removido do frasco e per-

mitiu-se que a suspensão esfriasse a uma temperatura de 25°C a 30 °C. A suspensão então foi filtrada, e a almofada de filtro foi lavada com a água (2 x 500 mL). O sólido amarelo então foi colocado em uma bandeja de secagem e seco em um forno de vácuo a 50°C até que um peso constante fosse obtido (tipicamente 16 horas) para obter 97,2 g (96,2%) do produto purificado, como um pó amarelo.

D. Preparação do Sal do Ácido Lático da 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazinil-1)-1H-benzimidazolil-2]-1H-quinolinona-2-ona.



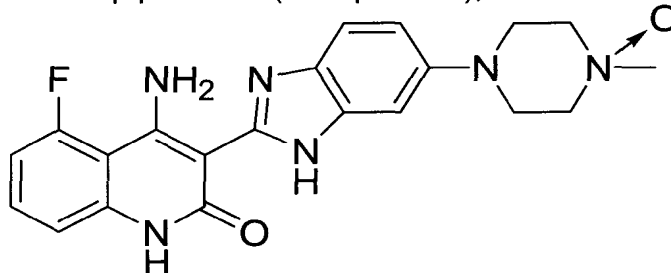
Um 3000 mL frasco revestido de 4 gargalos foi ajustado com um condensador, um sensor de temperatura, uma entrada de gás N₂, e um agitador mecânico. O vaso de reação foi purgado com N₂ durante pelo menos 15 minutos e depois carregado com o 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazinil-1)-1H-benzimidazolil-2]-1H-quinolinona-2-ona (484 g, 1,23 mol). Uma solução de ácido D,L-lático (243,3 g, 1,72 mol do monômero - ver o parágrafo seguinte), água (339 mL), e etanol (1,211 mL) foi preparada e depois carregado ao frasco de reação. A agitação foi iniciada em uma taxa média, e a reação foi aquecida a uma temperatura interna de 68°C a 72 °C. A temperatura interna da reação foi mantida em 68°C a 72°C para aquecimento de e depois de 15 a 45 minutos foi descontinuado. A mistura resultan-

te foi filtrada por um filtro sinterizado de 10 a 20 micron coletando o filtrado em um frasco de 12 L. O frasco de 12 L foi equipado de um sensor de temperatura interno, um condensador de refluxo, um funil de adição, uma entrada e saída de gás, e um agitador superior. O filtrado então foi agitado em uma taxa média e aquecido ao refluxo (temperatura interna de aproximadamente 78°C). Mantendo um refluxo suave, etanol (3.596 mL) foi carregado ao frasco durante o período de aproximadamente 20 minutos. O frasco de reação então foi esfriado a uma temperatura interna variando de aproximadamente 64°C a 70°C dentro de 15 a 25 minutos e esta temperatura foi mantida durante um período de aproximadamente 30 minutos. O reator foi inspecionado à procura de cristais. Se nenhum cristal estivesse presente, então cristais do sal ácido láctico do 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazinil-1)-1H-benzimidazolil-2]-1H-quinolinona-2-ona (484 mg, 0.1% de mol) eram adicionados ao frasco, e a reação foi agitada entre 64°C e 70°C durante 30 minutos antes novamente inspecionando o frasco à procura de cristais. Uma vez que os cristais estivessem presentes, a agitação era reduzida a uma taxa baixa e a reação agitada entre 64°C e 70°C durante uns 90 minutos adicionais. A reação então foi resfriada a aproximadamente 0°C durante o período de aproximadamente 2 horas, e a mistura resultante foi filtrada por um filtro sinterizado de 25 a 50 micron. O reator foi lavado com o etanol (484 mL) e agitado até que a temperatura interna fosse aproximadamente 0°C. O etanol frio foi usado para lavar o bolo da filtração, e esse procedimento foi repetido mais 2 vezes. O sólido coletado foi seco até um peso constante a 50°C sob vácuo em forno de vácuo com uma produção de 510,7 g (85,7%) do sal ácido láctico amarelo cristalino do 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazinil-1)-1H-benzimidazolil-2]-1H-quinolinona-2-ona. Uma vedação de borracha ou condições inertes são tipicamente usadas durante o processo de filtração. Enquanto o sólido seco não pareceu ser muito higroscópico, o bolo da filtração molhada tende a aprisionar a água e ficar pegajosa. As precauções são tomadas para evitar a exposição prolongada do bolo de filtração molhada à atmosfera.

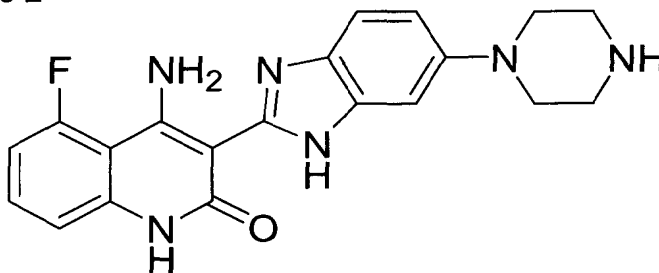
O ácido láctico comercial geralmente contém aproximadamente 8-12% p/p de água, e contém dímeros e trímeros além do ácido láctico monomérico. A proporção em mol do ácido láctico dímero para o monômero é geralmente de aproximadamente 1,0:4,7. O ácido láctico grau comercial pode ser usado no processo descrito no parágrafo precedente preferivelmente

Identificação de Metabólitos.

Dois metabólitos da 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazinil-1)-1H-benzimidazolil-2]-1H-quinolinona-2-ona (Composto 1) foram identificados e caracterizados no plasma de rato coletado de um estudo de toxicologia de 2 semanas tal como descrito nas referências aqui incorporadas. Dois metabólitos identificados são o composto N-óxido de piperazina (Composto 2) e o composto N-desmetilado de piperazina (Composto 3), mostrados abaixo.



Composto 2



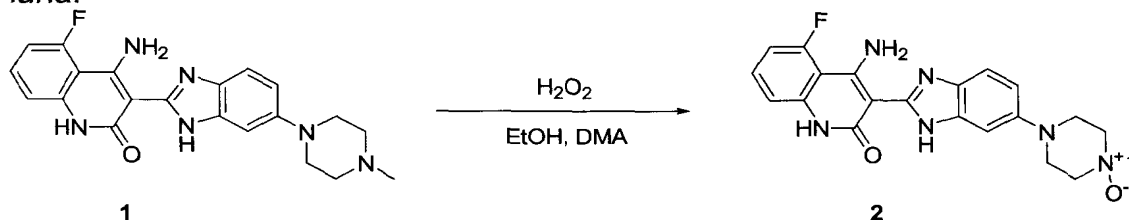
Composto 3

Síntese de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-4-oxidopiperazinil-1)-1H-benzimidazolil-2] quinolinona-(1H)-2 (Composto 2) e 4-Amino-5-fluoro-3-(6-piperazinil-1-1H-benzimidazolil-2) quinolinona-(1H)-2 (Composto 3).

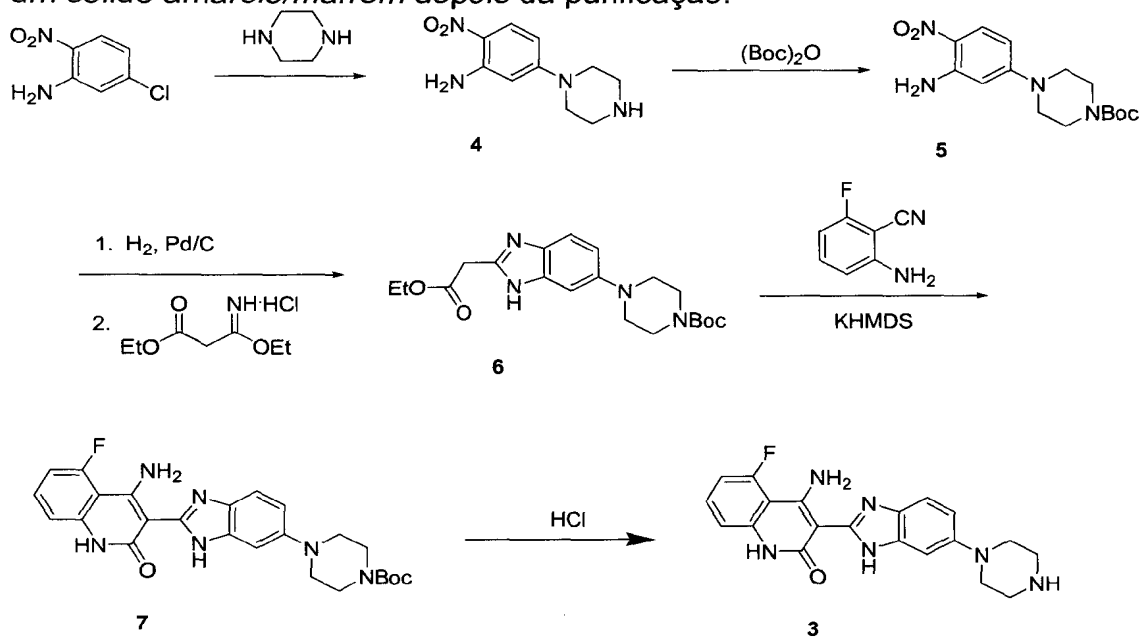
Para confirmar as estruturas dos metabólitos identificados do Composto 1, os metabólitos foram independentemente sintetizados

O Composto 2, o metabólito N-óxido do Composto 1, foi sintetizado como mostrado no esquema abaixo. O composto 1 foi aquecido em

uma mistura de etanol, dimetilacetamida e peróxido de hidrogênio. Ao final da reação, o Composto 2 foi isolado por filtração e lavado com o etanol. Se necessário, o produto pode ser também purificado por cromatografia em coluna.



- 5 O Composto 3, o metabólito N-desmetilado do Composto 1, foi sintetizado como mostrado no esquema abaixo. A 5-cloro-2-nitroanilina foi tratada com a piperazina para produzir 4 que foi posteriormente protegido com um grupo butil oxicarbonila (Boc) para produzir 5. A redução do grupo nitro seguido pela condensação com o éster etílico do ácido 3-etóxi-3-iminopropiônico forneceu 6. A condensação de 6 com a 6-fluoroanilonitrila usando hexametildissilazida de potássio como uma base, produziu 7. O 7 bruto foi tratado com HCl aquoso para produzir o metabólito desejado como um sólido amarelo/marrom depois da purificação.



Procedimentos de Ensaio.

Quinases de Tirosina.

[0106] A atividade de quinase de diversas quinases da proteína

tirosina foi medida pelo fornecimento de ATP e um peptídeo ou proteína apropriado contendo um resíduo de aminoácido de tirosina para fosforilação, e analisando para a transferência da porção fosfato para o resíduo de tirosina. As proteínas recombinantes correspondentes aos domínios citoplasmáticos dos receptores FLT-1 (VEGFR1), VEGFR2, VEGFR3, Tie-2, PDGFR α , PDGFR β , e FGFR1 foram expressadas em células Sf9 de inseto usando um sistema de expressão de Baculovirus (InVitrogen) e pode ser purificada através da interação de anticorpo Glu (para construtores marcados com epítipo Glu) ou pela Cromatografia de Íon Metálico (para construtores marcados His₆ (SEQ ID N°: 1)). Para cada ensaio, os compostos de teste foram serialmente diluídos em DMSO e depois agitados com um tampão de reação de quinase apropriado mais ATP. A proteína de quinase e um substrato de peptídeo biotinilado apropriado foram adicionados para fornecer um volume final de 50 a 100 μ L, as reações são incubadas durante 1 a 3 horas na temperatura ambiente e depois paradas pela adição de 25 a 50 μ L de 45 mM EDTA, 50 mM de Hepes, pH 7,5. A mistura reacional parada (75 μ L) foi transferida para uma microplaca revestida de estreptavidina (Boehringer Mannheim) e incubada durante 1 hora. O produto de peptídeo fosforilado foi medido com o sistema de fluorescência DELFIA resolvido pelo tempo (Wallac ou PE Biosciences), usando um anticorpo PT66 antifosfotirosina marcado com európio, com a modificação de que o tampão de ensaio DELFIA foi complementado com MgCl₂ a 1 mM para a diluição do anticorpo. A fluorescência resolvida pelo tempo foi lida em um fluorímetro Wallac 1232 DELFIA ou em uma leitora de sinal múltiplo PE Victor II. A concentração de cada composto da inibição de 50% (IC₅₀) foi calculada empregando regressão não linear usando o software XL Fit para a análise de dados.

As quinases FLT-1, VEGFR2, VEGFR3, FGFR3, Tie-2, e FGFR1 são analisadas em 50 mM Hepes, pH 7,0, MgCl₂ a 2mM MnCl₂ a 10 mM NaFa 1 mM, DTT 1 mM, 1 mg/mL BSA, 2 μ M ATP, e de 0,20 a 0,50 μ M do substrato de peptídeo biotinilado correspondente. As quinases FLT-1, VEGFR2, VEGFR3, Tie-2, e FGFR1 foram adicionadas em 0,1 μ g/mL, 0,05 μ g/mL, ou 0,1 μ g/mL respectivamente. Para o ensaio da quinase PDGFR,

120 µg/mL de enzima foram usadas as mesmas condições de tampões que as acima exceto a modificação das concentrações de ATP e de substrato de peptídeo a 1,4 µM ATP e 0,25 µM biotina-GGLFDDPSYVNVQNL-NH₂ (SEQ ID N°: 2) substrato de peptídeo.

5 As quinases de tirosina Fyn e Lck recombinantes e ativas, estão disponíveis comercialmente e são compradas da Upstate Biotechnology. Para cada ensaio, os compostos de teste foram serialmente diluídos em DMSO e depois misturados com um tampão de reação de quinase apropriado mais 10 nM de ATP marcado na posição gama com ³³P. A proteína de
10 quinase e o substrato de peptídeo biotinilado apropriado foram adicionados para fornecer um volume final de 150 µL. As reações foram incubadas durante 3 a 4 horas na temperatura ambiente e depois parada por transferência para uma microplaca branca revestida de estreptavidina (Thermo Labsystems) contendo 100 µL do tampão de reação de parada de 100 mM EDTA e
15 50 µM ATP não marcado. Depois de incubação de 1 hora, as placas de estreptavidina foram lavadas com PBS e 200 µL o fluido de cintilação de Microscint 20 foi acrescentado por poço. As placas foram seladas e contadas utilizando um TopCount. A concentração de cada composto da inibição de 50% (IC₅₀) foi calculada empregando regressão não linear usando software
20 XL Fit de análise de dados.

 O tampão de reação de quinase de Fyn, Lck, e c-ABL continha 50 mM de Tris-HCl pH 7,5, MgCl₂ a 15 mM, MnCl₂ a 30 mM, DTT a 2 mM, EDTA a 2 mM, fosfato de beta-glicerol a 25 mM, 0,01% BSA/PBS, 0,5 µM do substrato de peptídeo apropriado (substrato de peptídeo Src biotinilado: biotina-GGGGKVEKIGEGTYGVVYK-NH₂ (SEQ ID N°: 3) para Fyn e Lck), 1 µM
25 ATP não-marcado e 1 nM quinase.

 A atividade de quinase de c-Kit e FLT-3 foram medidas fornecendo ATP e um peptídeo ou proteína contendo um resíduo do aminoácido tirosina para fosforilação, e analisando a transferência da porção fosfato para o resíduo de tirosina. A proteína recombinante correspondente aos domínios citoplasmáticos do c-Kit e os receptores FLT-3 foram comprados (Pro-
30 quinase). Para os teste, um composto usado como exemplo, por exemplo, o

4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil piperazinil-1)-1H-benzimidazolil-2] quinolinona-(1H)-2-ona, foi diluído em DMSO e depois misturado com o tampão de reação de quinase descrito abaixo mais ATP. A proteína da quinase (c-Kit ou FLT-3) e o substrato de peptídeo biotinilado (biotina-GGLFDDPSYVNVQNL-NH₂ (SEQ ID N°: 2)) foram adicionados para fornecer um volume final de 100 μ L. Estas reações foram incubadas durante 2 horas na temperatura ambiente e depois paradas pela adição de 50 μ L de 45 mM EDTA, 50 mM HEPES, pH 7,5. A mistura reacional parada (75 μ L) foi transferida para uma microplaca revestida de estreptavidina (Boehringer Mannheim) e incubada durante 1 hora. O produto de peptídeo fosforilado foi medido com o sistema de fluorescência DELPHIA resolvido pelo tempo (Wallac ou PE Biosciences), usando um anticorpo de antifosfotirosina marcado com európio, PT66, com a modificação que o tampão de ensaio DELFIA foi complementado com MgCl₂ a 1 mM para diluição do anticorpo. Os valores de fluorescência resolvidos para o tempo, foram determinados em um fluorímetro Wallac 1232 DELFIA ou uma leitora de múltiplo sinal PE Victor II. A concentração de cada composto para inibição de 50% (IC₅₀) foi calculada empregando regressão não linear usando o software XL Fit de análise de dados.

A FLT-3 e as quinases de c-Kit foram analisadas em 50 mM de Hepes pH 7.5, NaF a 1 mM, MgCl₂ a 2 mM, MnCl₂ a 10 mM e 1 mg/mL BSA, 8 μ M de ATP e 1 μ M do substrato de peptídeo biotinilado correspondente (biotina-GGLFDDPSYVNVQNL-NH₂ (SEQ ID N°: 2)). A concentração de FLT-3 e quinases de c-Kit foram analisadas em 2 nM. O substrato de peptídeo fosforilado em uma concentração final de 1 μ M foi incubado com um anticorpo de antifosfotirosina marcado com európio (PT66) (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA). O europium foi detectado usando a fluorescência resolvida para o tempo. O IC₅₀ foi calculado usando regressão não linear.

As FGFR2 e FGFR4 foram analisadas por produtos comprados de terceiros que usam cada um dos seguintes métodos.

Método A: o ensaio radiométrico direto KinaseProfiler (Upstate/Millipore) foi empregado como se segue. Em um volume de reação final de 25 μ L, FGFR2 ou FGFR4 (humana, 5 a 10 mU) foi incubado com 8 mM

MOPS, pH 7,0, 0,2 mM EDTA, a MnCl_2 2,5 a 10 mM, 0,1 mg/mL poli(Glu, Tyr) 4:1, M acetato de Mg a 10 mM e [^{32}P - gamaATP] com atividade específica de aproximadamente 500 cpm/pmol, concentração necessária). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Depois da incubação durante 40 minutos na temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 μL de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 μL da solução de reação é gotejado sobre um Filtermat A e lavado três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

Método B: o ensaio de quinase Millipore Z'-LYTE (Invitrogen) é baseado na transferência de energia de ressonância de fluorescência e foi empregado como se segue. A mistura de peptídeos 2X FGFR2 ou FGFR4/Tyr 04 é preparada em 50 mM HEPES, pH 7,5, BRIJ-35 de 0,01%, MgCl_2 a 10 mM, MnCl_2 a 4 mM, EGTA a 1 mM, DTT a 2 mM. A reação de quinase final 10 μL consiste de 0,3 a 2,9 ng FGFR2 ou 2,4 a 105 ng FGFR4 e 2 μM Tyr 04 Peptídeo em 50 mM de Hepes pH 7,5, BRIJ-35 0,01%, MgCl_2 a 10 mM, MnCl_2 a 2 mM, 1 mM EGTA, 1 mM DTT. Depois da incubação da reação de quinase por 1 hora, são adicionados 5 μL de um reagente de desenvolvimento B com diluição de 1:32.

Proteína MIA.

Análise de Western Blot: as células de CHL-1 ou o plasma foram analisados para a proteína MIA como aqui descrito. O sangue total foi coletado para a preparação de plasma em tubos separadores BD Microtainer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). As células CHL-1 foram lavadas duas vezes em tampão de fosfato de solução salina (PBS, Mediatech, Inc., Herndon, VA) e lisadas em tampão RIPA (Tris HCl a 50 mM, pH 7,4, NaCl a 150 mM, EDTA a 1 mM, EGTA a 1 mM, 2 mM ortovanadato de sódio, pirofosfato a 20 mM, 1% Triton X-100, 1% desoxicolato de sódio e 0,1% SDS), contendo fluoreto de fenilmetilsulfonil fresco a 1 mM, comprimido de Coquetel completo de inibidor de mini protease (2 comprimidos/25 mL de tampão de lise) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) e 1X Coquetel II de Inibidor de Fosfatase (Sigma-Aldrich, St., Louis, MO), durante 20 minutos

em gelo. Os lisados são coletado em tubos de centrifugação, girados em 14K rpm em 4°C durante 20 minutos e filtrados por tubos QIAshredder (QIAGEN, Inc, Valencia, CA). As concentrações de proteína são o determinadas usando o ensaio de BCA de acordo com o protocolo do fabricante (Pierce, Rockford, IL). Amostras foram processadas de Western Blot por métodos padrão usando gel de Tris-glicina de 18% de Novex® (Invitrogen, Carlsbad, CA). A MIA foi detectada com um anticorpo policlonal de cabra (R&D Systems, Minneapolis, MN), diluída a 1:1000 em TBST (tampão salino de Tris contendo Tween® 20 de 0,1%, Fisher Scientific, Hampton, NH) contendo leite em pó de 5% e incubada durante a noite em 4°C. O anticorpo secundário foi um anticorpo anticabra de rábano bravo ligado a peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA) diluído em 1:5.000. As bandas de proteína foram visualizadas usando Enhanced Chemiluminescence (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). A carga igual e a transferência são confirmadas por detecção da β -actina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). A proteína MIA recombinante humana (peso molecular de 12-kDa) de duas fontes comerciais é usada como controle positivo (Axxora, LLC, San Diego, CA e ProSpec-Tany TechnoGene, LTD, Rehovot, Israel).

Ensaio ELISA para MIA: quantidades iguais de melanoma humano e células de carcinoma coloretais (~250.000 células de cada linhagem celular) são semeadas sobre as placas de cultura de tecido, e o meio de cultura de cada linhagem celular foi coletado 48 horas depois. Os níveis de MIA em meios de cultura ou plasma são medido por um kit comercial ELISA de única etapa, de acordo com o protocolo do fabricante (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN). As concentrações de MIA nas amostras do experimento são calculadas usando uma curva padrão variando de 3 a 37 ng/mL. Quando a concentração de MIA excedeu a concentração-padrão mais alta, as amostras são diluídas em 1:5 e analisadas novamente para ter os resultados incluídos na faixa de variação linear da curva padrão. Os dados são avaliados utilizando o teste t de Student (distribuição de duas caudas, variância desigual de duas amostras), usando $P \leq 0,05$ como o nível da significância.

Análises Estatísticas.

A regressão linear foi executada usando Microsoft Excel (Redmond, Washington). O teste t de Student foi usado para medir a significância estatística entre dois grupos de tratamento. Múltiplas comparações são feitas usando análise de variância de uma via (ANOVA), e o pós-teste comparando diferentes meios de tratamento foi feito utilizando o teste de Student-Newman Keul (SigmaStat, San Rafael, CA). Para estudos de sobrevivência, o teste de log rank foi usado para determinar a significância entre as curvas de sobrevivência dos vários tratamentos contra grupos de veículo (Prisma, San Diego, CA). Os camundongos sacrificados com uma situação de saúde normal ao final do estudo são considerados sobreviventes de longo prazo e censurados nessa análise. As diferenças são consideradas estatisticamente significativas em $p < 0,05$.

Análise Western Blot da linhagem de células de melanoma.

As linhagens das células de melanoma foram lavadas com PBS frio, colhidas das placas e lisadas em tampão RIPA (20 mM Tris, pH 8; 135 mM NaCl; 2 mM EDTA pH 8; glicerol a 10%; Triton X-100 a 1%; SDS a 0,1%; desoxicolato de sódio a 0.1%) contendo protease e coquetéis de inibidor de fosfatase (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) e 1 mM PMSF (Sigma) durante 1 hora a 4°C. Os lisados de proteína são centrifugados em 14.000 rpm durante 10 minutos e os sobrenadantes resultantes são coletados. O teor de proteína foi determinado usando o ensaio BCA (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). A proteína total foi submetida a eletroforese sobre gel de Tris-glicina Novex SDS-PAGE (Invitrogen) e a proteína foi transferida para membranas de nitrocelulose a 0,45 μ M (Invitrogen). Para detectar níveis de proteína FGFR-1, 2, 3 e 4, a proteína total (100 μ g) foi submetida a eletroforese no gel Tris-glicina Novex SDS-PAGE (Invitrogen) e a proteína foi transferida para membranas de nitrocelulose a 0,45 μ M (Invitrogen). As membranas foram bloqueadas em TBS-T (0,1% de Tween 20) contendo leite em pó sem gordura a 5% (tampão de bloqueio) por um mínimo de 1 hora em 4°C e depois incubado de 3 a 4 horas ou durante a noite com o anticorpo primário no tampão de bloqueio (proteína total) ou TBS-T

filtrado contendo BSA a 5% (fosfoproteína). O anticorpo anti-camundongo ou anticoelho secundários no tampão de bloqueio foram incubados durante 1 hora na temperatura ambiente. As membranas foram lavadas 3 x por 15 minutos com TBS-T (0,1% de Tween 20) seguido por detecção Western ECL (Amersham Biosciences) depois de exposição a um filme Kodak. A análise Western blot foi feita com um anticorpo específico para FGFR-1 (Novus Biologicals ab10646), FGFR-2 (Novus Biologicals ab5476), FGFR3 (Novus Biologicals ab10649) e FGFR-4 (Santa Cruz C-16).

Ensaio clonogênicos.

Os ensaios clonogênicos de sobrevivência são executados em uma microplaca com formato de 24 poços usando um ensaio modificado de ágar-ágar macio de duas camadas. Resumidamente, a camada de fundo consiste de 0,2 mL / poço do meio Modificado da Dulbecco de Iscoves (Invitrogen), complementado com soro fetal de bezerro a 20%, gentamicina a 0,01% p/v e ágar-ágar a 0,75%. A linhagem de células de melanoma humano é propagada em passagens seriais como xenoinxertos de tumor humano sólido que crescem subcutaneamente em camundongos NMRI nu/nu. As suspensões de célula única são geradas por desagregação mecânica e subsequente incubação com a digestão por enzima consistindo na collagenase tipo IV (41 U/mL, Sigma), DNase I (125 U/mL, Roche) e hialuronidase tipo III (100 U/mL, Sigma), no meio RPMI 1640 (Invitrogen), a 37°C durante 30 minutos. As células são passadas por peneiras de 200 µm e 50 µm de tamanho de rede e lavadas duas vezes com PBS estéril. As células ($1,5 \times 10^4$ a 6×10^4) são isoladamente semeadas no meio de cultura complementado com ágar-ágar a 0,4% e plaqueadas sobre uma camada de base e exposta a diversas concentrações do Composto 1, depois incubadas a 37°C e gás carbônico a 7,5% em uma atmosfera umedecida por 8 a 20 dias. As células são controladas microscopicamente em relação ao crescimento de colônia (diâmetro de > 50 µm). No momento da formação máxima de colônia, as contagens são realizadas com um sistema automático de análise de imagem (OMNICON 3600, Biosys GmbH).

Os efeitos do fármaco são expressos em termos da percentagem de formação de colônia, obtidos pela comparação do número médio de colônias nos poços tratados à contagem média de colônias de controle não-tratadas (as contagens relativas de colônia são traçadas em gráfico como o teste/controle, valor T/C [%]). Os valores de EC₅₀-, EC₇₀- e de EC₉₀- são concentrações do fármaco necessárias para a inibição da formação de colônia em 50%, 70% e 90% respectivamente. Como o controle positivo de cada experimento, 5-FU (Medac) em uma concentração de 1000 µg/mL foi usado para atingir uma sobrevivência de colônia de < 30% do controle.

10 Ensaio *in vivo* de angiogênese em Matrigel mediados por FGF.

Resumidamente, uma mistura de 0,5 mL de Matrigel (Becton Dickinson, Bedford, MA) e 2 µg de bFGF bovino (Chiron Corporação; Emeryville, CA) foi implantada subcutaneamente em camundongos BDF1 fêmeas (Charles River, Wilmington, MA). O veículo ou o Composto 1 foram fornecidos oralmente, diariamente durante 8 dias depois da implantação do Matrigel. A formação de vaso sanguíneo foi quantificada medindo níveis de hemoglobina nas tomadas de Matrigel depois da sua remoção dos animais. O teor de hemoglobina foi medido pelo procedimento de Drabkin (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO) de acordo com as instruções do fabricante.

20 Animais.

Os camundongos fêmeas Nu/Nu imunodeficientes (4 a 8 semanas) obtidos de Charles River Laboratories, Inc (Wilmington, MA) são alojado em uma instalação de barreira em jaulas com filtros superiores estéreis com ciclos claros/escuros de 12 horas e alimentados a comida de roedor e água estéreis à vontade. Os camundongos são implantados com chips ID subcutâneo quando da chegada e depois passam pelo menos 7 dias da aclimação antes do início do estudo. Todos os estudos dos animais são conduzidos em uma instalação acreditada pela Associação Internacional de Avaliação e Acreditação de Cuidado dos Animais de Laboratório e de acordo com todas as orientações do Comitê Institucional de Cuidado e Uso dos Animais e o *Guia de Cuidado e o Uso de Animais de Laboratório* (National Research Council).

Cultivo de célula para estudos de eficácia *in vivo*.

A linhagem celular de melanoma humano A375M foi cultivada para 6 passagens no meio EMEM com FBS a 10%, vitaminas a 1%, aminoácidos não-essenciais (NEAAs) e piruvato-Na em 37°C em uma atmosfera umedecida com CO₂ a 5%. A linhagem celular de melanoma humano CHL-1 foi cultivada para 6 passagens no meio DMEM com a baixa glutamina + FBS a 10% em 37°C em uma atmosfera umedecida com CO₂ a 5%.

Eficácia *in vivo* do agente único Composto 1 em modelos A375 (mutante B-Raf) e CHL-1 (tipo selvagem B-Raf).

No dia da implantação das células de tumor, as células tumorais foram colhidas e resuspendidas em HBSS (células A375) ou HBSS+ a 50% mais Matrigel a 50% (células de CHL-1; Becton Dickenson and Company, Franklin Lakes, NJ) em $2,5 \times 10^7$ células/mL. As células são inoculadas subcutaneamente no flanco direito a 5×10^6 células/200 µL/camundongo.

Quando o volume médio do tumor atingiu ~200 mm³ (12 a 15 dias depois da inoculação das células), os camundongos são espalhados aleatoriamente em grupos de 9 ou 10 baseado no volume do tumor e administrados ou o veículo ou o Composto 1 em 10, 30, 60 ou 80 mg/kg por via oral diariamente. Os tamanhos de grupo são de 9 animais por grupo (estudo A375) ou 10 animais por grupo (estudo CHL-1). O Composto 1 (batelada 41) foi formulado em citrato a 5 mM. Os volumes do tumor e o peso corporal são avaliados 2 a 3 vezes semanalmente usando o software Study Director 1.4 (Studylog Systems, Inc. So. São Francisco, CA). As medições do calibre dos tumores são convertidas no volume médio do tumor (mm³) utilizando da fórmula: $\frac{1}{2} [\text{comprimento (mm)} \times \text{largura (mm)}]^2$). A inibição do crescimento de tumor (TGI) foi calculada como $[1 - T/C] \times 100\%$ onde T = significa o volume de tumor do grupo de teste C = significa o volume do tumor do grupo de controle (estudos de agente único). Comparações do volume médio do tumor no tratamento contra o grupo do veículo foram avaliadas utilizando o teste t de duas caudas de Student (software Excel).

No estudo CHL-1, os níveis plasmáticos do marcador de melanoma, a proteína inibidora da atividade do melanoma (MIA) secretada por

células do melanoma, são também medidos.

Estudos de Eficácia *in vivo* da combinação Composto 1 + Carboplatina + Paclitaxel:

Camundongos nu/nu fêmeas (idade 6-8 semanas) são inocula-
 5 dos subcutaneamente no flanco direito dos camundongos com 3×10^6 células A375M ou CHL-1 (5×10^6 células com 50% Matrigel/0,1 mL / camundongo). Os tratamentos são iniciados quando o volume médio do tumor foi de 200 a 250 mm³ (dia 0 do estudo; camundongos/grupos de n= 10). Os tratamentos consistiram em qualquer veículo de fármaco sozinho, qd; carboplatina (50
 10 mg/kg) + paclitaxel (20 ou 25 mg/kg; 1x/semana x 4 semanas); Composto 1 (30 ou 50 mg/kg); qd para 4 semanas ou terapia de combinação do Composto 1 e carboplatina + paclitaxel (nas doses indicadas; dia 1).

Os volumes de tumor e o peso corporal são avaliados 2 a 3 vezes semanalmente usando o software Study Director 1.4 (Studylog Systems, Inc., So. San Francisco, CA). As medições de calibre de tumores são convertidas no volume médio do tumor (mm³) utilizando da fórmula: $\frac{1}{2} [\text{comprimento (mm)} \times \text{largura (mm)}]^2$. A inibição do crescimento do tumor (TGI) foi calculada $[1 - \{(\text{volume médio do tumor do grupo tratado} - \text{volume de tumor no grupo aleatório}) / \text{volume médio do tumor do grupo de controle} - \text{volume de}$
 15 $\text{tumor no grupo aleatório}\} \times 100$. O TGI foi calculado quando o volume médio do tumor do veículo foi de aproximadamente 1500 a 2000 mm³. As respostas foram definidas como ou uma resposta completa (CR, nenhum tumor mensurável) ou uma resposta parcial (PR, redução de volume de tumor de 50% a 99%) em comparação ao volume de tumor de cada animal no início
 20 do tratamento.

Os efeitos sinérgicos foram definidos quando a proporção da inibição esperada% de crescimento de tumor pela terapia de combinação $[(\%T/C_{\text{exp}} = \%T/C \text{ tratamento 1} \times \%T/C \text{ tratamento 2}) \text{ dividido pelo \% observado } T/C (\%T/C_{\text{obs}}) \text{ no tratamento de combinação}] \text{ foi } > 1$. Os efeitos aditivos
 30 foram definidos quando $\%T/C_{\text{exp}} / \%T/C_{\text{obs}} = 1$, e o antagonismo quando $\%T/C_{\text{exp}} / \%T/C_{\text{obs}} < 1$ (39).

Teste ELISA de captura da célula FGF-R.

Dia 1. Semeadura de célula: as células HEK293 foram tripsinizadas, e contadas usando um contador CASY (Schärfe System) e 10^4 células/poço foram plaqueadas na microplaca de 96 poços (TPP nº 92096), em 100 µL de DMEM 4,5 g/L de glicose, FBS a 10%, 1% de L-glutamina. As células foram incubadas 24 h em 37°C, CO₂ a 5%.

Dia 1. Transfecção de célula e revestimento de placas de experiência: as células de HEK293 são transfectado com pcDNA3.1-FGF-R1, pcDNA3.1-FGF-R2, pcDNA3.1-FGF-R3, pcDNA3.1-FGF-R4 ou vetores pcDNA3.1 usando reagente Eugene-6 (Roche nº11814443001) como se segue, reagente Eugene-6 (0,15 µL/poço) foi primeiro mistura com Optimem I (Gibco nº 31985-047) (5 µL/poço) seguido por adição de vetor DNA (0,05 µg/poço). Esta mistura foi incubada 15 min na temperatura ambiente. 5,2 µL desta mistura são posteriormente acrescentados sobre as células. As células foram incubadas por 24 h em 37°C, CO₂ a 5%. Uma microplaca de 96 poços FluoroNunc (Maxisorp F96 preto, Nunc nº 437111A) foi coberta de 2 µg/ml de α-FGF-R1 AB (R&D Sistemas nº MAB766), α-FGF-R2 AB (R&D Sistemas nº MAB665), α-FGF-R3 AB (R&D Sistemas nº MAB766) ou α-FGF-R4 AB (R&D Sistemas nº MAB685) AB. A placa FluoroNunc foi incubada durante a noite em 4°C.

Dia 3. Diluições compostas, tratamento de célula e processamento de célula: a placa coberta do FluoroNunc foi lavada 3 x com 200 µL de PBS/0 contendo Tween® 20 a 0,05% (Sigma nº P-1379), e bloqueado por 2h na temperatura ambiente com 200 µL/poço de PBS/0 contendo Tween® 20 a 0,05%, Bloco Superior de 3% (VWR-internacional nº 232010). A placa foi posteriormente lavada 3 x com 200 µL de PBS/0 contendo Tween® 20 a 0,05%. As diluições seriais do composto (estoque a 10 mM) foram realizadas primeiramente em DMSO (Serva nº 20385). A etapa de diluição final foi feita no meio de crescimento para atingir DMSO de 0,2% nas células. 11,5 µL de cada diluição foram adicionados sobre células em triplicatas. O tratamento foi realizado por 40 min em 37°C. As células foram lisadas em 100 µL/poço tampão de lise para ELISA (50 mM de Tris de pH 7,5, NaCl a 150 mM, EG-

TA a 1 mM, EDTA a 5 mM, Triton de 1%, 2 mM vanadato de Na, 1 mM PMSF e coquetel de inibidores de protease Roche nº 11873580001), e 50 µL do lisado de célula é transferido para a placa coberta do FluoroNunc. A placa coberta então foi incubada por 5 h em 4°C. A placa foi lavada 3 x com 200 µL/poço de PBS/0 contendo Tween® 20 a 0,05%. α-pTyr-AP AB (Zymed PY20 nº 03-7722) (1:10.000 em TopBlock a 0,3% / PBS / Tween® 20 a 0,05%) foi acrescentado em 50 µL/poço. A placa foi incubada durante a noite em 4°C, selada com selante Thermowell®.

Dia 4. Revelação do ensaio: a placa FluoroNunc foi lavada 3 x com 200 µL de PBS/0 contendo Tween® 20 a 0,05%, e 1 x com H₂O. 90 µL de CDP-Star (Applied Biosystems nº MS1000RY) foram adicionados sobre cada um poço. A placa foi incubada 45 min no escuro, na temperatura ambiente e a luminescência foi depois medida usando o luminômetro TOP Count NXT (Packard Bioscience).

RESULTADOS.

O Composto 1 Demonstra Potente Inibição da Atividade da Quinase FGFR.

A especificidade do Composto 1 foi testada contra uma lista de diversas RTKs usando ensaios de ligação competitivos com ATP com enzimas purificadas tais como descrito acima. O Composto 1 foi encontrado como sendo altamente potente contra uma faixa de quinases, incluindo a FLT3 (1 nM) com a atividade nanomolar contra c-KIT (2 nM), VEGFR1/2/3 (10 nM); FGFR1/3 (8 nM); o PDGFRβ (27 nM) e CSF-1R (36 nM) (Ver Tabela 1A). Para confirmar a seletividade contra as RTKs Classes III, IV e V, o Composto 1 foi testado contra outras quinases nos caminhos PI3K/Akt e MAPK(K) e foi encontrado como tendo atividade insignificante (IC₅₀ > 10 µM) (Ver Tabela 1A).

Tabela 1A. Atividade da 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil piperazinil-1)-1H-benzimidazolil-2] quinolinona-(1H)-2 contra várias RTKs.

RTK	IC ₅₀ (μM)
FLT3	0,001
c-KIT	0,002
CSF-1R	0,036
FGFR1	0,008
FGFR2	0,05
FGFR3	0,009
FGFR4	3
VEGFR1/Flt1	0,01
VEGFR2/Flk1	0,013
VEGFR3/Flt4	0,008
PDGFRβ	0,027
PDGFRα	0,21
TIE2	4

- 5 A atividade quinase de diversas quinases da proteína tirosina foi medida usando os procedimentos apresentados acima para os Compostos 2 e 3 para fornecer os valores de IC₅₀ mostrados na Tabela 1B.

Tabela 1B. IC₅₀ dos Compostos 2 e 3.

Composto	IC ₅₀ (μM)					
	VEGFR flt	VEGFR flk1	bFGFR	PDGFR	Flt3	c-kit
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

- Expressão de FGFR1-4 em células humanas de melanoma. Os
- 10 níveis de proteína FGFR1-4 são examinados em uma lista de tecidos de tumor de melanoma primário humano (Oncotest de tumores: 1341/3, 1765/3, 276/7, 462/6, 514/12, 672/3, 989/7) e linhagem de células (CHL-1, HMCB, SK-Mel-2, A375M, G361, SK-Mel-28, SK-Mel-31) para representar a expressão relativa do perfil de quatro receptores FGF pela análise Western (Figura
- 15 1). A especificidade do anticorpo para cada FGFR foi confirmada usando

lisado de proteína das células T FGFR⁺ 293 transitoriamente expressadas expressando cada FGFR (dados não-mostrados).

Como mostrado na Figura 1, todas as células de melanoma expressaram um modelo diferencial das FGFRs nas células. Níveis apreciáveis de FGFR1 (exceto SK-Mel-28), FGFR2 (exceto MEXF 462), FGFR3 (exceto G361) foram encontrados em células de melanoma. A expressão da FGFR4 foi ligeiramente mais inconsistente com altos níveis de FGFR4 expressados nas CHL-1, HMCB, A375M, G361, níveis intermediários nas 276/7, 514/12, 672/3, 989/7, níveis baixos nas SK-Mel-2, 462/6, 1765/3, e nenhum nível detectável nas SK-Mel-28, SK-Mel-31 e 1341/3.

Avaliação clonogênica in vitro do Composto 1 contra células tumorais de melanoma.

Avaliamos a atividade clonogênica do Composto 1 em ágar-ágar macio contra sete tecidos de melanomas primários *ex vivo*: 1341/3, 1765/3, 276/7, 462/6, 514/12, 672/3, 989/7. Nestes experimentos, as células tumorais foram expostas a diversas concentrações do Composto 1 em um faixa de variação de concentração de 0,001 nM a 10 µM. As respostas de fármaco foram avaliadas dos valores relativos de EC₅₀ (ver Tabela 2). A sensibilidade geral ao Composto 1 foi da ordem de: 1765/3 (2,58 µM) > 989/7 (2,54 µM) > 1341/3 (2,24 µM) > 672/3 (1,67 µM) > 276/7 (1,14 µM) > 514/12 (1,05 µM) > 462/6 (0,70 µM).

Tabela 2: Avaliação Clonogênica do Composto 1 Contra Células tumorais de Melanoma.

MEXF	IC ₅₀
1765/3	2,58
989/7	2,54
1341/3	2,24
672/3	1,67
276/7	1,14
514/12	1,05
462/6	0,70

Inibição da angiogênese mediada por FGF *in vivo* pelo Composto 1. Para determinar se o Composto 1 pode inibir a angiogênese mediada por bFGF *in vivo*, os seus efeitos são avaliados em um modelo de implante

em Matrigel dirigido por bFGF. A neovascularização marginal foi observada com o Matrigel sozinho (sem suplemento de bFGF), entretanto a adição nos implantes subcutâneos de bFGF em Matrigel resultou em uma indução significativa da neovascularização, determinado pela quantificação dos níveis de hemoglobina nos tampões de Matrigel (Figura 2). O tratamento diário do Composto 1 em doses de 3 a 100 mg/kg durante 8 dias resultou em uma inibição dependente da dose da neovascularização direcionada pela bFGF (IC₅₀ de 3 mg/kg). Todas as doses resultaram em uma redução estatisticamente significativa em comparação com o veículo ($p < 0,05$). De modo interessante, todas as doses > 10 mg/kg foram menos do que o nível basal de hemoglobina observado com implante de Matrigel não-complementado, claramente indicando que o Composto 1 inibe fortemente a angiogênese dirigida pela bFGF *in vivo*.

Estudos de Eficácia Antitumoral do Composto 1.

A atividade do Composto 1 como agente único ou em combinação com a carboplatina + paclitaxel foi nivelada em dois modelos de tumor de melanoma com perfis semelhantes de expressão da FGFR mas diferenciando-se nos seus estados mutacionais da B-Raf (mutante A375M B-Raf e tipo selvagem CHL-1 B-Raf).

Atividade de Composto 1 como um agente único no modelo de melanoma A375.

O Composto 1 demonstrou inibição significativa sobre o crescimento de tumor no modelo de xenoenxerto subcutâneo de melanoma humano A375M em camundongos Nu/Nu. A análise do crescimento primário do tumor é mostrada na Figura 3. Existiu uma diferença significativa no crescimento médio de tumor no grupo de 80 mg/kg em comparação com o grupo do veículo nos dias 3, 5, 21 e 25 de dosagem. A percentagem de inibição de crescimento de tumor (TGI) está baseada nos volumes de tumor no dia 25. A administração oral do Composto 1 com 10, 30, 60 e 80 mg/kg resultou em TGI de 28%, 45%, 58% e 69%, respectivamente. Nenhuma perda de peso corporal significativa (nenhuma perda de peso corporal maior do que aproximadamente 5%) ou outros sinais clínicos de toxicidade foram observados

em qualquer grupo.

Atividade do Composto 1 como um agente único no modelo de melanoma CHL-1.

O Composto 1 demonstrou a inibição significativa do crescimento de tumor sobre o modelo de xenoenxerto subcutâneo de melanoma humano CHL-1 em camundongos Nu/Nu. A análise do crescimento primário do tumor é mostrada na Figura 4. Houve uma diferença significativa no crescimento de tumor médio nos grupo de 30, 60 e 80 mg/kg em comparação com o grupo do veículo de dias 8 a 25 da dosagem. A percentagem de TGI está baseada nos volumes de tumor no dia 25. A administração oral de Composto 1 em 10, 30, 60 e 80 mpk resultaram em TGI de 64%, 73%, 89% e 87%, respectivamente. Nenhuma perda de peso corporal significativa (nenhuma perda de peso corporal maior do que aprox. 5%) ou outros sinais clínicos da toxicidade são observados em qualquer grupo.

Os níveis plasmáticos de MIA são avaliados nos dias 0, 8 e 22 no veículo, nos grupos de 30 mg/kg e 80 mg/kg (dados não-mostrados). Os níveis de MIA no dia 0 em todos os grupos estão abaixo do limiar da detecção. Pelo dia 8, os níveis de MIA no grupo do veículo tinham subido a 7,7 ng/mL, enquanto que os níveis de MIA nos grupos tratados foram indetectáveis. Os volumes de tumor e os níveis de MIA foram também baixos em relação ao grupo do veículo no dia 22. Além disso, os níveis plasmáticos de MIA são baixos (isto é, indetectáveis) nos animais tratados nos dias 8 e 22 e mais altos nos controles do veículo.

Atividade do Composto 1 em combinação com Carboplatina + Paclitaxel.

No modelo de melanoma A375M, diariamente a dosagem do Composto 1 sozinho produziu a inibição significativa de crescimento do tumor que foi estatisticamente diferente do tratamento com veículo (TGI de 74%, $p < 0,05$). Semanalmente a carboplatina (50 mg/kg) e o paclitaxel (20 mg/kg) produziram um TGI de aproximadamente 45%; (Figura 5 e Tabela 3). O tratamento combinado do Composto 1 e carboplatina + paclitaxel aumentou a atividade antitumoral (TGI de 94% contra o veículo, $p < 0,001$) com

- respostas parciais 1/10 observadas nesse grupo de tratamento e foi superior às monoterapias. A terapia de combinação do Composto 1 (50 mg/kg) com a carboplatina + paclitaxel era geralmente bem tolerada com perda de peso corporal < 5% (BWL) observado nos agentes únicos e nos grupos de combinação e analisados como uma resposta aditiva (ver Tabelas 2/3, isto é, esperado/observado (E/O) aproximadamente 1).
- 5

Tabela 3: Atividade do Composto 1 em Tratamento Combinação no Modelo de Melanoma A375M.

Tratamento, n=10/grupo	Média TV, dia 25	% TGI, dia 25	Valor de P vs. Veículo dia 25	PR/CR	% médiaBW troca vs ini- cial	Observa- ções Clíni- cas	% T/C Ob- serva do (O)	T/Cespe- rado (E)	Razão (E/O)
Veículo	759				0%	BAR			
Composto 150 mg/kg,qd	315	75%	<0,01		0%	BAR	0,42		
Carbo plati- na50 mg/kg + Pacitaxel20 mg/kg,1x/se mana	494	45%	>0,05		1%	BAR	0,65		
TK125850 mg/kg + Car- boplati-na +Pacilita-xel	203	94%	<0,001	1PR	-5%	1 camun- dongo com BWL > 15%/dia25	0,27	0,27	1,01

Inibição de crescimento de tumor (TGI) = $[1 - \{(\text{volume médio do tumor, TV do grupo tratado} - \text{volume do tumor aleatório}) / (\text{volume médio do tumor do grupo de controle} - \text{volume de tumor aleatório})\}] \times 100$; BAR = desperto, vigilante, responsivo; BWL = perda de peso corporal; teste estatístico = análise de variância de uma via de Kruskal-Wallis de Ranks/Dunn; Respostas = CR (resposta Completa, nenhum tumor mensurável), ou PR (resposta parcial, redução de volume de tumor de 50% a 99% em comparação ao volume de tumor de cada animal em iniciação de tratamento); resposta aditiva = razão de E/O de 1,0.

As terapias de combinação de carboplatina + paclitaxel são também avaliadas no modelo CHL-1. Como visto na Figura 6 e na Tabela 4, a inibição do tumor com a dosagem diária do Composto 1 (30 mg/kg) + semanalmente a dosagem de carboplatina (50 mg/kg) + paclitaxel (25 mg/kg) foi significativamente aumentada (TGI de 84%) em comparação a agentes únicos. A terapia de combinação do Composto 1 e carboplatina + paclitaxel foi bem tolerada e significativamente diferente da carboplatina + paclitaxel ($p < 0,05$ ANOVA/de Dunn), mas não o Composto 1 (30 mg/kg, qd) sozinho ($p < 0,05$, teste t). Entretanto, em análises mais detalhadas de respostas do fármaco, foi observada uma resposta maior do que a resposta aditiva (insinuação de sinergia) com o Composto 1 + carboplatina + paclitaxel no modelo de melanoma CHL-1 ($E/O > 1$).

Tabela 4: Combinação de Composto 1 e/ou Carboplatina + Pacitaxel Contra Tumores de Melanoma B Raf WT CHL-1 em Camundongos Nu/Nu Fêmeas.

Tratamento (n=10/gp)	Média de T _v no dia 14	Max% TGI;dia 14	TGI vs.Veículo valor de P;dia 14	% Média troca no BW do iní- cio	Observa- ções Clíni- cas	T/C Obser- vado (O)	T/C Espera- do (E)	Razão (E/O)
Veículo	1567			8,1%				
Carbopla ti- na 50 mg/kg + Pacitaxel 25 mg/kg, 1x/se- mana	1693	-9,65%	> 0,05	2,4%	BAR	1,08		
Composto 130 mg/kg, qd	884	52,51%	> 0,05	4,3%	BAR	0,56		
Composto 130 mg/kg + Carbo + Pacli	476	83,79%	> 0,05	3,5%	1 BWL > 15%	0,030	0,61	2,00

Inibição de crescimento de tumor (TGI) = $[1 - \{(\text{volume médio do tumor, TV de grupo tratado} - \text{volume de tumor aleatório}) / \text{volume médio do tumor de grupo de controle} - \text{volume de tumor aleatório}\} \times 100]$; BAR = des-
 5 perto, vigilante, responsivo; BWL = perda de peso corporal; Kruskal-Wallis
 de Uma Via ANOVA em Ranks/Dunn; E/O = 1 (resposta aditiva). E/O > 1
 (sinérgica).

Ensaio ELISA de captura da célula FGF-R.

Como mostrado abaixo na Tabela 5, o Composto 1 inibe a fosfo-
 rilação celular dos receptores da FGF bem como outras quinases de tirosina.

10 Tabela 5. Composto 1 Inibe a Fosforilação Celular dos Alvos
RTK.

Alvo	Linhagem celular	TKI258 nM IC ₅₀
FGFR1	HEK293 Transfectada	166
FGFR2	HEK293 Transfectada	78
FGFR3K650E*	HEK293 Transfectada	55
FGFR4	HEK293 Transfectada	1915
FLT3	RS4;11 AML	500
FLT3-ITD	MV4;11 AML	1 a 5
VEGFR1	KM12L4a do Co- lon	< 50
VEGFR2	HMVEC	<10
PDGFRb	KM12L4a do Co- lon	< 50

*FGFR3K650E é uma mutação de ativação vista em um subcon-
 junto de pacientes de mieloma múltiplo.

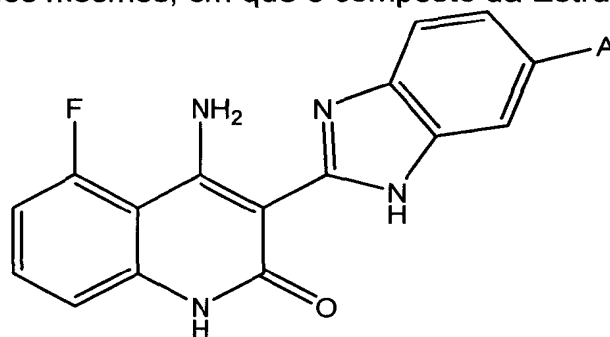
Outros compostos da Estrutura I, tais como os compostos da
 15 Estrutura IB, e IC foram preparados tal como descrito acima. Os estudos
 usando esses compostos podem ser realizados utilizando a metodologia
 descrita acima para o Composto 1. Esses estudos mostrarão que esses
 compostos também são úteis no tratamento do melanoma, em camundon-
 gos, humano, e outros pacientes mamíferos.

Todas as publicações, aplicações Pedidos de Patentes, Patentes Emitidas, e outros documentos referidos neste Relatório Descritivo são aqui incorporados pela referência como se cada publicação individual, Pedido de Patente, Patente Emitida, ou outro documento, foi especificamente e
5 individualmente indicado para ser incorporado em sua totalidade pela referência. As definições que estão contidas no texto incorporado pela referência são excluídas até o ponto que elas contradizem as definições da presente descrição.

Entende-se que a invenção não está limitada às modalidades
10 aqui apresentadas como ilustração, mas abarca todas tais formas da mesma conforme esteja dentro do alcance do presente documento.

REIVINDICAÇÕES

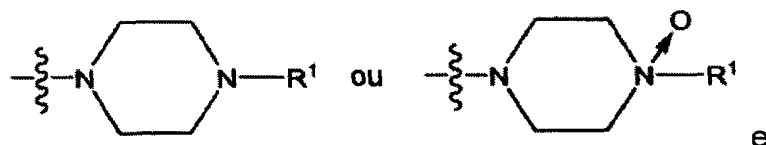
1. Uso de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto de Estrutura I, um tautômero do composto, um sal farmaceuticamente aceitável do composto, um sal farmaceuticamente aceitável do tautômero, ou uma mistura dos mesmos, em que o composto da Estrutura I é:



I

em que,

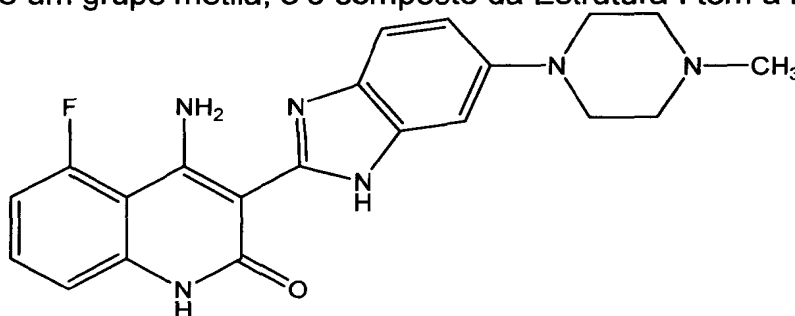
A é um grupo selecionado de



R^1 é selecionado de H ou grupos alquila de cadeia reta ou ramificada possuindo de 1 a 6 átomos de carbono,

- 10 referido uso sendo caracterizado pelo fato de ser para a preparação de um medicamento para tratamento de melanoma.

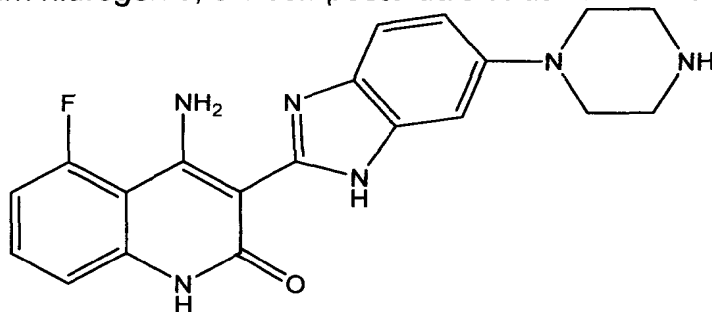
2. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que R^1 é um grupo metila, e o composto da Estrutura I tem a Estrutura IA:



IA

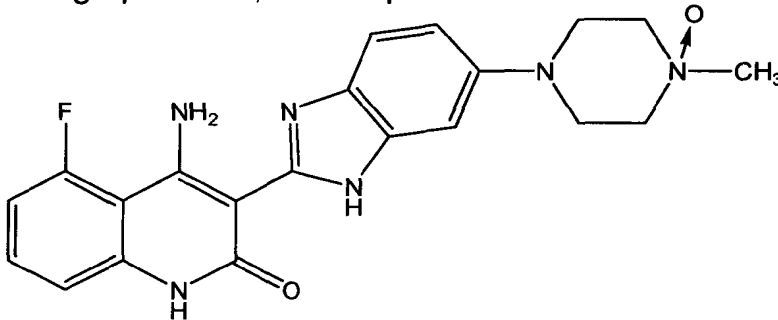
3. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato

de que R¹ é um hidrogênio, e o composto da Estrutura I tem a Estrutura IB:



IB

4. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que R¹ é um grupo metila, e o composto da Estrutura I tem a Estrutura IC:



IC

5. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que trata-se do sal de lactato do composto da Estrutura I, ou tautômero do mesmo.

6. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o medicamento é direcionado a pacientes humanos.

7. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o melanoma foi metastasiado.

8. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o melanoma é o melanoma de extensão superficial, o melanoma noduloso, o melanoma acral lentiginoso, o melanoma lentigo maligno, ou o melanoma lentiginoso da mucosa.

9. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o melanoma é cutâneo ou extracutâneo.

10. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o melanoma é intraocular ou um sarcoma de célula clara de tecidos

mols.

11. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que também compreende o uso de um ou mais fármacos anticâncer para o tratamento do melanoma.

5 12. Uso de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que um ou mais fármacos anticâncer são selecionados do grupo consistindo na alquilação de fármacos anticâncer, nitrosoureas, taxanos, alcaloides da vinca, inibidores da topoisomerase, antibióticos anticâncer, e fármacos anticâncer à base de platina.

10 13. Uso de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que um ou mais fármacos anticâncer são selecionado do grupo consistindo em dacarbazina, temozolomida, carmustina, lomustina, fotemustina, paclitaxel, docetaxel, vinblastina, irinotecano, talidomida, estreptozocina, dactinomicina, mecloretamina, cisplatina, e carboplatina, mesilato de imatinib, sorafenib, sunitinib, ou erlotinib.

14. Uso de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que um ou mais fármacos anticâncer são selecionados do grupo consistindo de interferons e interleucina-2.

20 15. Uso de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que um ou mais fármacos anticâncer são selecionados do grupo consistindo de interferon alfa-2a, interferon alfa-2b, interferon alfa-2b PEG-lado, e interleucina 2.

25 16. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a quantidade terapêuticamente eficaz dos compostos varia de aproximadamente 0,25 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg.

17. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a quantidade terapêuticamente eficaz dos compostos varia de aproximadamente 25 mg/dia a aproximadamente 1.500 mg/dia.

30 18. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a quantidade terapêuticamente eficaz dos compostos varia de aproximadamente 100 mg/dia a aproximadamente 600 mg/dia.

19. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato

de que o melanoma expressa o receptor 1, 2, 3 e/ou 4 do fator de crescimento de fibroblasto.

20. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o melanoma expressa o Raf tipo selvagem, o Raf mutante, o Ras tipo selvagem, o Ras mutante, o c-Kit tipo selvagem ou o c-Kit mutante.
- 5

FIG. 1

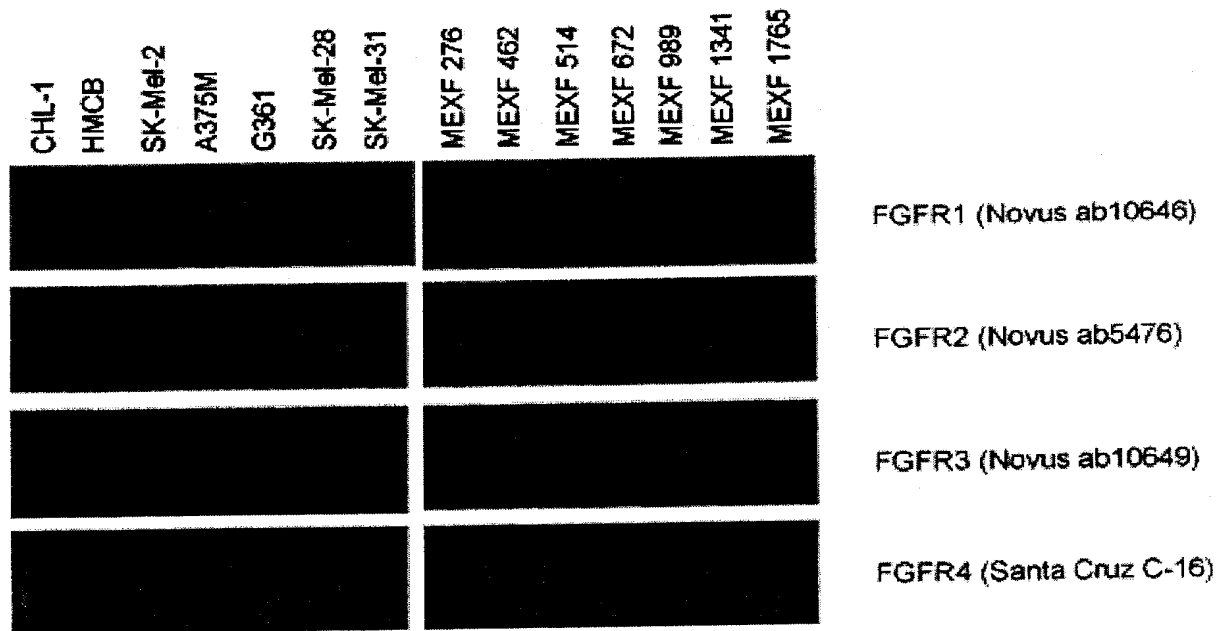


FIG. 2

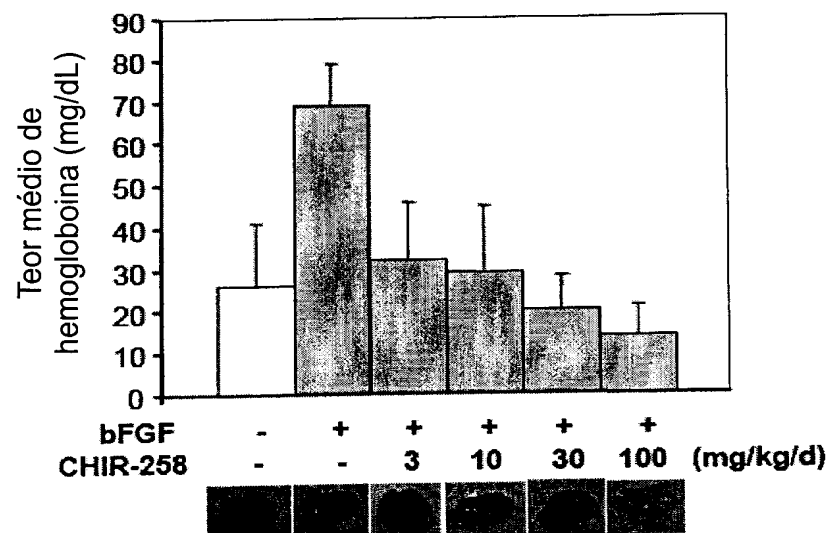


FIG. 3

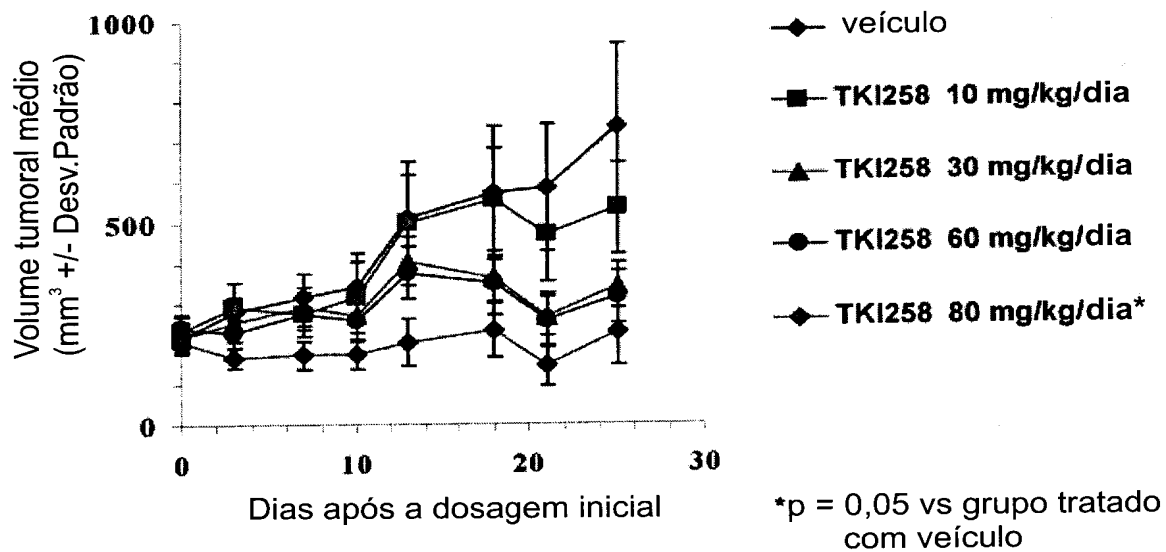


FIG. 4

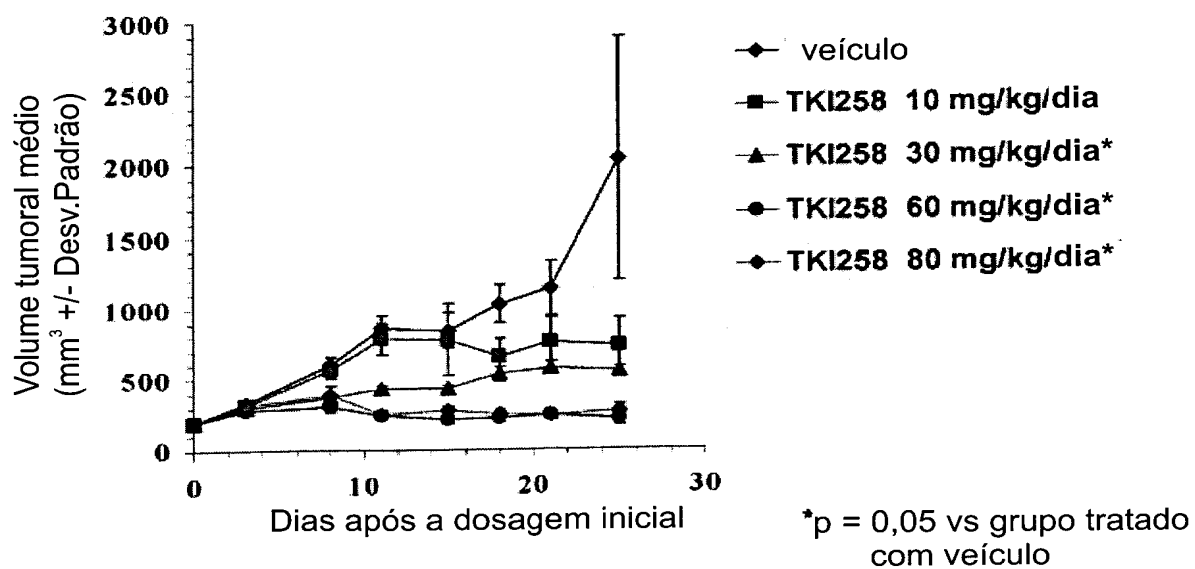


FIG. 5

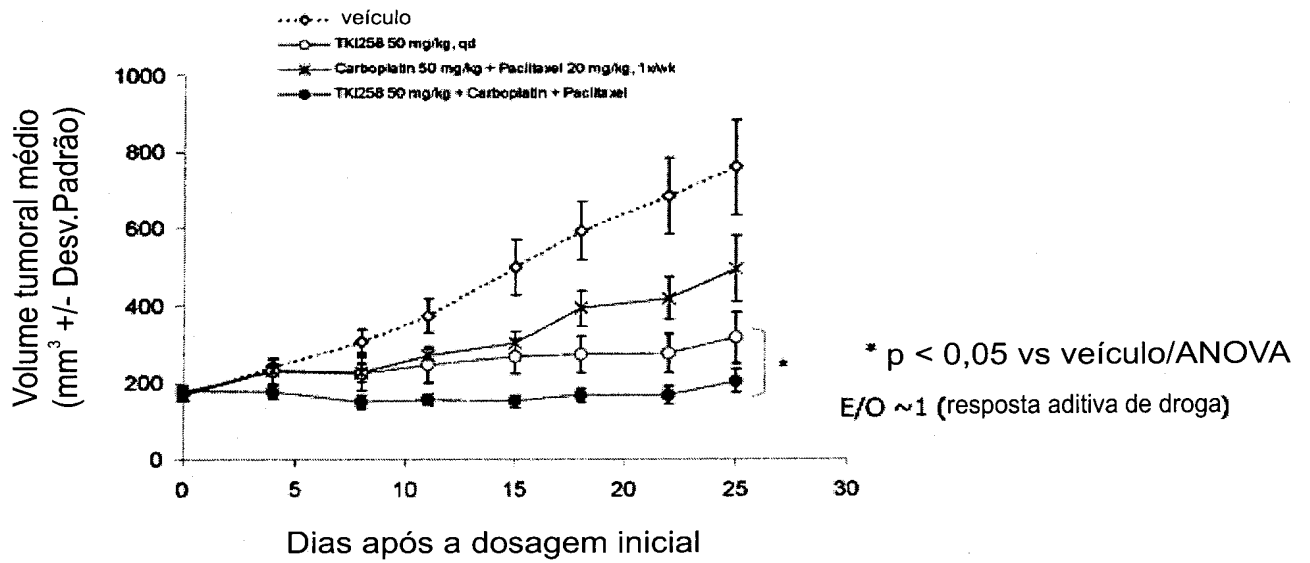
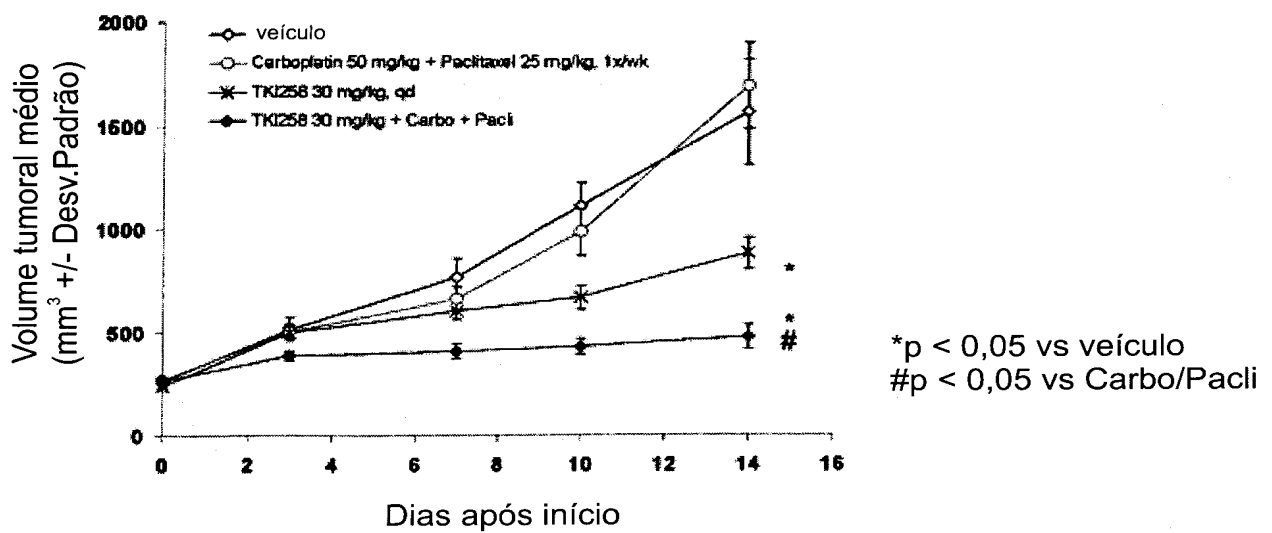


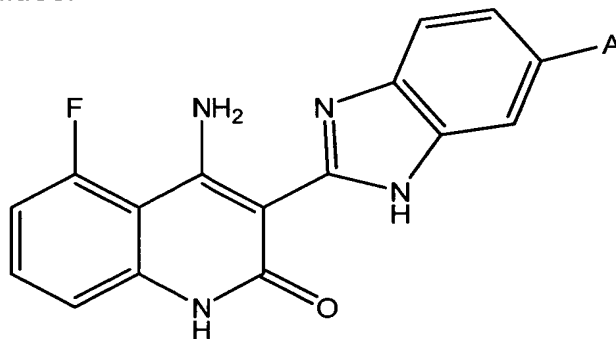
FIG. 6



RESUMO

Patente de Invenção: "USO DE COMPOSTOS, TAIS COMO 4-AMINO-5-FLUORO-3-[6-(4-METIL PIPERAZINIL-1)-1H-BENZIMIDAZOLIL-2] QUINOLINONA-(1H)-2 E TAUTÔMEROS, SAIS, E MISTURAS DOS MESMOS NO PREPARO DE MEDICAMENTOS PARA O TRATAMENTO DO MELANOMA".

A presente invenção refere-se aos métodos de tratamento do melanoma os quais incluem a administração de um composto da Estrutura (I), um tautômero do composto, um sal farmacologicamente aceitável do composto, um sal farmacologicamente aceitável ou tautômero, ou uma mistura dos mesmos a um paciente. O composto, tautômero, o sal do composto, o sal do tautômero, ou a mistura dos mesmos podem ser usados para preparar medicamentos para tratar o câncer metastático. A variável A possui os valores aqui definidos.



I