



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej  
Polskiej

(96) Data i numer zgłoszenia patentu europejskiego:  
**21.06.2013 13731470.4**

(97) O udzieleniu patentu europejskiego ogłoszono:  
**06.12.2017 Europejski Biuletyn Patentowy 2017/49  
EP 2864328 B1**

(13) **T3**  
(51) Int.Cl.  
**C07D 471/04 (2006.01)**  
**C07D 471/06 (2006.01)**

---

(54) Tytuł wynalazku:

**ZWIĄZKI AKTYWNE FARMACEUTYCZNE**

---

(30) Pierwszeństwo:  
**21.06.2012 GB 201211021**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:  
**29.04.2015 w Europejskim Biuletynie Patentowym nr 2015/18**

(45) O złożeniu tłumaczenia patentu ogłoszono:  
**29.06.2018 Wiadomości Urzędu Patentowego 2018/06**

(73) Uprawniony z patentu:  
**The Institute of Cancer Research: Royal Cancer Hospital, London, GB**

(72) Twórca(y) wynalazku:  
**JULIAN BLAGG, Sutton, GB**  
**VASSILIOS BAVETSIAS, Sutton, GB**  
**ANDREW S. MOORE, Herston, AU**  
**SPYRIDON LINARDOPOULOS, Sutton, GB**

(74) Pełnomocnik:  
**rzecz. pat. Adam Kudaj**  
**LDS ŁAZEWSKI DEPO I WSPÓLNICY SP. K.**  
**ul. Prosta 70**  
**00-838 Warszawa**

**PL/EP 2864328 T3**

---

**Uwaga:**

W ciągu dziewięciu miesięcy od publikacji informacji o udzieleniu patentu europejskiego, każda osoba może wnieść do Europejskiego Urzędu Patentowego sprzeciw dotyczący udzielonego patentu europejskiego. Sprzeciw wnosi się w formie uzasadnionego na piśmie oświadczenia. Uważa się go za wniesiony dopiero z chwilą wniesienia opłaty za sprzeciw (Art. 99 (1) Konwencji o udzielaniu patentów europejskich).

**ZWIĄZKI AKTYWNE FARMACEUTYCZNIE****5 WPROWADZENIE**

[0001] Niniejszy wynalazek dotyczy związków aktywnych farmaceutycznie. Konkretniej, niniejszy wynalazek dotyczy związków, które są inhibitorami aktywności enzymu kinazy Aurora. Związki według wynalazku są także inhibitorami aktywności FMS-podobnej kinazy tyrozynowej 3 (FLT3). Niniejszy wynalazek dotyczy także sposobów wytwarzania tych

10 związków, zawierających je kompozycji farmaceutycznych i ich zastosowania w leczeniu zaburzeń proliferacyjnych, takich jak rak, jak również innych chorób lub stanów chorobowych, z którymi wiąże się aktywność kinazy Aurora i/lub FLT3.

**TŁO WYNALAZKU**

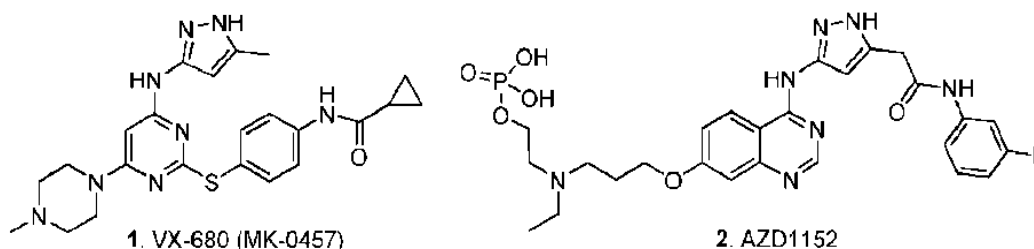
15 [0002] Choroby proliferacyjne, takie jak rak, charakteryzują się niekontrolowaną i nieuregulowaną proliferacją komórkową. Właśnie to, co powoduje, że komórka proliferuje w niekontrolowany i nieuregulowany sposób, jest przedmiotem intensywnych badań prowadzonych w ostatnich dziesięcioleciach.

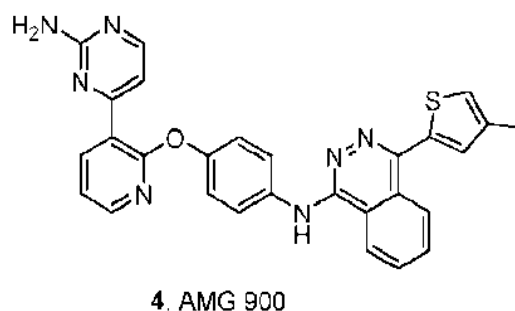
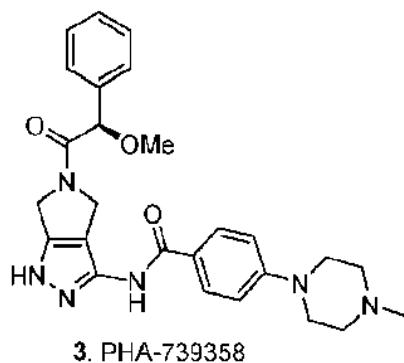
[0003] Kinazy Aurora, rodzina trzech kinaz seryno-treoninowych oznaczonych jako A, B i C, odgrywają kluczowe i odrębne role w różnych stadiach mitozy.<sup>1-3</sup> We wczesnych stadiach mitozy Aurora-A tworzy kompleks z białkiem ukierunkowanym na Xklp2 (TPX2), które reguluje dojrzewanie centrosomu i budowę wrzeciona mitotycznego.<sup>4,5</sup> Aurora-B tworzy kompleksy z wewnętrznym białkiem centromerowym (INCENP), surwiwiną i borealiną, regulując w ten sposób kondensację chromosomów, wyrównanie chromosomów, mitotyczny punkt kontrolny i

25 cytokinezę.<sup>6-9</sup> Nadmierna ekspresja Aurora-A i Aurora-B była odnotowywana w odniesieniu do szerokiego zakresu ludzkich nowotworów, w tym raka sutka, jelita grubego, jajnika, glejaka, raka tarczycy i nasieniaka.<sup>11-16</sup> Funkcja Aurora-C podczas mitozy jest słabiej poznana. Jednak wysoką ekspresję Aurora-C odnotowywano w jądrach.<sup>17,18</sup>

[0004] W ostatnich latach drobnocząsteczkowe celowanie w kinazy Aurora stało się

30 powszechną strategią odkrywania nowych chemioterapeutyków nowotworowych, i opisano wiele strukturalnie zróżnicowanych inhibitorów aktywności Aurora,<sup>18-20</sup> w tym **1** (VX-680 (MK-0457)),<sup>21</sup> **2** (AZD1152)<sup>22</sup>, **3** (PHA-739358)<sup>23,24</sup> i **4** (AMG 900)<sup>25</sup> (patrz poniżej).

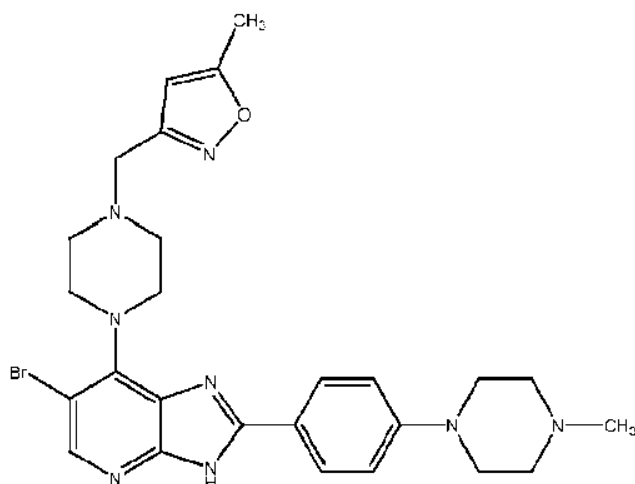




5 [0005] Pozostaje jednak potrzeba identyfikacji dalszych środków terapeutycznych zdolnych do hamowania aktywności kinazy Aurora.

[0006] Międzynarodowe zgłoszenia patentowe nr WO2007/072017 i WO2009/001021 ujawniają serię pochodnych imidazo[4,5-*b*]pirydyny, które działają jako inhibitory aktywności kinazy Aurora i które są więc potencjalnie użytecznymi środkami terapeutycznymi do leczenia raka. Jeden szczególny związek ujawniony w WO2009/001021 jest pokazany poniżej.

10



15 [0007] Ten szczególny związek (znany jako CCT137690) jest silnym i biodostępnym doustnie inhibitorem kinaz Aurora, który hamuje wzrost ksenoprzeszczepu ludzkiego raka okrężnicy SW620 *in vivo* z jednoczesną modulacją biomarkerów zgodną z zaangażowaniem w cel.<sup>26</sup> Jednak przedkliniczne opracowanie tego związku było ograniczone ze względu na jego wąski margines bezpieczeństwa względem hERG<sup>43</sup> ( $IC_{50} = 3,0 \mu M$ )<sup>26</sup> oraz jego niską stabilność mikrosomalną w wątrobie ludzkiej (86% metabolizowane po 30 minutach inkubacji, dane niepublikowane).

20 [0008] Dlatego celem niniejszego wynalazku jest dostarczenie doustnie biodostępnych inhibitorów aktywności enzymu kinazy Aurora, odpowiednich do oceny przedklinicznej i klinicznej.

[0009] Dlatego celem niniejszego wynalazku jest dostarczenie doustnie biodostępnych inhibitorów aktywności enzymu kinazy Aurora, które wykazują dopuszczalną stabilność mikrosomalną u człowieka, zmniejszoną inhibicję aktywności cytochromu P<sub>450</sub> i, w przypadku pewnych związków, szerszy indeks terapeutyczny wobec hERG.

5 [0010] FLT3 jest kinazą transbłonową należącą do rodziny receptorowych kinaz tyrozynowych klasy III (RTK). Wiązanie liganda FLT3 (FL) z jego receptorem prowadzi do dimeryzacji, autofosforylacji i późniejszej aktywacji dalszych szlaków sygnałowych<sup>37</sup>. Wysoki poziom ekspresji FLT3 stwierdzono w blastach ostrej białaczki szpikowej (AML), a dwie główne klasy mutacji, *tj.* duplikacje wewnątrz tandemowe (ITD) i mutacje punktowe w domenie  
10 kinazy tyrozynowej (TKD) zostały zidentyfikowane u pacjentów z AML<sup>37,38</sup>. Wewnątrz tandemowe duplikacje wykrywa się u 20-25% pacjentów z AML, a mutacje punktowe domeny kinazy tyrozynowej u 5-10% pacjentów z AML<sup>37,38</sup>. W badaniach klinicznych oceniano wiele drobnocząsteczkowych inhibitorów FLT3<sup>38,39</sup>.

[0011] Istnieje zatem dalsze zapotrzebowanie na związki, które mają podwójną funkcję  
15 hamowania zarówno kinaz Aurora, jak i FLT3. Takie związki byłyby użyteczne w leczeniu chorób i/lub stanów chorobowych, w które zaangażowane są Aurora i/lub FLT3, takich jak na przykład AML.

[0012] Dlatego dalszym celem niniejszego wynalazku jest dostarczenie związków posiadających tę podwójną aktywność.

20

### ***STRESZCZENIE WYNALAZKU***

[0013] W jednym aspekcie, niniejszy wynalazek dostarcza związek, lub jego farmaceutycznie dopuszczalną sól lub solwat, w znaczeniu zdefiniowanym w niniejszym opisie.

[0014] W innym aspekcie, niniejszy wynalazek dostarcza kompozycję farmaceutyczną  
25 zawierającą związek według wynalazku, zdefiniowany w niniejszym opisie, lub jego farmaceutycznie dopuszczalną sól lub solwat oraz jedną lub większą liczbę farmaceutycznie dopuszczalnych substancji pomocniczych.

[0015] W innym aspekcie, niniejszy wynalazek dotyczy związku według wynalazku zdefiniowanego w niniejszym opisie, lub jego farmaceutycznie dopuszczalnej soli lub solwatu,  
30 lub kompozycji farmaceutycznej, zdefiniowanej w niniejszym opisie, do zastosowania w terapii.

[0016] W innym aspekcie, niniejszy wynalazek dotyczy związku według wynalazku, zdefiniowanego w niniejszym opisie, lub jego farmaceutycznie dopuszczalnej soli lub solwatu, lub kompozycji farmaceutycznej, zdefiniowanej w niniejszym opisie, do zastosowania w  
35 leczeniu chorób lub stanów chorobowych, z którymi jest związana kinaza Aurora i/lub aktywność FLT3.

[0017] W innym aspekcie, niniejszy wynalazek dotyczy zastosowania zdefiniowanego w niniejszym opisie związku według wynalazku lub jego farmaceutycznie dopuszczalnej soli lub

solwatu, do wytwarzania leku do zastosowania w leczeniu chorób lub stanów chorobowych, z którymi wiąże się aktywność kinazy Aurora i/lub FLT3.

**[0018]** W innym aspekcie niniejsze zgłoszenie opisuje sposób leczenia choroby lub stanu chorobowego, z którym wiąże się aktywność kinazy Aurora i/lub FLT3, przy czym wymieniony sposób obejmuje podawanie osobnikowi potrzebującemu takiego leczenia terapeutycznie skutecznej ilości związku według wynalazku, zdefiniowanego w niniejszym opisie, lub jego farmaceutycznie dopuszczalnej soli lub solwatu lub zdefiniowanej w niniejszym kompozycji farmaceutycznej.

**[0019]** W innym aspekcie, niniejszy wynalazek dostarcza związek lub jego farmaceutycznie dopuszczalną sól lub solwat lub zdefiniowaną w niniejszym opisie kompozycję farmaceutyczną, do zastosowania w leczeniu zaburzenia proliferacyjnego, takiego jak rak. W szczególnym przykładzie wykonania, rakiem jest rak ludzki.

**[0020]** W innym aspekcie, niniejszy wynalazek dostarcza zastosowanie związku lub jego farmaceutycznie dopuszczalnej soli lub solwatu, do wytwarzania leku do stosowania w leczeniu zaburzenia proliferacyjnego, takiego jak rak. W szczególnej postaci rakiem jest rak ludzki.

**[0021]** W innym aspekcie niniejsze zgłoszenie opisuje sposób leczenia zaburzenia proliferacyjnego, takiego jak rak, przy czym wymieniony sposób obejmuje podawanie osobnikowi wymagającemu takiego leczenia terapeutycznie skutecznej ilości związku, lub jego farmaceutycznie dopuszczalnej soli lub solwatu, lub kompozycji farmaceutycznej zdefiniowanej w niniejszym opisie. W szczególnym przykładzie wykonania, rakiem jest rak ludzki.

**[0022]** W innym aspekcie niniejsze zgłoszenie opisuje związek lub jego farmaceutycznie dopuszczalną sól lub solwat lub zdefiniowaną w niniejszym opisie kompozycję farmaceutyczną do zastosowania w wytwarzaniu efektu hamowania kinazy Aurora i/lub FLT3.

**[0023]** W innym aspekcie, niniejszy wynalazek dostarcza sposób wytwarzania kinazy Aurora i/lub efektu hamującego FLT3 *in vitro*, przy czym wymieniony sposób obejmuje podawanie skutecznej ilości związku lub jego farmaceutycznie dopuszczalnej soli lub solwatu.

**[0024]** Niniejsze zgłoszenie opisuje również sposób hamowania proliferacji komórek *in vitro* lub *in vivo*, przy czym wymieniony sposób obejmuje kontaktowanie komórki ze skuteczną ilością związku zdefiniowanego w niniejszym opisie, lub jego farmaceutycznie dopuszczalnej soli lub solwatu.

**[0025]** Niniejsze zgłoszenie opisuje również sposób syntezy związku lub jego farmaceutycznie dopuszczalnej soli lub solwatu, zdefiniowanego w niniejszym opisie.

**[0026]** Niniejsze zgłoszenie opisuje związek lub jego farmaceutycznie dopuszczalną sól lub solwat, możliwy do otrzymania lub otrzymany lub bezpośrednio otrzymany sposobem syntezy, jaki zdefiniowano w niniejszym opisie.

**[0027]** Niniejsze zgłoszenie opisuje również nowe związki pośrednie, jakie zdefiniowano w niniejszym opisie, które są odpowiednie do zastosowania w dowolnej z opisanych w niniejszym metod syntezy.

[0028] Korzystne, odpowiednie i opcjonalne cechy któregośkolwiek konkretnego aspektu niniejszego wynalazku są również korzystnymi, odpowiednimi i opcjonalnymi cechami dowolnego innego aspektu.

## 5 **SZCZEGÓŁOWY OPIS WYNALAZKU**

### **Definicje**

[0029] O ile nie zaznaczono inaczej, następujące określenia stosowane w opisie i zastrzeżeniach mają następujące znaczenia podane poniżej.

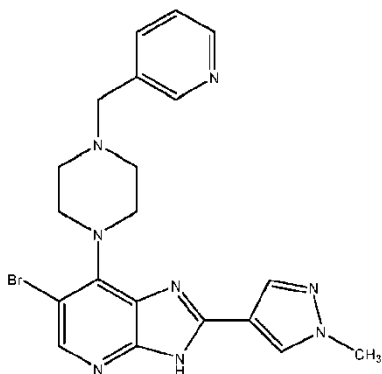
[0030] Należy zauważyć, że odniesienia do „traktowania” lub „leczenia” obejmują profilaktykę, jak również złagodzenie ustalonych objawów stanu chorobowego. „Traktowanie” lub „leczenie” stanu, zaburzenia lub stanu chorobowego obejmuje zatem: (1) zapobieganie lub opóźnianie pojawiania się klinicznych objawów stanu, zaburzenia lub stanu chorobowego rozwijającego się u człowieka, który może być dotknięty lub predysponowany do stanu, zaburzenia lub stanu chorobowego, ale nie doświadcza jeszcze klinicznych lub subklinicznych objawów stanu, zaburzenia lub stanu chorobowego, (2) hamowanie stanu, zaburzenia lub stanu chorobowego, *tj.*, zatrzymanie, zmniejszenie lub opóźnienie rozwoju choroby lub jej nawrotu (w przypadku leczenia podtrzymującego) lub co najmniej jednego klinicznego lub subklinicznego jej objawu, lub (3) złagodzenie lub złagodzenie choroby, *tj.*, spowodowanie regresji stanu, zaburzenia lub stanu chorobowego lub co najmniej jednego z objawów klinicznych lub subklinicznych.

[0031] „Terapeutycznie skuteczna ilość” oznacza ilość związku, która po podaniu ssakowi w celu leczenia choroby, jest wystarczająca do spowodowania takiego leczenia choroby. „Terapeutycznie skuteczna ilość” będzie zmieniać się w zależności od związku, choroby i jej nasilenia oraz wieku, wagi itp. ssaka, który ma być leczony.

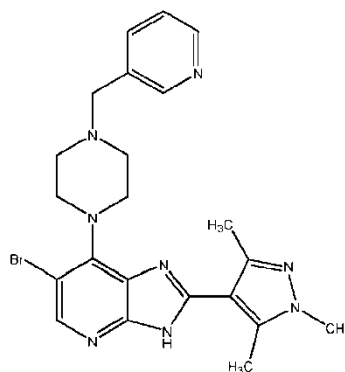
[0032] Wyrażenie „związki według wynalazku” oznacza te związki, które są ujawnione w niniejszym opisie, zarówno ogólnie jak i szczegółowo.

### **Związki według wynalazku**

[0033] Jak poprzednio stwierdzono, Międzynarodowa publikacja patentowa nr WO2007/072017 ujawnia serię pochodnych imidazo[4,5-*b*]pirydyny, które działają jako inhibitory aktywności kinazy Aurora. Dwa szczególne związki ujawnione w WO2007/072017 to 6-bromo-2-(1-metylo-1*H*-pirazol-4-ilo)-7-(4-(pirydyn-3-ylometylo)piperazyn-1-ylo)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]pirydyna (przykład 56) i 6-bromo-7-(4-(pirydyn-3-ylometylo)piperazyn-1-ylo)-2-(1,3,5-trimetylo-1*H*-pirazol-4-ilo)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]pirydyna (przykład 57). Struktury tych związków przedstawiono poniżej.



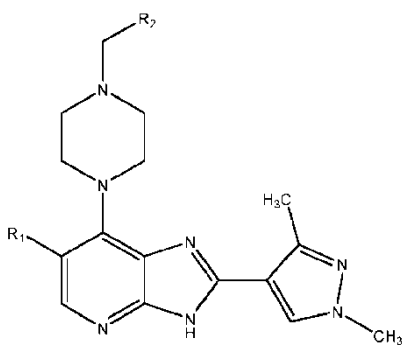
Przykład 56, WO2007/072017



Przykład 57, WO2007/072017

**[0034]** W pierwszym aspekcie, niniejszy wynalazek dostarcza związek o wzorze I pokazany poniżej:

5



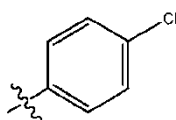
I

przy czym:

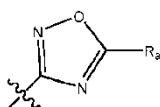
R<sub>1</sub> oznacza Br lub Cl;

R<sub>2</sub> jest wybrany spośród wzoru II lub wzoru III pokazanych poniżej:

10




II



III

przy czym R<sub>a</sub> oznacza atom wodoru lub metyl;

lub jego farmaceutycznie dopuszczalną sól lub solwat.

**[0035]** W definicji grupy R<sub>2</sub> powyżej, symbol 

15 oznacza punkt przyłączenia grupy R<sub>2</sub> do ugrupowania -CH<sub>2</sub>- obecnego w związkach o wzorze I.

**[0036]** Związki według niniejszego wynalazku wykazują zmniejszoną inhibicję aktywności cytochromu P<sub>450</sub> względem związków z przykładów 56 i 57 w WO2007/072017. Pewne związki według niniejszego wynalazku mają również szerszy indeks terapeutyczny wobec hERG w porównaniu ze związkami z przykładów 56 i 57 w WO2007/072017.

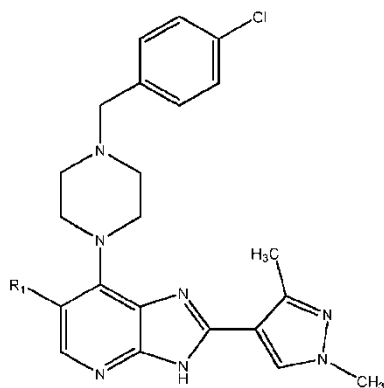
20

**[0037]** Szczególne związki według wynalazku obejmują, na przykład, związki o wzorze I lub ich farmaceutycznie dopuszczalne sole, gdzie, o ile nie podano inaczej, każdy z  $R_1$  i  $R_2$  ma jakiegokolwiek znaczenie zdefiniowane powyżej lub w którymkolwiek z ustępów od 1) do (5) poniżej:-

- 5 (1)  $R_1$  oznacza Br;  
 (2)  $R_1$  oznacza Cl;  
 (3)  $R_2$  ma wzór II;  
 (4)  $R_2$  ma wzór III jaki zdefiniowano w niniejszym opisie;  
 (5)  $R_2$  ma wzór III jaki zdefiniowano w niniejszym opisie i  $R_a$  oznacza atom wodoru;  
 10 (6)  $R_2$  ma wzór III jaki zdefiniowano w niniejszym opisie i  $R_a$  oznacza metyl;

**[0038]** Odpowiednio,  $R_1$  oznacza grupę chloro.

**[0039]** Odpowiednio,  $R_2$  ma wzór II (tj. *para*-chlorofenyl). W szczególnej grupie związków według wynalazku, zatem, związki mają wzór strukturalny Ia pokazany poniżej:

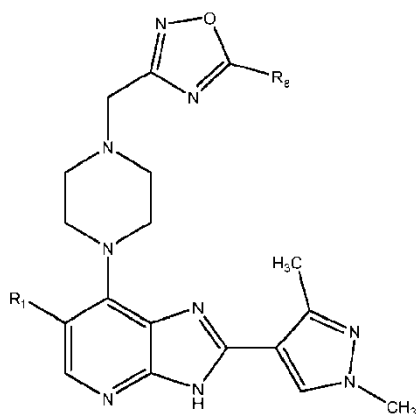


15 Ia

przy czym  $R_1$  jest taki jak zdefiniowano w niniejszym opisie poprzednio, lub ich farmaceutycznie dopuszczalna sól lub solwat.

**[0040]** W dalszej grupie związków według wynalazku,  $R_2$  ma wzór III, tj. związki mają wzór strukturalny Ib pokazany poniżej:

20



Ib

przy czym R<sub>1</sub> i R<sub>a</sub> oba są takie jak zdefiniowano w niniejszym opisie poprzednio, lub ich farmaceutycznie dopuszczalna sól lub solwat.

**[0041]** Poszczególne związki według niniejszego wynalazku obejmują którykolwiek z następujących:

- 5 6-Chloro-7-(4-(4-chlorobenzyl)piperazyn-1-ylo)-2-(1,3-dimetylo-1*H*-pirazol-4-ilo)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]pirydyna;  
 3-((4-(6-Chloro-2-(1,3-dimetylo-1*H*-pirazol-4-ilo)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]pirydyn-7-ylo)piperazyn-1-ylo)metylo)-1,2,4-oksadiazol;  
 3-((4-(6-Chloro-2-(1,3-dimetylo-1*H*-pirazol-4-ilo)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]pirydyn-7-ylo)piperazyn-1-  
 10 ylo)metylo)-5-metylo-1,2,4-oksadiazol;  
 lub ich farmaceutycznie dopuszczalną sól lub solwat.

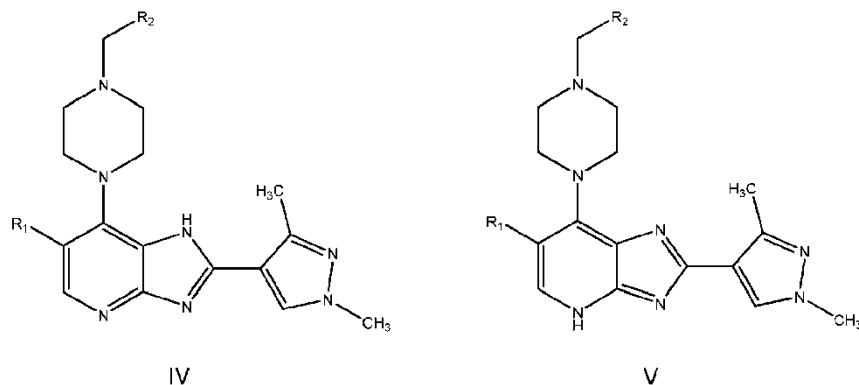
- [0042]** Odpowiednią farmaceutycznie dopuszczalną solą związku według wynalazku jest na przykład sól addycyjna z kwasem związku według wynalazku, który jest wystarczająco zasadowy, na przykład sól addycyjna z kwasem z, na przykład, kwasem nieorganicznym lub  
 15 organicznym, na przykład z kwasem chlorowodorowym, bromowodorowym, siarkowym, fosforowym, trifluorooctowym, mrówkowym, cytrynowym lub maleinowym.

- [0043]** Niniejszy wynalazek obejmuje również związki według wynalazku, jakie zdefiniowano w niniejszym opisie, które zawierają jedną lub większą liczbę substytucji izotopowych. Na przykład H może występować w dowolnej formie izotopowej, w tym <sup>1</sup>H, <sup>2</sup>H (D) i <sup>3</sup>H (T); C  
 20 może występować w dowolnej formie izotopowej, w tym <sup>12</sup>C, <sup>13</sup>C i <sup>14</sup>C; i tym podobne.

- [0044]** Należy również rozumieć, że pewne związki według wynalazku mogą istnieć w postaciach solwatowanych, jak również niesolwatowanych, takich jak, na przykład, postaci uwodnione. Należy rozumieć, że wynalazek obejmuje wszystkie takie solwatowane formy, które wykazują aktywność hamującą kinazy Aurora i/lub FLT3.

- 25 **[0045]** Należy również rozumieć, że niektóre związki według wynalazku mogą wykazywać polimorfizm i że wynalazek obejmuje wszystkie takie postaci, które wykazują aktywność hamującą kinazy Aurora i/lub FLT3.

- [0046]** Związki według wynalazku mogą występować w wielu różnych postaciach tautomerycznych, a odniesienia do związków według wynalazku obejmują wszystkie takie  
 30 postaci. W celu uniknięcia wątpliwości, gdy związek może istnieć w jednej z kilku postaci tautomerycznych, a tylko jedna jest konkretnie opisana lub przedstawiona, wszystkie inne są jednak objęte przez związki według wynalazku. Przykłady postaci tautomerycznych związków według niniejszego wynalazku obejmują związki w postaci pokazanej we wzorze I powyżej, jak również tautomery o wzorze (IV) i (V) pokazane poniżej.



przy czym R<sub>1</sub> i R<sub>2</sub> są takie jak zdefiniowano w niniejszym poprzednio.

**[0047]** Związki według wynalazku zawierające funkcję aminową mogą również tworzyć N-tlenki. Odniesienie w niniejszym do związku o wzorze I, który zawiera funkcję aminową obejmuje również N-tlenek. Gdy związek zawiera kilka funkcji aminowych, jeden lub więcej niż jeden atom azotu może być utleniony z wytworzeniem N-tlenku. Szczególnymi przykładami N-tlenków są N-tlenki atomu azotu w heterocyklu zawierającym azot. N-Tlenki można wytwarzać przez traktowanie odpowiedniej aminy środkiem utleniającym, takim jak nadtlenek wodoru lub peroksy kwas (np. kwas peroksykarboksylowy), patrz na przykład *Advanced Organic Chemistry*, Jerry March, 4-te wydanie, Wiley Interscience, strony. Konkretniej, N-tlenki można wytworzyć według procedury L. W. Deady (*Syn, Comm*, 1977, 7, 509-514), w którym związek aminowy reaguje z kwasem *m*-chloroperoksybenzoesowym (MCPBA), na przykład w obojętnym rozpuszczalniku, takim jak dichlorometan.

**[0048]** Związki według wynalazku można podawać w postaci proleku, który rozkłada się w organizmie ludzkim lub zwierzęcym z uwolnieniem związku według wynalazku. Prolek można stosować do zmiany właściwości fizycznych i/lub właściwości farmakokinetycznych związku według wynalazku. Prolek można wytworzyć, gdy związek według wynalazku zawiera odpowiednią grupę lub podstawnik, do którego można dołączyć grupę modyfikującą właściwość. Przykłady proleków obejmują pochodne amidowe rozszczepialne *in vivo*, które można utworzyć na grupie aminowej w związku według wynalazku.

**[0049]** W związku z tym, niniejszy wynalazek obejmuje te związki o wzorze I, jakie zdefiniowano w niniejszym opisie powyżej, gdy są dostępne poprzez syntezę organiczną i gdy są dostępne w ciele człowieka lub zwierzęcia na drodze rozszczepienia jego proleku. W związku z tym, niniejszy wynalazek obejmuje te związki o wzorze I, które są wytwarzane za pomocą środków syntezy organicznej, a także takie związki, które są wytwarzane w ciele człowieka lub zwierzęcia w drodze metabolizmu związku prekursorowego, czyli związek o wzorze I może być związkiem wytwarzanym syntetycznie lub związkiem wytwarzanym metabolicznie.

**[0050]** Odpowiednim farmaceutycznie dopuszczalnym prolekiem związku o wzorze I jest taki, który opiera się na rozsądnej ocenie medycznej, jako odpowiedni do podawania człowiekowi lub zwierzęciu bez niepożądanych działań farmakologicznych i bez nadmiernej toksyczności.

**[0051]** Opisano różne formy proleków, na przykład w następujących dokumentach:-

- 5 a) *Methods in Enzymology*, tom. 42, str. 309-396, wyd. K. Widder, i in. (Academic Press, 1985);
- b) *Design Pro-drugs*, opracowany przez H. Bundgaard, (Elsevier, 1985);
- c) *A Textbook of Drug Design and Development*, opracowany przez Krogsgaard-Larsen i H. Bundgaard, rozdział 5 „Design and Application of Pro-drugs”, autorstwa H. Bundgaard str. 113-191 (1991);
- 10 d) H. Bundgaard, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 8, 1-38 (1992);
- e) H. Bundgaard i in., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 77, 285 (1988);
- f) N. Kakeya i in., *Chem. Pharm. Bull.*, 32, 692 (1984);
- g) T. Higuchi i V. Stella, „Pro-Drugs as Novel Delivery Systems”, A.C.S. Symposium Series, Tom 14; i
- 15 h) E. Roche (redaktor), „Bioreversible Carriers in Drug Design”, Pergamon Press, 1987.

**[0052]** Wpływ *in vivo* związku o wzorze I może być częściowo wywierany przez jeden lub więcej metabolitów, które powstają w ciele ludzkim lub zwierzęcym po podaniu związku o wzorze I. Jak podano powyżej, wpływ *in vivo* związku o wzorze I może także być wywierany w drodze metabolizmu związku prekursorowego (proleku).

**[0053]** Należy również zauważyć, że związki o wzorze I mogą być również kowalencyjnie powiązane (w dowolnej odpowiedniej pozycji) z innymi grupami, takimi jak, na przykład, ugrupowania solubilizujące (na przykład, polimery PEG), ugrupowania, które umożliwiają ich zwiążanie ze stałym podłożem (takie jak, na przykład ugrupowania zawierające biotyne) i ligandy celujące (takie jak przeciwciała lub fragmenty przeciwciał).

### **Synteza**

**[0054]** W opisie metod syntezy opisanych poniżej i w przytaczanych metodach syntezy, które stosuje się do wytwarzania materiałów wyjściowych, należy rozumieć, że wszystkie proponowane warunki reakcji, w tym wybór rozpuszczalnika, atmosfera reakcji, temperatura reakcji, czas trwania doświadczenia i procedury obróbki, mogą być wybrane przez znawcę w dziedzinie.

**[0055]** Dla znawcy w dziedzinie syntezy organicznej zrozumiałe jest, że funkcjonalność występująca w różnych częściach cząsteczki musi być zgodna z odczynnikami i stosowanymi warunkami reakcji.

**[0056]** Niezbędne materiały wyjściowe można uzyskać z użyciem standardowych procedur chemii organicznej. Wytwarzanie takich materiałów wyjściowych opisano w połączeniu z następującymi reprezentatywnymi wariantami sposobu i w załączonych przykładach.

Alternatywnie, niezbędne materiały wyjściowe można otrzymać procedurami analogicznymi do zilustrowanych, które mieszczą się w zakresie zwykłych umiejętności specjalisty w zakresie chemii organicznej.

5 **[0057]** Należy zdawać sobie sprawę, że podczas syntezy związków według wynalazku w procesach określonych poniżej lub podczas syntezy pewnych materiałów wyjściowych, może być pożądane, aby zabezpieczyć pewne grupy podstawników, aby zapobiec ich niepożądanym reakcji. Specjalista chemik doceni, kiedy takie zabezpieczenie jest konieczne i w jaki sposób takie grupy zabezpieczające można umieścić na miejscu, a następnie je usunąć.

10 **[0058]** Przykłady grup zabezpieczających można znaleźć na jednym z wielu ogólnych tekstów na ten temat, na przykład „Protective Groups in Organic Synthesis” autorstwa Theodor Green (wydawca: John Wiley & Sons). Grupy zabezpieczające można usunąć dowolnym dogodnym sposobem opisanym w literaturze lub znanym znawcy w dziedzinie chemii, odpowiednim do usunięcia danej grupy zabezpieczającej, przy czym takie sposoby wybiera się tak, aby usunąć grupę zabezpieczającą przy minimalnym zakłócaniu grup gdzie indziej w cząsteczce.

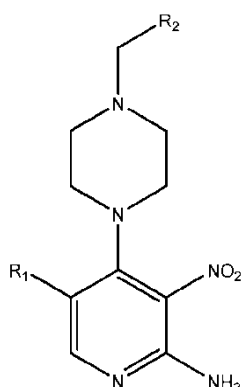
15 **[0059]** Zatem, jeśli reagenty obejmują, na przykład, takie grupy jak aminowa, karboksylowa lub hydroksylowa, może być pożądane zabezpieczenie grupy w niektórych z wymienionych tutaj reakcji.

**[0060]** Przykładowo, odpowiednią grupą zabezpieczającą dla grupy aminowej lub alkiloaminowej jest na przykład grupa acylowa, na przykład grupa alkanoilowa, taka jak acetylowa, grupa alkoksykarbonylowa, na przykład metoksykarbonylowa, etoksykarbonylowa lub *t*-butoksykarbonylowa, grupa aryloksykarbonylowa, na przykład benzyloksykarbonylowa lub grupa aroilowa, na przykład benzoilowa. Warunki odbezpieczania dla powyższych grup zabezpieczających koniecznie różnią się w zależności od wyboru grupy zabezpieczającej. Tak więc, na przykład, grupa acylowa, taka jak grupa alkanoilowa lub 25 alkoksykarbonylowa lub grupa aroilowa, może być usunięta, na przykład, przez hydrolizę odpowiednią zasadą, taką jak wodorotlenek metalu alkalicznego, na przykład wodorotlenek litu lub sodu. Alternatywnie, grupa acylowa, taka jak grupa *tert*-butoksykarbonylowa może być usunięta, na przykład, przez potraktowanie odpowiednim kwasem, takim jak kwas chlorowodorowy, siarkowy lub fosforowy lub kwas trifluorooctowy, a grupę 30 aryloksykarbonylową, taką jak grupa benzyloksykarbonylowa, można usunąć, na przykład, przez uwodornienie nad katalizatorem takim jak pallad na węglu, lub przez traktowanie kwasem Lewisa, na przykład  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ . Odpowiednią alternatywną grupą zabezpieczającą dla pierwszorzędowej grupy aminowej jest na przykład grupa ftaloilowa, którą można usunąć przez podziałanie alkiloaminą, na przykład dimetyloaminopropylaminą lub 35 hydrazyną.

**[0061]** Związki według niniejszego wynalazku można wytwarzać stosując ogólne techniki syntezy opisane w WO2007/072017 i WO2009/001021, których cała zawartość jest włączona w niniejszy opis poprzez odniesienie.

**[0062]** W szczególnym aspekcie, niniejszy wynalazek dostarcza sposób syntezy związku o wzorze **I**, lub jego farmaceutycznie dopuszczalną sól lub solwat, gdzie sposób obejmuje:

a) reakcją związku o wzorze **A**:



5

A

przy czym każdy  $R_1$  i  $R_2$  ma którekolwiek ze znaczeń podanych w niniejszym poprzednio;

z 1,3-dimetylo-1H-pirazolo-4-karbaldehydem w obecności odpowiedniego środka redukującego; i

10

b) ewentualnie potem, i jeśli jest to konieczne:

i) usunięcie wszelkich obecnych grup zabezpieczających;

ii) przekształcenie związku o wzorze **I** w inny związek o wzorze **I**; i/lub

iii) utworzenie farmaceutycznie dopuszczalnej soli lub solwatu.

**[0063]** Odpowiednio, reakcja pomiędzy związkiem o wzorze **A** i 1,3-dimetylo-1H-pirazolo-4-karbaldehydem odbywa się w obecności odpowiedniego rozpuszczalnika. Do tej reakcji można zastosować dowolny odpowiedni rozpuszczalnik lub mieszaninę rozpuszczalników. Przykłady odpowiednich rozpuszczalników obejmują DMSO, wodę, DMF i alkohole, np. EtOH.

**[0064]** Dogodnie reakcję prowadzi się w obecności odpowiedniego środka redukującego, takiego jak wodny  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ .<sup>26</sup>

**[0065]** Znacwa w dziedzinie będzie również w stanie dobrać odpowiednie warunki reakcji do zastosowania, w celu ułatwienia tej reakcji.

**[0066]** Reakcję można również prowadzić w podwyższonej temperaturze, na przykład można stosować temperaturę w zakresie od 50 do 190°C (w zależności od rodzaju rozpuszczalnika).

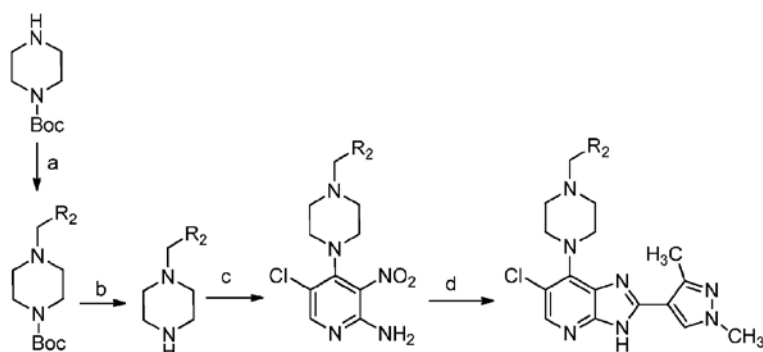
**[0067]** Powstały związek o wzorze **I** można wyodrębnić i oczyścić, stosując techniki dobrze znane w tej dziedzinie.

**[0068]** Zdefiniowany w niniejszym sposób może ponadto obejmować etap poddawania związku o wzorze **I** wymianie soli, szczególnie w sytuacjach, gdy związek o wzorze **I** tworzy się jako mieszanina różnych postaci soli. Wymiana soli odpowiednio obejmuje unieruchamianie związku o wzorze **I** na odpowiednim stałym podłożu lub żywicy i eluowanie związków odpowiednim kwasem, z wytworzeniem pojedynczej soli związku o wzorze **I**.

30

[0069] Związki o wzorze A można wytwarzać sposobami znanymi w dziedzinie.

[0070] Przykład odpowiedniej procedury wytwarzania związku o wzorze I przez związek pośredni o wzorze A pokazano na schemacie 1 poniżej.



**Odczynniki i warunki:** etapy (a) i (b) powyżej dotyczą tylko pochodnej 1,2,4-oksadiazolowej, ponieważ 1-(4-chlorobenzyl)piperazyna i 1-((5-metylo-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)metylo)piperazyna są dostępne na rynku: (a) dla pochodnej 1,2,4-oksadiazolowej:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 3-(chlorometylo)-1,2,4-oksadiazol,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $50^\circ\text{C}$ ; (b) dla pochodnej 1,2,4-oksadiazolowej: TFA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , temp. pokojowa; (c) dla pochodnych 4-chlorobenzylowej i 1,2,4-oksadiazolowej: 2-amino-4,5-dichloro-3-nitropyrydyna,  $\text{Pr}_2\text{NEt}$ ,  $\text{PrOH}$ , ogrzewanie; (d) dla pochodnych 4-chlorobenzylowej i 1,2,4-oksadiazolowej: 1,3-dimetylo-1H-pirazo-4-karbaldehyd, EtOH, 1M aq  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ,  $80^\circ\text{C}$ .

### Schemat 1

5

[0071] 2-Amino-4,5-dichloro-3-nitropyrydynę (4,5-dichloro-3-nitropyrydino-2-aminy) i 2-amino-5-bromo-4-chloro-3-nitropyrydynę (5-bromo-4-chloro-3-nitropyrydino-2-aminy), prekursorzy do syntezy pochodnych A 2-amino-3-nitropyridyny, wytworzono jak opisano poprzednio<sup>26</sup> lub przez halogenowanie 2-amino-4-chloro-3-nitropyridyny (4-chloro-3-nitropyridyn-2-aminy)<sup>40</sup>.

10

### Kompozycje farmaceutyczne

[0072] Zgodnie z dalszym aspektem wynalazku dostarczana jest kompozycja farmaceutyczna, która zawiera związek według wynalazku, jaki zdefiniowano powyżej, lub jego farmaceutycznie dopuszczalną sól lub solwat, w połączeniu z farmaceutycznie dopuszczalnym rozcieńczalnikiem lub nośnikiem.

15

[0073] Kompozycje według wynalazku mogą mieć postać odpowiednią do stosowania doustnego (na przykład tabletki, pastylki do ssania, kapsułki twarde lub miękkie, zawiesiny wodne lub olejowe, emulsje, proszki lub granulki do sporządzania zawiesin, syropy lub eliksiry) do stosowania miejscowego (na przykład jako kremy, maści, żele lub wodne lub olejowe roztwory lub zawiesiny) do podawania przez inhalację (na przykład jako rozdrobniony proszek lub ciekły aerozol), do podawania przez wdmuchiwanie (na przykład jako rozdrobniony proszek) lub do podawania pozajelitowego (np. jako jałowy wodny lub olejowy roztwór do

20

podawania dożylnego, podskórnego, domięśniowego, dootrzewnowego lub domięśniowego lub jako czopek do podawania doodbytniczego).

**[0074]** Kompozycje według wynalazku można otrzymać konwencjonalnymi procedurami, stosując konwencjonalne farmaceutyczne substancje pomocnicze, dobrze znane w dziedzinie.

5 Tak więc, kompozycje przeznaczone do stosowania doustnego mogą zawierać, na przykład, jeden lub więcej środków barwiących, słodzących, aromatyzujących i/lub konserwujących.

**[0075]** Skuteczna ilość związku według niniejszego wynalazku do stosowania w terapii choroby proliferacyjnej jest ilością wystarczającą do objawowego łagodzenia u zwierząt stałocieplnych, w szczególności u człowieka, objawów infekcji, w celu spowolnienia postępu infekcji lub zmniejszenia, u pacjentów z objawami infekcji, ryzyka pogorszenia.

**[0076]** Ilość składnika aktywnego, który jest połączony z jedną lub większą liczbą substancji pomocniczych w celu wytworzenia pojedynczej postaci dawkowania, będzie zmieniać się w zależności od leczonego gospodarza i konkretnej drogi podawania. Na przykład, preparat przeznaczony do podawania doustnego ludziom zawiera na ogół od 0,5 mg do 0,5 g składnika  
15 aktywnego (bardziej odpowiednio od 0,5 do 100 mg, na przykład od 1 do 30 mg) zmieszanego z odpowiednią i dogodną ilością substancji pomocniczych, która może zmieniać się od około 5 do około 98 procent wagowych całej kompozycji.

**[0077]** Wielkość dawki do celów terapeutycznych lub profilaktycznych związku o wzorze I będzie się oczywiście zmieniać zależnie od charakteru i nasilenia stanów chorobowych, wieku i  
20 płci zwierzęcia lub pacjenta i drogi podawania, zgodnie z dobrze znanymi zasadami medycyny.

**[0078]** Przy stosowaniu związku według wynalazku do celów terapeutycznych lub profilaktycznych będzie on na ogół tak podawany, że otrzymuje się dzienną dawkę w zakresie, na przykład, od 0,1 mg/kg do 30 mg/kg masy ciała, podaną, jeśli jest to wymagane, w podzielonych dawkach. Ogólnie, niższe dawki będą podawane, gdy stosowana jest droga  
25 pozajelitowa. Tak więc, na przykład, do podawania dożylnego lub dootrzewnowego, ogólnie stosuje się dawkę w zakresie, na przykład, od 0,1 mg/kg do 30 mg/kg masy ciała. Podobnie, do podawania przez inhalację, stosowana będzie dawka w zakresie, na przykład, od 0,05 mg/kg do 25 mg/kg masy ciała. Może również być odpowiednie podawanie doustne, szczególnie w postaci tabletek. Zazwyczaj jednostkowe postaci dawkowania będą zawierać  
30 około 0,5 mg do 0,5 g związku według wynalazku.

### **Stosowanie terapeutyczne i zastosowania**

**[0079]** Związki według wynalazku są inhibitorami aktywności kinazy Aurora i FLT3.

**[0080]** Niniejsze zgłoszenie opisuje sposób hamowania aktywności kinazy Aurora i/lub FLT3  
35 w komórce, gdzie sposób obejmuje podawanie do wymienionej komórki związku o wzorze I, jaki zdefiniowano w niniejszym opisie, lub jego farmaceutycznie dopuszczalnej soli lub solwatu.

- [0081] Niniejsze zgłoszenie opisuje sposób hamowania aktywności kinazy Aurora i/lub FLT3 *in vitro* lub *in vivo*, przy czym wymieniony sposób obejmuje kontaktowanie komórki ze skuteczną ilością związku lub jego farmaceutycznie dopuszczalnej soli lub solwatu, jakie zdefiniowano w niniejszym opisie.
- 5 [0082] Niniejsze zgłoszenie opisuje sposób hamowania aktywności kinazy Aurora i/lub FLT3 u podmiotu będącego człowiekiem lub zwierzęciem, który wymaga takiej inhibicji, przy czym sposób ten obejmuje podawanie wymienionemu podmiotowi skutecznej ilości związku o wzorze I, jakie zdefiniowano w niniejszym opisie, lub jego farmaceutycznie dopuszczalnej soli lub solwatu.
- 10 [0083] Kinaza Aurora może być kinazą Aurora A, B lub C.
- [0084] W jednym aspekcie, niniejszy wynalazek dostarcza związek o wzorze I lub jego farmaceutycznie dopuszczalną sól lub solwat lub zdefiniowaną w niniejszym opisie kompozycję farmaceutyczną, do zastosowania w terapii.
- [0085] Niniejsze zgłoszenie opisuje związek o wzorze I, jaki zdefiniowano w niniejszym opisie, lub jego farmaceutycznie dopuszczalną sól lub solwat, do zastosowania w leczeniu choroby lub stanu chorobowego związanego z aktywnością kinazy Aurora (i/lub aktywnością FLT3).
- 15 [0086] Niniejsze zgłoszenie opisuje zastosowanie związku o wzorze I, jaki zdefiniowano w niniejszym opisie, lub jego farmaceutycznie dopuszczalnej soli lub solwatu, do wytwarzania leku do zastosowania w leczeniu choroby lub stanu chorobowego związanego z aktywnością kinazy Aurora (i/lub aktywnością FLT3).
- 20 [0087] Niniejsze zgłoszenie opisuje sposób leczenia zaburzenia proliferacyjnego u podmiotu będącego człowiekiem lub zwierzęciem, przy czym sposób ten obejmuje podawanie wymienionemu podmiotowi terapeutycznie dopuszczalnej ilości związku o wzorze I, jaki zdefiniowano w niniejszym opisie, lub jego farmaceutycznie dopuszczalnej soli lub solwatu.
- 25 [0088] W jeszcze innym aspekcie, niniejszy wynalazek dostarcza związek o wzorze I, jaki zdefiniowano w niniejszym opisie, lub jego farmaceutycznie dopuszczalną sól lub solwat, do zastosowania w leczeniu zaburzenia proliferacyjnego.
- [0089] W jeszcze innym aspekcie, niniejszy wynalazek dostarcza zastosowanie związku o wzorze I, jaki zdefiniowano w niniejszym opisie, lub jego farmaceutycznie dopuszczalnej soli lub solwatu, do wytwarzania leku do zastosowania w leczeniu zaburzenia proliferacyjnego.
- 30 [0090] W innym aspekcie, niniejszy wynalazek dostarcza związek lub jego farmaceutycznie dopuszczalną sól lub solwat lub zdefiniowaną w niniejszym opisie kompozycję farmaceutyczną, do zastosowania w leczeniu raka.
- 35 [0091] W jeszcze innym aspekcie, niniejszy wynalazek dostarcza zastosowanie związku, lub jego farmaceutycznie dopuszczalnej soli lub solwatu, jaki zdefiniowano w niniejszym opisie, do wytwarzania leku do zastosowania w leczeniu raka.

[0092] W jeszcze innym aspekcie niniejsze zgłoszenie opisuje sposób leczenia raka u pacjenta wymagającego takiego leczenia, przy czym wymieniony sposób obejmuje podawanie wymienionemu pacjentowi terapeutycznie skutecznej ilości związku lub jego farmaceutycznie dopuszczalnej soli lub solwatu, lub kompozycji farmaceutycznej, jakie zdefiniowano w  
5 niniejszym opisie.

[0093] Związki według wynalazku mogą być użyteczne, na przykład, do leczenia raka jelita grubego, sutka, płuc, gruczołu krokowego, trzustki lub pęcherza i nerek lub białaczek lub chłoniaków.

10 [0094] W szczególności, związki według niniejszego wynalazku są użyteczne do leczenia białaczek. Wysoką ekspresję kinazy Aurora wykazano w białaczce (linie komórkowe i kohorty pacjentów).<sup>30-33</sup> Ponadto wewnętrzne powielanie tandemowe genu *FLT3* (*FLT3-ITD*) powoduje konstytutywną aktywację kinazy FLT3.<sup>34</sup> Istotnie, *FLT3-ITD* występuje u 20-35% dorosłych i 15% dzieci z AML, przyczyniając się do złego rokowania w obu grupach wiekowych.<sup>35</sup>

15 [0095] Tak więc, w szczególnym wykonaniu, związki są przeznaczone do leczenia białaczek, takich jak ostra białaczka szpikowa (AML), zespół mielodysplastyczny (MDS), przewlekła białaczka limfatyczna (CLL) i szpiczak mnogi. Przewiduje się, że związki według niniejszego wynalazku będą użyteczne w leczeniu nerwiaka zarodkowego.

[0096] Oczekuje się, że związki według niniejszego wynalazku będą szczególnie korzystne u  
20 pacjentów, u których zawiodło leczenie standardowymi terapiami. Przewiduje się, że związki według niniejszego wynalazku będą również przydatne w leczeniu starszych pacjentów (na przykład powyżej 60 lat) z białaczką (np. AML), ponieważ oczekuje się, że tacy pacjenci odniosą korzyści z inhibicji kinazy Aurora.

[0097] Oczekuje się, że związki według niniejszego wynalazku będą miały wartość w leczeniu  
25 dzieci z białaczką (na przykład nowo zdiagnozowaną AML z mutacją FLT3 i AML niemowląt), jak również z nerwiakiem zarodkowym.

### **Drogi podawania**

[0098] Związki według wynalazku lub kompozycję farmaceutyczną zawierającą związek  
30 aktywny można podawać podmiotowi dowolną dogodną drogą podawania, układowo/obwodowo lub miejscowo (tj. w miejscu pożądanego działania).

[0099] Drogi podawania obejmują, ale nie wyłącznie, podawanie doustne (np. przez spożycie); ustne; podjęzykowe; przezskórne (w tym np. opatrunek, plaster itp.); przezśluzówkowe (w tym np. przez opatrunek, plaster, itp.); donosowe (np. za pomocą sprayu  
35 do nosa); oczne (np. za pomocą kropli do oczu); płucne (np. terapię przez inhalację lub wdmuchiwanie, np. za pomocą aerozolu, np. przez usta lub nos); doodbytnicze (np. przez czopek lub lewatywę); dopochwowe (np. przez pessarium); pozajelitowe, na przykład przez wstrzyknięcie, w tym podskórne, śródskórne, domięśniowe, dożylnie, dotętnicze, dosercowe,

dooonowe, wewnątrznaczyniowe, wewnątrztorbkowe, podtorbkowe, do gałki ocznej, dootrzewnowe, dotchawicze, podnaskórkowe, dostawowe, podpajęczynówkowe i domostkowe; przez wszczepienie depotu lub zbiornika, na przykład, podskórnice lub domięśniowo.

5

### **Terapia skojarzona**

**[0100]** Związki według wynalazku można podawać same w monoterapii lub można je podawać w skojarzeniu z jednym lub większą liczbą dodatkowych środków terapeutycznych. Wybór jednego lub większej liczby dodatkowych środków terapeutycznych będzie oczywiście różny w zależności od choroby lub stanu, który ma być leczony, i jego nasilenia.

**[0101]** Powszechne jest stosowanie terapii skojarzonych w leczeniu zaburzeń proliferacyjnych, takich jak rak. Dlatego też leczenie antyproliferacyjne zdefiniowane powyżej może być stosowane jako jedyna terapia lub może obejmować, oprócz związku według wynalazku, konwencjonalną operację lub radioterapię lub chemioterapię. Taka chemioterapia może obejmować jedną lub większą liczbę z następujących kategorii środków przeciwnowotworowych:-

(i) inne leki antyproliferacyjne/przeciwnowotworowe i ich kombinacje, stosowane w onkologii medycznej, takie jak środki alkilujące (na przykład cisplatyna, oksaliplatyna, karboplatyna, cyklofosfamid, iperyt azotowy, melfalan, chlorambucyl, busulfan, temozolamid i nitrozomocznik); antymetabolity (na przykład gemcytabina i antyfolany, takie jak fluoropirymidyny, takie jak 5-fluorouracyl i tegafur, raltitrexed, metotreksat, arabinozyd cytozyny i hydroksymocznik); antybiotyki przeciwnowotworowe (na przykład antracykliny, takie jak adriamycyna, bleomycyna, doksorubicyna, daunomycyna, epirubicyna, idarubicyna, mitomycyna-C, daktynomycyna i mitramycyna); środki antymitotyczne (na przykład alkaloidy barwinka, takie jak winkrystyna, winblastyna, windezyna i winorelbina, i taksoidy, takie jak taksol i taksotere i inhibitory polokinazy); i inhibitory topoizomerazy (na przykład epipodofilotoksyny, takie jak etopozyd i tenipozyd, amsakryna, topotekan i kamptotecyna);

(ii) środki cytostatyczne, takie jak antyestrogeny (na przykład tamoksyfen, fulwestrant, toremifen, raloksyfen, droloksyfen i jodoksyfen), antyandrogeny (na przykład bikalutamid, flutamid, nilutamid i octan cyproteronu), antagoniści LHRH lub agoniści LHRH (na przykład goserelina, leuprorelina i buserelina), progestageny (na przykład octan megestrolu), inhibitory aromatazy (na przykład anastrozol, letrozol, vorazol i eksemestan) i inhibitory 5a-reduktazy, takie jak finasteryd;

(iii) środki przeciwinwazyjne [na przykład inhibitory rodziny kinaz c-Src, takie jak 4-(6-chloro-2,3-metylenodioksyanilino)-7-[2-(4-metylopiperazyn-1-ylo)etoksy]-5-tetrahydropirano-4-yloksychinazolina (AZD0530; Międzynarodowe zgłoszenie

patentowe WO 01/94341), *N*-(2-chloro-6-metylofenylo)-2-{6-[4-(2-hydroksyetylo)piperazyn-1-ylo]-2-metylopirymidyn-4-yloamino}tiazolo-5-karboksyamid (dasatynib, BMS-354825; J. Med. Chem., 2004, 47, 6658-6661) i bosutynib (SKI-606) i inhibitory metaloproteinazy, takie jak marimastat, inhibitory funkcji receptora aktywatora plazminogenu typu urokinazy lub przeciwciała przeciwko heparanazie];

5 (iv) inhibitory funkcji czynnika wzrostu: na przykład takie inhibitory obejmują przeciwciała czynnika wzrostu i przeciwciała receptora czynnika wzrostu (na przykład przeciwciało anty-erbB2 trastuzumab [Herceptin™], przeciwciało anty-EGFR panitumumab [Vectibix®], przeciwciało anty-erbB1 cetuksymab [Erbix®], C225] i

10 jakiegokolwiek inny czynnik wzrostu lub receptor czynnika wzrostu ujawniony przez Stern i in. Critical reviews in oncology/haematology, 2005, t. 54, str. 11-29); takie inhibitory obejmują także inhibitory kinazy tyrozynowej, na przykład inhibitory rodziny naskórkowego czynnika wzrostu (na przykład inhibitory kinazy tyrozynowej rodziny EGFR, takie jak *N*-(3-chloro-4-fluorofenylo)-7-metoksy-6-(3-

15 morfolinopropoksy)chinazolino-4-amina (gefitynib, ZD1839), *N*-(3-etynylofenylo)-6,7-bis(2-metoksyetoksy)chinazolino-4-amina (erlotynib, OSI-774) i 6-akrylamido-*N*-(3-chloro-4-fluorofenylo)-7-(3-morfolinopropoksy)-chinazolino-4-amina (CI 1033), inhibitory kinazy tyrozynowej erbB2, takie jak lapatynib); inhibitory rodziny czynników wzrostu hepatocytów; inhibitory rodziny insulinowych czynników wzrostu; inhibitory

20 rodziny czynnika wzrostu pochodzącego od płytek, takie jak imatynib i/lub nilotynib (AMN107); inhibitory kinaz serynowo/treoninowych (na przykład inhibitory przekazywania sygnałów Ras/Raf, takie jak inhibitory transferazy farnezylowej, na przykład sorafenib (BAY 43-9006), tipifarnib (R115777) i lonafarnib (SCH66336)), inhibitory sygnalizacji komórkowej przez MEK i/lub Kinazy AKT, inhibitory c-kit,

25 inhibitory kinazy abl, inhibitory kinazy PI3, inhibitory kinazy PI3, inhibitory kinazy CSF-1R, inhibitory kinazy IGF (insulinopodobnego czynnika wzrostu); inhibitory kinazy Aurora (na przykład AZD1152, PH739358, VX-680, MLN8054, R763, MP235, MP529, VX-528 i AX39459) i inhibitory kinazy zależne od cyklin takie, jak inhibitory CDK2 i/lub CDK4;

30 (v) środki przeciwdziałające angiogenezie, takie jak te, które hamują wpływ czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego, [na przykład przeciwciało przeciwko czynnikowi naczyniowemu śródbłonna bewacizumab (Avastin™) i na przykład inhibitor receptora kinazy tyrozynowej VEGF, taki jak wandetanib (ZD6474), watalanib (PTK787), sunitynib (SU11248), aksytynib (AG-013736), pazopanib (GW 786034) i 4-(4-fluoro-2-

35 metyloindol-5-iloksy)-6-metoksy-7-(3-pirolidyn-1-ylopropoksy)chinazolina (AZD2171; przykład 240 w obrębie WO 00/47212), związki takie jak te ujawnione w Międzynarodowych Zgłoszeniach Patentowych WO97/22596, WO 97/30035, WO

97/32856 i WO 98/13354 i związki, które działają przez inne mechanizmy (na przykład linomid, inhibitory funkcji integryny  $\alpha\beta 3$  i angiostatyny)];

(vi) środki niszczące naczynia, takie jak Combretastatin A4 i związki ujawnione w Międzynarodowych Zgłoszeniach Patentowych WO 99/02166, WO 00/40529, WO 00/41669, WO 01/92224, WO 02/04434 i WO 02/08213;

(vii) antagonistę receptora endoteliny, na przykład zibotentan (ZD4054) lub atrasentan;

(viii) terapie antysensowne, na przykład te, które są ukierunkowane na cele wymienione powyżej, takie jak ISIS 2503, antysensowny anty-ras;

(ix) podejścia do terapii genowej, w tym, na przykład, zastosowanie związków według wynalazku w połączeniu z adenowirusami onkolitycznymi, w celu zastąpienia nieprawidłowych genów, takich jak nieprawidłowy p53 lub nieprawidłowy BRCA1 lub BRCA2, GDEPT (ukierunkowane na gen leczenia pro-lekiem enzymu) takie jak te, które stosują enzym deaminazę cytozynową, kinazę tymidynową lub bakteryjną nitroreduktazę oraz podejścia do zwiększenia tolerancji pacjenta na chemioterapię lub radioterapię, takie jak terapia genowa oporności na wiele leków; i

(x) podejścia immunoterapeutyczne, w tym na przykład podejścia *ex-vivo* oraz *in-vivo* do zwiększenia immunogenności komórek nowotworowych pacjenta, takie jak transfekcja cytokinami, takimi jak interleukina 2, interleukina 4 lub czynnik stymulujący kolonie granulocytów i makrofagów, podejścia do zmniejszenia anergii limfocytów T, podejścia z użyciem transfekowanych komórek odpornościowych, takich jak komórki dendrytyczne transfekowane cytokiną, podejścia z wykorzystaniem linii komórek nowotworowych transfekowanych cytokinami, i podejścia stosującymi przeciwciała antyidiotypowe.

**[0102]** Takie łączone/skojarzone leczenie można osiągnąć przez równoczesne, kolejne lub oddzielne dawkowanie poszczególnych składników leczenia. Takie produkty skojarzone wykorzystują związki według niniejszego wynalazku w zakresie dawek opisanych powyżej oraz inny farmaceutycznie aktywny środek w jego dopuszczonym zakresie dawkowania.

**[0103]** W niniejszym opisie opisana jest dostarczona kombinacja odpowiednia do zastosowania w leczeniu choroby lub stanu chorobowego, z którym wiąże się aktywność kinazy białkowej, jak zdefiniowano w niniejszym opisie (np. raka), zawierająca związek według wynalazku, jak zdefiniowano powyżej, lub jego farmaceutycznie dopuszczalną sól lub solwat i inny środek terapeutyczny (np. środek przeciwnowotworowy).

**[0104]** W niniejszym opisie opisana jest dostarczona kombinacja odpowiednia do zastosowania w leczeniu raka (na przykład raka obejmującego guz lity) zawierająca związek według wynalazku, jak zdefiniowano powyżej, lub jego farmaceutycznie dopuszczalną sól lub solwat oraz dowolny spośród środków przeciwnowotworowych wymienionych w punkcie (i) - (ix) powyżej.

[0105] W niniejszym opisie opisany jest dostarczony związek według wynalazku lub jego farmaceutycznie dopuszczalna sól lub solwat, w skojarzeniu ze środkiem przeciwnowotworowym wybranym spośród wymienionych w punktach (i) - (ix) opisanych powyżej.

5 [0106] W niniejszym opisie, jeśli stosowane jest określenie „skojarzenie”, należy rozumieć, że odnosi się ono do równoczesnego, oddzielnego lub kolejnego podawania. W jednym aspekcie wynalazku „skojarzenie” odnosi się do równoczesnego podawania. W innym aspekcie wynalazku „skojarzenie” odnosi się do oddzielnego podawania. W dalszym aspekcie wynalazku „skojarzenie” dotyczy podawania sekwencyjnego. Gdy podawanie jest sekwencyjne lub  
10 oddzielne, opóźnienie w podawaniu drugiego składnika nie powinno powodować utraty korzystnego efektu skojarzenia.

[0107] W niniejszym opisie opisane jest dostarczanie kompozycji farmaceutycznej, która zawiera związek według wynalazku lub jego farmaceutycznie dopuszczalną sól lub solwat, w skojarzeniu z jednym lub większą liczbą dodatkowych środków terapeutycznych (na przykład  
15 środkiem przeciwnowotworowym wybranym spośród wymienionych w punkcie (i) - (ix) powyżej) w połączeniu z farmaceutycznie dopuszczalnym rozcieńczalnikiem lub nośnikiem.

[0108] Oczekuje się, że związki według niniejszego wynalazku będą szczególnie użyteczne jako część terapii skojarzonej z istniejącym standardem opieki w leczeniu starszych pacjentów (tj. pacjentów w wieku powyżej 60 lat), ponieważ tacy pacjenci mogą odnieść korzyść z  
20 inhibicji kinazy Aurora (niezależnie od ich statusu FLT3).

[0109] Oczekuje się również, że związki według niniejszego wynalazku będą szczególnie użyteczne jako część terapii skojarzonej z istniejącym standardem opieki w leczeniu dzieci cierpiących na białaczkę (np. AML) lub nerwiaka zarodkowego.

## 25 **PRZYKŁADY**

### **KRÓTKI OPIS RYSUNKÓW**

#### **[0110]**

Fig. 1 pokazuje skuteczność związku z przykładu 1 wobec ksenoprzeszczepów ludzkiego guza MV4-11 u myszy bezgrasiczych: (A) Względne objętości guza  $\pm$  SEM. (B) Masy ciała myszy.

30 Fig. 2 pokazuje: (A) Całkowite stężenia leku i guza w osoczu oraz wolne stężenia leku w osoczu po podaniu dawki 50 i 100 mg/kg, próbki pobrane 2 godziny po ostatniej dawce. (B) Związek z przykładu 1 hamuje fosforylację histonu H-3 w S10 i fosforylację STAT5 w Y694 w ksenoprzeszczepach ludzkich guzów MV4-11 (badanie 4-dniowe). Próbki nowotworu otrzymano 2 godziny po ostatniej dawce. Całkowity histon H3, całkowity Stat5 i GAPDH  
35 zastosowano jako obciążenia kontrole.

## **SYNTEZA ZWIĄZKÓW**

### **Przykłady 1 do 3**

**Ogólne materiały i sposoby**

[0111] Dostępne w handlu materiały wyjściowe, odczynniki i suche rozpuszczalniki zastosowano w postaci dostarczonej. Rzutową chromatografię kolumnową przeprowadzono stosując żel krzemionkowy Merck 60 (0,025 - 0,04 mm). Chromatografię kolumnową  
5 przeprowadzono również na osobistym unicie FlashMaster stosując kolumny krzemionkowe Isolute Flash lub system oczyszczania Biotage SP1 stosując wkłady krzemionkowe Biotage Flash. Preparatywną TLC przeprowadzono na płytkach Analtech lub Merck. Chromatografię jonowymienną przeprowadzono stosując kwasowe wkłady Isolute Flash SCX-II. Widma NMR <sup>1</sup>H rejestrowano na aparacie Bruker Avance-500. Próbkę przygotowano jako roztwory w  
10 deuterowanym rozpuszczalniku i odniesiono do odpowiedniego wewnętrznego pikę nie-deuterowanego rozpuszczalnika lub tetrametylosilanu. Przesunięcia chemiczne rejestrowano w ppm ( $\delta$ ) w dół pola względem tetrametylosilanu. Analizę LC-MS przeprowadzono na Waters LCT z modułem rozdzielającym Waters Alliance 2795 i detektorem absorpcji o podwójnej długości fali Waters 2487 połączonym z spektrometrem masowym czasu lotu  
15 Waters/Micromass LCT ze źródłem ESI. Analityczne rozdzielanie przeprowadzono w 30°C na kolumnie Merck Chromolith SpeedROD (RP-18e, 50 x 4,6 mm) stosując szybkość przepływu 2 ml/min w 3,5-minutowym wymywaniu gradientowym z detekcją przy 254 nm lub na Merck Kolumna Purospher STAR (RP-18e, 30 x 4 mm) przy szybkości przepływu 1,5 ml/min w 3,5-minutowym wymywaniu gradientowym z detekcją przy 254 nm. Fazą ruchomą była  
20 mieszanina metanolu (rozpuszczalnik A) i wody (rozpuszczalnik B), oba zawierające kwas mrówkowy przy 0,1%. Wymywanie gradientowe było następujące: 1:9 (A/B) do 9:1 (A/B) przez 2,25 min, 9:1 (A/B) przez 0,75 min, a następnie odwrotnie z powrotem do 1:9 (A/B) przez 0,3 minuty, na koniec 1:9 (A/B) przez 0,2 minuty).

[0112] Analiza LC-HRMS została przeprowadzona na HPLC serii Agilent 1200 i detektorze z  
25 matrycą diodową sprzężonym z kwadrupolowym spektrometrem masowym z czasem przelotu 6520 z podwójnym, o wielu nastawach, źródłem APCI/ESI. Rozdzielanie analityczne prowadzono w 30°C na kolumnie Merck Purospher STAR (RP-18e, 30 x 4 mm) stosując szybkość przepływu 1,5 ml/min w 4-minutowym wymywaniu gradientowym z detekcją przy 254 nm. Fazą ruchomą była mieszanina metanolu (rozpuszczalnik A) i wody (rozpuszczalnik  
30 B), oba zawierające kwas mrówkowy przy 0,1%. Wymywanie gradientowe było następujące: 1:9 (A/B) do 9:1 (A/B) przez 2,5 min, 9:1 (A/B) przez 1 min, a następnie odwrotnie, z powrotem do 1:9 (A/B) przez 0,3 min, ostatecznie 1:9 (A/B) przez 0,2 min. Następujące masy referencyjne zostały użyte do analizy HRMS: kofeina [M + H]<sup>+</sup> 195,087652; (heksakis(1*H*,1*H*,3*H*-tetrafluoropentoksy)fosfazen [M + H]<sup>+</sup> 922,009798) i heksakis(2,2-difluoroetoksy)fosfazen [M + H]<sup>+</sup> 622,02896 lub rezerpina [M + H]<sup>+</sup> 609,280657.  
35

**Przykład 1 - Otrzymywanie 6-chloro-7-(4-(4-chlorobenzyl)piperazyn-1-yl)-2-(1,3-dimetylo-1*H*-pirazol-4-ilo)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]pirydyny**

**4-Chloro-3-nitropyridyno-2-amina<sup>40</sup>****[0113]**

5 **[0114]** Do okrągłodennej kolby o pojemności 100 ml zawierającej 2-amino-4-chloropyrydynę (0,480 g, 3,75 mmola) ochłodzoną na łaźni lodowej dodano stężony kwas siarkowy (5,4 g). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 5 minut, a następnie wkroplono kwas azotowy (70%, 0,36 g). Mieszaninę reakcyjną mieszano w 0°C przez 10 minut, następnie ogrzano do 55°C i mieszano w tej temperaturze przez 1 godzinę. Ochłodzono go do temperatury pokojowej i

10 rozcieńczono wodą z lodem. pH ostrożnie doprowadzono do ~7,5 za pomocą 10% wodnego roztworu NaOH, w wyniku czego powstał żółty osad. Odsączono go, przemyto wodą i wysuszono *w próżni* ponad P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na krzemionce (elucja dichlorometanem) dostarczając w kolejności elucji: 4-chloro-3-nitropyridyno-2-aminę w postaci żółtego ciała stałego (0,210 g, 32%), NMR <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 6,87 (d, J = 5,2 Hz, 1H, pyrydyna C-H), 7,21 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 8,11 (d, J = 5,2 Hz, 1H, pyrydyna C-H).

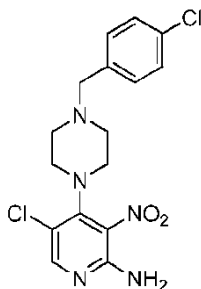
15 4-chloro-5-nitropyridyno-2-aminę (0,080 g, 12%): NMR <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 6,58 (s, 1H, pyrydyna C-H) 7,58 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 8,79 (s, 1H, pyrydyna C-H).

**4,5-dichloro-3-nitropyridyno-2-amina**20 **[0115]**

**[0116]** 4-Chloro-3-nitropyridyno-2-aminę (0,10 g, 0,58 mmol) rozpuszczono w suchym acetonitrylu (20 ml). Do mieszanego roztworu dodano następnie *N*-chlorosukcynoimid (0,094 g, 0,70 mmola) i mieszaninę reakcyjną ogrzewano w temperaturze 80°C przez 1 godzinę.

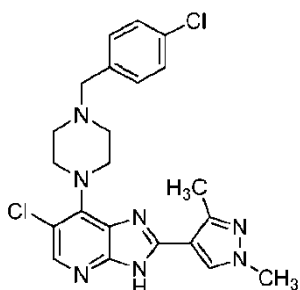
25 Substancje lotne usunięto pod próżnią, a pozostałość oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na krzemionce (elucja dichlorometanem), otrzymując związek tytułowy jako jasnobrązowy proszek (0,125 g, 85%). NMR <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 7,35 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 8,36 (s, 1H, 6-H).

**5-Chloro-4-(4-(4-chlorobenzyl)piperazyn-1-ylo)-3-nitropyridyno-2-amina**

**[0117]**

**[0118]** Do mieszaniny 2-amino-4,5-dichloro-3-nitropyridyny (0,152 g, 0,73 mmola) i izopropanolu (22 ml) dodano 1-(4-chlorobenzyl)piperazynę (0,165 g, 0,78 mmola), a następnie diizopropylloetyloaminę (0,17 ml, 0,97 mmola). Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w 45°C przez 18 godzin, następnie pozostawiono do ochłodzenia do temperatury pokojowej i rozcieńczono izopropanolem (5 ml). Osad zebrano przez odsączenie, przemyto izopropanolem i eterem dietylowym. Tytułowy związek otrzymano w ten sposób jako żółte ciało stałe (0,215 g, 77%); NMR <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 2,48 (br s, przesłonięty przez pik DMSO, 4H, piperazyna C-H), 3,06 (brt, J = 4,3 Hz, 4H, piperazyna C-H), 3,52 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>do<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl), 6,95 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7,35 (d, J = 8,5 Hz, 2H) i 7,38 (d, J = 8,5 Hz, 2H) (3,5-ArH i 2,6-ArH), 8,06 (s, 1H, 6-H); LC-MS (ESI, m/z): Rt = 1,70 min - 382,384,38 [(M + H)<sup>+</sup>, wzór izotopowy Cl<sub>2</sub>].

**6-Chloro-7-(4-(4-chlorobenzyl)piperazyn-1-ylo)-2-(1,3-dimetylo-1H-pirazol-4-ilo)-3H-imidazo(4,5-b]pirydyna**

**[0119]**

**[0120]** Do mieszaniny 5-chloro-4-(4-(4-chlorobenzyl)piperazyn-1-ylo)-3-nitropyridyno-2-aminy (0,076 g, 0,20 mmol) i EtOH (4,0 ml) dodano 1,3-dimetylo-1H-pirazolo-4-karbaldehyd (0,027 g, 0,22 mmol), a następnie świeżo sporządzony wodny roztwór Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (1M; 0,85 ml, 0,85 mmola). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze 80°C przez 24 godziny, następnie pozostawiono do ochłodzenia do temperatury pokojowej, zateżono *pod próżnią*, a pozostałość absorbowano na żelu krzemionkowym i umieszczono na kolumnie z 10 g krzemionki Isolute. W wyniku elucji octanem etylu/dichlorometanem (obj./obj., 1:1), a następnie 4% metanolem w octanie etylu/dichlorometanie (obj./obj., 1:1) otrzymano związek tytułowy w postaci białego ciała stałego po utarciu z eterem dietylowym (0,023 g, 25%).

NMR <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 2,51 (s, zasłonięte przez pik rozpuszczalnika, pirazol 3-CH<sub>3</sub>), 2,57 (br s, 4H, piperazyna C-H), 3,54 (s, 2H, N-CH<sub>2</sub>do<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl), 3,68 (br s, 4H, piperazyna C-H), 3,84 (s, 3H, pirazol N-Me), 7,37 (d, J = 8,5 Hz, 2H) i 7,40 (d, J = 8,5 Hz, 2H) (do<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl), 8,02

(s, 1H) i 8,18 (s, 1H) (pirazol 5-H i imidazo[4,5-*b*]pirydyna 5-H), 12,95 (br s, 1H, imidazo[4,5-*b*]pirydyna N-H); LC-MS (ESI, *m/z*): Rt = 1,97 min - 456,458, 460 [(M + H)<sup>+</sup>, wzór izotopowy Cl<sub>2</sub>].

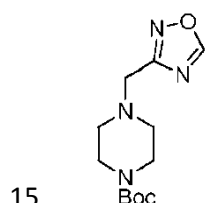
HRMS: znalezione: 456,1457, obliczone dla C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>7</sub> (M + H)<sup>+</sup>: 456,1465.

- 5 **[0121]** Związek ten wytwarzano także w ilościach masowych w zakresie od 0,80 g do 1,80 g i z wydajnością w zakresie od 54% do 70%. Zastosowano taki sam sposób jak opisano powyżej, ale podczas obróbki mieszaninę reakcyjną rozdzielono między wodę i chloroform. Warstwę wodną wyekstrahowano chloroformem i octanem etylu i połączone warstwy organiczne wysuszono i zateżono pod próżnią. Również jako rozpuszczalnik stosowano DMSO
- 10 zamiast EtOH, i w tym przypadku mieszaninę reakcyjną mieszano w 120°C przez 3 godziny.

**Przykład 2 - Otrzymywanie 3-((4-(6-Chloro-2-(1,3-dimetylo-1*H*-pirazol-4-ilo)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]pirydyn-7-yl)opiperazyn-1-yl)metylo)-1,2,4-oksadiazolu**

***4-((1,2,4-oksadiazol-3-ilo)metylo)piperazyno-1-karboksylan tert-butylu***

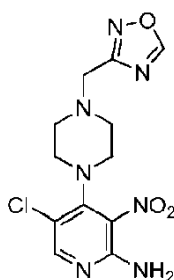
**[0122]**



- [0123]** Do roztworu Boc-piperazyny (571 mg, 3,07 mmola) i 3-(chlorometylo)-1,2,4-oksadiazolu (400 mg, 3,37 mmola) w CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 ml) dodano trietyloaminę (1,70 ml, 12,3 mmola). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 22 godziny w 50°C przed zateżeniem *pod próżnią* z uzyskaniem surowego oleistego białego ciała stałego. Oczyszczanie przeprowadzono
- 20 przez chromatografię rzutową na żelu krzemionkowym (4x12) z elucją MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5%) z wytworzeniem tytułowego związku (555 mg, 67%) jako białej substancji stałej. NMR <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 1,43 (s, 9H, C (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2,52 (app t, *J* = 4,9 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>), 3,45 (app t, *J* = 4,9 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>), 3,78 (s, 2H, CH<sub>2</sub>C-), 8,71 (s, 1H, CH<sub>ar</sub>); LC-MS (ESI, *m/z*): Rt = 1,67 min-213 (M-<sup>t</sup>Bu)<sup>+</sup>, 169 (M-Boc)<sup>+</sup>.

- 25 ***4-(4-((1,2,4-Oksadiazol-3-ilo)metylo)piperazyn-1-yl)-5-chloro-3-nitropirydno-2-amina***

**[0124]**



- [0125]** Do roztworu 4-((1,2,4-oksadiazol-3-ilo)metylo)piperazyno-1-karboksylanu *tert*-butylu
- 30 (213 mg, 0,790 mmola) w CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (18 ml) dodano TFA (1,8 ml, 23,8 mmola) i roztwór

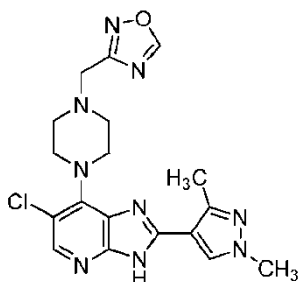
mieszano w temperaturze pokojowej przez 1½ godziny. Mieszaninę reakcyjną zatężono *pod próżnią*, azeotropowano z toluenem (x2) i suszono w eksykatorze próżniowym (zawierającym KOH) przez noc, z wytworzeniem żółtego oleju. Surowy olej został rozpuszczony w *i*PrOH (4,4 ml) a także obie, 2-amino-3-nitro-4,5-dichloropirydyna (190 mg, 0,752 mmola) i DIPEA (520 μl, 3,00 mmola). Roztwór mieszano w 50°C przez 4 godziny. Po ochłodzeniu wytrącił się żółty osad, który odsączono i przemyto Et<sub>2</sub>O, suszono *pod próżnią* z wytworzeniem tytułowego związku jako żółtego ciała stałego (165 mg, 0,486, 65%). Przesącz zatężono *pod próżnią* z wytworzeniem 715 mg oleistego żółtego ciała stałego. Oczyszczanie przeprowadzono przez chromatografię rzutową na żelu krzemionkowym (4x11), elując mieszaniną EtOAc/heksan (40-50%), w wyniku czego otrzymano związek tytułowy (42 mg, 16%) w postaci żółtego ciała stałego.

NMR <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 2,74 (app t, *J* = 4,1 Hz, 4H, -CH<sub>2</sub>-), 3,25 (t, *J* = 4,8 Hz, 4H, -CH<sub>2</sub>-), 3,85 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>C-), 5,77 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7,99 (s, 1H, CH<sub>ar</sub>), 8,72 (s, 1H, -C (Cl) CH-). LC-MS (ESI, *m/z*): Rt = 1,56 min.-340, 342 [(M + H)<sup>+</sup> Wzór izotopowy Cl].

15

**3-((4-(6-Chloro-2-(1,3-dimetylo-1H-pirazol-4-ilo)-3H-imidazo(4,5-b]pirydyn-7-ylo)piperazyn-1-ylo)metylo)-1,2,4-oksadiazol**

[0126]



20 **[0127]** Do roztworu 4-(4-((1,2,4-oksadiazol-3-ilo)metylo)piperazyn-1-ylo)-5-chloro-3-nitropirydino-2-aminy (50,0 mg, 0,147 mmola) i 1,3-dimetylo-1H-pirazolo-4-karbaldehydu (19,2 mg, 0,155 mmola) w EtOH (3,4 ml) dodano 1M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (0,588 ml, 0,588 mmola, świeżo przygotowany) i roztwór ogrzano do 80°C i mieszano przez 15 godzin, otwarty na powietrze. Po ochłodzeniu mieszaninę reakcyjną odparowano *pod próżnią* a pozostałość 25 wysuszono na krzemionce. Oczyszczanie przeprowadzono metodą chromatografii rzutowej na żelu krzemionkowym (2x14), elując za pomocą MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5-7,5%) z uzyskaniem tytułowego związku (26 mg, 43%) w postaci bledożółtego ciała stałego.

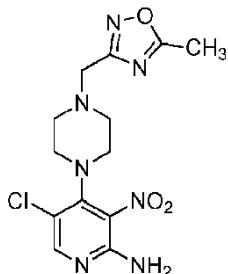
NMR <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 2,58 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,81 (app t, *J* = 4,4 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>), 3,82 (app s, 4H, CH<sub>2</sub>), 3,85 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3,88 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 7,62 (br s, 1H, CH<sub>ar</sub>), 7,87 (br s, 1H, CH<sub>ar</sub>), 8,74 (s, 1H, CH<sub>ar</sub>), 13,04 (s, 1H, NH);

30

LC-MS (ESI, *m/z*): Rt = 1,91 min - 414, 416 [(M + H)<sup>+</sup> Wzór izotopowy Cl]; HRMS: znaleziono: 436,1374, obliczono dla C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>N<sub>9</sub>OCINa (M + Na)<sup>+</sup>: 436,1372.

**Przykład 3 - Otrzymywanie 3-((4-(6-Chloro-2-(1,3-dimetylo-1H-pirazol-4-ilo)-3H-imidazo[4,5-b]pirydyn-7-ylo)piperazyn-1-ylo)metylo)-5-metylo-1,2,4-oksadiazolu 2-Amino-5-chloro-4-(4-(5-metylo-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)metylo)piperazyn-1-ylo)-3-nitropirydyna**

5 [0128]

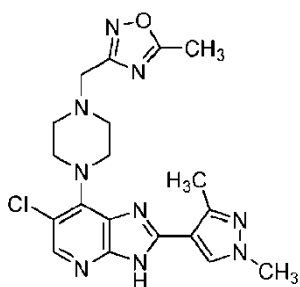


[0129] Chlorowodorek 1-[(5-metylo-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)metylo]piperazyny (217 mg, 0,99 mmola) i 2-amino-4,5-dichloro-3-nitropirydynę (208 mg, 1,0 mmol) mieszano w 2-propanolu (5 ml) i dodano diizopropylotetyloaminę (523 µl, 387 mg, 3,0 mmola). Mieszaninę mieszano i ogrzewano w 45°C przez 23 godziny. Mieszaninę reakcyjną ochłodzono, a produkt odsączono i przemyto 2-propanolem. Po wysuszeniu pod próżnią otrzymano produkt (246 mg, 69%). NMR <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 2,63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,77 (br m, 4H, piperazyna C-H), 3,29 (m, 4H, piperazyna C-H), 3,76 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 5,27 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 8,02 (s, 1H, pirydyna 6-H).

LC-MS (ESI, *m/z*): Rt = 1,66 min-354 (M + H)<sup>+</sup>, Izotop <sup>35</sup>Cl

15 **3-((4-(6-Chloro-2-(1,3-dimetylo-1H-pirazol-4-ilo)-3H-imidazo[4,5-b]pirydyn-7-ylo)piperazyn-1-ylo)metylo)-5-metylo-1,2,4-oksadiazol**

[0130]



[0131] Do roztworu 5-chloro-4-(4-((5-metylo-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)metylo)piperazyn-1-ylo)-3-nitropirydyno-2-aminy (60,0 mg 0,170 mmola) i 1,3-dimetylo-1H-pirazolo-4-karbaldehydu (22,2 mg, 0,179 mmola) w EtOH (3,8 ml) dodano 1M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (0,678 ml, 0,678 mmol, świeżo przygotowany) i roztwór ogrzano do 80°C i mieszano przez 16 godzin, otwarty na powietrze. Po ochłodzeniu mieszaninę reakcyjną odparowano *pod próżnią*, a pozostałość wysuszono na krzemionce. Oczyszczanie przeprowadzono przez chromatografię rzutową na żelu krzemionkowym (3x14) z elucją MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5-7,5%), w wyniku czego otrzymano tytułowy związek w postaci bledożółtego ciała stałego. Rekrystalizacja w EtOAc/Et<sub>2</sub>O dała tytułowy związek (20 mg, 27%) w postaci białawego ciała stałego. Przesącz zateżono *pod próżnią*, dodatkową ilość tytułowego związku (12 mg, 16%) jako bledożółte ciało stałe. NMR <sup>1</sup>H (500

MHz, CDCl<sub>3</sub>) 2,60 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,62 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,81 (app t,  $J = 4,5$  Hz, 4 H, CH<sub>2</sub>), 3,76 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 3,87 (app s, 4H, CH<sub>2</sub>) 3,90 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 7,77 (br s, 1H, CH<sub>ar</sub>), 7,96 (br s, 1H, CH<sub>ar</sub>), 12,18 (s, 1H, NH);

LC-MS (ESI,  $m/z$ ): Rt = 1,95 min.-428, 430 [(M + H)<sup>+</sup> Wzór izotopowy Cl];

- 5 HRMS: znaleziono: 450,1527, obliczono dla C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>9</sub>OCINa (M + Na)<sup>+</sup>: 450,1528.

### **OCENA ZWIĄZKÓW Z PRZYKŁADÓW 1 do 3**

#### **Ogólne materiały i sposoby**

- 10 [0132] Testy kinazy Aurora: wartości IC<sub>50</sub> kinazy Aurora zostały określone zgodnie z wcześniejszym opisem.<sup>26,36</sup>

[0133] Test żywotności komórek: wartości GI<sub>50</sub> (stężenie hamujące wzrost komórek o 50%) oznaczono zgodnie z wcześniejszym opisem.<sup>26,36</sup>

#### **Oznaczanie komórkowych wartości IC<sub>50</sub> z przykładu 1 dla inhibicji Aurora A i Aurora B:**

- 15 [0134] Znakowane Myc Aurora A transfekowano w komórkach Hela przy użyciu Lipofectamine LTX w 24-studzienkowych płytkach i 24 godziny po transfekcji komórki traktowano różnymi stężeniami z przykładu 1, przez 2 godziny. Komórki następnie poddano lizie w buforze do próbek 2X LDS. Białka z różnych próbek rozdzielono za pomocą 4-12% żelu Bis-Tris NuPage (Invitrogen) i analizowano metodą western blot, stosując przeciwciała P-histone H3 (S10) i P-Aurora A (T288). Prążki P-histone H3 i P-Aurora A oznaczono ilościowo przy użyciu oprogramowania Image J, a wartości IC<sub>50</sub> zostały obliczone przy użyciu Graphpad Prism.
- 20

#### **Stabilność mikrosomalna w wątrobie myszy:**

- 25 [0135] Związki (10 μM) inkubowano z białkiem mikrosomów samców myszy CD1 (1 mg.ml<sup>-1</sup>) w obecności NADPH (1 mM), UDPGA (2,5 mM) i MgCl<sub>2</sub> (3 mM) w soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (10 mM) w 37°C. Inkubacje prowadzono przez 0 i 30 minut. Kontrolne inkubacje generowano przez pominięcie NADPH i UDPGA w reakcji inkubacji. Pozostały procent związku ustalono po analizie metodą LCMS.

#### **Stabilność mikrosomalna w wątrobie ludzkiej:**

- 30 [0136] Związki (10 μM) inkubowano z białkiem mikrosomów zbiorczej ludzkiej wątroby o mieszanej płci (1 mg.ml<sup>-1</sup>) w obecności NADPH (1 mM), UDPGA (2,5 mM) i MgCl<sub>2</sub> (3 mM) w soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (10 mM) w 37°C. Inkubacje prowadzono przez 0 i 30 minut. Kontrolne inkubacje generowano przez pominięcie NADPH i UDPGA w reakcji inkubacji. Pozostały procent związku ustalono po analizie metodą LCMS.

- 35 [0137] Inhibicja hERG: Całkowity procent inhibicji hERG przy stężeniu związku 10 μM został określony przez Millipore w wysokoprzepustowym teście elektrofizjologicznym opartym na komórkach dla inhibicji końcowego prądu hERG<sup>41</sup>, a wartości są podawane jako średnia z wielu oznaczeń. 0,3% wodna kontrola negatywna DMSO w podłożu dała inhibicję 7-16%.

Pozytywna kontrola, Cisapryd (1  $\mu\text{M}$ ), dała 96-104% inhibicji. Wszystkie wartości  $\text{IC}_{50}$  hERG zostały określone przez Millipore<sup>41</sup> a  $\text{IC}_{50}$  hERG dla przykładu 1 określono również przez Cyprotex plc oznaczający prądy końcowe hERG metodą whole-cell voltage-clamping.<sup>42</sup>

5 **[0138]** Właściwości fizykochemiczne: Pomiar LogD i pKa zostały wykonane przez Pharmorphix® Solid State Services, członka grupy Sigma-Aldrich, Cambridge, Wielka Brytania.

**[0139]** Profilowanie selektywności kinaz: profilowanie kinaz za pomocą technologii KINOMEScan™ i ustalenia  $K_d$  zostały przeprowadzone przez KINOMEScan, oddział DiscoverX Corporation, San Diego, Kalifornia, USA; [www.kinomescan.com](http://www.kinomescan.com).

10 **[0140]** *In vivo* pełny PK (związek z przykładu 1): myszom (samice Balb/C) podawano p.o. lub i.v. związek z przykładu 1 (5 mg  $\text{kg}^{-1}$ ) w 10% DMSO, 5% Tween 20 w soli fizjologicznej. Po podaniu myszy uśmiercono po 5, 15 i 30 minutach i 1, 2, 4, 6 i 24 godzinach. Krew usunięto przez nakłucie serca i odwirowano, aby uzyskać próbki osocza. Próbki osocza (100  $\mu\text{l}$ ) dodano do analitycznego wzorca wewnętrznego (Olomoucine; IS), a następnie białko strącono za pomocą 300  $\mu\text{l}$  metanolu. Po odwirowaniu (1200 x g, 30 minut, 4°C), otrzymane supernatanty  
15 analizowano pod względem poziomu związku z przykładu 1, metodą LCMS stosując kolumnę analityczną Acquity UPLC C18 (Waters, 50x2,1 mm) z odwróconą fazą i trybem dodatniego jonu ESI MRM na układzie chromatografii cieczowej Agilent 1200 sprzężonym z potrójnym kwadrupolowym spektrometrem masowym 6410 (Agilent Ltd.).

**[0141]** Badanie skuteczności ksenoprzeszczepu guza ludzkiego: Procedury dotyczące zwierząt  
20 zostały przeprowadzone zgodnie z wytycznymi określonymi przez The Institute of Cancer Research's Animal Ethics Committee i zgodnie z wytycznymi krajowymi: Workman P, Aboagye EO, Balkwill F, Balmain A, Bruder G, Chaplin DJ, Double JA, Everitt J, Farningham D, Glennie MJ, Kelland LR, Robinson V, Stratford IJ, Tozer GM, Watson S, Wedge SR, Eccles SA. Wytyczne dotyczące dobrostanu i wykorzystania zwierząt w badaniach nad rakiem. Brit J  
25 Cancer 102: 1555-1577, 2010.

**[0142]** Samicom myszy bezgrasiczych CrTacNcr-*Fox1(nu)* wszczepiono podskórną 10<sup>7</sup> komórek białaczki MV4-11 *FLT3*-ITD. Gdy ksenoprzeszczepy były dobrze ustalone (10 dni po wszczepieniu, średnia objętość guza wynosiła co najmniej 100  $\text{mm}^3$ ) zwierzęta traktowano albo nośnikiem (10% DMSO, 20% PEG 400, 5% Tween 80 i 65% wody), albo związkiem z  
30 przykładu 1 podawanym doustnie w dwóch dawkach, 50 mg/kg i 100 mg/kg (n = 5 na grupę). Dawkowanie odbywało się dwa razy dziennie przez 7 dni, i raz dziennie przez kolejne 4 dni.

**[0143]** Badanie PK/PD: 4-dniowe badanie PK/PD przeprowadzono przez doustne podawanie nośnika jak powyżej, lub 50 mg/kg i 100 mg/kg związku z przykładu 1, dwa razy dziennie u myszy bezgrasiczych z dobrze ustalonymi ksenoprzeszczepami MV4-11 (17 dni po implantacji).  
35 Próbki osocza i guza pobrano 2 godziny i 6 godzin po końcowych dawkach.

## Wyniki

**Aktywność kinazy Aurora, aktywność komórek, stabilność mikrosomowa, inhibicja hERG i właściwości fizykochemiczne**

[0144] Aktywność przykładowych związków przeciwko Aurora A (test biochemiczny), komórkową GI50 w komórkach SW620 i hERG pokazano w Tablicy 1 poniżej, wraz z danymi 5 dotyczącymi stabilności mikrosomowej tych związków i ich odpowiednich wartości clogP.

Tablica 1

Przykład nr	Aurora-A IC <sub>50</sub> (μM)	SW620 GI <sub>50</sub> (μM)	MLM/HLM <sup>b</sup>	hERG IC <sub>50</sub> (μM)	clogP <sup>27</sup>
Prz. 56 WO2007/072017	z 0,032 <sup>a</sup>	n.d.		5,5	2,78
Prz. 57 WO2007/072017	z 0,300 <sup>a</sup>	n.d.		10,8	2,72
1	0,038 ± 0,029	0,283 ± 0,227	34%/10%	>25	4,81 <sup>c</sup>
2	0,040 ± 0,015	1,175 ± 0,653	67%/22%	11,0	1,45
3	0,052 <sup>a</sup>	1,1 <sup>a</sup>	58%/20%	9,5	1,72

Dla oznaczeń IC<sub>50</sub> Aurora-A i GI<sub>50</sub>SW620, wyniki są wartościami średnimi z dwóch niezależnych oznaczeń lub średniej (± SD) dla n > 2, o ile nie podano inaczej.

<sup>a</sup> Wyniki są wartościami średnimi dla próbek prowadzonych w trzech powtórzeniach.

<sup>b</sup> MLM/HLM: Procent macierzystego związku metabolizowanego po 30 minutach inkubacji.

<sup>c</sup> LogD<sub>7.4</sub> = 3,84 (wartość wyznaczona doświadczalnie).

n.d. = nie określono.

[0145] Związek z przykładu 1 wykazywał niższą aktywność hamującą wobec hERG w porównaniu ze związkami z przykładów 56 i 57 WO2007/072017.

10 [0146] W oparciu o te wyniki, związek z przykładu 1 wybrano do dalszej charakterystyki *in vitro* i *in vivo*.

**Selektywność kinaz**

[0147] Selektywność kinazy oceniano przez profilowanie przykładu 1 na panelu kinazowym 442 (386 niezmutowanych kinaz) o stężeniu 1 μM, stosując technologię KINOMEScan™.<sup>28</sup>

15 Wynik selektywności S(10), który jest obliczany przez podzielenie liczby niezmutowanych kinaz, dla których zaobserwowano >90% konkurencji w teście (mierzone to jako <10% kontroli), przez całkowitą liczbę niezmutowanych testowanych kinaz, został określony jako 0,057, tj., 22 trafienia z testowanych 386 niezmutowanych kinaz. Aurora-A, -B i -C były silnie hamowane, przy czym % wartości kontrolnych określono odpowiednio jako 3,4%, 1% i 16%.

To pierwszorzędowe badanie przesiewowe ujawniło także ponad 94% konkurencję dla kinazy FLT3 i mutantów FLT3, w tym FLT3-ITD, FLT3 (D835Y) i FLT3 (D835H).

**[0148]** Aktywności hamujące FLT3 i Aurora związku z przykładu 1 zostały następnie potwierdzone przez określenie wartości  $K_d$  (technologia KINOMEScan™), jak pokazano w Tablicy 2.

Tablica 2: Wartości  $K_d$  dla związku z przykładu 1

Kinaza	$K_d$ (nM)
Aurora-A	7,5
Aurora-B	48
FLT3	6,2
FLT3(D835H)	11
FLT3(D835Y)	14
FLT3-ITD	38
FLT3(K663Q)	5,1
FLT3(N841I)	16
FLT3(R834Q)	110

**[0149]** Przykłady 2 i 3 były również silnymi inhibitorami FLT3 i FLT3-ITD. Wartości  $K_d$  z przykładu 2 względem FLT3 i FLT3-ITD określono jako odpowiednio 4,4 nM i 14 nM. Podobnie, wartości  $K_d$  z przykładu 3 względem FLT3 i FLT3-ITD określono jako odpowiednio 5,6 nM i 26 nM.

**[0150]** Podsumowując, dane te wskazują, że związek z przykładu 1 jest silnym podwójnym inhibitorem kinaz FLT3 i Aurora z niewielką aktywnością kinazową poza celem w całym kinomie.

15

### **Ocena w teście komórkowym**

**[0151]** Zgodnie z podwójną aktywnością hamującą FLT3/Aurora, związek z przykładu 1 wykazywał aktywność antyproliferacyjną w szeregu ludzkich linii komórek nowotworowych, w tym ludzkiego raka okrężnicy HCT116 ( $GI_{50} = 0,300 \mu M$ ) i ludzkich liniach komórkowych AML pozytywnych pod względem FLT3-ITD, MOLM-13 ( $GI_{50} = 0,104 \mu M$ ) i MV4-11 ( $GI_{50} = 0,211 \mu M$ ). W komórkach Hela związek z przykładu 1 hamował zarówno komórkową Aurora-A, jak i Aurora-B z wartościami  $IC_{50}$  odpowiednio 0,030  $\mu M$  i 0,148  $\mu M$ . W tych testach opartych na komórkach redukcję fosforylacji H3 w S10 zastosowano jako biomarker inhibicji Aurora-B, a autofosforylację Aurora-A w T288 jako biomarker inhibicji Aurora-A.<sup>29</sup>

25 **PK *in vivo***

[0152] Wyniki PK *in vivo* dla związku z przykładu 1 u myszy pokazano w tablicy 3. Jest to związek biodostępny doustnie ( $F = 100\%$ ) z klirensem określonym jako 0,058 l/godz (~48 ml/min/kg) i  $V_d$  jako 0,066 l (~3,3 l/kg).

Tablica 3: Związek z przykładu 1: Wiązanie z białkami osocza myszy i parametry PK

5 (dawkowanie iv: 5 mg/kg, dawkowanie doustne: 5 mg/kg)

PPB (mysz)	t <sub>1/2</sub> , (iv) (godz)	Cl, (iv) (l/godz)	AUC <sub>inf</sub> , (iv) godz.nmol/l	V <sub>d</sub> (l)	F% (po)
97,3±0,8	0,84	0,058	3753	0,066	100

### **Model ksenoprzeszczepu AML**

[0153] Aktywność związku z przykładu 1 w modelu ksenoprzeszczepu ludzkiej AML pokazano na Fig. 1.

10 [0154] Odnosząc się do Fig. 1, można zauważyć, że związek z przykładu 1 silnie hamował wzrost ksenoprzeszczepów ludzkich nowotworów MV4-11 w sposób zależny od dawki, bez obserwowanej toksyczności, jaką określono przez utratę masy ciała. Gdy leczenie przerwano po 11 dniach, guzy były niewykrywalne u myszy traktowanych dawką 100 mg/kg związku z przykładu 1 i zmniejszyły się do 42% początkowej objętości u myszy leczonych schematem  
15 dawkowania 50 mg/kg. Myszy kontrolne uśmiercano w dniu 18 od początku terapii, gdy średnia objętość guza zwiększyła się o ponad 500%. Przeciwnie, pojedyncze myszy ubito, gdy guzy postępowały do tego etapu, w następujący sposób: dni 28 i 31 w dawce 50 mg/kg i dni 46 i 56 w dawce 100 mg/kg. Trzy z 5 myszy w każdej grupie leczonej (60%) nie rozwijały progresywnie rosnących nowotworów w chwili zakończenia badania w dniu 60.

20 [0155] W wyniku tego silnego efektu hamującego *in vivo*, guzy w trakcie leczenia były zbyt małe, aby zapewnić materiał do analizy farmakokinetycznej/farmakodynamicznej. Następnie, powtórzono 4-dniowe badanie PK/PD przez doustne podawanie 50 mg/kg i 100 mg/kg przykładu 1 dwa razy dziennie. Analiza farmakodynamiczna wykazała wyraźną inhibicję fosforylacji histonu H-3 i inhibicję fosforylacji STAT5, która jest dalszym celem FLT3 (Fig. 2).  
25 Ponadto stężenie wolnego leku w osoczu w próbkach otrzymanych 2 godziny po ostatniej dawce określono jako 222 nM i 488 nM odpowiednio dla schematów dawkowania 50 mg/kg i 100 mg/kg (Fig. 2). Stężenia wolnego leku w osoczu są wyraźnie ponad wartości  $K_d$  związku z przykładu 1 względem odpowiednich kinaz, tj. Aurora-A ( $K_d = 7,5$  nM), Aurora-B ( $K_d = 48$  nM), FLT3 ( $K_d = 6,2$  nM), FLT3-ITD ( $K_d = 38$  nM). Te odkrycia demonstrowają, że związek z  
30 przykładu 1 istotnie hamuje wzrost modelu ludzkiego ksenoprzeszczepu AML pozytywnego pod względem FLT3-ITD *in vivo*, z modulacją biomarkerów i ekspozycją na wolny lek, zgodną z podwójnym zaangażowaniem docelowym FLT3 i kinazy Aurora.

### **Inhibicja izoform cytochromu P450**

35 ***Materiały i sposoby***

[0156] W tym badaniu zastosowano dwa związki-komparatory, mianowicie 6-bromo-2-(1-metylo-1*H*-pirazol-4-ilo)-7-(4-(pirydyn-3-ylometylo)piperazyn-1-ylo)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]pirydynę (komparator 1, przykład 56, WO2007/072017) i 6-bromo-7-(4-(pirydyn-3-ylometylo)piperazyn-1-ylo)-2-(1,3,5-trimetylo-1)*H*-pirazol-4-ilo)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]pirydynę (komparator 2, przykład 57, WO2007/072017).

[0157] Związki-komparatory i związki z przykładów 1 do 3 powyżej inkubowano z ludzkimi mikrosomami wątroby (0,5 mg.ml<sup>-1</sup>) w 1 μM, 10 μM i 50 μM.

[0158] Inhibicję izoenzymów CYP określono za pomocą mieszaniny substratów sondy (tablica 4). Próbki inkubowano przez 10 minut, a następnie białko strącono metanolem. Metabolity substratu w każdej próbce zmierzono za pomocą LC/MS/MS, stosując chromatografię cieczową z odwróconymi fazami i ESI w trybie z jonem dodatnim, z monitorowaniem reakcji wielokrotnych (MRM).

Tablica 4: Stężenia substratu sondy izoenzymów CYP i wykryte metabolity

Enzym	Substrat sondy	Stężenie substratu (μM)	Km literaturowa (μM)	Metabolit
CYP1 A2	Fenacetyna	10	10-50	Acetaminofen
CYP2A6	Kumaryna	5	0.5-2	7-Hydroksykumaryna
CYP2C9	Tolbutamid	60	100-200	4-Hydroksytolbutamid
CYP2C19	Mefenytoina	40	30-50	(+/-)-Hydroksymefenytoina
CYP2D6	Bufuralol	5	4-10	1-Hydroksybufuralol
CYP3A4	Midazolam	3	3-5	1-Hydroksymidazolam

## 15 Wyniki

### [0159]

Tablica 5: Oszacowane wartości IC<sub>50</sub> dla inhibicji ludzkich izoenzymów CYP przez badane związki

	CYP1 A2	CYP2A6	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4
Komparator 1	10-50 μM	>50 μM	10-50 μM	10-50 μM	1-10 μM	<1 μM
Komparator 2	>50 μM	>50 μM	10-50 μM	10-50 μM	10-50 μM	<1 μM
Przykład 1	>50 μM	>50 μM	10-50 μM	10-50 μM	10-50 μM	>50 μM
Przykład 2	>50 μM	>50 μM	10-50 μM	10-50 μM	10-50 μM	>50 μM
Przykład 3	>50 μM	>50 μM	10-50 μM	>50 μM	10-50 μM	>50 μM

**[0160]** W przykładach 1-3 nie wykazano istotnej inhibicji izoenzymów CYP (tablica 5), oszacowane wartości IC<sub>50</sub> były wyższe niż 10 µM.

**[0161]** Żadne związki nie wykazywały istotnej inhibicji CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9 ani CYP2C19. Oba związki porównawcze wykazały istotną inhibicję CYP3A4 z przybliżonymi wartościami IC<sub>50</sub> poniżej 1 µM, przy czym komparator 1 także hamuje CYP2D6. W związku z tym związki według niniejszego wynalazku wykazywały istotnie zredukowaną inhibicję CYP3A4 w stosunku do obu związków porównawczych.

### Odniesienia literaturowe

#### [0162]

- 10           1. Carmena, M i in.; Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2003, 4, 842-854.
2. Ducat D. i in.; Exp. Cell Res. 2004, 301, 60-67.
3. Marumoto, T. i in.; Nat. Rev. Cancer 2005, 5, 42-50.
4. Barr, A. R. i in. J. Cell Sci. 2007, 120, 2987-2996.
5. Bayliss, R i in.; Mol. Cell. 2003, 12, 851-862.
- 15           6. Giet, R. i in.; J. Cell Biol. 2001, 152, 669- 681.
7. Gassmann, R. i in.; J. Cell Biol. 2004, 166, 179 - 191.
8. Sessa, F. i in.; Mol. Cell, 2005, 18, 379-39 1.
9. Bishop, J. D. i in.; J. Biol. Chem. 2002, 277, 27577-27580.
10. Tanaka, T. i in.; Cancer Res. 1999, 59, 2041-2044.
- 20           11. Bischoff, J. R. i in.; EMBO J. 1998, 17, 3052-3065.
12. Gritsko, T. M. i in.; Clin. Cancer. Res. 2003, 9, 1420-1426.
13. Reichardt, W. i in.; Oncol. Rep. 2003, 10, 1275-1279.
14. Chieffi, P. i in.; J. Endocrinol. 2004, 181, 263-270.
15. Araki, K. i in.; J Neurooncol. 2004, 67, 53-64.
- 25           16. Sorrentino, R. i in.; J Clin Endocrinol Metab. 2005, 90, 928-935.
17. Kimura, M. i in.; J. Biol. Chem. 1999, 274, 7334-7340.
18. Pollard, J. R. i in.; J. Med. Chem. 2009, 52, 2629-2651.
19. Green, M. R. i in.; Expert Opin. Drug Discov. 2011, 6, 291-307.
20. Cheung, C. H. A. i in.; Expert Opin. Ther. Patents 2011, 21, 857-884.
- 30           21. Harrington, E. A. i in.; Nat. Med. 2004, 10, 262-267.
22. Mortlock, A. A. i in.; J. Med. Chem. 2007, 50, 2213-2224.
23. Fancelli, D. i in.; J. Med. Chem. 2006, 49, 7247-7251.
24. Caprinelli. P. i in.; Mol. Cancer Ther. 2007, 6, 3158-3168.
25. Payton, M. i in.; Cancer Res 2010, 70, 9846-9854.
- 35           26. Bavetsias, V. i in.; J. Med Chem. 2010, 53, 5213-5228.
27. CLogP obliczono stosując ChemBioDraw Ultra 12 z CambridgeSoft ([www.cambridgesoft.com](http://www.cambridgesoft.com)).
28. Profilowanie kinazy z użyciem technologii KINOMEScan™: [www.kinomescan.com](http://www.kinomescan.com).

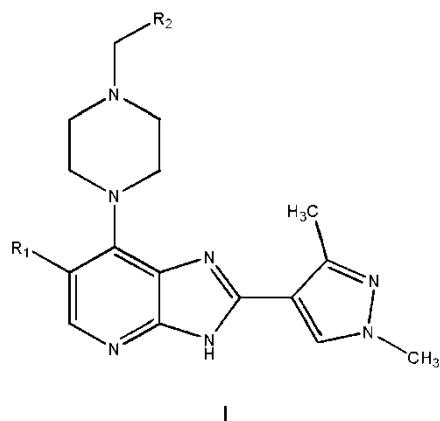
29. Manfredi, M. G. i in.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007, 104, 4106-4111.
30. Ikezoe, T. i in.; Mol Cancer Ther 2007, 6, 1851-1857.
31. Ochi, T. i in.; Blood 2009, 113, 66-74.
32. Huang, X.-F. i in.; Blood 2008, 111, 2854-2865.
- 5 33. Walsby, E. i in.; Haematologica 2008, 93, 662-669.
34. Meshinchi, S. i in; Clin Cancer Res 2009, 15, 4263-4269.
35. Meshinchi, S. i in.; Blood 2006, 108, 3654-3661.
36. Chan, F. i in.; Mol Cancer Ther, 2007, 6, 3147-3157.
37. Stirewalt, D. L. i in.; Nat Rev Cancer 2003, 3, 650-665.
- 10 38. Kindler, T. i in.; Blood 2010, 116, 5089 - 5102.
39. Levis, M. J.; Best Practice & Research Clinical Haematology 2010, 23, 489-494.
40. Bavetsias, V. i in, Bioorg. Med. Chem. Lett. 2007, 17, 6567-6571.
41. *Ion Channel Cardiac Profiler*; Millipore: Billerica, MA:  
[http://www.millipore.com/life\\_sciences/flx4/ld\\_ion](http://www.millipore.com/life_sciences/flx4/ld_ion)
- 15 42. hERG Safety Test; Cyprotex plc, Cheshire, UK; [www.cyprotex.com](http://www.cyprotex.com)
43. Roden, D. M. N. Engl. J. Med. 2004, 350, 1013-1022.

**The Institute of Cancer Research: Royal Cancer Hospital, Wielka Brytania**

**Pełnomocnik:**

**Zastrzeżenia patentowe**

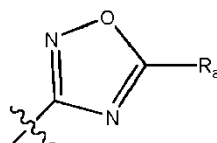
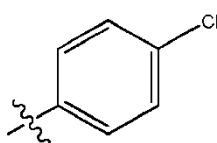
1. Związek o wzorze I pokazanym poniżej:



przy czym:

R<sub>1</sub> oznacza Br lub Cl;

R<sub>2</sub> jest wybrany spośród wzoru II lub wzoru III pokazanych poniżej:



przy czym R<sub>a</sub> oznacza atom wodoru lub metyl;

lub jego farmaceutycznie dopuszczalna sól lub solwat.

2. Związek według zastrz. 1, przy czym R<sub>1</sub> oznacza Cl.

3. Związek według zastrz. 1, przy czym R<sub>1</sub> oznacza Br.

4. Związek według któregokolwiek z zastrzeżeń poprzednich, przy czym R<sub>2</sub> ma wzór II.

5. Związek według któregokolwiek z zastrz. 1 do 3, przy czym R<sub>2</sub> ma wzór III.

6. Związek według któregokolwiek z zastrzeżeń poprzednich, który jest wybrany spośród któregokolwiek z następujących:

6-Chloro-7-(4-(4-chlorobenzyl)piperazyn-1-ylo)-2-(1,3-dimetylo-1*H*-pirazol-4-ilo)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]pirydyny;

3-((4-(6-Chloro-2-(1,3-dimetylo-1*H*-pirazol-4-ilo)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]pirydyn-7-ylo)piperazyn-1-ylo)metylo)-1,2,4-oksadiazolu;

3-((4-(6-Chloro-2-(1,3-dimetylo-1*H*-pirazol-4-ilo)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]pirydyn-7-ylo)piperazyn-1-ylo)metylo)-5-metylo-1,2,4-oksadiazolu;

lub jego farmaceutycznie dopuszczalnej soli lub solwatu.

7. Kompozycja farmaceutyczna zawierająca związek według któregośkolwiek z zastrz. 1 do 6, lub jego farmaceutycznie dopuszczalną sól lub solwat, i jedną lub większą liczbę farmaceutycznie dopuszczalnych substancji pomocniczych.

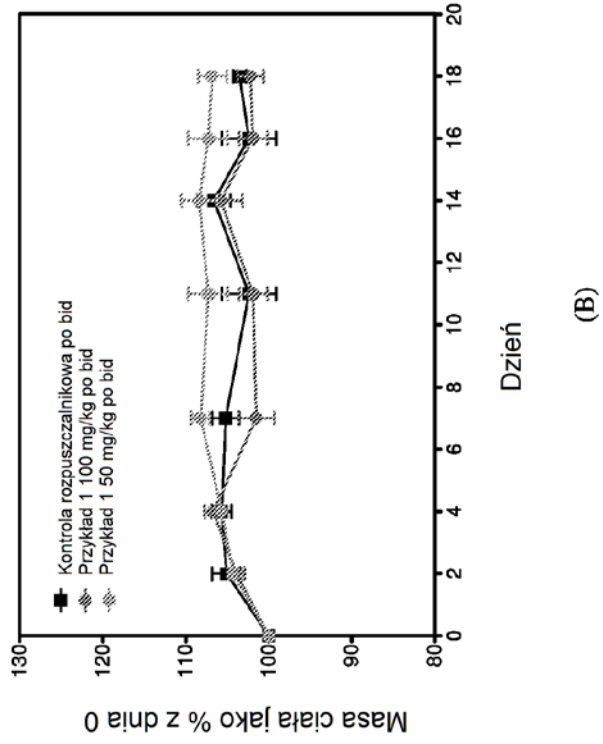
8. Związek według któregośkolwiek z zastrz. 1 do 6, lub jego farmaceutycznie dopuszczalna sól lub solwat, do zastosowania w terapii.

9. Związek według któregośkolwiek z zastrz. 1 do 6, lub jego farmaceutycznie dopuszczalna sól lub solwat, do zastosowania w leczeniu zaburzenia proliferacyjnego, takiego jak rak.

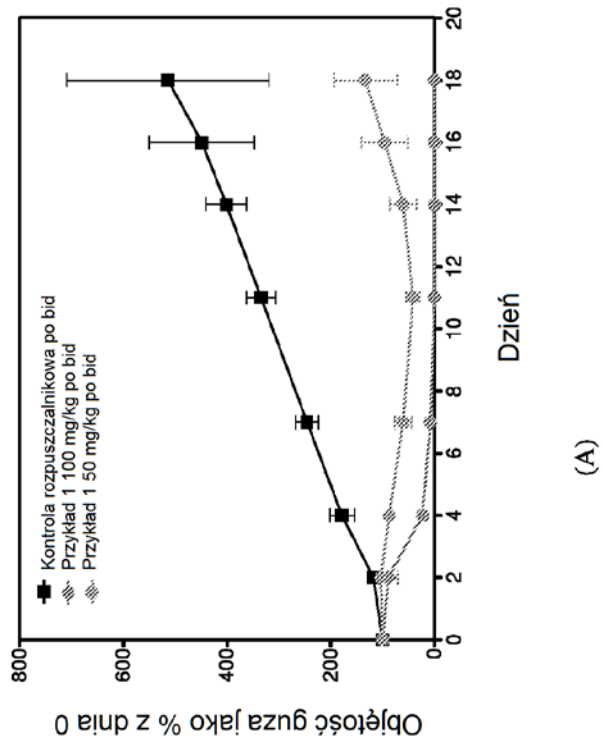
10. Związek do zastosowania według zastrz. 9, lub jego farmaceutycznie dopuszczalna sól lub solwat, przy czym zaburzeniem proliferacyjnym jest ostra białaczka szpikowa.

**The Institute of Cancer Research: Royal Cancer Hospital, Wielka Brytania**

**Pełnomocnik:**

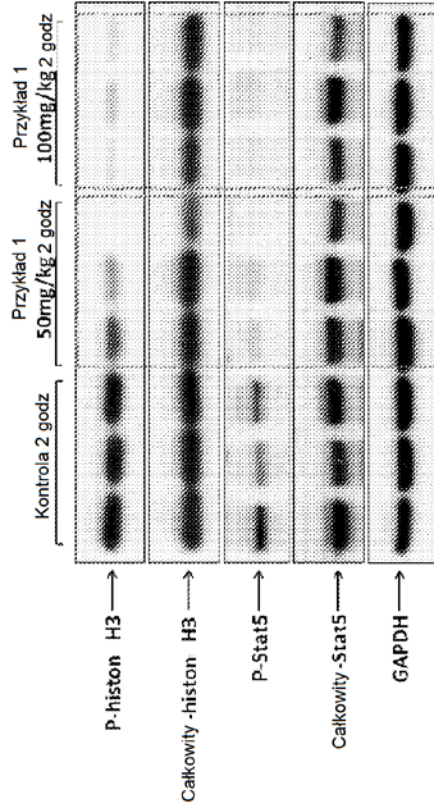


(B)

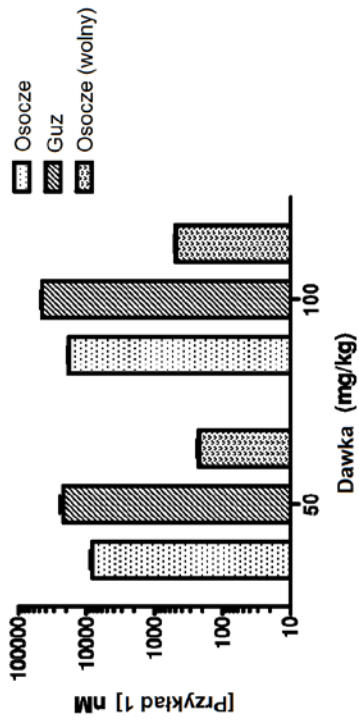


(A)

Fig. 1



(B)



(A)

Fig. 2