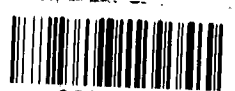




Organización y
Ejecución CSA Ltda

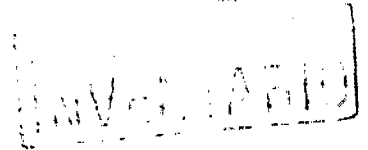


CSA125854

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PCT



Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuev

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-108728- -00000-0000

Fecha: 2010-09-02 16:45:51

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 183

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

10-108728

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

FORMA CRISTALINA DE DERIVADO DE FENILAMINO PIRIMIDINA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

NATCO PHARMA LIMITED

DOMICILIO

ANDHRA PRADESH, INDIA

74. APODERADO

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C.,

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-108728- -00000-0000

Fecha: 2010-09-02 16:45:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 183**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL****SOLICITUD DE:**

1

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☒ Capítulo I.☐ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**Nombre: **NATCO PHARMA LIMITED**
Sociedad constituida y existente bajo las
leyes de India.Dirección: Natco House,
Road No. 2,
Banjara Hills, Hyderabad,
Andhra Pradesh 50003-3,
IndiaDomicilio: Andhra Pradesh,
India**IDENTIFICACIÓN**

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.**IDENTIFICACIÓN**

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 35.456.344T.P 23.555

4

**INVENTOR (ES)
(72)****1. Amala Kishan KOMPELLA**
Natco Pharma Limited,
"natco House", Road No. 2,
Banjara Hills, Hyderabad,
Andhra Pradesh 50003-3,
India**3. Bhujanga Rao ADIBHATLA KALISATYA**
Natco Pharma Limited,
"natco House", Road No. 2,
Banjara Hills, Hyderabad,
Andhra Pradesh 50003-3,
India**2. Sreenivas RACHAKONDA**
Natco Pharma Limited,
"natco" House" Road No.2
Banjara Hills, Hyderabad,
Andhra Pradesh 50003-3,
India**4. Nannapaneni VENKAIAH CHOWDARY**
Natco Pharma Limited,
"natco House", Road No. 2,
Banjara Hills, Hyderabad,
Andhra Pradesh 50003-3,
India

5

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/IB2009/005421Fecha: 02 de marzo de 2009Publicación Internacional No. WO 2009/109867 A3Fecha: 11 de septiembre de 2009

6

Título (54)**FORMA CRISTALINA DE DERIVADO DE FENILAMINO PIRIMIDINA**

7

Clasificación Internacional (51) C07D 401/004 A61P 35/02, A61K 31/506

8

PrioridadSI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US
US

(32) Fecha

04 de marzo de 2008
04 de marzo de 2008

(31) Número de Solicitud

12/042.235
12/042.247

9

Comprobante de pago No.: 10-67,887**Fecha:** 18 de agosto de 2010**Comprobante de pago No.:** 10-65,125**Fecha:** 09 de agosto de 2010**Comprobante de pago No.:** 10-67,819**Fecha:** 18 de agosto de 2010**Comprobante de pago No.:** 10-69,572**Fecha:** 23 de agosto de 2010**Comprobante de pago No.:** 10-69,573**Fecha:** 23 de agosto de 2010

10

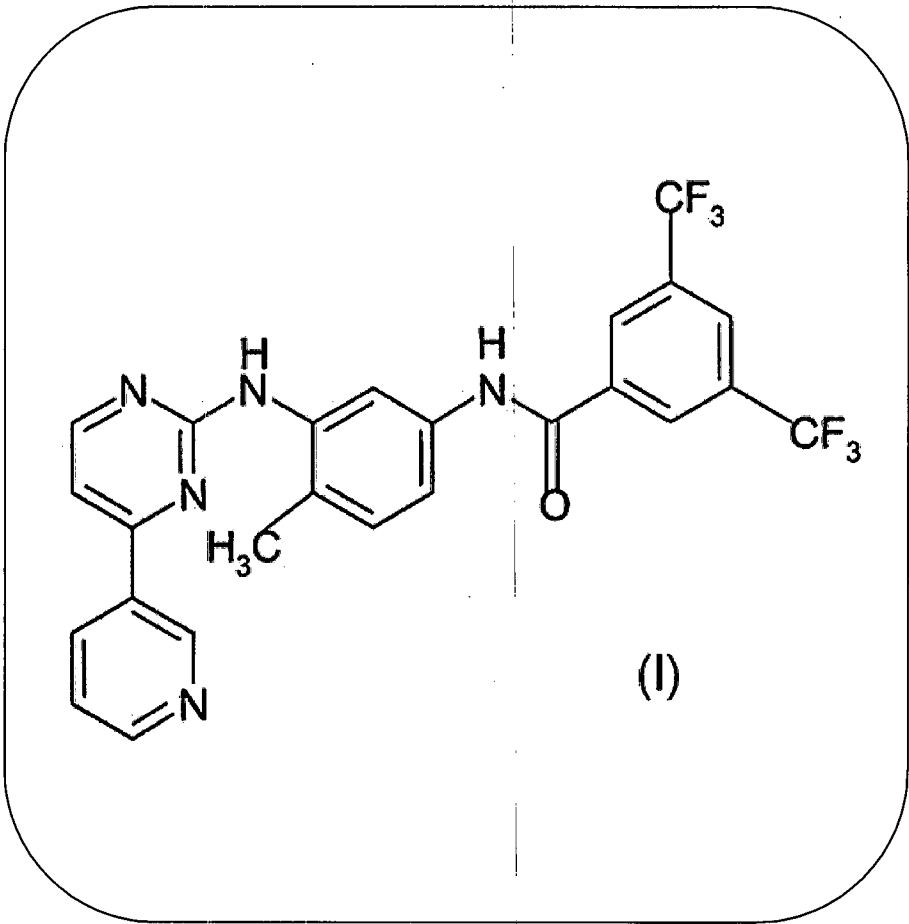
Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 554.000.oo.
- ☒ Comprobante de pago por 10 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$260.000.oo.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

3

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA :

Luz Clemencia de Paez
C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

SCT

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2009/109867 A3

Descripción:

Páginas 35 en el idioma original

Páginas 61 en español

Reivindicaciones: Número (s) 20

Figuras: Número (s) 23

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210**. Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

(43) International Publication Date
11 September 2009 (11.09.2009)



(10) International Publication Number
WO 2009/109867 A3

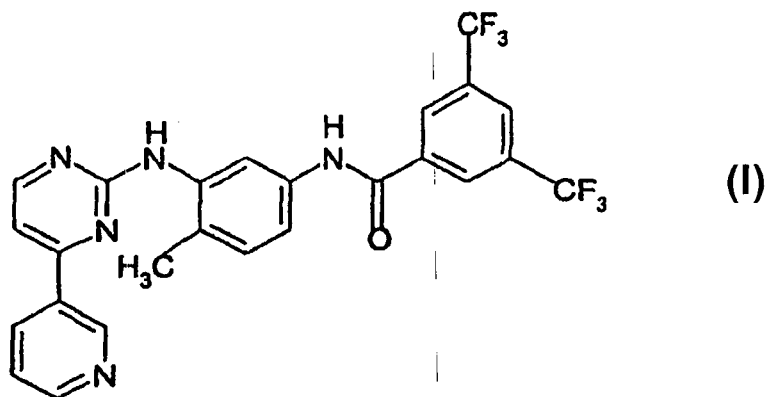
- (51) International Patent Classification:
C07D 401/04 (2006.01) *A61P 35/02* (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/IB2009/005421
- (22) International Filing Date:
2 March 2009 (02.03.2009)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
12/042,235 4 March 2008 (04.03.2008) US
12/042,247 4 March 2008 (04.03.2008) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **NATCO PHARMA LIMITED** [IN/IN]; Natco House, Road No. 2, Banjara Hills, Hyderabad, Andhra Pradesh 50003-3 (IN).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **KOMPELLA, Amala, Kishan** [IN/IN]; Natco Pharma Limited, "natco House", road No. 2, Banjara Hills, Hyderabad, Andhra Pradesh 500033 (IN). **RACHAKONDA, Sreenivas** [IN/IN]; Natco Pharma Limited, "natco House", Road No.2, Banjara Hills, Hyderabad, Andhra Pradesh 500033 (IN). **ADIBHATLA KALISATYA, Bhujanga, Rao** [IN/IN]; Natco Pharma Limited, "natco House", Road No. 2, Banjara Hills, Hyderabad, Andhra Pradesh 500033 (IN). **VENKAIAH CHOWDARY, Nannapaneni** [IN/IN]; Natco Pharma Limited, "natco House", Road No.2, Banjara Hills, Hyderabad, Andhra Pradesh 500033 (IN).

- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))
- (88) Date of publication of the international search report:
17 December 2009

(54) Title: CRYSTAL FORM OF PHENYLAMINO PYRIMIDINE DERIVATIVE



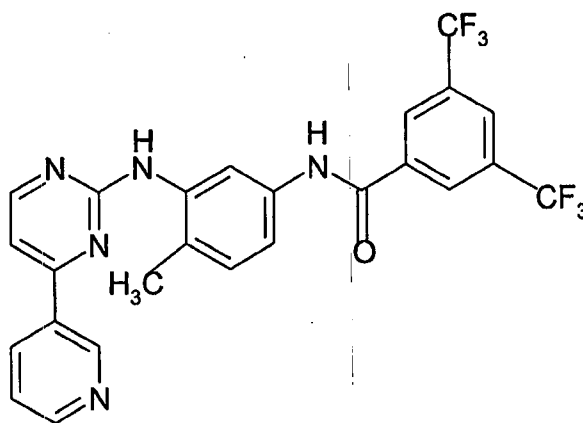
(57) Abstract: The present invention relates to a particular form of the (3,5-bis trifluoromethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3-yl-pyrimidin-2-ylamino)-phenyl]-benzamide (formula I), processes for the preparation thereof, pharmaceutical compositions containing this crystal form, and their use as anti tumor agent in humans. The compound of formula I, also known as AN- 019, is: Formula I (I)

CRYSTAL FORM OF PHENYLAMINO PYRIMIDINE DERIVATIVES

This application is being filed on 02 March 2009, as a PCT International Patent application in the name of Natco Pharma Limited, an Indian national corporation, applicant for the designation of all countries except the U.S., and Amala kishan Kompella, a citizen of India, Bhujana Rao Adibhatla Kali Satya, a citizen of India, Sreenivas Rachakonda, a citizen of India, and Nannapaneni Venkaiah Chowdary, a citizen of India, applicants for the designation of the U.S. only, and claims priority to U.S. Utility Patent Application Serial No. 12/042,247 filed on 04 March 2008 and U.S. Utility Patent Application Serial No. 12/042,235 filed on 04 March 2008.

Field of the Invention

The present invention relates to a particular form of the (3,5-bis trifluoromethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3-yl-pyrimidin-2-ylamino)-phenyl]-benzamide (formula I), processes for the preparation thereof, pharmaceutical compositions containing this crystal form, and their use as anti tumor agent in humans. The compound of formula I, also known as AN-019, is:



Formula I
Development code: AN-019

Background of the Invention

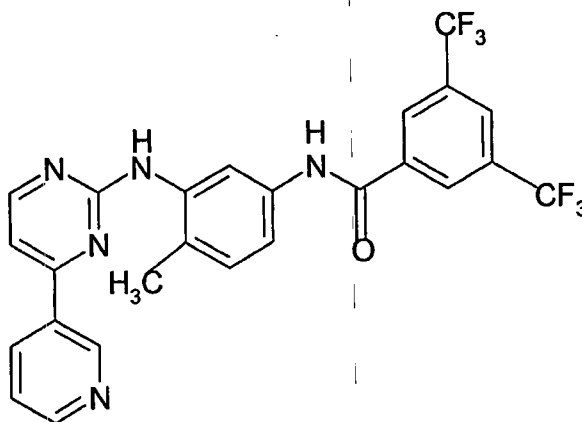
The preparation of (3,5-bis trifluoromethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3-yl-pyrimidin-2-ylamino)-phenyl]-benzamide of formula I, and the use thereof, especially as an anti-tumour agent, are described in Examples 3 and 4 of WO2006/027795 (PCT/IN05/00243 filed July 19, 2005) which was published on 16 March 2006, and in corresponding

applications in numerous other countries including USA (Pub. No.: US 2007/0232633). In these publications polymorphism is not discussed.

It has now been surprisingly found that under certain conditions a new polymorphic form of the compound of formula I is formed, which is described hereinafter as Form-III crystal form, and it has advantageous properties.

Summary of the Invention

The present invention relates to a particular form of the (3,5-bis trifluoromethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3yl-pyrimidin-2ylamino)-phenyl]-benzamide (formula I), processes for the preparation thereof, pharmaceutical compositions containing this crystal form, and their use as anti tumor agent in humans. The compound of formula I, also known as AN-019, is:



15

In an embodiment, the present invention relates to a Form-III crystal form of (3,5-bis trifluoromethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3yl-pyrimidin-2ylamino)-phenyl]-benzamide (formula I), wherein the Form-III crystal form has the XRPD characteristics listed in Table 3, below. This crystal form can have a melting point at or above 240 °C. The crystal form can be essentially pure.

In an embodiment, the present invention relates to a method of treating a subject in need of anti-proliferative therapy. This embodiment of the method can include administering to the subject a Form-III crystal form of (3,5-bis trifluoromethyl)-N-[4-methyl-3-(4-

25

pyridin-3yl-pyrimidin-2ylamino)-phenyl]-benzamide (formula I), wherein the Form-III crystal form has the XRPD characteristics listed in Table 3, below.

5 The present invention also relates to a pharmaceutical composition. The pharmaceutical composition includes a pharmaceutically acceptable excipient and a Form-III crystal form of (3,5-bis trifluoromethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3yl-pyrimidin-2ylamino)-phenyl]-benzamide (formula I), wherein the Form-III crystal form has the XRPD characteristics listed in Table 3, below.

10 The present invention also relates to a use of a Form-III crystal form of (3,5-bis trifluoromethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3yl-pyrimidin-2ylamino)-phenyl]-benzamide (formula I), wherein the Form-III crystal form has the XRPD characteristics listed in Table 1 below for producing an anti-proliferative medicament for treating a tumor disorder.

15 The present invention relates to a process for preparing a Form-III crystal form of (3,5-bis trifluoromethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3yl-pyrimidin-2ylamino)-phenyl]-benzamide (formula I), wherein the Form-III crystal form has the XRPD characteristics listed in Table 3, below. This process includes treating the compound of formula I in a Form-I or
20 Form-II crystal form with acetic acid or a mixture of dimethyl formamide and acetone, hexane, or toluene. This process can also include subsequently treating the once treated compound with acetic acid, acetone, hexane, or toluene.

In another aspect, the present invention relates to a Form-I crystal form of (3,5-bis trifluoromethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3yl-pyrimidin-2ylamino)-phenyl]-benzamide
25 (formula I), wherein the Form-I crystal form has the XRPD characteristics listed in Table 1, below.

In another aspect, the present invention relates to a Form-II crystal form of (3,5-bis trifluoromethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3yl-pyrimidin-2ylamino)-phenyl]-benzamide
30 (formula I), wherein the Form-II crystal form has the XRPD characteristics listed in Table 2, below.

9

Brief Description of the Figures

FIG. 1 shows the X-ray diffraction(XRD) diagram of the Form-I crystal form of the compound of formula I. The 2θ values and intensities are tabulated in Table 1.

- 5 FIG. 2 shows the X-ray diffraction (XRD) diagram of the Form-II crystal form of the compound of formula I. The 2θ values and intensities are tabulated in Table 2.

FIG. 3 shows the X-ray diffraction (XRD) diagram of the Form-III crystal form of the compound of formula I. The 2θ values and intensities are tabulated in Table 3.

10

FIG. 4 shows a differential scanning calorimetry (DSC) thermogram of Form-I crystal form of the compound of formula I.

- 15 FIG. 5 shows a differential scanning calorimetry (DSC) thermogram of Form-II crystal form of the compound of formula I.

FIG. 6 shows a differential scanning calorimetry(DSC) thermogram of Form-III crystal form of the compound of formula I.

- 20 FIG. 7 shows morphology of Form-I crystal form of the compound of formula I.

FIG. 8 shows morphology of Form-II crystal form of the compound of formula I.

- 25 FIG. 9 shows morphology of Form-III crystal form of the compound of formula I.

25

- FIGs. 10A and 10B illustrate that intraperitoneal injections of the compound of formula I (Example 1) caused regression of leukemia in nude mice. Tail vein drawn blood smears revealed an increase in LGI in controls and a progressive decrease in LGI in Imatinib-and AN019-treated mice (Fig. 10A). On day 48 LGI of Imatinib-treated mice was determined
- 30 to be 20 ± 5 , whereas LGI of AN019-treated mice was found to be 10 ± 2 with an almost normal cell count (Fig. 10B).

FIG. 11 illustrates that AN019-treated cells did not show any splenic enlargement whereas Imatinib-treated mice showed splenic enlargement (Example 2).

FIG. 12 illustrates that AN019 concentration at 1mg/kg did not induce a decrease in
5 luciferase expression, whereas 5mg/kg caused fixation of leukemia cells at constant expression levels, and 10 and 20 mg/kg concentrations caused a decrease in luciferase expression.

FIG. 13 illustrates that oral administration of Imatinib (1, 5, 10 and 20mg/kg) in nude
10 mice implanted with K562 luc human leukemia cells resulted in leukemia regression at higher concentrations. Imatinib administration at 1mg/kg concentration did not induce a decrease in luciferase expression, whereas 10mg/kg and 20mg/kg did show a retardation of luciferase expression.

15 FIGs. 14A, 14B, and 14C. These figures illustrate the results of studies analogous to those illustrated in Figures 12 and 13 but employing the control drug Dasatinib (Example 16).

FIGs. 15 and 16. *In vitro* matrigel invasion assay of 4910, 5310 and U87 glioma cells and
20 MDAMB231 and ZR71 breast cancer cells in the presence of specified concentrations of AN-019, AN-024, with and without radiation.

FIG. 17. *In vitro* angiogenic assay of 4910, 5310 and U87 glioma cells and MDAMB231
25 and ZR71 breast cancer cells in the presence of specified concentrations of AN-019, AN-024, with and without radiation.

FIG. 18. Western blot analysis of 4910, 5310 and U87 glioma cells and MDAMB231 and
ZR71 breast cancer cells in the presence of specified concentrations of AN-019, AN-024,
with and without radiation.

30 FIG. 19. Luciferase expression of K562luc implanted mice after treatment with AN024, AN019 or imatinib.

FIG. 20. Number of animals cured after treatment with AN024 or AN019 at day 58. Drug treatment was stopped at day 42, animals continued to show curative effect after treatment with AN024 and AN019 after withdrawal of drug treatment (Data based on luminescence).

5

FIG. 21. Blast cell count from blood smears taken from animals at the day indicated. Drug treatment was withdrawn on day 42. AN024 and AN019 showed effectiveness after withdrawal of drug treatment. Imatinib was found to be ineffective.

10

FIG. 22. Semiquantitative analysis of intracranial tumours in nude mice after treatment with TMZ, AN024 or AN019 with or without radiation (5Gly).

FIG. 23. Graphical representations of nude mice showing absence of intracranial tumours after drug treatment with AN-019, AN-024 and without radiation treatments.

15

Detailed Description of the Invention

Table 1 shows 2θ values and intensities of the Form-I crystal form of the compound of formula I from the X-ray diffraction (XRD) diagram of FIG. 1.

20

Table 1 (Form-I)

Angle [2-Theta]	d-value Angstrom	Intensity %
6.793	13.00131	13.9
9.823	8.99680	3.9
11.106	7.96069	54.2
13.267	6.66829	48.5
16.386	5.40523	7.0
17.941	4.94015	11.3
18.997	4.66785	13.0
19.778	4.48530	50,5
21.894	4.05635	100.0
22.396	3.96650	20.5
23.469	3.78750	19.7
24.466	3.63545	32.4
24.939	3.56759	52.6
25.525	3.48695	14.6
26.968	3.30351	10.3
28.777	3.09991	22.0
30.545	2.92436	14.8

Angle [2-Theta]	d-value Angstrom	Intensity %
33.011	2.71129	11.0

Table 2 shows 2θ values and intensities of the Form-II crystal form of the compound of formula I from the X-ray diffraction (XRD) diagram of FIG. 2.

5

Table 2 (Form-II)

Angle [2-Theta]	d-value Angstrom	Intensity %
6.500	13.58651	12.2
10.816	8.17295	100.0
12.094	7.31197	3.4
12.988	6.81061	49.7
16.120	5.49381	6.0
17.669	5.01562	10.9
19.521	4.54367	41.7
21.675	4.09687	39.9
22.083	4.02198	17.1
23.230	3.82602	21.9
24.264	3.66523	17.8
24.639	3.61023	8.5
28.460	3.13371	4.8
29.328	3.04290	2.3
30.256	2.95165	4.1
32.746	2.73261	3.5
34.035	2.63201	3.1
35.590	2.52050	1.5
39.660	2.27072	1.9
42.123	2.14346	2.5
44.193	2.04777	1.7

Table 3 shows 2θ values and intensities of the Form-III crystal form of the compound of formula I from the X-ray diffraction (XRD) diagram of FIG. 3.

10

Table 3 (Form-III)

Angle [2-Theta]	d-value Angstrom	Intensity %
5.909	14.94417	24.9
6.491	13.60517	66.4
8.267	10.68690	100.0
11.854	7.45967	58.2
13.181	6.71147	40.0
14.609	6.05866	50.0
15.960	5.54851	5.8

Angle [2-Theta]	d-value Angstrom	Intensity %
16.612	5.33224	9.5
18.826	4.70995	14.4
19.571	4.53226	52.1
21.302	4.16774	54.0
21.612	4.10861	37.7
22.160	4.00828	3.5
22.970	3.86869	23.8
23.278	3.81812	51.6
24.000	3.70491	8.7
25.112	3.54329	11.1
25.887	3.43895	3.1
26.500	3.36079	3.3
27.517	3.23887	3.4
29.476	3.02788	6.8
29.857	2.99011	8.6
30.474	2.93102	3.5
32.886	2.72133	3.2
33.559	2.66829	5.0
35.916	2.49836	3.8
39.645	2.27157	4.9
43.061	2.09893	2.6
43.748	2.06753	3.8
44.055	2.05383	3.9

The Form-III crystal form of the compound of formula I is characterized by needle-shaped crystals. The Form-I and Form-II crystal forms of the compound of formula I are characterized by non-needle shaped crystals

5

The Form-I and Form-II crystal forms of the compound of formula I are metastable at room temperature. However, the Form-III crystal form of the compound of formula I is the thermodynamically stable form at room temperature. This is indicative of the greater stability of the Form-III crystal form.

10

Accordingly, in an embodiment the present invention provides a Form-III crystalline form of the compound of formula I which is stable at room temperature and even at higher temperatures (e.g., 120 °C) and accelerated stress conditions, and having the characteristics given in Table 3 (above).

15

In an embodiment, the present invention provides a process for the preparation of Form-III crystal form of the compound of formula I which is stable and has the characteristics given in Table 3.

- 5 Table 4 shows the heat stability of Form-III crystal form at temperatures of 110-140°C. The Form-III was shown to be non-metastable and stable when heated at 130°C for 6 hours.

10 Pure Form-III crystal form (1 gm) prepared by the present process was placed in a boiling tube and heated gradually in oil bath. Then the substance was examined by XRPD. The results are tabulated in Table 4.

Table 4

Polymorph content* before heating	Temperature	Time of heating (hours)	Polymorph form detected* after heating
Form-III	110°C	6	Form-III
Form-III	120°C	6	Form-III
Form-III	130°C	6	Form-III

* The presence of form-I and Form-II was below the detection level in these examples.

- 15 This data demonstrates that the Form-III crystal form was not metastable. The Form-III crystal form was stable to heat even at 130°C for 6 hours.

Table 5 shows the stability of Form-III crystal form under accelerated stress conditions (45±2°C, 75 ±5% RH, 6 months) in the bulk and capsule formulation.

20

Table 5 - Stability of Form-III crystal form in bulk and formulated capsule

Polymorph content* of Formula I in formulated capsule	Polymorph content* of bulk compound of formula I	Duration of storage (months) at 40±2°C / 75 ±5% RH
Polymorph form detected	Polymorph form detected	
Form-III	Form-III	0 Month
Form-III	Form-III	1 Month
Form-III	Form-III	2 Months
Form-III	Form-III	3 Months
Form-III	Form-III	6 Months

* The presence of form-I and form-II was below the detection level in these examples.

This data demonstrates that form-III is not converted to other forms over a time period. The stability of form III in bulk and in the formulated capsule was thus established.

In an embodiment, the present invention provides a pharmaceutical composition useful
5 for the tumor therapy containing the stable Form-III crystal form of the compound of formula I.

The dosage form of the formulation containing the stable Form-III crystal form, which
10 can be prepared by the process of the present invention, for example, an oral dosage form, may be a capsule containing the composition, e.g., a powdered or granulated solid composition, within either a hard or soft shell. The shell may be made from gelatin that optionally contains a plasticizer, such as glycerin or sorbitol, and an opacifying agent or colorant.

15 Methods known in the art may be used to prepare the pharmaceutical composition containing Form-III crystal form in the form of capsules. The excipients which may be employed include micro crystalline cellulose, poloxamer 407, crospovidone XL, Aerosil, SLS, magnesium stearate, or mixture thereof.

20 Table-6 shows suitable amounts of active ingredients and excipients (weight %) for the present pharmaceutical formulations.

Table 6 – An embodiment of a pharmaceutical composition containing the Form-III crystal form

S. No.	Material	composition (w/w) mg/capsule
1.	Compound of Formula I, Form-III	25.0
2.	Micro crystalline cellulose	8.0
3.	Poloxamer 407	12.5
4.	Crospovidone XL	12.5
5.	Magnesium stearate	0.5
6.	SLS	4.0
7.	Aerosil	0.25

25

In an embodiment, the invention relates to a particular, essentially pure Form-III crystal form of (3,5-bis trifluoromethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3-yl-pyrimidin-2-ylamino)-phenyl]-benzamide (formula I). The term "essentially pure" is understood in the context of the present invention to mean that about 90 to 100 wt-%, about 95 to 100 wt-%, or, for example, about 99 to 100 wt-% of the crystals of formula I are present in the crystal form according to the invention, e.g., the Form-III crystal form.

In the context of stating that the Form-III crystal form of formula I exhibits an X-ray diffraction diagram essentially as in FIG. 3, the term "essentially" means that at least the major lines of the diagram depicted in FIG. 3, i.e. those having a relative line intensity of more than 10%, especially more than 20%, as compared to the most intense line in the diagram, are present.

The crystal forms have the following properties:

The melting point in the DSC thermogram of the Form-III crystal form is 246.7°C. The melting point in the DSC thermogram of the Form-I crystal form is 234°C and Form-II crystal form is 240.47°C, 249.2°C (peak).

The X-ray diffraction diagrams also show other marked differences. In an embodiment, the essentially pure Form-III crystal form of the compound of formula I shows the X-ray diffraction diagram indicated in FIG. 3.

In an embodiment, the invention relates to the Form-III crystal form of the compound of formula I which is characterised by the presence of crystals displaying the form shown in FIG. 9, for example, the Form-III crystal form in essentially pure form.

In an embodiment, the Form-III crystal form of the compound of formula I has a melting point of higher than 240 °C, e.g., between 245 and 250 °C.

The (for example, essentially pure) Form-III crystal form is obtainable by the following method: Treating another crystal form, e.g., the Form-I or Form-II crystal form, of the compound of formula I, with a suitable polar solvent, e.g., N,N-di-lower alkyl-lower alkanecarboxamide, such as N,N-dimethylformamide or N,N-dimethylacetamide, or, e.g.,

an aliphatic carboxylic acid such as acetic acid, or a mixture of the above with a ketone, such as acetone, or a hydrophobic hydrocarbon, e.g., toluene or hexane, or a mixture thereof, at a suitable temperature.

- 5 In an embodiment, the compound of formula I is treated with a mixture of dimethyl formamide and acetone followed by treatment in acetone. In an embodiment, the compound of formula I is treated with a mixture of dimethyl formamide and hexane followed by treatment in hexane. In an embodiment, the compound of formula I is treated with a mixture of dimethyl formamide and toluene followed by treatment in toluene. In an embodiment, the compound of formula I is treated one or more times with acetic acid. In this context, treating or treatment refers to heating, cooling, refluxing, washing, suspending, or the like in the solvent or mixture of solvents. These embodiments each yield the Form-III crystal form of the compound of formula I.
- 10
- 15 In certain embodiments, the present method of producing the Form-III crystal form of does not include treating another crystal form of the compound of formula I with chloroform, methanol, dichloromethane, ether (e.g., diethyl ether), water, ethyl acetate, or mixture thereof. In certain embodiments, the Form-III crystal form was not produced by treating another crystal form of the compound of formula I with chloroform, methanol, dichloromethane, ether (e.g., diethyl ether), water, ethyl acetate, or mixture thereof.
- 20

Form-III crystal form of the compound of formula I as well as other forms possess useful pharmacological properties and may, for example, be used as anti-tumour agents.

- 25 The present invention also includes a method of preparing compound of formula I. This method can include:
 - providing a compound of formula VI, 3,5-bis trifluoro methyl benzoyl chloride; or preparing this compound by known methods;
 - condensing 4-methyl-3-nitro-aniline with the compound of formula (IV) at about
- 30 0 to about -10 °C in chlorohydrocarbon solvent with addition of a basic compound to obtain a compound of formula III, ((3,5-bis trifluoromethyl)-N-(4-methyl-3-nitrophenyl)-)-benzamide;

reducing the compound of formula (III) with stannous chloride/conc. HCl at reflux temperature for about 0.5 to about 1 hour to obtain a compound of formula IV, (3,5-bis-trifluoromethyl)-N-(3-amino-4-methylphenyl)-benzamide;

condensing the compound of formula IV with aqueous cyanamide at reflux
5 temperature in n-butanol solvent to obtain a compound of formula V, (3,5-bis-trifluoromethyl)-N-(3-guanidino-4-methylphenyl)-benzamide;

condensing the compound of formula (V) with 3-dimethylamino-1-pyridin-3-yl-propenone in presence of base at reflux temperature to obtain the compound of formula (I).

10 In an embodiment, the method is accomplished as described in Example 10.

The disclosures of U.S. Patent Application No. 11/714,565, filed March 5, 2007 (U.S. Publication No. US 2007/0232633, published on October 4, 2007) and of PCT Application No. PCT/IN 2005/000243, filed July 19, 2005 (PCT Publication No.
15 WO2006/027795, published on March 16, 2006) are incorporated by reference herein in their entirety.

Embodiments of the present invention are described in the examples given below, which are provided to illustrate the invention only and therefore they should not be construed to
20 limit the scope of the invention.

Examples

General Note

The principal compound of this invention of formula I (Indicated by development code
25 AN-019) is found to exhibit useful anti-tumor activity superior to some of the existing approved drugs of this class. This compound is found to exhibit in three distinct polymorphic forms I, II and III as discussed above. Although all the forms exhibit valuable pharmacological properties and may be used as anti-tumor agents Form III was chosen for the biological activity evaluation based on its thermodynamic stability. The
30 development code AN-024 refers to another compound of the same class described elsewhere by the inventors. The bio-efficacy and activity of the compounds of this invention have been compared with the approved drugs like Imatinib mesylate and Dasatinib to serve as positive controls in this study. 'Imatinib mesylate' has been abbreviated and referred to as 'Imatinib' in this study.

19

Example 1 - Establishment of Anti-CML Activity of AN-019 in Nude Mice**Implanted With k562 cells (Figures 10A and 10B)**

To determine anti-CML activity of compounds of this invention K562 cells were obtained from ATCC and nude mice were implanted with these cells. As control, Imatinib was used at the same concentration per kg body weight for comparison. Drug treatment was initiated 15 days post implantation and for 48 days with daily ip injections of 10mg/kg. Blood was drawn from the tail vein every 6th day, percent K562 cells determined and percent leukemia growth index (LGI) calculated.

10

AN019-treated mice showed a steady decline in LGI after initiation of drug treatment. LGI for Imatinib-treated mice also showed a decline but significantly lagged AN019 treated mice. Forty-eight days after continuous ip injections, AN019-treated mice were comparable to normal control mice, and Imatinib-treated mice showed an LGI of 20 ± 5 when compared to controls. Spleen immunohistochemistry for Crk protein revealed localization of K562 cells in the spleen in control mice. AN019-treated mice showed basal levels of Crk expression, whereas Imatinib treated mice showed few colonies with low to undetectable expression levels of Crk.

20 Methods**K562 implantation**

Nude mice (nu/nu) were implanted with K562 cells (1×10^6) via tail vein. Four mice were used per group and divided into 4 groups. Three groups were implanted with K562 cells and one group was used as normal controls. Group 2 was inoculated with K562 cells and served as untreated positive controls. Two other groups implanted with K562 cells were treated with either Imatinib or AN019.

25

IP injection of AN019 and Imatinib

K562 implanted mice were treated with either Imatinib or AN019 (10mg/Kg body wt) via intraperitoneal injections. Stock solutions of Imatinib and AN019 were made at a concentration of $100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ in DMSO. Mice were injected via an intraperitoneal route at the above-mentioned dosage. Average weight of nude mice was determined to be $30 \pm 3\text{g}$, and the dosage per mouse was calculated to be $300 \pm 30 \mu\text{g}/\text{mouse}$. Three micro liters of the stock solutions was diluted to $100 \mu\text{l}$ with sterile water just prior to ip injections. Ip

30

injections were carried out daily from day 15 post implantation to day 48 with a total of 33 injections.

Determination of leukemia growth index (LGI)

5 Leukemia growth index was determined using the formula $LGI (\%) = (V_c - V_t) / V_c \times 100\%$. V_c is mean blast cell number (K562) per ml of blood in control animals at a certain time of measurement, and V_t is mean blast cell number per ml of blood in test animals at a certain time of measurement. Blood was drawn from the mice (treated and untreated) on the sixth day post-K562 cell implantation and followed by an every six-day interval for
10 48 days. Blood was drawn via the tail vein. Quantitative analysis of LGI was graphically represented.

Immunocytochemistry

Control mice were sacrificed on day 42 when secondary leukemia symptoms were
15 observed, such as abdominal swelling and lack of circulation in the peripherals causing loss of digits with red spots under the skin surface. Spleen and any secondary tumors were harvested, fixed in formaldehyde and paraffin embedded as per standard protocols. Paraffin section were obtained and processed for immunocytochemistry. The rehydrated sections were treated with 0.3% H_2O_2 to inactivate any native peroxidases prior to
20 immuno-probing. The sections were blocked with filter sterilized (0.22 μ m) 1% BSA-PBS at room temperature for 1h. Following blocking, the sections were immuno-probed with a human specific anti-Crk monoclonal primary antibody raised in rabbit against a synthetic peptide corresponding to residues in the SH2 domain, near the N-term of human CrkL protein (Abcam, Cambridge, MA, USA) in 1%BSA-PBS overnight. Secondary
25 antibody (anti-rabbit) conjugated to HRP was used to detect the presence of primary antibody. The sections were briefly rinsed three times in PBS solution after immuno-probing with secondary antibody, and DAB HRP substrate was added per manufacture's instructions (Sigma St Louis MO USA). The reaction was allowed to proceed until sharp contrast between positive and negative controls was observed. For negative controls
30 primary antibody were eliminated. Leukemic mice spleen served as positive controls.

Results

Intraperitoneal injections of AN019 caused regression of leukemia in nude mice. Blood smears taken every sixth day post-implantation indicated an increase in LGI in controls

when compared to untreated mice. Tail vein drawn blood smears revealed an increase in LGI in controls and a progressive decrease in LGI in Imatinib-and AN019-treated mice (Fig. 10A). From the fifteenth day post-implantation, mice were given intraperitoneal injections of AN019 or Imatinib at a dosage of 10mg/kg body weight. Imatinib-treated mice lagged AN019-treated mice at every data point. On day 48 LGI of Imatinib-treated mice was determined to be 20 ± 5 , whereas LGI of AN019-treated mice was found to be 10 ± 2 with an almost normal cell count (Fig. 10B).

Example 2 - AN019 Injections of Nude Mice Implanted With K562 Cells Did Not Show Splenic Enlargement and No Crk Expression (Figure-11)

Nude mice implanted with K562 cells were treated with Imatinib or AN019 via ip injections. Mice were sacrificed after a decrease in LGI was observed and spleen harvested. Splenic enlargement was observed by gross observation and it was determined that control mice showed enlarged spleen indicative of K562 cellular localization. AN019-treated cells did not show any splenic enlargement whereas Imatinib-treated mice showed slight splenic enlargement (Fig 11). Paraffin sections of spleen immuno-probed for the presence of Crk protein showed strong localization of Crk expression accompanied with increased cellular density indicative of K562 localization in control mice. Mice treated with AN019 showed only basal level expression of Crk expression comparable to negative control. Mice treated with Imatinib indicated localized expression regions of Crk expression, indicative of K562 cells in the spleen. Control mice also developed random subcutaneous tumors showing Crk expression, indicative of the presence of K562 cells.

From these results it is evident that AN019 treatment caused the regression of LGI in nude mice. Imatinib-treated mice also showed significant reduction in LGI but lagged AN019-treated mice. Both AN019-and Imatinib-treated mice showed no abnormal physiological, phenotypic or behavioral abnormality. Control mice showed the presence of random subcutaneous tumors with loss of digits accompanied with reddish spots under the skin and a slight enlargement of the abdomen. From these results, it is evident that AN019 provides a promising therapeutic drug for the treatment of leukemia.

Example 3 - In Vivo Studies Using Baf3 Imatinib Resistant Murine CML Cell Lines

To determine the *in vivo* anti-leukemic activity of AN019 and AN024, nude mice were

implanted intraperitoneally with Baf3 murine leukemia cells (Wt, T315I, M351T and E225K), and 15 days after implantation the mice were treated with Imatinib (10mg/kg), AN019 (20mg/kg) and AN024 (20mg/kg) by oral gavage or ip injections. Blood smears were obtained via the tail vein or via the femoral vein every 6th day and blast cells counted and graphically represented.

Blood smears of Baf3Wt implanted mice treated with Imatinib (10mg/kg), AN019 (20mg/kg) or AN024 (20mg/kg) were similar to normal controls after 42 days.

Blood smears of Baf3T315I implanted mice treated with Imatinib (10mg/kg), AN019 (20mg/kg) or AN024 (20mg/kg) showed a significant decrease in blast cell count in AN024 and AN019 treated mice. Mice treated with oral dosage of Imatinib did not show a decrease in blast cell count and were similar to untreated controls and Baf3M351T implanted mice.

Mice implanted with Baf3E255K also behaved similarly to Baf3M351T and Baf3T315I implanted mice.

Nude mice were implanted with Baf3 mutant cells Wt, E255K, T315I, and M351T were treated with Imatinib, AN019 and AN024 (orally and ip). Briefly, mice were treated with Imatinib (10mg/kg), AN019 (20mg/kg) and AN024 (20mg/kg) by oral gavage or ip injections 15 days post-implantation. Abdominal swelling and decrease in activity was monitored daily, blood smear taken via the tail vein or the femoral vein every 6th day and H&E stained as per standard protocols. 42 days after implantation, mice were sacrificed and spleens harvested. Splenic enlargement was determined and correlated with blood smear blast cell count.

Results

Microscopic determination of blast cell count

Blood from tail vein or the femoral vein was taken every 6th day from Baf3 cell implanted mice until day 42. On the 15th day post-implantation, the mice were given treatments with Imatinib, AN019 and AN024 (orally and ip) as described earlier. It was observed that in Baf3Wt implanted mice, progressive decrease in blast cell count was observed in all treatment conditions. Baf3M351T, T315I and E225K did not respond

well to Imatinib treatments. Oral administration of Imatinib had no significant effect in Baf3M351T, T315I and E225K implanted mice. Overall intraperitoneal treatments AN024 and AN019 were significantly better at decreasing blast cell count in all Baf3 implanted mice.

5

AN019 treatment in Baf3Wt implanted mice induced a complete regression of leukemic blast cells and was comparable to untreated controls. Intraperitoneal treatments were superior to oral treatments. AN019 treatment in Baf3 M351T, T315I and E225K implanted mice showed a significant decrease in blast cell count and was comparable to 12th day post-implant in ip-treated mice at day 42; ip-treated mice showed greater regression of blast cells than oral treated mice. AN024 treatment in Baf3 M351T, T315I and E225K implanted mice showed a significant decrease in blast cell count and was superior to AN019 treatment at day 42; ip-treated mice showed greater regression of blast cells than orally treated mice.

15

Example 4 - Response of nude mice implanted with k562 normal/luc human

leukemic cells with low dose of AN024, AN019 and Imatinib (Figures 12 & 13)

Nude mice (nu/nu) were implanted with K562 cells (1x10⁶) normal/luc via tail vein. Five mice were used per group and divided into 24 groups + 2 control. All groups were 20 implanted with K562 normal/luc cells. Of the 24 groups, 12 were used for luciferase studies whereas the other 12 were used for blood smear count studies.

Oral administration of AN019, AN024 and Imatinib

Drugs were administered by oral gavage (2% gum acacia and 2% SLS in an aqueous 25 suspension).

Results

Oral administration of AN019 (1, 5, 10 and 20mg/kg) in nude mice implanted with K562 luc human leukemia cells resulted in leukemia regression at higher concentrations. 30 AN019 concentration at 1mg/kg did not induce a decrease in luciferase expression, whereas 5mg/kg caused fixation of leukemia cells at constant expression levels, and 10 and 20 mg/kg concentrations caused a decrease in luciferase expression (Figure 12). Oral administration of Imatinib (1, 5, 10 and 20mg/kg) in nude mice implanted with K562 luc human leukemia cells resulted in leukemia regression at higher concentrations. Imatinib

administration at 1mg/kg concentration did not induce a decrease in luciferase expression, whereas 10mg/kg and 20mg/kg did show a retardation of luciferase expression (Figure 13).

- 5 The study shows the superiority of AN-019 over Imatinib in leukemic regression, particularly after 24 days of treatment.

Example 5 - Determination of Drug Effectiveness(D_e) and Drug Temporal Penetration

10 **Determination of drug effectiveness (D_e)**

Drug effectiveness was determined using the equation, D_e=

$$\left[\frac{\sum_{alive}}{\sum_{luc}} - \frac{\sum_{c\ alive}}{\sum_{c\ luc}} \right] \div \sum_{c-initial\ alive} \times 100$$

Where:

- 15 Σ_{alive} = total number of mice alive per concentration at the end of experiment times photon count, Σ_{luc} = total number of mice alive showing luciferase expression per concentration at end of experiment and c represents control untreated animals times photon count and $\Sigma_{c-initial}$ represents the initial number of animals in control at start of experiment times photon count. The results were represented graphically as percent drug effectiveness (Table 7).

20

Results

- 25 Table 7 shows the drug effectiveness at various concentrations of Imatinib, AN019 and AN024 as determined from the *in vivo* studies. From Table 7 it is evident that AN019 behaved in a dose dependent manner, whereas Imatinib and AN024 do not, and were effective at low concentrations.

Table 7

Drug	5mg/kg	10mg/kg	20mg/kg	40mg/kg
Imatinib D _e	10.00	32.00	13.33	8.00
AN019 D _e	25.82	78.20	83.40	85.20
AN024 D _e	30.00	85.00	87.00	90.00

Determination of drug temporal penetrance (T_p)

The temporal penetrance was calculated applying the following equation, $T_p =$.

$$\frac{\left(\frac{P}{n}\right)_a - \left(\frac{P}{n}\right)_{ter}}{\left(\frac{P}{n}\right)_a - \left(\frac{P}{n}\right)_b}$$

5

Where:

P=photon counts at day 'a', day 'ter', or day 'b' where 'a' is the day when drug treatment was stopped and 'ter' is the day when the experiment was terminated and 'b' is the day where P is minimum after day a but before day 'ter'.

10 n =number of animals alive when P was measured.

The larger the value indicates greater effectiveness of the drug after stopping drug treatment, i.e. the penetrance of the drug over time.

15 **Results**

To determine the temporal penetrance of AN019, AN024 and Imatinib, nude mice were implanted with K562luc cells. The animals were imaged at 6 day intervals post transplantation. Drug treatment (AN019 20mg/kg, AN024 20mg/kg and Imatinib 10mg/kg) was initiated 15 days post implantation by daily ip injections. Drug treatment
20 was stopped on day 35 and animals were imaged till day 45, and calculated as described in methods.

By applying the equation for temporal penetrance, T_p values were determined as:

25 AN019=2.0
AN024=2.4
Imatinib=0.8

These values of T_p indicate that AN024 had activity over untreated controls and fared better than AN019 for activity over time after withdrawal of drug treatment.

30 **Example 6 - Effect of Dasatinib on Baf3 Implanted Nude Mice When Compared to AN024, AN019 and Imatinib (Figures 14A, 14B, and 14C)**

Example 3 demonstrated the effectiveness of AN024 and AN019 in the treatment of leukemia when compared to Imatinib by using Baf3 (wt, T315I, M351T and E255K) mutant cell lines. Here, we have used Dasatinib as a control drug to determine the response of Baf3 mutant cells to treatment when compared to AN019, AN024 and Imatinib.

Method

The experimental layout is given in the tabular form as follows:

	Treatment ↓, cell line implanted →	Wt	T315I	M351T	E255K
Controls (previously done)					
Dasatinib (10mg/kg)	oral	5	5	5	5
	ip	5	5	5	5

Nude mice were intraperitoneally implanted with Baf3 mutant cells (wt, T315I, M351T or E255K). 15 days following implantation, the mice were treated either orally or intraperitoneally with 10mg/kg Dasatinib for 27 days. Blood was drawn from the femoral vein or tail vein every 6th day and blast cell count determined and graphically represented.

Results

On the 6th day, blood smears of nude mice implanted with Baf3 mutant cells (wt, T315I, M351T or E255K) showed normal blast cell count, and blast cell count progressively increased as observed on day 12. Dasatinib treatment was started on day 15 post implantation. Dasatinib treatments fared no better than Imatinib. On day 42, the termination of the experiment, mice implanted with wt cells showed significant response to Dasatinib, indicating that ip treatments were superior to oral. Mice implanted with T315I and M351T cells behaved similar to controls with no significant decrease in blast cell count. Mice implanted with E255K fared only a little better than T315I implanted cells in response to Dasatinib treatment. Overall Dastinib treatment only caused retardation in leukemic progress with no significant curative effect. Blast cell count was significantly lower in the group treated with AN019. These results are illustrated in

Figures 14A, 14B, and 14C.

Example 7 - *In vitro* Studies on Glioma and Breast Cell Lines (Figures 15-18)

Material and Methods

- 5 To determine the effect of AN019, AN024 and Temozolomide with or without radiation on glioma and breast cancer cells, cells were treated at the specified doses and determined invasion, angiogenesis and changes in certain signaling molecules.

Matrigel invasion assay

- 10 The *in vitro* invasiveness of 4910, 5310 and U87 glioma cells and MDAMB231 and ZR71 breast cancer cells in the presence of specified concentrations of compounds were assessed using a modified Boyden chamber assay. Cells were treated with these compounds for 48 h. 1×10^6 cells were suspended in $600 \mu\text{l}$ of serum-free medium supplemented with 0.2% BSA and placed in the upper compartment of the transwell
15 chambers (Corning Costar Fischer Scientific Cat #07-200-158, Pittsburgh PA) coated with Matrigel (0.7 mg/ml). The lower compartment of the chamber was filled with $200 \mu\text{l}$ of serum medium and the cells were allowed to migrate for 24 h. After incubation, the cells were fixed and stained with Hema-3 and quantified as previously described (Mohanam et al. 1993). The migrated cells were imaged microscopically to determine
20 the reduction in invasiveness induced by the compounds of this invention.

Angiogenic assay

- The *in vitro* angiogenesis of 4910, 5310 and U87 glioma cells and MDAMB231 and ZR71 breast cancer cells in the presence of specified concentrations of compounds were
25 determined as follows, cells (2×10^4 /well) were seeded in 8-well chamber slides and were treated with various concentrations of test compounds. After a 24 h incubation period, the conditioned media was removed and added to a 4×10^4 human dermal endothelial cell (monolayer in 8-well chamber slides) and the human dermal endothelial cells were allowed to grow for 72 h. Cells were then fixed in 3.7% formaldehyde and stained with
30 H&E and photographed.

Western blot analysis

Western blot analysis of 4910, 5310 and U87 glioma cells and MDAMB231 and ZR71 breast cancer cells in the presence of specified concentrations of compounds were

assessed as per standard protocols. Cells were treated with AN019, AN024 or Temozolomide at the specified concentrations. 24h after treatment, cells were collected and cell lysates extracted. Equal quantities of proteins were fractionated by SDS-PAGE. The fractionated proteins were blotted on to nylon membranes and immunoprobed for
5 AKT, ERK and Pi3k. Breast cancer cell protein isolates were additionally immunoprobed for EGFR, ErbB1, ErbB2 and ErbB3.

Results

Matrigel invasion assay

10 The *in vitro* invasiveness of 4910, 5310 and U87 glioma cells and MDAMB231 and ZR71 breast cancer cells in the presence of specified concentrations of compounds were assessed using a modified Boyden chamber assay. Cells were treated with these compounds for 48 h. Table 2 shows the results from the studies of *in vitro* matrigel invasion assay of 4910, 5310 and U87 glioma cells and MDAMB231 and ZR71 breast
15 cancer cells in the presence of specified concentrations of compounds, with and without radiation.

Change in the invasiveness of various cell lines is given in Table 8. From the invasion assay it is evident that AN019 and AN024 were the most effective at inhibiting invasion
20 in a majority of the cells, both with and without radiation.

Table 8

Cell line	Drug	-Radiation % Invasion	+Radiation % Invasion	± Change in invasion after radiation
ZR-71	Temozolomide	70%	65%	-5%
	AN024	48%	45%	-3%
	AN019	33%	19%	-14%
MDA-MB-231	Temozolomide	62%	49%	-13%
	AN024	43%	47%	+4%
	AN019	45%	15%	-30%
4910	Temozolomide	95%	73%	-22%
	AN024	56%	39%	-17%
	AN019	42%	15%	-27%
5310	Temozolomide	50%	63%	+13%
	AN024	27%	32%	+5%
	AN019	5%	6%	+1%
U87	Temozolomide	90%	93%	+3%
	AN024	53%	29%	-24%
	AN019	18%	18%	0%

5 Figures 15 and 16 illustrate the results of the *in vitro* matrigel invasion assay of 4910, 5310 and U87 glioma cells and MDAMB231 and ZR71 breast cancer cells in the presence of specified concentrations of AN-019, with and without radiation.

Angiogenic assay

10 From the angiogenesis assay experiments it is observed that AN019 was the most effective at inhibiting angiogenesis.

15 Temozolomide treatment caused complete inhibition of angiogenesis in ZR-71 cells, whereas in MDA-MB-231 cells only a slight inhibition was observed in control condition with an increase in inhibition after radiation. Glioma xenograft cells 4910 showed significant inhibition of angiogenesis both with and without radiation. In the case of 5310 cells inhibition of angiogenesis was seen in control conditions, whereas angiogenesis was promoted after radiation treatment. U87 glioma cells showed similar inhibition patterns

both with and without radiation.

AN024 treatment caused complete inhibition of angiogenesis in ZR-71 cells, whereas in MDA-MB-231 cells only a slight inhibition was observed in control and radiation treatments. Glioma xenograft cells 4910 showed significant inhibition of angiogenesis both with and without radiation. In the case of 5310 cells inhibition of angiogenesis was seen in control conditions, whereas angiogenesis further inhibited after radiation treatment. U87 glioma cells showed significant retardation in angiogenesis with an increase in inhibition after radiation.

10

AN019 treatment caused complete inhibition of angiogenesis in ZR-71 cells, whereas in MDA-MB-231 cells a slight inhibition was observed in both control and radiation treatments. Glioma xenograft cells 4910 showed inhibition of angiogenesis similar to MDA-MB-231 cells with an increase in angiogenic inhibition after radiation. In the case of 5310 cells inhibition of angiogenesis was greater in control conditions than after radiation treatment. U87 glioma cells showed similar significant retardation in angiogenesis both with and without radiation.

Figure 17 illustrates results obtained from the *in vitro* angiogenic assay of 4910, 5310 and U87 glioma cells and MDAMB231 and ZR71 breast cancer cells in the presence of specified concentrations of AN-019, with and without radiation.

20

Western blot analysis

Western blot analysis of 4910, 5310 and U87 glioma cells and MDAMB231 and ZR71 breast cancer cells in the presence of specified concentrations of compounds of this invention revealed that U87 cells did not show significant change in AKT or PI3k levels both with and without radiation, whereas a slight decrease in ERK levels was observed in AN024 treated cells and decrease was enhanced after radiation. 4910 cells behaved similar to U87 cells with a decrease in AKT levels in after AN024 treatment and the decrease in AKT levels was enhanced after radiation. In case of 5310 cells no significant observable difference was seen in ERK expression whereas AN019 treatment caused a decrease in AKT expression levels. Levels of PI3k were almost undetectable in AN019 treated cells without radiation but reappeared after radiation treatment. In case of breast cancer cells MDA-MB-231 no significant change in AKT, ERK or PI3k was observed,

30

whereas in case of ZR71 AN019 treatment caused a decrease in AKT levels, which was enhanced after radiation. AN024 treatment did not show any significant change under unirradiated conditions, whereas after radiation AN024 treated cells showed a decrease in AKT expression. PI3k levels were absent in AN019 treatments both with and without radiation. AN024 treatment caused decrease in PI3k levels after radiation. Levels of pAKT did not change significantly in any of the treatments with or without radiation, whereas levels of pERK reduced significantly especially in cell treated with AN019 both with and without radiation, AN024 also showed reduction on pERK levels but to a lesser extent than AN019. Temozolomide treatments both with and without radiation did not show any significant change in pAKT of perk levels.

Figure 18 illustrates the results of Western blot analysis of 4910, 5310 and U87 glioma cells and MDAMB231 and ZR71 breast cancer cells in the presence of specified concentrations of AN-024, with and without radiation.

15

Example 8 - Leukemic survival study (Figures 19-21)

K562 luciferase expressing cells were implanted intraperitoneally into nude mice; the mice were scanned using the xenogeny IVIS image station after ip injections of luciferin does determine implantations. Drug treatment was started as in previous studies day 15 after implantation. The animals were given treatment till day 42, after which drug treatment was stopped and survival of the animals determined as per the animal care regulations. It was observed that control animals developed leukemia and mortality had occurred on day 34 and 35, as per regulations we were advised to sacrifice the remaining 8 animals on day 35. Drug treatment was withdrawn on day 42 post implantation and survival of animals determined.

Animals treated with AN024 showed mortality on day 38, the dead animals on further inspection did not reveal splenic enlargement and cause of death was determined to be other than leukemia, blood smears could not be taken from the dead animal. Of the 10 animals used 8 animals showed no signed of leukemia on day 55.

Animals treated with AN019 did not show any mortality and 7 of the 10 animals showed complete absence of leukemic symptoms.

Animals treated with Imatinib showed reoccurrences of leukemic symptoms after treatment withdrawal and showed mortality on day 55, 56, 57 and 58. The surviving animals did show presence of leukemic symptoms.

5 Figure 19 illustrates the amount of luciferase expression of K562luc obtained from implanted mice after treatment with AN024, AN019 or imatinib.

Figure 20 illustrates the number of animals cured after treatment with AN024 or AN019 at day 58. Drug treatment was stopped at day 42, animals continued to show curative
10 effect after treatment with AN024 and AN019 after withdrawal of drug treatment.

Figure 21 illustrates blast cell count from blood smears taken from animals at the day indicated. Drug treatment was withdrawn on day 42. AN024 and AN019 showed effectiveness after withdrawal of drug treatment. Imatinib was found to be ineffective.

15

Example 8A - Studies on ED₅₀, LD₅₀, MTD and Therapeutic Index

The following table summarizes ED₅₀, LD₅₀, early cited MTD (Maximum Tolerated Dose) and therapeutic index of the compounds of the present invention in comparison with Imatinib. Methods employed as per J. Pharmacol. Exp. Ther., (1949), 96: 96-113.

20

Experimental substance	LD ₅₀ (po) Mice (mg/Kg)	ED ₅₀ (po) Mice (mg/Kg)	MTD Mice (mg/Kg)	Therapeutic* index - LD ₅₀ /ED ₅₀
Imatinib mesylate	949	12	250	78.9
AN-019	1133	11.5	500	98.5
AN-024	1440	10	500	144

* Leukemic mice (K562)

Example 9 - Glioma Radiation Studies (Figures 22 and 23)

Nude mice were intracranially implanted with 4910 human glioma xenograft cells (1x10⁶
25 cells). Ten days after implantation mice were treated with AN019, AN024 or temozolomide with or without radiation (5Gy/week). The experiment was terminated at day 40 post implantation.

From the results it was observed that 100% of control animals developed intracranial tumours and radiation alone had very little effect on tumor size reduction. Animals treated with TMZ alone showed reduction in intracranial tumours with 3 of 10 animals showing complete absence of tumours. Radiation treatment combined with TMZ administration caused a further regression in tumor size with animals showing less symptoms of intracranial pressure (arched back), in this case 2 of the 10 animals showed no observable intracranial tumor.

Animals treated with AN024 without radiation showed presence of intracranial tumours but the tumours were well defined and not showing diffuse edges as seen in controls or TMZ treatments, 3 of 10 animals were cured. After radiation treatment 7 of 10 animals were cured, the animals that showed presence of tumours showed well defined surgically respectable tumours.

Animals treated with AN019 alone showed tumours similar to AN024 treated animals and in this case both with and without radiation 6 of 10 animals were cured. It was observed that after radiation the tumor size was significantly reduced.

Figure 22 illustrates results obtained from semiquantitative analysis of intracranial tumours in nude mice after treatment with TMZ, AN024 or AN019 with or without radiation (5Gly).

Figure 23 shows graphical representations of nude mice showing absence of intracranial tumours after drug treatment with AN-019, AN-024 and without radiation treatments.

The preparative synthetic and other aspects of the compounds of the present invention have been illustrated in the following examples

Example 10 - Preparation of Form-I

(3,5-Bis trifluoromethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3yl-pyrimidin-2ylamino)-phenyl]-benzamide of formula-I, was prepared as per the step-IV process of Example-3 in WO2006/027795 (US 2007/0232633) as follows:

Preparation of (3,5-bis(trifluoromethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3-yl-pyrimidin-2-ylamino)-phenyl]-benzamide (I)

5 **Step(I):** Preparation of novel (3,5-bis trifluoromethyl)-N-(4-methyl-3-nitrophenyl)-benzamide

In the first instance, 3,5-bis trifluoro methyl benzoyl chloride which was used as one of the starting materials was prepared as follows

10 Thionyl chloride (576.0 g, 4.8mol) was added over a period of 15 min to a solution of 3,5-bis trifluoro methyl benzoic acid (Lancaster) (250.0 g, 0.97mol) in chloroform (2.5 L) at room temperature. The reaction mixture was heated to reflux temperature for 1 hour. The excess of thionyl chloride was removed by co-distillation with chloroform under reduced pressure. After the end of the distillation, the resulting 3,5-bis trifluoro methyl
15 benzoyl chloride was cooled down to room temperature and dissolved in 400 ml chloroform. A solution of 4-methyl-3-nitroaniline (92.0 g, 0.60mol) in chloroform (1.2 L) was cooled to -5°C and triethyl amine (304.8 g, 3.0mol) was added. 3,5-bis trifluoro methyl benzoyl chloride in chloroform was added drop wise at -5°C over a period of 60-75 min. The resulting suspension was stirred for 1 hr at -5°C. The suspension was
20 distilled to a residual volume of 800 ml and filtered, washed with chilled chloroform (200ml) and dried in vacuum to give 160.0g of novel (3,5-bis trifluoromethyl)-N-(4-methyl-3-nitrophenyl)-benzamide (68%) as cream colored crystals (98.2% purity by HPLC) MR-123-130°C.

25 **Step (II):** Preparation of (3,5-bis trifluoromethyl)-N-(3-amino-4-methylphenyl)-benzamide

A suspension of novel (3,5-bis trifluoromethyl)-N-(4-methyl-3-nitrophenyl)-benzamide (160 g, 0.41moles) and stannous chloride (460.8 g, 2.0 moles) in absolute ethanol (850
30 ml) was heated to reflux temperature for 40 min. The resulting suspension was then cooled to room temperature and quenched into 5 L of ice cold water. The reaction mixture pH was adjusted to 8.0 with 4.3 L of 5% sodium hydroxide solution and extracted with 2 x 2 L of ethyl acetate. The ethyl acetate layer was washed successively

with water and brine and dried over sodium sulfate. The ethyl acetate was distilled completely and 500 ml of hexane was added to the residue and filtered. The filtered cake was dried at high vacuum at 60°C to give 96.0g of novel (3,5-bis trifluoromethyl)-N-(3-amino-4-methylphenyl)-benzamide (65%) as yellow crystals. (98.5% purity by HPLC)

5 MR-153-156°C

Step (III): Preparation of (3,5-bis-trifluoromethyl)-N-(3-guanidino-4-methylphenyl)-benzamide:

10 A suspension of (3,5-bis-trifluoromethyl)-N-(3-amino-4-methylphenyl)-benzamide (90 g, 0.20 mol) in n-butanol (500 ml) was treated sequentially with concentrated Nitric acid until the pH reaches 2.5 (15.9 g) and with a solution of cyanamide (15.7 g, 0.37 mol) in water (15 ml) over a period of 30 min. The resulting reaction mixture was stirred at reflux temperature for 6 hrs. The reaction mixture was then distilled off completely under
15 vacuum and the residue was allowed to cool down to room temperature. A mixture of 180 ml of methanol and 180 ml of IPE was added to the reaction mass and stirred at room temperature for 1 hr. The product was filtered off with suction, washed with a mixture of methanol and IPE (3 x 50ml) and dried in vacuum at 60° C to give 72g of the nitrate salt of novel (3,5-bis-trifluoromethyl)-N-(3-guanidino – 4-methylphenyl)-benzamide of the
20 formula 62% of theory (99.2% purity by HPLC), MR-285-287°C

Step (IV): Preparation of (3,5-bis trifluoromethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3-yl-pyrimidin-2-ylamino)phenyl]-benzamide(I):

25 A suspension of (3,5-bis-trifluoromethyl)-N-(3-guanidino-4-methylphenyl)-benzamide nitrate (70 g, 0.15 mol) in n-butanol (470 ml) under an atmosphere of nitrogen was treated successively with sodium hydroxide flakes (7.0 g, 0.18 mol) and 3-dimethylamino-1-pyridin-3-yl-propenone (28.0 g, 0.16mol). The resulting suspension was heated to reflux temperature for 2 hrs. The reaction mixtures became a homogeneous
30 deep orange solution and dimethylamine was removed by the distillation of n-butanol. Reaction mass was cooled down to RT and a mixture of water and chloroform (300 ml + 300 ml) was added and chloroform layer was separated out. The chloroform layer was washed with water and distilled to a residual volume of 70 ml. Ethyl acetate (350 ml)

was added to the reaction mass and filtered off with suction, the isolated solid was washed with ethyl acetate (2 x 50ml) and water (2 x 50 ml) and dried in vacuum at 60°C.

Yield: 48.0g of (3,5-bis trifluoromethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3-yl-pyrimidin-2-ylamino)phenyl]-benzamide of the formula I.

The compound of formula-I obtained by Step-IV process was suspended in 480ml Chloroform and heated to 50-55°C. The reaction mass was cooled to room temperature and then cooled further to -5-0°C. The product was filtered and washed with Chloroform (250ml). The wet cake was dried for 6 hours at 60°C. The yield was 40gms. Melting range -230 -237°C (DSC).

FIG. 1 of the drawings accompanying this specification shows the X-Ray Powder Diffraction (XRPD) pattern which substantially depicts a typically pure sample of form-I prepared as per the process disclosed in this Example The 2θ values and intensities are tabulated in Table 1.

FIG. 4 shows the DSC thermogram of form-I crystal modification prepared by the process described in this Example (run from 40.0 – 325°C 10.00°C/min; N₂ 80 ml/min).

20

FIG.7 shows crystals of Form-I crystal modification of compound of formula (I)

Example 11 - Preparation of Form-II

(3,5-Bis trifluoromethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3-yl-pyrimidin-2-ylamino)phenyl]-benzamide of formula I, was prepared as per the process of Example 4 in WO2006/027795 (US 2007/0232633) as follows:

Alternative process for the Preparation of (3,5-bis trifluoromethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3-yl-pyrimidin-2-ylamino)-phenyl] – benzamide

30

In the first instance, 3,5-bis trifluoro methyl benzoyl chloride which was used as one of the starting material was prepared as follows:

Thionyl chloride (2.04 kg. 17.2mol) was added over a period of 15 min to a solution of 3,5-bis trifluoro methyl benzoic acid (855.0 g, 3.3mol) and D.M.F.(9 ml) in chloroform (9

35

L) at room temperature. The reaction mixture was heated to reflux temperature for 1 hour. The excess of thionyl chloride is removed by co-distillation with chloroform under reduced pressure at 40°C. After the end of the distillation, the resulting 3,5-bis trifluoro methyl benzoyl chloride was cooled down to room temperature and dissolved in 700 ml chloroform.

A solution of N-(5-amino-2-methylphenyl)-(3-pyridyl)-2-pyrimidine amine (0.73kgs, 2.64mol) in chloroform (9L) was cooled to -5°C and triethyl amine (1.03 kg, 10.2mol) was added. 3,5-Bis trifluoro methyl benzoyl chloride in chloroform was added drop wise at -5° C over a period of 60-75 min. The resulting suspension was stirred for 1 hr at -5° C. The suspension was filtered, washed with D.M. water and methanol vacuum to give 1.3 kg of wet crude title compound which on recrystallization from methanol yielded 0.82 Kgs (60%) of (3,5-bis trifluoromethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3-yl-pyrimidin-2-ylamino)-phenyl]-benzamide (I)

15

The compound of formula-I obtained by the above process was suspended in 5L methanol and heated to reflux temperature. The reaction mass was maintained at the same temperature for 30-40 minutes, cooled slowly to 40-45°C and held at this temperature for 60 minutes. The product was filtered and washed with 0.5L methanol at 40-45°C. The wet cake was dried for 6 hours at 60°C. Yield: 650gms

20

FIG. 2 of the drawings accompanying this specification shows the X-Ray Powder Diffraction (XRPD) pattern which substantially depicts a typically pure sample of Form-II prepared as per the process disclosed in this Example The 2θ values and intensities are tabulated in Table-2.

25

FIG. 5 shows the DSC thermogram of form-II crystal modification prepared by the process described in this Example (run from 30.0 – 350°C 10.00°C/min; N₂ 80 ml/min).

FIG. 8 shows crystals of Form-II crystal modification of compound of formula (I).

30

Example 12 - Preparation of Form-III

(3,5-Bis trifluoromethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3yl-pyrimidin-2ylamino)-phenyl]-benzamide of formula I, was prepared as per the process of Example 4 in WO2006/027795 as mentioned in the above Example-11.

- 5 The compound of formula-I obtained by the above process was suspended in a mixture of 2.5L Dimethyl formamide and 4.1L acetone and heated to 50°C. The reaction mass was maintained at the same temperature for 30-40 minutes, then cooled slowly to 25-30°C and held at the same temperature for 60 minutes. The product slurry was further cooled to -5°C and filtered and washed with 0.8L Acetone . The wet cake was suspended in 0.4L
10 acetone and heated to reflux temperature. The cooled slurry was filtered and washed with 0.4L acetone. The wet cake was dried for 6 hours at 60°C. Yield: 500gms.

- FIG. 3 of the drawings accompanying this specification shows the X-Ray Powder Diffraction (XRPD) pattern which substantially depicts a typically pure sample of
15 form-III prepared as per the process disclosed in this Example The 2θ values and intensities are tabulated in Table 3.

- FIG. 6 shows the DSC thermogram of form-III crystal modification prepared by the process described in this Example (run from 40.0 – 325°C 10.00°C/min; N₂ 80 ml/min).

20

FIG. 9 shows crystals of Form-III crystal modification of compound of formula (I).

Example-13 - Preparation of Form-III

- (3,5-Bis trifluoromethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3yl-pyrimidin-2ylamino)-phenyl]-
25 benzamide of formula I, was prepared as per the process of example-4 in WO2006/027795 as mentioned in the above example-11.

- The compound of formula-I obtained by the above process was suspended in a mixture of 2.5L dimethyl formamide and 4.1L Hexane and heated to 50°C. The reaction mass was
30 maintained at the same temperature for 30-40 minutes, cooled slowly to 25-30°C and held at the same temperature for 12 hours. The product slurry was further cooled to -5°C, filtered and washed with 0.8L Hexane. The wet cake was dried for 6 hours at 60°C. Yield: 400gms; DSC : 248.2(peak).

Example 14 - Preparation of Form-III

(3,5-Bis trifluoromethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3yl-pyrimidin-2ylamino)-phenyl]-benzamide of formula I, was prepared as per the process of Example 4 in
5 WO2006/027795 as mentioned in the above Example 11.

The compound of formula-I obtained by the above process was suspended in a mixture of 2.5L dimethyl formamide and 4.1L toluene and heated to 50°C. The reaction mass was maintained at the same temperature for 30-40 minutes, cooled slowly to 25-30°C and held
10 at the same temperature for 12 hours. The slurry was cooled further to -5°C, filtered and washed with 0.8L Toluene . The wet cake was dried for 6 hours at 60°C. Yield: 450gms; DSC : 246.7(peak).

Example 15 - Preparation of Form-III

15 (3,5-Bis trifluoromethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3yl-pyrimidin-2ylamino)-phenyl]-benzamide of formula I, was prepared as per the process of example -4 in WO2006/027795 as mentioned in the above example-11

The compound of formula-I obtained by the above process was suspended in a mixture of
20 2.5L Acetic acid and heated to 50°C. The reaction mass was maintained at the same temperature for 30-40 minutes, cooled slowly to 25-30°C and held at the same temperature for 96 hours. The product was filtered and washed with 0.4L chilled Acetic acid . The wet cake was dried for 6 hours at 60°C. Yield: 650gms; DSC : 246.3 (peak).

25

Example 16 - Preparation of Form-III

The Form-I prepared by Example-10 (40g) was suspended in a mixture of 120ml dimethyl formamide and 200ml acetone and heated to 50°C. The reaction mass was maintained at the same temperature for 30-40 minutes, cooled slowly to 25-30°C and held at the same temperature for 60 minutes. The slurry was cooled -5°C, filtered and washed with 40ml
30 Acetone . The wet cake was suspended in 200ml acetone and heated to reflux temperature and maintained for 60 minutes at reflux temperature. The slurry was cooled to 25°C, filtered and washed with 40ml acetone. The wet cake was dried for 6 hours at 60°C. Yield: 25gms; DSC : 247.0 °C (Peak).

Example 17 - Preparation of Form-III

The Form-II prepared by Example-11 (650g) was suspended in a mixture of 1.95L dimethyl formamide and 3.25L acetone and heated to 50°C. The reaction mass was maintained at the same temperature for 30-40 minutes. The reaction mass was cooled slowly to 25-30°C and maintained at the same temperature for 60 minutes. The product was filtered and washed with 0.7L Acetone. The wet cake was suspended in 3.5L acetone and heated to reflux temperature. The slurry was cooled to 25°C, filtered and washed with 0.7L acetone. The wet cake was dried for 6 hours at 60°C. Yield: 395gms; DSC: 246.5 °C (Peak).

As used herein, the term "about" refers to the variation in an amount or range that is conventional for the field of organic chemistry, for example, the typical variation that occurs in temperatures or times as measured in real world situations in the organic chemistry laboratory, scale-up, or production facility, or in evaluating anti-proliferative agents. Any range or amount used in the description of the present invention that is modified by the term "about" is also a part of the invention if not modified by the term about. For example, recitation of "about 10 to about 20" also includes recitation of "10 to 20".

It should be noted that, as used in this specification and the appended claims, the singular forms "a," "an," and "the" include plural referents unless the content clearly dictates otherwise. Thus, for example, reference to a composition containing "a compound" includes a mixture of two or more compounds. It should also be noted that the term "or" is generally employed in its sense including "and/or" unless the content clearly dictates otherwise.

All publications and patent applications in this specification are indicative of the level of ordinary skill in the art to which this invention pertains.

The invention has been described with reference to various specific and preferred embodiments and techniques. However, it should be understood that many variations and modifications may be made while remaining within the spirit and scope of the invention.

WE CLAIM:

1. A Form-III crystal form of (3,5-bis trifluoromethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3yl-pyrimidin-2ylamino)-phenyl]-benzamide (formula I).

5

2. The Form-III crystal form of claim 1, wherein the Form-III crystal form has the XRPD characteristics:

Angle [2-Theta]	d-value Angstrom	Intensity %
5.909	14.94417	24.9
6.491	13.60517	66.4
8.267	10.68690	100.0
11.854	7.45967	58.2
13.181	6.71147	40.0
14.609	6.05866	50.0
15.960	5.54851	5.8
16.612	5.33224	9.5
18.826	4.70995	14.4
19.571	4.53226	52.1
21.302	4.16774	54.0
21.612	4.10861	37.7
22.160	4.00828	3.5
22.970	3.86869	23.8
23.278	3.81812	51.6
24.000	3.70491	8.7
25.112	3.54329	11.1
25.887	3.43895	3.1
26.500	3.36079	3.3
27.517	3.23887	3.4
29.476	3.02788	6.8
29.857	2.99011	8.6
30.474	2.93102	3.5
32.886	2.72133	3.2
33.559	2.66829	5.0
35.916	2.49836	3.8
39.645	2.27157	4.9
43.061	2.09893	2.6
43.748	2.06753	3.8
44.055	2.05383	3.9.

3. The Form-III crystal form of claim 1, wherein the crystal form has melting point at or above 240 °C.

10

4. The Form-III crystal form of claim 1, wherein the crystal form is essentially pure.

5. A method of treating a subject in need of anti-proliferative therapy, the method comprising:

administering to the subject a Form-III crystal form of (3,5-bis trifluoromethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3yl-pyrimidin-2ylamino)-phenyl]-benzamide (formula I).

6. The method of claim 5, wherein the Form-III crystal form has the XRPD characteristics:

Angle [2-Theta]	d-value Angstrom	Intensity %
5.909	14.94417	24.9
6.491	13.60517	66.4
8.267	10.68690	100.0
11.854	7.45967	58.2
13.181	6.71147	40.0
14.609	6.05866	50.0
15.960	5.54851	5.8
16.612	5.33224	9.5
18.826	4.70995	14.4
19.571	4.53226	52.1
21.302	4.16774	54.0
21.612	4.10861	37.7
22.160	4.00828	3.5
22.970	3.86869	23.8
23.278	3.81812	51.6
24.000	3.70491	8.7
25.112	3.54329	11.1
25.887	3.43895	3.1
26.500	3.36079	3.3
27.517	3.23887	3.4
29.476	3.02788	6.8
29.857	2.99011	8.6
30.474	2.93102	3.5
32.886	2.72133	3.2
33.559	2.66829	5.0
35.916	2.49836	3.8
39.645	2.27157	4.9
43.061	2.09893	2.6
43.748	2.06753	3.8
44.055	2.05383	3.9

7. A pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable excipient and a Form-III crystal form of (3,5-bis trifluoromethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3-yl-pyrimidin-2-ylamino)-phenyl]-benzamide (formula I).

- 5 8. The pharmaceutical composition of claim 7, wherein the Form-III crystal form has the XRPD characteristics:

Angle [2-Theta]	d-value Angstrom	Intensity %
5.909	14.94417	24.9
6.491	13.60517	66.4
8.267	10.68690	100.0
11.854	7.45967	58.2
13.181	6.71147	40.0
14.609	6.05866	50.0
15.960	5.54851	5.8
16.612	5.33224	9.5
18.826	4.70995	14.4
19.571	4.53226	52.1
21.302	4.16774	54.0
21.612	4.10861	37.7
22.160	4.00828	3.5
22.970	3.86869	23.8
23.278	3.81812	51.6
24.000	3.70491	8.7
25.112	3.54329	11.1
25.887	3.43895	3.1
26.500	3.36079	3.3
27.517	3.23887	3.4
29.476	3.02788	6.8
29.857	2.99011	8.6
30.474	2.93102	3.5
32.886	2.72133	3.2
33.559	2.66829	5.0
35.916	2.49836	3.8
39.645	2.27157	4.9
43.061	2.09893	2.6
43.748	2.06753	3.8
44.055	2.05383	3.9

9. Use of a Form-III crystal form of (3,5-bis trifluoromethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3-yl-pyrimidin-2-ylamino)-phenyl]-benzamide (formula I), wherein the Form-III crystal form has the XRPD characteristics:
- 10

Angle [2-Theta]	d-value Angstrom	Intensity %
5.909	14.94417	24.9
6.491	13.60517	66.4
8.267	10.68690	100.0
11.854	7.45967	58.2
13.181	6.71147	40.0
14.609	6.05866	50.0
15.960	5.54851	5.8
16.612	5.33224	9.5
18.826	4.70995	14.4
19.571	4.53226	52.1
21.302	4.16774	54.0
21.612	4.10861	37.7
22.160	4.00828	3.5
22.970	3.86869	23.8
23.278	3.81812	51.6
24.000	3.70491	8.7
25.112	3.54329	11.1
25.887	3.43895	3.1
26.500	3.36079	3.3
27.517	3.23887	3.4
29.476	3.02788	6.8
29.857	2.99011	8.6
30.474	2.93102	3.5
32.886	2.72133	3.2
33.559	2.66829	5.0
35.916	2.49836	3.8
39.645	2.27157	4.9
43.061	2.09893	2.6
43.748	2.06753	3.8
44.055	2.05383	3.9

for producing an anti-proliferative medicament for treating a tumor disorder.

10. A process for preparing a Form-III crystal form of (3,5-bis
5 trifluoromethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3yl-pyrimidin-2ylamino)-phenyl]-benzamide
(formula I)

the process comprising:

treating the compound of formula I in a Form-I or Form-II crystal form with acetic
acid or a mixture of dimethyl formamide and acetone, hexane, or toluene; and,

10 subsequently treating the once treated compound with acetic acid, acetone,
hexane, or toluene.

45

11. The process of claim 10, comprising:
treating the compound of formula I in a Form-I or Form-II crystal form with acetic acid; and,
5 subsequently treating the once treated compound with acetic acid.

12. The process of claim 10, comprising:
treating the compound of formula I in a Form-I or Form-II crystal form with a mixture of dimethyl formamide and acetone; and,
10 subsequently treating the once treated compound with acetone.

13. The process of claim 10, comprising:
treating the compound of formula I in a Form-I or Form-II crystal form with a mixture of dimethyl formamide and hexane; and,
15 subsequently treating the once treated compound with hexane.

14. The process of claim 10, comprising:
treating the compound of formula I in a Form-I or Form-II crystal form with a mixture of dimethyl formamide and toluene; and,
20 subsequently treating the once treated compound with toluene.

15. The process of claim 10, wherein the Form-III crystal form has the XRPD characteristics:

Angle [2-Theta]	d-value Angstrom	Intensity %
5.909	14.94417	24.9
6.491	13.60517	66.4
8.267	10.68690	100.0
11.854	7.45967	58.2
13.181	6.71147	40.0
14.609	6.05866	50.0
15.960	5.54851	5.8
16.612	5.33224	9.5
18.826	4.70995	14.4
19.571	4.53226	52.1
21.302	4.16774	54.0
21.612	4.10861	37.7
22.160	4.00828	3.5

Angle [2-Theta]	d-value Angstrom	Intensity %
22.970	3.86869	23.8
23.278	3.81812	51.6
24.000	3.70491	8.7
25.112	3.54329	11.1
25.887	3.43895	3.1
26.500	3.36079	3.3
27.517	3.23887	3.4
29.476	3.02788	6.8
29.857	2.99011	8.6
30.474	2.93102	3.5
32.886	2.72133	3.2
33.559	2.66829	5.0
35.916	2.49836	3.8
39.645	2.27157	4.9
43.061	2.09893	2.6
43.748	2.06753	3.8
44.055	2.05383	3.9

5

16. A Form-I crystal form of (3,5-bis trifluoromethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3yl-pyrimidin-2ylamino)-phenyl]-benzamide (formula I).

17. The Form-I crystal form of claim 16, wherein the Form-I crystal form has the XRPD characteristics:

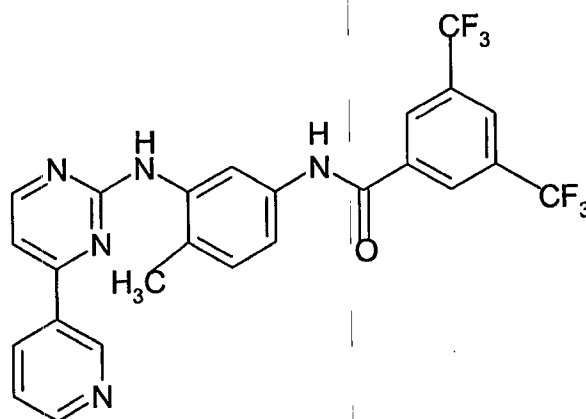
Angle [2-Theta]	d-value Angstrom	Intensity %
6.793	13.00131	13.9
9.823	8.99680	3.9
11.106	7.96069	54.2
13.267	6.66829	48.5
16.386	5.40523	7.0
17.941	4.94015	11.3
18.997	4.66785	13.0
19.778	4.48530	50,5
21.894	4.05635	100.0
22.396	3.96650	20.5
23.469	3.78750	19.7
24.466	3.63545	32.4
24.939	3.56759	52.6
25.525	3.48695	14.6
26.968	3.30351	10.3
28.777	3.09991	22.0
30.545	2.92436	14.8
33.011	2.71129	11.0.

18. A Form-II crystal form of (3,5-bis trifluoromethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3-yl-pyrimidin-2-ylamino)-phenyl]-benzamide (formula I).

5 19. The Form-II crystal form of claim 18, wherein the Form-II crystal form has the XRPD characteristics:

Angle [2-Theta]	d-value Angstrom	Intensity %
6.500	13.58651	12.2
10.816	8.17295	100.0
12.094	7.31197	3.4
12.988	6.81061	49.7
16.120	5.49381	6.0
17.669	5.01562	10.9
19.521	4.54367	41.7
21.675	4.09687	39.9
22.083	4.02198	17.1
23.230	3.82602	21.9
24.264	3.66523	17.8
24.639	3.61023	8.5
28.460	3.13371	4.8
29.328	3.04290	2.3
30.256	2.95165	4.1
32.746	2.73261	3.5
34.035	2.63201	3.1
35.590	2.52050	1.5
39.660	2.27072	1.9
42.123	2.14346	2.5
44.193	2.04777	1.7

20. A method of preparing compound of formula I:



Formula I Development code: AN-019

the method comprising:

- providing a compound of formula VI, 3,5-bis trifluoro methyl benzoyl chloride;
- 5 condensing 4-methyl-3-nitro-aniline with the compound of formula (IV) at about 0 to about -10 °C in chlorohydrocarbon solvent with addition of a basic compound to obtain a compound of formula III, ((3,5-bis trifluoromethyl)-N-(4-methyl-3-nitrophenyl)-benzamide;
- 10 reducing the compound of formula (III) with stannous chloride/conc. HCl at reflux temperature for about 0.5 to about 1 hour to obtain a compound of formula IV, (3,5-bis trifluoromethyl)-N-(3-amino-4-methylphenyl)-benzamide;
- condensing the compound of formula IV with aqueous cyanamide at reflux temperature in n-butanol solvent to obtain a compound of formula V, (3,5-bis-trifluoromethyl)-N-(3-guanidino – 4-methylphenyl)-benzamide;
- 15 condensing the compound of formula (V) with 3-dimethylamino-1-pyridin-3-yl-propenone in presence of base at reflux temperature to obtain the compound of formula (I).

49

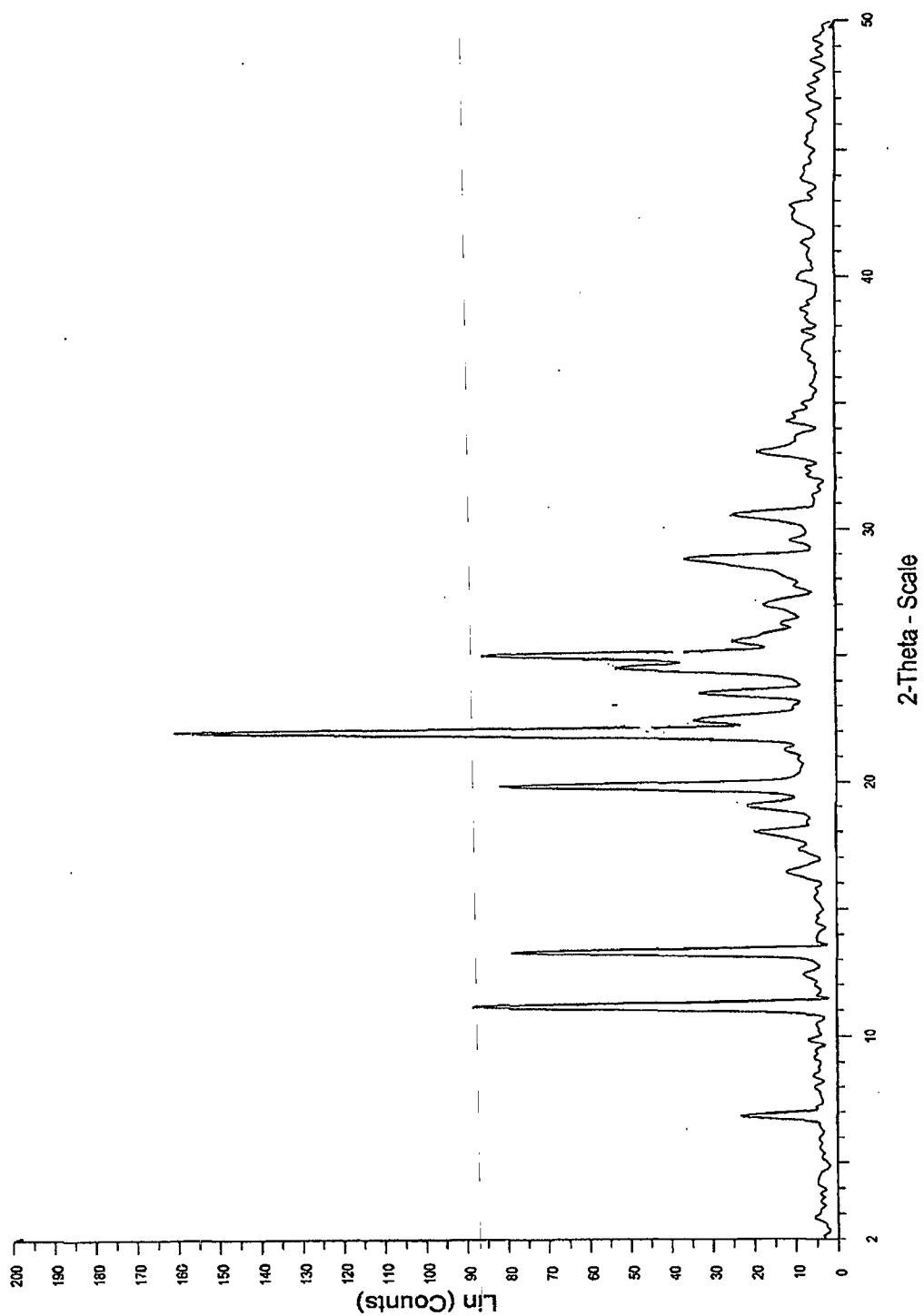
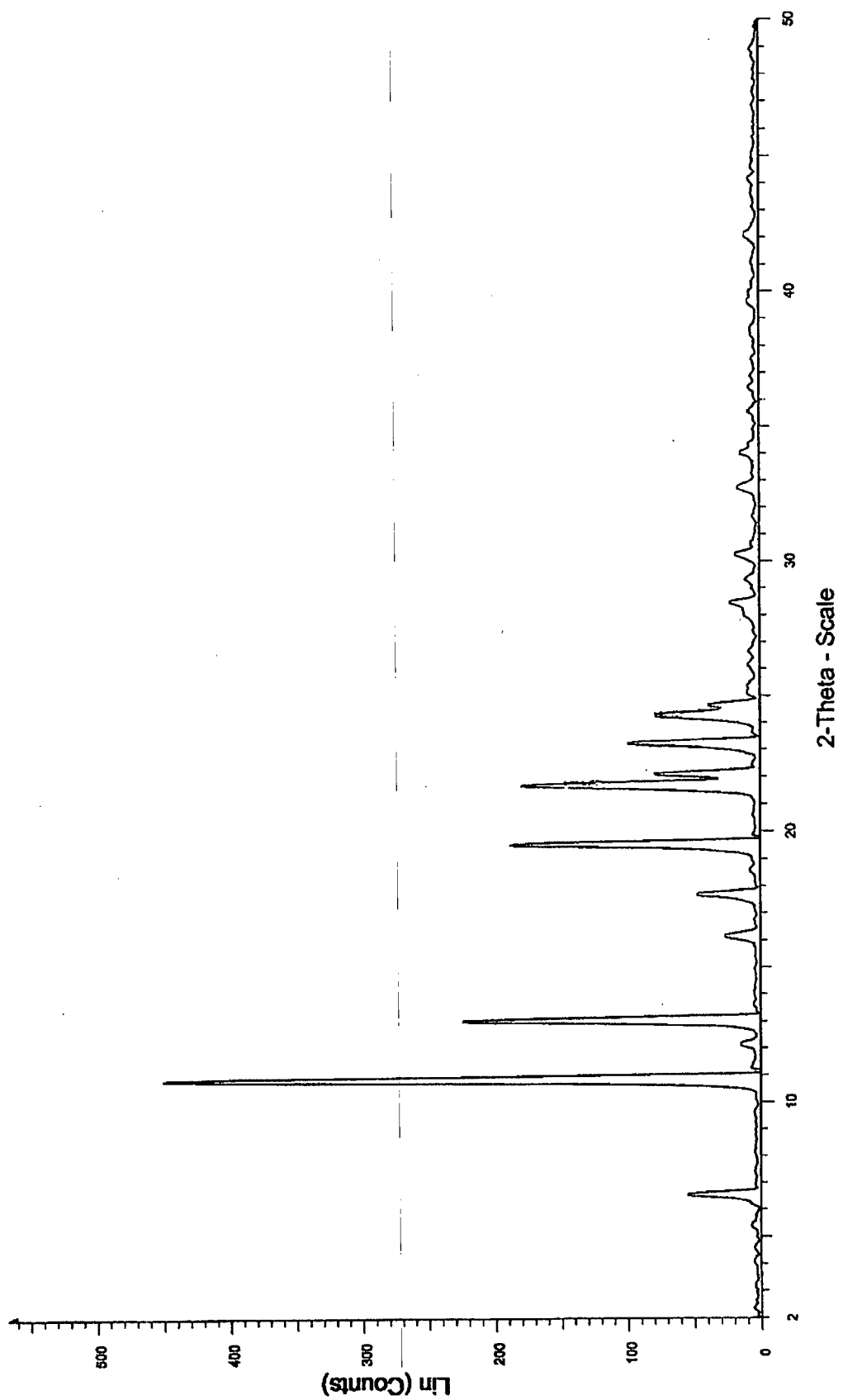


FIG. 1

50

FIG. 2



51

FIG. 3

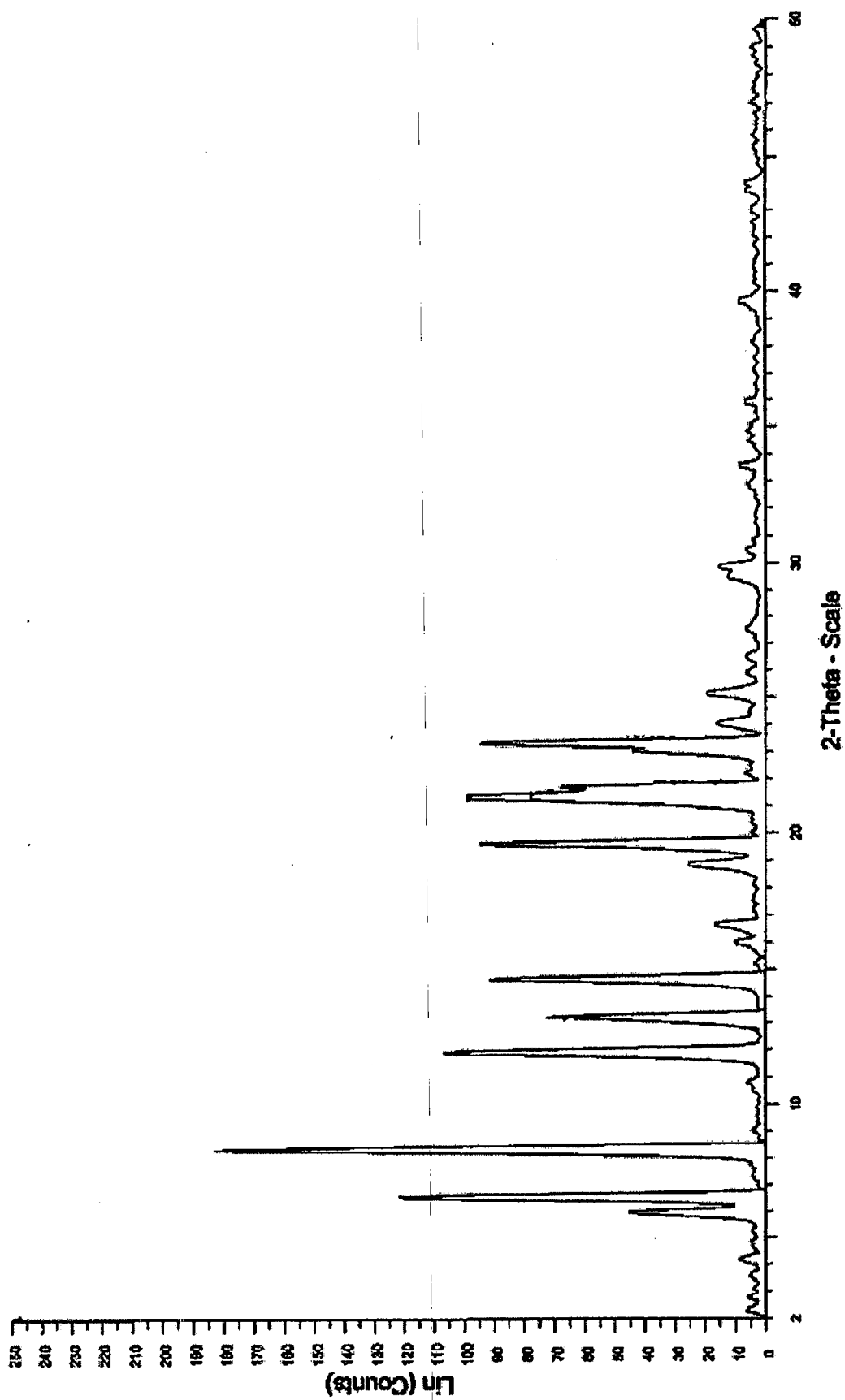


FIG. 4

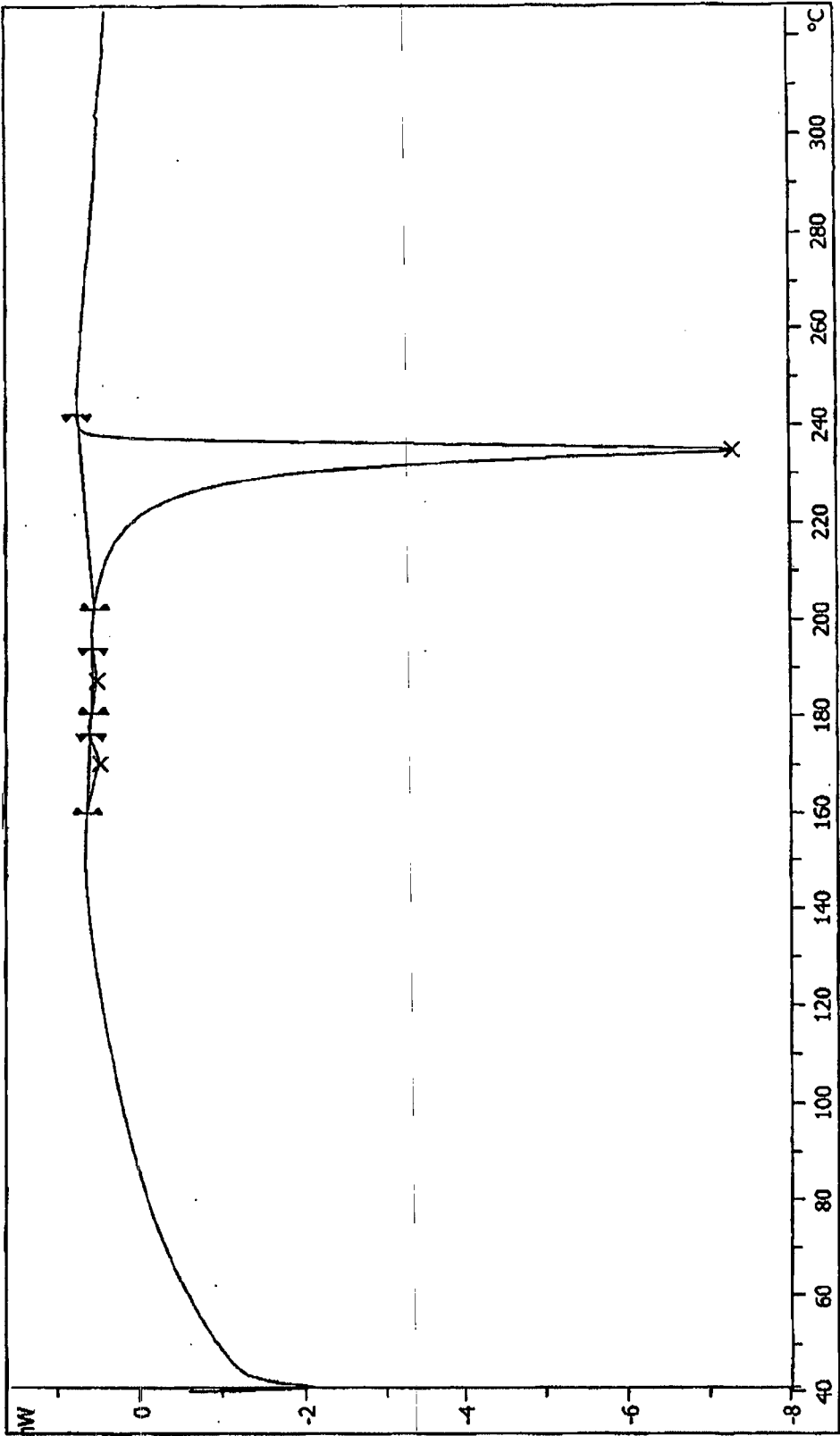
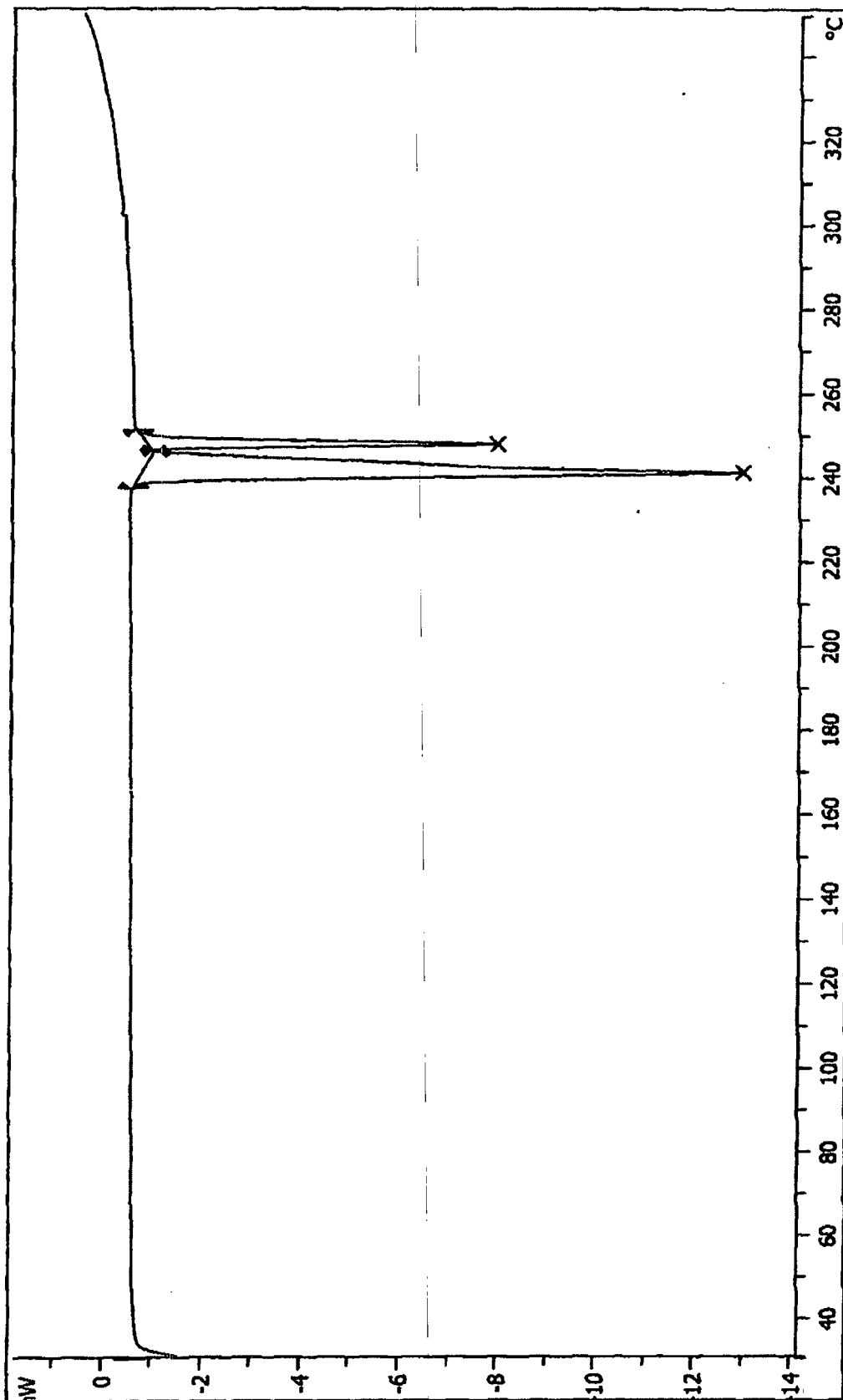


FIG. 5



54

FIG. 6

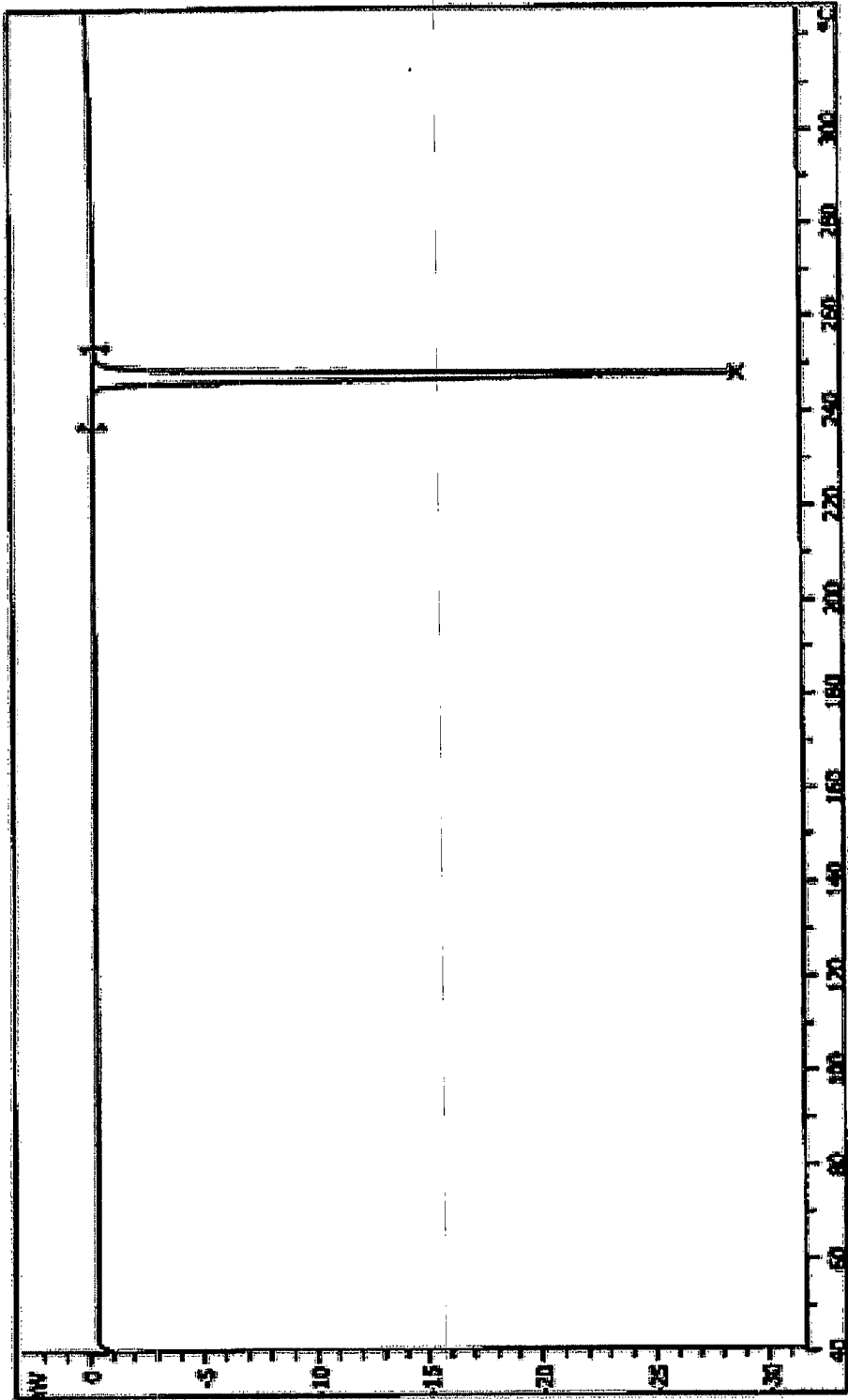


FIG. 7

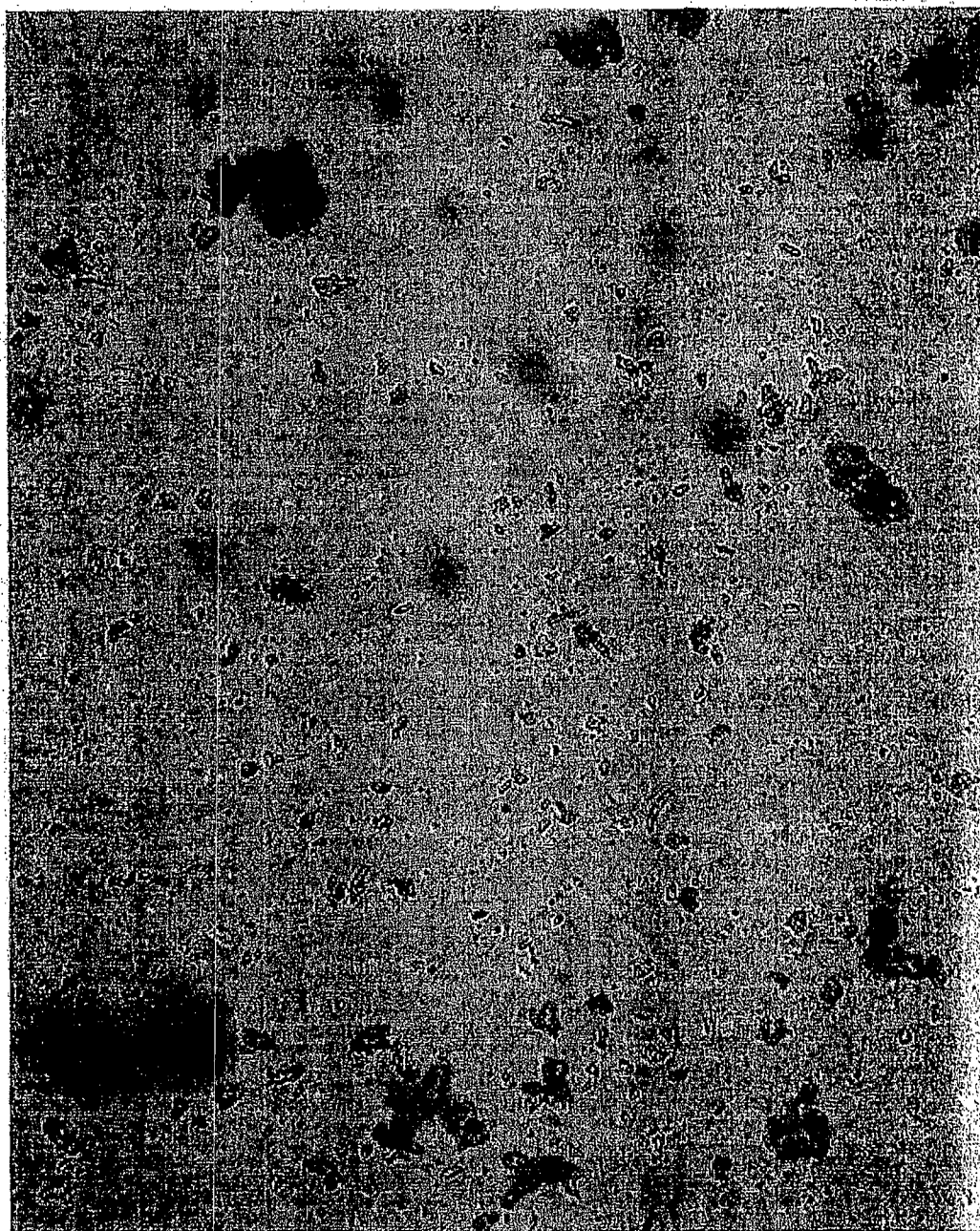
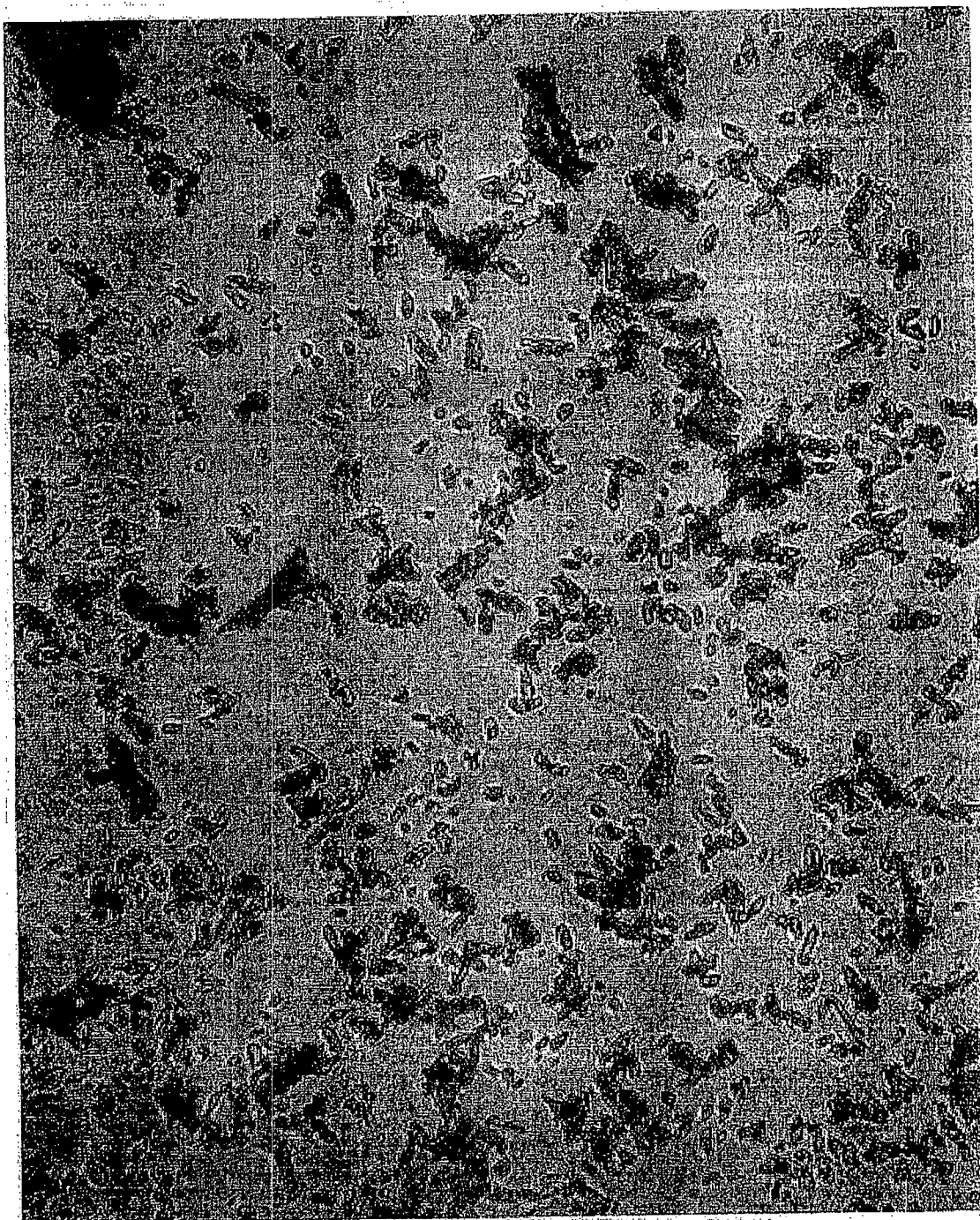
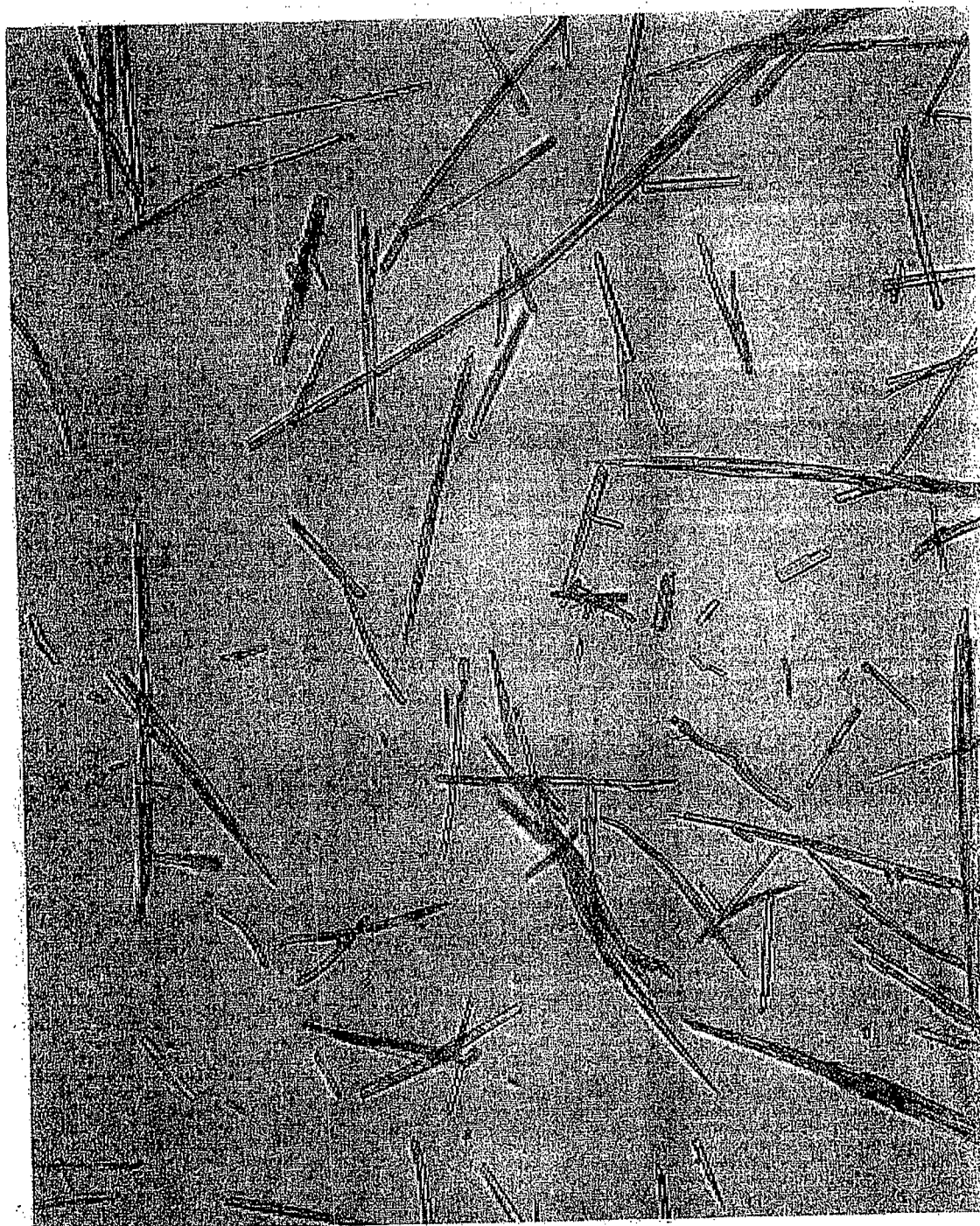


FIG. 8

57

FIG. 9



10/25

58

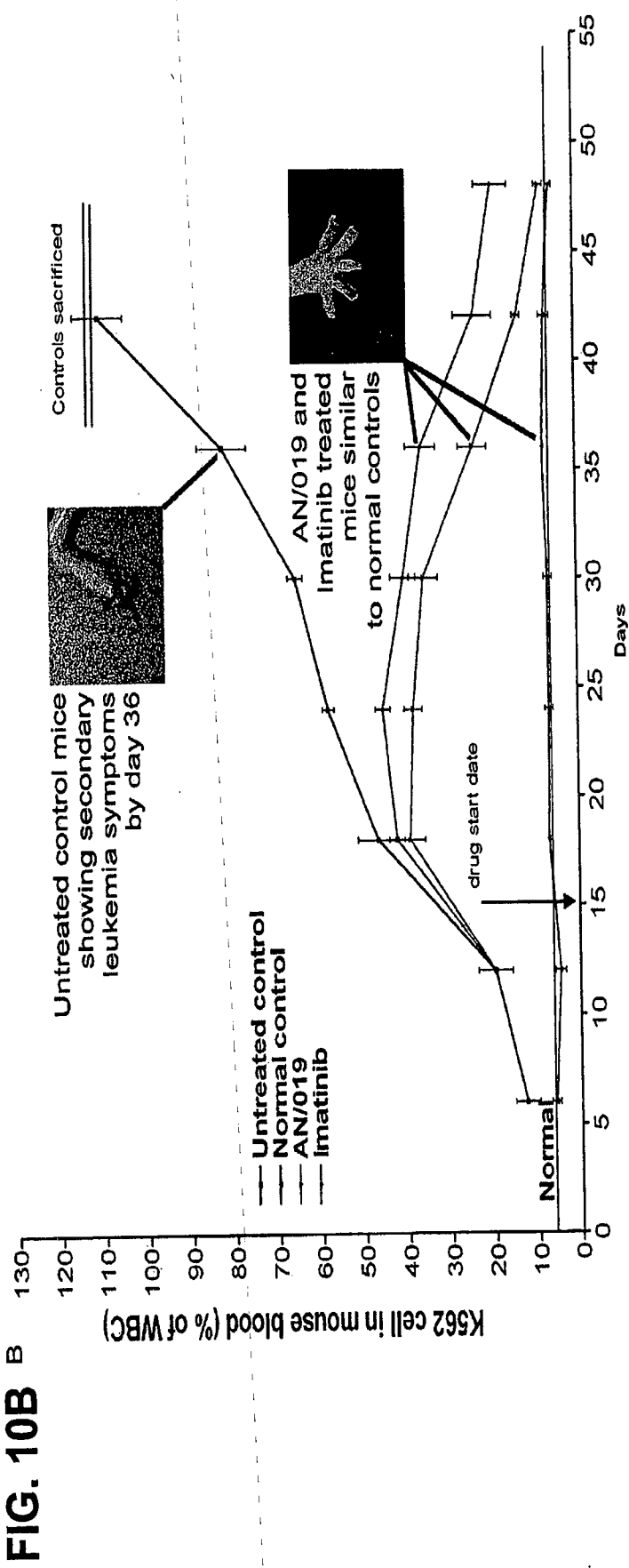
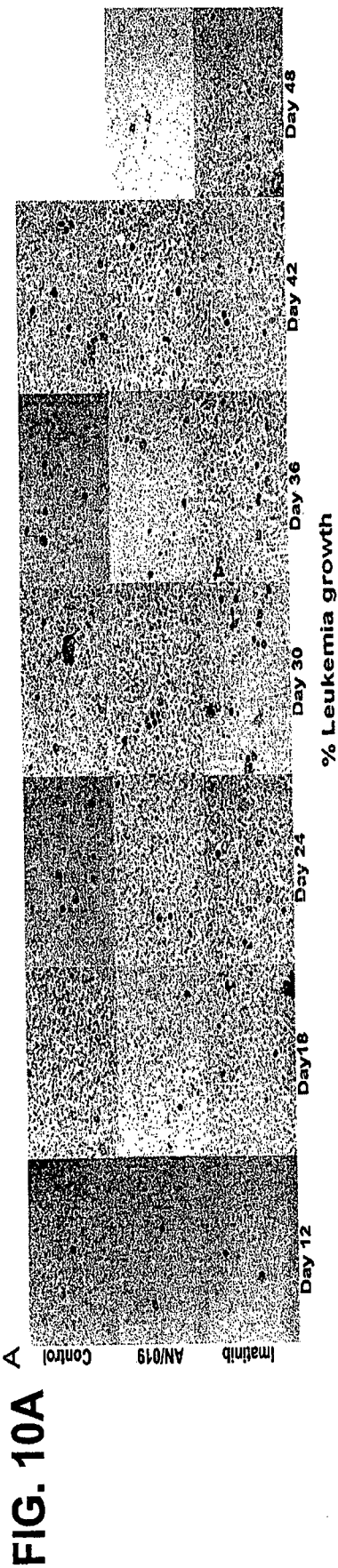
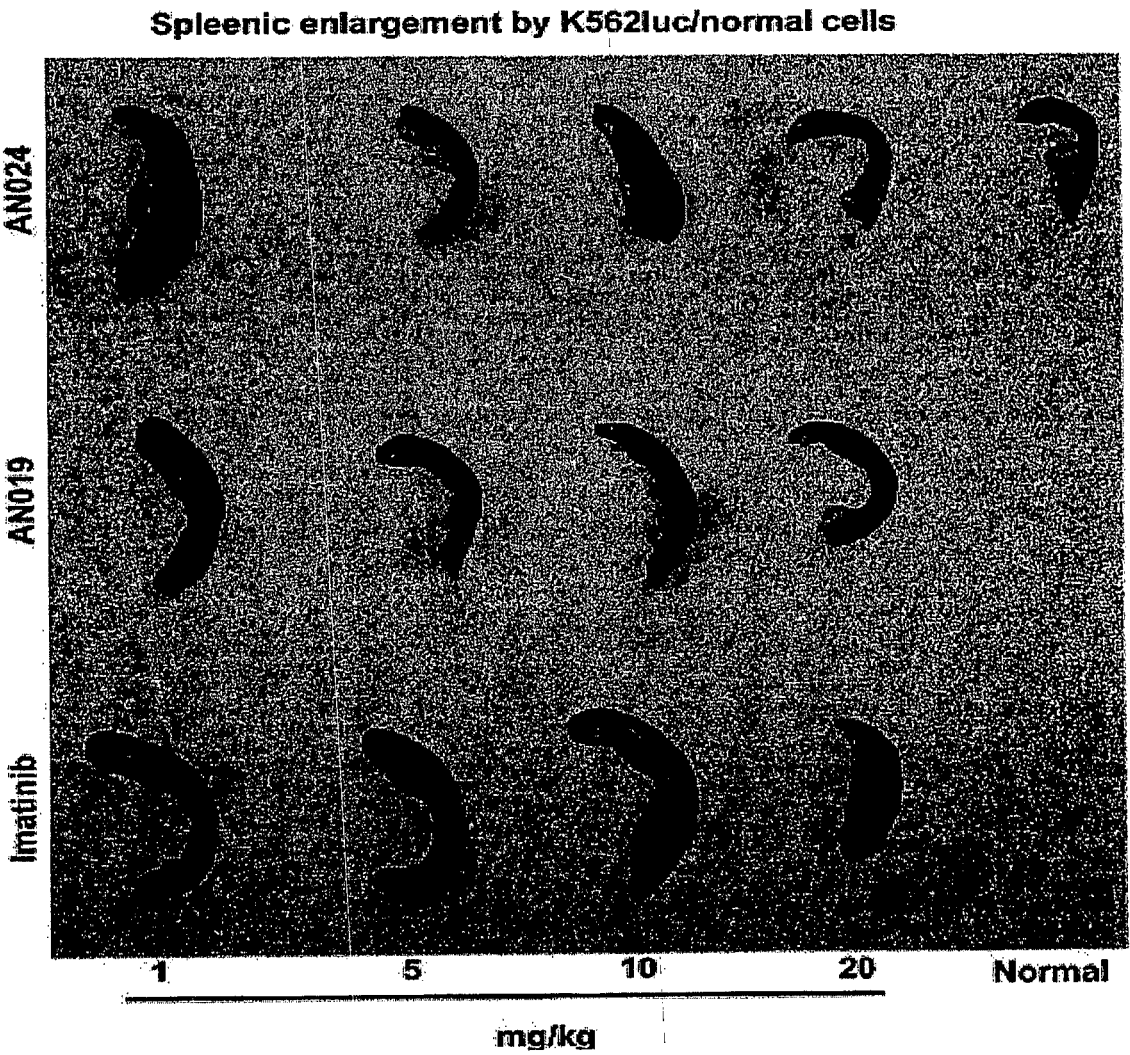
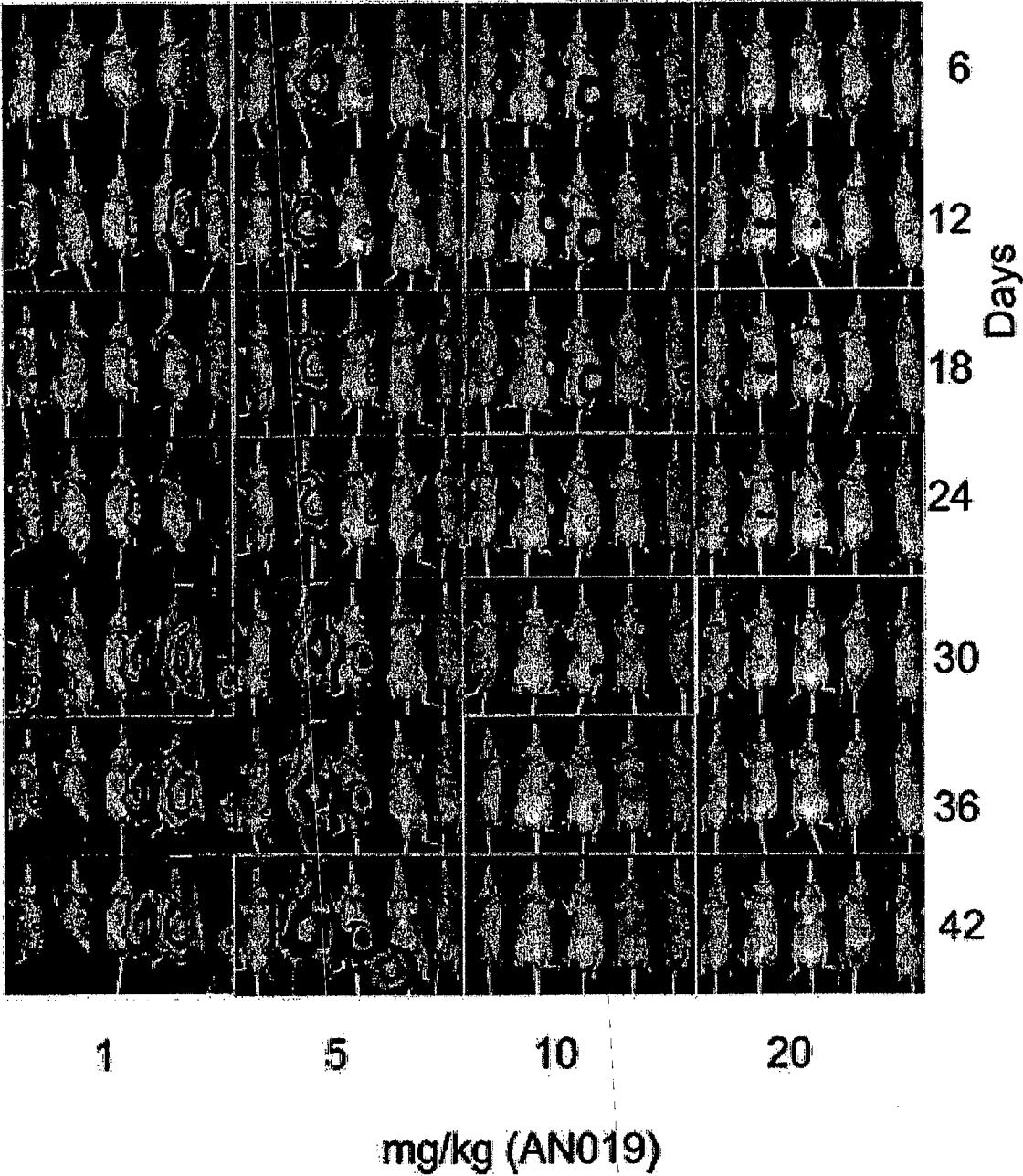


FIG. 11



12/25

FIG. 12



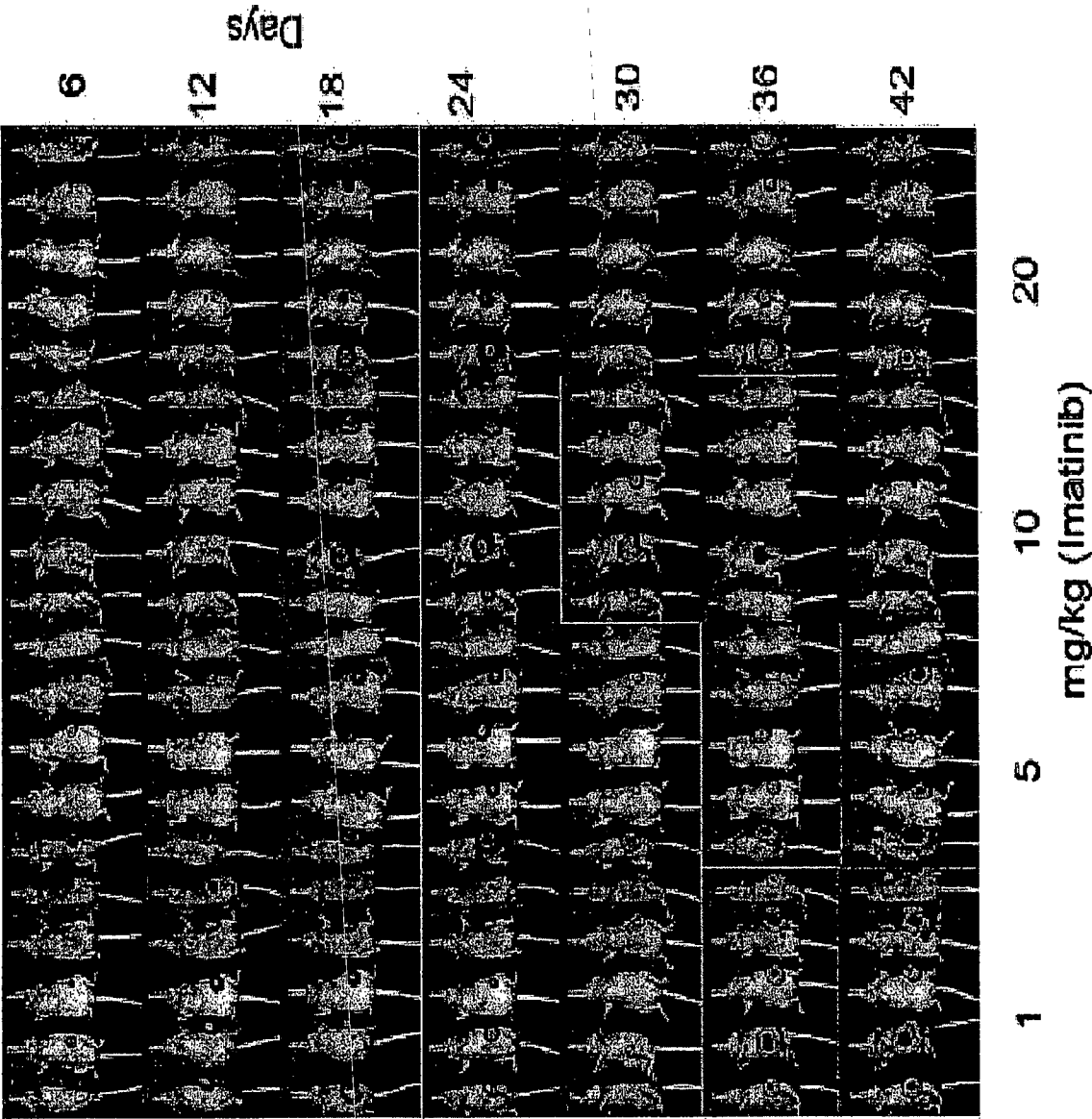
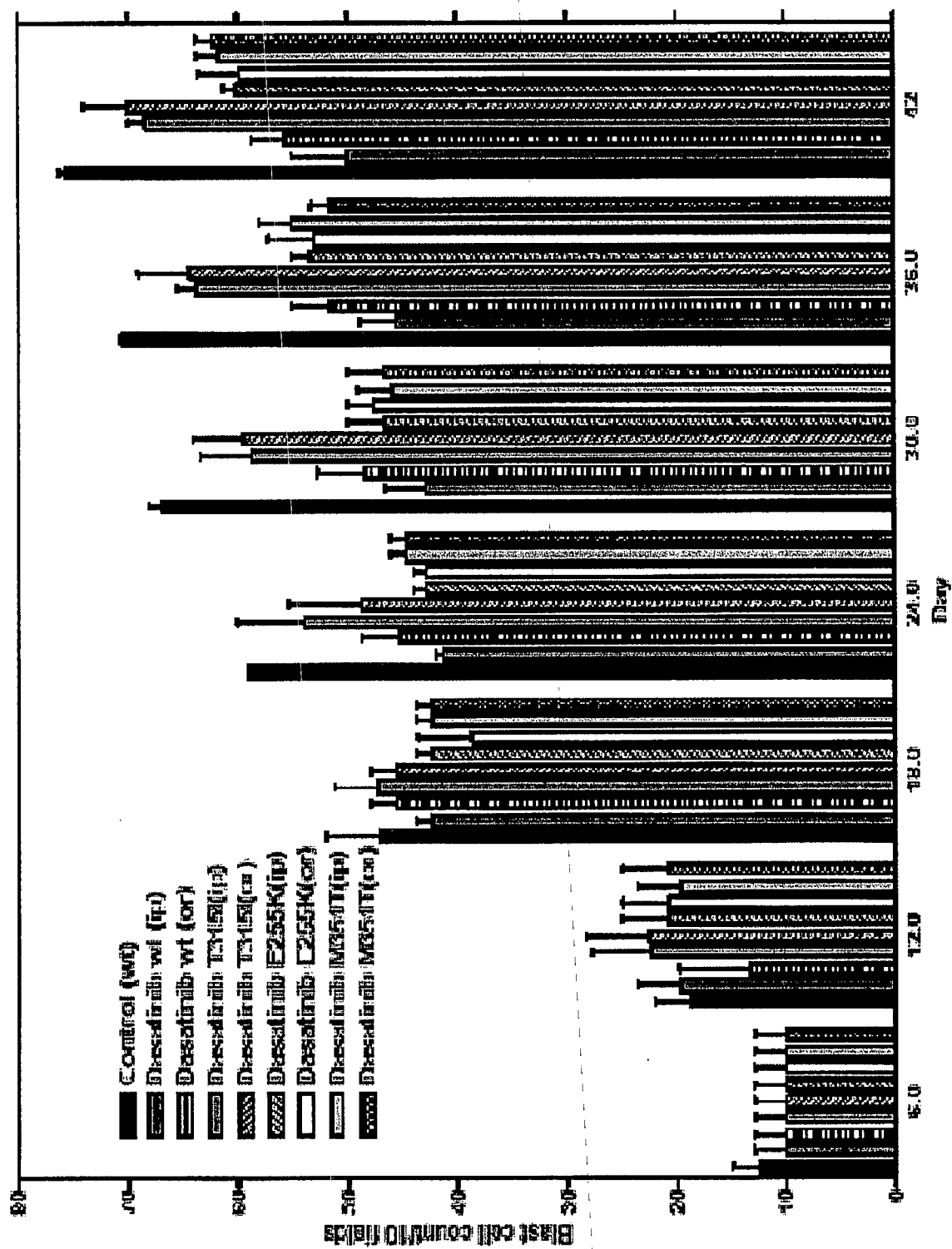


FIG. 13

14/25

62

FIG. 14A



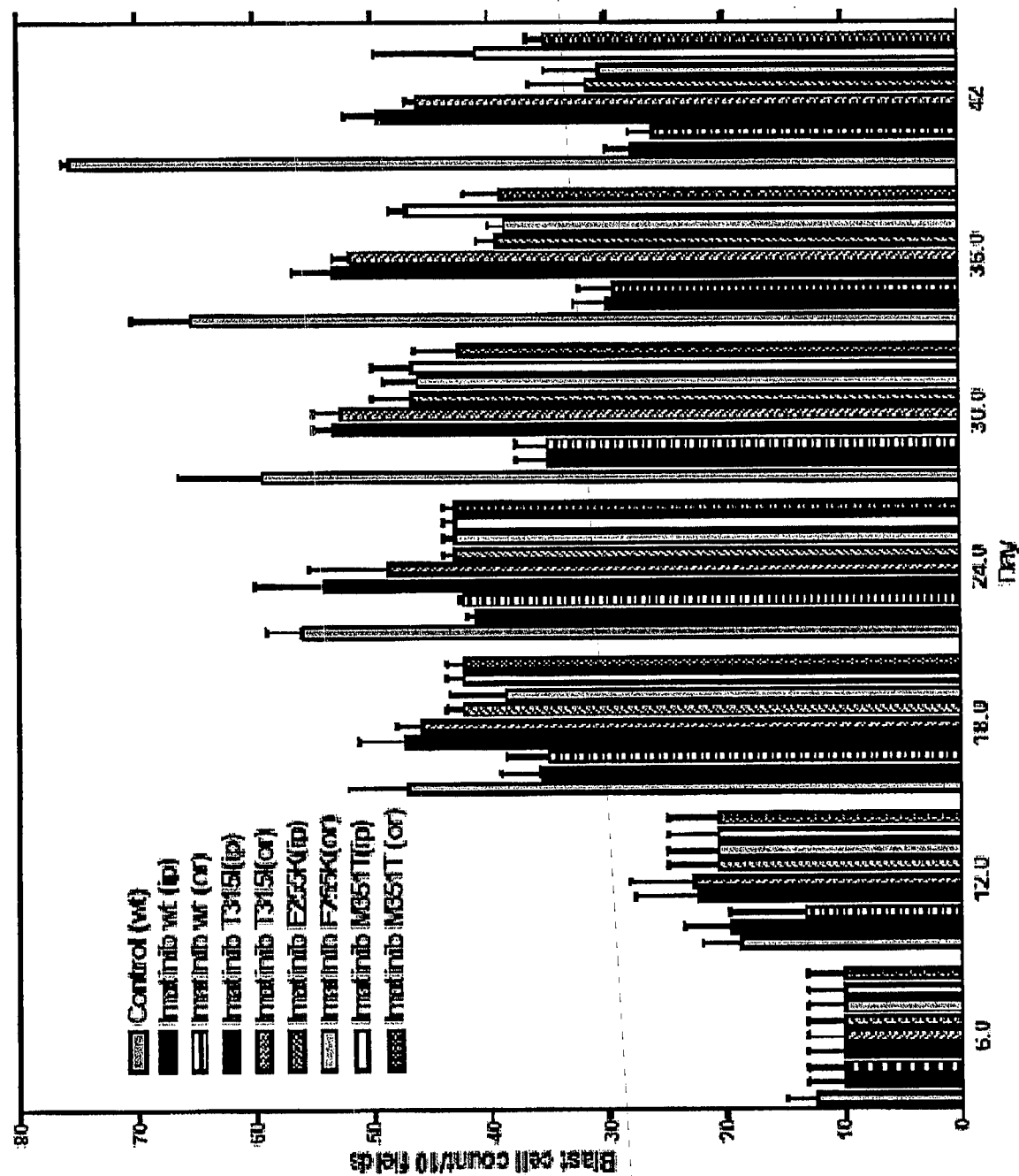


FIG. 14B

64

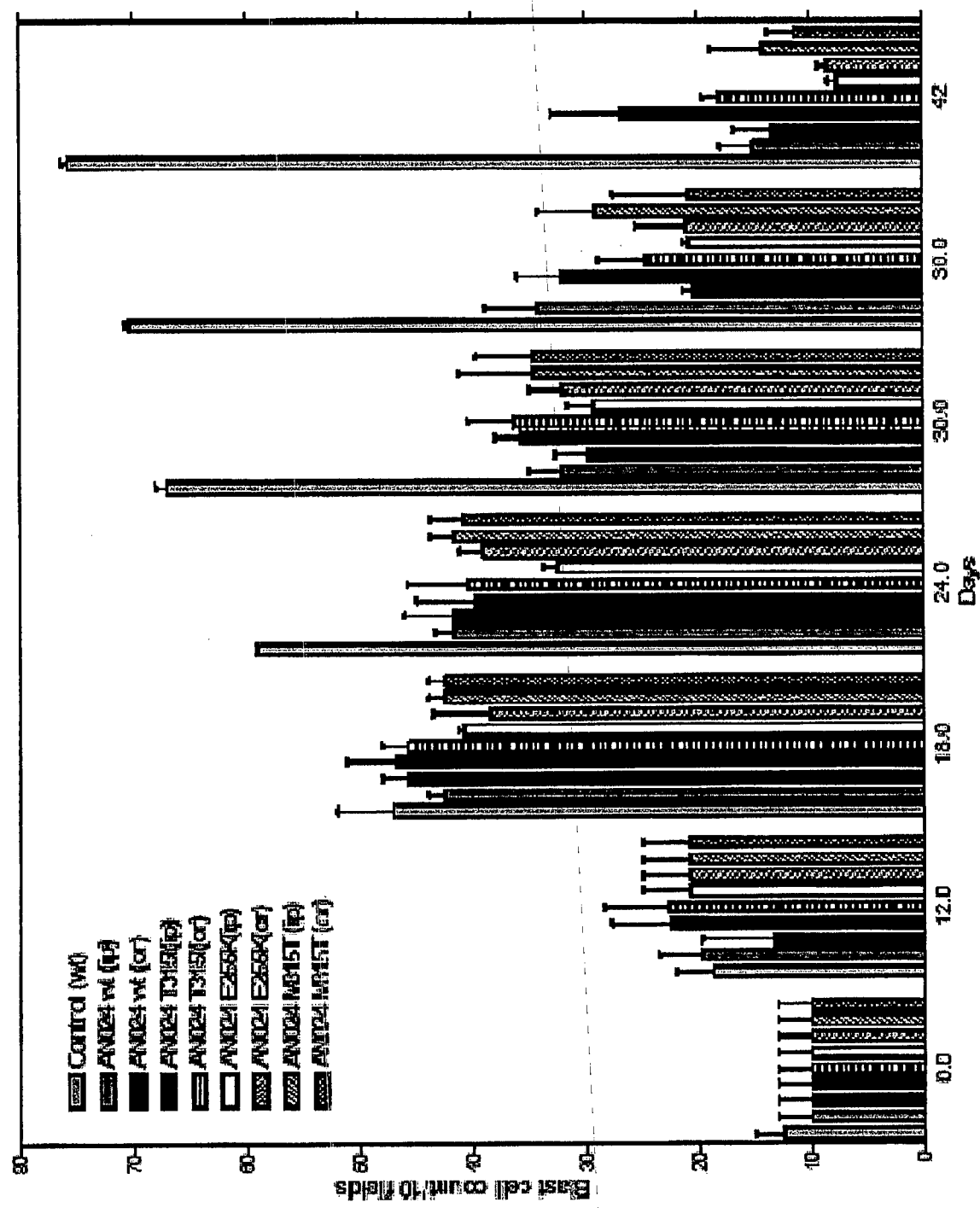


FIG. 14C

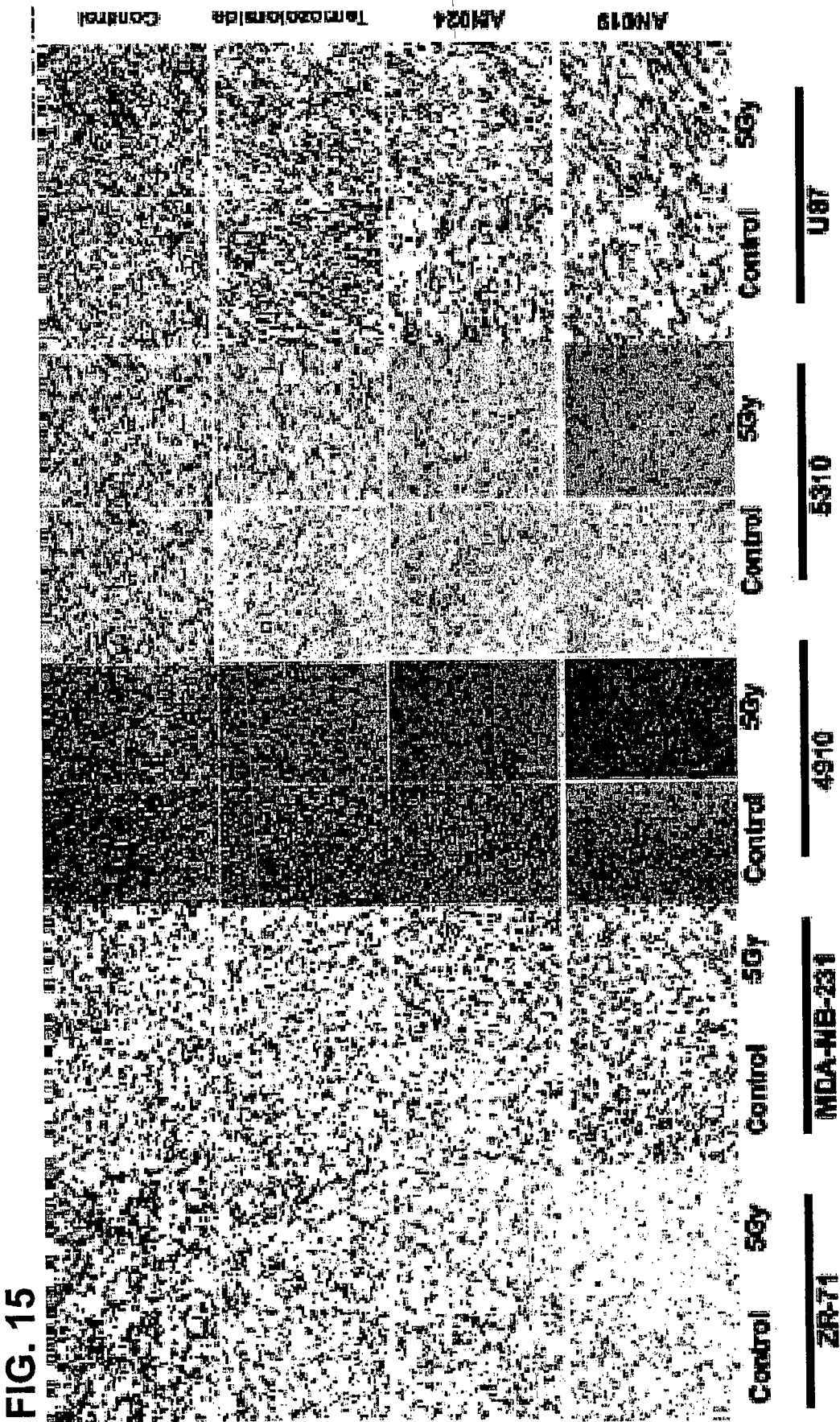
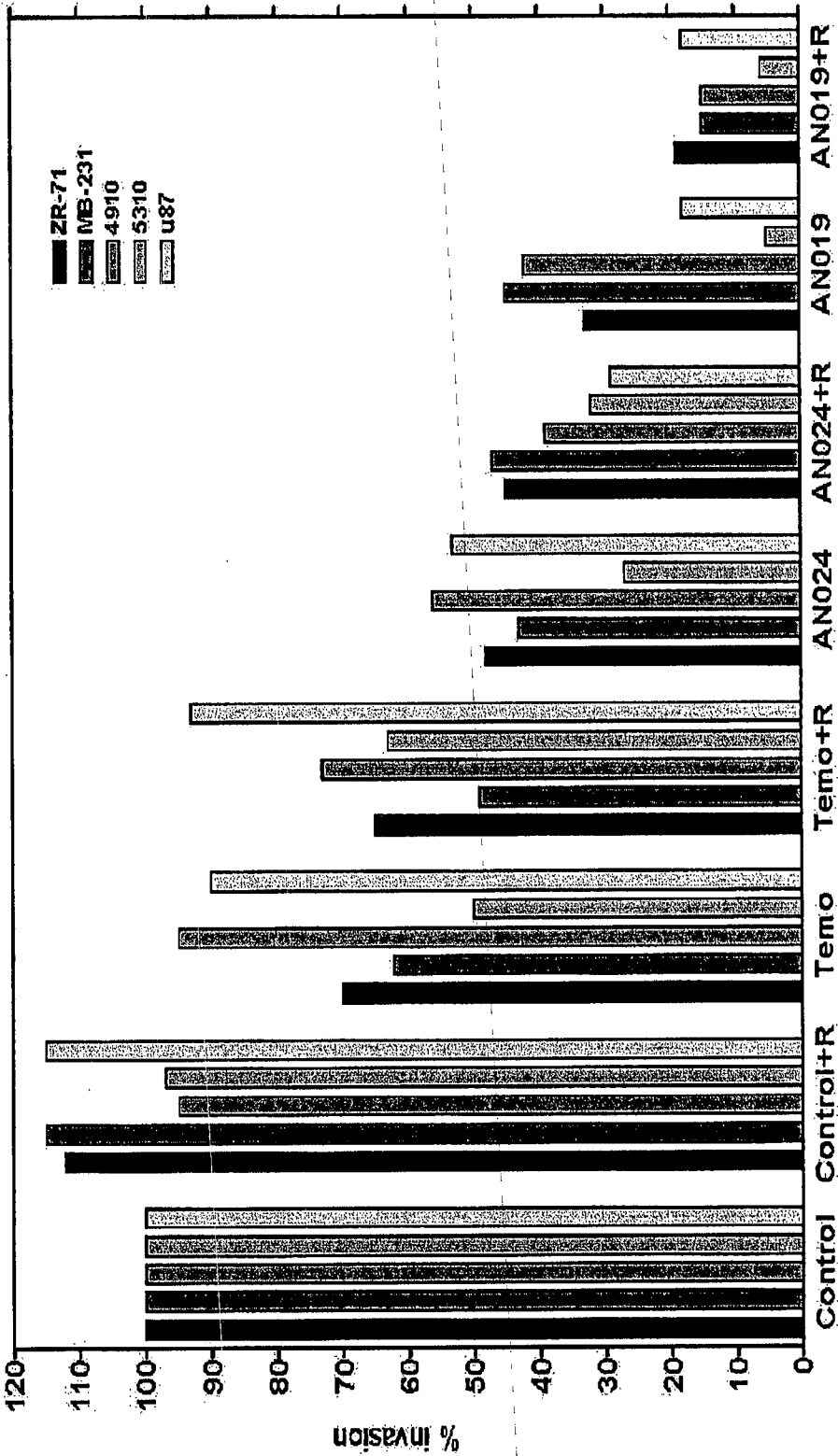


FIG. 16



20/25

FIG. 18

Western blot analysis



FIG. 19

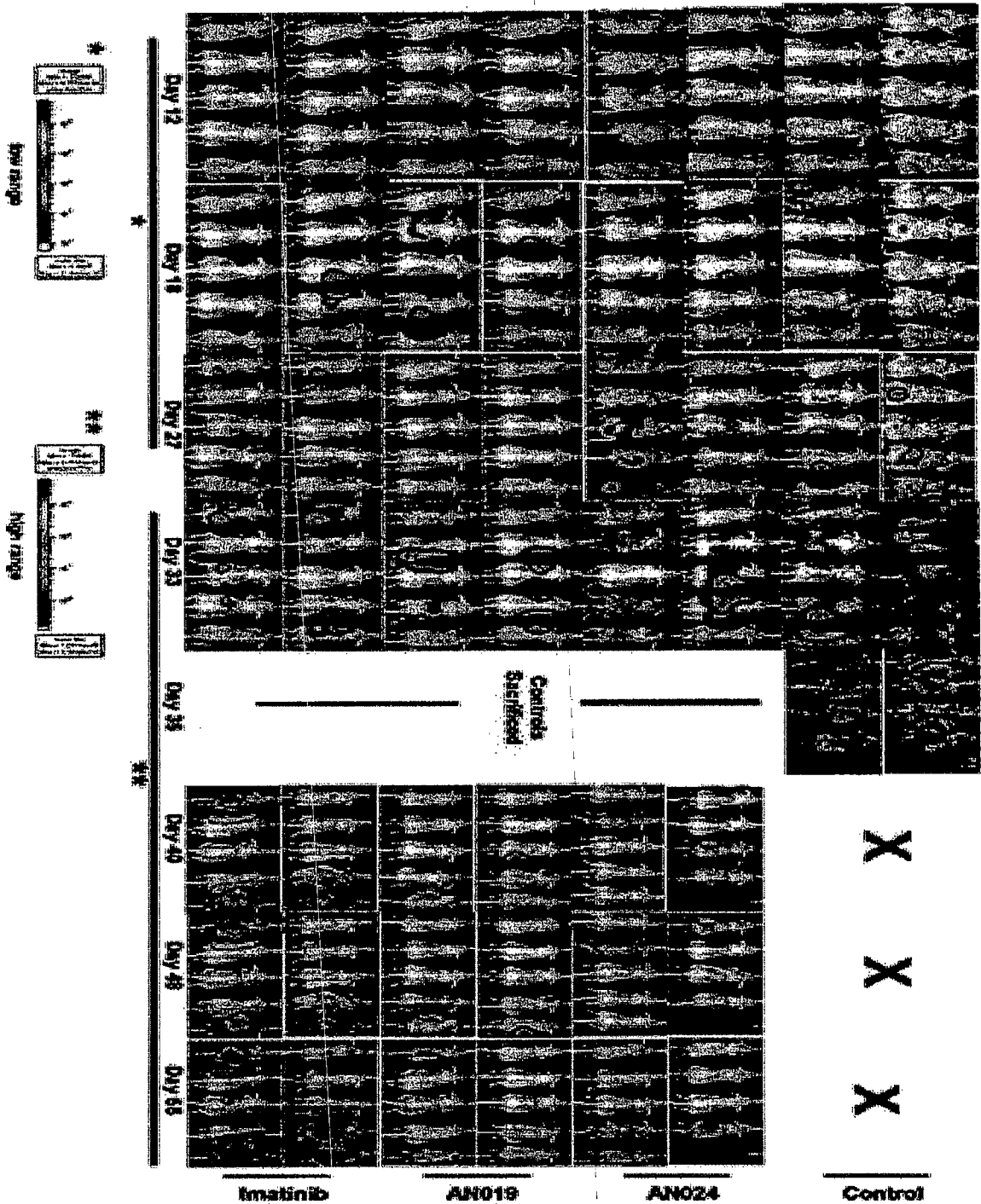
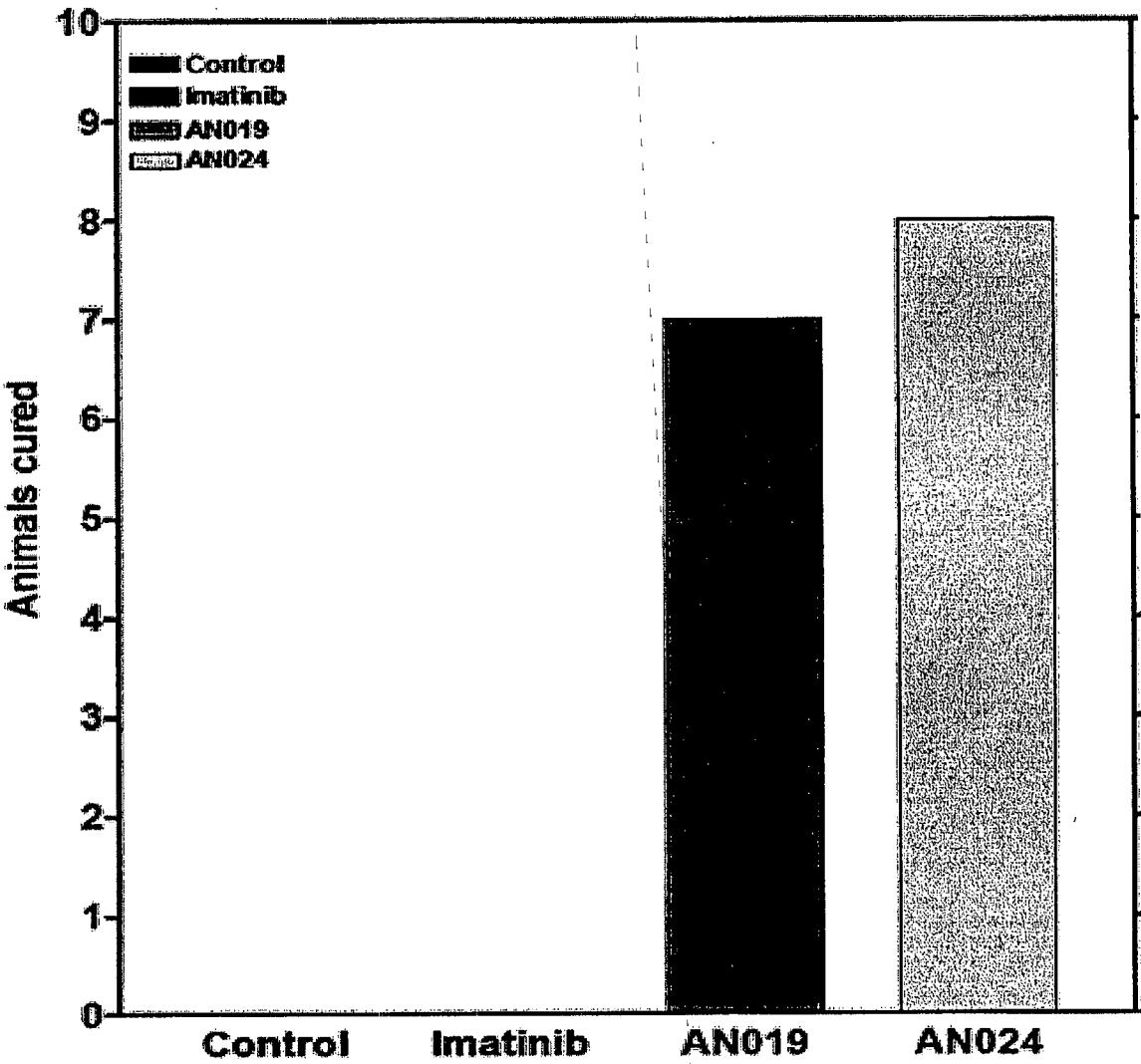


FIG. 20



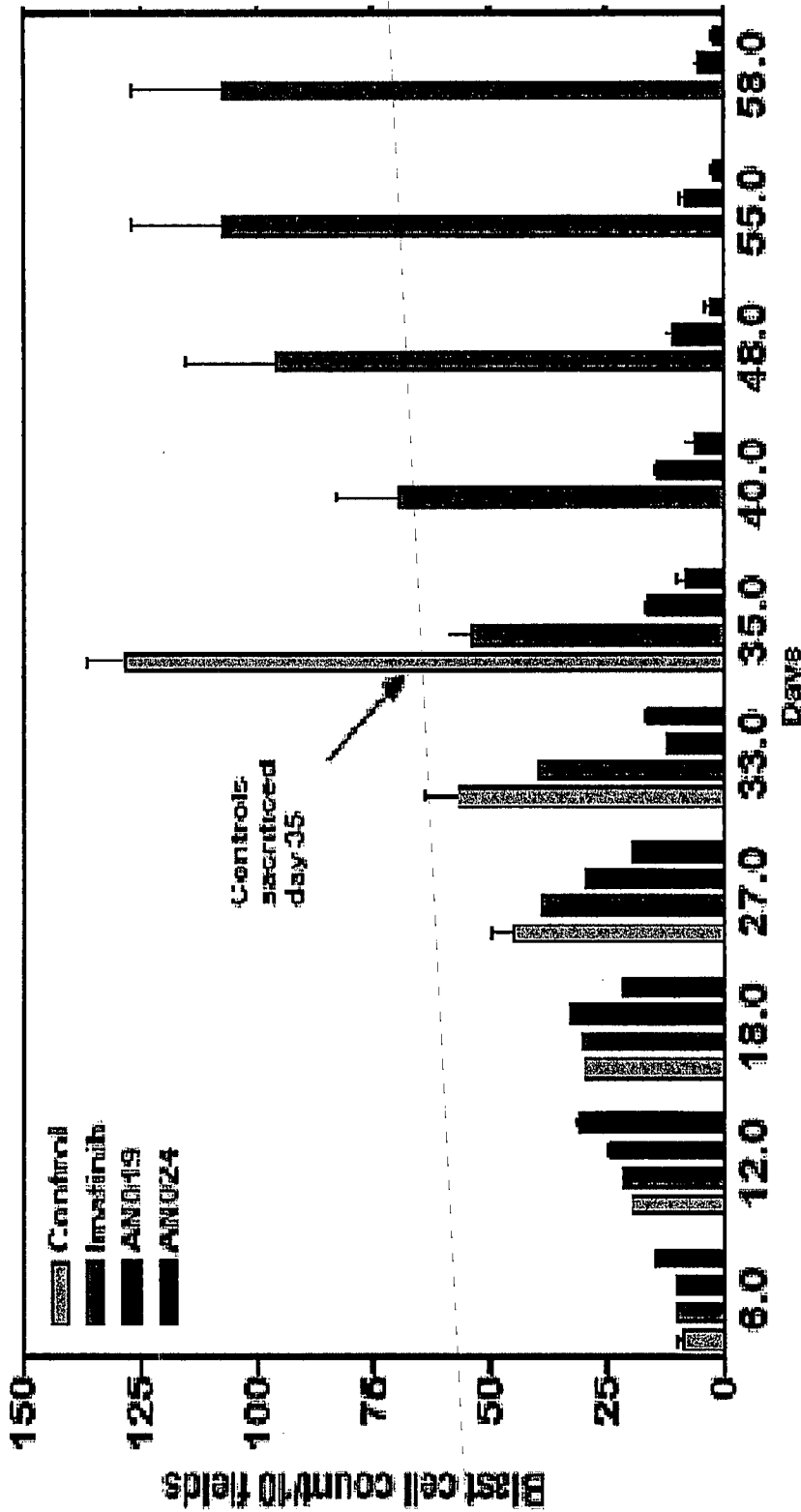


FIG. 21

FIG. 22

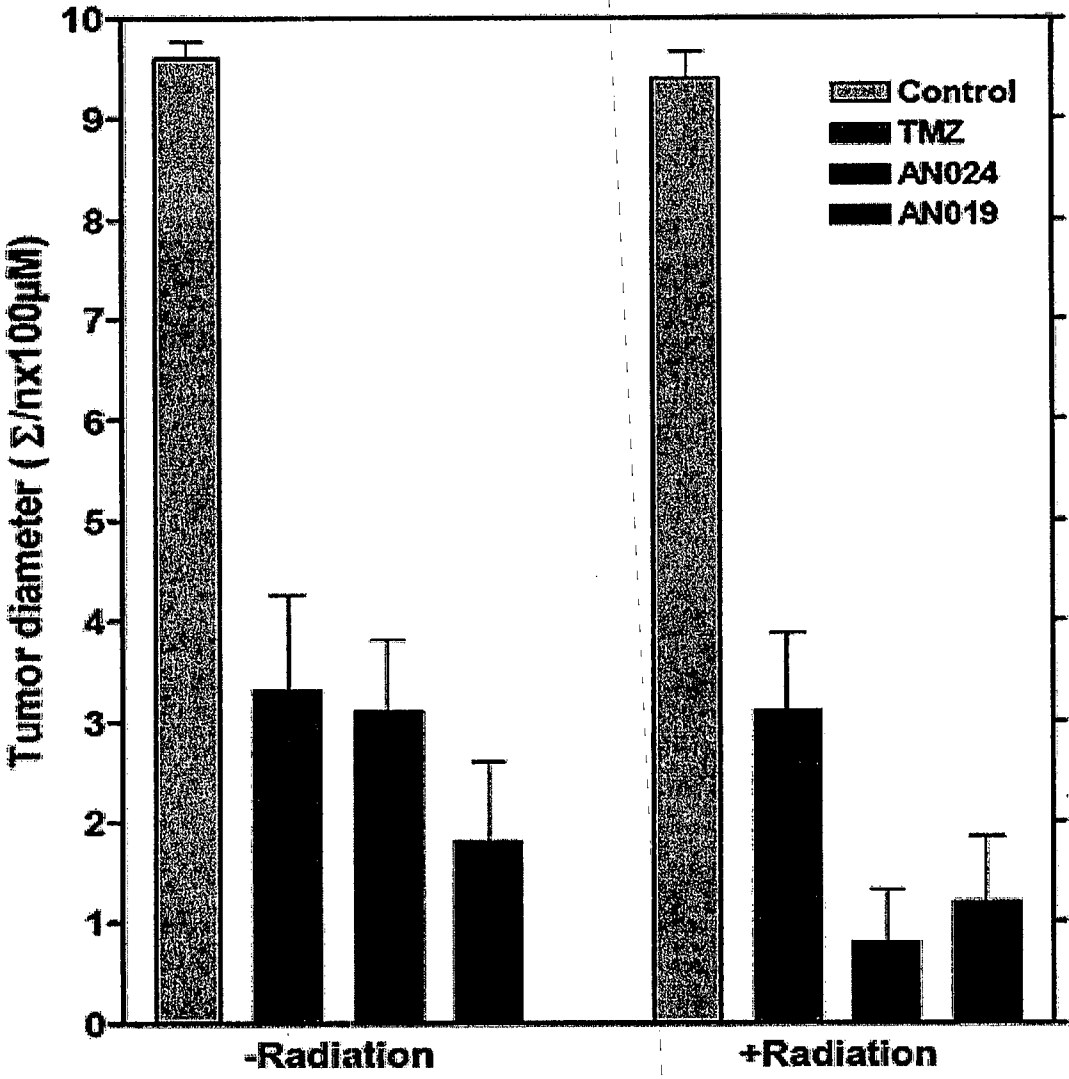
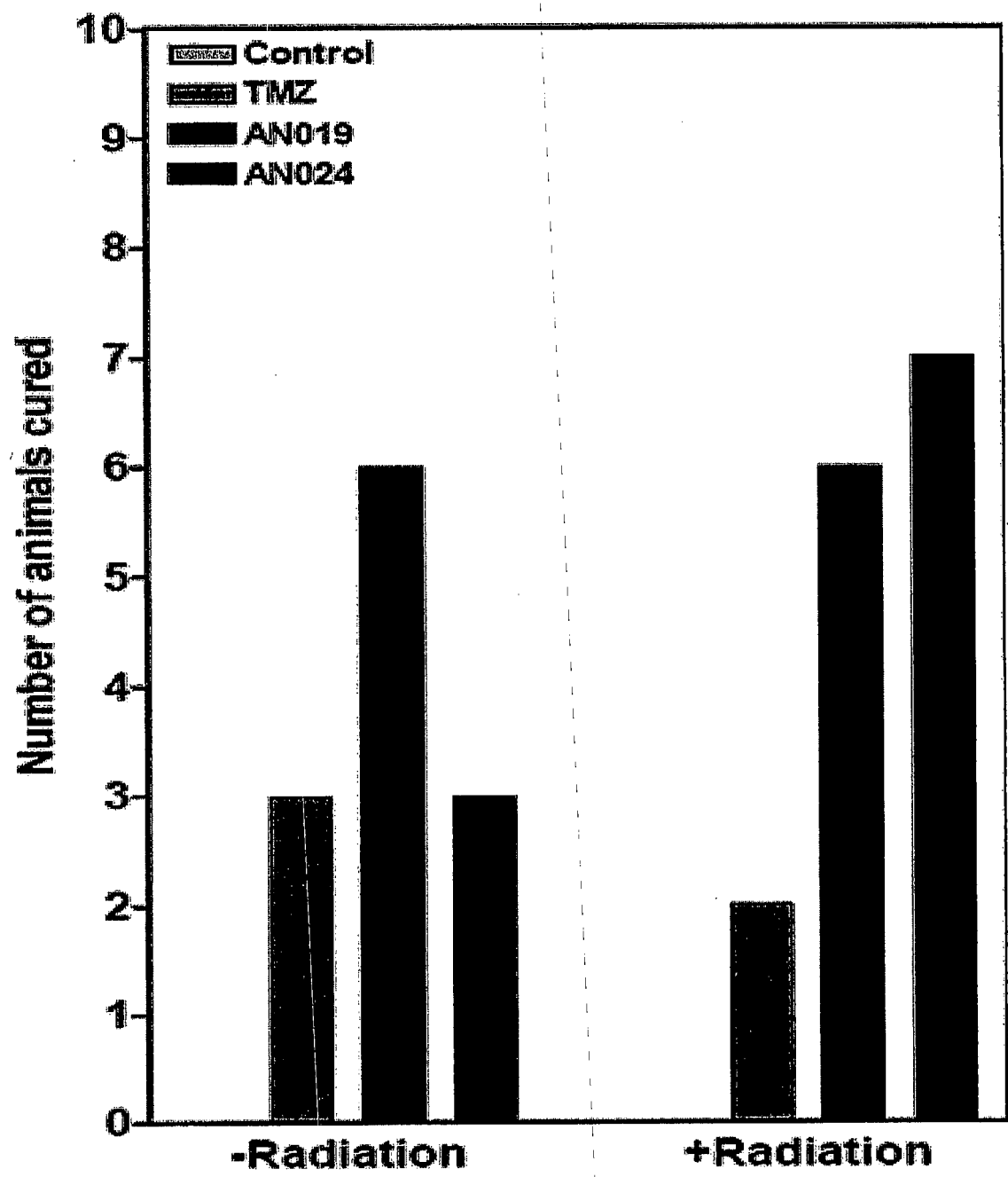


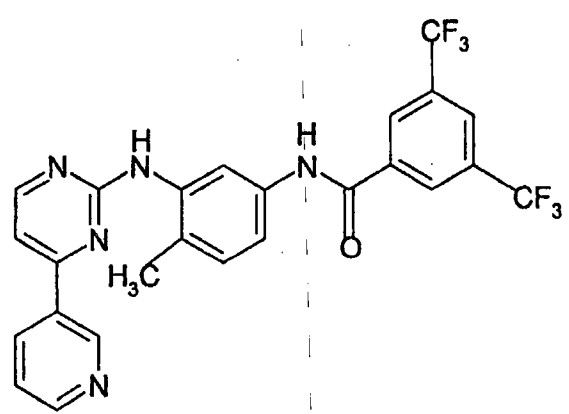
FIG. 23



FORMA CRISTALINA DE DERIVADO DE FENILAMINO PIRIMIDINA

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a una forma particular de la (3,5-bis-trifluorometil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)-fenil]-benzamida (fórmula I), a los procesos para la preparación de los mismos, a las composiciones farmacéuticas que contienen esta forma cristalina, y a su uso como agentes antitumorales en los seres humanos. El compuesto de la fórmula I, también conocido como AN-019 es:



Fórmula I
Código de desarrollo: AN-019

Antecedentes de la Invención

La preparación de la (3,5-bis-trifluorometil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)-fenil]-benzamida de la fórmula I, y el uso del mismo, especialmente como un agente antitumoral, se describen en los ejemplos 3 y 4 de

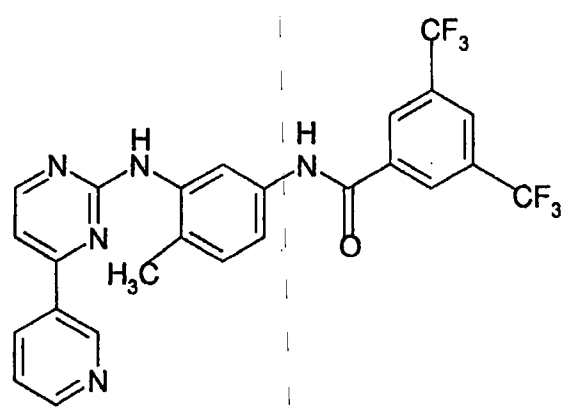
WO2006/027795 (PCT/IN05/00243 presentado el 19 de julio del 2005) que se publicó el 16 de marzo del 2006, y en las solicitudes correspondientes en numerosos otros países incluyendo EUA (Pub. No.: US 2007/0232633). En estas 5 publicaciones no se describe el polimorfismo.

Ahora se ha encontrado sorprendentemente que bajo ciertas condiciones una nueva forma polimórfica del compuesto de la fórmula I es formada, que se describe aquí posteriormente como la forma cristalina de Forma III, y que 10 tiene propiedades ventajosas.

Breve Descripción de la Invención

La presente invención se refiere a una forma particular de la (3,5-bis-trifluorometil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)+fenil]-benzamida (fórmula 15 I), a los procesos para la preparación de los mismos, a las composiciones farmacéuticas que contienen esta forma cristalina, y a su uso como agentes antitumorales en los seres humanos. El compuesto de la fórmula I, también conocido como AN-019 es:

20



25

En una modalidad, la presente invención se refiere a una forma cristalina de Forma III de (3,5-bis-trifluorometil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)-fenil]-benzamida (fórmula I), y donde la forma
5 cristalina de Forma III, tiene las características de XRPD listadas en la tabla 3, posterior. Esta forma cristalina puede tener un punto de fusión en o arriba de 240 °C. La forma cristalina puede ser esencialmente pura.

En una modalidad, la presente invención se refiere a
10 un método de tratamiento de un sujeto que tenga la necesidad de una terapia anti-proliferativa. Esta modalidad del método puede incluir la administración a un sujeto de una forma cristalina, de forma III, de la (3,5-bis-trifluorometil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)-fenil]-benzamida
15 (fórmula I), en donde la forma cristalina de Forma III, tiene las características de XRPD listadas en la tabla 3, posterior.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica. La composición farmacéutica incluye un excipiente farmacéuticamente aceptable y una forma
20 cristalina de Forma III, de la (3,5-bis-trifluorometil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)-fenil]-benzamida (fórmula I), en donde la forma cristalina de Forma III, tiene las características de XRPD listadas en la tabla 3, posterior.

La presente invención también se refiere al uso de
25 una forma cristalina de Forma III, de la (3,5-bis-

trifluorometil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)-fenil]-benzamida (fórmula I), en donde la forma cristalina de Forma III, tiene las características de XRPD listadas en la tabla 1 posterior para la producción de un medicamento anti-proliferativo para el tratamiento de un trastorno tumoral.

La presente invención se refiere a un proceso para la preparación de una forma cristalina de Forma III, (3,5-bis-trifluorometil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)-fenil]-benzamida (fórmula I), en donde la forma cristalina de Forma III, tiene las características de XRPD listadas en la tabla 3 posterior. Este proceso incluye el tratamiento del compuesto de la fórmula I en una forma cristalina de Forma I o de Forma II, con ácido acético o una mezcla de dimetil formamida y acetona, hexano o tolueno. Este proceso también puede incluir el tratamiento subsiguiente del compuesto tratado una vez con ácido acético, acetona, hexano, o tolueno.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una forma cristalina de Forma I, de la (3,5-bis-trifluorometil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)-fenil]-benzamida (fórmula I), en donde la forma cristalina de Forma I, tiene las características de XRPD listadas en la tabla 1, posterior.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a

una forma cristalina de Forma II de la (3,5-bis-trifluorometil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)-fenil]-benzamida (fórmula I), en donde la forma cristalina de Forma II, tiene las características de XRPD
5 listadas en la tabla 2, posterior.

Breve Descripción de las Figuras

La figura 1 muestra el diagrama de difracción de rayos X (XRD) de la forma cristalina de Forma I, del compuesto de la fórmula I. Los valores 2θ y las intensidades
10 son tabuladas en la tabla 1.

La figura 2 muestra el diagrama de difracción de rayos X (XRD) de la forma cristalina de Forma II, del compuesto de la fórmula I. Los valores 2θ y las intensidades son tabuladas en la tabla 2.

15 La figura 3 muestra el diagrama de difracción de rayos X (XRD) de la forma cristalina de Forma III, del compuesto de la fórmula I. Los valores 2θ y las intensidades son tabuladas en la tabla 3.

20 La figura 4 muestra un termograma de caloría de exploración diferencial (DSC) de la forma cristalina de Forma I, del compuesto de la fórmula I.

La figura 5 muestra un termograma de caloría de exploración diferencial (DSC) de la forma cristalina de Forma II, del compuesto de la fórmula I.

25 La figura 6 muestra un termograma de caloría de

exploración diferencial (DSC) de la forma cristalina de Forma III, del compuesto de la fórmula I.

La figura 7 muestra la morfología de la forma cristalina de Forma I, del compuesto de la fórmula I.

5 La figura 8 muestra la morfología de la forma cristalina de Forma II, del compuesto de la fórmula I.

La figura 9 muestra la morfología de la forma cristalina de Forma III, del compuesto de la fórmula I.

La figura 10A y la figura 10B ilustran que las
10 inyecciones intraperitoneales del compuesto de la fórmula I (ejemplo 1) provocaron la regresión de la leucemia en los ratones desnudos. Las muestras de la sangre extraídas de la vena de la cola revelaron un incremento en LGI en los controles y una reducción progresiva en LGI en los ratones
15 tratados con Imatinib y AN019 (figura 10A). El día 48 el LGI de los ratones tratados con Imatinib se determinó que va a ser de 20 ± 5 , mientras que el LGI de los ratones tratados con AN019 se encontró que va a ser de 10 ± 2 con un conteo de las células casi normal (figura 10B).

20 La figura 11 ilustra que las células tratadas con AN019 no mostraron ningún agrandamiento esplénico mientras que los ratones tratados con Imatinib mostraron un agrandamiento esplénico (ejemplo 2).

La figura 12 ilustra que la concentración de AN019 a
25 1 mg/kg no indujo una reducción en la expresión de la

luciferasa, mientras que 5 mg/kg provocaron la fijación de las células de leucemia a niveles de expresión constantes, y las concentraciones de 10 y 20 mg/kg provocaron una reducción en la expresión de la luciferasa.

5 La figura 13 ilustra que la administración oral de Imatinib (1, 5, 10 y 20 mg/kg) en los ratones desnudos con implantes de células de leucemia humanas K562 luc condujo a una regresión de la leucemia a concentraciones más elevadas. La administración de Imatinib a una concentración de 1 mg/kg
10 no indujo una reducción en la expresión de la luciferasa, mientras que las concentraciones de 10 mg/kg y 20 mg/kg mostraron un retardo de la expresión de la luciferasa.

La figura 14A, figura 14B, figura 14C ilustran los resultados de los estudios análogos a aquellos ilustrados en
15 las figuras 12 y 13 pero que emplean el fármaco de control Dasatinib (ejemplo 16).

La figura 15 y la figura 16 muestran los ensayos de invasión de matrigel *in vitro* de las células del glioma 4910, 5310 y U87 y las células del cáncer de mama MDAMB231 y ZR71
20 en la presencia de las concentraciones especificadas de AN-019, AN-024, con y sin radiación.

La figura 17 muestra el ensayo angiogénico *in vitro* de las células del glioma 4910, 5310 y U87 y las células del cáncer de mama MDAMB231 y ZR71 en la presencia de las concentraciones
25 especificadas de AN-019, AN-024, con y sin radiación.

La figura 18 muestra el análisis de Western Blot de las células del glioma 4910, 5310 y U87 y las células del cáncer de mama MDAMB231 y ZR71 en la presencia de las concentraciones especificadas de AN-019, AN-024, con y sin radiación.

5 La figura 19 muestra la expresión de luciferasa de los ratones con implantes de K562luc después del tratamiento con AN024, AN019 o Imatinib.

La figura 20 muestra el número de animales curados después del tratamiento con AN024 o AN019 en el día 58. El
10 tratamiento con el fármaco fue detenido el día 42, los animales continuaron mostrando un efecto curativo después del tratamiento con AN024 y AN019 después del retiro de tratamiento con el fármaco (datos basados en la luminiscencia).

La figura 21 muestra el conteo de hemocitoblastos de las
15 muestras de la sangre tomadas de los animales el día indicado. El tratamiento con el fármaco fue retirado el día 42. AN024 y AN019 mostraron una eficacia después del retiro del tratamiento con el fármaco. Imatinib se encontró que va a ser ineficaz.

La figura 22 muestra el análisis semicuantitativo de
20 los tumores intracraneales en los ratones desnudos después del tratamiento con TMZ, AN024 o AN019 con o sin radiación (5Gly).

La figura 23 muestra representaciones gráficas de los ratones desnudos que muestran la ausencia de tumores intracraneales después del tratamiento del fármaco con
25 AN-019, AN024 y sin tratamientos de radiación.

Descripción Detallada de la Invención

La tabla 1 muestra los valores 2θ y las intensidades de la forma del cristal, forma I, del compuesto de la fórmula 1 a partir del diagrama de difracción de rayos X (XRD) de la figura 1.

5

Tabla 1 (Forma I)

10

15

20

25

Ángulo [2-theta]	valor d, Angstroms	% de intensidad
6.793	13.00131	13.9
9.823	9.99680	3.9
11.106	7.96069	54.2
13.267	6.66829	48.5
16.386	5.40523	7.0
17.941	4.94015	11.3
18.997	4.66785	13.0
19.778	4.48530	50.5
21.894	4.05635	100.0
22.396	3.96650	20.5
23.469	3.78750	19.7
24.466	3.63545	32.4
24.939	3.56759	52.6
25.525	3.48695	14.6
26.968	3.30351	10.3
28.777	3.09991	22.0
30.545	2.92436	14.8
33.011	2.71129	11.0

5

10

15

20

25

5

10

15

20

25

85

Tabla 3 (Forma III) (Cont.)

	Angulo [2-theta]	valor d, Angstrom	% de intensidad
	26.500	3.36079	3.3
5	27.517	3.23887	3.4
	29.476	3.02788	6.8
	29.857	2.99011	8.6
	30.474	2.93102	3.5
	32.886	2.72133	3.2
10	33.559	2.66829	5.0
	35.916	2.49836	3.8
	39.645	2.27157	4.9
	43.061	2.09893	2.6
	43.748	2.06753	3.8
15	44.055	2.05383	3.9

La forma cristalina de Forma III, del compuesto de la fórmula I está caracterizado por cristales con forma de aguja. Las formas cristalinas, forma I y forma II, del compuesto de la fórmula I están caracterizadas por cristales que no tienen forma de aguja.

Las formas cristalinas, forma I y forma II, del compuesto de la fórmula I son metaestables a temperatura ambiente. Sin embargo, la forma cristalina de Forma III, del compuesto de la fórmula I, es la forma termodinámicamente

estable a temperatura ambiente. Esto es indicativo de la estabilidad más grande de la forma cristalina de Forma III.

En consecuencia, en una modalidad la presente invención proporciona una forma cristalina de Forma III, del compuesto de la fórmula I que es estable a temperatura ambiente y aún a temperaturas más elevadas (por ejemplo, 120 °C) y condiciones de tensión acelerada, y que tienen las características dadas en la tabla 3 (anterior).

En una modalidad, la presente invención proporciona un proceso para la preparación de la forma cristalina de Forma III, del compuesto de la fórmula I que es estable y que tiene las características dadas en la tabla 3.

La tabla 4 muestra la estabilidad con calentamiento de la forma cristalina de Forma III, a las temperaturas de 110-140 °C. La forma III se muestra que va a ser no metaestable y estable cuando se calienta a 130 °C durante 6 horas.

La forma cristalina de Forma III pura (1 g) preparada por el presente proceso se coloca en un tubo para ebullición y se calienta gradualmente en un baño de aceite. Luego, La substancia fue examinada por XRPD. Los resultados son tabulados en la tabla 4.

Tabla 4

Contenido del polimorfo* antes del calentamiento	Temperatura	Tiempo de calentamiento (horas)	Forma detectada del polimorfo* después del calentamiento
Forma III	110 °C	6	Forma III
Forma III	120 °C	6	Forma III
Forma III	130°C	6	Forma III

* La presencia de la forma I y de la forma II estuvo abajo del nivel de detección en estos ejemplos.

Esto demuestra que la forma cristalina de Forma III, no fue metaestable. La forma cristalina de Forma III, fue estable con respecto al calentamiento aún a 130 °C durante 6 horas.

La tabla 5 muestra la estabilidad de la forma cristalina de Forma III, bajo condiciones de tensión acelerada (45 ± 2 °C, 75 ± 5 % RH, 6 meses) en la formulación de la cápsula y del material a granel.

Tabla 5 - Estabilidad de la forma cristalina de Forma III, en el material a granel y la cápsula formulada.

Contenido del polimorfo* de la fórmula I en la cápsula formulada	Contenido del polimorfo* del compuesto a granel de la fórmula I	Duración del almacenamiento (meses) a 40±2 °C/75±5 % RH
Forma del polimorfo detectada	Forma del polimorfo detectada	
Forma III	Forma III	0 meses
Forma III	Forma III	1 mes
Forma III	Forma III	2 meses
Forma III	Forma III	3 meses
Forma III	Forma III	6 meses

* La presencia de la forma I y de la forma II estuvo abajo del nivel de detección en estos ejemplos.

Estos datos demuestran que la forma III no es convertida a otras formas durante un período de tiempo. La
5 estabilidad de la forma III en el material a granel y en la cápsula formulada fue establecida así.

En una modalidad, la presente invención proporciona una composición farmacéutica útil para la terapia tumoral que contiene la forma cristalina de Forma III, estable, del
10 compuesto de la fórmula I.

La forma de dosificación de la formulación que contiene la forma cristalina de Forma III, estable, que puede ser preparada por el proceso de la presente invención, por ejemplo, una forma de dosificación oral, puede ser una
15 cápsula que contiene la composición, por ejemplo, una composición sólida pulverizada o granulada, dentro de una capa externa ya sea dura o blanda. La capa externa se puede hacer de gelatina que contiene opcionalmente un plastificante, tal como glicerina o sorbitol, y un agente
20 opacificante o colorante.

Los métodos conocidos en el arte pueden ser utilizados para preparar la composición farmacéutica que contiene la forma cristalina de Forma III, en la forma de las cápsulas. Los excipientes que pueden ser empleados incluyen
25 celulosa microcristalina, poloxámero 407, crospovidona XL,

Aerosil, SLS, estearato de magnesio, o mezclas de los mismos.

La tabla 6 muestra las cantidades adecuadas de los ingredientes activos y de los excipientes (% en peso) para las presentes formulaciones farmacéuticas.

5 Tabla 6 - Una modalidad de una composición farmacéutica que contiene la forma cristalina de Forma III

10

15

No. muestra	Material	Composición (p/p) mg/cápsula
1	Compuesto de la fórmula I, forma III	25.0
2	Celulosa microcristalina	8.0
3	Poloxámero 407	12.5
4	Crospovidona XL	12.5
5	Estearato de magnesio	0.5
6	SLS	4.0
7	Aerosil	0.25

20

25

En una modalidad, la invención se refiere a una forma cristalina de Forma III, esencialmente pura, particular de la (3,5-bis-trifluorometil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)-fenil]-benzamida (fórmula I). El término "esencialmente pura" se entiende en el contexto de la presente invención que significa que aproximadamente 90 a 100 % en peso, aproximadamente 95 hasta 100 % en peso, o, por ejemplo, aproximadamente 99 hasta 100 % en peso de los cristales de la fórmula I están presentes en la forma

cristalina de acuerdo con la invención, por ejemplo, la forma cristalina de Forma III.

En el contexto del establecimiento de que la forma cristalina de Forma III, de la fórmula I exhibe un diagrama de difracción de rayos X esencialmente como en la figura 3, el término "esencialmente" significa que al menos las líneas principales del diagrama mostrado en la figura 3 es decir aquellas que tienen una intensidad de la línea relativa de más del 10 %, especialmente más del 20 %, cuando se compara con la línea más intensa en el diagrama, están presentes.

Las formas cristalinas tienen las siguientes propiedades:

El punto de fusión en el termograma de DSC de la forma cristalina de Forma III, es de 246.7 °C. El punto de fusión en el termograma de DSC de la forma cristalina de Forma I, es de 234 °C y de la forma cristalina de Forma II, es de 240.47 °C, 249.2 °C (pico).

Los diagramas de difracción de rayos X también muestran otras diferencias marcadas. En una modalidad, la forma cristalina de Forma III, esencialmente pura, del compuesto de la fórmula I muestra el diagrama de difracción de rayos X indicado en la figura 3.

En una modalidad, la invención se refiere a la forma cristalina de Forma III, del compuesto de la fórmula I, que está caracterizada por la presencia de cristales que exhiben

la forma mostrada en la figura 9, por ejemplo, la forma cristalina de Forma III, en la forma esencialmente pura.

En una modalidad, la forma cristalina de Forma III, del compuesto de la fórmula I tiene un punto de fusión más
5 elevado que 240 °C, por ejemplo, entre 245 y 250 °C.

La forma cristalina de Forma III, (por ejemplo, esencialmente pura) se puede obtener por el siguiente método. El tratamiento de otra forma cristalina, por ejemplo, la forma cristalina de Forma I o forma-II, del compuesto de la
10 fórmula I, con un solvente polar adecuado, por ejemplo, N,N-di-alquilo inferior-alcanocarboxamida inferior, tal como N,N-dimetilformamida o N,N-dimetilacetamida, o por ejemplo, un ácido carboxílico alifático tal como ácido acético, o una mezcla del anterior con una cetona, tal como acetona, o un
15 hidrocarburo hidrofóbico, por ejemplo, tolueno o hexano, o una mezcla de los mismos, a una temperatura adecuada.

En una modalidad, el compuesto de la fórmula I es tratado con una mezcla de dimetil formamida y acetona seguido por el tratamiento en acetona. En una modalidad, el compuesto
20 de la fórmula I es tratado con una mezcla de dimetil formamida y hexano seguido por el tratamiento en hexano. En una modalidad, el compuesto de la fórmula I es tratado con una mezcla de dimetil formamida y tolueno seguido por el tratamiento en tolueno. En una modalidad, el compuesto de la
25 fórmula I se trata una o más veces con ácido acético. En este

contexto, el tratamiento o una etapa de tratamiento se refiere al calentamiento, enfriamiento, reflujo, lavado, suspensión, o semejantes en el solvente o mezcla de solventes. Estas modalidades cada una proporcionan la forma
5 cristalina de Forma III, del compuesto de la fórmula I.

En ciertas modalidades, el presente método de producción de la forma cristalina de Forma III, no incluye el tratamiento de otra forma cristalina del compuesto de la fórmula I con cloroformo, metanol, diclorometano, éter (por
10 ejemplo, éter dietílico), agua, acetato de etilo, o una mezcla de los mismos. En ciertas modalidades, la forma cristalina de Forma III, no fue producida por el tratamiento de otra forma cristalina del compuesto de la fórmula I con cloroformo, metanol, diclorometano, éter (por ejemplo, éter
15 dietílico), agua, acetato de etilo, o mezclas de los mismos.

La forma cristalina de Forma III, del compuesto de la fórmula I así como otras formas, poseen propiedades farmacológicas útiles y pueden ser utilizadas, por ejemplo, como agentes antitumorales.

20 La presente invención también incluye un método de preparación del compuesto de la fórmula I. Este método puede incluir:

proporcionar un compuesto de la fórmula VI, el cloruro de 3,5-bis trifluoro metil benzoilo; o la preparación
25 de este compuesto por los métodos conocidos;

condensar 4-metil-3-nitro-anilina con el compuesto de la fórmula (IV) en aproximadamente 0 hasta aproximadamente -10 °C en un solvente de clorohidrocarburo con la adición de un compuesto básico para obtener un compuesto de la fórmula
5 III, la ((3,5-bis-trifluorometil)-N-(4-metil-3-nitrofenil)-benzamida;

reducir el compuesto de la fórmula (III) con cloruro estañoso/HCl concentrado a la temperatura de reflujo durante aproximadamente 0.5 hasta aproximadamente 1 hora para obtener
10 un compuesto de la fórmula IV, la (3,5-bis-trifluorometil)-N-(3-amino-4-metilfenil)-benzamida;

condensar el compuesto de la fórmula IV con cianamida acuosa a la temperatura de reflujo en un solvente de n-butanol para obtener un compuesto de la fórmula V, (3,5-
15 bis-trifluorometil)-N-(3-guanidinio-4-metilfenil)-benzamida;

condensar el compuesto de la fórmula (V) con 3-dimetilamino-1-piridin-3-il-propenona en la presencia de una base a la temperatura de reflujo para obtener el compuesto de la fórmula (I).

20 En una modalidad, el método es efectuado como se describe en el ejemplo 10.

Las descripciones de la solicitud de patente U.S. No. 11/714,565, presentada el 5 de marzo del 2007 (publicación U.S. No. US 2007/0232633, publicada el 4 de
25 octubre del 2007) y de la solicitud PCT No. PCT/IN

2005/000243, presentada el 19 de julio del 2005 (publicación PCT No. WO2006/027795, publicada el 16 de marzo del 2006) son incorporadas para referencia aquí en su totalidad.

Las modalidades de la presente invención son descritas en los ejemplos dados posteriormente, que son provistas para ilustrar la invención solamente y por lo tanto las mismas no van a ser interpretadas como limitativas del alcance de la invención.

EJEMPLOS

10 Nota general

El compuesto principal de esta invención de la fórmula I (indicado por el código de desarrollo AN-019) se encontró que exhibe una actividad antitumoral útil superior a algunos de los fármacos aprobados existentes de esta clase.

15 Este compuesto se encontró que exhibe tres formas polimórficas distintas, las formas I, II y III como se describió anteriormente. Aunque todas las formas exhiben propiedades farmacológicas valiosas y pueden ser utilizadas como agentes antitumorales, la forma III fue elegida para la
20 evaluación de la actividad biológica con base en su estabilidad termodinámica. El código de desarrollo AN-024 se refiere a otro compuesto de la misma clase descrito en otra parte por los inventores. La bio-eficacia y la actividad de los compuestos de esta invención ha sido comparada con los
25 fármacos aprobados semejantes al mesilato de Imatinib y

Dasatinib para que sirvan como controles positivos en este estudio. El "mesilato de Imatinib" ha sido abreviado y referido como "Imatinib" en este estudio.

Ejemplo 1- Establecimiento de la actividad de anti-CML de AN-019 en los ratones desnudos con implantes de células k562
(figuras 10A y 10B)

Para determinar la actividad anti-CML de los compuestos de esta invención, las células K562 fueron obtenidas del ATCC y los ratones desnudos recibieron implantes con estas células. Como un control, el Imatinib fue utilizado a la misma concentración por kg de peso corporal para comparación. El tratamiento del fármaco se inició 15 días post-implante y durante 48 horas con inyecciones ip diariamente de 10 mg/kg. La sangre fue extraída de la vena de la cola cada 6/o. día, el porcentaje de las células K562 fue determinado y se calculó el porcentaje del índice del crecimiento de la leucemia (LGI, por sus siglas en inglés).

Los ratones tratados con AN019 mostraron una declinación permanente en LGI después del inicio del tratamiento con el fármaco. El LGI para los ratones tratados con Imatinib también mostró una declinación pero retrasada significativamente para los ratones tratados con AN019. Cuarenta y ocho días después de las inyecciones de ip continuas, los ratones tratados con AN019 fueron comparables con los ratones de control normales, y los ratones tratados

con Imatinib mostraron una LGI de 20 ± 5 cuando se compara con los controles. La inmunohistoquímica del bazo para la proteína Crk reveló la localización de las células K562 en el bazo en los ratones de control. Los ratones tratados con AN019 mostraron niveles basales de la expresión de Crk, mientras que los ratones tratados con Imatinib mostraron pocas colonias con niveles de expresión de Crk desde bajos hasta indetectables.

Métodos

10 **Implantación de K562**

A los ratones desnudos (nu/nu) se les implantaron células K562 (1×10^6) por medio de la vena de la cola. Cuatro ratones fueron utilizados por grupo y divididos en cuatro grupos. Tres grupos recibieron implantes de células K562 y un grupo fue utilizado como los controles normales. El grupo 2 fue inoculado con las células K562 y sirvió como controles positivos no tratados. Dos de otros grupos con implantes de células K562 fueron tratados ya sea con Imatinib o AN019.

20 **Inyección IP de AN019 e Imatinib**

Los ratones con implantes de K562 fueron tratados ya sea con Imatinib o con AN019 (10 mg/kg de peso corporal) por medio de inyecciones intraperitoneales. Las soluciones en almacenamiento de Imatinib y AN019 se hicieron a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en DMSO. Los ratones fueron

inyectados por medio de una ruta intraperitoneal a la dosificación mencionada anteriormente. El peso promedio de los ratones desnudos se determinó que va a ser de 30 ± 3 g, y la dosificación por ratón se calculó que va a ser de 300 ± 30 5 $\mu\text{g/ratón}$. Tres microlitros de las soluciones en almacenamiento se diluyen hasta 100 μl justo previo a las inyecciones ip. Las inyecciones ip fueron llevadas a cabo diariamente desde el día 15 post-implante hasta el día 48 con un total de 33 inyecciones.

10 **Determinación del índice de crecimiento de leucemia (LGI)**

El índice de crecimiento de leucemia se determinó utilizando la fórmula $\text{LGI (\%)} = (V_c - V_t) / V_c \times 100 \%$. V_c es el número de hemocitoblastos promedio (K562) por ml de sangre en los animales de control en un cierto tiempo de la medición, y 15 V_t es el número de hemocitoblastos promedio por ml de sangre en los animales de prueba en un cierto tiempo de la medición. La sangre fue extraída de los ratones (tratados y no tratados) durante el sexto día post-implante de las células K562 y seguido por un intervalo cada seis días durante 48 20 días. La sangre fue extraída por medio de la vena de la cola. El análisis cuantitativo de LGI fue representado gráficamente.

Inmunocitoquímica

Los ratones de control se sacrificaron el día 42 25 cuando los síntomas secundarios de la leucemia fueron

observados, tales como la hinchazón abdominal y la falta de circulación en los sistemas periféricos que causan pérdida de dedos con puntos rojos bajo la superficie de la piel. Los tumores del bazo y cualesquiera tumores secundarios fueron recolectados, fijados en formaldehído y sumergidos en parafina como por los protocolos estándares. La sección de parafina fue obtenida y procesada para inmunocitoquímica. Las secciones rehidratadas se trataron con 0.3 % de H_2O_2 para inactivar cualesquiera peroxidasas naturales previo al

10 inmuño-sondeo. Las secciones fueron bloqueadas con un filtro esterilizado (0.22 μm) con BSA-PBS al 1 % a temperatura ambiente durante 1 h. Después del bloqueo, las secciones fueron inmuño-sondeadas con un anticuerpo primario monoclonal de anti-Crk específico, humano, realizado en el conejo contra

15 un péptido sintético correspondiente a los residuos en el dominio SH2, cerca de la terminación N de la proteína CrkL humana (Abcam, Cambridge, MA, USA) en BSA-PBS al 1 % toda la noche. El anticuerpo secundario (de anti-conejo) conjugado con HRP se utilizó para detectar la presencia del anticuerpo

20 primario. Las secciones se enjuagaron brevemente tres veces en una solución de PBS después del inmuño-sondeo con el anticuerpo secundario, y se agregó el sustrato de DAB HRP siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma St Louis MO EUA). La reacción se deja proceder hasta que se observa un

25 contraste agudo entre los controles positivos y negativos.

Para los controles negativos el anticuerpo primario fue eliminado. El bazo de los ratones leucémicos sirvió como los controles positivos.

Resultados

5 Las inyecciones intraperitoneales de AN019 provocaron la regresión de la leucemia en los ratones desnudos. Las muestras de sangre tomadas cada sexto día post-implante indicaron un incremento en LGI en los controles cuando se compara con los ratones no tratados. Las muestras
10 de la sangre extraídas de la vena de la cola revelaron un incremento en LGI en los controles y una reducción progresiva en LGI en los ratones tratados con Imatinib y AN019 (figura 10A). Desde el quinceavo día post-implante, los ratones fueron provistos con inyecciones intraperitoneales de AN019 o
15 Imatinib a una dosificación de 10 mg/kg de peso corporal. Los ratones tratados con Imatinib se quedaron rezagados con respecto a los ratones tratados con AN019 en cada punto de los datos. El día 48 el LGI de los ratones tratados con Imatinib se determinó que va a ser de 20 ± 5 , mientras que el
20 LGI de los ratones tratados con AN019 se encontró que va a ser de 10 ± 2 con un conteo de células casi normal (figura 10B).

Ejemplo 2 - Las inyecciones de AN019 de los ratones desnudos con implantes de células K562 no muestran un agrandamiento esplénico ni alguna expresión de Crk (figura 11)

25 Los ratones desnudos con implantes de células K562

se trataron con Imatinib o AN019 por medio de inyecciones ip. Los ratones se sacrificaron después que una reducción en el LGI fue observado y se recolectó el bazo. El agrandamiento esplénico fue observado a simple vista y se determinó que los ratones de control mostraron un bazo agrandado indicativo de la localización celular de K562. Las células tratadas con AN019 no mostraron ningún agrandamiento esplénico mientras que los ratones tratados con Imatinib mostraron un agrandamiento esplénico ligero (figura 11). Las secciones de parafina del bazo inmuno-sondeado para verificar la presencia de la proteína Crk mostraron una localización fuerte de la expresión de Crk acompañada con una densidad celular incrementada indicativa de la localización de K562 en los ratones de control. Los ratones tratados con AN019 mostraron una expresión solamente al nivel basal de la expresión de Crk comparable con el control negativo. Los ratones tratados con Imatinib indicaron regiones de expresión localizadas, de la expresión de Crk, indicativas de las células de K562 en el bazo. Los ratones de control también desarrollaron tumores subcutáneos aleatorios que muestran la expresión de Crk, indicativa de la presencia de las células K562.

De estos resultados es evidente que el tratamiento con AN019 provocó la regresión de LGI en los ratones desnudos. Los ratones tratados con Imatinib también mostraron una reducción significativa en LGI pero distanciada con

respecto a los ratones tratados con AN019. Tanto los ratones tratados con AN019 como con Imatinib no mostraron una anormalidad fisiológica, fenotípica o del comportamiento. Los ratones de control mostraron la presencia de los tumores subcutáneos aleatorios con una pérdida de dedos acompañada con puntos rojizos bajo la piel y un agrandamiento ligero del abdomen. De estos resultados, es evidente que AN019 proporciona un fármaco terapéutico promisorio para el tratamiento de la leucemia.

10 **Ejemplo 3 - Estudios in vivo utilizando líneas celulares de CML de murino resistentes a Baf3 Imatinib**

Para determinar la actividad anti-leucémica *in vivo* de AN019 y AN024, los ratones desnudos recibieron implantes intraperitonealmente de células de leucemia Baf3 de murino (Wt, T315I, M351T, y E225K), y 15 días después del implante los ratones se trataron con Imatinib (10 mg/kg), AN019 (20 mg/kg), y AN024 (20 mg/kg) por cebadura oral o inyecciones ip. Las muestras de la sangre se obtuvieron a partir de la vena de la cola o por medio de la vena femoral cada 6/o. día y los hemocitoblastos se contaron y se representaron gráficamente.

Las muestras de la sangre de los ratones con implantes de Baf3Wt tratados con Imatinib (10 mg/kg), AN019 (20 mg/kg), y AN024 (20 mg/kg) fueron semejantes a los controles normales después de 42 días.

Las muestras de la sangre de los ratones con implantes de Baf3Wt315I tratados con Imatinib (10 mg/kg), AN019 (20 mg/kg), y AN024 (20 mg/kg) mostraron una reducción significativa en el conteo de hemocitoblastos en los ratones
5 tratados con AN024 y AN019. Los ratones tratados con una dosificación oral de Imatinib no mostraron una reducción en el conteo de los hemocitoblastos y fueron semejantes a los controles no tratados y los ratones con implantes de Baf3M351T.

10 Los ratones con implantes de Baf3E255K también se comportaron de manera semejante a los ratones con implantes de Baf3M351T y con Baf3T315I.

Los ratones desnudos con implantes de células mutantes de Baf3, Wt, E255K, T315I, y M351T se trataron con
15 Imatinib, AN019 y AN024 (oralmente e ip). Brevemente, los ratones se trataron con Imatinib (10 mg/kg), AN019 (20 mg/kg), y AN024 (20 mg/kg) por cebadura oral o por inyecciones ip 15 días post-implante. La hinchazón abdominal y la reducción en la actividad se verificaron diariamente,
20 las muestras de la sangre se toman por medio de la vena de la cola o de la vena femoral cada 6/o. día y se tiñeron con H&E como por los protocolos estándares. 42 días después del implante, los ratones se sacrificaron y se colectaron los bazos. El agrandamiento esplénico se determinó y estuvo
25 correlacionado con el conteo de los hemocitoblastos de la

muestra de sangre.

Resultados

Determinación microscópica del conteo de los hemocitoblastos

La sangre de la vena de la cola o de la vena femoral se toma cada 6/o. día de los ratones con implantes de células Baf3 hasta el día 42. El día 15/o. post-implante, los ratones fueron provistos con tratamientos de Imatinib, AN019 y AN024 (oralmente e ip) como se describió previamente. Se observó que en los ratones con implantes de Baf3Wt, la reducción progresiva en el conteo de los hemocitoblastos fue observado en todas las condiciones de tratamiento. Baf3M351T, T315I y E225K no respondieron bien a los tratamientos con Imatinib. La administración oral de Imatinib no tuvo un efecto significativo en los ratones con implantes de Baf3M351T, T315I y E225K. Los tratamientos intraperitoneales totales con AN024 y AN019 fueron significativamente mejores en la reducción del conteo de los hemocitoblastos en todos los ratones con implantes de Baf3.

El tratamiento con AN019 en los ratones con implantes de Baf3Wt indujo una regresión completa de los hemocitoblastos leucémicos y fue comparable con los controles no tratados. Los tratamientos intraperitoneales fueron superiores a los tratamientos orales. El tratamiento con AN019 en los ratones con implantes de Baf3 M351T, T315I y E225K mostró una reducción significativa en el conteo de los

hemocitoblastos y fue comparable con los ratones tratados post-implante el 12/o. día 2 ip en el día 42; los ratones tratados ip mostraron una regresión más grande de los hemocitoblastos que los ratones tratados oralmente. El
5 tratamiento con AN024 en los ratones con implantes de Baf3 M351T, T315I y E225K mostró una reducción significativa en el conteo de los hemocitoblastos y fue superior al tratamiento con AN019 en el día 42; los ratones tratados ip mostraron una regresión más grande de los hemocitoblastos que los ratones
10 tratados oralmente.

Ejemplo 4 - Respuesta de los ratones desnudos con implantes de células leucémicas humanas luc/k562 normales con dosis bajas de AN024, AN019 e Imatinib (figuras 12 y 13)

A los ratones desnudos (nu/nu) se les implantaron
15 las células K562 (1×10^6) normales/luc por medio de la vena de la cola. Cinco ratones se utilizaron por grupo y se dividieron en 24 grupos + 2 de control. Todos los grupos recibieron implantes de células K562 normales/luc. De los 24 grupos, 12 se utilizaron para los estudios con luciferasa
20 mientras que los otros 12 se utilizaron para los estudios de conteos de las muestras de la sangre.

Administración oral de AN019, AN024 e Imatinib

Los fármacos se administraron por cebadura oral (goma de acacia al 2 % y 2 % de SLS en una suspensión
25 acuosa).

Resultados

La administración oral de AN019 (1, 5, 10 y 20 mg/kg) en los ratones desnudos con implantes de células de la leucemia humana K562 luc condujo a una regresión de la leucemia a concentraciones más elevadas. La concentración de AN019 a 1 mg/kg no indujo una reducción en la expresión de la luciferasa, mientras que 5 mg/kg provocaron la fijación de las células de leucemia a niveles de expresión constante, y las concentraciones de 10 y 20 mg/kg provocaron una reducción en la expresión de luciferasa (figura 12). La administración oral de Imatinib (1, 5, 10 y 20 mg/kg) en los ratones desnudos con implantes de células de leucemia humanas K562 luc condujo a la regresión de la leucemia a concentraciones más elevadas. La administración de Imatinib a la concentración de 1 mg/kg no indujo una reducción en la expresión de la luciferasa, mientras que 10 mg/kg y 20 mg/kg no muestran un retardo de la expresión de luciferasa (figura 13).

Los estudios muestran la superioridad de AN-019 sobre Imatinib en la regresión leucémica, particularmente después de 24 días de tratamiento.

Ejemplo 5 - Determinación de la eficacia del fármaco (D_e) y la penetración temporal del fármaco

Determinación de la eficacia del fármaco (D_e)

La eficacia del fármaco se determinó utilizando la

ecuación, $D_e =$

$$\left[\frac{\Sigma \text{vivos}}{\Sigma \text{luc}} - \frac{\Sigma \text{vivos}}{c} \right] \div \frac{\Sigma \text{vivos}}{c - \text{inicial}} \times 100$$

5

en donde:

Σvivos = número total de ratones vivos por concentración al final del experimento por las veces del conteo de fotones,

Σluc = número total de ratones vivos que muestran la

10 expresión de la luciferasa por la concentración al final del experimento y c representa los animales no tratados de control por las veces del conteo de los fotones y $\Sigma c - \text{inicial}$ representa el número inicial de los animales en el control en el inicio de los experimentos por las veces del conteo
15 de fotones. Los resultados fueron representados gráficamente como la eficacia del fármaco porcentual (tabla 7).

Resultados

La tabla 7 muestra la eficacia del fármaco a
20 varias concentraciones de Imatinib, AN019 y AN024 como se determinó a partir de los estudios *in vivo*. De la tabla 7 es evidente que AN019 se comportó de una manera dependiente de la dosis, mientras que Imatinib y AN024 no lo hicieron, y fueron efectivos a concentraciones
25 bajas.

Tabla 7

Fármaco	5 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg	40 mg/kg
D _e Imatinib	10.00	32.00	13.33	8.00
D _e AN019	25.82	78.20	83.40	85.20
D _e AN024	30.00	85.00	87.00	90.00

Determinación de la penetración temporal del fármaco (T_p)

La penetración temporal se calculó aplicando la siguiente ecuación, T_p =

10

$$\frac{\left(\frac{P}{n}\right)_a - \left(\frac{P}{n}\right)_{ter}}{\left(\frac{P}{n}\right)_a - \left(\frac{P}{n}\right)_b}$$

en donde:

15

P = a los conteos de fotones en el día "a", el día "ter", o el día "b" en donde "a" es el día cuando el tratamiento con el fármaco se detuvo y "ter" es el día cuando el experimento fue terminado y "b" es el día en donde P es el mínimo después del día a pero antes del día "ter".

20

n = número de animales vivos cuando se mide P.

El valor más grande indica una eficacia más grande del fármaco después de detener el tratamiento con el fármaco, es decir la penetración del fármaco durante el transcurso del tiempo.

25

Resultados

Para determinar la penetración temporal de AN019, AN024 e Imatinib, los ratones desnudos se les implantaron las células K562luc. Se tomaron imágenes de los animales a 5 intervalos de 6 días post-trasplante. El tratamiento con el fármaco (AN019 20 mg/kg, AN024 20 mg/kg e Imatinib 10 mg/kg) se inició 15 días pos-implante por las inyecciones ip diariamente. El tratamiento con el fármaco se detuvo el día 35 y se tomaron imágenes de los animales todavía el día 45, y 10 se calcularon como se describe en los métodos.

Por la aplicación de la ecuación para la penetración temporal, se determinaron los valores de T_p como:

AN019 = 2.0

AN024 = 2.4

15 Imatinib = 0.8

Estos valores de T_p indican que AN024 tuvo actividad sobre los controles no tratados y prosperaron mejor que AN019 para la actividad durante el transcurso del tiempo después del retiro del tratamiento con el fármaco.

20 Ejemplo 6 - Efecto de Dasatinib sobre los ratones desnudos con implantes de Baf3 cuando se compara con AN024, AN019 e

Imatinib (figuras 14A, 14B y 14C)

El ejemplo 3 demuestra la eficacia de AN024 y AN019 en el tratamiento de la leucemia cuando se compara con 25 Imatinib utilizando las líneas de células mutantes de Baf3

(Wt, T315I, M351T y E255K). Aquí, se ha utilizado Dasatinib como un fármaco de control para determinar la respuesta de las células mutantes de Baf3 al tratamiento cuando se compara con AN019, AN024 e Imatinib.

5 **Método**

La distribución experimental se da en forma tubular como sigue:

10

	Tratamiento ↓, línea celular implantada →	Wt	T315I	M351T	E255K
Controles (hecho previamente)					
Dasatinib (10	oral	5	5	5	5
mg/kg)	ip	5	5	5	5

15 Los ratones desnudos recibieron implantes intraperitonealmente de células mutantes de Baf3 (Wt, T315I, M351T, o E255K). 15 días después del implante, los ratones se trataron ya sea oralmente o intraperitonealmente con 10 mg/kg de Dasatinib durante 27 días. La sangre fue extraída de la

20 vena femoral o de la vena de la cola cada 6/o. día y se determinó el conteo de los hemocitoblastos y se representó gráficamente.

Resultados

25 Por el día 6/o, las muestras de sangre de los ratones desnudos con implantes de células mutantes de Baf3

(wt, T315I, M351T o E255K) mostraron un conteo de hemocitoblastos normal, el conteo de los hemocitoblastos se incrementó progresivamente como se observa el día 12. El tratamiento con Dasatinib se empezó el día 15 post-implante.

5 Los tratamientos con Dasatinib no progresaron mejor que Imatinib. El día 42, la terminación del experimento, los ratones con implantes de células Wt mostraron una respuesta significativa a Dasatinib, indicando que los tratamientos ip fueron superiores a los orales. Los ratones con implantes de
10 células T315I y M351T se comportaron semejantes a los controles sin una reducción significativa en el conteo de los hemocitoblastos. Los ratones con implantes de E255K progresaron solamente un poco mejor que las células implantadas con T315I en respuesta al tratamiento con
15 Dasatinib. El tratamiento total con Dasatinib solamente provocó un retardo en el progreso leucémico sin un efecto curativo significativo. El conteo de los hemocitoblastos fue significativo inferior en el grupo tratado con AN019. Estos resultados son ilustrados en las figuras 14A, 14B y 14C.

20 **Ejemplo 7 - Estudios in vitro sobre las líneas celulares del glioma y del cáncer de mama (figuras 15-18)**

Materiales y Métodos

Para determinar el efecto de AN019, AN024 y temozolomida con o sin radiación sobre las células del cáncer
25 de mama y de glioma, las células se trataron a las dosis

especificadas y se determinó la invasión, la angiogénesis y los cambios en ciertas moléculas de señalización.

Ensayo de invasión de matrigel

La invasividad *in vitro* de las células del glioma 4910, 5310 y U87 y las células del cáncer de mama MDAMB231 y ZR71 en la presencia de las concentraciones especificadas de los compuestos se evaluaron utilizando un ensayo de la cámara de Boyden modificada. Las células se trataron con estos compuestos durante 48 h. Se suspenden 1×10^6 células en 600 μl del medio libre del suero suplementado con 0.2 % de BSA y se colocan en el compartimiento superior de las cámaras de transcavidad (Corning Costar Fischer Scientific Cat #07-200-158, Pittsburgh, PA) recubiertas con matrigel (0.7 mg/ml). El compartimiento inferior de la cámara se llena con 200 μl del medio del suero y las células se dejan migrar durante 24 h. Después de la incubación, las células se fijan y se tiñen con Hema-3 y se cuantifican como se describió previamente (Mohanam et al., 1993). Se forman imágenes microscópicas de las células que migraron para determinar la reducción en la invasividad inducida por los compuestos de esta invención.

Ensayo angiogénico

La angiogénesis *in vitro* de las células del glioma 4910, 5310 y U87 y las células del cáncer de mama MDAMB231 y ZR71 en la presencia de las concentraciones especificadas de los compuestos se determinaron como sigue, las células ($2 \times$

104/cavidad) se sembraron en portaobjetos con cámaras de 8 cavidades y se tratan con varias concentraciones de los compuestos de prueba. Después de un período de incubación de 24 h, el medio acondicionado fue removido y se agregó a una 5 célula endotelial dérmica humana en una cantidad de 4×10^4 (monocapa en portaobjetos con cámaras de 8 cavidades) y las células endoteliales dérmicas humanas se dejó que crezcan durante 72 h. Las células fueron fijadas entonces en formaldehído al 3.7 % y se tiñeron con H&E y se 10 fotografiaron.

Análisis de Western Blot

El análisis de Western Blot de las células del glioma 4910, 5310 y U87 y las células del cáncer de mama MDAMB231 y ZR71 en la presencia de las concentraciones 15 especificadas de los compuestos fueron evaluados por protocolos estándares. Las células se trataron con AN019, AN024 o temozolomida a las concentraciones especificadas. 24 horas después del tratamiento, se colectan las células y los lisados celulares se extraen. Cantidades iguales de las 20 proteínas se fraccionaron por SDS-PAGE. Las proteínas fraccionadas se transfirieron a las membranas de nailon y se sondearon inmunológicamente para verificar AKT, ERK y Pi3k. Los aislados de las proteínas de las células del cáncer de mama fueron sondeadas inmunológicamente de manera adicional 25 para verificar EGFR, ErbB1, ErbB2 y ErbB3.

Resultados

Ensayo de invasión del matrigel

La invasividad *in vitro* de las células del glioma 4910, 5310 y U87y las células del cáncer de mama MDAMB231 y ZR71 en la presencia de las concentraciones especificadas de los compuestos se evaluaron utilizando un ensayo de la cámara de Boyden modificada. Las células se tratan con estos compuestos durante 48 h. La tabla 2 muestra los resultados de los estudios en un ensayo de invasión del matrigel *in vivo* de las células del glioma 4910, 5310 y U87 y las células del cáncer de mama MDAMB231 y ZR71 en la presencia de las concentraciones especificadas de los compuestos, con y sin radiación.

El cambio en la invasividad de varias líneas celulares se proporciona en la tabla 8. A partir del ensayo de invasión, es evidente que AN019 y AN024 fueron más efectivos en la inhibición de la invasión en una mayoría de las células, tanto con como sin radiación.

Tabla 8

Línea celular	Fármaco	-Radiación % invasión	+Radiación % invasión	+ Carga en la invasión después de la radiación
ZR71	Temozolomida	70 %	65 %	-5 %
	AN024	48 %	45 %	-3 %
	AN019	33 %	19 %	-14 %

Tabla 8 (Cont.)

	Línea celular	Fármaco	-Radiación % invasión	+Radiación % invasión	+ Carga en la invasión después de la radiación
5	MDA-MB-231	Temozolomida	62 %	49 %	-13 %
		AN024	43 %	47 %	+4 %
		AN019	45 %	15 %	-30 %
10	4910	Temozolomida	95 %	73 %	-22 %
		AN024	56 %	39 %	-17 %
		AN019	42 %	15 %	-27 %
	5310	Temozolomida	50 %	63 %	+13 %
		AN024	27 %	32 %	+5 %
		AN019	5 %	6 %	+1 %
15	U87	Temozolomida	90 %	93 %	+3 %
		AN024	53 %	29 %	-24 %
		AN019	18 %	18 %	0 %

Las figuras 15 y 16 ilustran los resultados del ensayo de la invasión de matrigel *in vivo* de las células del glioma 4910, 5310 y U87 y las células del cáncer de mama MDAMB231 y ZR71 en la presencia de las concentraciones especificadas de AN019, con y sin radiación.

Ensayo angiogénico

De los experimentos del ensayo de angiogénesis se observo que AN019 fue el más efectivo en la inhibición de la

angiogénesis.

El tratamiento con temozolida provocó la inhibición completa de la angiogénesis en las células ZR-71, mientras que en las células MDA-MB-231 solo se observó una inhibición ligera en la condición del control con un incremento en la inhibición después de la radiación. Las células 4910 del xenoinjerto del glioma mostraron una inhibición significativa de la angiogénesis tanto con como sin radiación. En el caso de las células 5310 la inhibición de angiogénesis fue observada en las condiciones de control, mientras que la angiogénesis fue promovida después del tratamiento con radiación. Las células del glioma U87 mostraron configuraciones de inhibición semejantes tanto con como sin la radiación.

El tratamiento con AN024 provoca la inhibición completa de la angiogénesis en las células ZR-71, mientras que en las células MDA-MB-231 solamente una inhibición ligera fue observada en los tratamientos de control y de la radiación. Las células 4910 del xenoinjerto del glioma mostraron una inhibición significativa de la angiogénesis tanto con como sin radiación. En el caso de las células 5310 la inhibición de la angiogénesis fue observada en las condiciones de control, mientras que la angiogénesis fue inhibida adicionalmente después del tratamiento de radiación. Las células del glioma U87 mostraron un retardo significativo

en la angiogénesis con un incremento en la inhibición después de la radiación.

El tratamiento con AN019 provocó la inhibición completa de la angiogénesis en las células ZR-71, mientras
5 que en las células MDA-MB-231 se observa una inhibición ligera en los tratamientos tanto de control como de radiación. Las células 4910 del xenoinjerto del glioma mostraron una inhibición de la angiogénesis semejante a las células MDA-MB-231 con un incremento en la inhibición
10 angiogénica después de la radiación. En el caso de las células 5310, la inhibición de la angiogénesis fue mayor en las condiciones de control que después del tratamiento con radiación. Las células del glioma U87 mostraron un retardo significativo semejante en la angiogénesis tanto con como sin
15 radiación.

La figura 17 ilustra los resultados obtenidos del ensayo angiogénico *in vitro* de las células del glioma 4910, 5310 y U87 y las células del cáncer de mama MDA-MB-231 y ZR-71 en la presencia de las concentraciones especificadas de
20 AN-019, con y sin radiación.

Análisis de Western Blot

El análisis de Western Blot de las células del glioma 4910, 5310 y U87 y las células del cáncer de mama MDAMB231 y ZR71 en la presencia de las concentraciones
25 especificadas de los compuestos de esta invención revelaron

que las células U87 no mostraron un cambio significativo en los niveles de AKT o de PI3k tanto con como sin radiación, mientras que una reducción ligera en los niveles de ERk fue observado en las células tratadas con AN024 y la reducción
5 fue mejorada después de la radiación. Las células 4910 se comportaron de manera semejante a las células U87 con una reducción en los niveles de AKT después del tratamiento con AN024 y la reducción en los niveles de AKT fue mejorada después de la radiación. En el caso de las células 5310,
10 ninguna diferencia observable significativa fue observada en la expresión de ERK mientras que el tratamiento con AN019 provocó una reducción en los niveles de expresión de AKT. Los niveles de PI3k fueron casi indetectables en las células tratadas con AN019 sin radiación pero reaparecieron después
15 del tratamiento con radiación. En el caso de las células MDA-MB-231 del cáncer de mama, no se observó ningún cambio significativo en AKT, ERK o PI3k, mientras que en el caso de ZR71, el tratamiento con AN019 provocó una reducción en los niveles de AKT, que se mejoraron después de la radiación. El
20 tratamiento con AN024 no mostró ningún cambio significativo bajo las condiciones irradiadas, mientras que después de la radiación las células tratadas con AN024 mostraron una reducción en la expresión de AKT. Los niveles de PI3k estuvieron ausentes en los tratamientos con AN019 tanto con
25 como sin radiación. El tratamiento con AN024 provocó una

reducción en los niveles de PI3k después de la radiación. Los niveles de pAKT no cambiaron significativamente en ninguno de los tratamientos con o sin radiación, mientras que los niveles de pERK se redujeron de manera significativa especialmente en la célula tratada con AN019 tanto con como sin radiación, AN024 también mostró reducción en los niveles de pERK pero a un grado menor que AN019. Los tratamientos con temozolomida tanto con como sin radiación no mostraron ningún cambio significativo en pAKT de los niveles de pERK.

10 La figura 18 ilustra los resultados del análisis de Western Blot de las células del glioma 4910, 5310 y U87 y las células del cáncer de mama MDAMB231 y ZR71 en la presencia de las concentraciones especificadas de AN-024, con y sin radiación.

15 Ejemplo 8 - Estudio de supervivencia leucémica (figuras 19-21)

Las células que expresan la luciferasa K562 fueron implantadas intraperitonealmente en los ratones desnudos; los ratones fueron explorados utilizando la estación formadora de imágenes Xenogeny IVIS, después de las inyecciones ip de luciferina se determinan los implantes. El tratamiento con el fármaco se empezó como en los estudios previos el día 15 después del implante. Los animales todavía fueron provistos del tratamiento el día 42, después de lo cual se detuvo el tratamiento con el fármaco y se determinó la supervivencia de

20

25

los animales, de acuerdo con las reglas para el cuidado de los animales. Se observó que los animales de control desarrollaron leucemia y la mortalidad ha ocurrido en los días 34 y 35, por las regulaciones que fueron contempladas para sacrificar a los 8 animales restantes el día 35. El tratamiento con el fármaco fue retirado el día 42 post-implante y se determinó la supervivencia de los animales.

Los animales tratados con AN024 mostraron mortalidad el día 38, los animales muertos durante una inspección adicional no revelaron un agrandamiento esplénico y la causa de la muerte se determinó que va a ser diferente de la leucemia, las muestras de sangre no pudieron ser tomadas del animal muerto. De los 10 animales utilizados 8 animales no mostraron signos de leucemia el día 55.

Los animales tratados con AN019 no mostraron ninguna mortalidad y 7 de los 10 animales mostraron una ausencia completa de los síntomas leucémicos.

Los animales tratados con Imatinib mostraron recurrencias de los síntomas leucémicos después del retiro del tratamiento y mostraron mortalidad los días 55, 56, 57 y 58. Los animales sobrevivientes no mostraron la presencia de síntomas leucémicos.

La figura 19 ilustra la cantidad de la expresión de luciferasa de K562luc obtenida de los ratones con implantes después del tratamiento con AN024, AN019 o Imatinib.

La figura 20 ilustra el número de animales curados después del tratamiento con AN024 o AN019 el día 58. El tratamiento con el fármaco se detuvo el día 42, los animales continuaron mostrando un efecto curativo después del 5 tratamiento con AN024 y AN019 después del retiro del tratamiento del fármaco.

La figura 21 ilustra el conteo de hemocitoblastos de las muestras de la sangre tomadas de los animales el día indicado. El tratamiento con el fármaco fue retirado el día 10 42. AN024 y AN019 mostraron eficacia después del retiro del tratamiento con el fármaco. Imatinib se encontró que va a ser ineficaz.

Ejemplo 8A - Estudios sobre ED₅₀, LD₅₀, MTD e índice terapéutico

La siguiente tabla resume los datos de ED₅₀, LD₅₀, 15 MTD (dosis tolerada máxima) citada inicialmente y el índice terapéutico de los compuestos de la presente invención en comparación con Imatinib. Los métodos empleados como por J. Pharmacol. Exp. Ther., (1949), 96: 96-113.

20

Substancia experimental	LD ₅₀ (po) Ratón (mg/kg)	ED ₅₀ (po) Ratón (mg/kg)	MTD Ratón (mg/kg)	índice terapéutico* - LD ₅₀ /ED ₅₀
Mesilato de Imatinib	949	12	250	78.9
AN-019	1133	11.5	500	98.5
AN-024	1440	10	500	144

25

* Ratones leucémicos (K562)

Ejemplo 9 - Estudio de radiación del glioma (figuras 22 y 23)

Los ratones desnudos recibieron implantes intracranealmente de células del xenoinjerto del glioma humano 4910 (células 1×10^6). Diez días después del implante los ratones fueron tratados con AN019, AN024 o temozolomida con o sin radiación (5 Gi/semana). El experimento se terminó el día 40 post-implante.

De los resultados se observó que 100 % de los animales de control desarrollaron tumores intracraneales y la radiación tuvo solo un efecto pequeño sobre la reducción del tamaño del tumor. Los animales que se trataron solo con TMZ mostraron reducción los tumores intracraneales con 3 de 10 animales que muestran la ausencia completa de los tumores. El tratamiento con radiación combinado con la administración de TMZ provocó una regresión adicional en el tamaño del tumor con los animales que muestran menos síntomas de presión intracraneal (espalda arqueada), en este caso 2 de los 10 animales no mostraron tumor intracraneal observable.

Los animales tratados con AN024 sin radiación mostraron la presencia de tumores intracraneales pero los tumores estuvieron bien definidos y no mostraron bordes difusos como se observa en los controles o en los tratamientos con TMZ, 3 de los 10 animales fueron curados. Después del tratamiento con radiación, 7 de 10 animales

fueron curados, los animales que mostraron la presencia de tumores mostraron tumores considerables quirúrgicamente, bien definidos.

Los animales tratados con AN019 solo mostraron 5 tumores semejantes a los animales tratados con AN024 y en este caso con y sin radiación, 6 de 10 animales fueron curados. Se observa que después de la radiación el tamaño del tumor se redujo significativamente.

La figura 22 ilustra los resultados obtenidos del 10 análisis semicuantitativo de los tumores intracraneales y los ratones desnudos después del tratamiento con TMZ, AN024 o AN019 con o sin radiación (5Gly).

La figura 23 muestra representaciones gráficas de los ratones desnudos que muestran la ausencia de tumores 15 intracraneales después del tratamiento con el fármaco AN-019, AN-024 y sin tratamientos de radiación.

Los otros aspectos sintéticos de preparación y otros, de los compuestos de la presente invención, han sido ilustrados en los siguientes ejemplos.

20 **Ejemplo 10 - Preparación de la Forma I**

La (3,5-bis-trifluorometil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)-fenil]-benzamida de la fórmula I, fue preparada como por el proceso de la etapa IV del ejemplo 3 en WO2006/027795 (US 25 2007/0232633) como sigue:

Preparación de la (3,5-bis-trifluorometil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)-fenil]-benzamida (I)

Etapa (I): Preparación de la (3,5-bis-trifluorometil)-N-(4-metil-3-nitrofenil)-benzamida

5 En el primer caso, el cloruro de 3,5-bis-trifluoro metil benzoilo que se utilizó como una de las materias primas fue preparado como sigue.

El cloruro de tionilo (576.0 g, 4.8 mmol) se agrega durante un período de 15 minutos a una solución del ácido

10 3,5-bis trifluoro metil benzoico (Lancaster) (250.0 g, 0.97 mol) en cloroformo (2.5 l) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calienta a la temperatura de reflujo durante 1 hora. El exceso de cloruro de tionilo se remueve por co-

15 destilación con cloroformo bajo presión reducida. Después del fin de la destilación, el cloruro de 3,5-bis trifluoro metil benzoilo resultante se enfría gradualmente a temperatura ambiente y se disuelve en 400 ml de cloroformo. Se enfría una

solución de 4-metil-3-nitroanilina (92.0 g, 0.60 mol) en cloroformo (1.2 l) a -5 °C y luego se agrega trietil amina

20 (304.8 g, 3.0 mol). Se agrega por goteo el cloruro de 3,5-bis trifluoro metilo benzoilo en cloroformo por goteo a -5 °C durante un período de 60-75 min. La suspensión resultante se agita durante 1 hora a -5°C. La suspensión se destila a un volumen residual de 800 ml y se filtra, se lava con

25 cloroformo enfriado (200 ml) y se seca in vacuo para dar

160.0 g de la (3,5-bis-trifluorometil)-N-(4-metil-3-nitrofenil)-benzamida novedosa (68 %) como cristales de color crema (98.2 % de pureza por HPLC) MR-123-130 °C.

Etapa (II): Preparación de la (3,5-bis-trifluorometil)-N-(3-amino-4-metilfenil)-benzamida

Una suspensión de la (3,5-bis-trifluorometil)-N-(4-metil-3-nitrofenil)-benzamida novedosa (160 g, 0.41 moles) y cloruro estañoso (460.8 g, 2.0 moles) en etanol absoluto (850 ml) se calienta a reflujo durante 40 minutos. La suspensión resultante se enfría entonces a temperatura ambiente y se apaga en 5 l de agua enfriada con hielo. El pH de la mezcla de reacción se ajusta a 8.0 con 4.3 l de la solución de hidróxido de sodio al 5 % y se extrae con 2 x 2 l de acetato de etilo. La capa de acetato de etilo se lava sucesivamente con agua y salmuera y se seca sobre sulfato de sodio. El acetato de etilo se destila completamente y se agregan 500 ml de hexano al residuo y se filtra. La torta filtrada se seca al alto vacío a 60 °C para dar 96.0 g de la (3,5-bis-trifluorometil)-N-(3-amino-4-metilfenil)-benzamida novedosa (65 %) como cristales amarillos. (98.5 % de pureza por HPLC) MR-153-156 °C.

Etapa (III): Preparación de la (3,5-bis-trifluorometil)-N-(3-guanidino-4-metilfenil)-benzamida:

Una suspensión de la (3,5-bis-trifluorometil)-N-(3-amino-4-metilfenil)-benzamida (90 g, 0.20 mol) en n-butanol

(500 ml) se trata consecutivamente con ácido nítrico concentrado hasta que el pH alcanza 2.5 (15.9 g) y con una solución de cianamida (15.7 g, 0.37 mol) en agua (15 ml) durante un período de 30 minutos. La mezcla de reacción
5 resultante se agita a la temperatura de reflujo durante 6 horas. La mezcla de reacción luego se retira por destilación completamente bajo vacío y el residuo se deja que se enfríe gradualmente hasta la temperatura ambiente. Una mezcla de 180 ml de metanol y 180 ml de IPE se agrega a la masa de reacción
10 y se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. El producto se retira por filtración con succión, se lava con una mezcla de metanol e IPE (3 x 50 ml) y se seca *in vacuo* a 60 °C para dar 72 g de la sal de nitrato de la (3,5-bis-trifluorometil)-N-(3-guanidino-4-metilfenil)-benzamida novedosa de la fórmula
15 con un rendimiento del 62 % del teórico (99.2 % de pureza por HPLC), MR-285-287 °C.

Etapa (IV): Preparación de la (3,5-bis-trifluorometil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)fenil]-benzamida
(I):

20 Una suspensión del nitrato de la (3,5-bis-trifluorometil)-N-(3-guanidino-4-metilfenil)-benzamida (70 g, 0.15 mol), en n-butanol (470 ml) bajo una atmósfera de nitrógeno se trata sucesivamente con hojuelas de hidróxido de sodio (7.0 g, 0.18 mol) y 3-dimetilamino-1-piridin-3-il-
25 propenona (28.0 g, 0.16 mol). La suspensión resultante se

calienta a la temperatura de reflujo durante 2 horas. La mezcla de reacción llega a ser una solución anaranjada intensa, homogénea y se remueve la dimetilamina por la destilación de n-butanol. La masa de reacción se enfría gradualmente a TA y se agrega una mezcla de agua y cloroformo (300 ml + 300 ml) y la capa de cloroformo se separa. La capa de cloroformo se lava con agua y se destila hasta un volumen residual de 70 ml. Se agrega acetato de etilo (350 ml) a la masa de la reacción y se retira por filtración con succión, el sólido aislado se lava con acetato de etilo (2 x 50 ml) y agua (2 x 50 ml) y se seca *in vacuo* a 60 °C.

Rendimiento: 48.0 g de la (3,5-bis-trifluorometil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)fenil]-benzamida de la fórmula I.

El compuesto de la fórmula I obtenido por el proceso de la etapa IV se suspende en 480 ml de cloroformo y se calienta a 50-55 °C. La masa de la reacción se enfría a temperatura ambiente y luego se enfría adicionalmente a -5 - 0 °C. El producto se filtra y se lava con cloroformo (250 ml). La torta húmeda se seca durante 6 horas a 60 °C. El rendimiento fue de 40 gramos. Intervalo de la fusión -230 - 237 °C (DSC).

La figura 1 que acompaña esta especificación muestra la configuración de difracción del polvo de rayos X (XRPD) que muestra substancialmente una forma típicamente pura de la

forma I preparada como por el proceso descrito en este ejemplo. Los valores de 2θ y las intensidades son tabuladas en la tabla 1.

La figura 4 muestra el termograma de DSC de la modificación cristalina de la forma I preparada por el proceso descrito en este ejemplo (corrida desde 40.0 - 325 °C 10.00 °C/min; N₂ 80 ml/min).

La figura 7 muestra los cristales de la modificación cristalina de la forma I del compuesto de la fórmula (I).

10 **Ejemplo 11 - Preparación de la Forma II**

La (3,5-bis-trifluorometil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-il-amino)-fenil]-benzamida de la fórmula I, se prepara como por el proceso del ejemplo 4 en WO2006/027795 (US 2007/0232633) como sigue.

15 **Procesos alternativos para la preparación de (3,5-bis-trifluorometil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-il-amino)-fenil]-benzamida**

En el primer caso, el cloruro de 3,5-bis trifluoro metil benzoilo que fue utilizado como uno de los materiales de partida, se preparó como sigue:

20 Se agrega cloruro de tionilo (2.04 kg, 17.2 mmol) durante un período de 15 minutos a una solución del ácido 3,5-bis trifluoro metil benzoico (855.0 g, 3.3 mol) y D.M.F. (9 ml) en cloroformo (9 l) a temperatura ambiente. La mezcla 25 de la reacción se calienta a la temperatura de reflujo

durante 1 hora. El cloruro de tionilo en exceso se remueve por co-destilación con cloroformo bajo presión reducida a 40 °C. Después del final de la destilación, el cloruro de 3,5-bis trifluoro metil benzoilo se enfría gradualmente hasta la temperatura ambiente y se disuelve en 700 ml de cloroformo.

Una solución de la N-(5-amino-2-metilfenil)-(3-piridil)-2-pirimidina (0.73 kg, 2.64 mol) en cloroformo (9 l) se enfría a -5 °C y se agrega trietilamina (1.03 kg, 10.2 mmol). Se agrega por goteo el cloruro de 3,5-bis trifluoro metil benzoilo en cloroformo a -5 °C durante un período de 60-75 minutos. La suspensión resultante se agita durante 1 hora a -5 °C. La suspensión se filtra, se lava con D.M., agua y metanol al vacío para dar 1.3 kg del compuesto del título sin refinar, húmedo, el cual durante la recristalización a partir del metanol produjo 0.82 kg (60 %) de la (3,5-bis-trifluorometil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)-fenil]-benzamida (I).

El compuesto de la fórmula I obtenido por el proceso anterior se suspende en 5 l de metanol y se calienta a la temperatura de reflujo. La masa de la reacción se mantiene a la misma temperatura durante 30-40 minutos, se enfría lentamente a 40-45 °C y se mantiene a esta temperatura durante 60 minutos. El producto se filtra y se lava con 0.5 l de metanol a 40-45 °C. La torta húmeda se seca durante 6 horas a 60 °C. Rendimiento: 650 gramos.

La figura 2 que acompaña a esta especificación muestra la configuración de difracción de rayos X (XRPD) que muestra substancialmente una forma típicamente pura de la forma II preparada como por el proceso descrito en este ejemplo 20. Los valores 2θ y las intensidades son tabulados en la tabla 2.

La figura 5 muestra el termograma de DSC de la modificación cristalina de la forma II preparada por el proceso descrito en este ejemplo (corrida desde 30.0-350 °C 10 10.00 °C/minuto; N₂ 80 l/min).

La figura 8 muestra los cristales de la modificación cristalina de la forma II del compuesto de la fórmula (I).

Ejemplo 12 - Preparación de la forma III

La (3,5-bis-trifluorometil)-N-[4-metil-3-(4-piridin- 15 3-il-pirimidin-2-ilamino)-fenil]-benzamida de la fórmula I, se prepara como por el proceso del ejemplo 4 en WO2006/027795 como se menciona en el ejemplo 11 anterior.

El compuesto de la fórmula I obtenido por el proceso anterior se suspende en una mezcla de 2.5 l de dimetil 20 formamida y 4.1 l de acetona y se calienta a 50 °C. La masa de la reacción se mantiene a la misma temperatura durante 30-40 minutos, luego se enfría lentamente a 25-30 °C y se mantiene a la misma temperatura durante 60 minutos. La suspensión del producto se enfría adicionalmente a -5 °C y se 25 filtra y se lava con 0.8 l de acetona. La torta húmeda se

suspende en 0.4 l de acetona y se calienta a la temperatura de reflujo. La suspensión enfriada se filtra y se lava con 0.4 l de acetona. La torta húmeda se seca durante 6 horas a 60 °C. Rendimiento: 500 gramos.

5 La figura 3 que acompaña a esta especificación muestra la configuración de difracción de rayos X (XRPD) que ilustra substancialmente una muestra típicamente pura de la forma III preparada como para el proceso descrito en este ejemplo 20. Los valores 2θ y las intensidades son tabulados
10 en la tabla 3.

La figura 6 muestra el termograma de DSC de la modificación cristalina de la forma III preparada por el proceso descrito en este ejemplo (corrida desde 40.0 - 325 °C 10.00 °C/minuto; N₂ 80 l/min).

15 La figura 9 muestra los cristales de la modificación cristalina de la forma III del compuesto de la fórmula (I).

Ejemplo 13 - Preparación de la forma III

La (3,5-bis-trifluorometil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)-fenil]-benzamida de la fórmula I se
20 prepara como por el proceso del ejemplo 4 en WO2006/027795 como se menciona en el ejemplo 11 anterior.

El compuesto de la fórmula I obtenido por el proceso anterior se suspende en una mezcla de 2.5 l de dimetil formamida y 4.1 l de acetona y se calienta a 50 °C. La masa
25 de la reacción se mantiene a la misma temperatura durante 30-

40 minutos, luego se enfría lentamente a 25-30 °C y se mantiene a la misma temperatura durante 12 horas. La suspensión del producto se enfría adicionalmente a -5 °C y se filtra y se lava con 0.8 l de hexano. La torta húmeda se seca durante 6 horas a 60 °C. Rendimiento: 400 gramos; DSC: 248.2 (pico).

Ejemplo 14 - Preparación de la forma III

La (3,5-bis-trifluorometil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)-fenil]-benzamida de la fórmula I se prepara como por el proceso del ejemplo 4 en WO2006/027795 como se menciona en el ejemplo 11 anterior.

El compuesto de la fórmula I obtenido por el proceso anterior se suspende en una mezcla de 2.5 l de dimetil formamida y 4.1 l de tolueno y se calienta a 50 °C. La mezcla de la reacción se mantiene a la misma temperatura durante 30-40 minutos, luego se enfría lentamente a 25-30 °C y se mantiene a la misma temperatura durante 12 horas. La suspensión del producto se enfría adicionalmente a -5 °C y se filtra y se lava con 0.8 l de tolueno. La torta húmeda se seca durante 6 horas a 60 °C. Rendimiento: 450 gramos; DSC: 246.7 (pico).

Ejemplo 15 - Preparación de la forma III

La (3,5-bis-trifluorometil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)-fenil]-benzamida de la fórmula I se prepara como por el proceso del ejemplo 4 en WO2006/027795

como se menciona en el ejemplo 11 anterior.

El compuesto de la fórmula I obtenido por el proceso anterior se suspende en una mezcla de 2.5 l de ácido acético y se calienta a 50 °C. La masa de reacción se mantiene a la misma temperatura durante 30-40 minutos, se enfría lentamente a 25-30 °C y se mantiene a la misma temperatura durante 96 horas. El producto se filtra y se lava con 0.4 l de ácido acético enfriado. La torta húmeda se seca durante 6 horas a 60 °C. Rendimiento: 650 gramos; DSC: 246.3 (pico).

10

Ejemplo 16 - Preparación de la forma III

La forma I preparada por el ejemplo 10 (40 g) se suspende en una mezcla de 120 ml de dimetil formamida y 200 ml de acetona y se calienta a 50 °C. La masa de la reacción se mantiene a la misma temperatura durante 30-40 minutos, se enfría lentamente a 25-30 °C y se mantiene a la misma temperatura durante 60 minutos. La suspensión se enfría a -5 °C, se filtra y se lava con 40 ml de acetona. La torta húmeda se suspende en 200 ml de acetona y se calienta a la temperatura de reflujo y se mantiene durante 60 minutos a la temperatura de reflujo. La suspensión se enfría a 25 °C, se filtra y se lava con 40 ml de acetona. La torta húmeda se enfría durante 6 horas a 60 °C. Rendimiento: 2.5 gramos; DSC: 247.0 °C (pico).

20

Ejemplo 17 - Preparación de la forma III

25

La forma II preparada por el ejemplo 11 (650 g) se

suspende en una mezcla de 1.95 l de dimetil formamida y 3.25 l de acetona y se calienta a 50 °C. La masa de la reacción se mantiene a la misma temperatura durante 30-40 minutos. La masa de la reacción se enfría lentamente a 25-30 °C y se mantiene a la misma temperatura durante 60 minutos. El producto se filtra y se lava con 0.7 l de acetona. La torta húmeda se suspende en 3.5 l de acetona y se calienta a la temperatura de reflujo. La suspensión se enfría a 25 °C, se filtra y se lava con 0.7 l de acetona. La torta húmeda se seca durante 6 horas a 60 °C. Rendimiento: 395 gramos; DSC: 246.5 °C (pico).

Cuando se utilice aquí, el término "aproximadamente" se refiere a la variación en una cantidad o intervalo que es convencional para el campo de la química orgánica, por ejemplo, la variación típica que ocurre en temperaturas o tiempos como se miden en situaciones del mundo real en el laboratorio de química orgánica, la instalación de escalamiento hacia arriba, o la instalación de producción, o en la evaluación de agentes anti-proliferativos. Cualquier intervalo o cantidad utilizada en la descripción de la presente invención que está modificada por el término "aproximadamente" también es una parte de la invención si no está modificada por el término aproximadamente. Por ejemplo, la descripción de "aproximadamente 10 hasta aproximadamente 20" también incluye la descripción de "10 a 20".

Se debe señalar que, cuando se utilicen en esta especificación y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares "un", "una", y "el" incluyen referencias plurales a menos que el contexto lo dicte claramente de otra manera.

5 Así, por ejemplo, la referencia a una composición que contiene "un compuesto" incluye una mezcla de dos o más compuestos. También se debe señalar que el término "o" es empleado generalmente en su sentido que incluye "y/o" a menos que el contexto lo dicte claramente de otra manera.

10 Todas las publicaciones y solicitudes de patentes en esta especificación son indicativas del nivel de experiencia ordinaria en el arte al cual pertenece esta invención.

La invención ha sido descrita con referencia a varias modalidades y técnicas preferidas y específicas. Sin

15 embargo, se debe entender que se pueden hacer muchas variaciones y modificaciones mientras que permanezcan dentro del espíritu y alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Una forma cristalina caracterizada porque es la Forma III de la (3,5-bis-trifluorometil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)-fenil]-benzamida (fórmula I).

2. Una forma cristalina de la forma III, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque tiene las características de XRPD:

Angulo [2-theta]	valor d, Angstrom	% de intensidad
5.909	14.94417	24.9
6.491	13.60517	66.4
8.267	10.68690	100.0
11.854	7.45967	58.2
13.181	6.71147	40.0
14.609	6.05866	50.0
15.960	5.54851	5.8
16.612	5.33224	9.5
18.826	4.70995	14.4
19.571	4.53226	52.1
21.302	4.16774	54.0
21.612	4.10861	37.7
22.160	4.00828	3.5
22.970	3.86869	23.8
23.278	3.81812	51.6
24.000	3.70491	8.7
25.112	3.54329	11.1
25.887	3.43895	3.1
26.500	3.36079	3.3
27.517	3.23887	3.4
29.476	3.02788	6.8
29.857	2.99011	8.6
30.474	2.93102	3.5
32.886	2.72133	3.2
33.559	2.66829	5.0
35.916	2.49836	3.8
39.645	2.27157	4.9
43.061	2.09893	2.6
43.748	2.06753	3.8
44.055	2.05383	3.9

3. Una forma cristalina de Forma III, de

conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque tiene un punto de fusión en o arriba de 240 °C.

4. Una forma cristalina de Forma III, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la forma cristalina está esencialmente pura.

5. Un método de tratamiento de un sujeto que tenga la necesidad de una terapia anti-proliferativa, caracterizado porque comprende:

administrar al sujeto una forma cristalina, la Forma III, de la (3,5-bis-trifluorometil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)-fenil]-benzamida (fórmula I).

6. El método de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado porque la forma cristalina de Forma III, tiene las características de XRPD:

Angulo [2-theta]	valor d, Angstrom	% de intensidad
5.909	14.94417	24.9
6.491	13.60517	66.4
8.267	10.68690	100.0
11.854	7.45967	58.2
13.181	6.71147	40.0
14.609	6.05866	50.0
15.960	5.54851	5.8
16.612	5.33224	9.5
18.826	4.70995	14.4
19.571	4.53226	52.1
21.302	4.16774	54.0

5

10

15

Angulo [2-theta]	valor d, Angstrom	% de intensidad
21.612	4.10861	37.7
22.160	4.00828	3.5
22.970	3.86869	23.8
23.278	3.81812	51.6
24.000	3.70491	8.7
25.112	3.54329	11.1
25.887	3.43895	3.1
26.500	3.36079	3.3
27.517	3.23887	3.4
29.476	3.02788	6.8
29.857	2.99011	8.6
30.474	2.93102	3.5
32.886	2.72133	3.2
33.559	2.66829	5.0
35.916	2.49836	3.8
39.645	2.27157	4.9
43.061	2.09893	2.6
43.748	2.06753	3.8
44.055	2.05383	3.9

7. Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y una forma cristalina de Forma III de la (3,5-bis-trifluorometil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)-fenil]-benzamida (fórmula I).

8. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada porque la forma cristalina de Forma III, tiene las características de XRPD:

25

5

10

15

20

Angulo [2-theta]	valor d, Angstrom	% de intensidad
5.909	14.94417	24.9
6.491	13.60517	66.4
8.267	10.68690	100.0
11.854	7.45967	58.2
13.181	6.71147	40.0
14.609	6.05866	50.0
15.960	5.54851	5.8
16.612	5.33224	9.5
18.826	4.70995	14.4
19.571	4.53226	52.1
21.302	4.16774	54.0
21.612	4.10861	37.7
22.160	4.00828	3.5
22.970	3.86869	23.8
23.278	3.81812	51.6
24.000	3.70491	8.7
25.112	3.54329	11.1
25.887	3.43895	3.1
26.500	3.36079	3.3
27.517	3.23887	3.4
29.476	3.02788	6.8
29.857	2.99011	8.6
30.474	2.93102	3.5
32.886	2.72133	3.2
33.559	2.66829	5.0
35.916	2.49836	3.8
39.645	2.27157	4.9
43.061	2.09893	2.6
43.748	2.06753	3.8
44.055	2.05383	3.9

25

9. El uso de la forma cristalina de Forma III de

la (3,5-bis-trifluorometil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin- 2-ilamino)-fenil]-benzamida (fórmula I), en donde la forma cristalina de Forma III, tiene las características de XRPD:

	Angulo [2-theta]	valor d, Angstrom	% de intensidad
5	5.909	14.94417	24.9
	6.491	13.60517	66.4
	8.267	10.68690	100.0
	11.854	7.45967	58.2
	13.181	6.71147	40.0
	14.609	6.05866	50.0
	15.960	5.54851	5.8
10	16.612	5.33224	9.5
	18.826	4.70995	14.4
	19.571	4.53226	52.1
	21.302	4.16774	54.0
	21.612	4.10861	37.7
	22.160	4.00828	3.5
	22.970	3.86869	23.8
15	23.278	3.81812	51.6
	24.000	3.70491	8.7
	25.112	3.54329	11.1
	25.887	3.43895	3.1
	26.500	3.36079	3.3
	27.517	3.23887	3.4
	29.476	3.02788	6.8
	29.857	2.99011	8.6
20	30.474	2.93102	3.5
	32.886	2.72133	3.2
	33.559	2.66829	5.0
	35.916	2.49836	3.8
	39.645	2.27157	4.9
	43.061	2.09893	2.6
	43.748	2.06753	3.8
25	44.055	2.05383	3.9

10. Un proceso de preparación de la forma cristalina de Forma III, de la (3,5-bis-trifluorometil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)-fenil]-benzamida (fórmula I), caracterizado porque comprende:

5 tratar el compuesto de la fórmula I en una forma cristalina de Forma I o de Forma II, con ácido acético o una mezcla de dimetil formamida y acetona, hexano, o tolueno; y, subsiguientemente tratar el compuesto tratado una vez con ácido acético, acetona, hexano, o tolueno.

10 11. El proceso de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque comprende:

 tratar el compuesto de la fórmula I en una forma cristalina de Forma I o de Forma II, con ácido acético; y, subsiguientemente tratar el compuesto tratado una

15 vez con ácido acético.

 12. El proceso de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque comprende:

 tratar el compuesto de la fórmula I en una forma cristalina de Forma I o de Forma II, con una mezcla de
20 dimetil formamida y acetona; y,

 subsiguientemente tratar el compuesto tratado una vez con acetona.

 13. El proceso de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque comprende:

25 tratar el compuesto de la fórmula I en una forma

cristalina de Forma I o de Forma II, con una mezcla de dimetil formamida y hexano; y,

subsiguientemente tratar el compuesto tratado una vez con hexano.

5 14. El proceso de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque comprende:

tratar el compuesto de la fórmula I en una forma cristalina de Forma I o de Forma II, con una mezcla de dimetil formamida y tolueno; y,

10 subsiguientemente tratar el compuesto tratado una vez con tolueno.

15. El proceso de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque la forma cristalina de Forma III, tiene las características de XRPD:

15

Angulo [2-theta]	valor d, Angstrom	% de intensidad
5.909	14.94417	24.9
6.491	13.60517	66.4
8.267	10.68690	100.0
11.854	7.45967	58.2
13.181	6.71147	40.0
14.609	6.05866	50.0
15.960	5.54851	5.8
16.612	5.33224	9.5
18.826	4.70995	14.4
19.571	4.53226	52.1
21.302	4.16774	54.0
21.612	4.10861	37.7

20

25

5

10

15

Angulo [2-theta]	valor d, Angstrom	% de intensidad
22.160	4.00828	3.5
22.970	3.86869	23.8
23.278	3.81812	51.6
24.000	3.70491	8.7
25.112	3.54329	11.1
25.887	3.43895	3.1
26.500	3.36079	3.3
27.517	3.23887	3.4
29.476	3.02788	6.8
29.857	2.99011	8.6
30.474	2.93102	3.5
32.886	2.72133	3.2
33.559	2.66829	5.0
35.916	2.49836	3.8
39.645	2.27157	4.9
43.061	2.09893	2.6
43.748	2.06753	3.8
44.055	2.05383	3.9

16. Una forma cristalina, caracterizada porque es la Forma I de la (3,5-bis-trifluorometil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-il-amino)-fenil]-benzamida (fórmula I).

17. La forma cristalina de Forma I, de conformidad con la reivindicación 16, caracterizada porque tiene las características de XRPD:

25

5

10

15

Angulo [2-theta]	valor d, Angstroms	% de intensidad
6.793	13.00131	13.9
9.823	9.99680	3.9
11.106	7.96069	54.2
13.267	6.66829	48.5
16.386	5.40523	7.0
17.941	4.94015	11.3
18.997	4.66785	13.0
19.778	4.48530	50.5
21.894	4.05635	100.0
22.396	3.96650	20.5
23.469	3.78750	19.7
24.466	3.63545	32.4
24.939	3.56759	52.6
25.525	3.48695	14.6
26.968	3.30351	10.3
28.777	3.09991	22.0
30.545	2.92436	14.8
33.011	2.71129	11.0

18. Una forma cristalina, caracterizada porque es la Forma II de la (3,5-bis-trifluorometil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)-fenil]-benzamida (fórmula I).

19. La forma cristalina de Forma II, de conformidad con la reivindicación 18, caracterizada porque tiene las características de XRPD:

5

10

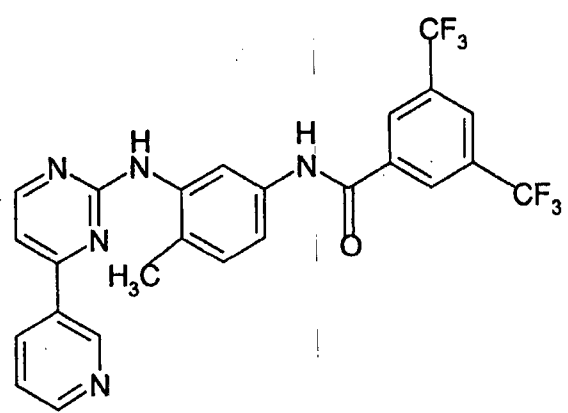
15

20

25

Angulo [2-theta]	valor d, Angstroms	% de intensidad
6.500	13.58651	12.2
10.816	8.17295	100.0
12.094	7.31197	3.4
12.988	6.81061	49.7
16.120	5.49381	6.0
17.669	5.01562	10.9
19.521	4.54367	41.7
21.675	4.09687	39.9
22.083	4.02198	17.1
23.230	3.82602	21.9
24.264	3.66523	17.8
24.639	3.61023	8.5
28.460	3.13371	4.8
29.328	3.04290	2.3
30.256	2.95165	4.1
32.746	2.73261	3.5
34.035	2.63201	3.1
35.590	2.52050	1.5
39.660	2.27072	1.9
42.123	2.14346	2.5
44.193	2.04777	1.7

20. Un método de preparación de un compuesto de la fórmula I:



Fórmula I
Código de desarrollo: AN-019

caracterizado porque comprende:

proporcionar un compuesto de la fórmula VI, el cloruro de 3,5-bis trifluoro metil benzoilo;

condensar la 4-metil-3-nitro-anilina con el
5 compuesto de la fórmula (IV) a una temperatura de aproximadamente 0 hasta aproximadamente -10 °C en un solvente de clorohidrocarburo con la adición de un compuesto básico para obtener un compuesto de la fórmula III, la ((3,5-bis-trifluorometil)-N-(4-metil-3-nitrofenil)-benzamida;

10 reducir el compuesto de la fórmula (III) con cloruro estañoso/HCl concentrado a la temperatura de reflujo durante aproximadamente 0.5 hasta aproximadamente 1 hora para obtener un compuesto de la fórmula IV, la (3,5-bis-trifluorometil)-N-(3-amino-4-metilfenil)-benzamida;

15 condensar el compuesto de la fórmula IV con cianamida acuosa a la temperatura de reflujo en un solvente de n-butanol para obtener un compuesto de la fórmula V, la (3,5-bis-trifluorometil)-N-(3-guanidino-4-metilfenil)-benzamida;

20 condensar el compuesto de la fórmula (V) con 3-dimetilamino-1-piridin-3-il-propenona en la presencia de una base a la temperatura de reflujo para obtener el compuesto de la fórmula (I).

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una forma particular de la (3,5-bis-trifluorometil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)+fenil]-benzamida (fórmula I), a procesos para su preparación, a las composiciones farmacéuticas que contienen esta forma cristalina, y a su uso como un agente anti-tumoral en los seres humanos. El compuesto de la fórmula I, también conocido como AN-019, es la fórmula (I).

FIG. 1

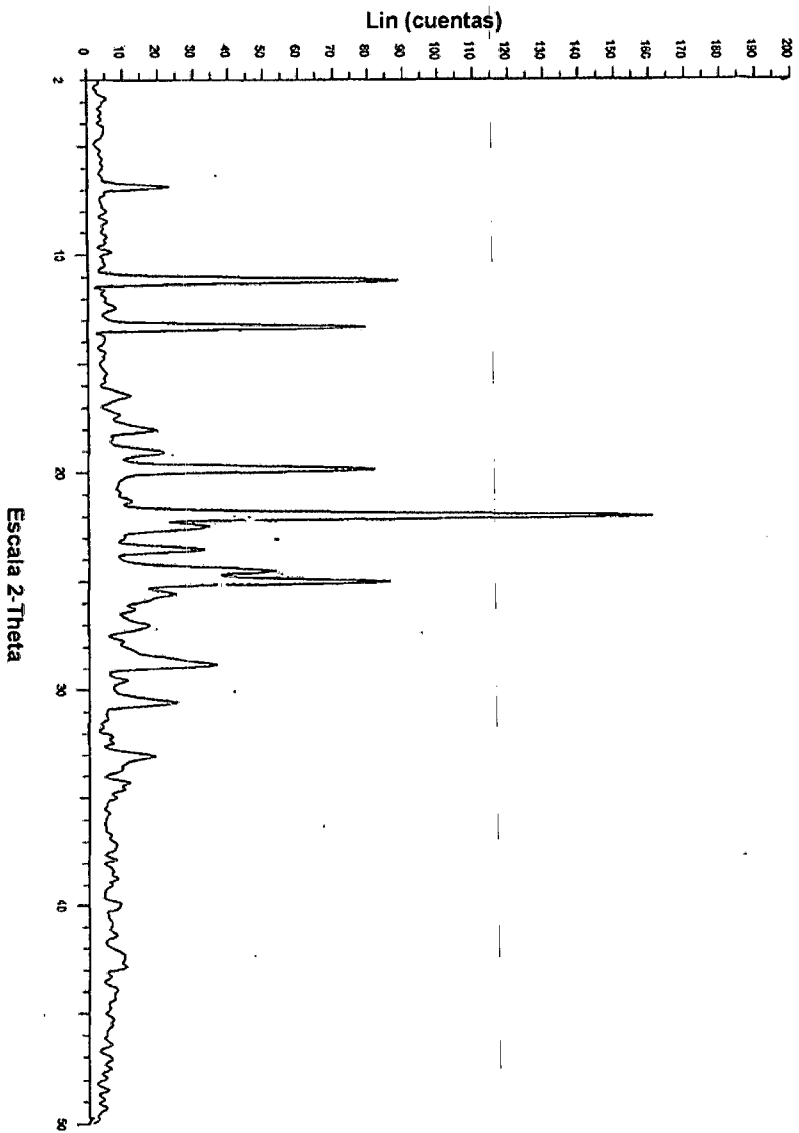


FIG. 2

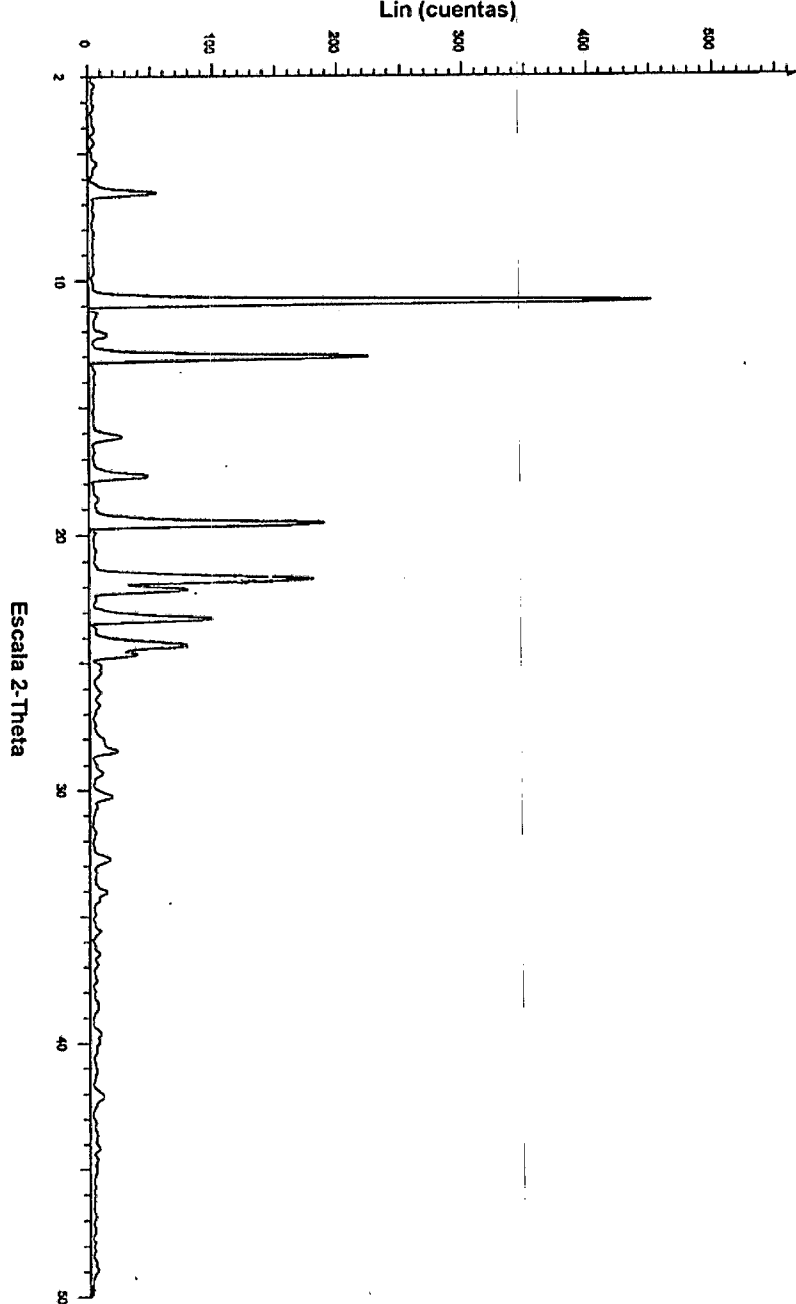


FIG. 3

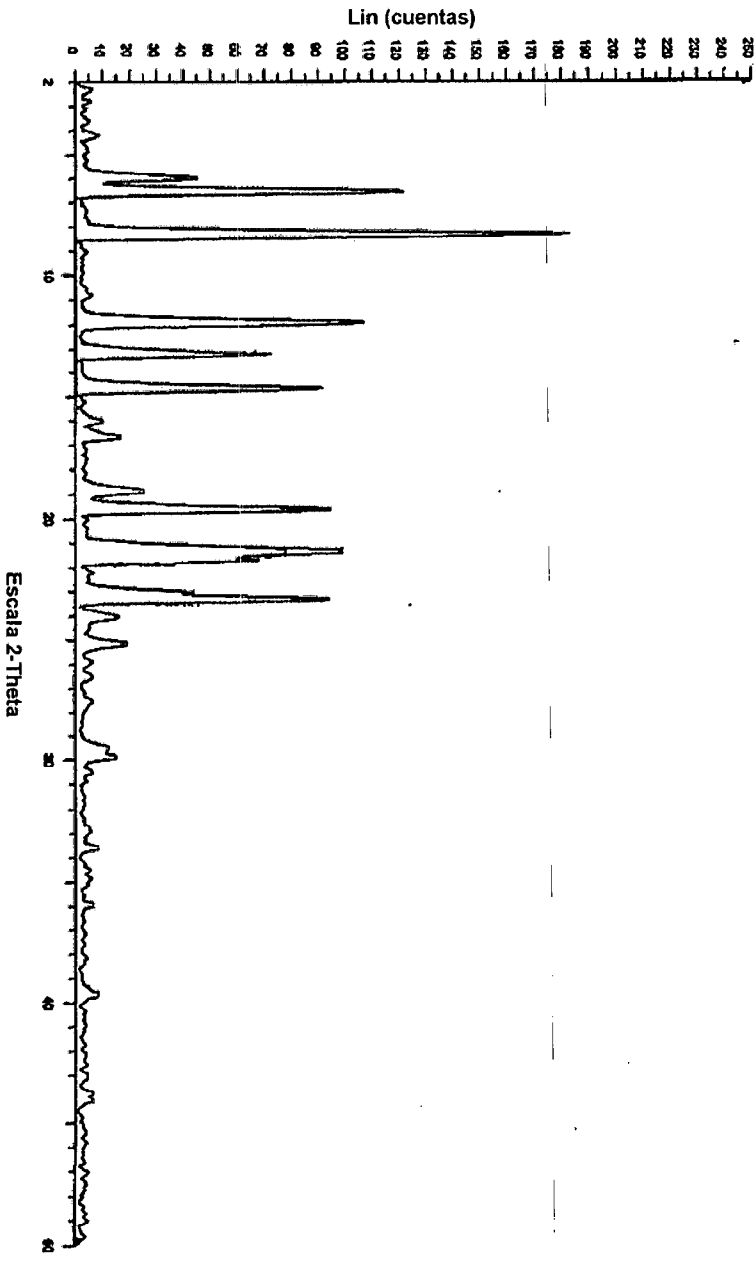


FIG. 4

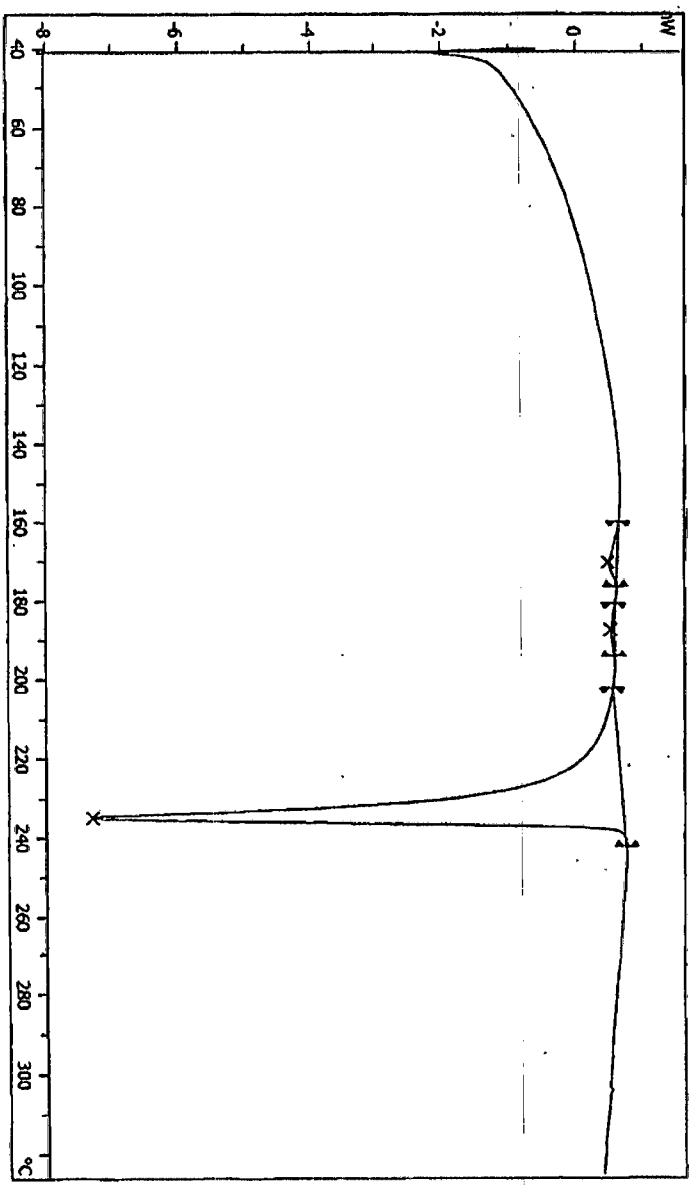


FIG. 5

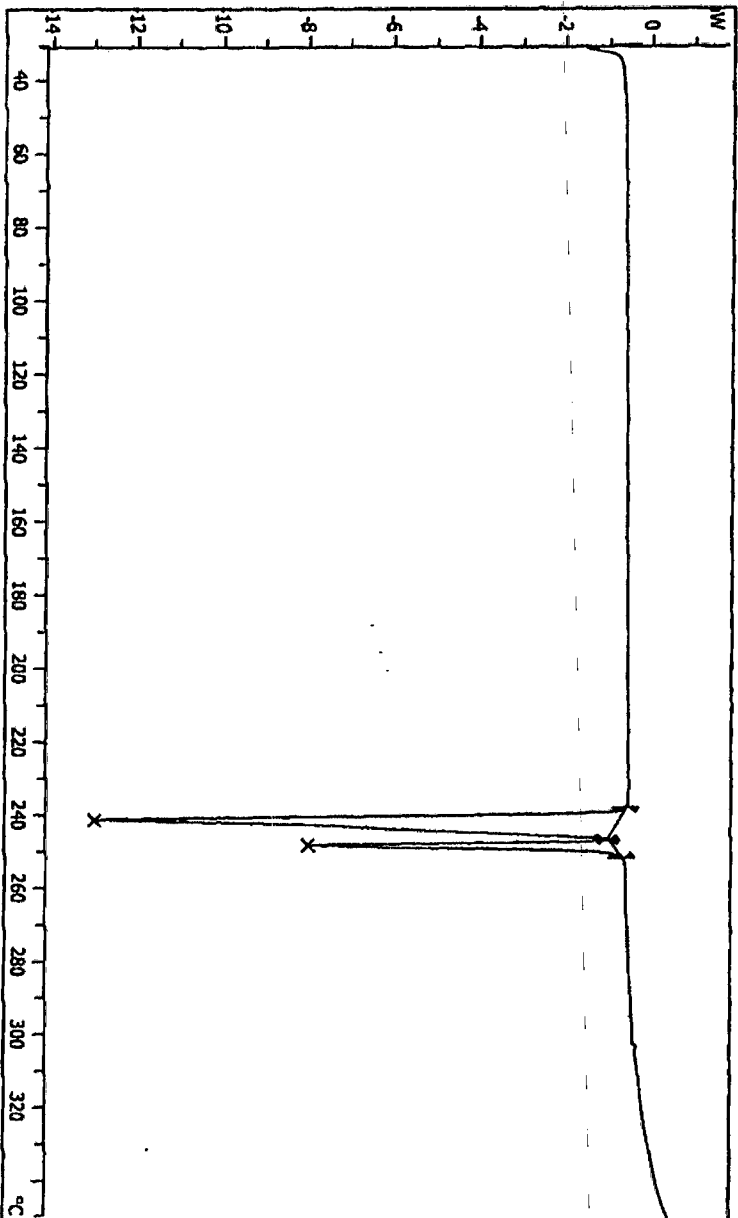
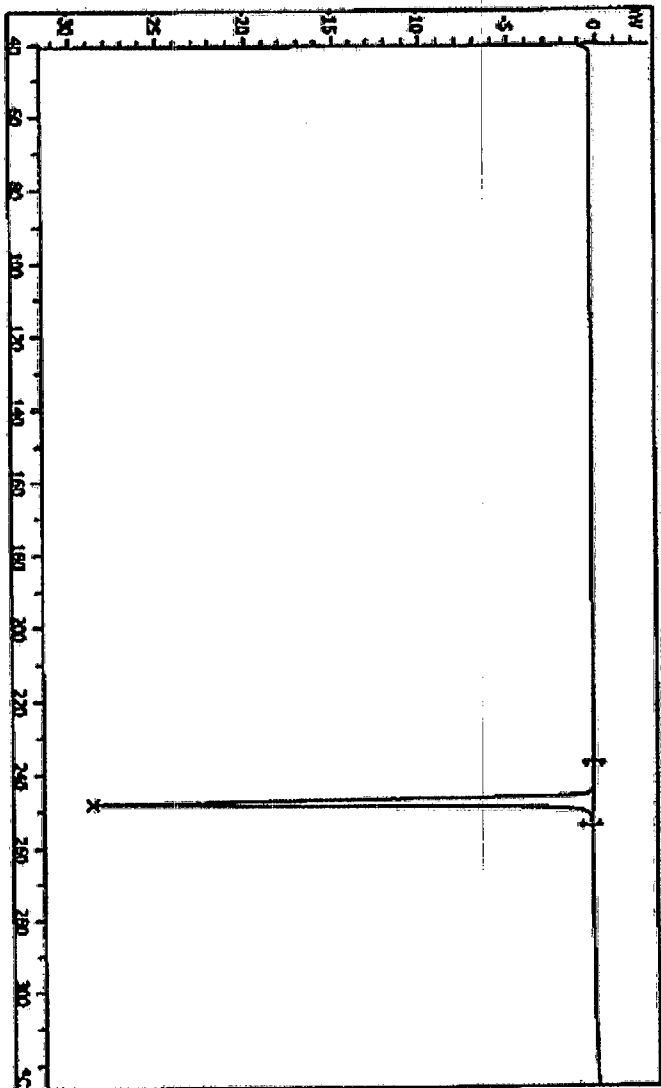


FIG. 6



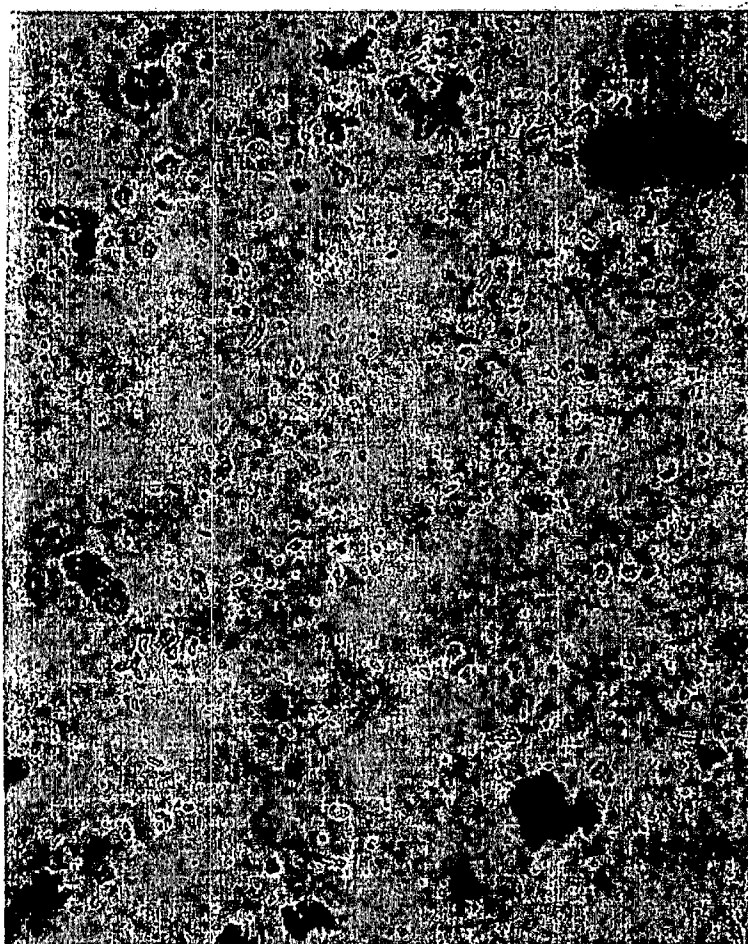


FIG. 7

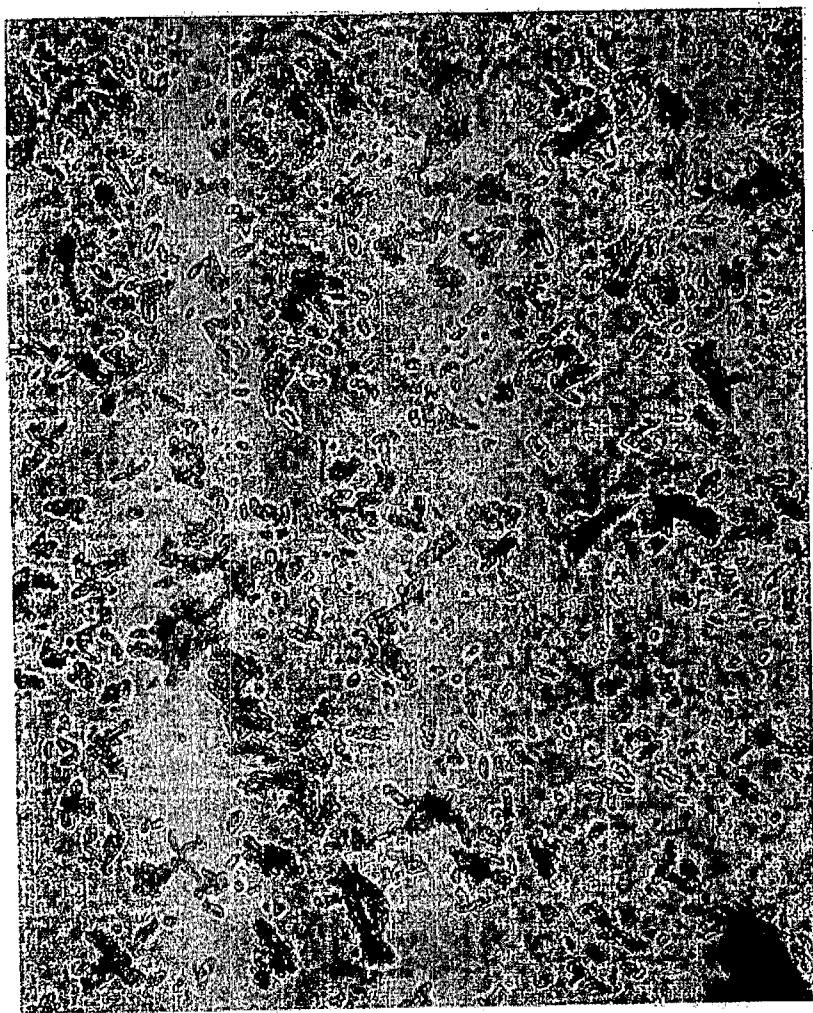


FIG. 8

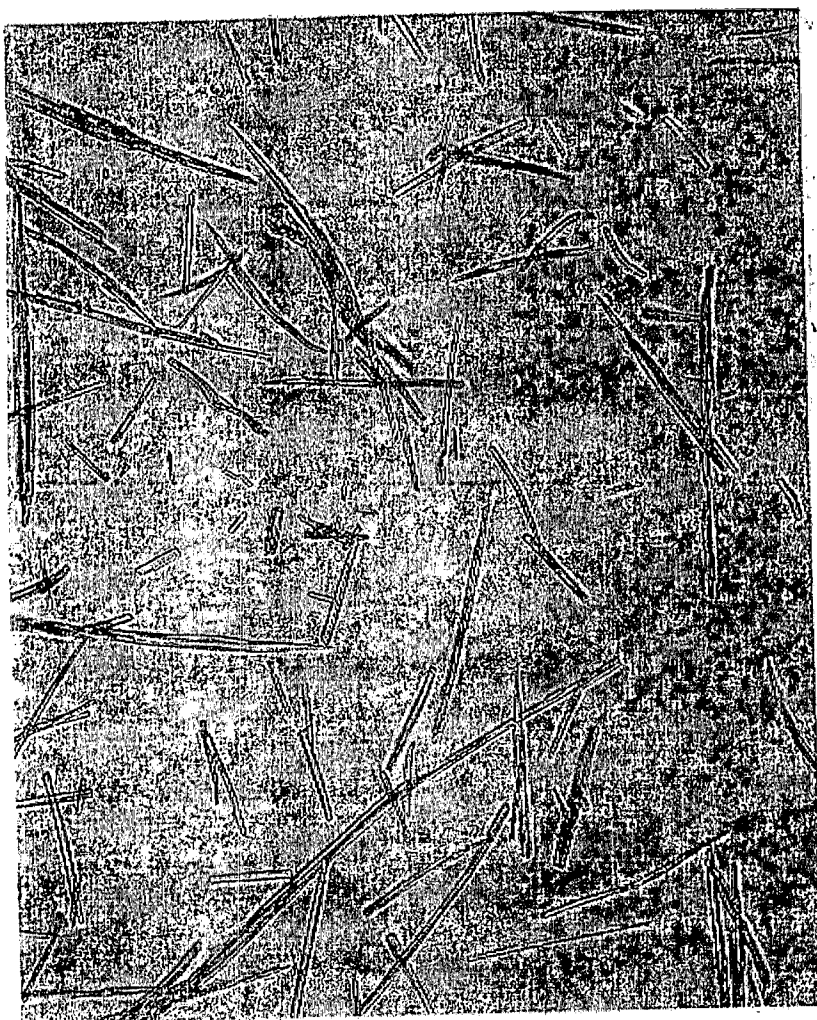
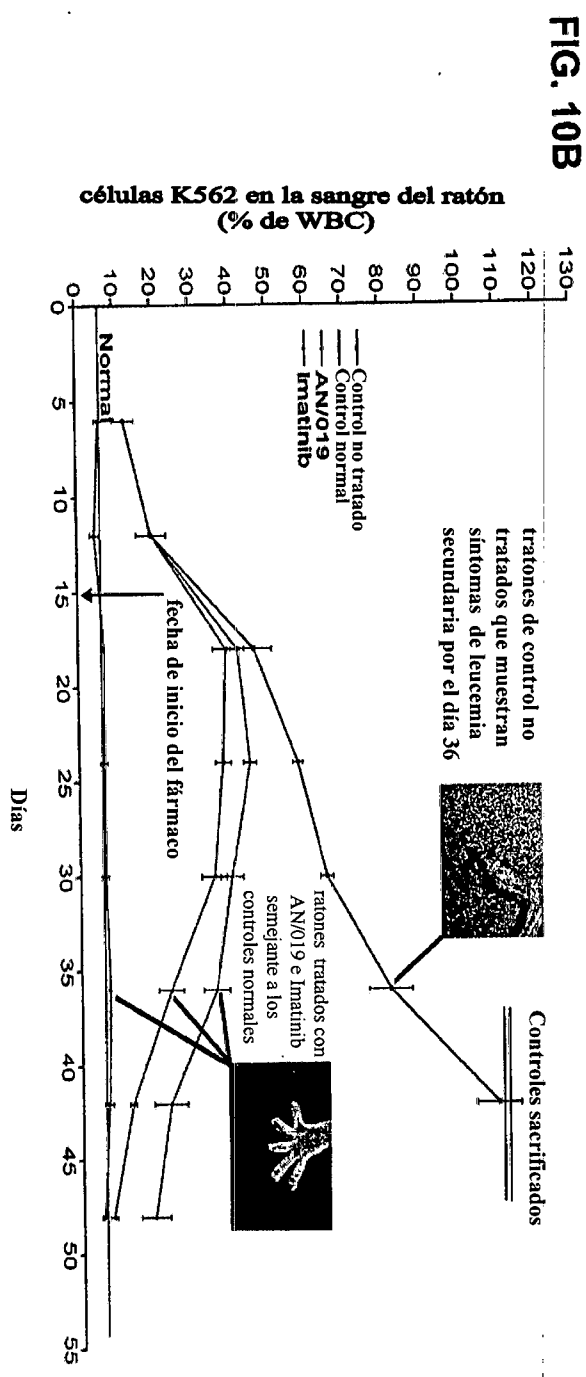
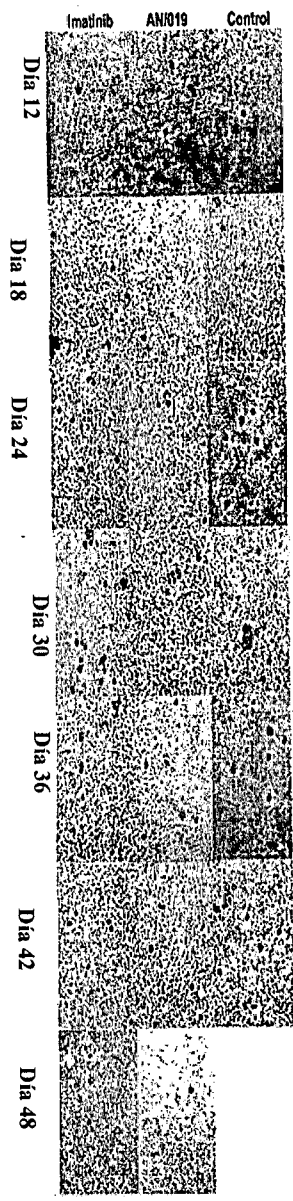


FIG. 9

% crecimiento de Leucemia



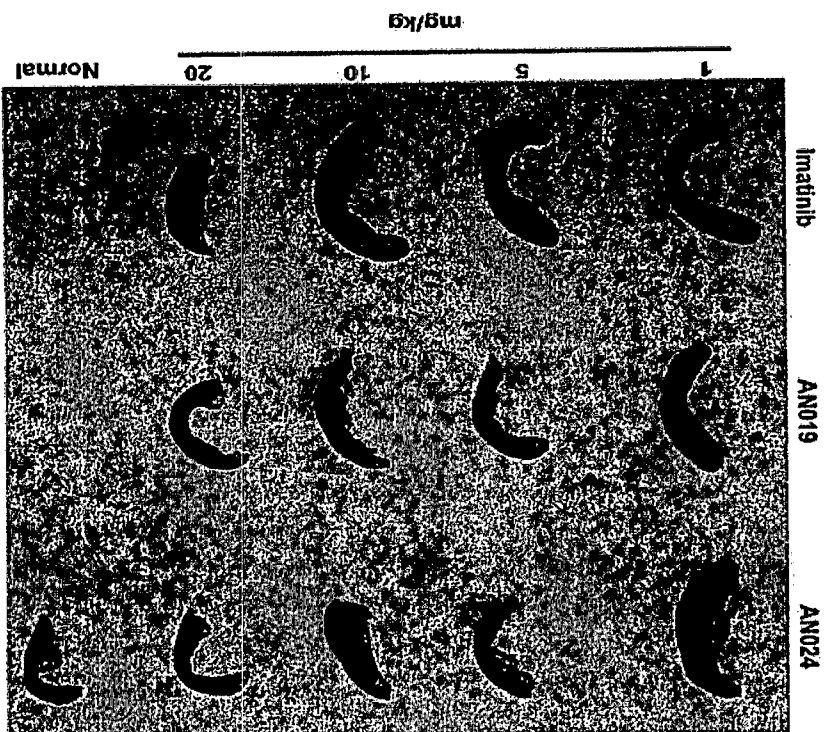


FIG. 11

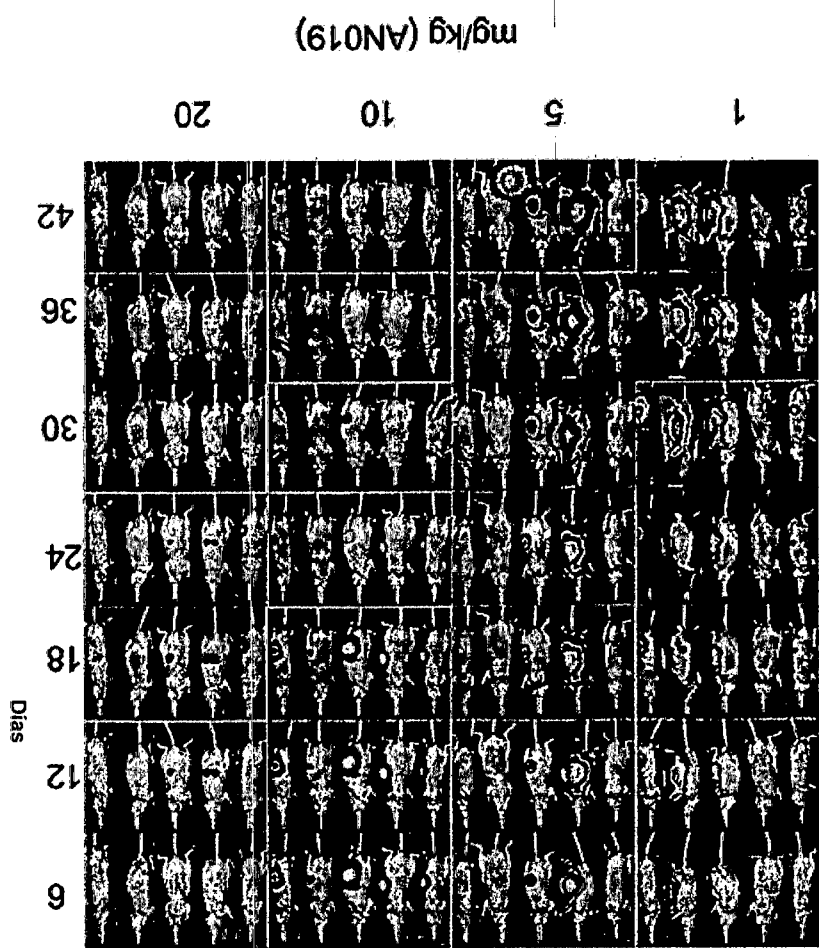


FIG. 12

FIG. 13

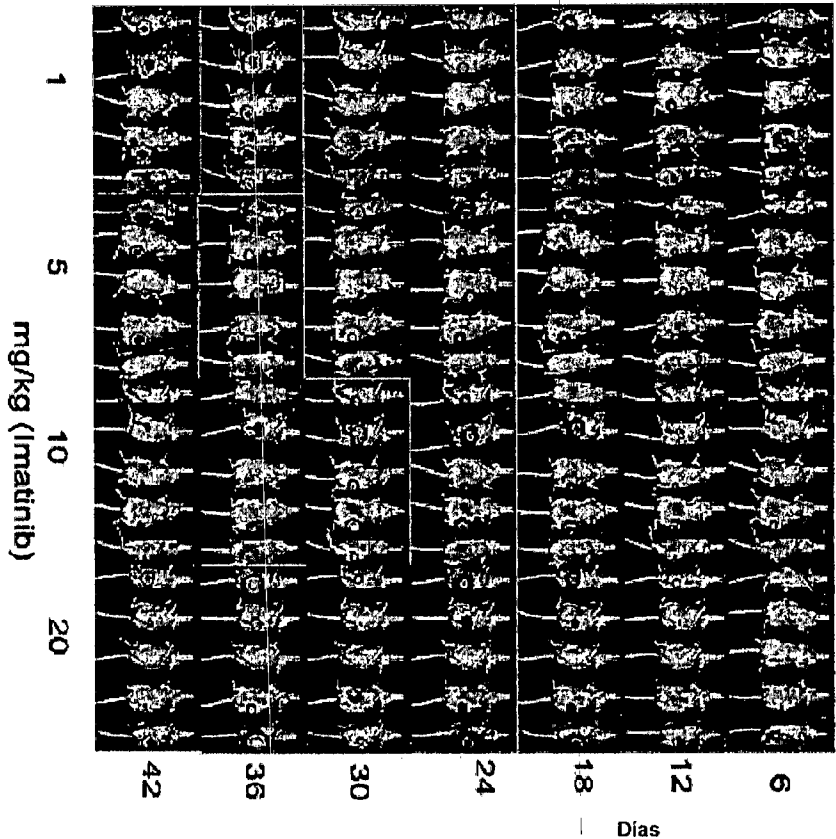


FIG. 14A

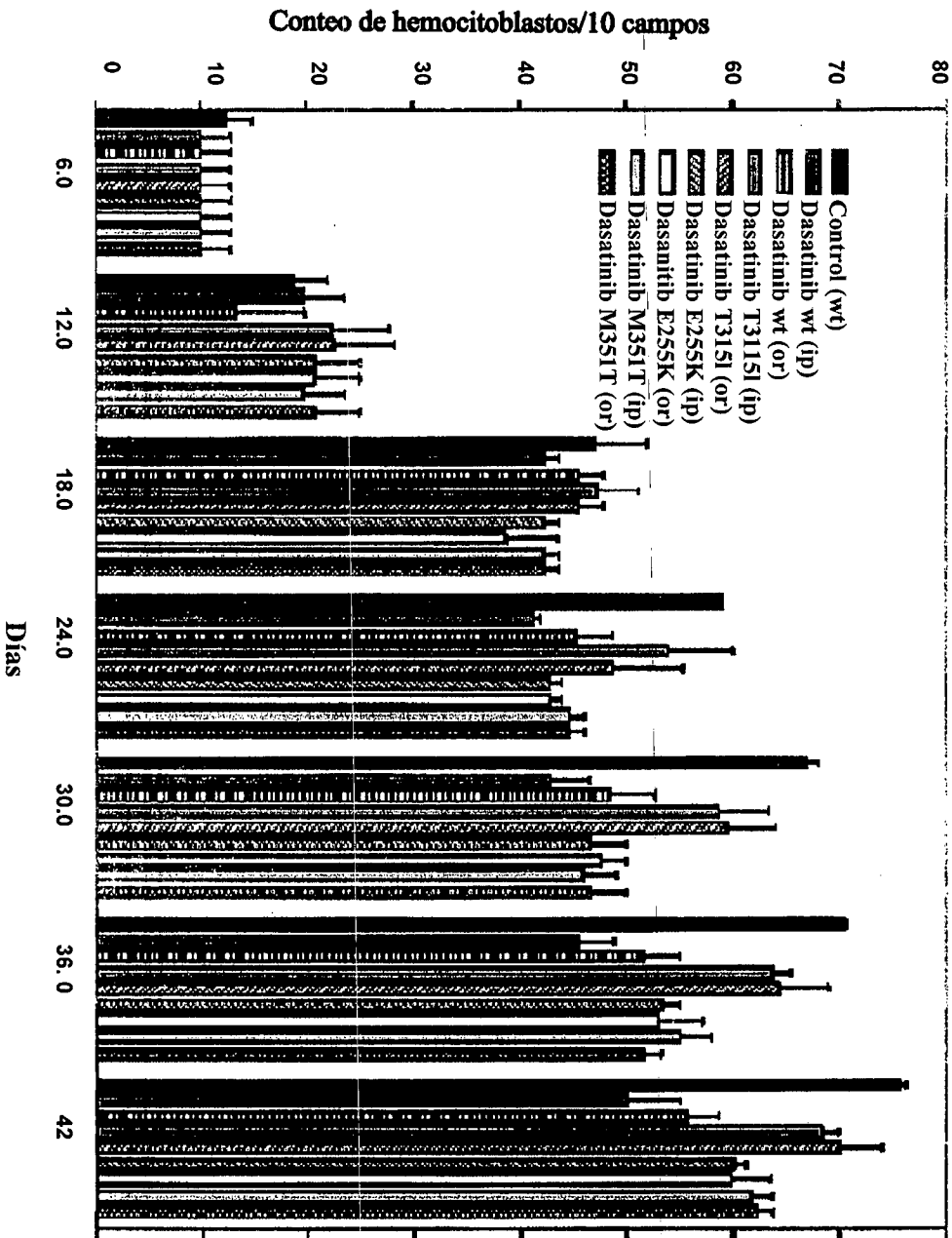


FIG. 14B

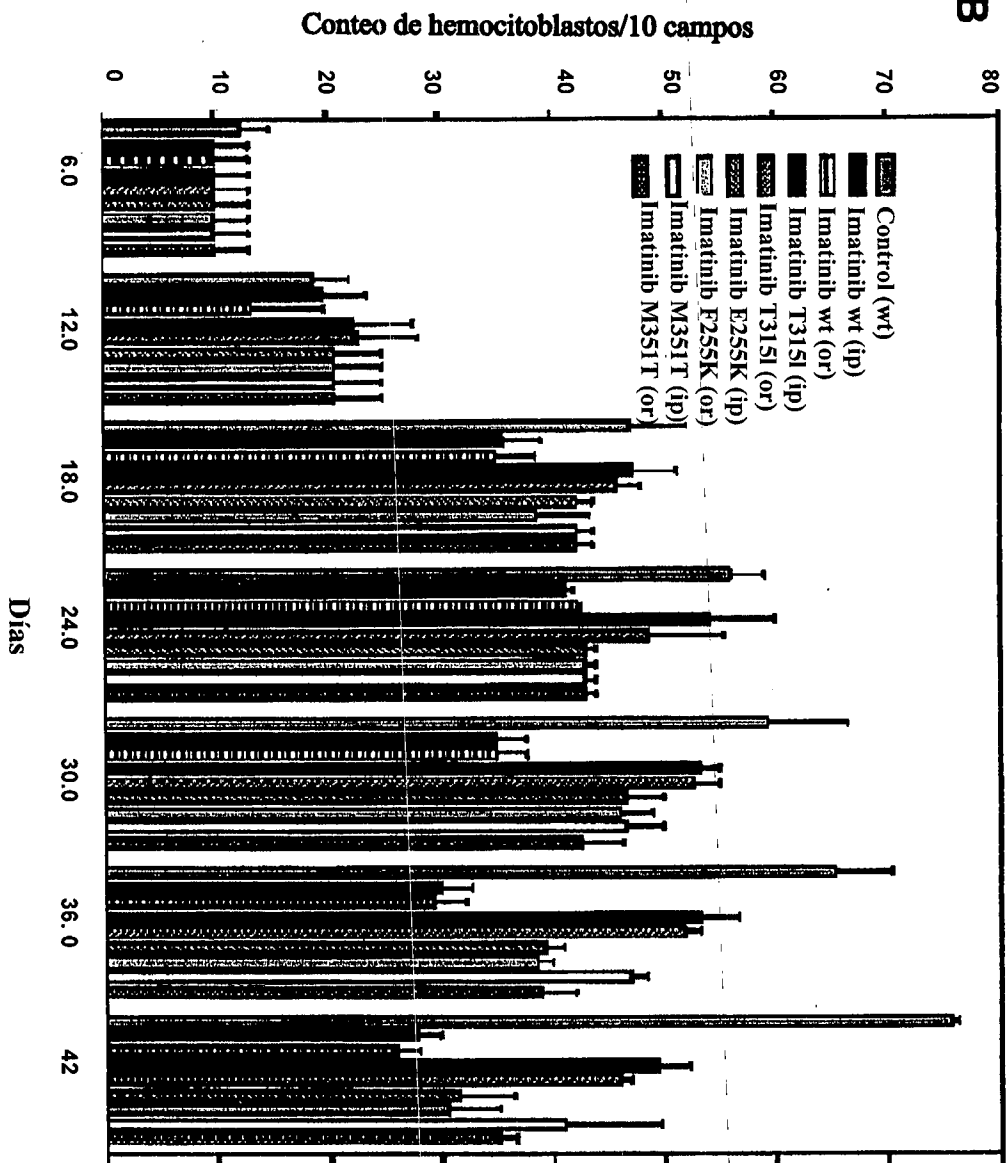


FIG. 14C

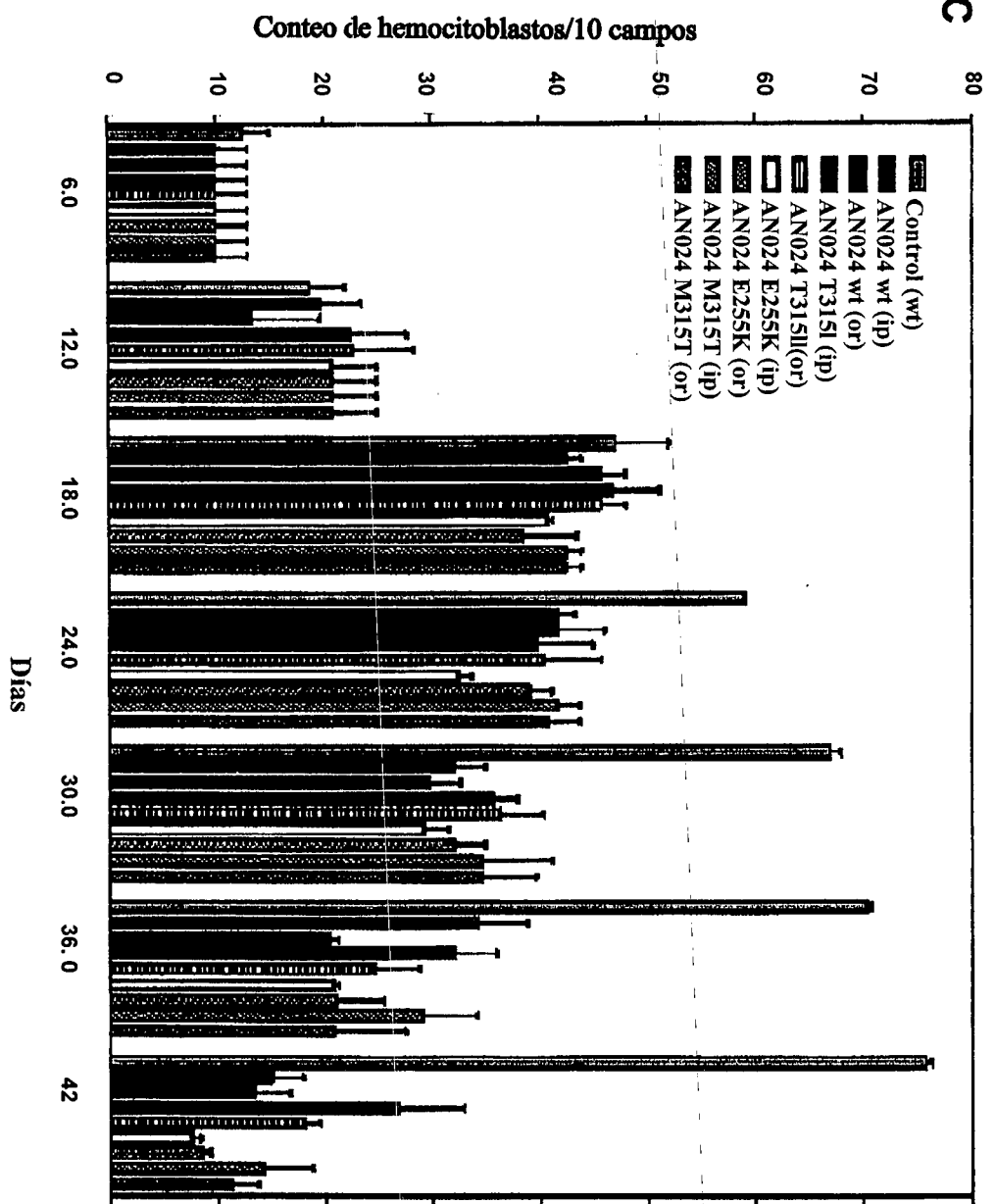


FIG. 15

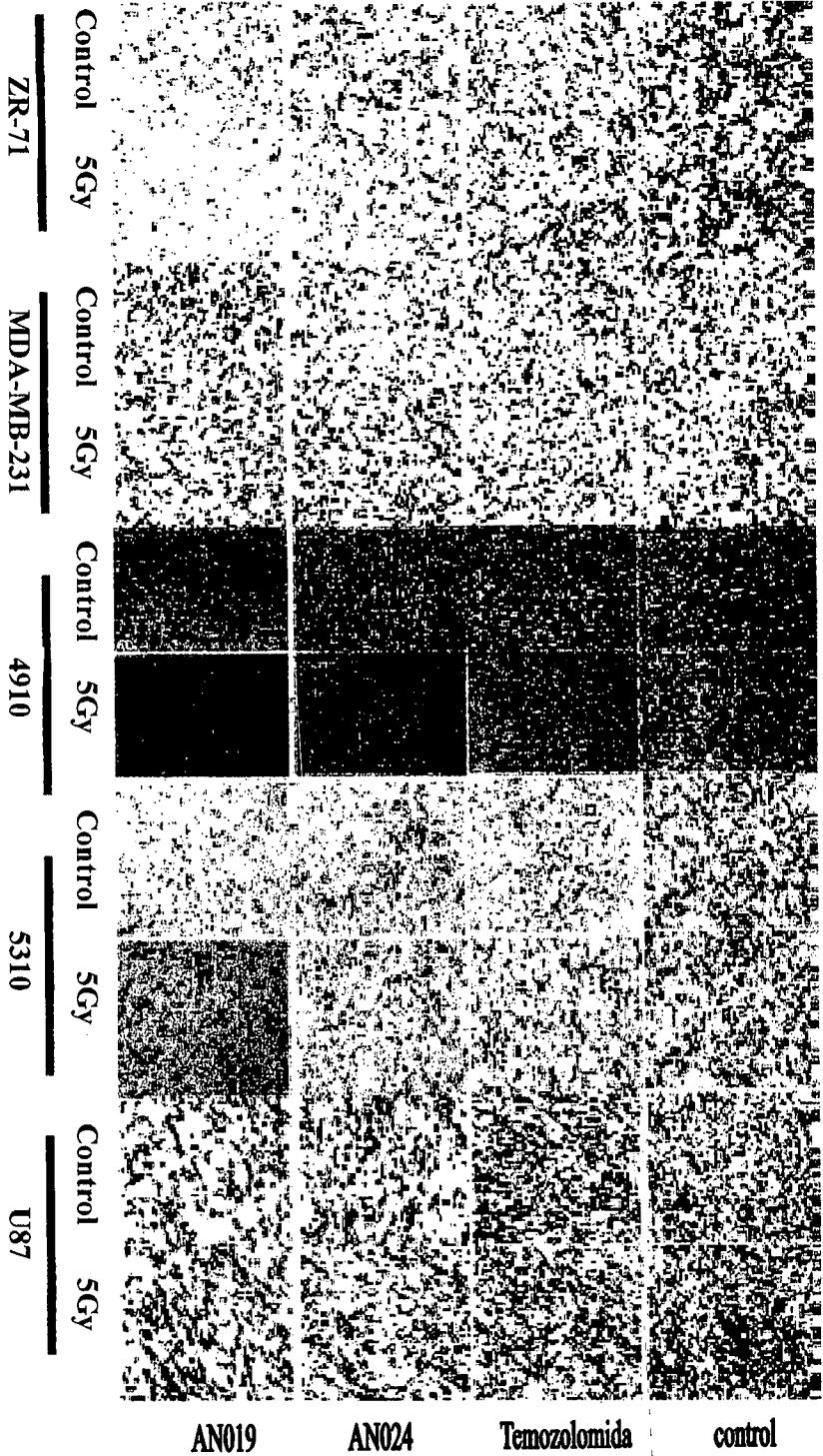


FIG. 16

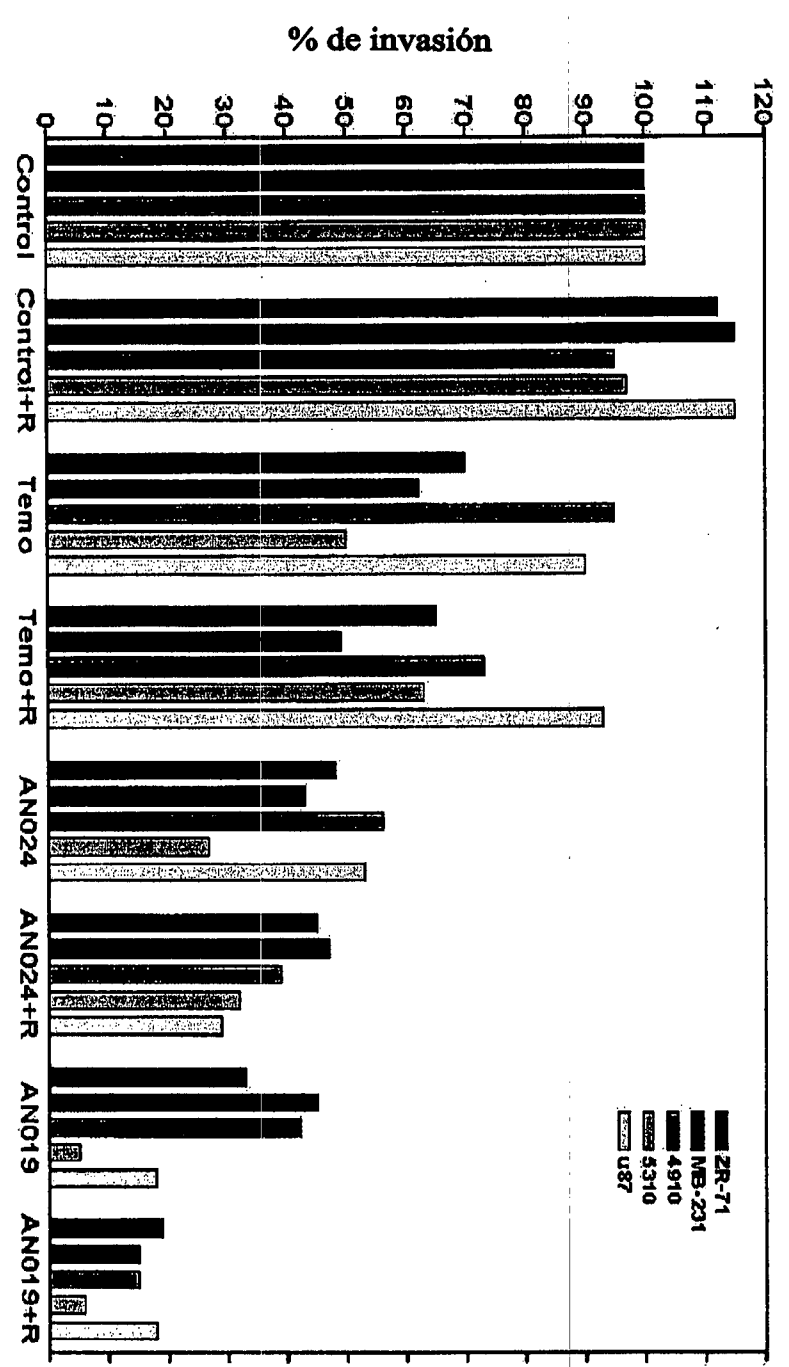


FIG. 17

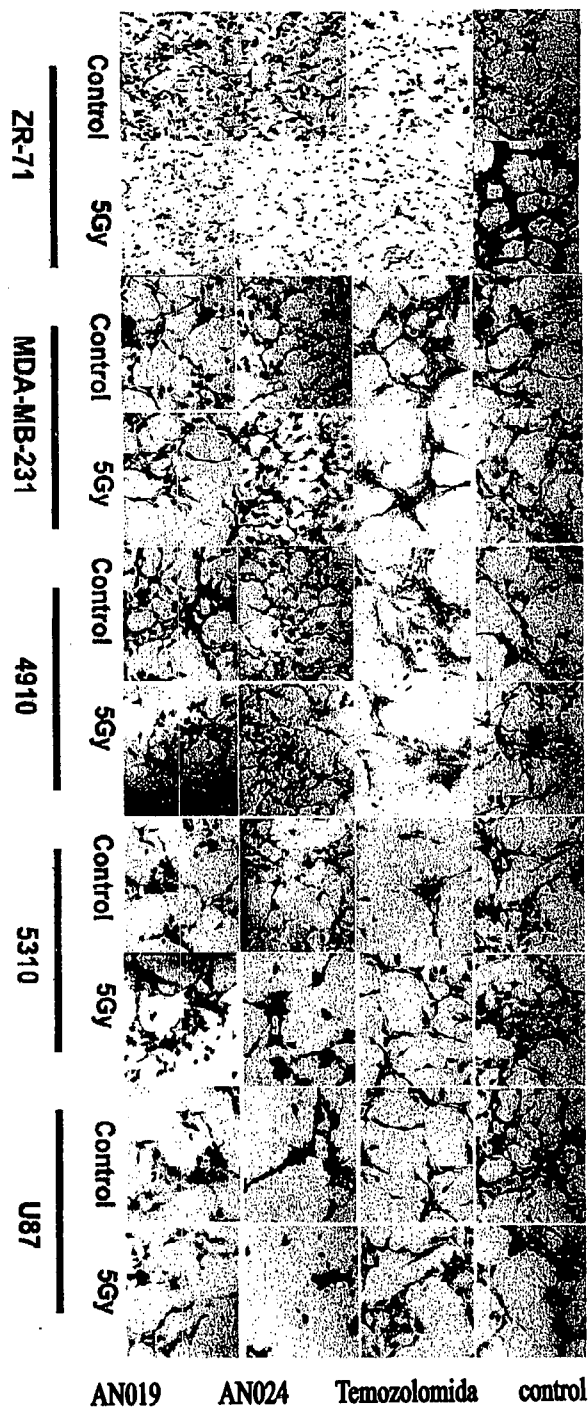
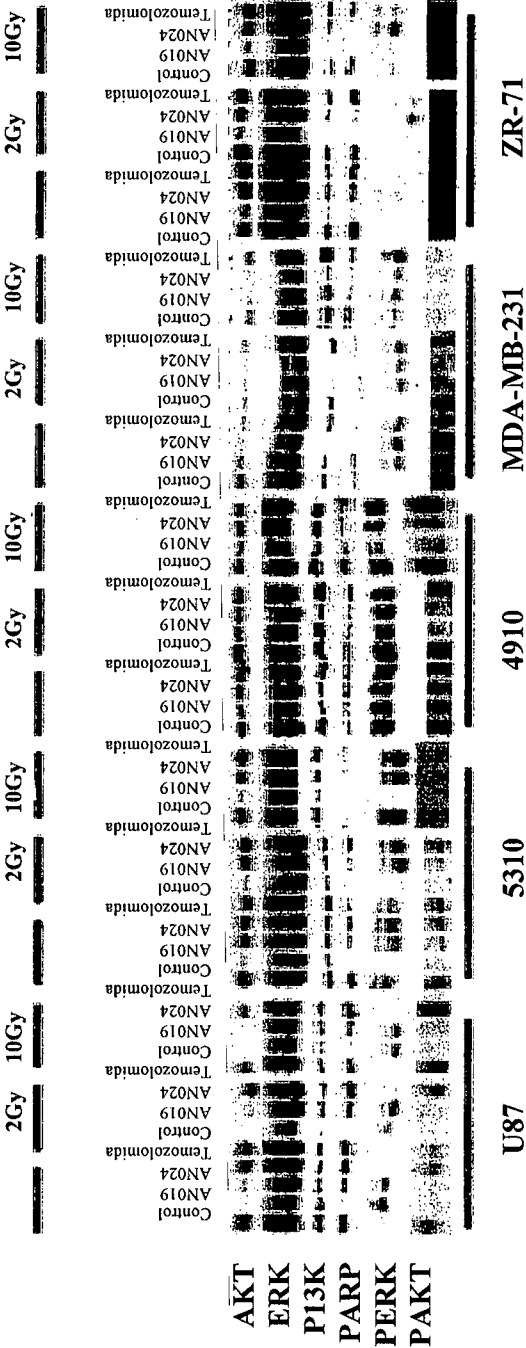


FIG. 18



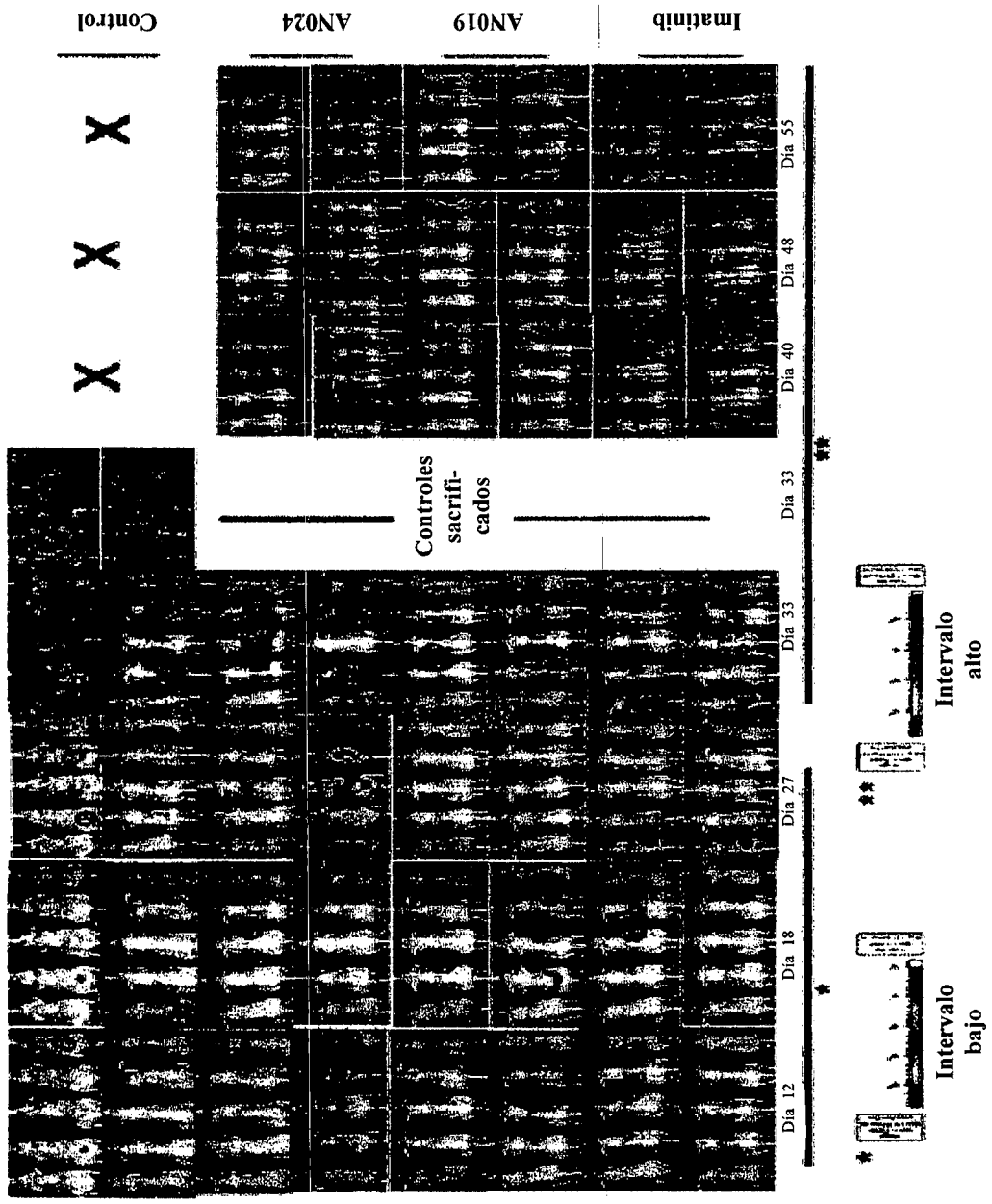


FIG. 19

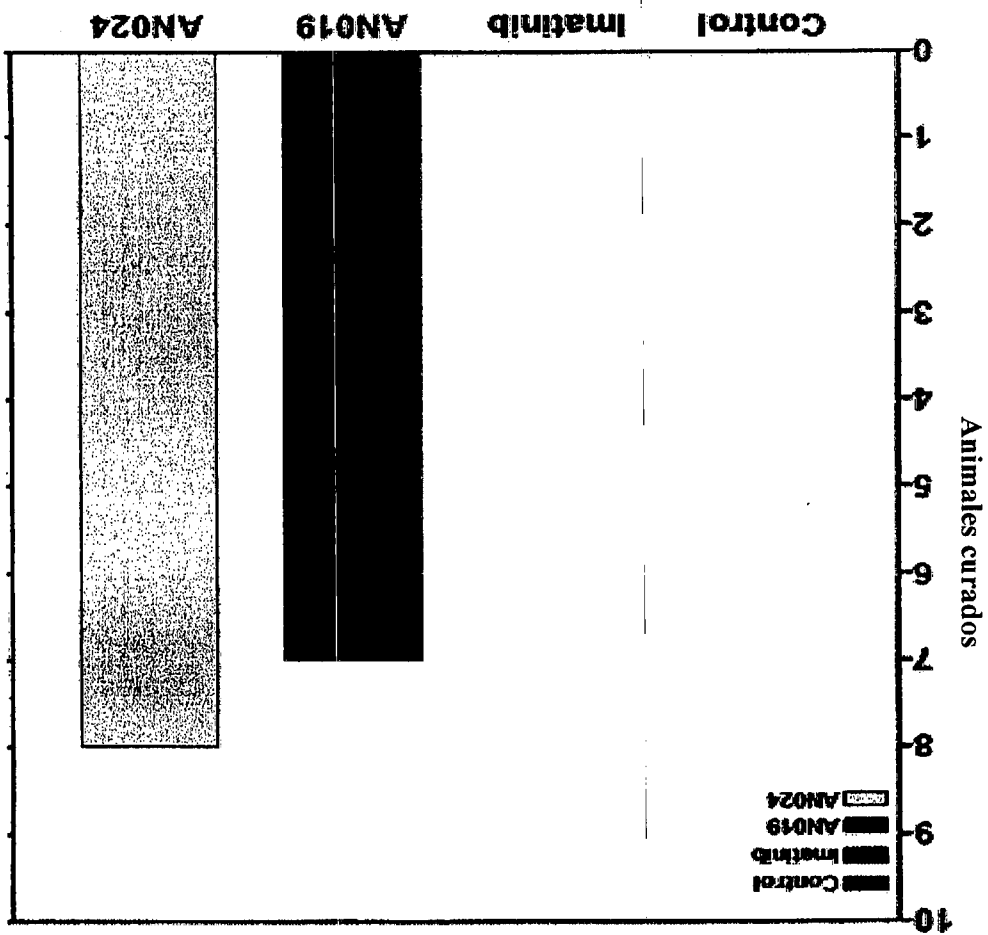
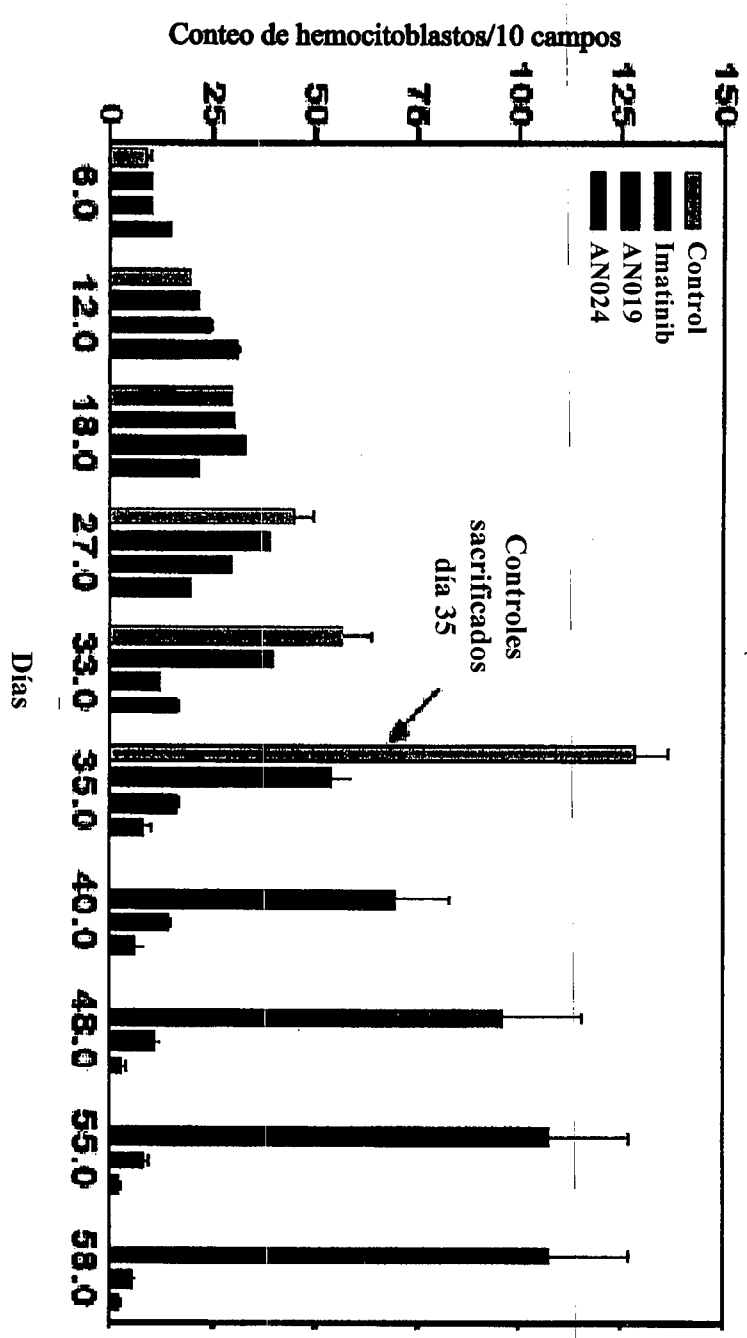


FIG. 20

FIG. 21



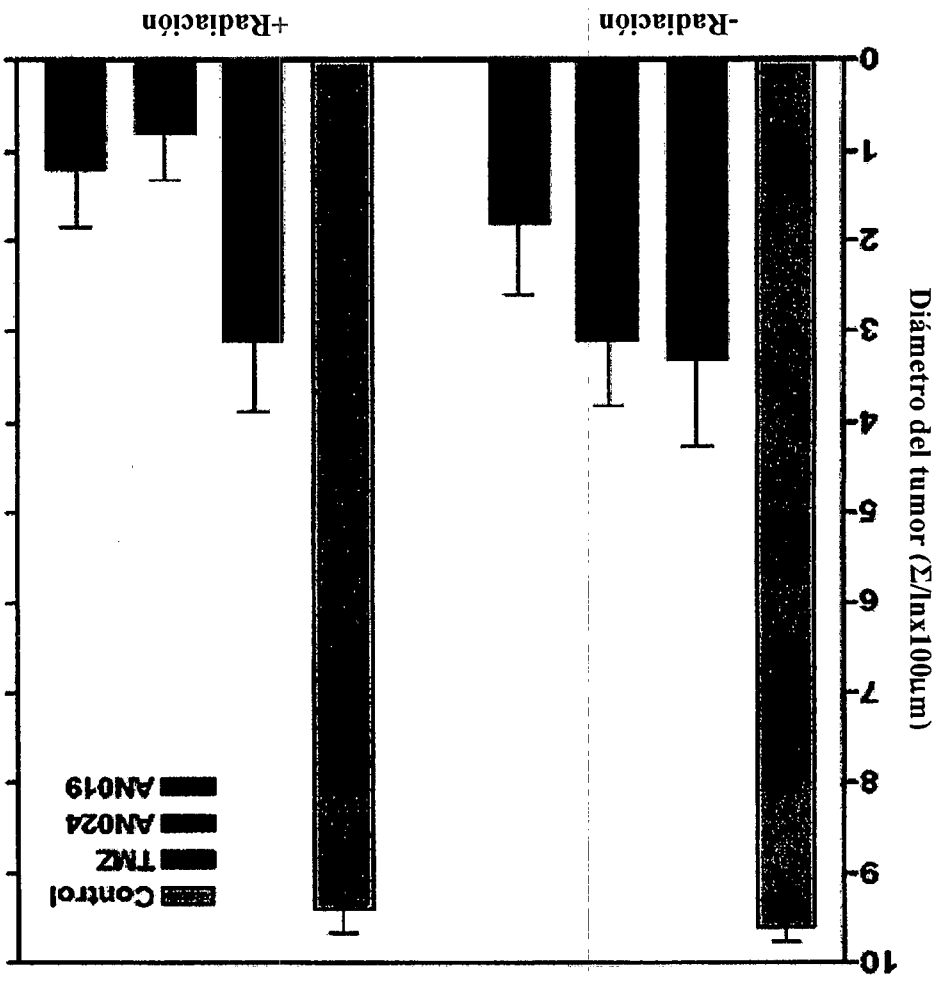


FIG. 22

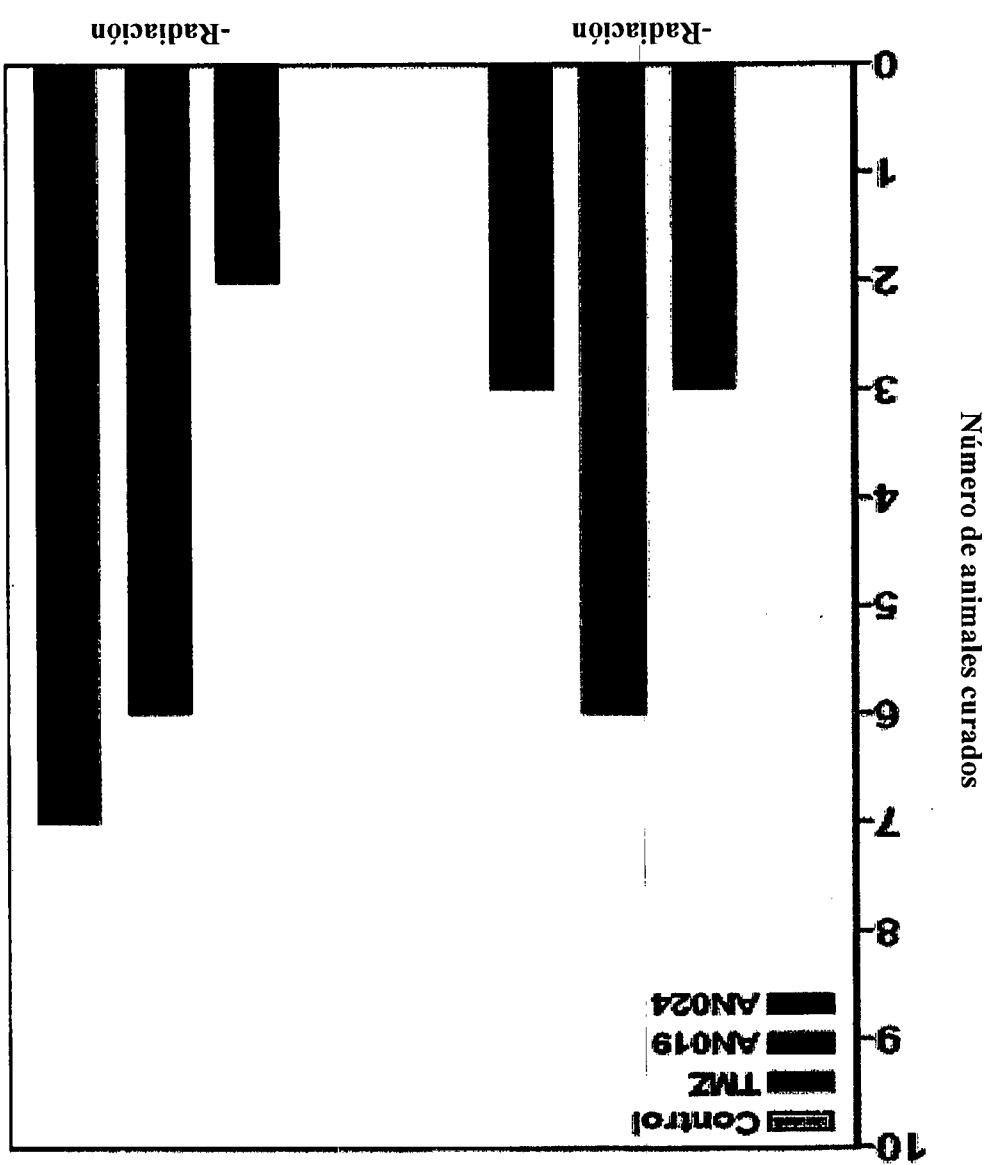


FIG. 23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2009/005421

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07D401/04 A61K31/506 A61P35/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07D A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, BEILSTEIN Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/027795 A (NATCO PHARMA LTD [IN]; KOMPELLA AMALA KISHAN [IN]; ADIBHATLA KALI SATY) 16 March 2006 (2006-03-16) cited in the application page 2, line 1 - line 3; examples 3,4	2-4,6, 8-15
Y		-17,19,20
Y	CAIRA M R: "CRYSTALLINE POLYMORPHISM OF ORGANIC COMPOUNDS" TOPICS IN CURRENT CHEMISTRY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 198, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 163-208, XP001156954 Chapter 3.1; pages 165-166	17,19
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 October 2009

Date of mailing of the international search report

29/10/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Johnson, Claire

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2009/005421

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PAQUETTE, L. (ED): "Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis" 1995, WILEY , XP002550833 first two sentences of "Functional Group Reductions" page 4893 -----	20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2009/005421

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-15

Form III crystal form, its preparation, uses and compositions

2. claim: 16

Form I crystal form

3. claims: 17,18

Form II crystal form

4. claim: 20

A method for preparing the compound of formula I

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2009/005421

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006027795 A	16-03-2006	AU 2005281299 A1	16-03-2006
		BR PI0515081 A	08-07-2008
		CA 2591321 A1	16-03-2006
		CN 101068805 A	07-11-2007
		EA 200700601 A1	28-02-2008
		EP 1786799 A1	23-05-2007
		HR 20070146 A2	31-08-2007
		JP 2008512448 T	24-04-2008
		KR 20070106681 A	05-11-2007
		NZ 554361 A	31-03-2009
		US 2007232633 A1	04-10-2007
		ZA 200701942 A	29-10-2008
		ZA 200703123 A	29-10-2008

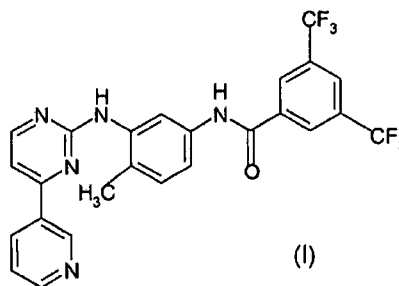
(21) N° de solicitud:	(51) Int Cl:	C07D 401/004
22) Fecha de solicitud:	(71) Solicitante(s)	NATCO PHARMA LIMITED
(30) Prioridad (31) Prioridad (32) Fecha (33) País	(72) Inventor(es)	AMALA KISHAN KOMPELLA Y OTROS
12/042,235 04/03/2008 US	(74) Apoderado:	LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
12/042,247 04/03/2008 US		
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 04/10/2010	(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT	Fecha:	11/09/2009
Fecha de presentación de la solicitud: 02/03/2009	N° publicación:	WO 2099/109867 A3
No. de solicitud PCT/IB2009/005421		
(54) Título: FORMA CRISTALINA DE DERIVADO DE FENILAMINO PIRIMIDINA		

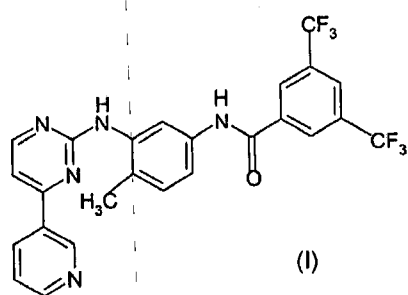
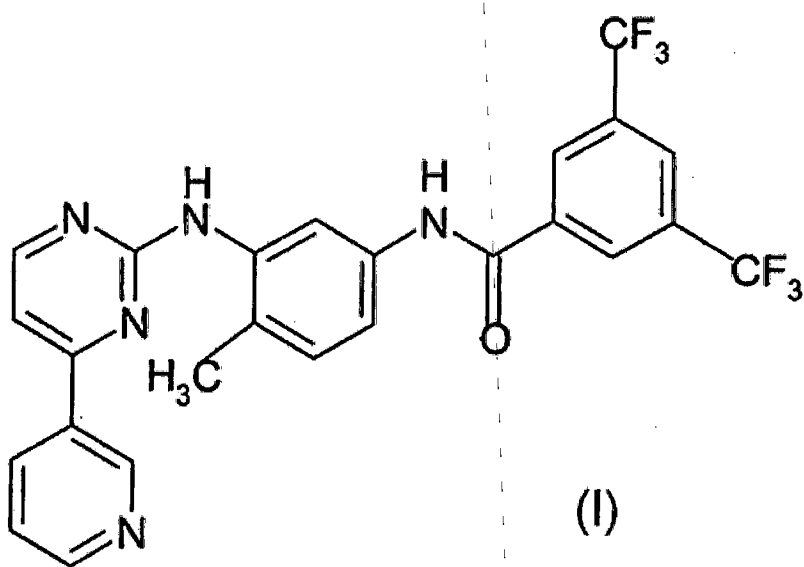
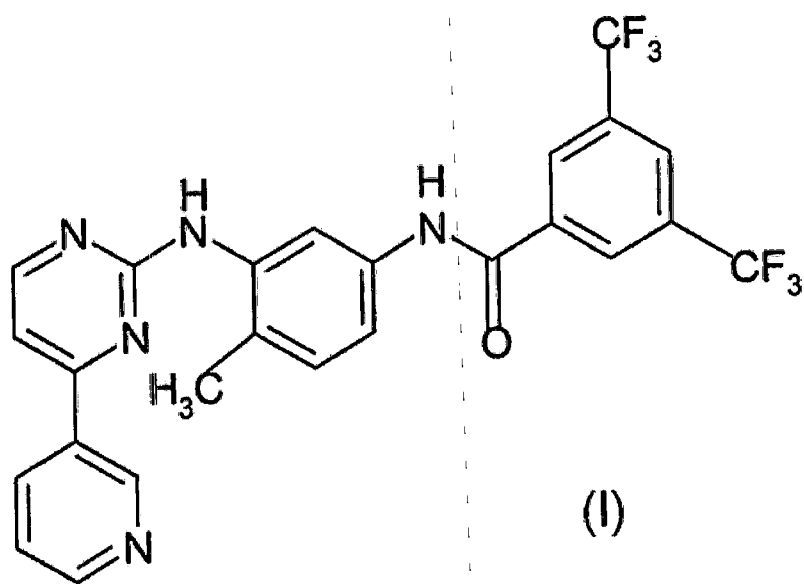
Reivindicación(es):

1. Una forma cristalina caracterizada porque es la Forma III de la (3,5-bis-trifluorometil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)-fenil]-benzamida (fórmula I).
2. Una forma cristalina de la forma III, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque tiene las características de XRPD:

Angulo [2-theta]	valor d, Angstrom	% de intensidad
5.909	14.94417	24.9
6.491	13.60517	66.4
8.267	10.68690	100.0
11.854	7.45967	58.2
13.181	6.71147	40.0
14.609	6.05866	50.0
15.960	5.54851	5.8
16.612	5.33224	9.5
18.826	4.70995	14.4
19.571	4.53226	52.1
21.302	4.16774	54.0
21.612	4.10861	37.7
22.160	4.00828	3.5
22.970	3.86869	23.8
23.278	3.81812	51.6
24.000	3.70491	8.7
25.112	3.54329	11.1
25.887	3.43895	3.1
26.500	3.36079	3.3
27.517	3.23887	3.4
29.476	3.02788	6.8
29.857	2.99011	8.6
30.474	2.93102	3.5
32.886	2.72133	3.2
33.559	2.66829	5.0
35.916	2.49836	3.8
39.645	2.27157	4.9
43.061	2.09893	2.6
43.748	2.06753	3.8
44.055	2.05383	3.9

3. Una forma cristalina de Forma III, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque tiene un punto de fusión en o arriba de 240 °C.
4. Una forma cristalina de Forma III, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la forma cristalina está esencialmente pura.
5. Un método de tratamiento de un sujeto que tenga la necesidad de una terapia anti-proliferativa, caracterizado porque comprende:
administrar al sujeto una forma cristalina, la Forma III, de la (3,5-bis-trifluorometil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)-fenil]-benzamida (fórmula I).





179

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176029-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 67,887
FECHA : AGOSTO 18 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-108728- -00000-0000

Fecha: 2010-09-02 16:45:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 183

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754327	354662860	17/02/2010	60,633,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	DETALLE	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
		TOTAL :	\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO: J7766-841-002-6,

180

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 65,125
FECHA : AGOSTO 9 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-108728-00000-0000

Fecha: 2010-09-02 16:45:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYI Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 183

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	132667006	09/08/2010	59,216,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		94 TASA ANUAL MANTENIMIENTO MODELO C	232,000.00
		TOTAL :	\$ 232,000.00

SON: DOSCIENTOS TREINTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO-17766-841-002-6

181

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176029-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 67,819
FECHA : AGOSTO 18 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-108728-00000-0000

Fecha: 2010-09-02 16:45:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 183

**** CONSIGNACION ****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	334662860	17/08/2010	60,633,000.00

**** CONCEPTO ****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		*** REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL	26,000.00
		TOTAL :	\$ 26,000.00

SDM: VEINTISEIS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO: 37766-841-002-6.

182

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 69,572
FECHA : AGOSTO 23 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-108728- -00000-0000

Fecha: 2010-09-02 16:45:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 183

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	156798795	23/08/2010	83,297,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
99		OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	1,000.00
		TOTAL :	\$ 1,000.00

SON: MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

COLO-17766-8411-002-6

183

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 69,573

FECHA : AGOSTO 23 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-108728-00000-0000

Fecha: 2010-09-02 16:45:51

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 183

**** CONSIGNACION ****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	156798795	23/08/2010	83,297,000.00

**** CONCEPTO ****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS
			TOTAL : \$ 1,000.00

SON: MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

Cdo- 17766-841-002-6



No. 10-108728- -00000-0000

Fecha: 2010-09-02 16:45:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 183

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐ Indicación que se solicita una patente.

☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐ Descripción de la invención

☐ Dibujos de ser estos pertinentes

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒ Indicación que se solicita una PCT

☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☒ Dibujos de ser estos pertinentes

☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

☐ Indicación que se solicita Diseño industrial

☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐ Representación gráfica de un esquema de trazado

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA
Apoderado(a) y/o Representante de
NATCO PHARMA LIMITED

REFERENCIA	Radicación No.	10 108728
	Solicitud internacional	PCT/IB2009/005421
	Fecha inicio fase nacional	04/10/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	<u>14066</u>

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

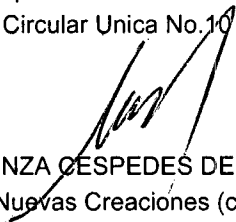
Continúa en la página siguiente...



Continuación radicado No: 10 108728



Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

29 OCT. 2010

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____.
adpa11