



No. 07-075241- -00000-0000

Fecha: 2007-07-24 16:20:57 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eva. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 166

FORMULARIO ÚNICO 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: **ASTEX THERAPEUTICS LIMITED**

Dirección: 436 Cambridge Science Park,
Milton Road, Cambridge CB4 0QA,
Reino Unido de la Gran Bretaña.

Nacionalidad o Domicilio: Cambridge, Reino
Unido de la Gran Bretaña

Lugar de Constitución : Reino Unido de la
Gran Bretaña.

Teléfono:

Fax:

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)

Nombre: **JIMENA ESCOBAR URIBE**

Dirección: Cra. 11 No. 86-53 piso 6

Teléfono: 6 162051/61 Fax: 6 161889

E-mail: tm-patent@escobaruribe.com

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Número 39.779.452T.P 68228

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: **VER ANEXOS**

Dirección:

Nacionalidad o domicilio:

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/GB2006/000193

Fecha 20 de enero de 2006

Publicación Internacional No. WO 2006/077416 A1

Fecha 27 de julio de 2006

6 **TÍTULO (54)** DERIVADOS DE PIRAZOL PARA LA INHIBICIÓN DE LAS CDKs Y GSKs.

7

Clasificación Internacional (51)

C07D 401/14

8

Prioridad

SI



NO



(33) País de Origen

Estados Unidos de América

Reino Unido de la Gran Bretaña

Reino Unido de la Gran Bretaña

Estados Unidos de América

(32) Fecha

21 de enero de 2005

22 de enero de 2005

27 de enero de 2005

09 de febrero de 2005

(31) Número de Solicitud

60/646,217

0501480.8

0501748.8

60/651,339

9

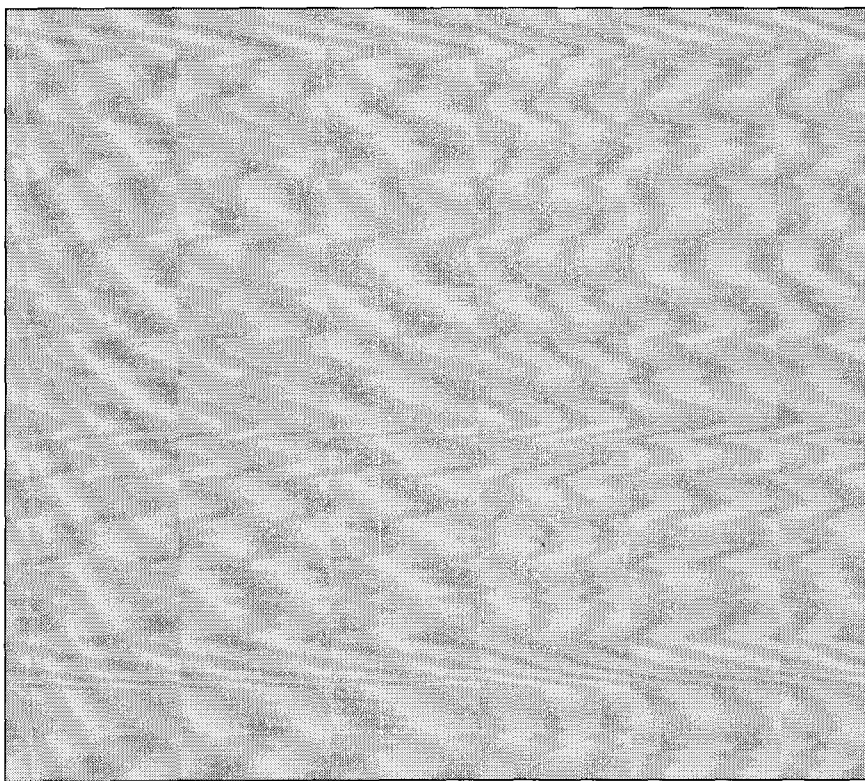
Comprobante de pago No. 07 - 51,440

Fecha

27 de junio de 2007

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ 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 internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de 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 deposito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ 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.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☒ Otros "Opinión escrita "

11 FIGURA CARACTERÍSTICA



12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE: JIMENA ESCOBAR URIBE

FIRMA: *Jimena Escobar Uribe*

C.C. 39.779.452 DE Usaquén T.P. 68.228

3079

2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 000176009-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-075241 - 00000-0000

Fecha: 2007-07-24 16:20:57 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 166

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 51,440
FECHA : JUNIO 27 DE 2007

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	66415409	26/06/2007	7,193,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN
			TOTAL : \$ 482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

2

POWER OF ATTORNEY DOCUMENTO DE PODER

El suscrito

The undersigned
acting on behalf of and representing **Astex Therapeutics Limited** a company duly organized and existing under the laws of **United Kingdom** domiciled at **436 Cambridge Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 0QA, United Kingdom** hereby appoints **JIMENA ESCOBAR-URIBE** and/or **IGNACIO ESCOBAR-URIBE** domiciled at Bogota, Colombia

CARRERA 11 A No. 94-76 OF. 305-306

as our true and legal attorneys with the necessary powers:

1. to apply to the administrative, judicial and police authorities of the Republic of Colombia, in any instance or appeal, for obtaining registration of patents, utility models, industrial designs, commercial ensigns and names, trademarks, domain names, copyrights and neighbouring rights, plant varieties, health licenses as well as their assignments, extensions, renewals, changes of name and domicile; 2. to prepare, apply for, obtain, execute and register contracts, licenses, authorizations and registrations of any kind; 3. to intervene as plaintiffs or defendants, in any instance or appeal, before any judge, court, tribunal, corporation, public officer or authority in any judicial, administrative or police action, such as: actions dealing with commercial ensigns and names; oppositions against trademark registrations; caducity and nullity actions; recovery actions, actions arising from obtainment and working of license agreements; actions dealing with unfair competition; criminal actions; actions claiming indemnity for damages, complaints or remarks on all sort of industrial property matters; the performance of precautionary measures, and in any other similar action, measure or appeal related to industrial property matters, copyrights and neighbouring rights and obtentor of plant varieties' rights. To this effect, we hereby authorize them to file applications, make descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, appeals and claims; to pay taxes, quotas and liens as provided by law; to waive or abandon granted rights or rights in process of being granted, to receive all kind of documents and securities; to issue the respective releases and, in general to take, before said authorities, pertinent steps to the above-mentioned purposes and take all measures they may deem advisable to protect our interests, with all other necessary legal faculties, and we hereby declare as good and valid whatever the attorneys should do to our benefit.

This power comprises the authority to ratify or confirm on our behalf any action, as well as the faculty of receiving, desisting, transacting, compromising, conciliating, substituting and revoking substitutions, taking notifications and appointing judicial or extra-judicial attorneys.

Signed at
On

Cambridge
7th February 2006

M. J. P.

CHIEF SCIENTIFIC
OFFICER

obrando en nombre y representación de
Astex Therapeutics Limited
una sociedad organizada y existente bajo las leyes del

Reino Unido
con domicilio en

436 Cambridge Science Park, Milton Road,
Cambridge CB4 0QA, Reino Unido

nombramos a **JIMENA ESCOBAR-URIBE** y/o **IGNACIO ESCOBAR-URIBE**

domiciliados en Bogotá, Colombia

CARRERA 11 A No. 94-76 OF. 305-306

apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente: 1. para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, registro de marcas, nombres de dominio, registro de derechos de autor y derechos conexos, registro de variedades vegetales, depósito de nombres comerciales y enseñanzas, registros sanitarios, así como sus trasposos, prórrogas, renovaciones, cambios de nombre y de domicilio; 2. elaborar, tramitar, solicitar, obtener, realizar, ejecutar y registrar contratos, licencias, autorizaciones y registros de cualesquiera clase; 3. intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso, y ante cualquier juez, entidad, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía, tales como acciones derivadas del nombre o enseña comerciales; observaciones u oposición al registro de marcas; acciones de caducidad y nulidad; acciones reivindicatorias; acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales y civiles; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos u observaciones a cualquier asunto sobre propiedad industrial; el ejercicio de medidas cautelares y cualesquiera otras acciones, medidas o recursos similares relacionados con la propiedad industrial, los derechos de autor y derechos conexos y los derechos de obtentor de variedades vegetales. A este efecto, los facultamos para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses, con todas las demás facultades necesarias y por este documento desde ahora declaramos válido y bueno todo cuanto los apoderados hicieren en nuestro beneficio. Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en nuestro nombre lo actuado, así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, conciliar, sustituir y revocar sustituciones, recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Firmado en
el



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

94876

2006 MAY 22 P 2:09

J. mena Escobar
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

[Signature]
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

El suscrito Notario Treinta y Seis de Bogotá,
Encargado Hace constar que esta fotocopia
coincide en su contenido con un documento
igual cuyo original ha tenido a la vista
(Art. 74 Decreto 960 de 1970)

17 JUL 2007

NELSON FLOREZ GONZALEZ
NOTARIO TREINTAY SEIS DE BOGOTA
ENCARGADO

ANEXOS

INVENTORES

1.) **WYATT, Paul, Graham**
(Division of Biological Chemistry & Molecular Microbiology University of Dundee, Dow Street, Dundee
DD1 5EH, Reino Unido de la Gran Bretaña);
2.) **BERDINI, Valerio**
(436 Cambridge Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 0QA, Reino Unido de la Gran Bretaña);
3.) **GILL, Adrian, Liam**
(CVGI Medicinal Chemistry, 3S101 Mereside, Alderley Park, Macclesfield, Cheshire SK10 4TG, Reino
Unido de la Gran Bretaña);
4.) **TREWARTHA, Gary**
(436 Cambridge Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 0QA, Reino Unido de la Gran Bretaña);
5.) **WOODHEAD, Andrew, James**
(436 Cambridge Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 0QA, Reino Unido de la Gran Bretaña).

7

Solicito expresamente a nombre de la sociedad **ASTEX THERAPEUTICS LIMITED**, sociedad constituida de conformidad con las leyes de Reino Unido de la Gran Bretaña, domiciliada en 436 Cambridge Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 0QA, Reino Unido de la Gran Bretaña, el otorgamiento de Patente para la invención titulada **“DERIVADOS DE PIRAZOL PARA LA INHIBICIÓN DE LAS CDKs Y GSKs”**.

Clase: C07D 401/14

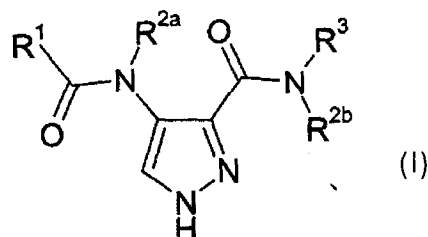

JIMENA ESCOBAR URIBE
C.C. 39.779.452 de Usaquen.
T.P. 68.228

7

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad Estados Unidos de América (31) No. Prioridad 60/646,217 (32) Fecha 21/01/05 (33) País US Reino Unido de la Gran Bretaña 0501480.8 22/01/05 GB Reino Unido de la Gran Bretaña 0501748.8 27/01/05 GB Estados Unidos de América 60/651,339 09/02/05 GB		(51) Int Cl: C07D 401/14 (71) Solicitante(s) ASTEX THERAPEUTICS LIMITED (72) Inventor(es) WYATT, Paul, Graham // BERDINI, Valerio // GILL, Adrian, Liam // TREWARTHA, Gary // WOODHEAD, Andrew, James. (74) Agente: JIMENA ESCOBAR URIBE	
(85) Fecha inicio fase nacional: (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: Fecha 20/01/06 No. de solicitud PCT/GB2006/000193		(87) Publicación internacional Fecha: Fecha (dd/mm/aa) 27/07/06 N° publicación: WO 2006/077416 A1	
(54) Título: DERIVADOS DE PIRAZOL PARA LA INHIBICIÓN DE LAS CDKs Y GSKs.			

Reivindicación(es):

1. Un compuesto de la Fórmula (I):



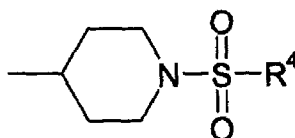
o una sal, tautómero, N-óxido, o solvato del mismo,

en donde:

R¹ es 2,6-diclorofenilo;

R^{2a} y R^{2b} son ambos hidrógeno;

y R³ es un grupo:



en donde R⁴ es alquilo de 1 a 4 átomos de carbono.

10

1

DERIVADOS DE PIRAZOL PARA
LA INHIBICIÓN DE LAS CDKs Y GSKs

Esta invención se refiere a compuestos de pirazol que inhiben
5 o modulan la actividad de las cinasas dependientes de ciclina (CDK)
y cinasas de sintasa de glicógeno (GSK), al uso de los compuestos
en el tratamiento o en la profilaxis de estados de enfermedad o
condiciones mediadas por las cinasas, y a compuestos novedosos
que tienen una actividad inhibidora o moduladora de cinasa. También
10 se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen a los
compuestos, e intermediarios químicos novedosos.

Antecedentes de la Invención

Las cinasas de proteína constituyen una gran familia de
enzimas estructuralmente relacionadas que son responsables del
15 control de una amplia variedad de procesos de transducción de
señales adentro de la célula (Hardie, G. y Hanks, S. (1995) *The
Protein Kinase Facts Book. I and II*, Academic Press, San Diego,
CA). Las cinasas se pueden categorizar en familias por los sustratos
que fosforilan (por ejemplo, proteína-tirosina, proteína-
20 serina/treonina, lípidos, etcétera). Se han identificado motivos de
secuencia que corresponden en general a cada una de estas familias
de cinasa (por ejemplo, Hanks, S. K., Hunter, T., *FASEB J.*, 9:576-
596 (1995); Knighton y colaboradores, *Science*, 253:407-414 (1991);
Hiles y colaboradores, *Cell*, 70:419-429 (1992); Kunz y
25 colaboradores, *Cell*, 73:585-596 (1993); Garcia-Bustos y

10

colaboradores, *EMBO J.*, 13:2352-2361 (1994)).

Las cinasas de proteína se pueden caracterizar por sus mecanismos de regulación. Estos mecanismos incluyen, por ejemplo, auto-fosforilación, trans-fosforilación por otras cinasas, interacciones de proteína-proteína, interacciones de proteína-lípido, e interacciones de proteína-polinucleótido. Una cinasa de proteína individual puede ser regulada por más de un mecanismo.

Las cinasas regulan muchos procesos celulares diferentes, incluyendo, pero no limitándose a, proliferación, diferenciación, apoptosis, movilidad, transcripción, traducción y otros procesos de señalización, mediante la adición de grupos fosfato a las proteínas objetivas. Estos eventos de fosforilación actúan como conmutadores moleculares de activación/desactivación que pueden modular o regular la función biológica de la proteína objetiva. La fosforilación de las proteínas objetivas se presenta en respuesta a una variedad de señales extracelulares (hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento y diferenciación, etcétera), eventos del ciclo celular, tensiones medio-ambientales o nutricionales, etcétera. La cinasa de proteína apropiada funciona en las sendas de señalización para activar o inactivar (ya sea directa o indirectamente), por ejemplo, una enzima metabólica, proteína reguladora, receptor, proteína citoesquelética, canal o bomba de iones, o factor de transcripción. Se ha implicado una señalización incontrolada debida a un control defectuoso de la fosforilación de la proteína en un número de enfermedades, incluyendo, por ejemplo, inflamación, cáncer,

alergia/asma, enfermedades y condiciones del sistema inmune, enfermedades y condiciones del sistema nervioso central, y angiogénesis.

Cinasas Dependientes de Ciclina

5 El proceso de división celular eucariótica se puede dividir ampliamente en una serie de fases en secuencia denominadas G1, S, G2, y M. Se ha demostrado que el progreso correcto a través de las diferentes fases del ciclo celular depende críticamente de la regulación especial y temporal de una familia de proteínas conocidas
10 como cinasas dependientes de ciclina (cdks), y un conjunto diverso de sus componentes de proteína cognados asociados denominados ciclinas. Las cinasas dependientes de ciclina son proteína de cinasa de serina-treonina homólogas a cdc2 (también conocida como cdk1), que son capaces de utilizar el ATP como un sustrato en la
15 fosforilación de diversos polipéptidos en un contexto dependiente de la secuencia. Las ciclinas son una familia de proteínas caracterizadas por una región de homología, que contiene aproximadamente 100 aminoácidos, denominada como el "cuadro de ciclina", el cual se utiliza en el enlace a, y en la definición de la
20 selectividad para, proteínas asociadas de cinasa dependiente de ciclina específicas.

La modulación de los niveles de expresión, las velocidades de degradación, y los niveles de activación de diferentes cinasas dependientes de ciclina, y las ciclinas a través de todo el ciclo
25 celular, conduce a la formación cíclica de una serie de complejos de

cinasa dependiente de ciclina/ciclina, en donde las cinasas dependientes de ciclina son enzimáticamente activas. La formación de estos complejos controla el paso a través de puntos de verificación del ciclo celular separados, y de esta manera, hace posible que continúe el proceso de la división celular. La falla para satisfacer los criterios bioquímicos previamente requeridos en un punto de verificación dado del ciclo celular, es decir, la falla para formar un complejo requerido de cinasa dependiente de ciclina/ciclina, puede conducir a un paro del ciclo celular y/o a apoptosis celular. La proliferación celular aberrante, como se manifiesta en el cáncer, con frecuencia se puede atribuir a una pérdida de control del ciclo celular correcto. Por consiguiente, la inhibición de la actividad enzimática de la cinasa dependiente de ciclina proporciona un medio por el cual se puede hacer que las células que se dividan anormalmente detengan su división y/o sean aniquiladas. La diversidad de cinasas dependientes de ciclina, y complejos de cinasa dependiente de ciclina, y sus papeles críticos en la mediación del ciclo celular, proporciona un amplio espectro de objetivos terapéuticos potenciales seleccionados con base en una racionalización bioquímica definida.

El progreso desde la fase G1 hasta la fase S de ciclo celular, es primordialmente regulado por cdk2, cdk3, cdk4, y cdk6 mediante su asociación con miembros de las ciclinas de tipo D y E. Las ciclinas de tipo D parecen ser instrumentales para hacer posible el paso más allá del punto de restricción G1, en donde el complejo de

cdk2/ciclina E es clave para la transición desde la fase G1 hasta la fase S. Se piensa que el progreso subsecuente a través de la fase S y la entrada en la fase G2 requiere del complejo de cdk2/ciclina A. Tanto la mitosis como la transición desde la fase G2 hasta la fase M que la desencadena, son reguladas por complejos de cdk1 y las ciclinas de tipo A y B.

Durante la fase G1, la proteína de retinoblastoma (Rb), y proteínas de bolsillo relacionadas, tales como p130, son sustratos para los complejos de cdk(2, 4, y 6)/ciclina. El progreso a través de la fase G1 es en parte facilitado por la hiperfosforilación, y por lo tanto la inactivación, de la proteína de retinoblastoma y p130 por los complejos de cdk(4/6)/ciclina-D. La hiperfosforilación de la proteína de retinoblastoma y p130 provoca la liberación de los factores de transcripción, tales como E2F, y por lo tanto, la expresión de los genes necesarios para el progreso a través de la fase G1 y para entrar en la fase S, tales como el gen para la ciclina E. La expresión de la ciclina E facilita la formación del complejo de cdk2/ciclina E, el cual amplifica o mantiene los niveles de E2F por medio de una fosforilación adicional de la proteína de retinoblastoma. El complejo de cdk2/ciclina E también fosforila otras proteínas necesarias para la réplica del ADN, tales como NPAT, que se ha implicado en la biosíntesis de histona. El progreso en la fase G1 y la transición de G1/S, también son regulados por la senda de Myc estimulado por mitógeno, que se alimenta hacia la senda de cdk2/ciclina E. Cdk2 también se conecta a la senda de respuesta al daño del ADN

mediada por p53 por medio de la regulación por p53 de los niveles de p21. p21 es un inhibidor de proteína de cdk2/ciclina E, y por lo tanto, es capaz de bloquear o demorar la transición de G1/S. Por consiguiente, el complejo de cdk2/ciclina E puede representar un punto en el cual se integran hasta algún grado los estímulos bioquímicos a partir de las sendas de Rb, Myc, y p53. Por consiguiente, cdk2 y/o el complejo de cdk2/ciclina E, representan buenos objetivos para la terapia diseñada para detener o recuperar el control de, el ciclo celular, en las células que se dividen de una manera aberrante.

No está claro el papel exacto de cdk3 en el ciclo celular. Como todavía no se ha identificado un componente asociado de ciclina cognado, pero sí una forma negativa dominante de células demoradas cdk3 en G1, se sugiere de esta manera que cdk3 tiene un papel en la regulación de la transición de G1/S.

Aunque la mayoría de las cinasas dependientes de ciclina se han implicado en la regulación del ciclo celular, existe evidencia de que ciertos miembros de la familia de cinasa dependiente de ciclina están involucrados en otros procesos bioquímicos. Esto es ejemplificado por cdk5, que es necesaria para el desarrollo neuronal correcto, y que también se ha implicado en la fosforilación de varias proteínas neuronales, tales como Tau, NUDE-1, sinapsina1, DARPP32, y el complejo de Munc18/Syntaxina1A. La cdk5 neuronal es convencionalmente activada por el enlace a las proteínas p35/p39. Sin embargo, se puede desregular la actividad de cdk5

mediante el enlace de p25, una versión truncada de p35. La conversión de p35 hasta p25, y la desregulación subsecuente de la actividad de cdk5, se pueden inducir mediante isquemia, exitotoxicidad, y péptido- β -amiloide. En consecuencia, p25 se ha implicado en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas, tales como Alzheimer, y por consiguiente, es de interés como un objetivo para la terapia dirigida contra estas enfermedades.

Cdk7 es una proteína nuclear que tiene una actividad de cdc2 CAK, y se enlaza a la ciclina H. Cdk7 se ha identificado como un componente del complejo de transcripción TFIIH, que tiene una actividad de dominio terminal-c de polimerasa II de ADN (CTD). Se ha asociado con la regulación de la transcripción de HIV-1 por medio de una senda bioquímica mediada por Tat. Cdk8 se enlaza con la ciclina C, y se ha implicado en la fosforilación del CTD de la polimerasa II de ARN. De una manera similar, el complejo de cdk9/ciclina-T1 (complejo P-TEFb) se ha implicado en el control de la elongación de la polimerasa II de ARN. PTEF-b también se requiere para la activación de la transcripción del genoma de HIV-1 mediante el transactivador viral Tat a través de su interacción con la ciclina T1. Cdk7, cdk8, cdk9, y el complejo P-TEFb, por consiguiente, son los objetivos potenciales para los terapéuticos anti-virales.

A un nivel molecular, la mediación de la actividad del complejo de cinasa dependiente de ciclina/ciclina, requiere de una serie de eventos estimulantes e inhibidores de fosforilación o

desfosforilación. La fosforilación de la cinasa dependiente de ciclina es llevada a cabo por un grupo de cinasas activadoras de la cinasa dependiente de ciclina (CAKs), y/o de cinasas tales como wee1, Myt1 y Mik1. La desfosforilación es llevada a cabo por las fosfatasas, tales como cdc25(a y c), pp2a, ó KAP.

La actividad del complejo de cinasa dependiente de ciclina/ciclina puede ser además regulada por dos familias de inhibidores proteínáceos celulares endógenos: la familia Kip/Cip, o la familia INK. Las proteínas INK se enlazan específicamente a cdk4 y cdk6. p16^{ink4} (también conocida como MTS1) es un gen supresor de tumor potencial que se muta o se suprime en un gran número de cánceres primarios. La familia Kip/Cip contiene proteínas, tales como p21^{Cip1, Wat1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2}. Como se describe anteriormente, p21 es inducida por p53, y es capaz de inactivar los complejos de cdk2/ciclina(E/A) y cdk4/ciclina(D1/D2/D3). Se han observado niveles atípicamente bajos de la expresión de p27 en los cánceres de mama, colon, y próstata. Inversamente, se ha demostrado que la sobre-expresión de la ciclina E en los tumores sólidos se correlaciona con un mal pronóstico del paciente. La sobre-expresión de ciclina D1 se ha asociado con carcinomas esofágicos, de mama, escamosos, y de pulmón que no son de células pequeñas.

Los papeles pivotaes de las cinasas dependientes de ciclina, y sus proteínas asociadas, en la coordinación e impulso del ciclo celular en las células proliferantes, ya se han ilustrado anteriormente. También se han descrito algunas de las sendas

bioquímicas en las cuales las cinasas dependientes de ciclina tienen un papel clave. Por consiguiente, es potencialmente altamente deseable el desarrollo de monoterapias para el tratamiento de trastornos proliferativos, tales como cánceres, utilizando terapéuticos dirigidos genéricamente hacia las cinasas dependientes de ciclina, o hacia cinasas dependientes de ciclina específicas. Concebiblemente, los inhibidores de cinasa dependiente de ciclina también se pueden utilizar para tratar otras condiciones, tales como infecciones virales, enfermedades autoinmunes, y enfermedades neurodegenerativas, entre otras. Los productos terapéuticos dirigidos a la cinasa dependiente de ciclina también pueden proporcionar beneficios clínicos en el tratamiento de las enfermedades previamente descritas, cuando se utilizan en una terapia de combinación con agentes terapéuticos existentes o nuevos. Las terapias contra el cáncer dirigidas a la cinasa dependiente de ciclina podrían tener potencialmente ventajas sobre muchos agentes anti-tumorales actuales, debido a que no interactuarían directamente con el ADN, y por consiguiente, deben reducir el riesgo de un desarrollo tumoral secundario.

20 Cinasa de Sintasa de Glicógeno

La cinasa de sintasa de glicógeno-3 (GSK3) es una cinasa de serina-treonina que se presenta como dos isoformas ubicuitamente expresadas en seres humanos (GSK3 α y GSK3 β). GSK3 se ha implicado por tener papeles en el desarrollo embrionario, en la síntesis de proteínas, en la proliferación celular, en la diferenciación

19

celular, en la dinámica de los microtúbulos, en la movilidad celular, y en la apoptosis celular. Como tal, GSK3 se ha implicado en el progreso de estados de enfermedad tales como diabetes, cáncer, enfermedad de Alzheimer, embolia, epilepsia, enfermedad de
5 neuronas motrices, y/o trauma de la cabeza. Filogenéticamente, GSK3 está más estrechamente relacionada con las cinasas dependientes de ciclina (CDKs).

La secuencia del sustrato peptídico en consenso reconocida por GSK3 es (Ser/Thr)-X-X-X-(pSer/pThr), en donde X es cualquier
10 aminoácido (en las posiciones (n+1), (n+2), (n+3)), y pSer y pThr son fosfo-serina y fosfo-treonina, respectivamente (n+4). GSK3 fosforila la primera serina, o treonina, en la posición (n). La fosfo-serina, o fosfo-treonina, en la posición (n+4) parecen ser necesarias para cebar GSK3 con el fin de dar un máximo cambio de sustrato. La
15 fosforilación de GSK3 α en Ser21, ó de GSK3 β en Ser9, conduce a la inhibición de GSK3. Los estudios de mutagénesis y competencia de péptidos han conducido al modelo de que el término-N fosforilado de GSK3 es capaz de competir con el sustrato del fosfo-péptido (S/TXXXpS/pT) por medio de un mecanismo auto-inhibidor. También
20 hay datos que sugieren que GSK3 α y GSK3 β pueden ser sutilmente reguladas por la fosforilación de las tirosinas 279 y 216, respectivamente. La mutación de estos residuos hasta un Phe provocó una reducción en la actividad de la cinasa *in vivo*. La estructura cristalográfica de rayos-X de GSK3 β ha ayudado a dar luz
25 sobre todos los aspectos de la activación y regulación de GSK3.

19

GSK3 forma parte de la senda de respuesta a la insulina del mamífero, y es capaz de fosforilar, y de esta manera inactivar, la sintasa de glicógeno. El aumento de la actividad de la sintasa de glicógeno, y por lo mismo de la síntesis de glicógeno, a través de la inhibición de GSK3, por lo tanto, se ha considerado como un medio potencial para combatir la diabetes mellitus tipo II o no dependiente de insulina (NIDDM): una condición en la cual los tejidos corporales llegan a ser resistentes al estímulo de insulina. La respuesta de insulina celular en el hígado, en el tejido adiposo, o en el tejido muscular, es desencadenada por la insulina que se enlaza a un receptor de insulina extracelular. Esto provoca la fosforilación, y el reclutamiento subsecuente hacia la membrana de plasma, de las proteínas de sustrato del receptor de insulina (IRS). La fosforilación adicional de las proteínas de sustrato del receptor de insulina inicia el reclutamiento de la cinasa de fosfoinositida-3 (PI3K) hacia la membrana de plasma, en donde puede liberar el segundo mensajero de 3,4,5-trifosfato de fosfatidilinositilo (PIP3). Esto facilita la co-localización de la cinasa-1 de proteína dependiente de fosfoinositida (PDK1) y de la cinasa B de proteína (PKB ó Akt) hacia la membrana, en donde la PDK1 activa la PKB. La cinasa B de proteína es capaz de fosforilar, y de esta manera inhibir, la GSK3 α y/o GSK3 β a través de la fosforilación de Ser9 ó Ser21, respectivamente. Entonces, la inhibición de GSK3 desencadena el aumento de la actividad de la sintasa de glicógeno. Por consiguiente, los agentes terapéuticos capaces de inhibir la GSK3 pueden inducir respuestas celulares

71

ajenas a las que se ven sobre el estímulo de insulina. Un sustrato de GSK3 *in vivo* adicional es el factor 2B de inicio de síntesis de proteína eucariótica (eIF2B). El eIF2B se inactiva mediante fosforilación, y por lo tanto, es capaz de suprimir la biosíntesis de proteína. La inhibición de GSK3, por ejemplo, mediante la inactivación de la proteína "objetiva de rapamicina de mamífero" (mTOR), por lo tanto, puede aumentar la biosíntesis de proteína. Finalmente, existe alguna evidencia para la regulación de la actividad de GSK3 por medio de la senda de cinasa de proteína activada por mitógeno (MAPK) a través de la fosforilación de GSK3 mediante las cinasas, tales como la cinasa de proteína activada por mitógeno y la cinasa 1 de proteína activada (MAPKAP-K1 ó RSK). Estos datos sugieren que se puede modular la actividad de GSK3 mediante estímulos mitogénicos con insulina y/o aminoácido.

15 También se ha demostrado que GSK3 β es un componente clave en la senda de señalización de Wnt en los vertebrados. Se ha demostrado que esta senda bioquímica es crítica para el desarrollo embrionario normal, y regula la proliferación celular en los tejidos normales. GSK3 llega a inhibirse en respuesta a los estímulos de Wnt. Esto puede conducir a la desfosforilación de los sustratos de GSK3, tales como Axina, el producto genético de poliposis-coli adenomatosa (APC) y β -catenina. La regulación aberrante de la senda de Wnt se ha asociado con muchos cánceres. Las mutaciones en APC, y/o β -catenina, son comunes en el cáncer colo-rectal y en otros tumores. También se ha demostrado que la β -catenina es

25

21

12

importante en la adhesión celular. Por consiguiente, la GSK3 puede modular los procesos de adhesión celular hasta algún grado. Aparte de las sendas bioquímicas ya descritas, también existen datos que implican a la GSK3 en la regulación de la división celular por medio de la fosforilación de ciclina-D1, en la fosforilación de los factores de transcripción tales como c-Jun, CCAAT/proteína de enlace α de potenciador (C/EBP α), c-Myc y/u otros sustratos tales como Factor Nuclear de Células T Activadas (NFATc), Factor de Choque por Calor-1 (HSF-1) y la proteína de enlace de elemento de respuesta a c-AMP (CREB). GSK3 también parece tener un papel, aunque específico del tejido, en la regulación de la apoptosis celular. El papel de GSK3 en la modulación de la apoptosis celular, por medio de un mecanismo pro-apoptótico, puede ser una relevancia particular para las condiciones médicas en las cuales se pueda presentar la apoptosis neuronal. Los ejemplos de éstas son trauma de la cabeza, embolia, epilepsia, Alzheimer, y enfermedades de las neuronas motrices, parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, y enfermedad de Pick. *In vitro*, se ha mostrado que GSK3 es capaz de hiperfosforilar la proteína Tau asociada con microtúbulos. La hiperfosforilación de Tau altera su enlace normal a los microtúbulos, y también puede conducir a la formación de filamentos de Tau intra-celulares. Se cree que la acumulación progresiva de estos filamentos conduce a disfunción y degeneración neuronal eventual. La inhibición de la fosforilación de Tau, a través de la inhibición de GSK3, por lo tanto, puede proporcionar un medio

22

para limitar y/o prevenir los efectos neurodegenerativos.

Linfomas de células-B Grandes Difusos (DLBCL)

El progreso del ciclo celular es regulado por la acción combinada de las ciclinas, las cinasas dependientes de ciclina (CDKs), y los inhibidores de CDK (CDKi), que son reguladores negativos del ciclo celular. p27KIP1 es una CDKi clave en la regulación del ciclo celular, cuya degradación se requiere para la transición de G1/S. A pesar de la ausencia de expresión de p27KIP1 en los linfocitos en proliferación, se han reportado algunos linfomas de células-B agresivos, que muestran un teñido anómalo de p27KIP1. Se encontró una expresión anormalmente alta de p27KIP1 en los linfomas de este tipo. El análisis de la relevancia clínica de estos descubrimientos mostró que un alto nivel de expresión de p27KIP1 en este tipo de tumor es un marcador de pronóstico adverso, tanto en el análisis univariado como multivariado. Estos resultados muestran que hay una expresión anormal de p27KIP1 en los linfomas de células B grandes difusos (DLBCL), con un significado clínico adverso, sugiriendo que esta proteína p27KIP1 anómala puede hacerse no funcional a través de su interacción con otras proteínas reguladoras del ciclo celular. (Br. J. Cancer. julio de 1999; 80(9):1427-34. p27KIP1 se expresa anormalmente en los linfomas de células B grandes difusos, y está asociada con un resultado clínico adverso. Saez A, Sanchez E, Sanchez-Beato M, Cruz MA, Chacon 1, Munoz E, Camacho FI, Martinez-Montero JC, Mollejo M, Garcia JF, Piris MA. Departamento de Patología, Hospital Virgen de la Salud,

Toledo, España).

Leucemia Linfocítica Crónica

La leucemia linfocítica crónica de células B (CLL) es la leucemia más común en el hemisferio occidental, diagnosticándose aproximadamente 10,000 nuevos casos cada año (Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA: Cancer statistics, 1997. Ca. Cancer. J. Clin. 47:5, (1997)). En relación con otras formas de leucemia, el pronóstico global de la leucemia linfocítica crónica es bueno, teniendo inclusive los pacientes en la etapa más avanzada una sobrevivencia promedio de 3 años.

La adición de fludarabina como la terapia inicial para los pacientes con leucemia linfocítica crónica sintomática, ha conducido a un índice más alto de respuestas completas (27 por ciento contra 3 por ciento) y duración de sobrevivencia sin progreso (33 contra 17 meses), comparándose con las terapias basadas en alquilador previamente utilizadas. Aunque la obtención de una respuesta clínica completa después de la terapia es el paso inicial hacia la mejora la sobrevivencia en la leucemia linfocítica crónica, la mayoría de los pacientes no alcanzan una remisión completa, o no responden a la fludarabina. Adicionalmente, todos los pacientes con leucemia linfocítica crónica tratados con fludarabina eventualmente tienen recurrencia, haciendo que su papel como el único agente sea puramente paliativo (Rai KR, Peterson B, Elias L, Shepherd L, Hines J, Nelson D, Cheson B, Kolitz J, Schiffer CA: A randomized comparison of fludarabine and chlorambucil for patients with

previously untreated chronic lymphocytic leukemia. A CALGB SWOG, CTG/NCI-C and ECOG Inter-Group Study. Blood 88:141a, 1996 (extracto 552, suplemento 1). Por consiguiente, será necesaria la identificación de nuevos agentes con mecanismos novedosos de acción que complementen a la citotoxicidad de la fludarabina, y que abroguen la resistencia inducida por los factores de resistencia a fármacos en la leucemia linfocítica crónica intrínsecos, si se quieren hacer realidad avances adicionales en la terapia de esta enfermedad.

El factor uniformemente predictivo más extensamente estudiado para la mala respuesta a la terapia y para la supervivencia inferior en los pacientes con leucemia linfocítica crónica, es la función aberrante de p53, como se caracteriza por las mutaciones puntuales o las supresiones del cromosoma 17p13. En realidad, virtualmente no se han documentado respuestas ya sea a la terapia con alquilador o bien a la terapia con análogo de purina en múltiples series de casos institucionales individuales para los pacientes de leucemia linfocítica crónica con una función anormal de p53. La introducción de un agente terapéutico que tenga la capacidad para superar la resistencia a fármacos asociada con la mutación de p53 en la leucemia linfocítica crónica, sería potencialmente un importante avance para el tratamiento de la enfermedad.

El flavopiridol y CYC 202, los inhibidores de las cinasas dependientes de ciclina, inducen la apoptosis *in vitro* de las células malignas a partir de la leucemia linfocítica crónica de células-B (B-CLL).

La exposición al flavopiridol da como resultado el estímulo de la actividad de caspasa 3, y la disociación dependiente de caspasa de p27(kip1), un regulador negativo del ciclo celular, que se sobre-expresa en la leucemia linfocítica crónica de células-B (Blood. 15 de noviembre de 1998; 92(10):3804-16 Flavopiridol induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells via activation of caspase-3 without evidence of bcl-2 modulation or dependence on functional p53. Byrd JC, Shinn C, Waselenko JK, Fuchs EJ, Lehman TA, Nguyen PL, Flinn IW, Diehl LF, Sausville E, Grever MR).

Técnica Anterior

La Publicación Internacional Número WO 02/34721 de Du Pont, da a conocer una clase de indeno[1,2-c]pirazol-4-onas como inhibidores de las cinasas dependientes de ciclina.

Publicación Internacional Número WO 01/81348 de Bristol Myers Squibb describe el uso de 5-tio-, sulfinil- y sulfonil-pirazolo[3,4-b]-piridinas, como inhibidores de cinasa dependiente de ciclina.

La Publicación Internacional Número WO 00/62778 también de Bristol Myers Squibb, da a conocer una clase de inhibidores de cinasa de proteína tirosina.

La Publicación Internacional Número WO 01/72745A1 de Cyclacel, describe 4-heteroaril-pirimidinas 2-sustituidas y su preparación, composiciones farmacéuticas que las contienen, y su uso como inhibidores de las cinasas dependientes de ciclina (CDKs), y por consiguiente, su uso en el tratamiento de trastornos

27

proliferativos, tales como cáncer, leucemia, psoriasis, y similares.

La Publicación Internacional Número WO 99/21845 de Agouron, describe derivados de 4-aminotiazol para inhibir las cinasas dependientes de ciclina (CDKs), tales como CDK1, CDK2, CDK4, y
5 CDK6. La invención también se refiere al uso terapéutico o profiláctico de composiciones farmacéuticas que contienen estos compuestos, y a métodos para el tratamiento de malignidades y otros trastornos mediante la administración de cantidades efectivas de estos compuestos.

10 La Publicación Internacional Número WO 01/53274 de Agouron da a conocer inhibidores de cinasa dependiente de ciclina, una clase de compuestos que pueden comprender un anillo de benceno sustituido por amida enlazado a un grupo heterocíclico que contiene N.

15 La Publicación Internacional Número WO 01/98290 (Pharmacia & Upjohn) da a conocer una clase de derivados de 3-amino-carbonil-2-carboxamido-tiofeno como inhibidores de la cinasa de proteína.

Las Publicaciones Internacionales Números WO 01/53268 y WO 01/02369 de Agouron, dan a conocer compuestos que median o
20 inhiben la proliferación celular a través de la inhibición de las cinasas de proteína, tales como la cinasa dependiente de ciclina o la cinasa de tirosina. Los compuestos de Agouron tienen un anillo de arilo o heteroarilo unido directamente o a través de un grupo CH=CH ó CH=N a la posición 3 de un anillo de indazol.

25 Las Publicaciones Internacionales Números WO 00/39108 y WO

27

02/00651 (ambas de Du Pont Pharmaceuticals) describen compuestos heterocíclicos que son inhibidores de las enzimas de proteasa de serina tipo tripsina, en especial el factor Xa y la trombina. Se menciona que los compuestos son útiles como anti-coagulantes, o para la prevención de trastornos tromboembólicos.

Las Patentes Números US 2002/0091116 (Zhu y colaboradores), WO 01/19798 y WO 01/64642, dan a conocer cada una diversos grupos de compuestos heterocíclicos como inhibidores del factor Xa. Se dan a conocer y se ejemplifican algunas pirazol-carboxamidas 1-sustituidas.

Las Patentes Números US 6,127,382, WO 01/70668, WO 00/68191, WO 97/48672, WO 97/19052 y WO 97/19062 (todas a Allergan), describen cada una compuestos que tienen actividad de tipo retinoide para utilizarse en el tratamiento de diferentes enfermedades hiperproliferativas, incluyendo cánceres.

La Publicación Internacional Número WO 02/070510 (Bayer) describe una clase de compuestos de amino-ácido dicarboxílico para utilizarse en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Aunque se mencionan los pirazoles genéricamente, no hay ejemplos específicos de pirazoles en este documento.

La Publicación Internacional Número WO 97/03071 (Knoll AG) da a conocer una clase de derivados de heterocicli-carboxamida, para utilizarse en el tratamiento de trastornos del sistema nervioso central. Se mencionan los pirazoles en general como ejemplos de grupos heterocíclicos, pero no se dan a conocer ni se ejemplifican

compuestos de pirazol específicos.

La Publicación Internacional Número WO 97/40017 (Novo Nordisk) describe compuestos que son moduladores de fosfatasas de la proteína tirosina.

5 La Publicación Internacional Número WO 03/020217 (Univ. Connecticut) da a conocer una clase de pirazol-3-carboxamidas como moduladores del receptor canabinoide para el tratamiento de condiciones neurológicas. Se menciona (página 15) que los compuestos se pueden utilizar en la quimioterapia de cáncer, pero no
10 queda claro si los compuestos son activos como agentes contra el cáncer, o si se administran para otros propósitos.

La Publicación Internacional Número WO 01/58869 (Bristol Myers Squibb) da a conocer moduladores del receptor canabinoide que se pueden utilizar, entre otras cosas, para tratar una variedad de
15 enfermedades. El uso principal previsto es el tratamiento de enfermedades respiratorias, aunque se hace referencia al tratamiento de cáncer.

La Publicación Internacional Número WO 01/02385 (Aventis Crop Science) da a conocer derivados de 1-(quinolin-4-il)-1H-pirazol como fungicidas. Se dan a conocer pirazoles 1-insustituídos como
20 intermediarios sintéticos.

La Publicación Internacional Número WO 2004/039795 (Fujisawa) da a conocer amidas que contienen un grupo pirazol 1-sustituído, como inhibidores de la secreción de apolipoproteína B. Se
25 menciona que los compuestos son útiles en el tratamiento de

condiciones tales como hiperlipidemia.

La Publicación Internacional Número WO 2004/000318 (Cellular Genomics) da a conocer diferentes monociclos amino-sustituídos como moduladores de cinasa. Ninguno de los compuestos
5 ejemplificados son pirazoles.

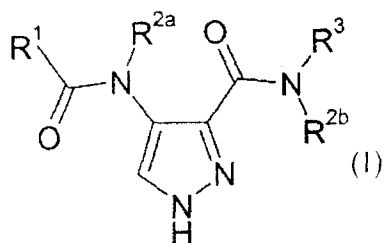
Nuestra solicitud pendiente anterior Número WO 2005/012256, la cual se publicó después de la fecha de prioridad de la presente solicitud, da a conocer compuestos de pirazol 3,4-di-sustituídos como inhibidores de las cinasas CDK y GSK-3.

10 **Breve Descripción de la Invención**

La invención proporciona compuestos que tienen una actividad inhibidora o moduladora de la cinasa dependiente de ciclina, y una actividad inhibidora o moduladora de la cinasa-3 de sintasa de glicógeno (GSK3), y que se prevé que son útiles para prevenir o
15 tratar estados de enfermedad o condiciones mediadas por las cinasas.

Por consiguiente, por ejemplo se prevé que los compuestos de la invención serán útiles para aliviar o reducir la incidencia de cáncer.

20 En un primer aspecto, la invención proporciona un compuesto de la Fórmula (I):



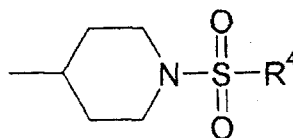
o sales, solvatos, y N-óxidos de la misma;

en donde:

R^1 es 2,6-diclorofenilo;

R^{2a} y R^{2b} son ambos hidrógeno;

5 y R^3 es un grupo:



en donde R^4 es alquilo de 1 a 4 átomos de carbono.

10 El término "alquilo" cubre tanto los grupos alquilo de cadena recta como de cadena ramificada.

El grupo alquilo de 1 a 4 átomos de carbono puede ser un grupo alquilo de 1, 2, 3, ó 4 átomos de carbono.

15 Dentro del grupo de los grupo alquilo de 1 a 4 átomos de carbono están los subgrupos de:

- grupos alquilo de 1 a 3 átomos de carbono;
- grupos alquilo de 1 a 2 átomos de carbono;
- grupos alquilo de 2 a 3 átomos de carbono; y
- grupos alquilo de 2 a 4 átomos de carbono;

20 Un subgrupo particular es alquilo de 1 a 3 átomos de carbono.

Los grupos alquilo de 1 a 4 átomos de carbono particulares son los grupos metilo, etilo, isopropilo, butilo normal, isobutilo, y terbutilo.

25 Otro subgrupo de los grupos alquilo de 1 a 4 átomos de carbono consiste de grupos metilo, etilo, isopropilo, y propilo normal.

Otro grupo preferido es un grupo metilo.

Otro grupo R^4 particular es etilo e isopropilo.

De acuerdo con lo anterior, un compuesto preferido de la invención es (1-metansulfonil-piperidin-4-il)-amida del ácido 4-(2,6-dicloro-benzoyl-amino)-1H-pirazol-3-carboxílico.

La invención también proporciona, entre otras cosas:

- un compuesto de la Fórmula (I), o cualesquiera subgrupos o ejemplos de la misma, como se definen en la presente, para utilizarse en la profilaxis o el tratamiento de un estado de enfermedad o condición mediada por una cinasa dependiente de ciclina o por una cinasa-3 de sintasa de glicógeno.

- Un método para la profilaxis o el tratamiento de un estado de enfermedad o condición mediada por una cinasa dependiente de ciclina o cinasa-3 de sintasa de glicógeno, cuyo método comprende administrar a un sujeto que lo necesite, un compuesto de la Fórmula (I), o cualesquiera subgrupos o ejemplos de la misma, como se definen en la presente.

- Un método para aliviar o reducir la incidencia de un estado de enfermedad o condición mediada por una cinasa dependiente de ciclina o cinasa-3 de sintasa de glicógeno, cuyo método comprende administrar a un sujeto que lo necesite, un compuesto de la Fórmula (I), o cualesquiera subgrupos o ejemplos de la misma, como se definen en la presente.

- Un método para el tratamiento de una enfermedad o condición que comprende o se presenta a partir de un crecimiento

celular anormal en un mamífero, cuyo método comprende administrar al mamífero un compuesto de la Fórmula (I), o cualesquiera subgrupos o ejemplos de la misma, como se definen en la presente, en una cantidad efectiva para inhibir el crecimiento celular anormal.

5 • Un método para aliviar o reducir la incidencia de una enfermedad o condición que comprende o se presenta a partir del crecimiento celular anormal en un mamífero, cuyo método comprende administrar al mamífero un compuesto de la Fórmula (I), o cualesquiera subgrupos o ejemplos de la misma, como se definen en
10 la presente, en una cantidad efectiva para inhibir el crecimiento celular anormal.

 • Un método para el tratamiento de una enfermedad o condición que comprende o se presenta a partir del crecimiento celular anormal en un mamífero, comprendiendo el método
15 administrar al mamífero un compuesto de la Fórmula (I), o cualesquiera subgrupos o ejemplos de la misma, como se definen en la presente, en una cantidad efectiva para inhibir la actividad de una cinasa cdk (tal como cdk1 ó cdk2) o de cinasa-3 de sintasa de glicógeno.

20 • Un método para aliviar o reducir la incidencia de una enfermedad o condición que comprende o se presenta a partir del crecimiento celular anormal en un mamífero, comprendiendo el método administrar al mamífero un compuesto de la Fórmula (I), o cualesquiera subgrupos o ejemplos de la misma, como se definen en
25 la presente, en una cantidad efectiva para inhibir la actividad de una

cinasa cdk (tal como cdk1 ó cdk2) o de cinasa-3 de sintasa de glicógeno.

- Un método para inhibir una cinasa dependiente de ciclina o una cinasa-3 de sintasa de glicógeno, cuyo método comprende poner en contacto la cinasa con un compuesto inhibidor de cinasa de la Fórmula (I), o cualesquiera subgrupos o ejemplos de la misma, como se definen en la presente.

- Un método para modular un proceso celular (por ejemplo, la división celular), mediante la inhibición de la actividad de una cinasa dependiente de ciclina o de una cinasa-3 de sintasa de glicógeno, utilizando un compuesto de la Fórmula (I), o cualesquiera subgrupos o ejemplos de la misma, como se definen en la presente.

- Un compuesto de la Fórmula (I), o cualesquiera subgrupos o ejemplos de la misma, como se definen en la presente, para utilizarse en la profilaxis o el tratamiento de un estado de enfermedad, como se describe en la presente.

- El uso de un compuesto de la Fórmula (I), o cualesquiera subgrupos o ejemplos de la misma, como se definen en la presente, para la fabricación de un medicamento, en donde el medicamento es para cualquiera o más de los usos definidos en la presente.

- Una composición farmacéutica, la cual comprende un compuesto de la Fórmula (I), o cualesquiera subgrupos o ejemplos de la misma, como se definen en la presente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- Una composición farmacéutica, la cual comprende un

compuesto de la Fórmula (I), o cualesquiera subgrupos o ejemplos de la misma, como se definen en la presente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en una forma adecuada para administración oral.

5 • Un compuesto de la Fórmula (I), o cualesquiera subgrupos o ejemplos de la misma, como se definen en la presente, para utilizarse en medicina.

 • Un método para el diagnóstico y el tratamiento de un estado o condición de enfermedad mediada por una cinasa
10 dependiente de ciclina, cuyo método comprende: (i) rastrear a un paciente para determinar si una enfermedad o condición de la que esté o pueda estar sufriendo el paciente, es una que sería susceptible al tratamiento con un compuesto que tenga actividad
15 contra las cinasas dependientes de ciclina; y (ii) en donde se indique que la enfermedad o condición de la que está sufriendo el paciente es así susceptible, administrar posteriormente al paciente un compuesto de la fórmula (I) o cualesquiera subgrupos o ejemplos de la misma, como se definen en la presente.

 • El uso de un compuesto de la fórmula (I) o cualesquiera
20 subgrupos o ejemplos de la misma, como se definen en la presente, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de un estado o condición de enfermedad en un paciente que se haya rastreado y se haya determinado por sufrir de, o por estar en riesgo de sufrir de, una enfermedad o condición que sería
25 susceptible al tratamiento con un compuesto que tenga actividad

contra la cinasa dependiente de ciclina.

- Un compuesto de la fórmula (I) o cualesquiera subgrupos o ejemplos de la misma, como se definen en la presente, para utilizarse en la inhibición de un crecimiento tumoral en un mamífero.

5 • Un compuesto de la fórmula (I) o cualesquiera subgrupos o ejemplos de la misma, como se definen en la presente, para utilizarse en la inhibición del crecimiento de células tumorales (por ejemplo, en un mamífero).

10 • Un método para inhibir el crecimiento tumoral en un mamífero (por ejemplo, un ser humano), cuyo método comprende administrar al mamífero (por ejemplo, un ser humano) una cantidad inhibidora del crecimiento tumoral efectiva de un compuesto de la fórmula (I), o cualesquiera subgrupos o ejemplos de la misma, como se define en la presente.

15 • Un método para inhibir el crecimiento de células tumorales (por ejemplo, las células tumorales presentes en un mamífero, tal como un ser humano), cuyo método comprende poner en contacto las células tumorales con una cantidad inhibidora del crecimiento de células tumorales efectiva de un compuesto de la
20 fórmula (I), o cualesquiera subgrupos o ejemplos de la misma, como se define en la presente.

- Un compuesto como se define en la presente, para cualesquiera de los usos y métodos estipulados anteriormente, y como se describen en cualquier otra parte de la presente.

Preferencias Generales y Definiciones

En esta solicitud, a menos que el contexto lo indique de otra manera, las referencias a un compuesto de la Fórmula (I) incluyen a todos los subgrupos de la Fórmula (I), como se definen en la presente, y el término "subgrupos" incluye todas las preferencias, modalidades, ejemplos, y compuestos particulares definidos en la presente.

Cualesquiera referencias a la Fórmula (I) en la presente, también se tomarán para referirse a cualquier subgrupo de compuestos dentro de la Fórmula (I), y a cualesquiera preferencias y ejemplos de la misma, a menos que el contexto lo requiera de otra manera.

Sales, Solvatos, Tautómeros, Isómeros, N-óxidos, Ésteres, Profármacos, e Isótopos

Una referencia a un compuesto de la Fórmula (I) y a los subgrupos de la misma, también incluye las formas iónicas, sales, solvatos, isómeros, tautómeros, N-óxidos, ésteres, profármacos, isótopos, y las formas protegidas del mismo, por ejemplo como se describe más adelante; de preferencia, las sales o tautómeros o isómeros ó N-óxidos o solvatos del mismo; y de una manera más preferible, las sales o tautómeros ó N-óxidos o solvatos del mismo.

Muchos compuestos de la Fórmula (I) pueden existir en las forma de sales, por ejemplo sales de adición de ácido, o en ciertos casos, sales de bases orgánicas e inorgánicas, tales como sales de carboxilato, sulfonato, y fosfato. Todas estas sales están dentro del

alcance de esta invención, y las referencias a los compuestos de la
Fórmula (I) incluyen a las formas de sal de los compuestos.

Las sales de la presente invención se pueden sintetizar a partir
del compuesto progenitor que contenga una fracción básica o ácida,
5 mediante métodos químicos convencionales, tales como los métodos
descritos en *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P.
Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3-90639-
026-8, Hardcover, 388 páginas, agosto de 2002. En general, estas
sales se pueden preparar mediante la reacción de las formas de
10 ácido o base libres de estos compuestos, con la base o el ácido
apropiado en agua o en un solvente orgánico, o en una mezcla de los
dos; en términos generales, se utilizan medios no acuosos, tales
como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol, o acetonitrilo.

Las sales de adición de ácido se pueden formar con una amplia
15 variedad de ácidos, tanto inorgánicos como orgánicos. Los ejemplos
de las sales de adición de ácido incluyen las sales formadas con un
ácido seleccionado a partir del grupo que consiste en ácido acético,
2,2-dicloro-acético, adípico, algínico, ascórbico (por ejemplo, L-
ascórbico), L-aspártico, bencen-sulfónico, benzoico, 4-acetamido-
20 benzoico, butanoico, (+)-canfórico, canfor-sulfónico, (+)-(1S)-canfor-
10-sulfónico, cáprico, caproico, caprílico, cinámico, cítrico,
ciclámico, dodecil-sulfúrico, etan-1,2-disulfónico, etan-sulfónico, 2-
hidroxi-etan-sulfónico, fórmico, fumárico, galactárico, gentísico,
glucoheptónico, D-glucónico, glucurónico (por ejemplo, D-
glucurónico), glutámico (por ejemplo, L-glutámico), α -oxoglutárico,
25

glicólico, hipúrico, bromhídrico, clorhídrico, yodhídrico, isetiónico, (+)L-láctico, ($\pm$)-DL-láctico, lactobiónico, maleico, málico, (-)-L-málico, malónico, ($\pm$)-DL-mandélico, metan-sulfónico, naftalen-2-sulfónico, naftalen-1,5-disulfónico, 1-hidroxi-2-naftoico, nicotínico, nítrico, oleico, orótico, oxálico, palmítico, pamoico, fosfórico, propiónico, L-pirolutámico, salicílico, 4-amino-salicílico, sebácico, esteárico, succínico, sulfúrico, tánico, (+)-L-tartárico, tiociánico, p-toluen-sulfónico, undecilénico, y valérico, así como los aminoácidos acilados y las resinas de intercambio de cationes.

Un grupo particular de sales consisten en las sales formadas a partir de los ácidos acético, clorhídrico, yodhídrico, fosfórico, nítrico, sulfúrico, cítrico, láctico, succínico, maleico, málico, isetiónico, fumárico, bencen-sulfónico, toluen-sulfónico, metan-sulfónico (mesilato), etan-sulfónico, naftalen-sulfónico, valérico, acético, propanoico, butanoico, malónico, glucurónico, y lactobiónico.

Un subgrupo de sales consiste en las sales formadas a partir de los ácidos clorhídrico, acético, metan-sulfónico, adípico, L-aspartico, y DL-láctico.

Otro subgrupo de sales consiste en las sales de acetato, mesilato, etan-sulfonato, DL-lactato, adipato, D-glucuronato, D-gluconato, y clorhidrato.

Las sales particulares para utilizarse en la preparación de las composiciones líquidas (por ejemplo, acuosas) de los compuestos de la Fórmula (I) y los subgrupos y ejemplos de los mismos, como se describen en la presente, son las sales que tengan una solubilidad

en un vehículo líquido dado (por ejemplo, agua) mayor a 10 miligramos/mililitro del vehículo líquido (por ejemplo, agua), más típicamente mayor a 15 miligramos/mililitro, y de preferencia mayor a 1 miligramos/mililitro.

5 En una modalidad de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una solución acuosa que contiene un compuesto de la Fórmula (I), y subgrupos y ejemplos del mismo, como se describen en la presente, en la forma de una sal, en una concentración mayor a 10 miligramos/mililitro del vehículo
10 líquido (por ejemplo, agua), más típicamente mayor a 0.5 miligramos/mililitro, y de preferencia mayor a 1 miligramos/mililitro.

Si el compuesto aniónico, o tiene un grupo funcional que pueda ser aniónico (por ejemplo, $-\text{COOH}$ puede ser $-\text{COO}^-$), entonces se puede formar una sal con un catión adecuado. Los ejemplos de los
15 cationes inorgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan, iones de metales alcalinos, tales como Na^+ y K^+ , cationes de metales alcalinotérreos, tales como Ca^{2+} y Mg^{2+} , y otros cationes, tales como Al^{3+} . Los ejemplos de los cationes orgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, ion de amonio (es decir, NH_4^+) y los iones de
20 amonio sustituidos (por ejemplo, NH_3R^+ , NH_2R_2^+ , NHR_3^+ , NR_4^+). Los ejemplos de algunos iones de amonio sustituidos adecuados son aquéllos derivados a partir de: etil-amina, dietil-amina, dicitclohexil-amina, trietil-amina, butil-amina, etilen-diamina, etanol-amina, dietanol-amina, piperazina, bencil-amina, fenil-bencil-amina, colina, meglumina, y trometamina, así como los aminoácidos, tales como
25

lisina y arginina. Un ejemplo de un ion de amonio cuaternario común es $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$.

Cuando los compuestos de la Fórmula (I) contienen una función de aminas, éstos pueden formar sales de amonio cuaternario, por ejemplo mediante su reacción con un agente alquilante de acuerdo con los métodos bien conocidos por la persona experta. Estos compuestos de amonio cuaternario están dentro del alcance de la Fórmula (I).

Las formas de sal de los compuestos de la invención normalmente son sales farmacéuticamente aceptables, y los ejemplos de las sales farmacéuticamente aceptables se describen en Berge y colaboradores, 1997, "Pharmaceutically Acceptable Salts", *J. Pharm. Sci.*, Volumen 66, páginas 1-19. Sin embargo, también se pueden preparar sales que no sean farmacéuticamente aceptables como formas intermediarias, las cuales luego se pueden convertir en sales farmacéuticamente aceptables. Estas formas de sal no farmacéuticamente aceptables, que pueden ser útiles, por ejemplo, en la purificación o separación de los compuestos de la invención, también forman parte de la invención.

Los compuestos de la Fórmula (I) que contengan una función de amina, también pueden formar N-óxidos. Una referencia en la presente a un compuesto de la Fórmula (I) que contenga una función de amina, también incluye al N-óxido.

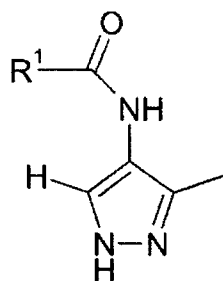
Cuando un compuesto contiene varias funciones de amina, uno o más de un átomo de nitrógeno se puede oxidar para formar un N-

óxido. Los ejemplos particulares de los N-óxidos son los N-óxidos de una amina terciaria, o un átomo de nitrógeno de un heterociclo que contenga nitrógeno.

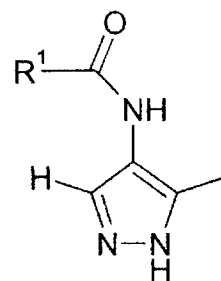
Los N-óxidos se pueden formar mediante el tratamiento de la amina correspondiente con un agente oxidante, tal como peróxido de hidrógeno o un per-ácido (por ejemplo, un ácido peroxycarboxílico), ver, por ejemplo, *Advanced Organic Chemistry*, por Jerry March, 4^a Edición, Wiley Interscience, páginas. De una manera más particular, los N-óxidos se pueden hacer mediante el procedimiento de L. W. Deady (*Syn. Comm.* 1977, 7, 509-514), en donde el compuesto de amina se hace reaccionar con ácido m-cloroperoxi-benzoico (MCPBA), por ejemplo en un solvente inerte, tal como diclorometano.

Los compuestos de la Fórmula (I) pueden existir en un número de diferentes formas geométricas, isoméricas, y tautoméricas, y las referencias a los compuestos de la Fórmula (I) incluyen a todas estas formas. Para evitar dudas, cuando un compuesto pueda existir en una de varias formas geométricas, isoméricas, o tautoméricas, y solamente se describa o se muestre una de una forma específica, no obstante todas las demás quedan abarcadas por la Fórmula (I).

Por ejemplo, en los compuestos de la Fórmula (I), el anillo de pirazol puede existir en las dos formas tautoméricas A y B que se encuentran en seguida. Para mayor simplicidad, la fórmula general (I) ilustra la forma A, pero se debe interpretar que la fórmula abarca ambas formas tautoméricas.

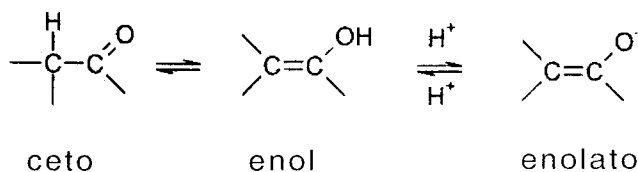


A



B

Otros ejemplos de formas tautoméricas incluyen, por ejemplo, las formas ceto, enol, y enolato, por ejemplo, como en los siguientes pares tautoméricos: ceto/enol (ilustrado más adelante), imina/enamina, amida/imino-alcohol, amidina/amidina, nitroso/oxima, tiocetona/enotiol, y nitro/aci-nitro.



En donde los compuestos de la Fórmula (I) contienen uno o más centros quirales (por ejemplo, como en el caso de los compuestos en donde R⁴ es 2-butilo), y pueden existir en la forma de dos o más isómeros ópticos, y las referencias a los compuestos de la Fórmula (I) incluyen a todas las formas isoméricas ópticas de los mismos (por ejemplo, enantiómeros, epímeros, y diaestereoisómeros), ya sea como isómeros ópticos individuales, o como mezclas (por ejemplo, mezclas racémicas), o como dos o más isómeros ópticos, a menos que el contexto lo requiera de otra manera.

Los isómeros ópticos se pueden caracterizar e identificar por

su actividad óptica (es decir, como isómeros + y -, o como isómeros *d* y *l*), o se pueden caracterizar en términos de su estereoquímica absoluta utilizando la nomenclatura "R y S" desarrollada por Cahn, Ingol, y Prelog, ver *Advanced Organic Chemistry* por Jerry March, 4^a Edición, John Wiley & Sons, Nueva York, 1992, páginas 109-114, y ver también Cahn Ingold & Prelog, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1966, 5, 385-415.

Los isómeros ópticos se pueden separar mediante un número de técnicas, incluyendo cromatografía quiral (cromatografía sobre un soporte quiral), y estas técnicas son bien conocidas por una persona experta en este campo.

Como una alternativa a la cromatografía quiral, los isómeros ópticos se pueden separar mediante la formación de sales diaestereoisoméricas con ácidos quirales tales como (+)-ácido tartárico, (-)-ácido piroglutámico, (-)-ácido di-toluil-L-tartárico, (+)-ácido mandélico, (-)-ácido málico, y (-)-ácido cantorsulfónico, mediante la separación de los diaestereoisómeros por medio de cristalización preferencial, y luego la disociación de las sales para dar el enantiómero individual de la base libre.

Cuando los compuestos de la Fórmula (I) existen como dos o más formas isoméricas ópticas, un enantiómero de un par de enantiómeros puede exhibir ventajas sobre el otro enantiómero, por ejemplo, en términos de actividad biológica. Por consiguiente, en ciertas circunstancias, puede ser deseable utilizar, como un agente terapéutico, solamente uno de un par de enantiómeros, o solamente

uno de una pluralidad de diaestereoisómeros. De conformidad con lo anterior, la invención proporciona composiciones que contienen un compuesto de la Fórmula (I) que tiene uno o más centros quirales, en donde cuando menos el 55 por ciento (por ejemplo, cuando menos el 60 por ciento, el 65 por ciento, el 70 por ciento, el 75 por ciento, el 80 por ciento, el 85 por ciento, el 90 por ciento, o el 95 por ciento) del compuesto de la Fórmula (I) está presente como un solo isómero óptico (por ejemplo, enantiómero o diaestereoisómero). En una modalidad general, el 99 por ciento o más (por ejemplo, sustancialmente todo) de la cantidad total del compuesto de la Fórmula (I), puede estar presente como un solo isómero óptico (por ejemplo, enantiómero o diaestereoisómero).

Los compuestos de la invención incluyen a los compuestos con una o más sustituciones isotópicas, y una referencia a un elemento particular incluye, dentro de su alcance, a todos los isótopos del elemento. Por ejemplo, una referencia a hidrógeno incluye, dentro de su alcance, ^1H , $^2(\text{D})$, y $^3\text{H}(\text{T})$. De una manera similar, las referencias a carbono y oxígeno incluyen, dentro de su alcance, respectivamente, ^{12}C , ^{13}C y ^{14}C , y ^{16}O y ^{18}O .

Los isótopos pueden ser radioactivos o no radioactivos. En una modalidad de la invención, los compuestos no contienen isótopos radioactivos. Estos compuestos son los preferido para uso terapéutico. Sin embargo, en otra modalidad, el compuesto puede contener uno o más radioisótopos. Los compuestos que contengan estos radioisótopos pueden ser útiles en un contexto de diagnóstico.

Los ésteres, tales como los ésteres de ácidos carboxílicos y los aciloxi-ésteres de los compuestos de la Fórmula (I) que lleven un grupo de ácido carboxílico o un grupo hidroxilo, también son abarcados por la Fórmula (I). Los ejemplos de los ésteres son los compuestos que contienen al grupo $-C(=O)OR$, en donde R es un sustituyente de éster, por ejemplo, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono, o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, de preferencia un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono. Los ejemplos particulares de los grupos éster incluyen, pero no se limitan a, $-C(=O)OCH_3$, $-C(=O)OCH_2CH_3$, $-C(=O)OC(CH_3)_3$, y $-C(=O)OPh$. Los ejemplos de los grupos aciloxilo (éster inverso) están representados por $-OC(=O)R$, en donde R es un sustituyente de aciloxilo, por ejemplo un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono, o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, de preferencia un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono. Los ejemplos particulares de los grupos aciloxilo incluyen, pero no se limitan a, $-OC(=O)CH_3$ (acetoxilo), $-OC(=O)CH_2CH_3$, $-OC(=O)C(CH_3)_3$, $-OC(=O)Ph$, y $-OC(=O)CH_2Ph$.

También están abarcadas por la Fórmula (I), cualesquiera formas polimórficas de los compuestos, solvatos (por ejemplo, hidratos), complejos (por ejemplo, complejos de inclusión o clatratos con compuestos tales como ciclodextrinas, o complejos con metales (de los compuestos, y profármacos de los compuestos). "Profármacos" significa, por ejemplo, cualquier compuesto que se

convierta *in vivo* en un compuesto biológicamente activo de la Fórmula (I).

Por ejemplo, algunos profármacos son ésteres del compuesto activo (por ejemplo, un éster metabólicamente lábil fisiológicamente aceptable). Durante el metabolismo, el grupo éster ($-C(=O)OR$) se disocia para dar el fármaco activo. Estos ésteres se pueden formar mediante esterificación, por ejemplo, de cualquiera de los grupos de ácido carboxílico ($-C(=O)OH$) en el compuesto progenitor, con, donde sea apropiado, una previa de cualesquiera otros grupos reactivos presentes en el compuesto progenitor, seguido por desprotección, si se requiere.

Los ejemplos de estos ésteres metabólicamente lábiles incluyen aquéllos de la fórmula $-C(=O)OR$, en donde R es:

alquilo de 1 a 7 átomos de carbono (por ejemplo, -Me, -Et, -nPr, -iPr, nBu, -sBu, -iBu, -tBu);

aminoalquilo de 1 a 7 átomos de carbono (por ejemplo, amino-etilo; 2-(N,N-dietil-amino)-etilo; 2-(4-morfolino)etilo; y aciloxi-alquilo de 1 a 7 átomos de carbono (por ejemplo, aciloximetilo; aciloxi-etilo; pivaloiloxi-metilo; acetoxi-metilo; 1-acetoxi-metilo; 1-(1-metoxi-1-metil)-etil-carboniloxi-etilo; 1-(benciloxi)etilo; isopropoxi-carboniloxi-metilo; 1-isopropoxi-carboniloxi-etilo; ciclohexil-carboniloxi-metilo; 1-ciclohexil-carboniloxi-etilo; ciclohexiloxi-carboniloxi-metilo; 1-ciclohexiloxi-carboniloxi-etilo; (4-tetrahidro-piraniloxi)-carboniloxi-metilo; 1-(4-tetrahidro-piraniloxi)-carboniloxi-etilo; (4-tetrahidro-piranil)-carboniloxi-metilo; y 1-(4-tetrahidropiranil)-carboniloxi-etilo).

También, algunos profármacos son activados enzimáticamente para dar el compuesto activo, o un compuesto que, después de una reacción química adicional, produce el compuesto activo (por ejemplo, como en ADEPT, GDEPT, LIDEPT, etcétera). Por ejemplo, el profármaco puede ser un derivado de azúcar u otro conjugado de glicósido, o puede ser un derivado de éster de aminoácido.

Actividad Biológica

Los compuestos de la Fórmula (I) y los subgrupos de los mismos, son inhibidores de las cinasas dependientes de ciclina. Por ejemplo, los compuestos de la invención son inhibidores de las cinasas dependientes de ciclina, y en particular de las cinasas dependientes de ciclina seleccionadas a partir de CDK1, CDK2, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6, y CDK9, y se seleccionan más particularmente a partir de CDK1, CDK2, CDK3, CDK4, CDK5 y CDK9.

Los compuestos preferidos son los compuestos que inhiben a una o más cinasas dependientes de ciclina seleccionadas a partir de CDK1, CDK2, CDK4 y CDK9, por ejemplo CDK1 y/o CDK2.

Los compuestos de la invención también tienen actividad contra la cinasa-3 de sintasa de glicógeno (GSK-3).

Como una consecuencia de su actividad en la modulación o en la inhibición de la cinasa dependiente de ciclina y de la cinasa de sintasa de glicógeno, se espera que sean útiles para proporcionar un medio de detener o recuperar el control de, el ciclo celular en las que se dividen anormalmente. Por consiguiente, se anticipa que los

compuestos probarán ser útiles en el tratamiento o en la prevención de los trastornos proliferativos, tales como los cánceres. También se prevé que los compuestos de la invención sean útiles en el tratamiento de condiciones tales como infecciones virales, diabetes mellitus tipo II ó no dependiente de insulina, enfermedades autoinmunes, trauma de la cabeza, embolia, epilepsia, enfermedades neurodegenerativas tales como Alzheimer, enfermedad de neuronas motrices, parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, y enfermedad de Pick, por ejemplo enfermedades autoinmunes y enfermedades neurodegenerativas.

Un subgrupo de estados de enfermedad y condiciones en donde se prevé que los compuestos de la invención serán útiles consiste en infecciones virales, enfermedades autoinmunes, y enfermedades neurodegenerativas.

Las cinasas dependientes de ciclina tienen un papel en la regulación del ciclo celular, apoptosis, transcripción, diferenciación, y función del sistema nervioso central. Por consiguiente, los inhibidores de cinasa dependiente de ciclina podrían ser útiles en el tratamiento de enfermedades en las que exista un trastorno de proliferación, apoptosis, o diferenciación, tal como en el cáncer. En particular, los tumores RB+ve pueden ser particularmente sensibles a los inhibidores de la cinasa dependiente de ciclina. Los tumores RB-ve también pueden ser sensibles a los inhibidores de la cinasa dependiente de ciclina.

Los ejemplos de los cánceres que se pueden inhibir incluyen,

pero no se limitan a, un carcinoma, por ejemplo un carcinoma de la vejiga, mama, colon (por ejemplo, carcinomas colo-rectales, tales como adenocarcinoma de colon y adenoma de colon), riñón, epidermis, hígado, pulmón, por ejemplo adenocarcinoma, cáncer pulmonar de células pequeñas y carcinomas pulmonares que no son de células pequeñas, esófago, vesícula, ovario, páncreas, por ejemplo carcinoma pancreático exocrino, estómago, cérvix, tiroides, próstata, o de piel, por ejemplo carcinoma de células escamosas; un tumor hematopoiético del linaje linfoide, por ejemplo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, linfoma de células-B (tal como linfoma de células-B grande y difuso), linfomas de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma que no es Hodgkin, linfoma de células pilosas, o linfoma de Burkett; un tumor hematopoiético del linaje mieloide, por ejemplo leucemias mielógenas agudas y crónicas, síndrome mielodisplástico, o leucemia promielocítica; cáncer folicular de tiroides; un tumor de origen mesenquimal, por ejemplo fibrosarcoma o habdomiosarcoma; un tumor del sistema nervioso central o periférico, por ejemplo astrocitoma, neuroblastoma, glioma, o schwannoma; melanoma; seminoma; teratocarcinoma; osteosarcoma; xeroderma pigmentosum; queratotanthoma; cáncer folicular de tiroides; o sarcoma de Kaposi.

Los cánceres pueden ser cánceres que sean sensibles a la inhibición de cualquiera o más cinasas dependientes de ciclina seleccionados a partir de CDK1, CDK2, CDK3, CDK4, CDK5, y CDK6, por ejemplo, una o más cinasas dependientes de ciclina

seleccionadas a partir de CDK1, CDK2, CDK4, y CDK5, por ejemplo CDK1 y/o CDK2.

El que un cáncer particular sea o no uno sensible a la inhibición por una cinasa dependiente de ciclina puede ser
5 determinado por medio de un ensayo de crecimiento celular, como se estipula en los ejemplos que se encuentran más adelante, o mediante un método como se estipula en la sección encabezada como "Métodos de Diagnóstico".

También se sabe que las cinasas dependientes de ciclina
10 tienen un papel en la apoptosis, proliferación, diferenciación, y transcripción, y por consiguiente, los inhibidores de cinasa dependiente de ciclina también podrían ser útiles en el tratamiento de las siguientes enfermedades diferentes del cáncer: infecciones virales, por ejemplo virus de herpes, virus de varicela, virus Epstein-
15 Barr, virus Sindbis, adenovirus, VIH, HPV, HCV, y HCMV; prevención de desarrollo de SIDA en los individuos infectados por VIH; enfermedades inflamatorias crónicas, por ejemplo lupus eritematoso sistémico, glomerulonefritis autoinmuno-mediada, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, y diabetes mellitus
20 autoinmune; enfermedades cardiovasculares, por ejemplo hipertrofia cardíaca, restenosis, aterosclerosis; trastornos neurodegenerativos, por ejemplo enfermedad de Alzheimer, demencia relacionada con SIDA, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrópica, rinitis pigmentosa, atrofia muscular espina, y degeneración cerebelar;
25 glomerulonefritis; síndromes mielodisplásticos, lesión isquémica

asociada con infartos de miocardio, embolia, y lesión por
reperusión, arritmia, aterosclerosis, enfermedades hepáticas
inducidas por toxinas o relacionadas con alcohol, enfermedades
hematológicas, por ejemplo anemia crónica y anemia aplástica;
5 enfermedades degenerativas del sistema musculoesquelético, por
ejemplo osteoporosis y artritis, rinosinusitis sensible a la aspirina,
fibrosis quística, esclerosis múltiple, enfermedades de riñón, y dolor
por cáncer.

También se ha descubierto que algunos inhibidores de cinasa
10 dependiente de ciclina se pueden utilizar en combinación con otros
agentes contra el cáncer. Por ejemplo, el inhibidor de cinasa
dependiente de ciclina flavopiridol se ha utilizado con otros agentes
contra el cáncer en una terapia de combinación.

Por consiguiente, en las composiciones farmacéuticas, usos, o
15 métodos de esta invención, para el tratamiento de una enfermedad o
condición que comprenda un crecimiento celular anormal, la
enfermedad o condición que comprenda el crecimiento celular
anormal en una modalidad es un cáncer.

Un grupo de cánceres incluye cánceres de mama humanos (por
20 ejemplo, tumores de mama primarios, cáncer de mama de nodos
negativos, adenocarcinomas invasivos del conducto de la mama,
cánceres de mama no endometrioides); y linfomas de células de
manto. En adición, otros cánceres son los cánceres colo-rectal y
endometrial.

25 Otro subconjunto de cánceres incluyen tumores

hematopoiéticos del linaje linfoide, por ejemplo leucemia, leucemia linfocítica crónica, linfoma de células de manto, y linfoma de células-B (tal como linfoma de células-B grande difuso).

Un cáncer particular es la leucemia linfocítica crónica.

5 Otro cáncer particular es el linfoma de células de manto.

Otro cáncer particular es el linfoma de células-B grande difuso.

Otro subconjunto de cánceres incluye cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer esofágico, cáncer escamoso, y carcinomas pulmonares que no son de células
10 pequeñas.

La actividad de los compuestos de la invención como inhibidores de las cinasas dependientes de ciclina y de la cinasa-3 de sintasa de glicógeno, se puede medir utilizando los ensayos estipulados en los ejemplos que se encuentran más adelante, y se
15 puede definir el nivel de actividad exhibido por un compuesto dado en términos del valor IC_{50} . Los compuestos preferidos de la presente invención son los compuestos que tienen un valor IC_{50} menor que 1 micromolar, más preferiblemente menor que 0.1 micromolar.

Ventajas de los Compuestos de la Invención

20 Los compuestos de la Fórmula (I) y los subgrupos de los mismos, como se definen en la presente, por ejemplo el compuesto (1-metansulfonil-piperidin-1-il)-amida del ácido 4-(2,6-dicloro-benzoil-amino)-1H-pirazol-3-carboxílico tienen ventaja sobre los compuestos de la técnica anterior.

25 Potencialmente, los compuestos de la invención tienen

propiedades fisicoquímicas adecuadas para su exposición oral.

Los compuestos de la invención tienen una IC_{50} más alta para la transcripción que la IC_{50} para la proliferación en las células HCT-116, por consiguiente, por ejemplo, la IC_{50} para la transcripción es
5 aproximadamente 100 veces más alta que la IC_{50} para la proliferación. Esto es conveniente, debido a que el compuesto podría ser mejor tolerado, permitiéndole de esta manera dosificarse en dosis más altas y durante más tiempo.

En particular, los compuestos de la Fórmula (I) exhiben una
10 mejor biodisponibilidad oral en relación con los compuestos de la técnica anterior. La biodisponibilidad oral se puede definir como la proporción (F) de la exposición al plasma de un compuesto cuando se dosifica por la vía oral, a la exposición al plasma del compuesto cuando se dosifica por la vía intravenosa (i.v.), expresada como un
15 porcentaje.

Los compuestos que tienen una biodisponibilidad oral (valor F) mayor al 30 por ciento, más preferiblemente mayor al 40 por ciento, son en particular convenientes, porque se pueden administrar oralmente en lugar de, o así como, mediante la administración
20 parenteral.

El compuesto de (1-metansulfonil-piperidin-4-il)-amida del ácido 4-(2,6-dicloro-benzoil-amino)-1H-pirazol-3-carboxílico tiene una biodisponibilidad del 40 al 50 por ciento cuando se administra a ratones por la vía oral.

25 Los compuestos de la invención, por ejemplo el compuesto de

(1-metansulfonil-piperidin-4-il)-amida del ácido 4-(2,6-dicloro-benzoil-amino)-1H-pirazol-3-carboxílico, tienen una mayor actividad inhibidora de cinasa (CDK2) in vitro y efectos antiproliferativos más potentes sobre las líneas celulares de cáncer. En adición, los compuestos tienen menor actividad contra GSK3 β y son más selectivos para CDK2 sobre GSK3 β . Por consiguiente, la acción de los compuestos es dominada por los efectos de ciclo celular por medio de la inhibición de la cinasa dependiente de ciclina, y no se complica por las consecuencias adicionales de la inhibición de GSK3 β , por ejemplo, sobre la sensibilidad a la insulina, o la acción del factor de crecimiento. Los compuestos tienen un perfil de inhibición del ciclo celular más limpio y menos efectos secundarios a partir de los efectos adicionales por GSK3 β . En el Ejemplo 11 que se encuentra más adelante, se estipula una comparación de las propiedades biológicas del compuesto de (1-metansulfonil-piperidin-4-il)-amida del ácido 4-(2,6-dicloro-benzoil-amino)-1H-pirazol-3-carboxílico con las propiedades de su análogo de 2,6-difluoro-benzoil-amino.

Métodos para la Preparación de los Compuestos de la Fórmula (I)

En esta sección, como en todas las demás secciones de esta solicitud, a menos que el contexto lo indique de otra manera, las referencias a la Fórmula (I) también incluyen a todos los subgrupos y ejemplos de los mismos, como se definen en la presente. Cuando se hace referencia a un grupo R¹, R³, R⁴, R⁷, o cualquier otro grupo "R", la definición del grupo en cuestión es como se estipula

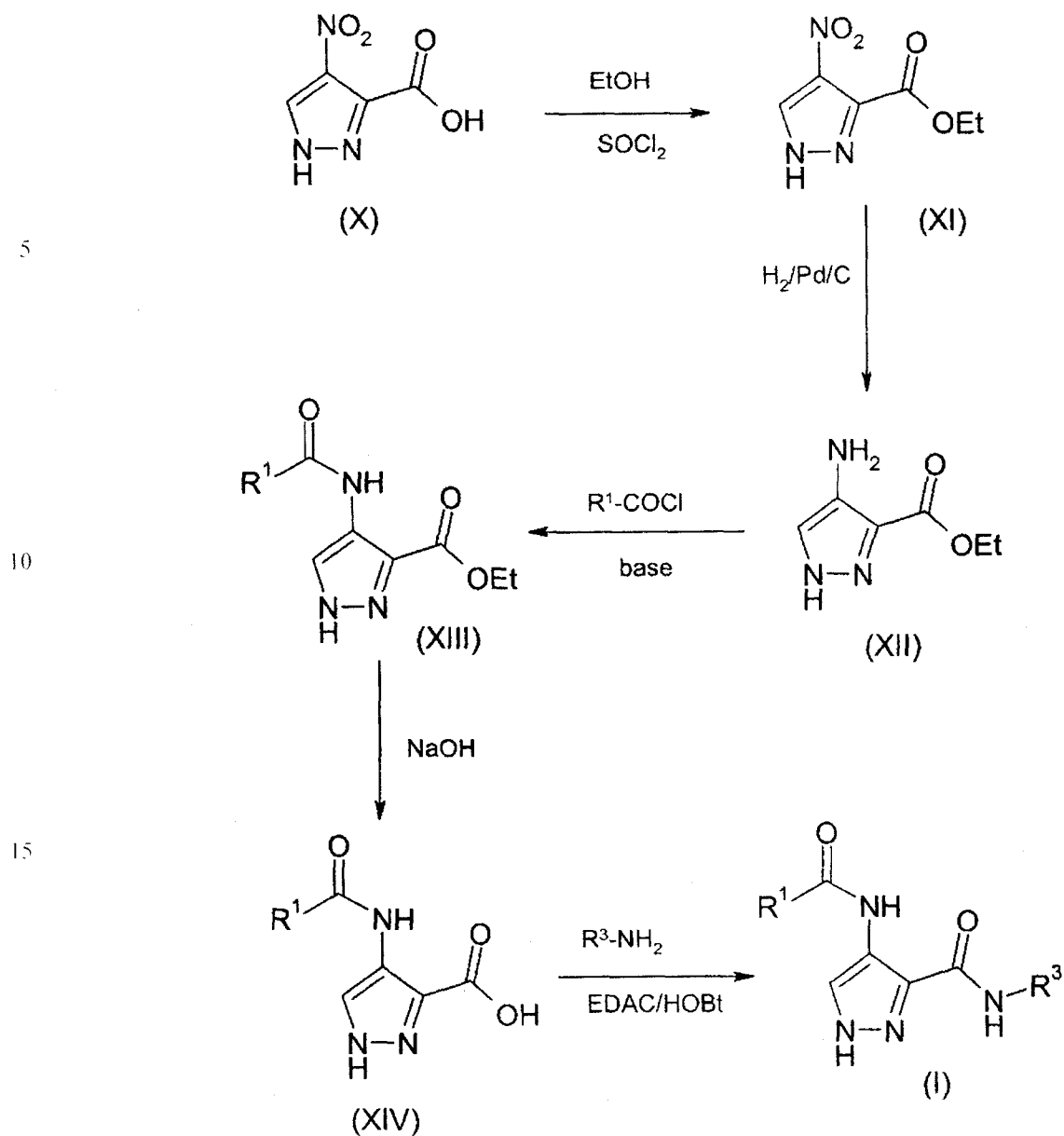
anteriormente, y como se estipula en las siguientes secciones de esta solicitud, a menos que el contexto lo requiera de otra manera.

Los compuestos de la Fórmula (I) se pueden preparar de acuerdo con los métodos sintéticos bien conocidos por la persona experta, y mediante los métodos estipulados más adelante, y como se describe en nuestra Solicitud No. PCT/GB2004/003179 (Solicitud Internacional Número WO 2005/012256), cuyo contenido se incorpora a la presente como referencia.

Por ejemplo, los compuestos de la Fórmula (I) se pueden preparar mediante la secuencia de reacciones mostrada en el Esquema 1.

El material de partida para la ruta sintética mostrada en el Esquema 1, es el ácido 4-nitro-pirazol-3-carboxílico (X), el cual se puede obtener comercialmente, o bien se puede preparar mediante la nitración del compuesto de pirazol-carboxilo 4-insustituido correspondiente.

57



Esquema 1

El ácido nitro-pirazol-carboxílico (X) se convierte hasta el éster correspondiente (XI), por ejemplo el metil- ó etil-éster (de los cuales se muestra el etil-éster), mediante su reacción con el alcohol apropiado, tal como etanol, en la presencia de un catalizador ácido o

25

57

cloruro de tionilo. La reacción se puede llevar a cabo a temperatura ambiente, utilizando el alcohol esterificante como el solvente.

El nitro-éster (XI) se puede reducir hasta la amina correspondiente (XII) mediante métodos convencionales para convertir un grupo nitro hasta un grupo amino. Por consiguiente, por ejemplo, el grupo nitro se puede reducir hasta la amina mediante hidrogenación sobre un catalizador de paladio sobre carbón. La reacción de hidrogenación se puede llevar a cabo en un solvente, tal como etanol, a temperatura ambiente.

La amina resultante (XII) se puede convertir hasta la amida (XIII) mediante su reacción con un cloruro de ácido de la Fórmula $R^1\text{COCl}$, en la presencia de una base que no interfiera, tal como trietil-amina. La reacción se puede llevar a cabo alrededor de la temperatura ambiente en un solvente polar, tal como dioxano. El cloruro de ácido se puede preparar mediante el tratamiento del ácido carboxílico $R^1\text{CO}_2\text{H}$ con cloruro de tionilo, o mediante la reacción con cloruro de oxalilo en la presencia de una cantidad catalítica de dimetil-formamida, o mediante la reacción de una sal potásica del ácido con cloruro de oxalilo.

Como una alternativa a la utilización del método de cloruro de ácido descrito anteriormente, la amina (XII) se puede convertir hasta la amida (XIII) mediante su reacción con el ácido carboxílico $R^1\text{CO}_2\text{H}$ en la presencia de reactivos de acoplamiento de amida del tipo comúnmente utilizado en la formación de enlaces peptídicos. Los ejemplos de estos reactivos incluyen 1,3-diciclo-hexil-carbodi-imida

(DCC) (Sheehan y colaboradores, *J. Amer. Chem. Soc.* 1955, 77, 1067), 1-etil-3-(3'-dimetil-amino-propil)-carbodi-imida (referida en la presente como EDC ó EDAC, pero también conocida en la técnica como EDCI y WSCDI) (Sheehan y colaboradores, *J. Org. Chem.*, 1961, 26, 2525), agentes de acoplamiento basados en uronio, tales como hexafluoro-fosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (HATU), y agentes de acoplamiento basados en fosfonio, tales como hexafluorofosfato de 1-benzotriazoliloxi-tris-(pirrolidino)-fosfonio (PyBOP) (Castro y colaboradores, *Tetrahedron Letters*, 1990, 31, 205). Los agentes de acoplamiento basados en carbodi-imida se utilizan convenientemente en combinación con 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt) (L. A. Carpino, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1993, 115, 4397) ó 1-hidroxi-benzotriazol (HOBt) (Konig y colaboradores, *Chem. Ber.*, 103, 708, 2024-2034). Los reactivos de acoplamiento preferidos incluyen EDC (EDAC) y DCC, en combinación con HOAt ó HOBt.

La reacción de acoplamiento normalmente se lleva a cabo en un solvente no prótico y no acuoso, tal como acetonitrilo, dioxano, sulfóxido de dimetilo, dicloro-metano, dimetil-formamida, o N-metil-pirrolidina, o en un solvente acuoso, opcionalmente junto con uno o más co-solventes miscibles. La reacción se puede llevar a cabo a temperatura ambiente, o, cuando los reactivos sean menos reactivos (por ejemplo, en el caso de las anilinas pobres en electrones que lleven grupos de retiro de electrones, tales como los grupos sulfonamida), a una temperatura apropiadamente elevada. La

reacción se puede llevar a cabo en la presencia de una base que no interfiera, por ejemplo, una amina terciaria, tal como trietil-amina ó N,N-di-isopropil-etil-amina.

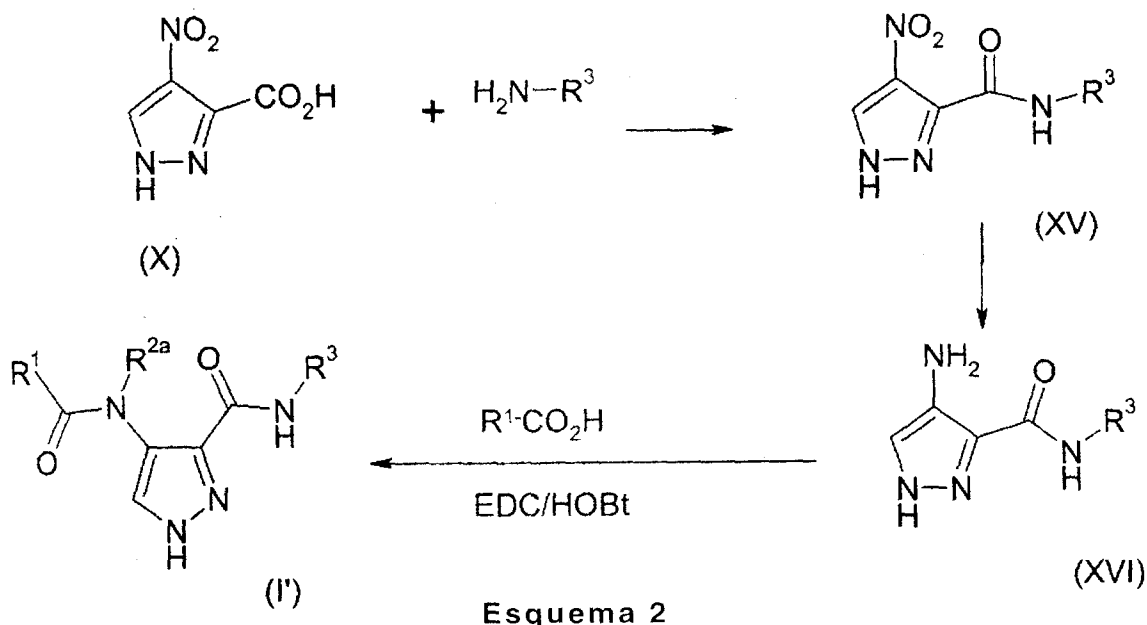
5 La amida (XIII) subsecuentemente se hidroliza hasta el ácido carboxílico (XIV) mediante su tratamiento con un hidróxido de metal alcalino acuoso, tal como hidróxido de sodio. La reacción de saponificación se puede llevar a cabo utilizando un co-solvente orgánico, tal como un alcohol (por ejemplo, metanol), y la mezcla de reacción típicamente se calienta a una temperatura no extrema, por
10 ejemplo hasta aproximadamente 50-60°C.

Entonces el ácido carboxílico (XIV) se puede convertir hasta un compuesto de la Fórmula (I) mediante su reacción con una amina R³-NH₂, utilizando las condiciones de formación de amida descritas anteriormente. Por lo tanto, por ejemplo, la reacción de acoplamiento
15 de amida se puede llevar a cabo en la presencia de EDC y HOBt en un solvente polar, tal como N,N-dimetil-formamida.

Una ruta general alternativa para los compuestos de la Fórmula (I), en donde R^{2b} es hidrógeno, se muestra en el Esquema 2.

20

25

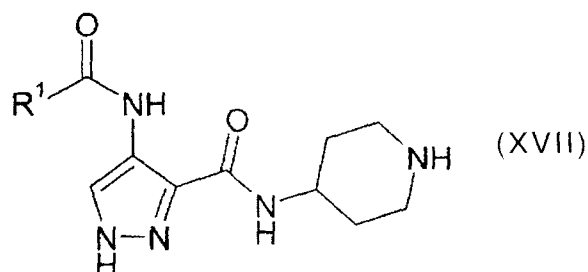


En el Esquema 2, el ácido nitro-pirazol-carboxílico (X), o un derivado activado del mismo, tal como un cloruro de ácido, se hace reaccionar con la amina R³-NH₂, utilizando las condiciones de formación de amida descritas anteriormente, para dar la nitro-pirazol-amida (XV), la cual luego se reduce hasta el compuesto de amino correspondiente (XVI), empleando un método convencional para reducir grupos nitro, por ejemplo el método que involucra hidrogenación sobre un catalizador de Pd/C, como se describe en lo anterior.

Entonces la amina (XVI) se acopla con un ácido carboxílico de la fórmula R¹-CO₂H, o un derivado activado del mismo, tal como un cloruro de ácido o anhídrido, bajo las condiciones de formación de amida descritas anteriormente en relación con el Esquema 1. Por consiguiente, por ejemplo, como una alternativa a la utilización de un cloruro de ácido, la reacción de acoplamiento se puede llevar a cabo

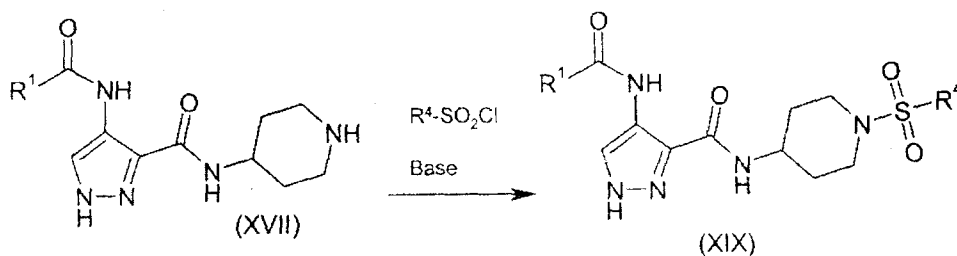
en la presencia de EDAC (EDC) y HOBt, en un solvente tal como dimetil-formamida, para dar un compuesto de la Fórmula (I'), la cual corresponde a un compuesto de la fórmula (I), en donde R^{2b} es hidrógeno.

Los compuestos de la Fórmula (I) también se pueden preparar a partir de un compuesto de la Fórmula (XVII):



mediante su reacción con un agente de sulfonilación apropiado, por ejemplo, un cloruro de sulfonilo, tal como un cloruro de metan-sulfonilo.

Se especifica una secuencia de reacción ilustrativa muestra la conversión de un compuesto de la Fórmula (XVII) en derivados de sulfonilo de la Fórmula (I) en el Esquema 3.



Esquema 3

Como se muestra en el Esquema 3, un compuesto de la Fórmula (I), en donde R^3 es un anillo de piperidina que lleva un

grupo sulfonilo $-\text{SO}_2\text{R}^4$ (es decir, un compuesto de la Fórmula (XIX)), se puede preparar mediante la reacción del compuesto de la Fórmula (XVII) con un cloruro de sulfonilo $\text{R}^4\text{SO}_2\text{Cl}$ (tal como cloruro de metan-sulfonilo), en la presencia de una base que no interfiera, tal como di-isopropil-etil-amina. La reacción normalmente se lleva a cabo a temperatura ambiente en un solvente no prótico y no acuoso, tal como dioxano y diclorometano.

Los cloruros de sulfonilo de la fórmula $\text{R}^4\text{SO}_2\text{Cl}$ se pueden obtener en las fuentes comerciales, o se pueden preparar mediante un número de procedimientos. Por ejemplo, los cloruros de alquil-sulfonilo se pueden preparar mediante la reacción de un haluro de alquilo con sulfito de sodio y con calentamiento en un solvente orgánico acuoso, tal como agua/dioxano, para formar el ácido sulfónico correspondiente, seguido por su tratamiento con cloruro de tionilo en la presencia de dimetil-formamida, para dar el cloruro de sulfonilo.

En una preparación alternativa, se puede hacer reaccionar un tiol $\text{R}^4\text{SH}/\text{R}^{4a}\text{SH}$ con nitrato de potasio y cloruro de sulfurilo, para dar el cloruro de sulfonilo requerido.

En muchas de las reacciones descritas anteriormente, puede ser necesario proteger a uno o más grupos para impedir que tenga lugar una reacción en una localización indeseable sobre la molécula. Los ejemplos de los grupos protectores, y los métodos para proteger y desproteger los grupos funcionales, se pueden encontrar en *Protective Groups in Organic Synthesis* (T. Green y P. Wuts; 3ª

Edición; John Wiley and Sons, 1999).

Por ejemplo, un grupo amina se puede proteger como una amida (-NRCO-R) o un uretano (-NRCO-OR), por ejemplo como: una metil-amida (-NHCO-CH₃); una benciloxi-amida (-NHCO-OCH₂C₆H₅, -NH-Cbz); o como una terbutoxi-amida (-NHCO-OC(CH₃)₃, -NH-Boc); una 2-bifenil-2-propoxi-amida (-NHCO-OC(CH₃)₂C₆H₅, -NH-Bpoc), como una 9-fluorenil-metoxi-amida (-NH-Fmoc), como una 6-nitro-veratriloxi-amida (-NH-Nvoc), como una 2-trimetil-silil-etiloxi-amida (-NH-Teoc), como una 2,2,2-tricloro-etiloxi-amida (-NH-Troc), como una aliloxi-amida (-NH-Alloc), o como una 2-(fenil-sulfonil)-etiloxi-amida (-NH-Psec). Otros grupos protectores para las aminas, tales como las aminas cíclicas y los grupos N-H heterocíclicos, incluyen los grupos toluen-sulfonilo (tosilo) y metan-sulfonilo (mesilo), y los grupos bencilo, tales como el grupo *para*-metoxi-bencilo (PMB). Un grupo de ácido carboxílico se puede proteger como un éster, por ejemplo, como: un éster de alquilo de 1 a 7 átomos de carbono (por ejemplo, un éster de metilo; un éster de terbutilo); un éster e haloalquilo de 1 a 7 átomos de carbono (por ejemplo, un éster de trihaloalquilo de 1 a 7 átomos de carbono); un éster de tri-alquilo de 1 a 7 átomos de carbono-silil-alquilo de 1 a 7 átomos de carbono; o un éster de arilo de 5 a 20 átomos de carbono-alquilo de 1 a 7 átomos de carbono-éster (por ejemplo, un éster de bencilo; un éster de nitrobencilo); o como una amida, por ejemplo como una metil-amida. Un grupo tiol se puede proteger, por ejemplo, como un tioéter (-SR), por ejemplo, como: un tioéter de bencilo; un éter de

acetamido-metilo (-S-CH₂NHC(=O)CH₃).

Los intermediarios químicos novedosos (por ejemplo, compuestos novedosos de las Fórmulas (XIII), (XIV), (XV), (XVI), y (XVII)), utilizados en los procesos estipulados anteriormente y en los ejemplos, representan un aspecto adicional de la invención.

Método de Purificación

Los compuestos se pueden aislar y purificar mediante un número de métodos bien conocidos por los expertos en la materia, y los ejemplos de estos métodos incluyen técnicas cromatográficas, tales como cromatografía en columna (por ejemplo, cromatografía por evaporación instantánea), y HPLC. La LC-MS de preparación es un método estándar y efectivo utilizado para la purificación de moléculas orgánicas pequeñas, tales como los compuestos descritos en la presente. Los métodos para la cromatografía de líquidos (LC) y la espectrometría de masas (MS) se pueden variar para proporcionar una mejor separación de los materiales crudos y una mejor detección de las muestras mediante la espectrometría de masas. La optimización del método de cromatografía de líquidos en gradiente de preparación involucrará diferentes columnas, eluyentes volátiles, y modificadores, y gradientes. Se conocen bien los métodos en la técnica para optimizar los métodos de LC-MS de preparación, y luego utilizarlos para purificar compuestos. Estos métodos se describen en Rosentreter U, Huber U.; Optimal fraction collecting in preparative LC/MS; *J. Comb. Chem.* 2004; 6(2), 159-64 y Leister W. Strauss K, Wisnoski D, Zhao Z, Lindsley C., Development of a

custom high-throughput preparative liquid chromatography/mass spectrometer platform for the preparative purification and analytical analysis of compound libraries; *J. Comb. Chem.*; 2003; 5(3); 322-9.

Uno de estos sistemas para purificar compuestos por medio de LC-MS de preparación se describe en la sección experimental que se encuentra más adelante, aunque una persona experta en la materia apreciará que se podrían utilizar sistemas y métodos alternativos para los descritos. En particular, se podrían utilizar los métodos basados en LC de preparación en fase normal en lugar de los métodos en fase inversa descritos en la presente. La mayoría de los sistemas LC-MS de preparación utilizan LC de fase inversa y modificadores ácidos volátiles, debido a que el planteamiento es muy efectivo para la purificación de moléculas pequeñas, y debido a que los eluyentes son compatibles con la espectrometría de masas por electropulverización de iones positivos. El empleo de otras soluciones cromatográficas, por ejemplo LC en fase normal, alternativamente fase móvil regulada, modificadores básicos, etcétera, como se ilustran en los métodos analíticos descritos anteriormente, se podrían utilizar de una manera alternativa para purificar los compuestos.

Formulaciones Farmacéuticas

Aunque es posible que el compuesto activo se administre solo, es preferible presentarlo como una composición farmacéutica (por ejemplo, formulación), que comprenda cuando menos un compuesto activo de la invención, junto con uno o más vehículos, adyuvantes,

excipientes, diluyentes, rellenos, reguladores del pH, estabilizantes, conservadores, lubricantes, u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos por los expertos en este campo, y opcionalmente otros agentes terapéuticos o profilácticos; por ejemplo, agentes que reduzcan o alivien algunos de los efectos secundarios asociados con la quimioterapia. Los ejemplos particulares de estos agentes incluyen agentes anti-eméticos y agentes que prevengan o reduzcan la duración de la neutropenia asociada con quimioterapia, y que prevengan las complicaciones que se presenten por los niveles reducidos de glóbulos rojos o glóbulos blancos sanguíneos, por ejemplo eritropoietina (EPO), factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), y factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF).

Por consiguiente, la presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas, como se definen anteriormente, y métodos para hacer una composición farmacéutica, los cuales comprenden mezclar cuando menos un compuesto activo, como se define en lo anterior, junto con uno o más vehículos, excipientes, reguladores del pH, adyuvantes, estabilizantes, y otros materiales farmacéuticamente aceptables, como se describen en la presente.

El término "farmacéuticamente aceptable", como se utiliza en la presente, pertenece a los compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosificación que, dentro del alcance de un juicio médico importante, sean adecuados para utilizarse en contacto con los tejidos de un sujeto (por ejemplo, un ser humano) sin una

68

excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, de una manera conmensurada con una proporción razonable de beneficio/riesgo. Cada vehículo, excipiente, etcétera, también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los
5 otros ingredientes de la formulación.

De conformidad con lo anterior, en un aspecto adicional, la invención proporciona compuestos de la Fórmula (I), y subgrupos de los mismos, como se definen en la presente, en la forma de composiciones farmacéuticas.

10 Las composiciones farmacéuticas pueden estar en cualquier forma adecuada para administración oral, parenteral, tópica, intranasal, oftálmica, ótica, rectal, intra-vaginal, o transdérmica. Cuando se pretenden las composiciones para administración parenteral, se pueden formular para administración intravenosa,
15 intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, o para su suministro directo hacia un órgano o tejido objetivo mediante inyección, infusión, u otro medio de suministro. El suministro puede ser mediante inyección de bolo, infusión de corto plazo, o infusión de plazo más largo, y puede ser por medio de suministro pasivo o a
20 través de la utilización de una bomba de infusión adecuada.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración parenteral incluyen soluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas, las cuales pueden contener antioxidantes, reguladores del pH, bacteriostáticos, co-solventes,
25 mezclas de solventes orgánicos, agentes de formación de complejos

68

de ciclodextrina, agentes emulsionantes (para formar y estabilizar las formulaciones en emulsión), componentes de liposomas para formar liposomas, polímeros gelificables para formar geles poliméricos, protectores de liofilización, y combinaciones de agentes para, entre
5 otras cosas, estabilizar al ingrediente activo en una forma soluble, y hacer que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor pretendido. Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral también pueden tomar la forma de suspensiones estériles acuosas y no acuosas, las cuales pueden incluir agentes de
10 suspensión y agentes espesantes (R. G. Strickly, Solubilizing Excipients in oral and injectable formulations, Pharmaceutical Research, Vol. 21(2) 2004, páginas 201-230).

Una molécula de fármaco que sea ionizable, se puede solubilizar hasta la concentración deseada mediante ajuste del pH, si
15 la pK_a del fármaco está suficientemente lejos del valor de pH de la formulación. El intervalo aceptable es un pH de 2 a 12 para administración intravenosa e intramuscular, pero, subcutáneamente, el intervalo es un pH de 2.7 a 9.0. El pH de la solución se controla ya sea mediante la forma de sal del fármaco, ácidos/bases fuertes, tales
20 como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio, o mediante soluciones de reguladores que incluyen, pero no se limitan a, soluciones reguladores formadas de glicina, citrato, acetato, maleato, succinato, histidina, fosfato, tris-(hidroxi-metil)-amino-metano (TRIS), o carbonato.

25 La combinación de una solución acuosa y un solvente orgánico

10

soluble en agua/tensoactivo (es decir, un co-solvente), con frecuencia se utiliza en formulaciones inyectables. Los solventes orgánicos solubles en agua y los tensoactivos utilizados en las formulaciones inyectables incluyen, pero no se limitan a, propilenglicol, etanol, polietilenglicol 300, polietilenglicol 400, glicerina, dimetil-acetamida (DMA), N-metil-2-pirrolidona (NMP; Pharmasolve), sulfóxido de dimetilo (DMSO), Solutol HS 15, Cremophor EL, Cremophor RH 60, y polisorbato 80. Estas formulaciones normalmente, pero no siempre, se pueden diluir antes de su inyección.

El propilenglicol, PEG 300, etanol, Cremophor EL, Cremophor RH 60, y el polisorbato 80, son los solventes miscibles en agua y tensoactivos enteramente orgánicos utilizados en las formulaciones inyectables comercialmente disponibles, y se pueden utilizar en combinaciones de unos con otros. Las formulaciones orgánicas resultantes normalmente se diluyen cuando menos dos veces antes del bolo IV o de la infusión IV.

De una manera alternativa, se puede alcanzar una mayor solubilidad en agua a través de formación de complejos moleculares con ciclodextrinas.

Los liposomas son vesículas esféricas cerradas compuestas de membranas de bicapa de lípido externas y un núcleo acuoso interno, y con un diámetro total de <100 micras. Dependiendo del nivel de hidrofobicidad, los fármacos moderadamente hidrofóbicos se pueden solubilizar mediante los liposomas si el fármaco llega a encapsularse

70

o a intercalarse adentro del liposoma. Los fármacos hidrofóbicos también se pueden solubilizar mediante los liposomas si la molécula de fármaco llega a ser una parte integral de la membrana de bicapa de lípido, y en este caso, el fármaco hidrofóbico se disuelve en la porción de lípido de la bicapa de lípido. Una formulación de liposoma típica contiene agua con fosfolípido a -5-20 miligramos/mililitro, un isotonicificador, un regulador de pH de 5-8, y opcionalmente colesterol.

Las formulaciones se pueden presentar en recipientes de dosis unitaria o de múltiples dosis, por ejemplo en ampollitas y frascos sellados, y se puede almacenar en una condición secada por congelación (liofilizada), requiriendo solamente de la adición de un vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de utilizarse.

La formulación farmacéutica se puede preparar mediante la liofilización de un compuesto de la Fórmula (I) o una sal de adición de ácido del mismo. La liofilización se refiere al procedimiento de secado por congelación de una composición. Por consiguiente, el secado por congelación y la liofilización se utilizan en la presente como sinónimos. Un proceso típico es solubilizar el compuesto, y la formulación resultante se aclara, se filtra estéril, y se transfiere asépticamente a los recipientes apropiados para la liofilización (por ejemplo, frascos). En el caso de los frascos, se tapan parcialmente con lio-taponés. La formulación se puede enfriar hasta la congelación, y se puede someter a liofilización bajo condiciones

72

convencionales, y luego se tapa herméticamente, formando una formulación liofila seca estable. La composición típicamente tendrá un contenido de agua residual bajo, por ejemplo menor del 5 por ciento, por ejemplo menor del 1 por ciento en peso, basándose en el peso del liofilo.

La formulación de liofilización puede contener otros excipientes, por ejemplo, agentes espesantes, agentes dispersantes, reguladores del pH, antioxidantes, conservadores, y ajustadores de tonicidad. Los reguladores del pH típicos incluyen fosfato, acetato, citrato, y glicina. Los ejemplos de los antioxidantes incluyen ácido ascórbico, bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio, monotioglicerol, tiourea, hidroxitolueno butilado, hidroxianisol butilado, y sales de ácido etilendiaminatetra-acético. Los conservadores pueden incluir ácido benzoico y sus sales, ácido sórbico y sus sales, alquil-ésteres de ácido *para*-hidroxibenzoico, fenol, cloro-butanil, alcohol bencílico, timerosal, cloruro de benzalconio, y cloruro de cetil-piridinio. Los reguladores mencionados anteriormente, así como dextrosa y cloruro de sodio, se pueden utilizar para el ajuste de la tonicidad, si es necesario.

En general se utilizan agentes de volumen en la tecnología de liofilización para facilitar el proceso y/o para proporcionar volumen y/o para la integridad mecánica de la torta liofilizada. Un agente de volumen significa un diluyente en partículas sólidas libremente soluble en agua que, cuando se co-liofiliza con el compuesto o la sal del mismo, proporciona una torta liofilizada físicamente estable, un

72

73

proceso de secado por congelación más óptimo, y una reconstitución rápida y completa. El agente de volumen también se puede utilizar para hacer que la solución sea isotónica.

El agente de volumen soluble en agua puede ser cualquiera de los materiales sólidos inertes farmacéuticamente aceptables típicamente utilizados para la liofilización. Estos agentes de volumen incluyen, por ejemplo, azúcares, tales como glucosa, maltosa, sacarosa, y lactosa; polialcoholes, tales como sorbitol o manitol; aminoácidos, tales como glicina; polímeros, tales como polivinil-
10 pirrolidina; y polisacáridos, tales como dextrano.

La proporción del peso del agente de volumen al peso el compuesto activo normalmente está dentro del intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, por ejemplo de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, por ejemplo en el
15 intervalo de aproximadamente 1 a 2.

De una manera alternativa, se pueden proporcionar en una forma de solución, la cual puede ser concentrada y sellada en un frasco adecuado. La esterilización de las formas de dosificación puede ser por medio de filtración, o pasando por autoclave los
20 frascos y su contenido en etapas apropiadas del proceso de formulación. La formulación suministrada puede requerir de una dilución o preparación adicional antes del suministro, por ejemplo, una dilución en los paquetes de infusión estériles adecuados.

Las soluciones y suspensiones para inyección extemporáneas se pueden preparar a partir de polvos, gránulos, y tabletas estériles.
25

73

En una modalidad preferida de la invención, la composición farmacéutica está en una forma adecuada para administración intravenosa, por ejemplo mediante inyección o infusión.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención para inyección parenteral también pueden comprender soluciones, dispersiones, suspensiones, o emulsiones acuosas o no acuosas, estériles, farmacéuticamente aceptables, así como polvos estériles para reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de usarse. Los ejemplos de los vehículos, diluyentes, solventes, o portadores acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), carboxi-metil-celulosa y mezclas adecuadas de la misma, aceites vegetales (tales como aceite de olivo), y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Se puede mantener una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante la utilización de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de las dispersiones, y mediante la utilización de tensoactivos.

Las composiciones de la presente invención también pueden contener adyuvantes, tales como conservadores, agentes humectantes, agentes emulsionantes, y agentes de dispersión. Se puede asegurar la prevención de la acción de los microorganismo mediante la inclusión de diferentes agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. También puede ser deseable incluir agentes

isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede provocar mediante la inclusión de agentes que demoren la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

5 Si un compuesto no es estable en un medio acuoso, o tiene una baja solubilidad en un medio acuoso, se puede formular como un concentrado en solventes orgánicos. Entonces el concentrado se puede diluir hasta una concentración más baja en un sistema acuoso, y puede ser suficientemente estable durante el corto período
10 de tiempo durante la dosificación. Por consiguiente, en otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una solución no acuosa compuesta enteramente de uno o más solventes orgánicos, los cuales se pueden dosificar como estén, o más comúnmente se pueden diluir con un excipiente adecuado IV (suero,
15 dextrosa; regulado o no regulado) antes de su administración (Solubilizing excipients in oral and injectable formulations, Pharmaceutical Research, 21(2), 2004, páginas 201-230). Los ejemplos de los solventes y tensoactivos son propilenglicol, PEG300, PEG400, etanol, dimetil-acetamida (DMA), N-metil-2-pirrolidona
20 (NMP, Pharmasolve), glicerina, Cremophor EL, Cremophor RH60, y polisorbato. las soluciones no acuosas particulares se componen del 70 al 80 por ciento de propilenglicol, y del 20 al 30 por ciento de etanol. Una solución no acuosa particular se compone del 70 por ciento de propilenglicol, y el 30 por ciento de etanol. Otra es del 80
25 por ciento de propilenglicol, y el 20 por ciento de etanol.

Normalmente, estos solventes se utilizan en combinación, y usualmente se diluyen cuando menos dos veces antes del bolo IV ó de la infusión IV. Las cantidades típicas para las formulaciones del bolo IV son aproximadamente el 50 por ciento para glicerina, propilenglicol, PEG300, PEG400, y aproximadamente el 20 por ciento para etanol. Las cantidades típicas para las formulaciones de infusión IV son aproximadamente el 15 por ciento para glicerina, el 3 por ciento para dimetil-acetamida, y aproximadamente el 10 por ciento para propilenglicol, PEG300, PEG400, y etanol.

En una modalidad preferida de la invención, la composición farmacéutica está en una forma adecuada para administración intravenosa, por ejemplo mediante inyección o infusión. Para la administración intravenosa, la solución se puede dosificar como esté, o se puede inyectar en una bolsa para infusión (que contenga un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como suero al 0.9 por ciento o dextrosa al 5 por ciento), antes de su administración.

En otra modalidad preferida, la composición farmacéutica está en una forma adecuada para su administración subcutánea (s.c.).

Las formas de dosificación farmacéutica adecuadas para administración oral incluyen tabletas, cápsulas, caplets, píldoras, grageas, jarabes, soluciones, polvos, gránulos, elíxires y suspensiones, tabletas sublinguales, obleas o parches, y parches bucales.

Las composiciones farmacéuticas que contengan a los compuestos de la Fórmula (I) se pueden formular de acuerdo con las

técnicas conocidas, ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA, EUA.

Por consiguiente, las composiciones de tabletas pueden contener una dosificación unitaria del compuesto activo, junto con un
5 diluyente o vehículo inerte, tal como un azúcar o un alcohol de azúcar, por ejemplo lactosa, sacarosa, sorbitol, o manitol; y/o un diluyente no derivado de azúcar, tal como carbonato de sodio, fosfato de calcio, carbonato de calcio, o una celulosa o derivado de la misma, tal como metil-celulosa, etil-celulosa, hidroxipropil-metil-
10 celulosa, y almidones, tales como almidón de maíz. Las tabletas también pueden contener ingredientes convencionales, tales como agentes aglutinantes y de granulación, tales como polivinilpirrolidona, desintegrantes (por ejemplo, polímeros reticulados hinchables, tales como carboximetil-celulosa reticulada), agentes
15 lubricantes (por ejemplo, estearatos), conservadores (por ejemplo, parabenos), antioxidantes (por ejemplo, BHT), agentes reguladores del pH (por ejemplo, reguladores de fosfato o citrato), y agentes efervescentes, tales como mezclas de citrato/bicarbonato. Estos excipientes son bien conocidos y no necesitan discutirse con detalle
20 en la presente.

Las formulaciones de cápsulas pueden ser de la variedad de gelatina dura o de gelatina blanda, y pueden contener al componente activo en una forma sólida, semi-sólida, o líquida. Las cápsulas de gelatina se pueden formar de gelatina animal, o de sus equivalentes
25 sintéticos o derivados de plantas.

Las formas de dosificación sólida (por ejemplo, tabletas, cápsulas, etcétera) pueden estar recubiertas o no recubiertas, pero típicamente tienen un recubrimiento, por ejemplo un recubrimiento de película protectora (por ejemplo, una cera o barniz), o un recubrimiento de control de liberación. El recubrimiento (por ejemplo, un polímero de tipo Eudragit^{MR}) se puede diseñar para liberar el componente activo en una localización deseada dentro del tracto gastrointestinal. Por consiguiente, el recubrimiento se puede seleccionar de tal manera que se degrade bajo ciertas condiciones de pH adentro del tracto gastrointestinal, liberando de esta manera selectivamente el compuesto en el estómago o en el íleo o en el duodeno.

En lugar de, o en adición a, un recubrimiento, el fármaco se puede presentar en una matriz sólida que comprenda un agente de control de liberación, por ejemplo un agente de demora de liberación que se pueda adaptar para liberar selectivamente el compuesto bajo condiciones de actividad o alcalinidad variables en el tracto gastrointestinal. De una manera alternativa, el material de matriz o el recubrimiento retardador de liberación, puede tomar la forma de un polímero erosionable (por ejemplo, un polímero de anhídrido maleico), el cual se erosione de una manera sustancialmente continua a medida que pase la forma de dosificación a través del tracto gastrointestinal. Como una alternativa adicional, el compuesto activo se puede formular en un sistema de suministro que proporcione un control osmótico de la liberación del compuesto. Las

formulaciones de liberación osmótica y otras formulaciones de liberación demorada o de liberación sostenida se pueden preparar de acuerdo con los métodos bien conocidos por los expertos en la materia.

5 Las composiciones farmacéuticas comprenden de aproximadamente el 1 por ciento a aproximadamente el 95 por ciento, de preferencia de aproximadamente el 20 por ciento a aproximadamente el 90 por ciento de ingrediente activo. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención, por
10 ejemplo, pueden estar en una forma de dosis unitaria, tal como en la forma de ampolletas, frascos, supositorios, grageas, tabletas, o cápsulas.

Las composiciones farmacéuticas para administración oral se pueden obtener mediante la combinación del ingrediente activo con
15 vehículos sólidos, si se desea se granula una mezcla resultante, y se procesa la mezcla, si se desea o es necesario, después de la adición de excipientes apropiados, en tabletas, núcleos de grageas, o cápsulas. También es posible que se incorporen en portadores de plástico que permitan que los ingredientes activos se difundan o se
20 liberen en cantidades medidas.

Los compuestos de la invención también se pueden formular como dispersiones sólidas. Las dispersiones sólidas son fases dispersas extremadamente finas y homogéneas de dos o más sólidos. Las soluciones sólidas (sistemas molecularmente dispersos),
25 un tipo de dispersión sólida, son bien conocidas para utilizarse en la

tecnología farmacéutica (ver Chiou y Riegelman, *J. Pharm. Sci.*, 60, 1281-1300 (1971)), y son útiles para aumentar las velocidades de disolución y aumentar la biodisponibilidad de los fármacos pobremente solubles en agua.

5 Las dispersiones sólidas de fármacos se producen en general mediante métodos de fusión o de evaporación de solvente. Para el procesamiento por fusión, los materiales (excipientes), que normalmente son semisólidos y de una naturaleza cerosa, se calientan para causar la fusión y disolución de la sustancia de
10 fármaco, seguido por endurecimiento mediante enfriamiento a temperaturas muy bajas. Luego la dispersión sólida se puede pulverizar, tamizar, mezclar con excipientes, y encapsular en cápsulas de gelatina dura, o comprimir en tabletas. De una manera alternativa, el uso de portadores de actividad superficial y de auto-
15 emulsión, permite la encapsulación de las dispersiones sólidas directamente en cápsulas de gelatina dura como fusiones. Se forman tapones sólidos adentro de las cápsulas cuando se enfrían las fusiones a temperatura ambiente.

También se pueden fabricar soluciones sólidas mediante la
20 disolución del fármaco y el excipiente requerido, ya sea en una solución acuosa, o bien en un solvente orgánico farmacéuticamente aceptable, seguido por la remoción del solvente, utilizando un método farmacéuticamente aceptable, tal como secado por pulverización. El sólido resultante se puede dimensionar en
25 partículas, si se requiere, opcionalmente mezclar con excipientes, y

hacerse en tabletas o bien llenarse en cápsulas.

Un auxiliar polimérico particularmente adecuado para producir estas dispersiones sólidas o soluciones sólidas, es polivinil-pirrolidona (PVP).

5 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una solución sólida sustancialmente amorfa, comprendiendo esta solución:

(a) un compuesto de la Fórmula (I), por ejemplo el compuesto del Ejemplo 1; y

10 (b) un polímero seleccionado a partir del grupo que consiste en:

polivinil-pirrolidona (povidona), polivinil-pirrolidona reticulada (crospovidona), hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polióxido de etileno, gelatina, poliácido acrílico reticulado (carbómero), carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa reticulada (croscarmelosa), metilcelulosa, copolímero de ácido metacrílico, copolímero de metacrilato, y sales solubles en agua, tales como sales de sodio y de amonio de los copolímeros de ácido metacrílico y metacrilato, ftalato de acetato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, y alginato de propilenglicol;

20 en donde la proporción de este compuesto al polímero es de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:6, por ejemplo una proporción de 1:3, secada por pulverización a partir de una mezcla de uno de cloroformo o diclorometano, y uno de metanol o etanol, de preferencia diclorometano/etanol, en una proporción de 1:1.

82

Esta invención también proporciona formas de dosificación sólida que comprenden a la solución sólida descrita anteriormente. Las formas de dosificación sólida incluyen tabletas, cápsulas, y tabletas masticables. Se pueden mezclar los excipientes conocidos con la solución sólida para proporcionar la forma de dosificación deseada. Por ejemplo, una cápsula puede contener la solución sólida mezclada con (a) un desintegrante y un lubricante, o (b) un desintegrante, un lubricante, y un tensoactivo. Una tableta puede contener a la solución sólida mezclada con cuando menos un desintegrante, un lubricante, un tensoactivo, y un derrapante. La tableta masticable puede contener a la solución sólida mezclada con un agente de volumen, un lubricante, y si se desea un agente edulcorante adicional (tal como un edulcorante artificial), y saborizantes adecuados.

Las formulaciones farmacéuticas se pueden presentar a un paciente en "paquetes para el paciente" que contengan un curso entero de tratamiento en un solo paquete, usualmente un paquete de ampolla. Los paquetes para el paciente tienen una ventaja sobre las prescripciones tradicionales, en donde un farmacéutico divide el suministro de un paciente de un producto farmacéutico a partir de un suministro a granel, en que el paciente siempre tiene acceso al inserto del paquete contenido en el paquete para el paciente, el cual normalmente falta en las prescripciones para los pacientes. La inclusión de un inserto en el paquete ha demostrado mejorar el cumplimiento del paciente con las instrucciones del médico.

82

Las composiciones para uso tópico incluyen ungüentos, cremas, rocíos, parches, geles, gotas líquidas, e insertos (por ejemplo, insertos intraoculares). Estas composiciones se pueden formular de acuerdo con los métodos conocidos.

5 Las composiciones para administración parenteral normalmente se presentan como soluciones acuosas u oleosas estériles, o como suspensiones finas, o se pueden proporcionar en una forma de polvo estéril finamente dividido para formarse extemporáneamente con agua estéril para inyección.

10 Los ejemplos de las formulaciones para administración rectal o intra-vaginal incluyen pesarios y supositorios, los cuales, por ejemplo, se pueden formar a partir de un material moldeable configurado o ceroso que contenga al compuesto activo.

15 Las composiciones para administración mediante inhalación pueden tomar la forma de composiciones en polvo inhalables o rocíos líquidos o en polvo, y se pueden administrar en una forma estándar utilizando dispositivos de inhaladores de polvo o dispositivos de dosificación de aerosol. Estos dispositivos son bien conocidos. Para la administración mediante inhalación, las
20 formulaciones en polvo normalmente comprenden al compuesto activo junto con un diluyente en polvo sólido inerte, tal como lactosa.

Los compuestos de la Fórmula (I) generalmente se presentarán en una forma de dosificación unitaria, y como tales, típicamente contendrán suficiente compuesto para proporcionar un nivel deseado
25 de actividad biológica. Por ejemplo, una formulación puede contener

84

desde 1 nanogramo hasta 2 gramos de ingrediente activo, por ejemplo desde 1 nanogramo hasta 2 miligramos de ingrediente activo. Dentro de este intervalo, los sub-intervalos particulares del compuesto son de 0.1 miligramos 2 gramos de ingrediente activo
5 (más usualmente de 10 miligramos a 1 gramo, por ejemplo de 50 miligramos a 500 miligramos), o de 1 microgramo a 20 miligramos (por ejemplo, de 1 microgramo a 10 miligramos, por ejemplo de 0.1 miligramos a 2 miligramos de ingrediente activo).

Para las composiciones orales, una forma de dosificación
10 unitaria puede contener desde 1 miligramo hasta 2 gramos, más típicamente desde 10 miligramos hasta 1 gramo, por ejemplo de 50 miligramos a 1 gramo, por ejemplo de 100 miligramos a 1 gramo del compuesto activo.

El compuesto activo se administrará a un paciente que lo
15 necesite (por ejemplo, un paciente humano o animal), en una cantidad suficiente para lograr el efecto terapéutico deseado.

Métodos de Tratamiento

Se prevé que los compuestos de la Fórmula (I), y los subgrupos definidos en la presente, serán útiles en la profilaxis o en
20 el tratamiento de un rango de estados de enfermedad o condiciones mediadas por las cinasas dependientes de ciclina y la cinasa-3 de sintasa de glicógeno. Los ejemplos de estos estados de enfermedad y condiciones se estipulan anteriormente.

Los compuestos se administran en general a un sujeto que
25 necesite dicha administración, por ejemplo un paciente humano o

34

animal, de preferencia un ser humano.

Los compuestos normalmente se administrarán en cantidades que sean terapéuticamente o profilácticamente útiles, y que en general sean no tóxicos. Sin embargo, en ciertas situaciones (por ejemplo, en el caso de las enfermedades amenazantes de la vida), los beneficios de administrar un compuesto de la Fórmula (I) pueden superar a los inconvenientes de cualesquiera efectos tóxicos o efectos secundarios, en cuyo caso, se puede considerar deseable administrar los compuestos en cantidades que estén asociadas con un grado de toxicidad.

Los compuestos se pueden administrar durante un plazo prolongado para mantener los efectos terapéuticos benéficos, o se pueden administrar solamente durante un período corto. De una manera alternativa, se pueden administrar de una manera pulsátil o continua.

Una dosis diaria típica del compuesto de la Fórmula (I) puede estar en el intervalo de 100 picogramos a 100 miligramos por kilogramo de peso corporal, más típicamente de 5 nanogramos a 25 miligramos por kilogramo de peso corporal, y más usualmente de 10 nanogramos a 15 miligramos por kilogramo (por ejemplo, de 10 nanogramos a 10 miligramos, y más típicamente de 1 microgramo por kilogramo a 20 miligramos por kilogramo, por ejemplo de 1 microgramo a 10 miligramos por kilogramo) por kilogramo de peso corporal, aunque se pueden administrar dosis más altas o más bajas cuando se requieran. El compuesto de la Fórmula (I) se puede

administrar sobre una base diaria, o sobre una base repetida cada 2, ó 3, ó 4, ó 5, ó 6, ó 7, ó 10, ó 14, ó 21, ó 28 días, por ejemplo.

Los compuestos de la invención se pueden administrar oralmente en un rango de dosis, por ejemplo de 1 a 1500 miligramos, de 2 a 800 miligramos, ó de 5 a 500 miligramos, por ejemplo de 2 a 200 miligramos o de 10 a 1,000 miligramos, incluyendo los ejemplos particulares de dosis 10, 20, 50, y 80 miligramos. El compuesto se puede administrar una vez o más de una vez cada día. El compuesto se puede administrar continuamente (es decir, se toma cada día sin que se interrumpa la duración del régimen de tratamiento). De una manera alternativa, el compuesto se puede administrar de una forma intermitente (es decir, se puede tomar continuamente durante un período dado, tal como una semana, luego se interrumpe durante un período tal como una semana, y después se toma continuamente durante otro período, tal como una semana, y así sucesivamente a través de la duración del régimen de tratamiento). Los ejemplos de los regímenes de tratamiento que involucran la administración intermitente incluyen los regímenes en donde la administración es en ciclos de una semana sí, y una semana no; o dos semanas sí, y una semana no; o tres semanas sí, y una semana no; o dos semanas sí, y dos semanas no; o cuatro semanas sí, y dos semanas no; o una semana sí, y tres semanas no - para uno o más ciclos, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ó 10 o más ciclos.

Un ejemplo de una dosificación para la administración intravenosa para una persona de 60 kilogramos comprende

87

administrar un compuesto de la Fórmula (I) como se define en la presente, en una dosificación inicial de 4.5 a 10.8 miligramos/60 kilogramos/ día (equivalente a 75-180 microgramos/kilogramo/día), y subsecuentemente en una dosis eficaz de 44 a 97 miligramos/60 kilogramos/día (equivalente a de 0.7 a 1.6 miligramos/kilogramo/día), o en una dosis eficaz de 72 a 274 miligramos/60 kilogramos/día (equivalente a de 1.2 a 4.6 miligramos/kilogramo/día), aunque se pueden administrar dosis más altas o mas bajas cuando se requieran. La dosis en miligramos/kilogramo se escalaría prorrataada para cualquier peso corporal dado.

En un programa de dosificación particular, a un paciente se le dará una infusión de un compuesto de la Fórmula (I) durante períodos de 1 hora diariamente por hasta 10 días, en particular hasta 5 días durante una semana, y se repetirá el tratamiento a un intervalo deseado, tal como de 2 a 4 semanas, en particular cada 3 semanas.

De una manera más particular, a un paciente se le puede dar una infusión de un compuesto de la Fórmula (I) durante períodos de 1 hora diariamente por 5 días, y se repite el tratamiento cada tres semanas.

En otro programa de dosificación particular, a un paciente se le da una infusión durante 30 minutos a 1 hora, seguida por infusiones de mantenimiento de duración variable, por ejemplo de 1 a 5 horas, por ejemplo 3 horas.

En un programa de dosificación particular adicional, a un

~~87~~

paciente se le da una infusión continua durante un período de 12 horas a 5 días, y en particular una infusión continua de 24 horas a 72 horas.

5 Sin embargo, finalmente, la cantidad del compuesto administrado y el tipo de composición utilizada serán conmensurados con la naturaleza de la enfermedad o condición fisiológica que se esté tratando, y estarán a la discreción del médico.

10 Los compuestos de la Fórmula (I), y los subgrupos definidos en la presente, se pueden administrar como el único agente terapéutico, o se pueden administrar en una terapia de combinación con uno o más compuestos diferentes para el tratamiento de un estado de enfermedad particular, por ejemplo una enfermedad neoplásica, tal como un cáncer, como se define anteriormente en la presente. Los ejemplos de otros agentes terapéuticos o terapias que se pueden
15 administrar o utilizar junto (ya sea de una manera concurrente o a diferentes intervalos de tiempo) con los compuestos de la invención incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de topoisomerasa, agentes alquilantes, antimetabolitos, enlazantes de ADN, inhibidores de microtúbulos (agentes de dirección a la tubulina), anticuerpos
20 monoclonales, e inhibidores de transducción de señales, siendo los ejemplos particulares la cisplatina, ciclofosfamida, doxorubicina, irinotecano, fludarabina, 5FU, taxanos, mitomicina C, y radioterapia.

25 Para el caso de los inhibidores de cinasa dependiente de ciclina combinados con otras terapias, los dos o más tratamientos se pueden dar en programas de dosis individualmente variables y por

ga

vías diferentes.

Cuando el compuesto de la Fórmula (I) se administra en una terapia de combinación con 1, 2, 3, 4, ó más agentes terapéuticos diferentes (de preferencia 1 ó 2, más preferiblemente 1), los compuestos se pueden administrar de una manera simultánea o en secuencia. Cuando se administran en secuencia, se pueden administrar a intervalos estrechamente espaciados (por ejemplo, durante un período de 5 a 10 minutos), o a intervalos más largos (por ejemplo, con 1, 2, 3, 4, ó más horas de separación, o inclusive períodos más largos de separación cuando se requiera), siendo el régimen de dosificación preciso conmensurado con las propiedades de los agentes terapéuticos.

Los compuestos de la invención también se pueden administrar en conjunto con tratamiento no quimioterapéuticos, tales como radioterapia, terapia fotodinámica, terapia genética; cirugía, y dietas controladas.

Para utilizarse en la terapia de combinación con otro agente quimioterapéutico, el compuesto de la Fórmula (I), y 1, 2, 3, 4, ó más agentes terapéuticos diferentes, por ejemplo, se pueden formular juntos en una forma de dosificación que contenga 2, 3, 4, ó más agentes terapéuticos. En una alternativa, los agentes terapéuticos individuales se pueden formular por separado, y se pueden presentar juntos en la forma de un estuche terapéutico, opcionalmente con instrucciones para su uso.

Una persona experta en la materia sabría, a través de su

~~ga~~

conocimiento general común, los regímenes de dosificación y las terapias de combinación a utilizar.

Métodos de Diagnóstico

Antes de la administración de un compuesto de la Fórmula (I),
5 se puede rastrear a un paciente para determinar si una enfermedad o condición de la que esté o pueda estar sufriendo el paciente, es una que sería susceptible al tratamiento con un compuesto que tenga actividad contra las cinasas dependientes de ciclina.

Por ejemplo, se puede analizar una muestra biológica tomada
10 de un paciente, para determinar si una condición o enfermedad, tal como cáncer, que esté o pueda estar sufriendo el paciente, es una que se caracterice por una anomalía genética o una expresión de proteína anormal que conduzca a una sobre-activación de las cinasas dependientes de ciclina, o a la sensibilización de una senda
15 para la actividad normal de la cinasa dependiente de ciclina. Los ejemplos de estas anomalías que dan como resultado la activación o sensibilización de la señal de CDK2 incluyen el aumento de ciclina E (Harvell RM, Mull BB, Porter DC, Keyomarsi K.; *J. Biol. Chem.* 2004 26 de marzo; 279(13):12695-705), o la pérdida de p21 ó
20 p27, o la presencia de variantes de CDC4 (Rajagolapan H, Jallepalli PV, Rago C, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C.; *Nature*. 4 de marzo de 2004; 428(6978):77-81). Los tumores con mutantes de CDC4 ó en aumento, en particular con sobre-expresión, de ciclina E, o pérdida de p21 ó p27, pueden ser particularmente
25 sensibles a los inhibidores de la cinasa dependiente de ciclina. El

término "aumento" incluye la expresión elevada o sobre-expresión, incluyendo la amplificación genética (es decir, múltiples copias de genes) y la expresión incrementada mediante un efecto de transcripción, e hiperactividad y activación, incluyendo activación por mutaciones.

Por consiguiente, el paciente se puede someter a una prueba de diagnóstico para detectar un marcador característico del aumento de ciclina E, o de la pérdida de p21 ó p27, o de la presencia de variantes de CDC4. El término "diagnóstico" incluye el rastreo. Mediante marcador, incluimos a los marcadores genéticos incluyendo, por ejemplo, la medición de la composición del ADN para identificar las mutaciones de CD4. El término "marcador" también incluye a los marcadores que son característicos del aumento de ciclina E, incluyendo la actividad enzimática, los niveles de enzimas, el estado enzimático (por ejemplo, fosforilado o no), y los niveles de ARNm de las proteínas anteriormente mencionadas. Los tumores con aumento de ciclina E, o pérdida de p21 ó p27, pueden ser particularmente sensibles a los inhibidores de la cinasa dependiente de ciclina. Los tumores se pueden rastrear preferencialmente para el aumento de ciclina E, o la pérdida de p21 ó p27, antes del tratamiento. Por consiguiente, el paciente se puede someter a una prueba de diagnóstico con el fin de detectar un marcado característico del aumento de ciclina E, o de la pérdida de p21 ó p27.

Las pruebas de diagnóstico normalmente se conducen sobre una muestra biológica seleccionada a partir de muestras de biopsia

92

del tumor, muestras de sangre (aislamiento y enriquecimiento de células tumorales alojadas), biopsias de heces, esputo, análisis de cromosomas, fluido pleural, fluido peritoneal, u orina.

Se ha encontrado, Rajagopalan y colaboradores (*Nature*. 4 de marzo de 2004; 428(6978):77-81), que había mutaciones presentes en CDC4 (también conocido como Fbw7 ó Archipiélago) en los cánceres colo-rectales humanos y en los cánceres endometriales (Spruck y colaboradores, *Cancer Res*. 15 de agosto de 2002; 62(16):4535-9). La identificación de un individuo que lleve una mutación en CDC4, puede significar que el paciente sería particularmente adecuado para el tratamiento con un inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina. Los tumores se pueden rastrear preferencialmente para determinar la presencia de una variante de CDC4 antes del tratamiento. El proceso de rastreo normalmente involucrará la secuenciación directa, el análisis de microarreglos de oligonucleótidos, o un anticuerpo específico del mutante.

Los métodos de identificación y análisis de mutaciones y aumento de proteína son bien conocidas por una persona experta en la materia. Los métodos de rastreo podrían incluir, pero no se limitan a, métodos convencionales, tales como reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), o hibridación *in situ*.

En el rastreo mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa, se evalúa el nivel de ARNm en el tumor, mediante la creación de una copia de ADNc del ARNm, seguida por amplificación del ADNc mediante reacción en cadena de la

92

polimerasa. Los métodos de amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa, la selección de cebadores, y las condiciones para la amplificación, son conocidos por una persona experta en este campo. Las manipulaciones de ácidos nucleicos y la

5 reacción en cadena de la polimerasa se llevan a cabo mediante métodos convencionales, como se describen, por ejemplo, en Ausubel, F. M. y colaboradores, Editores, *Current Protocols in Molecular Biology*, 2004, John Wiley & Sons Inc., ó Innis, M. A. y colaboradores, editores, *PCR Protocols: a guide to methods and applications*, 1990, Academic Press, San Diego. Las reacciones y

10 manipulaciones que involucran técnicas de ácidos nucleicos también se describen en Sambrook y colaboradores, 2001, 3ª Edición, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. De una manera alternativa, se puede utilizar un

15 estuche de diagnóstico comercialmente disponible para reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (por ejemplo, Roche Molecular Biochemicals), o la metodología estipulada en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659; 5,272,057; 5,882,864, y 6,218,529,

20 e incorporadas a la presente como referencia.

Un ejemplo de una técnica de hibridación *in situ* para evaluar la expresión del ARNm, sería la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) (ver Angerer, 1987 Meth. Enzymol., 152:649).

En términos generales, la hibridación *in situ* comprende los

25 siguientes pasos principales: (1) fijación del tejido que se vaya a

analizar; (2) tratamiento de prehibridación de la muestra para aumentar la accesibilidad del ácido nucleico objetivo, y para reducir el enlace no específico; (3) la hibridación de la mezcla de ácidos nucleicos al ácido nucleico de la estructura biológica o tejido; (4) los lavados posteriores a la hibridación para remover los fragmentos de ácidos nucleicos no enlazados en la hibridación, y (5) la detección de los fragmentos de ácidos nucleicos hibridados. Las sondas utilizadas en estas aplicaciones normalmente se marcan, por ejemplo, con radioisótopos o reporteros fluorescentes. Las sondas preferidas son suficientemente largas, por ejemplo, de aproximadamente 50, 100, ó 200 nucleótidos, a aproximadamente 1,000 ó más nucleótidos, para hacer posible una hibridación específica con los ácidos nucleicos objetivos bajo condiciones restringentes. Los métodos convencionales para llevar a cabo el FISH se describen en Ausubel, F. M. y colaboradores, *Current Protocols in Molecular Biology*, 2004, John Wiley & Sons, Inc. y *Fluorescence In Situ Hybridization: Technical Overview* by John M. S. Barlett en *Molecular Diagnosis of Cancer, Methods and Protocols*, Segunda Edición; ISBN: 1-59259-706-2; marzo de 2004, páginas 077-088; Serie: *Methods in Molecular Medicine*.

De una manera alternativa, los productos de proteína expresados a partir de los ARNms se pueden ensayar mediante inmunohistoquímica de muestras tumorales, inmunoensayo en fase sólida con placas de microtitulación, Western blot, electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS bidimensional, ELISA, citometría de flujo,

95

y otros métodos conocidos en la técnica para la detección de proteínas específicas. Los métodos de detección incluirían el uso de anticuerpos específicos del sitio. La persona experta reconocerá que todas estas técnicas bien conocidas para la detección del aumento de ciclina E, o de la pérdida de p21 ó p27, o para la detección de variantes de CDC4, podrían ser aplicables en el presente caso.

Por consiguiente, todas estas técnicas se podrían utilizar también para identificar tumores particularmente adecuados para el tratamiento con los compuestos de la invención.

Los tumores con mutantes de CDC4 o con aumento, en particular sobre-expresión, de ciclina E, o pérdida de p21 ó p27, pueden ser particularmente sensibles a los inhibidores de cinasa dependiente de ciclina. Los tumores se pueden rastrear preferencialmente para determinar el aumento, en particular la sobre-expresión, de ciclina E (Harwell RM, Mull BB, Porter DC, Keyomarsi K.; *J. Biol. Chem.* 26 de marzo de 2004; 279(13):12659-705), o pérdida de p21 ó p27, o para determinar las variantes de CDC4 antes del tratamiento (Rajagopalan H, Jallepalli PV, Rago C, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C.; *Nature*. 4 de marzo de 2004; 428(6978):77-81).

Los pacientes con linfoma de células de manto (MCL) se podrían seleccionar para el tratamiento con un compuesto de la invención, utilizando las pruebas de diagnóstico ilustradas en la presente. MCL es una entidad clinicopatológico distinta del linfoma que no es de Hodgkin, caracterizada por la proliferación de linfocitos

45

de tamaño pequeño a mediano, con la co-expresión de CDC5 y CDC20, un cuadro clínico agresivo e incurable, y la translocación frecuente de t(11;14)(q13;q32). La sobre-expresión del ARNm de la ciclina D1, encontrada en el linfoma de células de manto (MCL), es un marcador de diagnóstico crítico. Yatabe y colaboradores (Blood. 1 de abril de 2000; 95(7):2253-61) propusieron que se debería incluir la positividad de la ciclina D1 como uno de los criterios estándares para MCL, y que se debe explorar terapias innovadoras para esta enfermedad incurable con base en los nuevos criterios. Jones y colaboradores (*J. Mol. Diagn.*, mayo de 2004; 6(2):84-9) desarrollaron un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cuantitativa, en tiempo real, para la expresión de ciclina D1 (CCND1), para ayudar en el diagnóstico del linfoma de células de manto (MCL). Howe y colaboradores (*Clin. Chem.* enero de 2004; 50(1):80-7) utilizaron reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa, en tiempo real, para evaluar la expresión del ARNm de la ciclina D1, y encontraron que la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa para el ARNm de la ciclina D1 normalizada para el ARNm de CD19, se puede utilizar en el diagnóstico de MCL en sangre, médula ósea, y tejido. De una manera alternativa, los pacientes con cáncer de mama se podrían seleccionar para el tratamiento con un inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina, utilizando las pruebas de diagnóstico ilustradas anteriormente. Las células tumorales comúnmente sobre-expresan la ciclina E, y se ha demostrado que la

97

ciclina E se sobre-expresa en el cáncer de mama (Harwell y colaboradores, *Cancer Res*, 2000, 60, 481-489). Por consiguiente, el cáncer de mama se puede tratar en particular con un inhibidor de cinasa dependiente de ciclina, como se proporcionan en la presente.

Uso Antifúngico

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de los compuestos de la Fórmula (I), y subgrupos de los mismos como se definen en la presente, como agentes antifúngicos.

Los compuestos de la Fórmula (I), y los subgrupos de los mismos, como se definen en la presente, se pueden utilizar en medicina animal (por ejemplo, en el tratamiento de mamíferos, tales como seres humanos), o en el tratamiento de plantas (por ejemplo, en agricultura y horticultura), o como agentes antifúngicos en general, por ejemplo como conservadores y desinfectantes.

En una modalidad, la invención proporciona un compuesto de la Fórmula (I), y subgrupos del mismo como se definen en la presente, para utilizarse en la profilaxis o el tratamiento de una infección fúngica en un mamífero, tal como un ser humano.

También se proporciona el uso de un compuesto de la Fórmula (I), y subgrupos del mismo, como se definen en la presente, para la fabricación de un medicamento para utilizarse en la profilaxis o el tratamiento de una infección fúngica en un mamífero, tal como un ser humano.

Por ejemplo, los compuestos de la invención se pueden administrar a pacientes humanos que sufran de, o que estén en

212

riesgo de infección por, infecciones fúngicas tópicas causadas por, entre otros organismos, especies de *Candida*, *Trichophyton*, *Microsporum*, ó *Epidermophyton*, o en infecciones mucosas causadas por *Candida Albicans* (por ejemplo, candidiasis thrush y vaginal). Los

5 compuestos de la invención también se pueden administrar para el tratamiento o la profilaxis de infecciones fúngicas sistémicas causadas, por ejemplo, por *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Coccidioides*, *Paracoccidioides*, *Histoplasma* ó *Blastomyces*.

10 En otro aspecto, la invención proporciona una composición antifúngica para uso agrícola (incluyen hortícola), la cual comprende un compuesto de la Fórmula (I), y subgrupos del mismo, como se definen en la presente, junto con un diluyente o vehículo agrícolamente aceptable.

15 La invención proporciona además un método para el tratamiento de un animal (incluyendo un mamífero, tal como un ser humano), una planta o una semilla, que tenga una infección fúngica, el cual comprende tratar a este animal, planta, o semilla, o al lugar de esta planta o semilla, con una cantidad efectiva de un compuesto

20 de la Fórmula (I), y subgrupos del mismo, como se definen en la presente.

La invención también proporciona un método para el tratamiento de una infección fúngica en una planta o semilla, el cual comprende tratar la planta o la semilla con una cantidad

25 antifúngicamente efectiva de una composición fungicida que

contenga un compuesto de la Fórmula (I), y subgrupos del mismo, como se definen en la presente.

Se pueden utilizar ensayos de rastreo diferencial para seleccionar los compuestos de la presente invención con una
5 especificidad para las enzimas de cinasa dependiente de ciclina no humanas. Los compuestos que actúen específicamente sobre las enzimas de cinasa dependiente de ciclina de los patógenos eucarióticos se pueden utilizar como agentes antifúngicos o antiparasitarios. Se pueden utilizar inhibidores de la cinasa
10 dependiente de ciclina de *Candida*, CKSI, en el tratamiento de candidiasis. Los agentes antifúngicos se pueden utilizar contra infecciones del tipo definido anteriormente en la presente, o contra infección oportunistas que se presentan comúnmente en los pacientes debilitados e inmunosuprimidos, tales como los pacientes
15 con leucemias y linfomas, las personas que estén recibiendo terapia inmunosupresora, y los pacientes con condiciones de predisposición, tales como diabetes mellitus o SIDA, así como para los pacientes no inmunosuprimidos.

Se pueden emplear los ensayos descritos en la técnica para
20 rastrear los agentes que puedan ser útiles para inhibir cuando menos un hongo implicado en micosis, tal como candidiasis, aspergilosis, mucormicosis, blastomicosis, geotricosis, criptococcosis, cromoblastomicosis, coccidioidomicosis, conidiosporosis, histoplasmosis, maduromicosis, rinosporidosis, nocardiosis, para-
25 actinomicosis, penicilosis, monoliásis, o esporotricosis. Los ensayos

de rastreo diferencial se pueden utilizar para identificar los agentes antifúngicos que puedan tener un valor terapéutico en el tratamiento de aspergilosis, haciendo uso de los genes de cinasa dependiente de ciclina clonados a partir de levadura, tales como *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, ó *Aspergillus terreus*, o en donde la infección micótica sea mucormicosis, en ensayo de cinasa dependiente de ciclina se puede derivar de levadura, tal como *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oryzae*, *Absidia corymbifera*, *Absidia ramosa*, ó *Mucorpusillus*. Las fuentes de otras enzimas de cinasa dependiente de ciclina incluyen al patógeno *Pneumocystis carinii*.

A manera de ejemplo, se puede llevar a cabo la evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de los compuestos, mediante la determinación de la concentración inhibidora mínima (M.I.C.); que es la concentración de los compuestos de prueba, en un medio adecuado, en donde no se presente el crecimiento del microorganismo particular. En la práctica, una serie de placas de ágar, cada una teniendo al compuesto de prueba incorporado en una concentración particular, se inoculan con un cultivo estándar, por ejemplo, de *Candida albicans*, y luego se incuba cada placa durante un período apropiado a 37°C. Entonces se examinan las placas para determinar la presencia o ausencia de crecimiento del hongo, y se anota el valor de concentración inhibidora mínima apropiado. De una manera alternativa, se puede llevar a cabo un ensayo de turbidez en cultivos líquidos, y se puede encontrar un protocolo que ilustra un

ejemplo de este ensayo en los ejemplos que se encuentran más adelante.

La evaluación *in vivo* de los compuestos se puede llevar a cabo en una serie de niveles de dosis mediante inyección intraperitoneal o intravenosa, o mediante administración oral, a ratones que se han inoculado con un hongo, por ejemplo una cepa de *Candida albicans* o *Aspergillus flavus*. La actividad de los compuestos se puede evaluar mediante el monitoreo del crecimiento de la infección fúngica en grupos de ratones tratados y no tratados (mediante histología, o recuperando los hongos de la infección). La actividad se puede medir en términos del nivel de dosis en el cual el compuesto proporciona una protección del 50 por ciento contra el efecto letal de la infección (PD₅₀).

Para uso antifúngico humano, los compuestos de la Fórmula (I), y los subgrupos de los mismos, como se definen en la presente, se pueden administrar solos o mezclados con un vehículo farmacéutico seleccionado de acuerdo con la vía de administración pretendida y la práctica farmacéutica convencional. Por consiguiente, por ejemplo, se pueden administrar oralmente, parenteralmente, intravenosamente, intramuscularmente, o subcutáneamente, por medio de las formulaciones descritas anteriormente, en la sección con el encabezado de "Formulaciones Farmacéuticas".

Para la administración oral y parenteral a pacientes humanos, el nivel de dosificación diaria de los compuestos antifúngicos de la invención puede ser de 0.01 a 10 miligramos/kilogramo (en dosis

divididas), dependiendo, entre otras cosas, de la potencia de los compuestos cuando se administren ya sea por la vía oral o parenteral. Las tabletas o cápsulas de los compuestos pueden contener, por ejemplo, de 5 miligramos a 0.5 gramos del compuesto activo, para administrarse individualmente, o dos o más en un tiempo apropiado. El médico, en cualquier caso, determinará la dosificación real (cantidad efectiva) que será más adecuada para un paciente individual, y variará con la edad, el peso, y la respuesta del paciente particular.

De una manera alternativa, los compuestos antifúngicos se pueden administrar en la forma de un supositorio o pesario, o se pueden aplicar tópicamente en la forma de una loción, solución, crema, ungüento, o polvo. Por ejemplo, se pueden incorporar en una crema consistente en una emulsión acuosa de polietilenglicoles o parafina líquida; o se pueden incorporar, en una concentración de entre el 1 y el 10 por ciento, en un ungüento consistente en una cera blanca o en una base de parafina blanda y blanca, junto con los estabilizantes y conservadores que puedan ser requeridos.

En adición a los usos terapéuticos descritos anteriormente, los agentes antifúngicos desarrollados con estos ensayos de rastreo diferencial, se pueden utilizar, por ejemplo, como conservadores en materiales alimenticios, suplementos alimenticios para promover la ganancia de peso en el ganado, o en formulaciones desinfectantes para el tratamiento de materia no viva, por ejemplo para descontaminar equipo y sales de hospitales. De una forma similar, la

comparación lado a lado de la inhibición de una cinasa dependiente de ciclina de mamífero y una cinasa dependiente de ciclina de insecto, tal como el gen CDK5 de *Drosophila* (Hellmich y colaboradores (1994) FEBS Lett. 356:317-21), permitirá hacer la selección de entre los compuestos de la presente, de los inhibidores que discriminen entre las enzimas humanas/de mamífero y de insecto. De conformidad con lo anterior, la presente invención contempla expresamente el uso y la formulación de los compuestos de la invención en insecticidas, tal como para utilizarse en el manejo de insectos como la mosca de la fruta.

En todavía otra modalidad, se pueden seleccionar algunos de los inhibidores de cinasa dependiente de ciclina objeto, con base en la especificidad inhibidora para las cinasas dependientes de ciclina de plantas en relación con la enzima de mamífero. Por ejemplo, una cinasa dependiente de ciclina de planta se puede disponer en un rastreo diferencial con una o más de las enzimas humanas, para seleccionar los compuestos de mayor selectividad para inhibir la enzima de la planta. Por consiguiente, la presente invención contempla de una manera específica, las formulaciones de los inhibidores de cinasa dependiente de ciclina objeto para aplicaciones agrícolas, tal como en la forma de un desfoliante o similar.

Para propósitos agrícolas y hortícolas, los compuestos de la invención se pueden utilizar en la forma de una composición formulada según sea apropiado para el uso particular y el propósito pretendido. Por consiguiente, los compuestos se pueden aplicar en la

bu

forma de polvos, o gránulos, revestimientos de semillas, soluciones, dispersiones o emulsiones acuosas, inmersiones, rocíos, aerosoles, o humos. Las composiciones también se pueden suministrar en la forma de polvos dispersables, gránulos o granos, o concentrados para diluirse antes de usarse. Estas composiciones pueden contener los vehículos, diluyentes, o adyuvantes convencionales, como son conocidos y aceptables en agricultura y horticultura, y se pueden fabricar de acuerdo con los procedimientos convencionales. Las composiciones también pueden incorporar otros ingredientes activos, por ejemplo, los compuestos que tengan actividad herbicida o insecticida, o un fungicida adicional. Los compuestos y las composiciones se pueden aplicar en un número de maneras, por ejemplo, se pueden aplicar directamente al follaje de la planta, a los tallos, a las ramas, semillas, o raíces, o a la tierra o a otro medio de crecimiento, y se pueden utilizar no solamente para erradicar la enfermedad, sino también profilácticamente para proteger a las plantas o a las semillas del ataque. A manera de ejemplo, las composiciones pueden contener del 0.01 al 1 por ciento en peso del ingrediente activo. Para utilizarse en el campo, los probables índices de aplicación del ingrediente activo pueden ser de 50 a 5,000 gramos/hectárea.

La invención también contempla el uso de los compuestos de la Fórmula (I), y los subgrupos de los mismos, como se definen en la presente, en el control de hongos de decaimiento de madera, y en el tratamiento de la tierra en donde crecen las plantas, los campos

104

inundados para plántulas, o el agua para perfusión. La invención también contempla el uso de los compuestos de la Fórmula (I), y los subgrupos de los mismos, como se definen en la presente, para proteger al grano almacenado y a otros lugares que no sean de plantas, de la infestación fúngica.

EJEMPLOS

Ahora se ilustrará la invención, pero sin limitación, haciendo referencia a las modalidades específicas descritas en los siguientes Ejemplos.

En los Ejemplos, se utilizan las siguientes abreviaturas:

AcOH Ácido acético.

BOC Terbutiloxi-carbonilo.

CDI 1,1-carbonildi-imidazol.

DMAW90 Mezcla de solventes: DCM: MeOH, AcOH, H₂O
(90:18:3:2).

DMAW120 Mezcla de solventes: DCM: MeOH, AcOH, H₂O
(120:18:3:2).

DMAW240 Mezcla de solventes: DCM: MeOH, AcOH, H₂O
(240:20:3:2).

DCM Diclorometano.

DMF Dimetil-formamida.

DMSO Sulfóxido de dimetilo.

EDC 1-etil-3-(3'-dimetil-amino-propil)-carbodi-
imida.

Et₃N Trietil-amina.

EtOAc	Acetato de etilo.
Et ₂ O	Dietil-éter.
HOAt	1-hidroxiaza-benzotriazol.
HOBt	1-hidroxibenzotriazol.
5 MeCN	Acetonitrilo.
MeOH	Metanol.
P.E.	Éter de petróleo.
SiO ₂	Sílice.
TBTU	Tetrafluoro-borato de N,N,N',N'-tetrametil-O-
10	(benzotriazol-1-il)-uronio.
THF	Tetrahidrofurano.

Sistema de LC-MS Analítica y Descripción del Método

En los Ejemplos, los compuestos preparados se caracterizaron mediante cromatografía de líquidos y espectroscopía de masas, utilizando los sistemas y las condiciones operativas estipuladas más adelante. Cuando están presentes átomos con diferentes isótopos, y se cita una sola masa, la masa citada para el compuesto es una masa monoisotópica (es decir, ³⁵Cl; ⁷⁹Br, etcétera). Se utilizaron varios sistemas, como se describen más adelante, y éstos se equiparon con, y se establecieron para ejecutarse bajo, las condiciones operativas estrechamente similares. Las condiciones operativas empleadas también se describen más adelante.

Sistema de LC-MS de Plataforma Waters:

Sistema de HPLC: Waters 2795

25 Detector de espectrometría

de masas: Micromass Platform LC.

Detector de PDA: Waters 2996 PDA.

Condiciones Ácidas Analíticas:

Eluyente A: H_2O (ácido fórmico al 0.1 por ciento).

5 Eluyente B: CH_3CN (ácido fórmico al 0.1 por ciento).

Gradiente: 5-95 por ciento de eluyente B durante 3.5 minutos.

Flujo: 0.8 mililitros/minuto.

Columna: Phenomenex Synergi 4μ MAX-RP 80A, 2.0
10 x 5.0 mm.

Condiciones Ácidas Largas Analíticas:

Eluyente A: H_2O (ácido fórmico al 0.1 por ciento).

Eluyente B: CH_3CN (ácido fórmico al 0.1 por ciento).

15 Gradiente: 05-95 por ciento de eluyente B durante 15 minutos.

Flujo: 0.4 mililitros/minuto.

Columna: Phenomenex Synergi 4μ MAX-RP 80A,
2.0x150 mm.

Condiciones de MS de Plataforma:

20 Voltaje capilar: 3.6 kV (3.40 kV sobre ES negativo).

Voltaje del cono: 25 V.

Temperatura de la fuente: 120°C

Intervalo de exploración: 100-800 amu.

25 Modo de ionización: Electropulverización positiva o

Electropulverización negativa o
Electropulverización positiva y
negativa.

Sistema de LC-MS Waters Fractionlynx:

5 Sistema de HPLC: Automuestreador 2767 - bomba de
gradiente binario 2525.

Detector de espectrometría de masas:

Waters ZQ.

Detector de PDA: Waters 2996 PDA.

10 **Condiciones Ácidas Analíticas:**

Eluyente A: H₂O (ácido fórmico al 0.1 por ciento).

Eluyente B: CH₃CN (ácido fórmico al 0.1 por ciento).

Gradiente: 5-95 por ciento de eluyente B durante 4
minutos.

15 Flujo: 2.0 mililitros/minuto.

Columna: Phenomenex Synergi 4μ MAX-RP 80A,
4.6x50 mm.

Condiciones de MS Fractionlynx:

20 Voltaje capilar: 3.5 kV (3.2 kV sobre ES
negativo).

Voltaje del cono: 25 V (30 V sobre ES negativo).

Temperatura de la fuente: 120°C

Intervalo de exploración: 100-800 amu.

25 Modo de ionización: Electropulverización positiva o
Electropulverización negativa o

pa

Electropulverización positiva y
negativa.

Sistema de LC-MS de Purificación Dirigida a la Masa

La LC-MS de preparación es un método estándar y efectivo
5 utilizado para la purificación de moléculas orgánicas pequeñas, tales
como los compuestos descritos en la presente. Los métodos para la
cromatografía de líquidos (LC) y la espectrometría de masas (MS) se
pueden variar para proporcionar una mejor separación de los
materiales crudos, y una mejor detección de las muestras mediante
10 espectrometría de masas. La optimización del método de LC de
gradiente de preparación involucrará diferentes columnas, eluyentes
volátiles, y modificaciones, y gradientes. Los métodos son bien
conocidos en la técnica para optimizar los métodos de LC-MS de
preparación, y luego emplearlos para purificar compuestos. Estos
15 métodos se describen en Rosentreter U, Huber U.; Optimal fraction
collecting in preparative LC/MS; *J. Comb. Chem.* 2004; 6(2), 159-64
y Leister W. Strauss K, Wisnoski D, Zhao Z, Lindsley C.,
Development of a custom high-throughput preparative liquid
chromatography/mass spectrometer platform for the preparative
20 purification and analytical analysis of compound libraries; *J. Comb.*
Chem.; 2003; 5(3); 322-9.

Más adelante se describe un sistema para purificar compuestos
por medio de LC-MS de preparación, aunque una persona experta en
la materia apreciará que se podrían utilizar sistemas y métodos
25 alternativos a los descritos. En particular, se podrían emplear

109

métodos basados en LC de preparación en fase normal en lugar de los métodos en fase inversa descritos en la presente. La mayoría de los sistemas de LC-MS de preparación utilizan LC de fase inversa y modificadores ácidos volátiles, debido a que el planteamiento es muy efectivo para la purificación de moléculas pequeñas, y debido a que los eluyentes son compatibles con la espectrometría de masas con electropulverización de iones positivos. El empleo de otras soluciones cromatográficas, por ejemplo cromatografía de líquidos en fase normal, fase móvil alternadamente regulada, modificadores básicos, etcétera, como se ilustran en los métodos analíticos descritos anteriormente, se podrían utilizar de una manera alternativa para purificar los compuestos.

Sistemas de LC-MS de Preparación:

Sistema Waters Fractionlynx:

• Hardware:

Auto-muestreado de Ciclo Doble/Recolector de Fracciones 2767.

Bomba de preparación 2525.

CFO (organizador fluido de columna) para la selección de columna.

RMA (manejador de reactivo Waters) como bomba de relleno.

Espectrómetro de Masas Waters ZQ.

Detector de Arreglo de Foto-diodo Waters 2996.

Espectrómetro de Masas Waters ZQ.

• Software:

Masslynx 4.0.

• Condiciones de ejecución de MS Waters:

Voltaje capilar: 3.5 kV (3.2 kV sobre ES
negativo).
Voltaje del cono: 25 V
Temperatura de la fuente: 120°C
5 Multiplicador: 500 V.
Intervalo de exploración: 125-800 amu.
Modo de ionización: Electropulverización positiva o
Electropulverización negativa.

Sistema de Preparación de LC-MS Agilent 1100:

10 • **Hardware:**

Automuestrador: 1100 serie "prepALS".

Bomba: 1100 serie "PrepPump" para gradiente de
flujo de preparación, y 1100 serie
"QuantPump" para bombeo de modificador
15 en flujo de preparación.

Detector UV: 1100 serie "MWD", Detector de Múltiples
Longitudes de Onda.

Detector MS: 1100 serie "LC-MSD VL".

Recolector de fracciones: 2x "Prep-FC".

20 Bomba de relleno: "Waters RMA".

Divisor activo Agilent

• **Software:**

Chemistation: Chem32.

• **Condiciones de Ejecución de MS Agilent:**

25 Voltaje capilar: 4000 V (3500 V sobre ES

negativo).

Fragmentador/ganancia: 150/1.

Flujo de gas de secado: 13.0 litros/minuto.

Temperatura del gas: 350°C.

5 Presión del nebulizador: 3.5 kg/cm².

Intervalo de exploración: 125-800 amu.

Modo de ionización: Electropulverización positiva o
Electropulverización negativa.

Condiciones Cromatográficas:

10 • **Columnas:**

1. Cromatografía a pH bajo:

Phenomenex Synergi MAX-RP, 10μ, 100 x 21.2mm.

(alternativamente se utiliza Thermo Hypersil-Keystone HyPurity
Aquastar, 5μ, 100x21.2 mm para los compuestos más polares).

15 2. Cromatografía a pH alto:

Phenomenex Luna C18(2), 10μ, 100 x 21.2 mm.

(se utiliza alternativamente Phenomenex Gemini, 5μ, 100 x 21.2
mm).

• **Eluyentes:**

20 1. Cromatografía a pH bajo:

Solvente A: H₂O + ácido fórmico al 0.1 por ciento, pH de
aproximadamente 1.5.

Solvente B: CH₃CN + ácido fórmico al 0.1 por ciento.

2. Cromatografía a pH alto:

25 Solvente A: H₂O + NH₄HCO₃ 10 mM + NH₄OH, pH = 9.2.

Solvente B: CH₃CN.

3. Solvente de relleno:

MeOH + ácido fórmico al 0.2 por ciento (para ambos tipos de cromatografía).

5 • **Métodos:**

De acuerdo con el trazo analítico, se seleccionó el tipo de cromatografía de preparación más apropiado. Una rutina típica fue ejecutar una LC-MS analítica empleando el tipo de cromatografía (a pH bajo o alto) más adecuado para la estructura del compuesto. Una vez que el trazo analítico mostró una buena cromatografía, se seleccionó un método de preparación adecuado del mismo. Las condiciones de ejecución típicas para ambos métodos de cromatografía a pH bajo y alto fueron:

Velocidad de flujo: 24 mililitros/minuto.

15 Gradiente: En general, todos los gradientes tuvieron un paso inicial de 0.4 minutos con 95 por ciento de A + 5 por ciento de B. Luego, de acuerdo con el trazo analítico, se seleccionó un gradiente de 3.6 minutos con el objeto de lograr una buena separación (por ejemplo, desde el 5 por ciento hasta el 50 por ciento de B para los compuestos de retención temprana; desde el 35 por ciento hasta el 80 por ciento de B para los compuestos de retención media, etcétera).

Lavado: Se llevó a cabo un paso de lavado de 1.2 minutos al final del gradiente.

25 Re-equilibrio: Se ejecutó un paso de re-equilibrio de 2.1

minutos para preparar el sistema para la siguiente prueba.

Velocidad de flujo de relleno: 1 mililitro/minuto.

• **Solvente:**

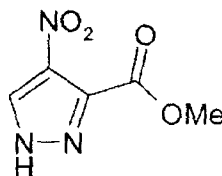
Todos los compuestos se disolvieron usualmente en el 100 por ciento de MeOH o en el 100 por ciento de sulfóxido de dimetilo.

A partir de la información proporcionada, alguien experto en la técnica podría purificar los compuestos descritos en la presente mediante LC-MS de preparación.

Los materiales de partida para cada uno de los Ejemplos están comercialmente disponibles, a menos que se especifique de otra manera.

EJEMPLO 1

A1. Metil-éster del ácido 4-nitro-1H-pirazol-3-carboxílico

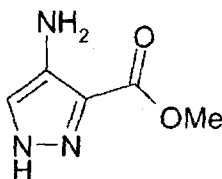


Se agregó lentamente cloruro de tionilo (2.90 mililitros, 39.8 milimoles) a una mezcla de ácido 4-nitro-3-pirazol-carboxílico (5.68 gramos, 36.2 milimoles) en MeOH (100 mililitros) a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó durante 48 horas. La mezcla se redujo al vacío, y se secó a través de destilación azeotrópica con tolueno, para proporcionar el metil-éster del ácido 4-nitro-1H-pirazol-3-carboxílico como un sólido blanco.

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 14.4 (s, 1H), 8.9 (s, 1H), 3.9 (s,

3H).

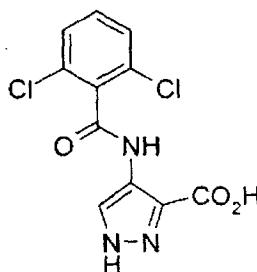
1B. Metil-éster del ácido 4-amino-1H-pirazol-3-carboxílico



Una mezcla del metil-éter del ácido 4-nitro-1H-pirazol-3-carboxílico y Pd al 10 por ciento/C en EtOH, se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno durante 20 horas. La mezcla se filtró a través de un tapón de Celite, se redujo al vacío, y se secó a través de destilación azeotrópica con tolueno, para proporcionar el metil-éster del ácido 4-amino-1H-pirazol-3-carboxílico.

^1H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7.2 (s, 1H), 3.9 (s, 3H).

1C. Ácido 4-(2,6-dicloro-benzoil-amino)-1H-pirazol-3-carboxílico



Se agregó con precaución cloruro de 2,6-dicloro-benzoilo (8.2 gramos; 39.05 milimoles) a una solución de metil-éster del ácido 4-amino-1H-pirazol-3-carboxílico (5 gramos; 35.5 milimoles) y trietilamina (5.95 mililitros; 42.6 milimoles) en dioxano (50 mililitros), y luego se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. La mezcla de reacción se filtró, y el filtrado se trató con metanol (50 mililitros) y

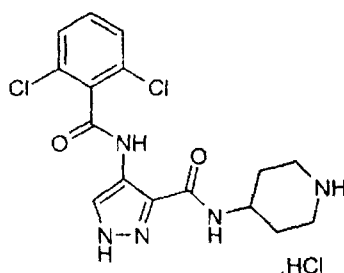
una solución de hidróxido de sodio 2M (100 mililitros), se calentó a 50°C durante 4 horas, y luego se evaporó. Se agregaron 100 mililitros de agua al residuo, y luego se acidificó con ácido clorhídrico concentrado. El sólido se recolectó mediante filtración, se lavó con agua (100 mililitros), y se succionó para secarse, para dar 10.05 gramos del ácido 4-(2,6-dicloro-benzoil-amino)-1H-pirazol-3-carboxílico como un sólido color violeta pálido. (LC/MS: R_f 2.26, $[M+H]^+$ 300/302).

1D. Terbutil-éster del ácido 4-[[4-(2,6-dicloro-benzoil-amino)-1H-pirazol-3-carbonil]-amino]-piperidin-1-carboxílico

Una mezcla del ácido 4-(2,6-dicloro-benzoil-amino)-1H-pirazol-3-carboxílico (6.5 gramos, 21.6 milimoles), 4-amino-1-BOC-piperidina (4.76 gramos, 23.8 milimoles), EDC (5.0 gramos, 25.9 milimoles) y HOBt (3.5 gramos, 25.9 milimoles) en dimetil-formamida (75 mililitros), se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. La mezcla de reacción se redujo al vacío, y el residuo se dividió entre acetato de etilo (100 mililitros) y una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (100 mililitros). La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó ($MgSO_4$), y se redujo al vacío. El residuo se recuperó en MeOH al 5 por ciento-DCM (aproximadamente 30 mililitros). El material insoluble se recolectó mediante filtración y se lavó con DCM, y luego se secó al vacío para dar el terbutil-éster del ácido 4-[[4-(2,6-dicloro-benzoil-amino)-1H-pirazol-3-carbonil]-amino]-piperidin-1-carboxílico (5.38 gramos) como un sólido blanco. El filtrado se redujo al vacío, y el residuo se purificó mediante

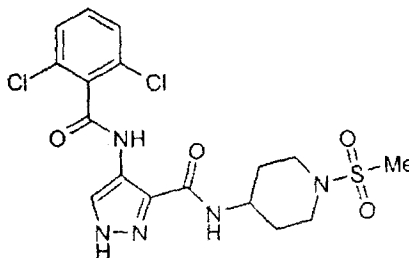
cromatografía en columna utilizando una elución de gradiente de 1:2 de EtOAc/hexano hasta EtOAc, para dar terbutil-éster del ácido 4-{{4-(2,6-dicloro-benzoyl-amino)-1H-pirazol-3-carbonil]-amino}-piperidin-1-carboxílico adicional (2.54 gramos) como un sólido blanco.

1E. Clorhidrato de piperidin-4-ilamida del ácido 4-(2,6-dicloro-benzoyl-amino)-1H-pirazol-3-carboxílico



Una solución del terbutil-éster del ácido 4-{{4-(2,6-dicloro-benzoyl-amino)-1H-pirazol-3-carbonil]-amino}-piperidin-1-carboxílico (7.9 gramos) en MeOH (50 mililitros) y EtOAc (50 mililitros) se trató con HCl saturado-EtOAc (40 mililitros), y luego se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El producto no se cristalizó debido a la presencia del metanol, y por consiguiente, la mezcla de reacción se evaporó, y el residuo se trituroó con EtOAc. El sólido grisáceo resultante se recolectó mediante filtración, se lavó con EtOAc, y se succionó para secarse en el sinterizador, para dar 6.3 gramos de la piperidin-4-ilamida del ácido 4-(2,6-dicloro-benzoyl-amino)-1H-pirazol-3-carboxílico como la sal de clorhidrato. (LC/MS: R_f 5.89, $[M+H]^+$ 382/384).

1F. (1-metansulfonil-piperidin-4-il)-amida del ácido 4-(2,6-dicloro-benzoil-amino)-1H-pirazol-3-carboxílico

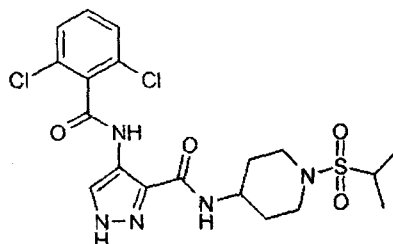


A una mezcla de clorhidrato de piperidin-4-ilamida del ácido 4-(2,6-dicloro-benzoil-amino)-1H-pirazol-3-carboxílico (1 milimoles) en acetonitrilo (10 mililitros) se le agrega di-isopropil-etil-amina (2.2 milimoles) seguido por el cloruro de metansulfonilo (1 milimol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 16 horas, luego se redujo al vacío. El residuo se dividió entre acetato de etilo y agua, las capas se separaron y la porción orgánica se lavó con salmuera, se secó (MgSO_4) y se redujo al vacío para dar el compuesto del título. $[\text{M}+\text{H}]^+$ 460 R_t 2.67. Temperatura ambiente LC/MS 2.67 minutos; m/z 460.11.

^1H RMN: (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 13.51 (s, 1H), 10.20 (s, 1H), 8.50 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.41 (s, 1H), 7.66 - 7.56 (m, 3H), 3.95 - 3.89 (m, 1H), 3.61 (d, $J = 12.0$ Hz, 2H), 2.92 (s, 3H), 2.84 (t, $J = 12.0$ Hz, 2H), 1.89 - 1.86 (m, 2H), 1.79 - 1.70 (m, 2H).

EJEMPLO 2

(1-isopropil-sulfonil-piperidin-4-il)-amida del ácido 4-(2,6-dicloro-benzoil-amino)-1H-pirazol-3-carboxílico

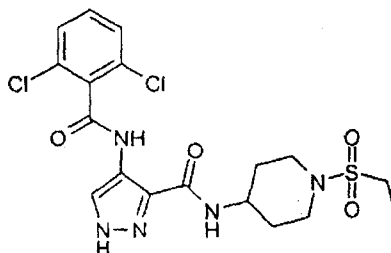


5 El compuesto del título se preparó mediante los métodos descritos en el Ejemplo 1, pero utilizando cloruro de isopropil-sulfonilo en lugar de cloruro de metan-sulfonilo, y se purificó mediante LC/MS de preparación. Temperatura ambiente 2.83 minutos; m/z 488.22.

10 ^1H RMN: (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.42 (s, 1H), 10.16 (s, 1H), 8.46 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.35 (s, 1H), 7.60 - 7.51 (m, 3H), 3.92 - 3.87 (m, 1H), 3.65 (d, J = 12.0 Hz, 2H), 3.35 - 3.27 (m, 1H), 2.95 (t, J = 12.0 Hz, 2H), 1.80 - 1.76 (m, 2H), 1.66 - 1.59 (m, 2H), 1.22 (d, J = 8.0 Hz, 6H).

15 EJEMPLO 3

(1-etil-sulfonil-piperidin-4-il)-amida del ácido 4-(2,6-dicloro-benzoil-amino)-1H-pirazol-3-carboxílico



20

El compuesto del título se preparó mediante los métodos descritos en el Ejemplo 1, pero utilizando cloruro de etilsulfonilo en lugar de cloruro de metil-sulfonilo, y se purificó mediante cromatografía en columna, eluyendo con P.E.-EtOAc (1:1 - 0:1).

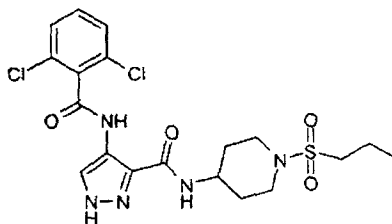
25

Temperatura ambiente LC/MS 2.74 minutos; m/z 474.17.

^1H RMN: (400 MHz, DMSO- d_6) 13.45 (s, 1H), 10.17 (s, 1H), 8.51 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.60 - 7.51 (m, 3H), 3.91 - 3.85 (m, 1H), 3.61 (d, J = 12.0 Hz, 2H), 3.04 (q, J = 8.0 Hz, 2H), 2.86 (t, J = 12.0 Hz, 2H), 1.80 - 1.78 (m, 2H), 1.69 - 1.60 (m, 2H), 1.21 (t, J = 8.0 Hz, 3H).

EJEMPLO 4

(1-propil-sulfonil-piperidin-4-il)-amida del ácido 4-(2,6-dicloro-benzoil-amino)-1H-pirazol-3-carboxílico



El compuesto del título se preparó mediante los métodos descritos en el Ejemplo 1, pero utilizando cloruro de propan-sulfonilo en lugar de cloruro de metan-sulfonilo, y se purificó mediante LC/MS de preparación. Temperatura ambiente 3.11 minutos; m/z 488.18.

^1H RMN: (400 MHz, DMSO- d_6) 13.42 (s, 1H), 10.15 (s, 1H), 8.46 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.36 (s, 1H), 7.60 - 7.51 (m, 3H), 3.91 - 3.84 (m, 1H), 3.60 (d, J = 12.0 Hz, 2H), 3.00 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 2.85 (t, J = 12.0 Hz, 2H), 1.82 - 1.78 (m, 2H), 1.72 - 1.62 (m, 4H), 0.99 (t, J = 8.0 Hz, 3H).

ACTIVIDAD BIOLÓGICA

EJEMPLO 5

Medición de CDK2 Activada/Ensayo de Actividad Inhibidora de

Cinasa de Ciclina A (IC₅₀)

Se probaron los compuestos de la invención para determinar la actividad inhibidora de cinasa, empleando el siguiente protocolo.

La CDK2 activada/ciclina A (Brown y colaboradores, *Nat. Cell Biol.*, 1, páginas 438-443, 1999; Lowe, E.D. y colaboradores, *Biochemistry*, 41, páginas 15625-15634, 2002) se diluye hasta 125pM en regulador de ensayo con una concentración de 2.5X (MOPS 50 mM, pH de 7.2, β -glicerofosfato 62.5 mM, EDTA 12.5 mM, $MgCl_2$ 37.5 mM, ATP 112.5 mM, DTT 2.5 mM, ortovanadato de sodio 2.5 mM, 0.25 miligramos/mililitro de albúmina de suero bovino), y 10 microlitros mezclados con 10 microlitros de mezcla de sustrato de histona (60 microlitros de histona bovina H1 (Upstate Biotechnology, 5 miligramos/mililitro), 940 microlitros de H_2O , 35 μCi $\gamma^{33}P$ -ATP), y se agregan a placas de 96 pozos junto con 5 microlitros de diferentes diluciones del compuesto de prueba en sulfóxido de dimetilo (hasta el 2.5 por ciento). La reacción se deja proceder durante 2 a 4 horas antes de detenerse con un exceso de ácido ortofosfórico (5 microlitros al 2 por ciento). El $\gamma^{33}P$ -ATP que queda sin incorporarse en la histona H1, se separa de la histona H1 fosforilada sobre una placa de filtro Millipore MAPH. Los pozos de la placa MAPH se humedecen con ácido ortofosfórico al 0.5 por ciento, y luego se filtran los resultados de la reacción con una unidad de filtración al vacío Millipore a través de los pozos. En seguida de la filtración, el residuo se lava dos veces con 200 microlitros de ácido ortofosfórico al 0.5 por ciento. Una vez que se secan los filtros, se agregan 20

microlitros de cintilador Microscint 20, y entonces se cuentan en un Packard TopCount durante 30 segundos.

Se calcula el porcentaje de inhibición de la actividad de CDK2, y se grafica con el objeto de determinar la concentración del compuesto de prueba requerida para inhibir el 50 por ciento de la actividad de CDK2 (IC_{50}).

EJEMPLO 6

Medición de CDK1 Activada/Ensayo de Actividad Inhibidora de Cinasa de Ciclina B (IC_{50})

El ensayo de CDK1/ciclina B es idéntico al de CDK2/ciclina A anterior, excepto que se utiliza CDK1/ciclina B (Upstate Discovery), y la enzima se diluye hasta 6.25 nM.

Los compuestos de la invención tienen valores IC_{50} menores de 20 μ M, o proporcionan una inhibición de cuando menos el 50 por ciento de la actividad de CDK2 en una concentración de 10 μ M. Los compuestos preferidos de la invención tienen valores IC_{50} menores que 1 μ M en el ensayo de CDK2 ó CDK1.

Ejemplo 7

Ensayo de la Actividad Inhibidora de Cinasa GSK3- β

La GSK3- β (Upstate Discovery) se diluye hasta 7.5 nM en MOPS 25 mM, pH de 7.00, 25 miligramos/mililitro de albúmina de suero bovino, Brij-35 al 0.0025 por ciento, glicerol al 1.25 por ciento, EDTA 0.5 mM, $MgCl_2$ 25 mM, β -mercaptoetanol al 0.025 por ciento, ATP 37.5 mM, y 10 microlitros mezclados con 10 microlitros de mezcla de sustrato. La mezcla de sustrato para GSK3- β es de

péptido-2 de sintasa de fosfo-glicógeno (Upstate Discovery) en 1 mililitro de agua con 35 μCi $\gamma^{33}\text{P}$ -ATP. La enzima y el sustrato se agregan a placas de 96 pozos, junto con 5 microlitros de diferentes diluciones del compuesto de prueba en sulfóxido de dimetilo (hasta el 2.5 por ciento). La reacción se deja proceder durante 3 horas (GSK3- β) antes de detenerse con un exceso de ácido orto-fosfórico (5 microlitros al 2 por ciento). El procedimiento de filtración es como para el ensayo de CDK2 activada/ciclina A anterior.

EJEMPLO 8

Actividad Anti-proliferativa

Las actividades anti-proliferativas de los compuestos de la invención se pueden determinar midiendo la capacidad de los compuestos para inhibir el crecimiento celular en un número de líneas celulares. La inhibición del crecimiento celular se mide utilizando el ensayo Alamar Blue (Nociari, M. M. Shalev, A., Bernias, P., Russo, C. *Journal of Immunological Methods* 1998, 213, 157-167). El método se basa en la capacidad de las células viables para reducir la resazurina hasta su producto fluorescente de resorufina. Para cada ensayo de proliferación, las células se aplican a placas de 96 pozos, y se dejan recuperarse durante 16 horas antes de la adición de los compuestos inhibidores durante 72 horas adicionales. Al final del período de incubación, se agrega Alamar Blue al 10 por ciento (volumen/volumen), y se incuba durante 6 horas adicionales antes de la determinación del producto fluorescente a 535 nanómetros de excitación/590 nanómetros de emisión. En el caso del

ensayo de células no proliferativas, las células se mantienen en una confluencia durante 96 horas antes de la adición de los compuestos inhibidores durante 72 horas adicionales. El número de células viables se determina mediante el ensayo de Alamar Blue como antes.

5 Las líneas celulares se pueden obtener en ECACC (European Collection of Cell Cultures (Colección Europea de Cultivos Celulares)).

En particular, los compuestos de la invención se probaron con la línea celular HCT-116 (ECACC Referencia: 91091005) derivada de
10 carcinoma de colon humano.

Se encontró que muchos compuestos de la invención tienen valores IC_{50} menores a 20 μM en este ensayo, y los compuestos preferidos tienen valores IC_{50} menores a 1 μM .

EJEMPLO 9

Determinación de la Biodisponibilidad Oral

La biodisponibilidad oral de los compuestos de la Fórmula (I) se puede determinar como sigue.

El compuesto de prueba se administra como una solución tanto intravenosamente como oralmente a ratones balb/C, en el siguiente
20 nivel de dosis y en las siguientes formulaciones de dosis:

- 1 miligramo/kilogramo del IV formulado en sulfóxido de dimetilo al 10 por ciento/(2-hidroxi-propil)- β -ciclodextrina al 90 por ciento (25 por ciento en peso/volumen); y
- 5 miligramos/kilogramo de PO formulado en sulfóxido de dimetilo al 10 por ciento/agua al 20 por ciento/PEG200 al 70 por
25

ciento.

En diferentes puntos del tiempo después de la dosificación, se toman muestras de sangre en tubos heparinizados, y se recolecta la fracción de plasma para el análisis. El análisis se lleva a cabo mediante LC-MS/MS después de la precipitación de la proteína, y las muestras se cuantifican mediante su comparación con una línea de calibración estándar construida para el compuesto de prueba. El área debajo de la curva (AUC) se calcula a partir del nivel de plasma contra el perfil de tiempo mediante métodos convencionales. La biodisponibilidad oral se calcula como un porcentaje a partir de la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{AUCpo}}{\text{AUCiv}} \times \frac{\text{dosisIV}}{\text{dosisPO}} \times 100$$

Seguiendo este protocolo, el compuesto (1-metan-sulfonil-piperidin-4-il)-amida del ácido 4-(2,6-dicloro-benzoil-amino)-1H-pirazol-3-carboxílico se encontró que tiene del 40 al 50 por ciento de biodisponibilidad cuando se administra a ratones mediante la ruta oral.

EJEMPLO 10

Estudios Xenográficos

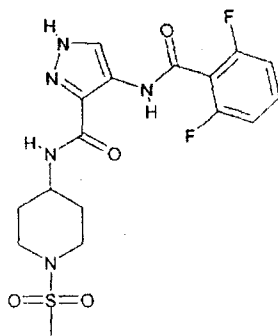
El compuesto del Ejemplo 1 tiene una acción anti-tumoral en ratones sin pelo injertados con líneas celulares derivadas de tumor humano. El tratamiento con el compuesto del Ejemplo 1 provoca una inhibición del crecimiento tumoral en los xenoinjertos implantados

subcutáneamente, cuando se dosifica oralmente en dosis que provoquen la inhibición de los biomarcadores del tumor. Estos biomarcadores incluyen la supresión de la fosforilación de los sustratos de las cinasas dependientes de ciclina, por ejemplo proteína de retinoblastoma. El compuesto del Ejemplo 1 es efectivo cuando se da en un rango de programas diferentes, incluyendo la dosificación crónica durante varias semanas.

EJEMPLO 11

EJEMPLOS DE COMPARACIÓN

Las actividades biológicas del compuesto del Ejemplo 1, el cual contiene un grupo 2,6-dicloro-fenilo, se compararon con las actividades biológicas de su 2,6-difluoro-fenilo análogo. El 2,6-difluoro-fenilo análogo, el cual se describe en el Ejemplo 131 en nuestra solicitud anterior número PCT/GB2004/003179 (publicación número WO 2005/012256), tiene la siguiente estructura:



Más particularmente, los compuestos se compararon con respecto a sus actividades contra cinasa CDK2 y cinasa GSK3 y su habilidad para inhibir la proliferación de células de cáncer de colón humano HCT-116. Las actividades inhibitoras de cinasa y la

127

actividad inhibidora HCT-116 se determinaron utilizando los métodos de ensayo especificados anteriormente, y los resultados se muestran en la tabla siguiente.

5		Compuestos de la Técnica Anterior (Ejemplo 131 de la PCT/GB2004/003179)	Compuesto del Ejemplo 1
	CDK2 IC ₅₀	0.0022 uM	43% @ 0.0003 µM
10	GSK3β IC ₅₀	0.014 uM	0.22 µM
	Proliferación de celular HCT-116 IC ₅₀	0.74 uM	0.11 µM

El compuesto del Ejemplo 1 de la presente solicitud tiene ventajas sobre el compuesto de su difluoro análogo por las siguientes razones:

• El compuesto del Ejemplo 1 tiene un efecto antiproliferativo de 6 a 7 veces más potente en la línea celular de cáncer de colon humano HCT-116, cuando se compara con su difluoro análogo.

• El compuesto del Ejemplo 1 tiene mayor actividad inhibidora de cinasa (CDK2) *in vitro* comparado con su difluoro análogo.

• El compuesto del Ejemplo 1 tiene menor actividad en contra de GSK3β (0.22 µM) que su difluoro análogo (0.014 µM).

127

- El compuesto del Ejemplo 1 tiene mayor selectividad para la inhibición CDK sobre GSK3 μ (mayor de 200 veces) comparado con su difluoro análogo (aproximadamente 6 veces).

FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

5 **EJEMPLO 12**

(I) Formulación de Tableta

Se prepara una composición de tableta que contiene un compuesto de la Fórmula (I), mezclando 50 miligramos del compuesto con 197 miligramos de lactosa (BP) como diluyente, y 3
10 miligramos de estearato de magnesio como lubricante, y se comprime para formar una tableta de una manera conocida.

(ii) Formulación de Cápsula

Se prepara una formulación de cápsula mezclando 100 miligramos de un compuesto de la Fórmula (I) con 100 miligramos de
15 lactosa, y llenando con la mezcla resultante cápsulas de gelatina dura opacas estándares.

(iii) Formulación Inyectable I

Se puede preparar una composición parenteral para administrarse mediante inyección, mediante la disolución de un
20 compuesto de la Fórmula (I) (por ejemplo, en una forma de sal) en agua conteniendo propilenglicol al 10 por ciento, para dar una concentración del compuesto activo del 1.5 por ciento en peso. Luego la solución se esteriliza mediante filtración, se llena en una ampolleta, y se sella.

129

(iv) Formulación Inyectable II

Se prepara una composición parenteral para inyección disolviendo en agua un compuesto de la Fórmula (I) (por ejemplo, en forma de sal) (2 miligramos/mililitro) y manitol (50 miligramos/mililitro), se filtra estéril la solución, y se llena en frascos o ampollitas sellables de 1 mililitro.

(v) Formulación Inyectable III

Se puede preparar una formulación para el suministro por inyección o infusión intravenosa, disolviendo el compuesto de la Fórmula (I) (por ejemplo, en una forma de sal) en agua a 20 miligramos/mililitro. Luego se sella el frasco y se esteriliza mediante su paso por autoclave.

(vi) Formulación Inyectable IV

Se puede preparar una formulación para el suministro por inyección o infusión intravenosa, disolviendo el compuesto de la Fórmula (I) (por ejemplo, en una forma de sal) en agua conteniendo un regulador (por ejemplo, acetato 0.2 M, pH de 4.6) a 20 miligramos/mililitro. Luego se sella el frasco y se esteriliza mediante su paso por autoclave.

(vii) Formulación de Inyección Subcutánea

Se prepara una composición para la administración subcutánea, mezclando un compuesto de la Fórmula (I) con aceite de maíz de grado farmacéutico, para dar una concentración de 5 miligramos/mililitro. La composición se esteriliza y se llena en un recipiente adecuado.

129

(viii) Formulaci3n Liofilizada

Se ponen al3cuotas del compuesto formulado de la F3rmula (I) en frascos de 50 mililitros, y se liofilizan. Durante la liofilizaci3n, las composiciones se congelan utilizando un protocolo de congelaci3n de un paso a (-45°C). La temperatura se eleva hasta -10°C para el templado, luego se baja hasta la congelaci3n a -45°C, seguido por un secado primario a +25°C durante aproximadamente 3,400 minutos, seguido por un secado secundario con pasos incrementados de la temperatura hasta 50°C. La presi3n durante el secado primario y secundario se establece en 80 militor.

(ix) Formulaci3n de Soluci3n S3lida

El compuesto de la F3rmula (I) se disuelve en diclorometano/etanol (1:1) en una concentraci3n del 5 al 50 por ciento (por ejemplo, del 16 3 del 20 por ciento), y la soluci3n se seca por pulverizaci3n empleando las condiciones correspondientes a las estipuladas en la siguiente tabla. Los datos que se dan en la tabla incluyen la concentraci3n del compuesto del Ejemplo 1, la temperatura de entrada y de salida de la secadora por pulverizaci3n, el rendimiento total de s3lido secado por pulverizaci3n (ensayo), y la distribuci3n de tama3o parcial (P.S.D.) de las part3culas que forman el s3lido secado por pulverizaci3n.

131

5

Lote	Solución concentrada en peso/vol	Tempe- ratura de entrada	Tempe- ratura de salida	rendi- miento %	ensayo (mg/g)	PDS (inter- valo) (μ m)
BR1A	16%	140°C	80°C	87.00	246.41	4.46 - 52.76
BR1B	16%	180°C	80°C	97.00	246.65	14.83 - 91.70
BR2A	20%	160°C	80°C	99.40	239.60	15,86 - 85.01
BR2B	20%	180°C	100°C	79.50	246.64	15,09 - 91.84

10

15

La solución sólida del compuesto del Ejemplo 1 y PVP, se puede llenar directamente en cápsulas de gelatina dura o de HPMC (hidroxi-propil-metil-celulosa), o se puede mezclar con excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de volumen, derrapantes, o dispersantes. Las cápsulas podrían contener al compuesto del Ejemplo 1 en cantidades de entre 2 miligramos y 200 miligramos, por ejemplo de 10, 20, y 80 miligramos.

20

EJEMPLO 13

Determinación de la Actividad Antifúngica

25

Se puede determinar la actividad antifúngica de los compuestos de la Fórmula (I), empleando el siguiente protocolo.

131

Los compuestos se prueban contra un panel de hongos, incluyendo *Candida parpsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans*-ATCC 36082, y *Cryptococcus neoformans*.

Los organismos de prueba se mantienen sobre placas de ágar-dextrosa Sabourahd a 4°C. Se preparan suspensiones individuales de cada organismo, cultivando la levadura durante la noche a 27°C sobre un tambor giratorio, en un caldo base de levadura-nitrógeno (YNB) con aminoácidos (Difco, Detroit, Mich.), pH de 7.0, con ácido morfolin-propansulfónico 0.05 M (MOPS). Luego la suspensión se centrifuga y se lava dos veces con NaCl al 0.85 por ciento antes de sonicar la suspensión celular lavada durante 4 segundos (Sonicador Branson, modelo 350, Danbury, Conn.). Se cuentan las blastoesporas individuales en un hemocitómetro, y se ajustan hasta la concentración deseada en NaCl al 0.85 por ciento.

La actividad de los compuestos de prueba se determina utilizando una modificación de una técnica de microdilución de caldo. Los compuestos de prueba se diluyen en sulfóxido de dimetilo hasta una proporción de 1.0 miligramos/mililitro, luego se diluyen hasta 64 microgramos/mililitro en caldo YNB, pH de 7.0, con MOPS (se utiliza fluconazol como el control), para proporcionar una solución de trabajo de cada compuesto. Utilizando una placa de 96 pozos, se preparan los pozos 1 y 3 a 12 con caldo YNB, se hacen diluciones de 10 veces de la solución del compuesto en los pozos 2 a 11 (los intervalos de concentración son de 64 a 0.125 microgramos/mililitro). El pozo 1 sirve como un control de esterilidad y en blanco para los

133

ensayos espectrofotométricos. El pozo 12 sirve como un control de crecimiento. Las placas de microtitulación se inoculan con 10 microlitros en cada uno de los pozos 2 a 11 (el tamaño de inóculo final es de 10^4 organismos/mililitro). Las placas inoculadas se incuban durante 48 horas a 35°C . Los valores IC_{50} se determinan espectrofotométricamente midiendo la absorbencia a 420 nanómetros (Lector de Microplacas Automático, DuPont Instruments, Wilmington, Del.) después de la agitación de las placas durante 2 minutos con una mezcladora de vórtex (Mezcladora Vorte-Genie 2, Scientific Industries, Inc., Bolemia, N.Y.). El punto final de la IC_{50} se define como la concentración más baja de fármaco que exhibe una reducción de aproximadamente el 50 por ciento (o más) del crecimiento, comparándose con el pozo de control. Con el ensayo de turbidez, esto se define como la concentración más baja de fármaco en la cual la turbidez en el pozo es <50 por ciento del control (IC_{50}). Las Concentraciones Citolíticas Mínimas (MCC) se determinan subcultivando todos los pozos de la placa de 96 pozos sobre una placa de Agar-Dextrosa Sabourahd (SDA), incubando durante 1 a 2 días a 35°C , y luego verificando la viabilidad.

EJEMPLO 14

Protocolo para la Evaluación Biológica del Control de Infección Fúngica de Planta Entera *in vivo*

Los compuestos de la Fórmula (I) se disuelven en acetona, con diluciones en serie subsecuentes en acetona, para obtener un rango de concentraciones deseadas. Los volúmenes de tratamiento finales

133

se obtienen agregando 9 volúmenes de Tween-20^{MR} acuoso al 0.05 por ciento, o Triton X-100^{MR} al 0.01 por ciento, dependiendo del patógeno.

5 Luego se utilizan las composiciones para probar la actividad de los compuestos de la invención contra el añublo de jitomate (*Phytophthora infestans*) utilizando el siguiente protocolo. Se cultivan jitomates (cultivo Rutgers) a partir de semillas en una mezcla para macetas basadas en turba sin tierra, hasta que las plántulas sean de 10 a 20 centímetros de alto. Luego las plantas se rocían hasta
10 escurrir con el compuesto de prueba, a un índice de 100 partes por millón. Después de 24 horas, las plantas de prueba se inoculan rociándolas con una suspensión acuosa de esporangios de *Phytophthora infestans*, y se mantienen en una cámara de rocío durante la noche. Entonces las placas se transfieren al invernadero
15 hasta que se desarrolla la enfermedad en las plantas de control no tratadas.

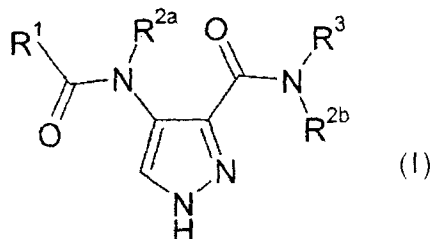
También se emplean protocolos similares para probar la actividad de los compuestos de la invención para combatir el óxido café del trigo (*Puccinia*), el moho polvoso de trigo (*Erysiphe
20 vraminis*), trigo (cultivo Monon), añublo de hoja de trigo (*Septoria tritici*), y mancha Glume de trigo (*Leptosphaeria nodorum*).

Equivalentes

Los ejemplos anteriores se presentan para propósitos de ilustrar la invención, y no deben interpretarse para imponer limitación
25 alguna sobre el alcance de la invención. Será fácilmente aparente

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la Fórmula (I):



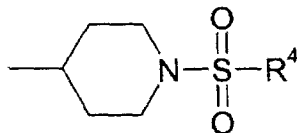
o una sal, tautómero, N-óxido, o solvato del mismo,

en donde:

R¹ es 2,6-diclorofenilo;

R^{2a} y R^{2b} son ambos hidrógeno;

y R³ es un grupo:



en donde R⁴ es alquilo de 1 a 4 átomos de carbono.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R⁴ es alquilo de 1 a 3 átomos de carbono.

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en donde R⁴ es metilo.

4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en donde R⁴ es etilo.

5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en donde R⁴ es propilo normal.

6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en

donde R⁴ es isopropilo.

7. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, los cuales no están en la forma de una sal o N-óxido.

5 8. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la forma de una sal, un solvato, ó N-óxido.

9. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para utilizarse en la profilaxis o el tratamiento de un estado de enfermedad o condición mediada por una cinasa dependiente de ciclina ó por una cinasa-3 de sintasa de glicógeno.

10 10. Un método para la profilaxis o el tratamiento de un estado de enfermedad o condición mediada por una cinasa dependiente de ciclina o cinasa-3 de sintasa de glicógeno, cuyo método comprende administrar a un sujeto que lo necesite, un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

11. Un método para aliviar o reducir la incidencia de un estado de enfermedad o condición mediada por una cinasa dependiente de ciclina o cinasa-3 de sintasa de glicógeno, cuyo método comprende administrar a un sujeto que lo necesite, un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

20 12. Un método para el tratamiento de una enfermedad o condición que comprende o se presenta a partir de un crecimiento celular anormal en un mamífero, cuyo método comprende administrar al mamífero un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en una cantidad efectiva para inhibir el

25

crecimiento celular anormal.

13. Un método para aliviar o reducir la incidencia de una enfermedad o condición que comprende o se presenta a partir del crecimiento celular anormal en un mamífero, cuyo método comprende
5 administrar al mamífero un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en una cantidad efectiva para inhibir el crecimiento celular anormal.

14. Un método para el tratamiento de una enfermedad o condición que comprende o se presenta a partir del crecimiento
10 celular anormal en un mamífero, comprendiendo el método administrar al mamífero un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en una cantidad efectiva para inhibir la actividad de una cinasa cdk (tal como cdk1 ó cdk2) o de cinasa-3 de sintasa de glicógeno.

15 15. Un método para aliviar o reducir la incidencia de una enfermedad o condición que comprende o se presenta a partir del crecimiento celular anormal en un mamífero, comprendiendo el método administrar al mamífero un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en una cantidad efectiva
20 para inhibir la actividad de una cinasa cdk (tal como cdk1 ó cdk2) o de cinasa-3 de sintasa de glicógeno.

16. Un método para inhibir una cinasa dependiente de ciclina o una cinasa-3 de sintasa de glicógeno, cuyo método comprende poner en contacto la cinasa con un compuesto inhibidor de cinasa de
25 acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

17. Un método para modular un proceso celular (por ejemplo, la división celular), mediante la inhibición de la actividad de una cinasa dependiente de ciclina o de una cinasa-3 de sintasa de glicógeno, utilizando un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

18. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para utilizarse en la profilaxis o el tratamiento de un estado de enfermedad, como se describe en la presente.

19. El uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para la fabricación de un medicamento, en donde el medicamento es para cualquiera o más de los usos definidos en la presente.

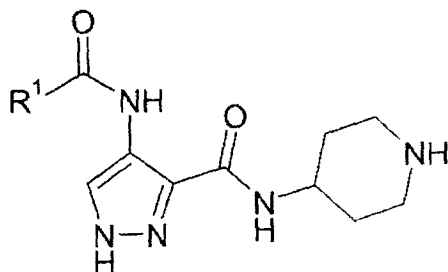
20. Una composición farmacéutica, la cual comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

21. Una composición farmacéutica, la cual comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en una forma adecuada para administración oral.

22. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para utilizarse en medicina.

23. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para cualquiera de los usos y métodos estipulados anteriormente, y como se describe en cualquiera otra parte de la presente.

24. Un proceso para la preparación de un compuesto como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, cuyo proceso comprende la reacción de un compuesto de la fórmula (XVII):



un agente de sulfonilación (por ejemplo un cloruro de sulfonilo, tal como cloruro de metan-sulfonilo) adecuado para introducir el grupo SO₂R⁴.

25. Un método para el diagnóstico y el tratamiento de un estado o condición de enfermedad mediada por una cinasa dependiente de ciclina, cuyo método comprende: (i) rastrear a un paciente para determinar si una enfermedad o condición de la que esté o pueda estar sufriendo el paciente, es una que sería susceptible al tratamiento con un compuesto que tenga actividad contra las cinasas dependientes de ciclina; y (ii) en donde se indique que la enfermedad o condición de la que está sufriendo el paciente es así susceptible, administrar posteriormente al paciente un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

26. El uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de un estado o condición de enfermedad en un paciente que se haya rastreado y que se haya determinado que está sufriendo de, o que esté en riesgo de sufrir de, una

enfermedad o condición que sería susceptible al tratamiento con un compuesto que tenga actividad contra la cinasa dependiente de ciclina.

27. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para utilizarse en la inhibición del crecimiento tumoral en un mamífero.

28. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para utilizarse en la inhibición del crecimiento de células tumorales (por ejemplo, en un mamífero).

29. Un método para inhibir el crecimiento tumoral en un mamífero (por ejemplo, un ser humano), cuyo método comprende administrar al mamífero (por ejemplo, un ser humano), una cantidad inhibidora del crecimiento tumoral efectiva de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

30. Un método para inhibir el crecimiento de células tumorales (por ejemplo, las células tumorales presentes en un mamífero, tal como un ser humano), cuyo método comprende poner en contacto las células tumorales con una cantidad inhibidora del crecimiento de células tumorales efectiva de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
27 July 2006 (27.07.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/077416 A1

(51) International Patent Classification:
C07D 401/14 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
A61K 31/44 (2006.01) **A01N 43/56** (2006.01)

James [GB/GB]; 436 Cambridge Science Park, Milton
Road, Cambridge CB4 0QA (GB).

(21) International Application Number:
PCT/GB2006/000193

(74) Agent: HUTCHINS, Michael, Richard; M.R. Hutchins
& Co., 23 Mount Sion, Tunbridge Wells, Kent TN1 1TZ
(GB).

(22) International Filing Date: 20 January 2006 (20.01.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/646,217 21 January 2005 (21.01.2005) US
0501480.8 22 January 2005 (22.01.2005) GB
0501748.8 27 January 2005 (27.01.2005) GB
60/651,339 9 February 2005 (09.02.2005) US

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) Applicant (for all designated States except US): ASTEX
THERAPEUTICS LIMITED [GB/GB]; 436 Cambridge
Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 0QA (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): WYATT, Paul,
Graham [GB/GB]; 436 Cambridge Science Park, Milton
Road, Cambridge CB4 0QA (GB). BERDINI, Valerio
[GB/GB]; 436 Cambridge Science Park, Milton Road,
Cambridge CB4 0QA (GB). GILL, Adrian, Liam
[GB/GB]; 436 Cambridge Science Park, Milton Road,
Cambridge CB4 0QA (GB). TREWARTHA, Gary
[GB/GB]; 436 Cambridge Science Park, Milton Road,
Cambridge CB4 0QA (GB). WOODHEAD, Andrew,

(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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, 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

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: PYRAZOLE DERIVATIVES FOR THE INHIBITION OF CDK'S AND GSK'S

(57) Abstract: The invention provides a compound of the formula (I): or salts, tautomers, solvates and N-oxides thereof; wherein:
R1 is 2,6-dichlorophenyl; R2a and R2 are both hydrogen; and R3 is a group: where R4 is C1-4 alkyl. The compounds have activity
as inhibitors of CDK kinases and inhibit the proliferation of cancer cells.

WO 2006/077416 A1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2006/000193

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D401/14 A61K31/44 A61P35/00 A01N43/56

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 A01N

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, PAJ, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2004/014864 A (ASTEX TECHNOLOGY LIMITED; BERDINI, VALERIO; PADOVA, ALESSANDRO; SAXTY,) 19 February 2004 (2004-02-19) page 1, line 2 - page 1, line 7; claims; examples 30,34,38 -----	1-30

☐ 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.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 March 2006

Date of mailing of the international search report

23/03/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schmid, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2006/000193

Box 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:
Although claims 10-17, 25, 29 and 30 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
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 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:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2006/000193

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004014864 A	19-02-2004	AU 2003255779 A1	25-02-2004
		EP 1534685 A1	01-06-2005
		JP 2006500348 T	05-01-2006

145

145

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/GB2006/000193

From the INTERNATIONAL BUREAU.....

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

HUTCHINS, Michael, Richard
M.R. Hutchins & Co.
23 Mount Sion
Tunbridge Wells
Kent TN1 1TZ
ROYAUME-UNI

Date of mailing (day month year) 03 March 2006 (03.03.2006)	
Applicant's or agent's file reference AST36(WO)	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/GB2006/000193	International filing date (day month year) 20 January 2006 (20.01.2006)
International publication date (day month year) Not yet published	Priority date (day month year) 21 January 2005 (21.01.2005)
Applicant ASTEX THERAPEUTICS LIMITED et al	

- By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- (If applicable)* The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- (If applicable)* An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
21 January 2005 (21.01.2005)	60/646,217	US	21 February 2006 (21.02.2006)
22 January 2005 (22.01.2005)	0501480.8	GB	21 February 2006 (21.02.2006)
27 January 2005 (27.01.2005)	0501748.8	GB	03 February 2006 (03.02.2006)
09 February 2005 (09.02.2005)	60/651,339	US	21 February 2006 (21.02.2006)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Carlos Roy - Gijsbertus Beijer

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Facsimile No. +41 22 740 14 35

Telephone No. +41 22 338 95 61

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

FIRST NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF
THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES WHICH
DO NOT APPLY THE 30 MONTH TIME LIMIT
UNDER ARTICLE 22(1))

(PCT Rule 47.1(c))

To:

RECEIVED

31 AUG 2006

HUTCHINS, Michael, Richard
M.R. Hutchins & Co.
23 Mount Sion
Tunbridge Wells
Kent TN1 1TZ
ROYAUME-UNI

Date of mailing (day/month/year) 24 August 2006 (24.08.2006)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference AST36(WO)			
International application No. PCT/GB2006/000193	International filing date (day/month/year) 20 January 2006 (20.01.2006)	Priority date (day/month/year) 21 January 2005 (21.01.2005)	
Applicant ASTEX THERAPEUTICS LIMITED et al			

ATTENTION: For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), **does apply**, please see Form PCT/IB/308(Second and Supplementary Notice) (to be issued promptly after the expiration of 28 months from the priority date).

2. Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does not apply**, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93bis.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
27 July 2006 (27.07.2006)

CH

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

3. The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does not apply**, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93bis.1:

LU, SE, TZ, UG, ZM

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.

4. TIME LIMITS for entry into the national phase

For the designated Office(s) listed above, and unless a demand for international preliminary examination has been filed before the expiration of **19 months** from the priority date (see Article 39(1)), the applicable time limit for entering the national phase will, **subject to what is said in the following paragraph**, be **20 MONTHS** from the priority date.

In practice, **time limits other than the 20-month time limit** will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated Offices listed above. For **regular updates on the applicable time limits** (20 or 21 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

It is the applicant's **sole responsibility** to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Nora Lindner
Facsimile No. +41 22 338 82 70	e-mail: pt02@wipo.int

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTSECOND AND SUPPLEMENTARY NOTICE
INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES
WHICH APPLY THE 30 MONTH TIME
LIMIT UNDER ARTICLE 22(1))

(PCT Rule 47.1(c))

To:

HUTCHINS, Michael, Richard
M.R. Hutchins & Co.
23 Mount Sion
Tunbridge Wells
Kent TN11 1TZ
ROYAUME-UNI**RECEIVED**

31 MAY 2007

Date of mailing (day/month/year)
24 May 2007 (24.05.2007)Applicant's or agent's file reference
AST36(WO)**IMPORTANT NOTICE**International application No.
PCT/GB2006/000193International filing date (day/month/year)
20 January 2006 (20.01.2006)Priority date (day/month/year)
21 January 2005 (21.01.2005)

Applicant

ASTEX THERAPEUTICS LIMITED et al

1. **ATTENTION:** For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), **does not apply**, please see Form PCT/IB/308(First Notice) issued previously.

2. Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does apply**, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93bis.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
27 July 2006 (27.07.2006)

AU, AZ, BY, CN, CO, DZ, EP, HU, KG, KP, KR, MD, MK, MZ, NA, NG, PG, RU, SY, TM, US

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

3. The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does apply**, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93bis.1:

AE, AG, AL, AM, AP, AT, BA, BB, BG, BR, BW, BZ, CA, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EA, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KM, KN, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, LY, MA, MG, MN, MW, MX, NI, NO, NZ, OA, OM, PH, PL, PT, RO, SC, SD, SG, SK, SL, SM, TJ, TN, TR, TT, UA, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.

TIME LIMITS for entry into the national phase

For the designated or elected Office(s) listed above, the applicable time limit for entering the national phase will, **subject to what is said in the following paragraph**, be **30 MONTHS** from the priority date.

In practice, **time limits other than the 30-month time limit** will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated or elected Office(s) listed above. For **regular updates on the applicable time limits** (30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

It is the applicant's **sole responsibility** to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Nora Lindner

Facsimile No. +41 22 338 82 70

e-mail: pt02.pct@wipo.int

PATENT COOPERATION TREATY

RECEIVED 44

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

M.R. HUTCHINS & CO.
Attn. Hutchins, Michael R.
23 Mount Sion
Tunbridge Wells
Kent TN1 1TZ
UNITED KINGDOM

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Applicant's or agent's file reference AST36 (WO)	Date of mailing (day/month/year) 23/03/2006
International application No. PCT/GB2006/000193	International filing date (day/month/year) 20/01/2006
Applicant ASTEX THERAPEUTICS LIMITED	

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.
3. ☐ **With regard to the protest** against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:
- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
- ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase **until 30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, **within 20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Eva Brell
--	-------------------------------------

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference AST36 (WO)	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/GB2006/000193	International filing date (day/month/year) 20/01/2006	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 21/01/2005
Applicant ASTEX THERAPEUTICS LIMITED		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III)

4. With regard to the **title**,

- ☐ the text is approved as submitted by the applicant
☒ the text has been established by this Authority to read as follows:

PYRAZOLE DERIVATIVES FOR THE INHIBITION OF CDK'S AND GSK'S

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
 b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

151

104

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2006/000193

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D401/14 A61K31/44 A61P35/00 A01N43/56

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 A01N

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, PAJ, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2004/014864 A (ASTEX TECHNOLOGY LIMITED; BERDINI, VALERIO; PADOVA, ALESSANDRO; SAXTY,) 19 February 2004 (2004-02-19) page 1, line 2 - page 1, line 7; claims; examples 30,34,38 -----	1-30



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

14 March 2006

Date of mailing of the international search report

23/03/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schmid, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2006/000193

153

Box 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:

Although claims 10-17, 25, 29 and 30 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
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 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:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

153

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2006/000193

154

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004014864 A	19-02-2004	AU 2003255779 A1	25-02-2004
		EP 1534685 A1	01-06-2005
		JP 2006500348 T	05-01-2006

PATENT COOPERATION TREATY

155

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/GB2006/000193

International filing date (day/month/year)
20.01.2006

Priority date (day/month/year)
21.01.2005

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
C07D401/14, A61K31/44, A61P35/00, A01N43/56

Applicant
ASTEX THERAPEUTICS LIMITED

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☒ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized Officer

Schmid, A

Telephone No. +49 89 2399-8591



155

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

156
International application No.
PCT/GB2006/000193

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
 - ☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).
2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☐ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☐ in written format
 - ☐ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in computer readable form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

157

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/GB2006/000193

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application,

☒ claims Nos. 10-17,25,29,30

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 10-17,25,29,30 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. . are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.

☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:

the written form

☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

the computer readable form

☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions.

☐ See separate sheet for further details

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/GB2006/000193

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-30
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	1-30
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-9,18-24,26-28
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VII Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

see separate sheet

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

- 1) Claims 10-17, 25, 29 and 30 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

- 1) The present compounds differ from the closest prior art represented by WO-2004/014864 (especially examples 31-36, 61, 63, 69, 77 and 78) in the fact that there exists an indazole ring instead of the present pyrazole one and the present substituent R₁ is missing in the relevant examples of WO-2004/014864.

Accordingly the present subject-matter is novel pursuant to Article 33(2) PCT.

- 2) A skilled person looking for alternative CDK and GSK inhibitors would surely not try to replace an indazole ring by the present pyrazole substituent and additionally use a substituent according to the present group R₁ with a reasonable expectation to obtain compounds exhibiting the desired properties which could be proved by the applicant on pages 66, 132 and 133.

Therefore, the present subject-matter also involves an inventive step with regard to Article 33(3) PCT.

M.R. HUTCHINS & CO

*Chartered Patent Attorneys
European Patent Attorneys
European Trade Mark Attorneys
Registered Trade Mark Agents*

23 Mount Sion
Tunbridge Wells
Kent TN1 1TZ
United Kingdom

Tel: 01892 539659
fax: 01892 528720
e-mail: mail@mrhutchins.com

DATA SHEET AND FILING INSTRUCTIONS

Our Case Reference: AST36

Astex Case Reference: P0058

Novartis Reference: 34647

Please file a new PCT national phase patent application in your country by:

21st July 2007 (30 month deadline)

or

21st August 2007 (31 month deadline)

whichever is applicable, on the basis of the enclosed documents and the following data:

1. International Patent Application Number

PCT/GB2006/000193

2. International Publication Number

WO 2006/077416

3. Applicant

ASTEX THERAPEUTICS LIMITED

436 Cambridge Science Park,
Milton Road,
Cambridge CB4 0QA,
United Kingdom.

A company organised and existing under the laws of England, United Kingdom.

N.B. The International application was filed in the name of Astex Therapeutics Limited but the two UK priority applications were filed in the name of Astex Technology Limited prior to their change of name to Astex Therapeutics Limited on 27th June 2005. If you require a certified copy or notarised/legalised copy of the name change certificate, please let us know.

4. International Filing Date

20 January 2006

5. Convention Priorities (4)

161

161

- | | |
|---|--------------------------------------|
| (1) US provisional patent application US 60/646,217 | Filed: 21 st January 2005 |
| (2) UK Patent Application GB 0501480.8 | Filed: 22 nd January 2005 |
| (3) UK Patent Application GB 0501748.8 | Filed: 27 th January 2005 |
| (4) US provisional patent application US 60/651,339 | Filed: 9 th February 2005 |

6. Inventors

- (1) Valerio BERDINI, an Italian citizen
- (2) Adrian Liam GILL, a British citizen
- (3) Gary TREWARTHA, a British citizen
- (4) Andrew James WOODHEAD, a British citizen
- (5) Paul Graham WYATT, a British citizen

The address for inventors (1), (3) and (4) is:

436 Cambridge Science Park,
Milton Road,
Cambridge, CB4 0QA,
United Kingdom

The address for inventor (2) is:

CVGI Medicinal Chemistry
3S101 Mereside
Alderley Park
Macclesfield
Cheshire SK10 4TG

The address for inventor (5) is:

Division of Biological Chemistry & Molecular Microbiology
University of Dundee
Dow Street
Dundee DD1 5EH

7. Applicant's Entitlement to File a Patent Application

The applicant is entitled to the rights in the invention described in the patent application by virtue of contracts of employment with the inventors and the operation of Section 39 of the UK Patents Act 1977.

8. International Classification

163

Main classifications C07D; A61K; A61P, A01N

Detailed classifications: C07D 401/14; A61K 31/44; A61P 35/00, A01N 43/56

9. Translations

Where translations of the patent specification or any priority documents from English into the language of your country are required, please prepare the necessary translations at your end unless our accompanying instructing letter indicates otherwise.

10. Renewal Fees and Requests for Examination

In the event that any renewal fees become due within 6 months of filing the application, these should be paid automatically.

Similarly, if any requests for examination or confirmation that the applicant wishes to proceed with the application are due within 6 months of filing the application, these should also be made automatically.

If any requests for examination or renewal fees are due more than 6 months after filing the application, please send us a reminder and seek our instructions before proceeding (but see item 12 below)

11. Correspondence & Invoices

Please send out correspondence and relevant documents as follows:

- (a) All correspondence and relevant documents including copies of the invoices should be sent to the above address of M.R. Hutchins & Co.
- (b) Original invoices, and copies of all correspondence and documents, should be sent to:

Novartis International AG
Corporate Intellectual Property
CH-4002
Basel
SWITZERLAND

quoting the Novartis case reference: **34647**

Please apply any discounts that you may previously have agreed with Novartis

- (c) Copies of all correspondence, including copies of invoices, should also be sent by mail, fax or e-mail where appropriate to:

Dr Michelle Jones
Astex Therapeutics Limited
436 Cambridge Science Park,

163

164
Data Sheet and filing instructions continued
Our Case Reference: AST36
Astex Case Reference: P0058

Milton Road,
Cambridge CB4 0QA,
United Kingdom

Tel: +44 1223 226 230

Fax: +44 1223 226 201

E-mail: M.Jones@astex-therapeutics.com

(d) All e-mails should also be copied to Silke Schnerr [S.Schnerr@astex-therapeutics.com]

12. General

No demand for International Preliminary Examination was made for this application.

The application should be filed no later than 2 days before the deadline. Please advise us by fax or e-mail before the deadline as soon the application has been filed.

Please note that this application (and any patents arising therefrom) should be maintained in force at all times and under no circumstances should be abandoned unless you receive explicit instructions from us to the contrary. We shall endeavour to provide you with timely instructions but, in the event that we are unable to do so, we request that you take the minimum action necessary to keep the application or patent alive.

If there are any further items of information or documents that you need in connection with the filing of the application, please let us know as soon as possible.

Thank you for your cooperation.

M.R. Hutchins & Co.

165

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-075241- -00000-0000

Fecha: 2007-07-24 16:20:57 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eje: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 166



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION



MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de 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 [☒]

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de 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 []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado [☐]
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [☐]
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado [☐]
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [☐]

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

168
166
3074

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
ESCOBAR URIBE JIMENA
Apoderado(a) y/o Representante de
ASTEX THERAPEUTICS LIMITED

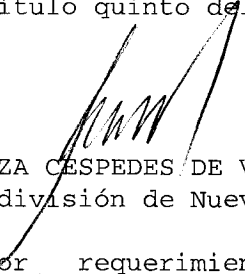
REFERENCIA	Radicación No.	7 75241
	Solicitud internacional	PCT/GB2006/000193
	Fecha inicio fase nacional	21/08/2007
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	13099

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 la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

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.

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
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 12 OCT 2007
adpall