

C.e



Organización
Digitalización CSA Ltda

Industria y Comercio

SUPERINTENDENTE



do

Q

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

09-25278

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____ INHIBIDOR DE QUINASA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____ SANOFI-AVENTIS

DOMICILIO _____ PARIS, FRANCIA

74. APODERADO _____ EMILIO FERRERO
C.C. 438.019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C., _____



PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-025278- -00000-0000

Fecha: 2009-03-11 16:56:10 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 113

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

- 1

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

2
SOLICITANTE
(71)

Nombre: **SANOFI-AVENTIS**
sociedad constituida y existente bajo las
leyes de Francia.

Dirección: 174 Avenue de France,
75013 Paris,
Francia

Domicilio: Paris,
Francia

IDENTIFICACIÓN

C.C.
C.E.

☐
☐

NIT
Otro
Cual

☐
☐

Número _____

3
REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: **EMILIO FERRERO**
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.
C.E.

☒
☐

NIT
Otro
Cual

☐
☐

Número 438.019 T.P 31.929

4
INVENTOR (ES)
(72)

1. **Timothy A. GILLESPIY**
55 Corporate Drive,
Bridgewater,
New Jersey 08807,
Estados Unidos de América

2. **Paul EYNOTT**
55 Corporate Drive,
Bridgewater,
New Jersey 08807,
Estados Unidos de América

3. **Elizabeth M. ALLEN**
55 Corporate Drive,
Bridgewater,
New Jersey 08807,
Estados Unidos de América

4. **Kin T. YU**
55 Corporate Drive,
Bridgewater,
New Jersey 08807,
Estados Unidos de América

5. **Asher ZILBERSTEIN**
55 Corporate Drive,
Bridgewater,
New Jersey 08807,
Estados Unidos de América

5

PCT (86)
Solicitud Internacional No. PCT/US2007/078103
Publicación Internacional No. WO 2008/033798 A3

Fecha: 11 de septiembre de 2007
Fecha: 20 de marzo de 2008

6

Título (54)
INHIBIDOR DE QUINASA

7

Clasificación Internacional (51) C07D 478/004

8	Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	SI ☒ NO ☐	<u>US</u>	<u>11 de septiembre de 2006</u>	<u>60/825,168</u>

9

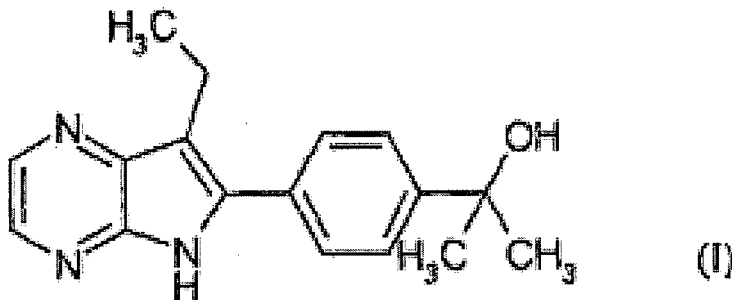
Comprobante de pago No.: 09-16,803
Fecha: 2 de marzo de 2009

10

Anexos:

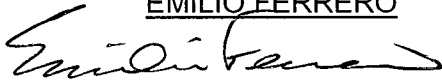
- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 540.000.oo.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicaciones adicionales después de la decimoquinta reivindicación por.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERREROFIRMA: 

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2008/033798 A3

Descripción:

Páginas 30 en el idioma original

Páginas 31 en español

Reivindicaciones: Número (s) 9

Figuras: Número (s) 10

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

3. ☒ Traducción Al Español De Los Anexos Presentados Junto Con El Informe Del Examen Preliminar Internacional.

4. ☒ Extracto de publicación.

**SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA
FASE INTERNACIONAL**

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER- OF- ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

SANOFI-AVENTIS

domiciliado (s) en/of **174, avenue de France**

F-75013 Paris, Francia, hereby ratify the patent

application No. 05,057,645 filed by EMILIO FERRERO on June 14, 2005 and

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el párrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquel. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

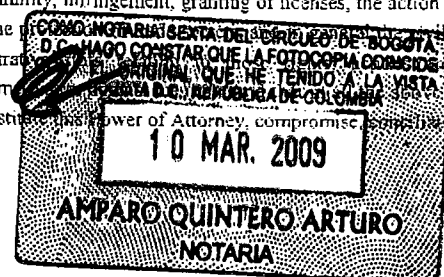
A demás, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso administrativos relacionados con estos derechos, acciones y procesos que promovamos o se nos

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4^a N^o 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys at law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the **PROCESO NOTARIAL EN LA OFICINA DE BOGOTA** penal, and administrative **D. C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA CONSIDE** suits **ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA** instituted by me **OFICINA D. C. NOTARIA DE COLOMBIA** matters they may substitute the Power of Attorney, compromise, litigation, admini

© CAVELIER ABOGADOS
WTPODE01-179 (MENUTA 12.1.1.2.5)

14775
7804



promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this _____
en/in _____
por/by _____
Firma _____ Signature _____

Sanofi-Aventis Dr. Markus Jacobi

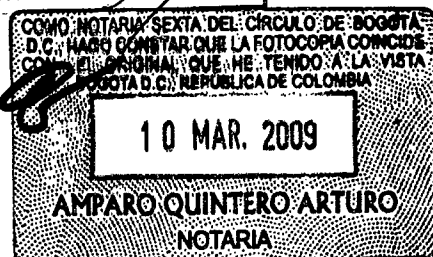
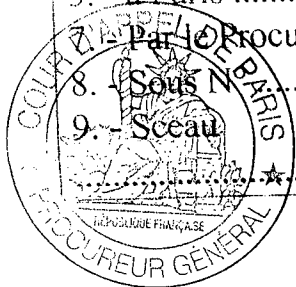
Vu pour certification
matérielle de la signature
de M. Markus Jacobi
apposée ci-dessous.

AFOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

- 1. - République Française
Le présent acte public
- 2. - a été signé par *le Dr. Koenig*
- 3. - agissant en qualité de *NOTAIRE*
- 4. - est revêtu du sceau de *la Cour*

ATTESTE 21 JUIN 2005

- 5. - à Paris le
- 6. - Par le Procureur Général près la Cour d'Appel
- 7. - Sous N° *81902/2005*
- 8. - Sceau
- 9. - Sceau



CERTIFICAT NOTARIE (SOCIETE)

6

K. L. ASSOCIÉS



Notaires

20, rue de la Paix

75002 PARIS

Tél. 01 55 04 70 00 - Fax 01 40 20 42 43

Le Notaire soussigné certifie : que la signature qui précède de :
Markus JACOBI

Est authentique et que le signataire occupe actuellement le poste de Directeur Operations
Brevets Europe
De la société sanofi-aventis,
et que ladite société fonctionne et est régie par le droit français
que la société est sise 174 avenue de France, 75013 PARIS, France
et que le signataire est habilité à octroyer le présent pouvoir.

Tous les faits susmentionnés sont connus du Notaire qui a examiné les documents
correspondants et les certifie.

Etabli et signé à Paris

Le 20/06/05

Le Notaire
(signature – cachet)



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Pays :
Le présent acte public

2. a été signé par

3. agissant en qualité de

4. est revêtu du sceau/cachet de/du

5. à

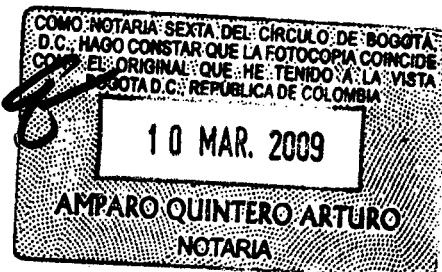
6. le

7. par

8. N°

9. Sceau/cachet :

10. Signature :



COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

10 MAR. 2009

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. - République Française
- Le présent acte public
2. - a été signé par *M^e Koenig*
3. - agissant en qualité de *Notaire*
4. - est revêtu du sceau de *Ac. E.T.U.D.E.*

ATTESTE

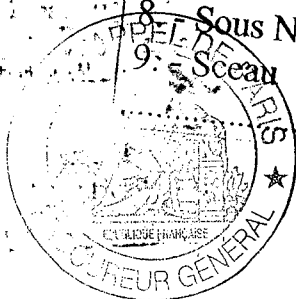
5. - à Paris le **21 JUIN 2005**

7. - Par le Procureur Général près la Cour d'Appel

8. - Sous N° *81.903*

9. - Sceau

Le signature



Traducción Oficial No. 20050708 de un documento escrito en Francés y en INGLÉS, el cual, para su identificación se sella con el sello de María Eugenia Sanint Traductora Oficial según Resolución 1448 del Ministerio de Justicia.

LEGALIZACIONES

Escritas en FRANCES, al pie de un PODER escrito en ESPAÑOL, otorgado por **SANOFI- AVENTIS**, a favor de **EMILIO FERRERO, GONZALO PERDOMO, LUZ CLEMENCIA PAEZ Y GERMAN CAVELIER** (por el cual se ratifica la solicitud de patente NO. 05.057.645 presentada por **EMILIO FERRERO** el 14 de junio de 2005.)

(Firma Ilegible)
Dr. Markus Jacobi
Sanofi-Aventis

Visto para la certificación material de la firma del Sr. Markus Jacobi, puesta anteriormente.

(Firma Ilegible)
.L. ASSOCIES
Notarios
20, rue de la Paix
75002 PARIS

Sello del Notario

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

El Notario suscrito certifica que la firma puesta anteriormente de:

Marcus Jacobi

es auténtica, y que el signatario ocupa actualmente el cargo de Director de Operaciones Patentes Europa, de la sociedad Sanofi-Aventis, y que la dicha sociedad funciona y está regida por el derecho francés; que la sociedad tiene su sede en el 174, avenue de France, 75013, PARIS, Francia, y que el signatario está habilitado para otorgar el presente poder.

Todos los hechos mencionados anteriormente son de conocimiento del Notario, quien examinó los documentos correspondientes y los certifica.

Dado y firmado en París, hoy, 20 de junio de 2005.

El Notario
(Firma – sello)

MARIA EUGENIA SANINT
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 671 BIS
DEL MINISTERIO DE JUSTICIA

MARIA EUGENIA SANINT
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 671 BIS
DEL MINISTERIO DE JUSTICIA

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

10 MAR. 2009

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

(Ilegible)
Alain Koenig
NOTARIO
20, rue de la Paix, París

APOSTILLA
(Convenio de La Haya del 5 de octubre de 1961)

- 1. País: República Francesa
El presente Documento Público
- 2. Fue firmado por el Abogado Koenig
- 3. Quien actúa en calidad de NOTARIO
- 4. Lleva el sello de SU DESPACHO

Certifica

- 5. En París
- 6. El 21 de junio de 2005
- 7. Por el Procurador General ante el Tribunal de Primera Instancia
- 8. Bajo el Número 81903
- 9. Sello/Estampilla:

Sello del Tribunal de Primera Instancia de París.

10- Firma: (Ilegible)

ES TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA
Traductora : Maria Eugenia Sanint
Bogotá, 8 de julio de 2005

MARIA EUGENIA SANINT
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 671 SIS
DEL MINISTERIO DE JUSTICIA

[Handwritten signature]
MARIA EUGENIA SANINT
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 118 DEL
J DE SE... 30.

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
10 MAR. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) ANTERIOR(ES) FIRMA(S) PUESTA(S) POR

Maria Eugenia Samin

IDENTIFICADOS CON C.C. No.(s)

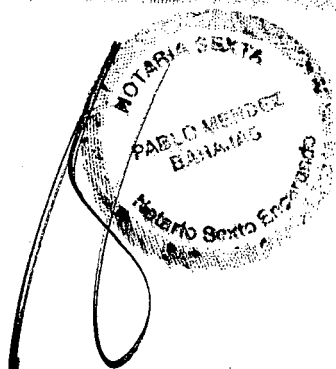
ES(SON) AUTENTICA(S)

SANTAFE DE BOGOTA 12 JUL 2005

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 JUL 12 P 1:28

ues
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

449243
Maria Eugenia Samin
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

10 MAR. 2009

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
20 March 2008 (20.03.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/033798 A3

(51) International Patent Classification:
C07D 487/04 (2006.01) A61P 19/02 (2006.01)
A61K 31/4985 (2006.01)

(74) Agents: BOLCSAK, James W. et al.; sanofi-aventis U.S. Inc., Route 202-206, P. O. Box 6800, Bridgewater, New Jersey 08807 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2007/078103

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

(22) International Filing Date:
11 September 2007 (11.09.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/825,168 11 September 2006 (11.09.2006) US

(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, MT, 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).

(71) Applicant (for all designated States except US): SANOFI-AVENTIS [FR/FR]; 174 Avenue de France, F-75013 Paris (FR).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): GILLESPIE, Timothy A. [US/US]; 55 Corporate Drive, Bridgewater, New Jersey 08807 (US). EYNOTT, Paul [GB/US]; 55 Corporate Drive, Bridgewater, New Jersey 08807 (US). ALLEN, Elizabeth M. [US/US]; 55 Corporate Drive, Bridgewater, New Jersey 08807 (US). YU, Kin T. [US/US]; 55 Corporate Drive, Bridgewater, New Jersey 08807 (US). ZILBERSTEIN, Asher [US/US]; 55 Corporate Drive, Bridgewater, New Jersey 08807 (US).

Declaration under Rule 4.17:

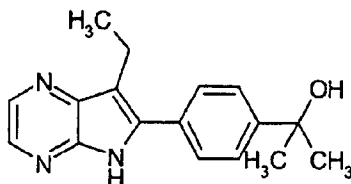
— of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

— with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
15 May 2008

(54) Title: A PYRROLOPYRAZIN AS SYK-KINASE INHIBITOR



(I)

(57) Abstract: The invention is directed to a compound of formula (I) and the prodrugs, and pharmaceutically acceptable salts and solvates of such compounds and their prodrugs. Such a compound has valuable pharmaceutical properties, in particular the ability to inhibit protein kinases.

WO 2008/033798 A3

10

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
20 March 2008 (20.03.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/033798 A2

(51) International Patent Classification:
C07D 487/04 (2006.01) A61P 19/02 (2006.01)
A61K 31/4985 (2006.01)

(74) Agents: BOLCSAK, James W. et al.; sanofi-aventis U.S. Inc., Route 202-206, P. O. Box 6800, Bridgewater, New Jersey 08807 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2007/078103

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

(22) International Filing Date:
11 September 2007 (11.09.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/825,168 11 September 2006 (11.09.2006) US

(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, MT, 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).

(71) Applicant (for all designated States except US): SANOFI-AVENTIS [FR/FR]; 174 Avenue de France, F-75013 Paris (FR).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): GILLESPIE, Timothy A. [US/US]; 55 Corporate Drive, Bridgewater, New Jersey 08807 (US). EYNOTT, Paul [GB/US]; 55 Corporate Drive, Bridgewater, New Jersey 08807 (US). ALLEN, Elizabeth M. [US/US]; 55 Corporate Drive, Bridgewater, New Jersey 08807 (US). YU, Kin T. [US/US]; 55 Corporate Drive, Bridgewater, New Jersey 08807 (US). ZILBERSTEIN, Asher [US/US]; 55 Corporate Drive, Bridgewater, New Jersey 08807 (US).

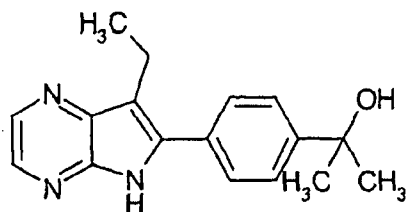
Declaration under Rule 4.17:

— of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

(54) Title: KINASE INHIBITOR



(I)

(57) Abstract: The invention is directed to a compound of formula (I) and the prodrugs, and pharmaceutically acceptable salts and solvates of such compounds and their prodrugs. Such a compound has valuable pharmaceutical properties, in particular the ability to inhibit protein kinases.

WO 2008/033798 A2

KINASE INHIBITOR

5

CROSS REFERENCE

10

15

FIELD OF THE INVENTION

20

This invention is directed to substituted azaindoles, their preparation, pharmaceutical compositions containing these compounds, and their pharmaceutical use in the treatment of disease states capable of being modulated by the inhibition of the protein kinases.

25

BACKGROUND OF THE INVENTION

Protein kinases participate in the signalling events which control the activation, growth and differentiation of cells in response to extracellular mediators and to changes in the environment. In general, these kinases fall into several groups; those which preferentially phosphorylate serine and/or threonine residues and those which preferentially phosphorylate tyrosine residues [S.K.Hanks and T.Hunter, FASEB. J., 1995, 9, pages 576-596]. The serine/threonine kinases include for example, protein kinase C isoforms [A.C.Newton, J. Biol. Chem., 1995, 270, pages 28495-28498] and a group of cyclin-dependent kinases such as cdc2 [J.Pines, Trends in Biochemical Sciences, 1995, 18, pages 195-197]. The tyrosine kinases include membrane-spanning growth factor receptors such as the epidermal growth factor receptor [S.Iwashita and M.Kobayashi, Cellular Signalling, 1992, 4, pages 123-132], and

cytosolic non-receptor kinases such as p56lck, p59fyn, ZAP-70 and csk kinases [C.Chan et al., Ann. Rev. Immunol., 1994, 12, pages 555-592].

Inappropriately high protein kinase activity has been implicated in many diseases resulting from abnormal cellular function. This might arise either directly or indirectly, for example by failure of the proper control mechanisms for the kinase, related for example to mutation, over-expression or inappropriate activation of the enzyme; or by over- or underproduction of cytokines or growth factors also participating in the transduction of signals upstream or downstream of the kinase. In all of these instances, selective inhibition of the action of the kinase might be expected to have a beneficial effect.

Syk is a 72-kDa cytoplasmic protein tyrosine kinase that is expressed in a variety of hematopoietic cells and is an essential element in several cascades that couple antigen receptors to cellular responses. Thus, Syk plays a pivotal role in signalling of the high affinity IgE receptor, FcεR1, in mast cells and in receptor antigen signalling in T and B lymphocytes. The signal transduction pathways present in mast, T and B cells have common features. The ligand binding domain of the receptor lacks intrinsic tyrosine kinase activity. However, they interact with transducing subunits that contain immunoreceptor tyrosine based activation motifs (ITAMs) [M.Reth, Nature, 1989, 338, pages 383-384]. These motifs are present in both the β and γ subunits of the FcεR1, in the ξ-subunit of the T cell receptor (TCR) and in the IgGα and IgG β subunits of the B cell receptor (BCR). [N.S.van Oers and A.Weiss, Seminars in Immunology, 1995, 7, pages 227-236] Upon binding of antigen and multimerization, the ITAM residues are phosphorylated by protein tyrosine kinases of the Src family. Syk belongs to a unique class of tyrosine kinases that have two tandem Src homology 2 (SH2) domains and a C terminal catalytic domain. These SH2 domains bind with high affinity to ITAMs and this SH2-mediated association of Syk with an activated receptor stimulates Syk kinase activity and localises Syk to the plasma membrane.

In Syk deficient mice, mast cell degranulation is inhibited, suggesting that this is an important target for the development of mast cell stabilising agents [P.S.Costello, Oncogene, 1996, 13, pages 2595-2605]. Similar studies have demonstrated a critical role for Syk in BCR and TCR signalling [A.M.Cheng, Nature, 1995, 378, pages 303-306, (1995) and D.H.Chu et al.,

Immunological Reviews, 1998, 165, pages 167-180]. Syk also appears to be involved in eosinophil survival in response to IL-5 and GM-CSF [S.Yousefi et al., J. Exp. Med., 1996, 183, pages 1407-1414]. Despite the key role of Syk in mast cell, BCR and T cell signalling, little is known about the mechanism by which Syk transmits downstream effectors. Two
5 adaptor proteins, BLNK (B cell Linker protein, SLP-65) and SLP-76 have been shown to be substrates of Syk in B cells and mast cells respectively and have been postulated to interface Syk with downstream effectors [M.Ishiai et al., Immunity, 1999, 10, pages 117-125 and L.R.Hendricks-Taylor et al., J.Biol. Chem, 1997, 272, pages 1363-1367]. In addition Syk appears to play an important role in the CD40 signalling pathway, which plays an important
10 role in B cell proliferation [M.Faris et al., J.Exp. Med., 1994, 179, pages 1923-1931].

Syk is further involved in the activation of platelets stimulated via the low-affinity IgG receptor (Fc gamma-RIIA) or stimulated by collagen [F.Yanaga et al., Biochem. J., 1995, 311, (Pt. 2) pages 471-478].

15

Focal adhesion kinase (FAK) is a non-receptor tyrosine kinase involved in integrin-mediated signal transduction pathways. FAK colocalizes with integrins in focal contact sites and FAK activation and its tyrosine phosphorylation have been shown in many cell types to be dependent on integrins binding to their extracellular ligands. Results from several studies
20 support the hypothesis that FAK inhibitors could be useful in cancer treatment. For example, FAK-deficient cells migrate poorly in response to chemotactic signals and overexpression of C-terminal domain of FAK blocks cell spreading as well as chemotactic migration (Sieg et al, J. Cell Science, 1999, 112, 2677-2691; Richardson A. and Parsons T., Cell, 1997, 97, 221-231) ; in addition, tumor cells treated with FAK antisense oligonucleotides lost their attachment and
25 underwent apoptosis (Xu et al, Cell Growth Differ. 1996, 4, 413-418). FAK has been reported to be overexpressed in prostate, breast, thyroid, colon and lung cancers. The level of expression of FAK is directly correlated with tumors demonstrating the most aggressive phenotype.

30 Angiogenesis or the formation of new blood vessels by sprouting from the preexisting vasculature is of central importance for embryonic development and organogenesis. Abnormal enhanced neovascularization is observed in rheumatoid arthritis, diabetic retinopathy and

14

4

during tumor development (Folkman, Nat. Med., 1995, 1, 27-31.). Angiogenesis is a complex multistage process which includes activation, migration, proliferation and survival of endothelial cells. Extensive studies in the field of tumor angiogenesis in the past two decades have identified a number of therapeutic targets including kinases, proteases and integrins

5 resulting in the discovery of many new anti-angiogenic agents, including KDR inhibitors some of which are currently under clinical evaluation (Jekunen, et al Cancer Treatment Rev. 1997, 23, 263-286.). Angiogenesis inhibitors may be used in frontline, adjuvant and even preventive settings for the emergence or regrowth of malignancies.

10 Several proteins involved in chromosome segregation and spindle assembly have been identified in yeast and drosophila. Disruption of these proteins results in chromosome missegregation and monopolar or disrupted spindles. Among these kinases are the Ipl1 and aurora kinases from *S.cerevisiae* and *drosophila* respectively, which are required for centrosome separation and chromosome segregation. One human homologue of yeast Ipl1
15 was recently cloned and characterized by different laboratories. This kinase termed Aurora2, STK15 or BTAK belongs to the serine/threonine kinase family. Bischoff et al showed that Aurora2 is oncogenic and is amplified in human colorectal cancers (EMBO J, 1998, 17, 3052-3065). It has also been exemplified in cancers involving epithelial tumors such as breast cancer.

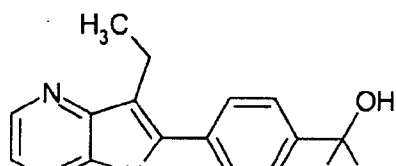
20

We have now found a novel substituted azaindole, which has valuable pharmaceutical properties, in particular, the ability to inhibit protein kinases, more particularly, the ability to selectively inhibit Syk kinase. This azaindole compound is related to those disclosed in United States Patent 6,770,643 but is not specifically disclosed in that patent.

25

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to a compound of formula I:



LS

5

(I)

5

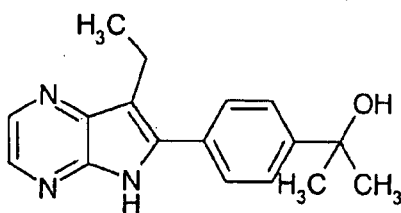
a pharmaceutically acceptable salt or prodrug thereof, or a solvate of such a compound, its salt or its prodrug.

The invention is also directed to a pharmaceutical composition comprising a compound of
10 formula I, and method for using the compound of formula I for or treating or preventing a physiological condition related to Syk in a patient.

The invention is also directed to a process for preparing a compound that is an intermediate useful in preparing a compound of formula I.

15

In another aspect, the present invention is directed to pharmaceutical compositions comprising compounds of general formula (I):



20

(I)

the corresponding N-oxide, and the prodrug; and a pharmaceutically acceptable salt and solvate (e.g. hydrate) of such a compound; and the N-oxide and the prodrug; together with one or more pharmaceutically acceptable carrier or excipient.

25

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIGURE 1: Reaction scheme for making a compound of Formula I.

FIGURE 2: Mean ankle joint diameter of rats injected with collagen type II from bovine nasal in Freund's incomplete adjuvant and treated with A003397769, the compound of Formula I (3.0, 10, or 30 mg/kg b.i.d.) from day 6 through day 21. Mean ankle joint diameters of female LEW rats sensitized by intra-dermal injection of collagen in Freund's incomplete adjuvant (400ug/400ul/rat) on Days 0 and 7. Animals dosed from Day 6 - 21.

FIGURE 3: Analysis of bone erosion (ratio of bone surface to bone volume) in the calcaneus of CIA rats treated with A003397769 (3.0, 10 or 30 mg/kg).

FIGURE 4: Mean ankle joint diameter of rats injected with collagen type II from bovine nasal in Freund's incomplete adjuvant and treated with A003397769 (3.0 mg/kg) alone or in combination with Methotrexate (0.1 or 0.2 mg/kg) from day 6 through day 20 or 21 and compared to vehicle dosed animals. Effects of SYK Inhibitor, A003397769 (3.0 mg/kg b.i.d.), as Monotherapy or in Combination with Methotrexate on Rat CIA.

FIGURE 5: Mean ankle joint diameter of rats injected with collagen type II from bovine nasal in Freund's incomplete adjuvant and treated with A003397769 (10 mg/kg) alone or in combination with Methotrexate (0.1 or 0.2 mg/kg) from day 6 through day 20 or 21 and compared to vehicle dosed animals. Effects of SYK Inhibitor, A003397769 (10 mg/kg b.i.d.), as Monotherapy or in Combination with Methotrexate on Rat CIA.

FIGURE 6: Analysis of bone erosion (ratio of bone surface to bone volume) in the calcaneus of CIA rats treated with A003397769 (3.0 or 10 mg/kg) alone or in combination with Methotrexate (0.1 or 0.2 mg/kg).

FIGURE 7: Mean ankle joint diameter of rats injected with collagen type II from bovine nasal in Freund's incomplete adjuvant and treated therapeutically with A003397769A (10 and 30 mg/kg b.i.d) from day 12 through day 21. Mean Ankle Joint Diameters of Female Lewis Rats Sensitized by Intra-dermal Injection of Collagen in Freund's Incomplete Adjuvant (400 ug/400ul/rat) on Days 0 and 7. Average of Both Paws.

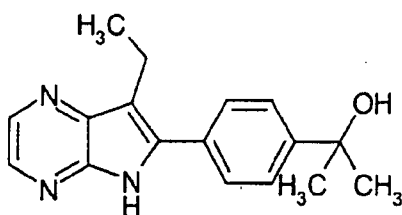
FIGURE 8: Analysis of bone erosion (ratio of bone surface to bone volume) in the calcaneus of CIA rats treated therapeutically with A003397769A (10 or 30 mg/kg b.i.d.).

FIGURE 9: Effect of the compound of Formula I on rat weight.

FIGURE 10: Effects of the compound of Formula I on hemoglobin concentration.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Thus, in one aspect, the present invention is directed to pharmaceutical compositions comprising a compound of general formula (I):



(I)

which also may be known as: 2-[4-(7-Ethyl-5H-pyrrolo[2,3-b]pyrazin-6-yl)-phenyl]-propan-2-ol.

In the present specification, the term "compound of the invention", and equivalent expressions, are meant to embrace a compound of general formula (I) as hereinbefore described, which expression includes the prodrugs, the pharmaceutically acceptable salts, and the solvates, e.g. hydrates, where the context so permits. Similarly, reference to intermediates, whether or not they themselves are claimed, is meant to embrace their salts, and solvates, where the context so permits. For the sake of clarity, particular instances when the context so permits are sometimes indicated in the text, but these instances are purely illustrative and it is not intended to exclude other instances when the context so permits.

Abbreviations used herein:

ATP adenosine triphosphate

DTT dithiothreitol

PBS phosphate buffered saline

As used above, and throughout the description of the invention, the following terms, unless otherwise indicated, shall be understood to have the following meanings:

"Patient" includes both human and other mammals.

5

"Prodrug" means a compound which is convertible in vivo by metabolic means (e.g. by hydrolysis) to a compound of formula (I), including N-oxides thereof. For example an ester of a compound of formula (I) containing a hydroxy group may be convertible by hydrolysis in vivo to the parent molecule. Alternatively, an ester of a compound of formula (I) containing a

10 carboxy group may be convertible by hydrolysis in vivo to the parent molecule.

Suitable esters of compounds of formula (I) containing a hydroxy group are, for example acetates, citrates, lactates, tartrates, malonates, oxalates, salicylates, propionates, succinates, fumarates, maleates, methylene-bis- β -hydroxynaphthoates, gentisates, isethionates,

15 di-p-toluoyltartrates, methanesulfonates, ethanesulfonates, benzenesulfonates, p-toluenesulfonates, cyclohexylsulfamates and quinate.

An especially useful class of esters of compounds of formula (I) containing a hydroxy group, may be formed from acid moieties selected from those described by Bundgaard et. al., J. Med.

20 Chem., 1989, 32, page 2503-2507, and include substituted (aminomethyl)-benzoates, for example dialkylamino-methylbenzoates in which the two alkyl groups may be joined together and/or interrupted by an oxygen atom or by an optionally substituted nitrogen atom, e.g. an alkylated nitrogen atom, more especially (morpholino-methyl)benzoates, e.g. 3- or 4-(morpholinomethyl)-benzoates, and (4-alkylpiperazin-1-yl)benzoates, e.g. 3- or

25 4-(4-alkylpiperazin-1-yl)benzoates.

Some of the compounds of the present invention are basic, and such compounds are useful in the form of the free base or in the form of a pharmaceutically acceptable acid addition salt thereof.

30

Acid addition salts are a more convenient form for use; and in practice, use of the salt form inherently amounts to use of the free base form. The acids which can be used to prepare the

acid addition salts include preferably those which produce, when combined with the free base, pharmaceutically acceptable salts, that is, salts whose anions are non-toxic to the patient in pharmaceutical doses of the salts, so that the beneficial inhibitory effects inherent in the free base are not vitiated by side effects ascribable to the anions. Although pharmaceutically acceptable salts of said basic compounds are preferred, all acid addition salts are useful as sources of the free base form even if the particular salt, per se, is desired only as an intermediate product as, for example, when the salt is formed only for purposes of purification, and identification, or when it is used as intermediate in preparing a pharmaceutically acceptable salt by ion exchange procedures. Pharmaceutically acceptable salts within the scope of the invention include those derived from mineral acids and organic acids, and include hydrohalides, e.g. hydrochlorides and hydrobromides, sulfates, phosphates, nitrates, sulfamates, acetates, citrates, lactates, tartrates, malonates, oxalates, salicylates, propionates, succinates, fumarates, maleates, methylene-bis-b-hydroxynaphthoates, gentisates, isethionates, di-p-toluoyltartrates, methane-sulfonates, ethanesulfonates, benzenesulfonates, p-toluenesulfonates, cyclohexylsulfamates and quinate.

As well as being useful in themselves as active compounds, salts of compounds of the invention are useful for the purposes of purification of the compounds, for example by exploitation of the solubility differences between the salts and the parent compounds, side products and/or starting materials by techniques well known to those skilled in the art.

The compounds of the invention exhibit useful pharmacological activity and accordingly are incorporated into pharmaceutical compositions and used in the treatment of patients suffering from certain medical disorders. The present invention thus provides, according to a further aspect, compounds of the invention and compositions containing compounds of the invention for use in therapy.

Compounds within the scope of the present invention inhibit or block kinase catalytic activity according to tests described in the literature and described in vitro procedures hereinafter, and which tests results are believed to correlate to pharmacological activity in humans and other mammals. Thus, in a further embodiment, the present invention provides compounds of the invention and compositions containing compounds of the invention for use in the treatment of

a patient suffering from, or subject to, conditions which can be ameliorated by the administration of protein kinase inhibitors (e.g. Syk, FAK, KDR or Aurora2). For example, compounds of the present invention are useful in the treatment of inflammatory diseases, for example asthma; inflammatory dermatoses (e.g. psoriasis; dermatitis herpetiformis, eczema, necrotizing and cutaneous vasculitis, bullous disease); allergic rhinitis and allergic conjunctivitis; joint inflammation, including arthritis, rheumatoid arthritis and other arthritic conditions such as rheumatoid spondylitis, gouty arthritis, traumatic arthritis, rubella arthritis, psoriatic arthritis and osteoarthritis. The compounds are also useful in the treatment of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), acute synovitis, autoimmune diabetes, autoimmune encephalomyelitis, colitis, atherosclerosis, peripheral vascular disease, cardiovascular disease, multiple sclerosis, restenosis, myocarditis, B cell lymphomas, systemic lupus erythematosus, graft versus host disease and other transplant associated rejection events, cancers and tumors (such as colorectal, prostate, breast, thyroid, colon and lung cancers) and inflammatory bowel disease. Additionally, the compounds are useful as tumor anti-angiogenic agents. And furthermore, the compounds of the invention are useful as agents to control tumor cells.

A special embodiment of the therapeutic methods of the present invention is the treating of joint inflammation.

Another special embodiment of the therapeutic methods of the present invention is the treating of rheumatoid arthritis.

A special embodiment of the therapeutic methods of the present invention is the treating of cancers, tumors and other proliferative disorders.

Another special embodiment of the therapeutic methods of the present invention is the treating of cancers involving liquid tumors.

Another special embodiment of the therapeutic methods of the present invention is the treating of mantle cell lymphoma.

21

Yet another special embodiment of the therapeutic methods of the present invention is the treating of disorders by inhibition of angiogenesis.

According to a further feature of the invention there is provided a method for the treatment of
5 a human or animal patient suffering from, or subject to, conditions which can be ameliorated
by the administration of a protein kinase inhibitor (e.g. Syk, FAK, KDR or Aurora2) for
example conditions as hereinbefore described, which comprises the administration to the
patient of an effective amount of a compound of the invention or a composition containing a
compound of the invention. "Effective amount" is meant to describe an amount of compound
10 of the present invention effective in inhibiting the catalytic activity a protein kinase, such as
Syk, FAK, KDR or Aurora2, and thus producing the desired therapeutic effect.

References herein to treatment should be understood to include prophylactic therapy as well as
treatment of established conditions.

15

The present invention also includes within its scope pharmaceutical compositions comprising
a compound of the invention in association with a pharmaceutically acceptable carrier or
excipient.

20 A compound of the invention may be administered by any suitable means. In practice a
compound of the present invention may generally be administered parenterally, topically,
rectally, orally or by inhalation; especially by the oral route or by inhalation.

Compositions according to the invention may be prepared according to the customary
25 methods, using one or more pharmaceutically acceptable adjuvants or excipients. The
adjuvants comprise, inter alia, diluents, sterile aqueous media and the various non-toxic
organic solvents. The compositions may be presented in the form of tablets, pills, granules,
powders, aqueous solutions or suspensions, injectable solutions, elixirs or syrups, and can
contain one or more agents chosen from the group comprising sweeteners, flavourings,
30 colourings, or stabilisers in order to obtain pharmaceutically acceptable preparations. The
choice of vehicle and the content of active substance in the vehicle are generally determined in
accordance with the solubility and chemical properties of the active compound, the particular

22

mode of administration and the provisions to be observed in pharmaceutical practice. For example, excipients such as lactose, sodium citrate, calcium carbonate, dicalcium phosphate and disintegrating agents such as starch, alginic acids and certain complex silicates combined with lubricants such as magnesium stearate, sodium lauryl sulfate and talc may be used for preparing tablets. To prepare a capsule, it is advantageous to use lactose and high molecular weight polyethylene glycols. When aqueous suspensions are used they can contain emulsifying agents or agents which facilitate suspension. Diluents such as sucrose, ethanol, polyethylene glycol, propylene glycol, glycerol and chloroform or mixtures thereof may also be used.

10

For parenteral administration, emulsions, suspensions or solutions of the products according to the invention in vegetable oil, for example sesame oil, groundnut oil or olive oil, or aqueous-organic solutions such as water and propylene glycol, injectable organic esters such as ethyl oleate, as well as sterile aqueous solutions of the pharmaceutically acceptable salts, are used. The solutions of the salts of the products according to the invention are especially useful for administration by intramuscular or subcutaneous injection. The aqueous solutions, also comprising solutions of the salts in pure distilled water, may be used for intravenous administration with the proviso that their pH is suitably adjusted, that they are judiciously buffered and rendered isotonic with a sufficient quantity of glucose or sodium chloride and that they are sterilised by heating, irradiation or microfiltration.

20

For topical administration, gels (water or alcohol based), creams or ointments containing compounds of the invention may be used. Compounds of the invention may also be incorporated in a gel or matrix base for application in a patch, which would allow a controlled release of compound through the transdermal barrier.

25

For administration by inhalation compounds of the invention may be dissolved or suspended in a suitable carrier for use in a nebuliser or a suspension or solution aerosol, or may be absorbed or adsorbed onto a suitable solid carrier for use in a dry powder inhaler.

30

Solid compositions for rectal administration include suppositories formulated in accordance with known methods and containing at least one compound of the invention.

The percentage of active ingredient in the compositions of the invention may be varied, it being necessary that it should constitute a proportion such that a suitable dosage shall be obtained. Obviously, several unit dosage forms may be administered at about the same time.

- 5 The dose employed will be determined by the physician, and depends upon the desired therapeutic effect, the route of administration and the duration of the treatment, and the condition of the patient. In the adult, the doses are generally from about 0.001 to about 50, preferably about 0.001 to about 5, mg/kg body weight per day by inhalation, from about 0.01 to about 100, preferably 0.1 to 70, more especially 0.5 to 10, mg/kg body weight per day by
- 10 oral administration, and from about 0.001 to about 10, preferably 0.01 to 1, mg/kg body weight per day by intravenous administration. In each particular case, the doses will be determined in accordance with the factors distinctive to the subject to be treated, such as age, weight, general state of health and other characteristics which can influence the efficacy of the medicinal product.

15

The compounds according to the invention may be administered as frequently as necessary in order to obtain the desired therapeutic effect. Some patients may respond rapidly to a higher or lower dose and may find much weaker maintenance doses adequate. For other patients, it may be necessary to have long-term treatments at the rate of 1 to 4 doses per day, in

20 accordance with the physiological requirements of each particular patient. Generally, the active product may be administered orally 1 to 4 times per day. Of course, for some patients, it will be necessary to prescribe not more than one or two doses per day.

- Compounds of the invention may be prepared by the application or adaptation of known
- 25 methods, by which is meant methods used heretofore or described in the literature, for example those described by R.C.Larock in Comprehensive Organic Transformations, VCH publishers, 1989.

- In the reactions described hereinafter it may be necessary to protect reactive functional groups,
- 30 for example hydroxy, amino, imino, thio or carboxy groups, where these are desired in the final product, to avoid their unwanted participation in the reactions. Conventional protecting

groups may be used in accordance with standard practice, for examples see T.W. Greene and P.G.M. Wuts in "Protective Groups in Organic Chemistry" John Wiley and Sons, 1991.

It will be appreciated that compounds of the present invention may contain asymmetric centres. These asymmetric centres may independently be in either the R or S configuration. It will be apparent to those skilled in the art that certain compounds of the invention may also exhibit geometrical isomerism. It is to be understood that the present invention includes individual geometrical isomers and stereoisomers and mixtures thereof, including racemic mixtures, of compounds of formula (I) hereinabove. Such isomers can be separated from their mixtures, by the application or adaptation of known methods, for example chromatographic techniques and recrystallisation techniques, or they are separately prepared from the appropriate isomers of their intermediates.

According to a further feature of the invention, acid addition salts of the compounds of this invention may be prepared by reaction of the free base with the appropriate acid, by the application or adaptation of known methods. For example, the acid addition salts of the compounds of this invention may be prepared either by dissolving the free base in water or aqueous alcohol solution or other suitable solvents containing the appropriate acid and isolating the salt by evaporating the solution, or by reacting the free base and acid in an organic solvent, in which case the salt separates directly or can be obtained by concentration of the solution.

The acid addition salts of the compounds of this invention can be regenerated from the salts by the application or adaptation of known methods. For example, parent compounds of the invention can be regenerated from their acid addition salts by treatment with an alkali, e.g. aqueous sodium bicarbonate solution or aqueous ammonia solution.

Compounds of this invention can be regenerated from their base addition salts by the application or adaptation of known methods. For example, parent compounds of the invention can be regenerated from their base addition salts by treatment with an acid, e.g. hydrochloric acid.

25

15

Compounds of the present invention may be conveniently prepared, or formed during the process of the invention, as solvates (e.g. hydrates). Hydrates of compounds of the present invention may be conveniently prepared by recrystallisation from an aqueous/organic solvent mixture, using organic solvents such as dioxan, tetrahydrofuran or methanol.

5

According to a further feature of the invention, base addition salts of the compounds of this invention may be prepared by reaction of the free acid with the appropriate base, by the application or adaptation of known methods. For example, the base addition salts of the compounds of this invention may be prepared either by dissolving the free acid in water or

10 aqueous alcohol solution or other suitable solvents containing the appropriate base and isolating the salt by evaporating the solution, or by reacting the free acid and base in an organic solvent, in which case the salt separates directly or can be obtained by concentration of the solution.

15 The starting materials and intermediates may be prepared by the application or adaptation of known methods, for example methods as described in the Example or their obvious chemical equivalents.

20 The present invention is further Exemplified but not limited by the following illustrative Example.

300 MHz ^1H nuclear magnetic resonance spectra (NMR) were recorded on a Varian Mercury instruments. In the nuclear magnetic resonance spectra (NMR) the chemical shifts (δ) are
25 expressed in ppm relative to tetramethylsilane. Abbreviations have the following significances: s = singlet; d = doublet; t = triplet; m = multiplet; q = quartet; dd = doublet of doublets; ddd = doublet of double doublets.

High Pressure Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (LCMS) experiments to
30 determine retention times (R_T) and associated mass ions are performed using the following method. Mass Spectra (MS) are recorded using a Micromass LCT time of flight mass spectrometer. The method is positive electrospray ionization, scanning mass m/z from 100 to

26

16

1000. Liquid chromatography is performed on an Agilent™ 1100 Series Binary Pump & Degasser; stationary phase: Phenomenex Synergi™ 2μ Hydro-RP 20 X 4.0mm column, mobile phase: A = 0.1% formic acid (FA) in water, B = 0.1% FA in acetonitrile. Injection volume of 5μL by CTC Analytical PAL System. Flow is 1 mL/minute. Gradient is 5% B to 90% B in 3 minutes and 90% B to 100% B in 2 minutes. Auxiliary detectors are: Agilent 1100 Series UV detector, wavelength = 220 nm and Sedere SEDEX™ 75 Evaporative Light Scattering (ELS) detector temperature = 46°C, Nitrogen pressure = 4bar.

The thin layer chromatography (TLC) R_F values were determined using Merck™ silica plates.

EXAMPLE 1

2-[4-(7-Ethyl-5H-pyrrolo[2,3-b]pyrazin-6-yl)-phenyl]-propan-2-ol

A total of 6.0 g of 2-[4-(7-ethyl-5H-pyrrolo[2,3-b]pyrazin-6-yl)phenyl]propan-2-ol (compound 1) was prepared in two steps from *n*-propylpyrazine (compound 2) and 4-acetylbenzonitrile (compound 3).

The synthesis of compound 1 was carried out as follows. Coupling of *n*-propylpyrazine (compound 2) and 4-acetylbenzonitrile (compound 3) with sodium bis(trimethylsilyl)amide in tetrahydrofuran at 40 °C gave the intermediate compound 4 in 30% yield. Reaction of compound 4 with methylmagnesium chloride in tetrahydrofuran at 0 °C gave the desired compound compound 1 in 74% yield after recrystallization from 2-propanol. The synthesis is shown in Figure 1.

EXPERIMENTAL

2-[4-(7-Ethyl-5H-pyrrolo[2,3-b]pyrazin-6-yl)phenyl]ethanone (compound 4). A solution of *n*-propylpyrazine (compound 2, 912 mg, 7.46 mmol) in tetrahydrofuran (5 mL) was added drop-wise, over a period of seven minutes, to a solution of sodium bis(trimethylsilyl)amide (2M

27

17

solution in THF; 13 mL, 26 mmol, 3.5 equiv) at 20 °C. A deep, purple-red solution was obtained and the temperature fell to 16.4 °C. A solution of 4-acetylbenzonitrile (compound 3, 1.08 g, 7.4 mmol) in tetrahydrofuran (5 mL) was added, over a period of 18 minutes, at 13.3 °C. The temperature fell to 12.6 °C and a brown solution ensued. The mixture was stirred at
5 room temperature for one hour, heated to about 35 °C for six hours, then left to stir at room temperature for about 60 hours. The mixture was poured into aqueous saturated sodium bicarbonate (200 mL) and extracted with ethyl acetate (2 x 150 mL). The ethyl acetate was washed with water (100 mL) and concentrated on the Buchi at a bath temperature of 40 °C and from 80 to 10 torr to give a deep-yellow solid. The solid was triturated with diethyl ether (25
10 mL), filtered and washed with ether (25 mL). The solid was air dried to give 600 mg (30.3%) of compound 4 as a yellow solid: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, figure 1) δ 8.5 (1H, d, J=2 Hz), 8.15 (2H, d, J=8 Hz), 8.1 (1H, d, J=3 Hz), 7.9 (2H, d, J=8 Hz), 3.1 (2H, q, J=9 Hz), 2.7 (3H, s), 1.4 (3H, t, J=9 Hz).

15 1-[4-(7-Ethyl-5*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyrazin-6-yl)phenyl]propan-2-ol (compound 1). To a cooled (~5 °C) solution of methylmagnesium chloride (3M in THF; 81.3 mL, 244 mmol, 10 equiv.) in tetrahydrofuran (116 mL), was added a solution of compound 4 (6.5 g, 24.4 mmol) in tetrahydrofuran (348 mL) drop-wise, over ninety minutes, keeping the temperature at about 0
20 °C by the rate of addition. A bright yellow solution was observed on addition. After one hour, TLC (ethyl acetate/*n*-heptane 1/1) showed no starting material present and a new spot moving at a lower R_f. The batch was quenched by the careful addition of a saturated, aqueous solution of sodium bicarbonate (about 660 mL). A thick mass ensued and ethyl acetate (250 mL) and water (250 mL) were added to the mixture. The aqueous layer was removed and re-extracted
25 with ethyl acetate (2 x 250 mL). The ethyl acetate fractions were combined, washed with water (2 x 200 mL) and concentrated on the Buchi at a bath temperature of 40 °C and from 80 to 10 torr, to give 7.5 g (109%) of 1 as a light-beige solid: ¹H NMR (DMSO-*d*₆, figure 2) δ 12.0 (1H, s), 8.35 (1H, d, J=3.5 Hz), 8.2 (1H, d, J=3.5 Hz), 7.6 (4H, s), 5.1 (1H, s), 2.9 (2H, q, J=8 Hz), 1.5 (6H, s), 1.3 (3H, t, J=8 Hz).

30

This material was combined with material from a previous experiment. The combined material (8.5 g) was refluxed with 2-propanol (150 mL) to give a clear, light brown solution, which was filtered hot through a hot Buchner funnel, under vacuum. A precipitate formed in

the filter flask and the mixture was heated to boiling to give a clear solution. The material was allowed to cool to room temperature with stirring, to give a light, yellow solid, which was filtered, washed with cold 2-propanol and dried in the vacuum oven at 50 °C to give 6.0 g (71%) of compound 1 as a light, yellow solid: LCMS: R_T = 2.55 minutes, MS: 282 (M+H); ^1H NMR (DMSO- d_6 , figure 3) δ 12.0 (1H, s), 8.35 (1H, d, J =3 Hz), 8.2 (1H, d, J =3 Hz), 7.6 (4H, s), 5.1 (1H, s), 2.9 (2H, q, J =9 Hz), 1.5 (6H, s), 1.3 (3H, t, J =9 Hz).

The elemental analysis of the compound 1 is shown in TABLE 1.

10 THEORY PERCENT
PER ELEMENT: C 72.57%, H 6.81%, N 14.93%, O 5.69%

EXPERIMENTAL 1: C 72.46%, H 7.05%, N 15.07%

15 TABLE 1

IN VITRO TEST PROCEDURE FOR SYK

20

Assay Name:	Spleen Tyrosine (Y) Kinase
Short Name:	Syk
Assay Format:	Substrate Phosphorylation
Detection Format:	Streptavidin FlashPlate
Modulation:	Inhibition

Streptavidin FlashPlate Plus microplates from PerkinElmer Life Sciences™ are designed for
30 in-plate radiometric assays. The interior of each well is permanently coated with a thin layer of
polystyrene-based scintillant followed by covalent binding of Streptavidin. These plates are
suitable for a wide variety of assay applications which utilize biotinylated capture molecules.
Poly (Glu,Tyr) 4:1 (PGT) is a random copolymer that can act as a substrate for tyrosine-
specific protein kinases. The assay measures the phosphorylation of PGT-Biotin substrate by

Syk. The enzyme transfers the [$\gamma^{33}\text{P}$]-phosphate from [$\gamma^{33}\text{P}$]-ATP to the polymeric substrate. The assay was run in solution in a non-binding 384-well plate. After stopping the reaction using phosphoric acid, the reaction mixture was transferred to a 384-well Streptavidin Flashplate. The biotinylated substrate was captured onto the plate and other reagents including
5 hot ATP were washed away. Each well was then counted for radioactivity.

The enzyme reaction was run in a 384-well non-binding plate. Final reagent concentration/well was: 7.77 nM Syk, 15.5 nM PGT-Biotin substrate, 0.1 μCi ^{33}P -ATP, 50 mM Tris, pH 7.5, 10 mM MgCl_2 , 3 mM MnCl_2 , 1 mM DTT, 0.1 mg/ml γ -Globulins. The
10 reaction volume was: 22 μl . Reaction time: 120 minutes. Temperature: Room temperature. The reaction was stopped by addition of 20 μl of 9% Phosphoric acid and 30 μl of reaction mixture was transferred to a 384-well Streptavidin Flashplate. After 90 minutes of incubation at room temperature, the plate was washed with 0.02% of Tween-20 in 50 mM Tris, pH 7.5. Radioactivity was counted on a Top CountTM scintillation counter.

15 Enzyme dilution was prepared and kept on ice prior to use.
MnCl₂ and DTT was added fresh into the assay buffer prior to use.

20 Materials for the assay are shown in Table 2.

Materials	Supplier	Catalog Number	Mwt	Function
1 M Tris, pH 7.5	Fisher	BP1757-500		Buffer
1 M MgCl ₂	Sigma	M-1028	95.2	Enzyme cofactor
1 MnCl ₂	Sigma	M-1787	125.8	Enzyme cofactor
DTT	Sigma	D-5545	154.2	Antioxidant
γ -Globulins	Sigma	G-5009		Protein stabilizer
DMSO	Sigma-Aldrich	15,493-9		Solvent
Staurosporine	Sigma	S-4400	466.5	Reference inhibitor
Phosphoric acid (85%)	Sigma	P-6560	98.0	Stop solution

30

1 mCi [γ 33P]-ATP	PerkinElmer	NEG6xx		Substrate
10 x PBS, pH 7.4	Fisher	BP399-1		Wash buffer
Tween 20	Fisher	BP337-500	1227.54	Detergent
384-well polypropylene plate	Corning	3657		Compound plate
Non-binding 384-well plate	Corning	3652		Reaction plate
384-well Streptavidin Flashplate	PerkinElmer	SMP-410 (A)		Capture plate
Top Seal A sealing film	Packard	6005185		Plate sealer
Elx405 Automated Washer	Bio-Tek			Plate washer
Top Count	Packard			Counter
FX Station	Beckman			Liquid handler
Beckman 2000	Beckman			Liquid handler

TABLE 2

Enzyme:

Flag-tagged Syk (0.184 mg/ml, MW = 35,531.81 Da) was produced and purified by methods known in the art.

Substrate:

Biotin conjugated Poly (Glu,Tyr) 4:1 was purchased from Cisbio international™ (catalog # 61GT0BLB, lot # 16).

Assay solutions used are shown in Table 3.

Reagent	Chemicals	Solvent	Concentration
Assay Buffer MnCl ₂ and DTT add fresh	Tris, pH 7.5 MnCl ₂	H ₂ O	50 mM 3 mM
	MgCl ₂ DTT γ -globulins		10 mM 1 mM 0.1%
Enzyme & Substrate Solution Keep in non-binding plates	Syk PGT-Biotin substrate	Assay buffer	7.77 nM 15.5 nM

ATP / ^{33}P -ATP Solution	ATP/ ^{33}P -ATP	Assay buffer	0.1 $\mu\text{Ci}/\text{well}$
Stop Solution	Phosphoric acid	H ₂ O	9%
Wash Buffer	Tween-20	1 x PBS, pH 7.4	0.02%

TABLE 3

5

Compound dilution:

- 10 1. Compounds were received as 10 $\mu\text{l}/\text{well}$ of 10mM in 100% DMSO in a 96-well U-bottom polypropylene plate with Row H empty. Added 90 $\mu\text{l}/\text{well}$ of 100% DMSO to yield 100 μl of 1 mM compound, resealed and stored the plate at room temperature in the dark.
- 15 2. Prepared compound destination plate: In a 384-well round-bottom polypropylene plate (Corning storage plate), added 23 $\mu\text{l}/\text{well}$ of H₂O to columns 3 & 13, 20 $\mu\text{l}/\text{well}$ of 30% DMSO to columns 4 through 12 and columns 14 through 22 (leaving Rows O and P empty).
- 20 3. Prepared compound dilutions (10 dilutions, 300 μM , 100 μM , 30 μM , --- etc) on Biomek 2000™ using Kinase Profiling program: Using 20 μl tips with 8th one (Row H) removed, transferred 10 $\mu\text{l}/\text{well}$ of 1 mM compound from Column 1 in source plate to Column 3 in destination plate to make the first 300 μM dilution. After that, in destination plate, mixed and transferred 10 $\mu\text{l}/\text{well}$ of 300 μM dilution from column 3 to 4 to make the 100 μM dilution. Mixed and transferred 10 $\mu\text{l}/\text{well}$ of 100 μM dilution from column 4 to 5 to make the 30 μM dilution, --- etc. Made duplicate dilutions for each compound, for example, transferred 10 $\mu\text{l}/\text{well}$ of compound from A1 in source plate to A3 and B3 in destination plate. Repeated mixing and transferred. Then, transferred 10 $\mu\text{l}/\text{well}$ of 1 mM compound from Column 2 in source plate to Column 13 in destination plate to make the 300 μM dilution. After that, in destination plate, mixed and transferred 10 $\mu\text{l}/\text{well}$ of 300 μM dilution from column 13 to 14 to make the 100 μM dilution --- etc. One full 96-well source plate with Row H empty can make up to six compound destination plates.
- 25 4. Prepared standard compound parent plate: Added 5 $\mu\text{l}/\text{well}$ of 10 mM Roscovitine solution in 100% DMSO to H1 and H2 in a 96-well U-bottom polypropylene plate, then diluted to 1 mM solution with 45 $\mu\text{l}/\text{well}$ of 100% DMSO.
- 30

22

5. Prepare standard compound destination plate: In a 384-well round-bottom polypropylene plate (Corning™ storage plate), added 23 µl/well of H₂O to columns 3 & 13, 20 µl/well of 30% DMSO to columns 4 through 12 and columns 14 through 22 (Rows O and P only).
- 5 6. Prepared standard compound dilutions (10 dilutions, 300 µM, 100 µM, 30 µM, --- etc) on Biomek 2000™ using Profiling Standard program: Using single 20 µl tip transferred 10 µl/well of 1 mM standard compound from H1 in parent plate to O1 in destination plate to make the first 300 µM dilution. After that, in destination plate, mixed and transferred 10 µl/well of 300 µM dilution from O3 to O4 to make the 100 µM dilution. Mixed and transferred 10 µl/well of 100 µM dilution from O4 to O5 to make the 30 µM dilution, --- etc. Made duplicate dilutions for each standard compound, for example, transferred 10 µl/well of compound from H1 in parent plate to O3 and P3 in destination plate. Repeated mixing and transferred. Then, transferred 10 µl/well of 1 mM compound from H2 in parent plate to O13 in destination plate to make the 300 µM dilution. After that, in destination plate, mixed and transferred 10 µl/well of 300 µM dilution from O13 to O14 to make the 100 µM dilution --- etc.
- 10 7. In standard compound destination plate, added 20 µl/well of 30% DMSO (high control) to A through H and 20 µl/well of 45% H₃PO₄ (low control) to I through J in column 23.
- 15 20 Assay procedure:
 1. To the assay plate (Corning™ Non-binding 384-well plate), added 10 µl Enzyme & Substrate Solution, 2 µl of test compound, incubate at room temperature for 30 min (enzyme/compound pre-incubation step).
 - 25 2. Started Reaction by adding 10 µl ATP/ ³³P-ATP Solution.
 3. Incubated at room temperature for 120 min.
 4. Stopped the reaction by adding 20 µl Stop Buffer.
 5. Transferred 30 µl of reaction mixture to a 384-well Streptavidin Flashplate.
 8. Incubated at room temperature for 90 min.
 - 30 9. Washed Streptavidin Flashplate 2 times with 100 µl/well of Wash Buffer using Elx405 Automated Washer.
 10. Sealed and read the plate (40 sec/well) on Top Count™ scintillation counter.

*Ran assay from step 1 to step 5 using Biomek™ FX station.

5

Equation for curve fitting in IC₅₀ determination:

10
$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{HillSlope}))}$$

X is the logarithm of concentration.

Y is the response.

Y starts at Bottom and goes to Top with a sigmoid shape.

15 This is identical to the "four parameter logistic" equation.

The compound of Formula I resulted in an IC₅₀ of 1.7 nanoMolar with this assay.

20

VIABILITY ASSAY OF HEMATOLOGICAL MALIGNANT CELL LINES USING MTS REAGENT

1. PURPOSE

25

This method is to determine the viability of a liquid tumor cell line following treatment with a test compound. Tumor cells are maintained in suspension at log phase growth. On the day of use, cells are resuspended to a density of 0.05 to 0.1 million/ml and cells are incubated in 96 well plate with the test compounds for 96 hours. Viability of cells was measured by incubating cells with Promega's MTS reagent. The viability of the cell is proportional to the change in absorbance at 490 nm. By comparing the absorbance between control and compound-treated cells, the impact of the test compounds on the cell viability is determined as a percent of the control cell viability.

30

2. PROCEDURE

35

A. Materials

1. Cells:

Liquid tumor cell lines are obtained from either American Tissue Culture Collection or from DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH).

2. Culture medium:

- 5 Complete RPMI: RPMI-1640 medium with 25 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) and L-glutamine (Gibco/Invitrogen™, Cat. # 22400-089) + 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco/Invitrogen™, Cat. # 16140-071) + 1x Penicillin/Streptomycin (Gibco/Invitrogen, Cat. # 15070-063) + 50ug/ml Plasmocin (Invivogen™, Cat. # ant-mpt)
- 10 Phenol red free cRPMI: Phenol red free RPMI-1640 medium L-glutamine (Gibco/Invitrogen™, Cat. # Gibco/Invitrogen, 11835-030) + 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco/Invitrogen, Cat. # 16140-071) + 1x Penicillin/Streptomycin (Gibco/Invitrogen™, Cat. # 15070-063)

15 3. Other liquid reagents:

Promega™ MTS reagent (Cell Titer 96 Aqueous Cat. # G358B)

Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma™, Cat. # D2650)

4. Consumable supplies:

- 20 Sterile 96-well polystyrene tissue culture-treated clear plates with lid (Falcon™, Cat. # 3072)

5. Equipment:

Platereader, 96-well (SpectraMAX GeminiEM™, Molecular Devices, USA)

25 B. Method

Day 1: Preparation of test compounds

Dissolve and serial-dilute test compounds in DMSO at 1000x concentration.

- 30 Dilute 1:100 test compounds in phenol red free cRPMI in sterile 96-well polystyrene tissue culture plates

Use a 12-channel pipetor to transfer 10ul of diluted compound solution to the an empty 96 well plate to be used for cell incubation

35

25

Following addition of 100ul of cell cultures, the final concentration of test compounds would be 1x.

Day1 : Preparation of liquid tumor cells for compound treatment

Harvest cells in complete RPMI from log-phase cultures at densities of approximately 0.3-0.7

- 5 million/ml. Count cells and adjust to 0.1 million/ml in phenol red free cRPMI (For fast growing cells with doubling time of equal or less than 24 hours, e.g. K562, use 0.05 million/ml instead to avoid over-growing).

- Transfer triplicates of 100 μ l of cells to the wells of 96-well clear plates for a total of 10000 cells/ well. Note that each well already contains 10 μ l of 10x concentrated test compound prepared as above.

Cell incubation

Incubate cells for 72-96 hours at 37°C in a tissue culture incubator containing 5% CO₂.

C- Measurement : Determination of cell viability

- 15 1. Thaw the Promega's MTS reagent and add 20ul to each well with a repeat pipetor.
2. Mix the reagent in the well by rocking the plate and place the plate to a CO₂ tissue culture incubator at 37°C.
3. Prepare the "no cell" blank control by adding the MTS reagent to a row of wells containing 100ul of phenol red free cRPMI alone.
20 4. Incubate at 37°C until the absorbance at 490 nm for the control cells is >1.5.
5. Mix the cell culture by rocking to ensure the color is uniform in the wells, making sure there are no air bubbles. If present, centrifuge the plate at 1000xg on a bench top centrifuge to eliminate air bubbles.
6. Read the absorbance in the Molecular Devices 96-well plate reader.

25

D-Analysis of results:

1. Copy and paste the text data onto an Excel spreadsheet
2. Average the "no cell" blank data and subtract this value from the absorbance from each well containing cells.
30 3. Average the blank-corrected triplicate well data and compute standard deviation for replicate variation.
4. Average of control cell data:

5. Calculate the averaged compound-treated cell data as a percent of the averaged control cell data as follows:
- (Compound-treated value/control value) * 100 = % of control value
- Results:
- 5 We have determined the anti-proliferation activity of the compound of Formula I. As shown in Table 4, the compound of Formula I is consistently active in the two MCL cell lines of Jeko-1 and Granta-519. Furthermore, the compound of Formula I appears to be inhibitory against a relatively wide spectrum of hematological malignant cell lines (6 out of 15).

Disease	Cell line	IC50 (uM)	% Inhibition at max. conc. (10uM)
		A003397769 N=4	A003397769 N=4
AML	HL-60	3.7, 8.1, >10, >10	35
AML	KG-1	1.9	91
AML	ML-2	>10	28
B-ALL	Nalm-6	5.5	84
B-CLL	JVM-2	3.5, 3.6, 7.7, >10	60
B-CLL	JVM-2	6.8, 7.0, 8.4, >10	59
B-NHL	DLCL-2	1.4, >10, >10, >10	0
B-NHL	DOHH-2	4.5	75
CML	Jurl-MK1	1.2, >10, >10, >10	28
CML	K562	3.9, >10, >10, >10	21
MCL	Jeko-1	3.1	97
MCL	Granta-519	3.4	67
MM	L-363	5.5	61
MM	RPM18226	>10	36
T-ALL	Jurkat	6.8, >10, >10, >10	43

Table 4: Effects of Syk compound on viability of liquid tumor cell lines (MTS assay)

15 INHIBITION OF RAT COLLAGEN INDUCED ARTHRITIS

Introduction

Collagen-induced arthritis (CIA) is a well characterized model of human rheumatoid arthritis (RA) that can be induced in genetically susceptible rodents following immunization with type II collagen (cII) in adjuvant. Both CIA and RA exhibit severe swelling / inflammation of the joints, synovial hyperplasia and cartilage and bone erosion. This chronic inflammatory

arthritis induced by immunization with cII consists of both a T cell component, as evidenced by attenuated CIA in T cell-deficient mice and a B cell component. B cell-deficient mice, xid mice or mice with a null mutation in CXCR5 fail to develop CIA.

5 **Methods:**

Immunization and Challenge: Female Lewis rats were immunized on day 0 and challenged on day 7 with cII from bovine nasal mixed with Freund's incomplete adjuvant at a final collagen concentration of 1.0 mg/ml. The animals were injected at the base of the tail with 400 µg of cII.

10

Prophylactic Dosing Regimen: The compound of Formula I (3.0, 10, and 30 mg/kg) was orally dosed (p.o.) twice daily (b.i.d.) starting on day 6 and continued through day 21.

Combination Dosing Regimen: Rats were dosed with the compound of Formula I (3.0 and 10 mg/kg, p.o., bi.d.) or Methotrexate (MTX, 0.1 and 0.2 mg/kg, p.o., q.d.) as monotherapy or in combinations consisting of each dose of the compound of Formula I with each dose of MTX starting on day 6 and continuing through day 21. .

15

Therapeutic Dosing Regimen: The compound of Formula I (10 and 30 mg/kg, p.o., b.i.d.) was orally administered starting on day 12 and continued through day 21.

20

Joint Pathology: Ankle joint swelling was measured to the nearest 0.01 mm by using electronic digital calipers. Measurements were recorded 7 times throughout the study starting on day 6 and ending on day 21. Body weights were recorded on the same days. On day 21, hind paws were removed at the hairline just above the ankle and fixed in 10% neutral buffered formalin.

25

MicroCT analysis: Ankle joints were examined using a cone-beam µCT scanner. A scout view scan was obtained first for selection of the examination volume of the specimens, followed by positioning, measurement and computational reconstruction. In ankle joints, the ratio of bone surface to bone volume, describing the complexity of bone surface in a certain volume, was analyzed.

30

Statistical Analysis: For joint swelling / inflammation, data were analyzed using Everstat v.5 software and a 2-way repeated measure ANOVA with Dunnett's post test. MicroCT data were analyzed by Everstat using a 1-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test. Data are presented as the mean $\pm$ SEM and p values of <0.05 are considered significant.

5

Results:

Prophylactic Dosing:

- 10 Digital Caliper Measurements of joint swelling / inflammation (Figure 2).
- The compound of Formula I (3.0 mg/kg) significantly reduced ankle swelling / inflammation compared to vehicle treated rats on day 12 only.
 - The compound of Formula I (10 mg/kg) significantly reduced ankle swelling / inflammation compared to vehicle treated rats on days 12 through 19.
 - 15 - The compound of Formula I (30 mg/kg) significantly reduced ankle swelling / inflammation compared to vehicle treated rats from day 12 through day 21.

MicroCT analysis (Figure 3).

- The compound of Formula I (3, 10 or 30mg/kg, b.i.d.) demonstrated significant reductions in
- 20 bone erosion when compared to the vehicle-treated rats (measured by the ratio of bone surface to bone volume).

Combination Dosing:

- 25 Digital Caliper Measurements of joint swelling / inflammation (Figure 4, 5).
- The compound of Formula I (10 mg/kg) significantly reduced ankle swelling / inflammation compared to vehicle-treated rats from days 15 through 21.
 - Combination therapy of the compound of Formula I (10 mg/kg) plus MTX (either 0.2 or 0.1 mg/kg) demonstrated a significant reduction in ankle swelling / inflammation from day 15 –
 - 30 day 21 compared to that observed in rats dosed with either the compound of Formula I (10 mg/kg) or MTX (0.2 or 0.1 mg/kg) as monotherapy.

- The compound of Formula I (3.0 mg/kg) as monotherapy or as combination therapy with MTX (0.1 mg/kg) failed to significantly impact on disease severity as measured by joint swelling / inflammation.

- 5 - The compound of Formula I (3.0 mg/kg) as combination therapy with MTX (0.2 mg/kg) demonstrated a significant reduction in joint swelling / inflammation above what was observed when either drug was dosed as monotherapy on measurement taken from days 18 through 21.

MicroCT analysis (Figure 6):

- 10 -Three-dimensional images demonstrated significant bone erosion / destruction in joints of vehicle-treated rats.
- Dosing of rats with the compound of Formula I (10 mg/kg, po, bid) resulted in a significant decrease in bone erosion versus vehicle-treated rats. A significant decrease was not observed in rats dosed with 3 mg/ kg the compound of Formula I.
- 15 -Monotherapy with MTX (0.2 mg/kg, po, qd) resulted in a significant decrease in bone erosion. This effect was not seen in rats dosed with 0.1 mg/kg MTX.
- When treated with combinations of the compound of Formula I and MTX, all groups showed a significant decrease in the ratio of bone surface to bone volume compared to vehicle-treated rats.
- 20 -Combination therapy of the compound of Formula I (10mg/kg, bid, po) with MTX (0.2 mg/kg, qd) resulted in additive protection from bone erosion versus that observed in rats receiving monotherapy with either the compound of Formula I or MTX.

Therapeutic Dosing

Digital Caliper Measurements of joint swelling / inflammation (Figure 7).

- 25 - Even when administered in a therapeutic regimen in which dosing was delayed until arthritis was visually evident, the compound of Formula I (10 and 30 mg/kg, p.o., b.i.d.) significantly reduced ankle swelling / inflammation from day 15 – 21

MicroCT analysis (Figure 8):

- 30 - Compared to vehicle-treated, CIA rats dosed therapeutically with the compound of Formula I (10mg/kg or 30mg/kg) exhibited a significant decrease in bone erosion as measured by the ratio of bone surface to bone volume.

Summary:

These studies confirm that inhibition of syk kinase by the compound of Formula I can significantly delayed both the onset and progression of rat CIA as measured by decreased in joint swelling /inflammation and bone erosion. Importantly, significant inhibition of disease progression and severity were observed in rats in which dosing was delayed until visible signs of arthritis were evident. New clinical therapies for RA are normally given in combination with MTX. Our data in a rodent model of arthritis demonstrate additive effects when the compound of Formula I is dosed in combination with MTX indicating that combination therapy of the compound of Formula I and MTX could produce synergistic clinical effects in RA patients.

ANGIOGENESIS ASSAY

Female Lewis rats (5 week-old, 150-175 g) were anesthetized using xylazine (4 mg/kg) and ketamine (80 mg/kg). Cellulose sponges (diameter 10 mm, Vivoxid Ltd.TM, Turku, Finland) containing 50 µl of either FGF-2 (fibroblast growth factor 2) solution (containing 400 ng of FGF-2) or vehicle (physiological salt solution, bovine serum albumin 0.08 %) were then implanted subcutaneously on the back of the animals. During the two following days further angiogenesis was induced by daily injection through the skin and into the sponges of 50 µl of FGF-2 solution or vehicle (basal conditions). One week after sponge implantation, animals were euthanized using an overdose of pentobarbital and the sponges were dissected out. The sponges were then minced and homogenized in lysis buffer (NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton X100 1%, sodium deoxycholate 0.5%, NaF 10 mM, Tris/HCl 30 mM pH 7.8 containing a protease inhibitor cocktail (P8340, Sigma-AldrichTM, St Louis, USA)) using Lysing Matrix D tubes (MP BiomedicalsTM, Illkirch, France) in a Fastprep homogenizer (QbiogeneTM, Illkirch, France). Hemoglobin concentration, indicative of vascular volume, was determined using the Drabkin assay (Pierce BiotechnologyTM, Rockford, Illinois, USA). Compounds were administered by oral gavage as a suspension in aqueous methylcellulose 0.6%, Tween 80 0.5% solution.

30

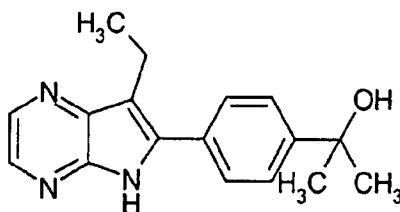
The effects of the compound of Formula I on rat weight are shown in Figure 9. The effects of the compound of Formula I on hemoglobin concentration (mg/ml) are shown in Figure 10.

31

CLAIMS

What is claimed is:

- 5 1. A compound of formula (I):



(I)

- 10 or a corresponding N-oxide, or a prodrug; or a pharmaceutically acceptable salt or solvate of such compound; and the N-oxide and the prodrug, of the salt and solvate.
2. A pharmaceutical composition, comprising a compound according to claim 1, together with at least one pharmaceutically acceptable carrier or excipient.
- 15 3. A method of treating joint inflammation in a patient comprising: administering to a patient in need thereof an effective amount of a compound according to claim 1.
4. A method of treating rheumatoid arthritis in a patient, comprising: administering to a patient in need thereof an effective amount of a compound according to claim 1.
- 20 5. A method of treating joint inflammation in a patient comprising: administering to a patient in need thereof an effective amount of a compound according to claim 1, in combination with methotrexate.
- 25 6. A method of treating rheumatoid arthritis in a patient comprising: administering to a patient in need thereof an effective amount of a compound according to claim 1, in combination with methotrexate.

42

7. A method of treating a tumor in a patient, comprising: administering to a patient in need thereof an effective amount of a compound according to claim 1.

5 8. A method of treating a mantle cell lymphoma in a patient, comprising: administering to a patient in need thereof an effective amount of a compound according to claim 1.

9. A method of inhibiting angiogenesis in a patient, comprising: administering to a patient in need thereof an effective amount of a compound according to claim 1.

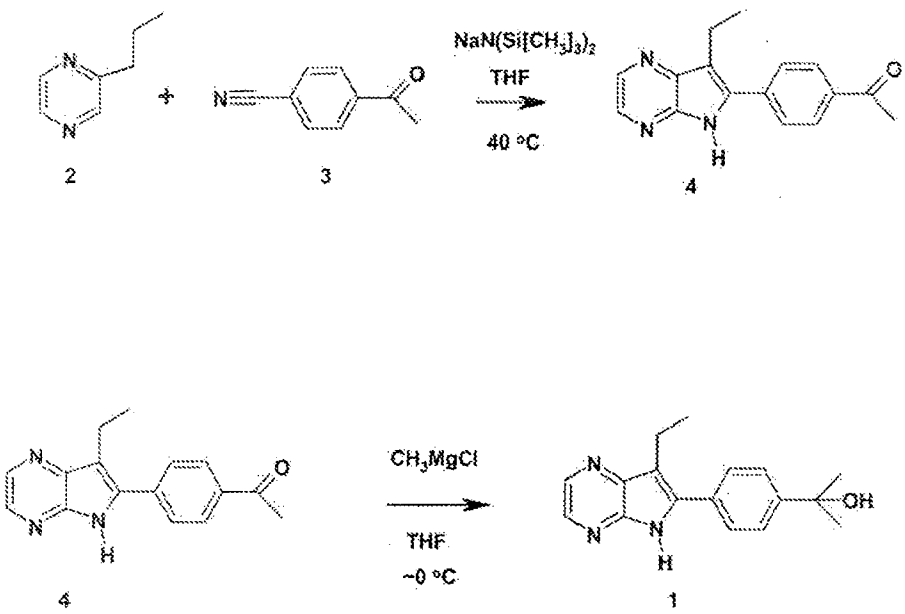


FIGURE 1

2/10

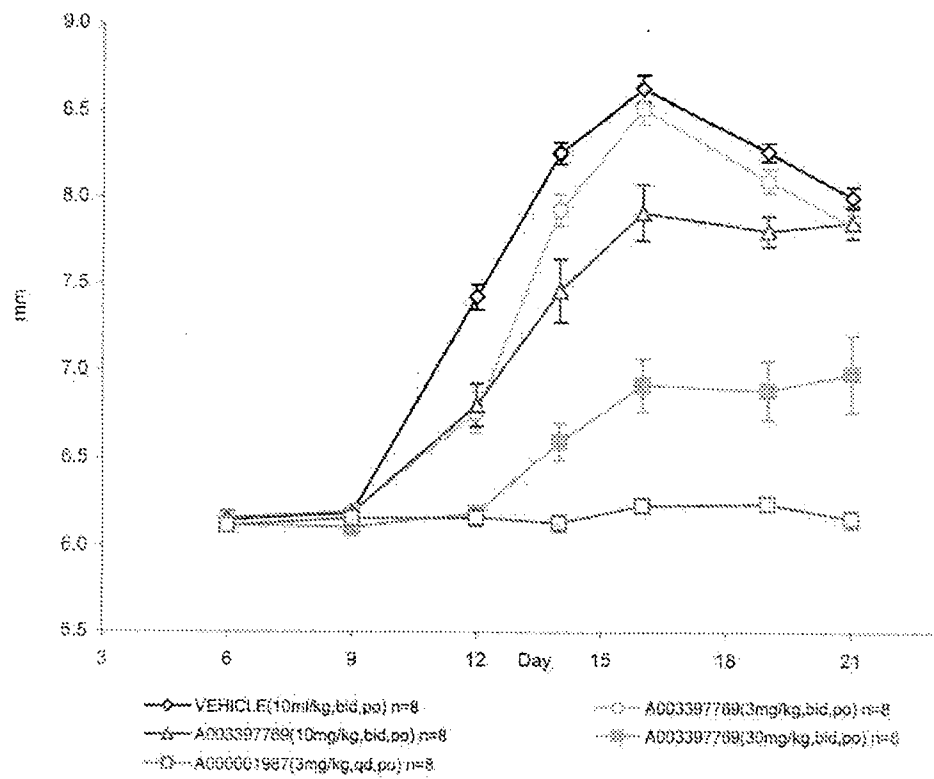
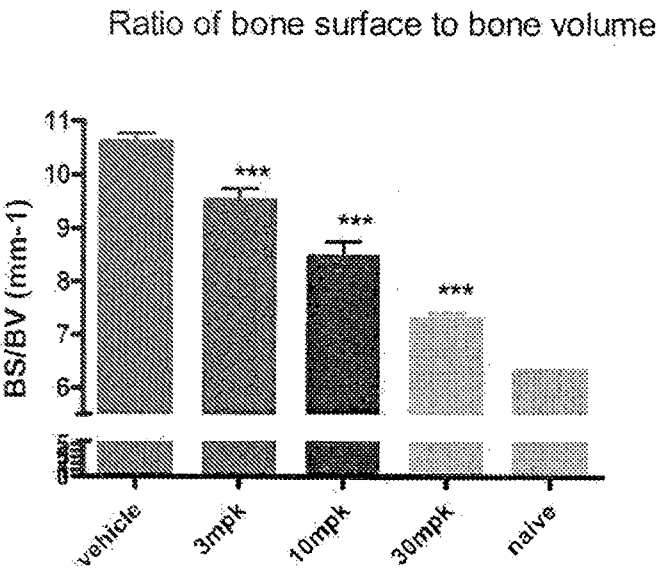


FIGURE 2

45



***p<0.001 compared to the vehicle group

FIGURE 3

4/10

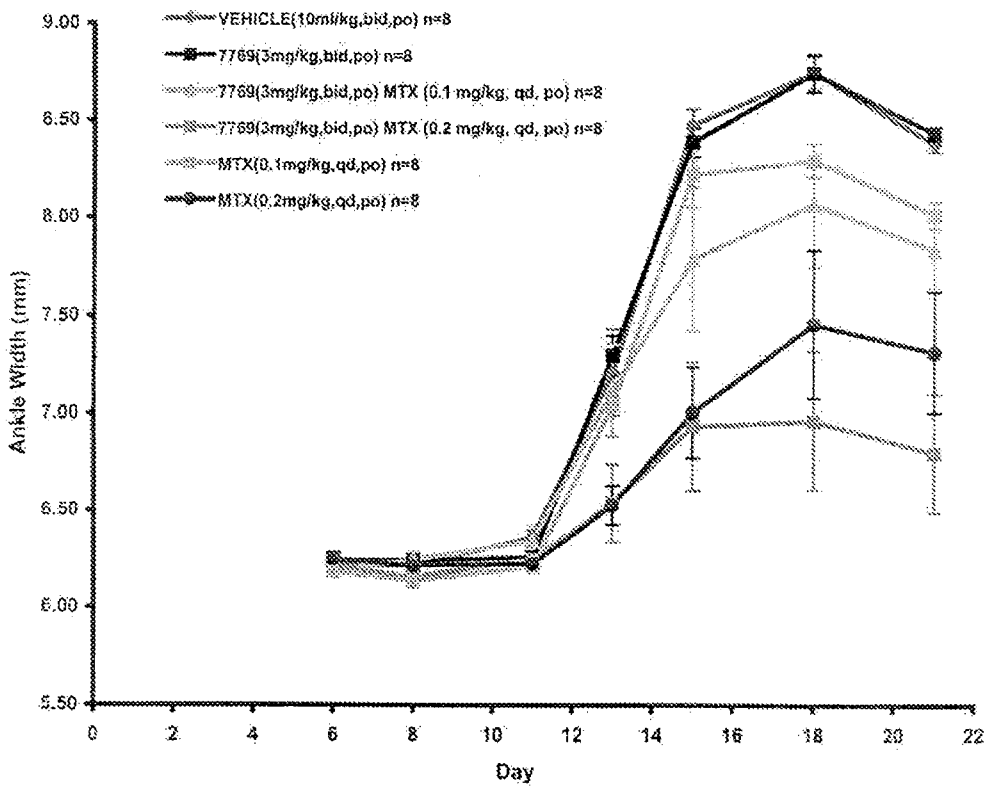


FIGURE 4

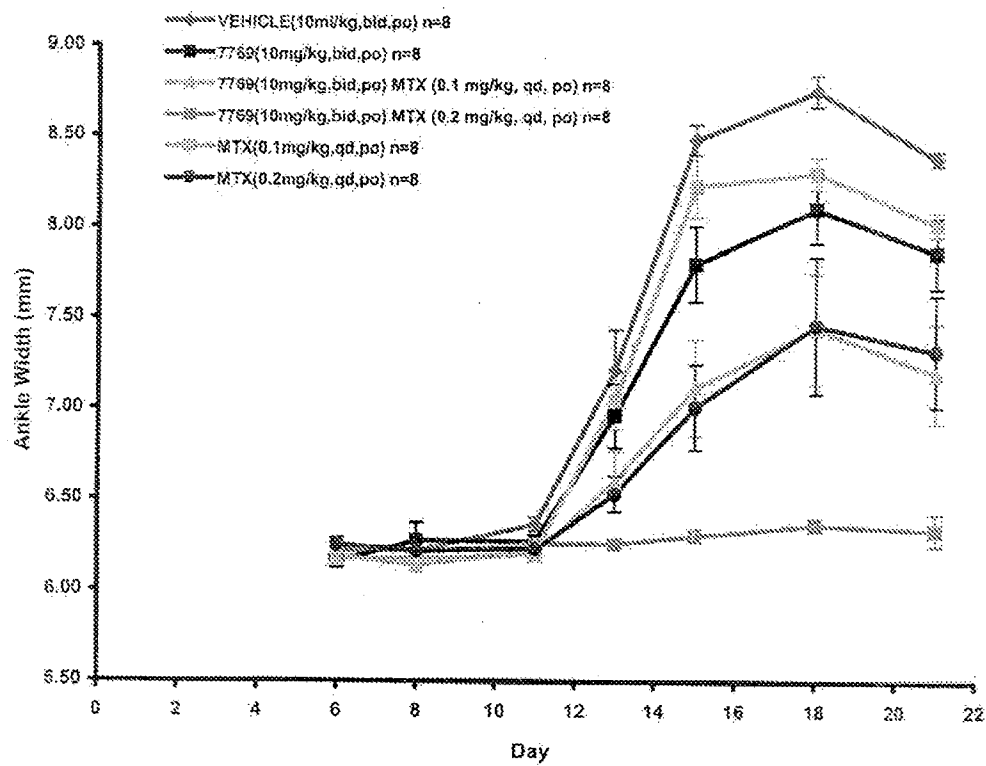
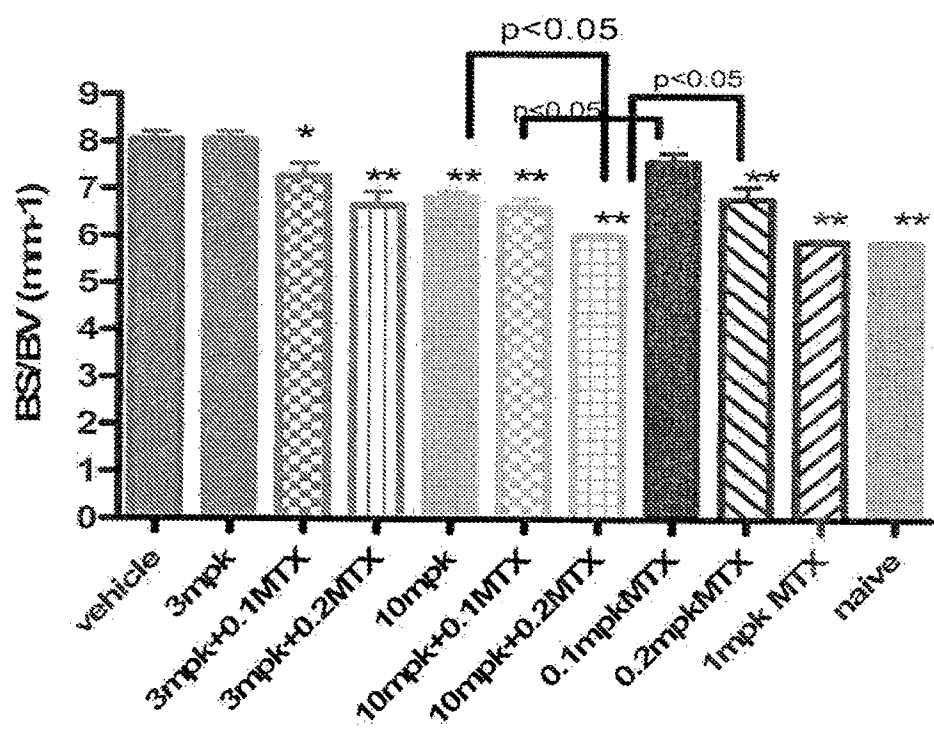


FIGURE 5

Ratio of bone surface to bone volume
in A003397769 treated CIA rat ankles



* P<0.05 ** P<0.001 compared to the vehicle group

FIGURE 6

7/10

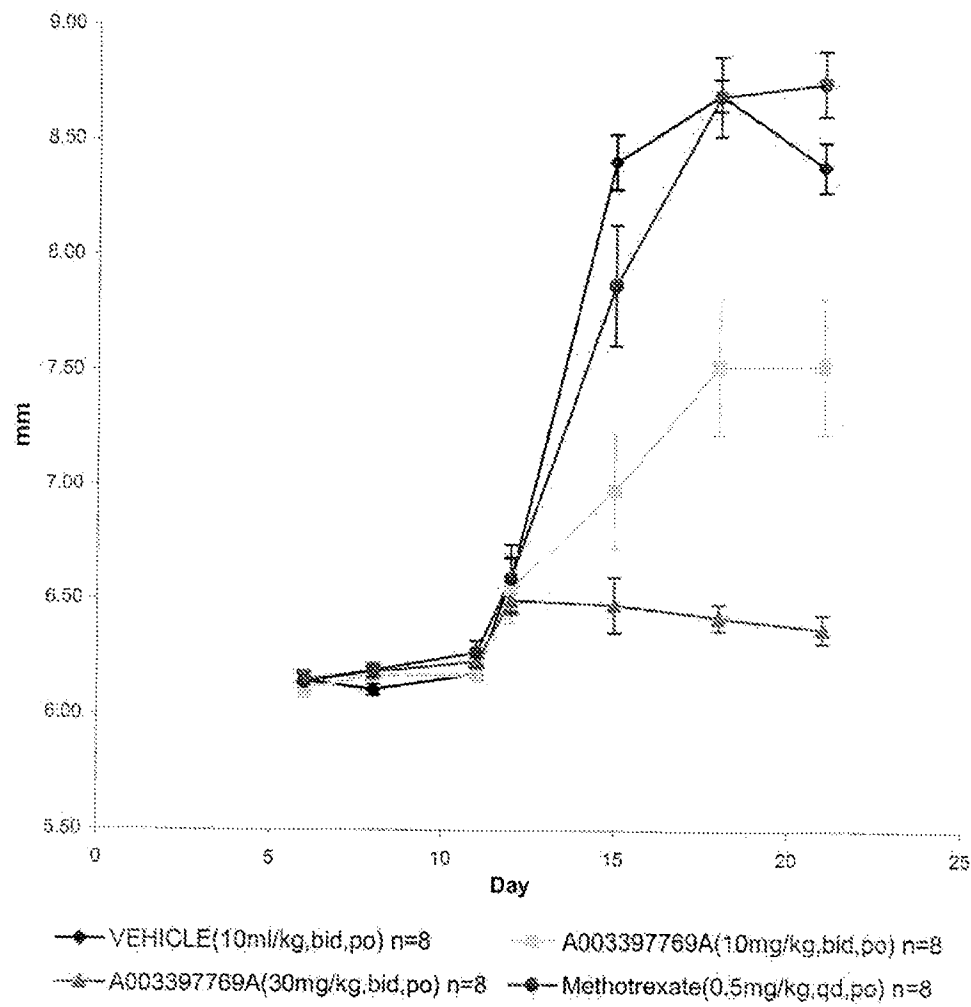
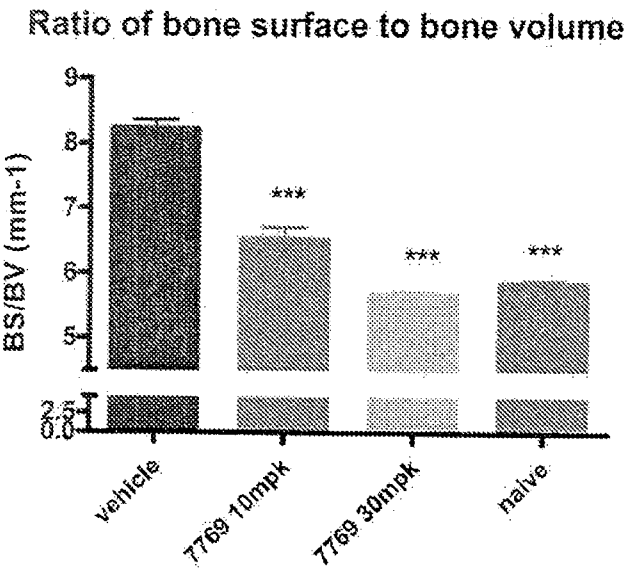


FIGURE 7

50



***p<0.001 compared to the vehicle group

FIGURE 8

S1

9/10

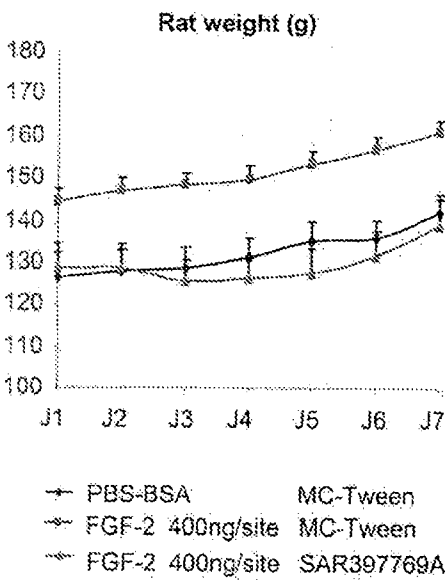


FIGURE 9

10/10

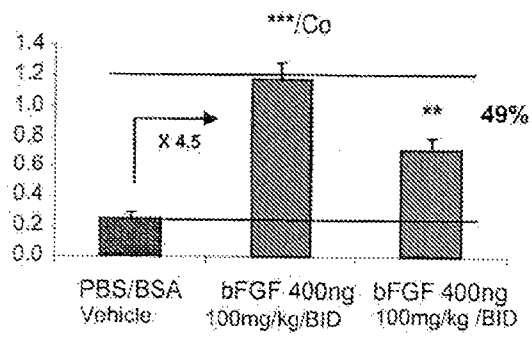


FIGURE 10

- 1 -

INHIBIDOR DE QUINASA

REFERENCIA CRUZADA

5

10

15

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a azaindoles sustituidos, a su preparación, a composiciones
20 farmacéuticas que contienen estos compuestos y a su uso farmacéutico en el tratamiento de
patologías que pueden modularse por la inhibición de las proteína quinasas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

25

Las proteína quinasas participan en los eventos de señalización que controlan la activación,
crecimiento y diferenciación de las células en respuesta a mediadores extracelulares y a
cambios en el medio. En general, estas quinasas se clasifican dentro de varios grupos; las
que fosforilan preferentemente restos de serina y/o treonina y los que fosforilan
30 preferentemente restos de tirosina [S. K. Hanks y T. Hunter, FASEB. J., 1995, 9, páginas
576-596]. Las serina/treonina quinasas incluyen, por ejemplo, isoformas de proteína
quinasas C [A. C. Newton, J. Biol. Chem., 1995, 270, páginas 28495-28498] y un grupo de
quinasas dependientes de ciclina tales como cdc2 [J.Pines, Trends in Biochemical Sciences,
1995, 18, páginas 195-197]. Las tirosina quinasas incluyen receptores de factores del
35 crecimiento transmembrana tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico [S.

Iwashita y M. Kobayashi, Cellular Signalling, 1992, 4, páginas 123-132], y quinasas citosólicas no asociadas a receptores tales como las quinasas p56lck, p59fyn, ZAP-70 y csk [C.Chan et. al., Ann. Rev. Immunol., 1994, 12, páginas 555-592].

- 5 Una actividad quinasa inapropiadamente elevada se ha implicado en muchas enfermedades debidas a una función celular anómala. Esto puede ocurrir de forma directa o indirecta, por ejemplo, por el fallo de los mecanismos de control apropiados para la quinasa, relacionado, por ejemplo, con mutación, sobreexpresión o una activación inapropiada de la enzima; o por una sobre- o infraproducción de citoquinas o factores de crecimiento que también participan
- 10 en la transducción de señales corriente arriba o corriente abajo de la quinasa. En todos estos casos, sería de esperar que la inhibición selectiva de la acción de la quinasa tuviera un efecto beneficioso.

- Syk es una proteína tirosina quinasa citoplásmica de 72-kDa que se expresa en una
- 15 diversidad de células hematopoyéticas y es un elemento esencial en varias cascadas que acoplan receptores de antígenos a respuestas celulares. De esta manera, Syk juega un papel central en la señalización del receptor de IgE de alta afinidad, FcεR1, en mastocitos y en la señalización de receptores antigénicos en linfocitos T y B. Las rutas de transducción de señales presentes en mastocitos, células T y células B tienen características comunes. El
- 20 dominio de unión al ligando del receptor carece de actividad tirosina quinasa intrínseca. Sin embargo, interaccionan con subunidades de transducción que contienen motivos de activación basados en tirosina de inmunorreceptores (ITAM) [M.Reth, Nature, 1989, 338, páginas 383-384]. Estos motivos están presentes tanto en las subunidades β como en las subunidades γ de FcεR1, en la subunidad ξ del receptor de células T (TCR) y en las
- 25 subunidades IgGα e IgG β del receptor de células B (BCR). [N.S.van Oers y A.Weiss, Seminars in Immunology, 1995, 7, páginas 227-236] Tras la unión del antígeno y la multimerización, los restos de ITAM se fosforilan por proteínas tirosina quinasas de la familia Src. Syk pertenece a una clase única de tirosina quinasas que tienen dos dominios de homología al dominio 2 de Src (SH2) en tándem y un dominio catalítico C terminal. Estos
- 30 dominios SH2 se unen con alta afinidad a ITAM y esta asociación mediada por SH2 de Syk con un receptor activado estimula la actividad quinasa Syk y localiza Syk en la membrana plasmática.

- En ratones deficientes en Syk, se inhibe la desgranulación de mastocitos, lo que sugiere que
- 35 es una diana importante para el desarrollo de agentes estabilizadores de mastocitos

- [P.S.Costello, *Oncogene*, 1996, 13, páginas 2595-2605]. Ciertos estudios similares han demostrado un papel crítico para Syk en la señalización de BCR y TCR [A.M.Cheng, *Nature*, 1995, 378, páginas 303-306, (1995) y D.H.Chu et al., *Immunological Reviews*, 1998, 165, páginas 167-180]. Syk también parece estar implicado en la supervivencia de eosinófilos en respuesta a IL-5 y GM-CSF [S. Yousefi et al., *J. Exp. Med.*, 1996, 183, páginas 1407-1414]. A pesar del papel clave de Syk en la señalización de mastocitos, BCR y células T, se sabe poco sobre el mecanismo por medio del cual Syk transmite efectores corriente abajo. Se ha demostrado que dos proteínas adaptadoras, BLNK (proteína enlazadora de células B, SLP-65) y SLP-76 son sustratos de Syk en células B y en mastocitos respectivamente, y se ha postulado que conectan Syk con efectores corriente abajo [M. Ishiai et al., *Immunity*, 1999, 10, páginas 117-125 y L. R. Hendricks-Taylor et al., *J. Biol. Chem*, 1997, 272, páginas 1363-1367]. Además, Syk parece jugar un papel importante en la ruta de señalización de CD40, que juega un papel importante en la proliferación de células B [M. Faris et al., *J.Exp. Med.*, 1994, 179, páginas 1923-1931].
- Syk está implicada además en la activación de plaquetas estimulada por el receptor de IgG de baja afinidad (Fc gamma-RIIA) o estimulada por colágeno [F. Yanaga et al., *Biochem. J.*, 1995, 311, (Pt. 2) páginas 471-478].
- La quinasa de adhesión focal (FAK) es una tirosina quinasa no asociada con receptores en las rutas de transducción de señales mediadas por integrina. FAK se colocaliza con las integrinas en sitios de contacto focal y en muchos tipos celulares se ha demostrado que la activación de FAK y su fosforilación de tirosina es dependiente de la unión de las integrinas a sus ligandos extracelulares. Los resultados de varios estudios confirman la hipótesis de que los inhibidores de FAK podrían ser útiles en el tratamiento de cánceres. Por ejemplo, las células con deficiencias en FAK migran de manera deficiente en respuesta a señales quimiotácticas y la sobreexpresión del dominio C-terminal de FAK bloquea la propagación celular así como la migración quimiotáctica (Sieg et al, *J. Cell Science*, 1999, 112, 2677-2691; Richardson A. y Parsons T., *Cell*, 1997, 97, 221-231); además, las células tumorales tratadas con oligonucleótidos antisentido FAK pierden su unión y experimentan apoptosis (Xu et al, *Cell Growth Differ.* 1996, 4, 413-418). Se ha notificado que FAK se sobreexpresa en cánceres de próstata, mama, tiroides, colon y pulmón. El nivel de expresión de FAK está correlacionado directamente con tumores, demostrando el fenotipo más agresivo.
- La angiogénesis o la formación de nuevos vasos sanguíneos que crecen a partir de la

vasculatura preexistente tiene una importancia central en el desarrollo embrionario y la organogénesis. Se observa una neovascularización aumentada anómala en la artritis reumatoide, retinopatía diabética y durante el desarrollo tumoral (Folkman, Nat. Med., 1995, 1, 27-31.). La angiogénesis es un proceso complejo de múltiples etapas que incluye la

5 activación, migración, proliferación y supervivencia de las células endoteliales. Ciertos estudios exhaustivos en el campo de la angiogénesis tumoral en las últimas dos décadas han identificado varios agentes terapéuticos que incluyen quinasas, proteasas e integrinas, que han tenido como resultado el descubrimiento de muchos agentes anti-angiogénicos nuevos, incluyendo inhibidores de KDR de los que algunos están actualmente en evaluación clínica

10 (Jekunen, et al Cancer Treatment Rev. 1997, 23, 263-286). Los inhibidores de la angiogénesis pueden usarse en situaciones de primera línea, adyuvantes e incluso preventivas para la aparición o reaparición de malignidades.

Se han identificado varias proteínas implicadas en la segregación cromosómica y el

15 ensamblaje del huso mitótico en levaduras y en drosophila. La ruptura de estas proteínas tiene como resultado una segregación errónea de los cromosomas y husos mitóticos monopares o rotos. Entre estas quinasas se encuentran las quinasas Ipl1 y aurora de *S. cerevisiae* y *drosophila* respectivamente, que son necesarias para la separación del centrosoma y la segregación cromosómica. Recientemente se ha clonado e identificado un

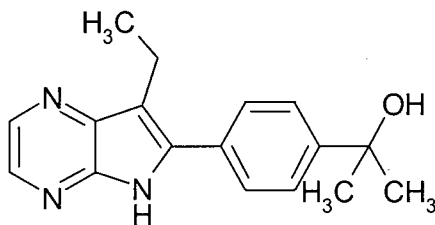
20 homólogo humano de Ipl1 de levadura por diferentes laboratorios. Esta quinasa, denominada Aurora2, STK15 o BTAK pertenece a la familia de serina/treonina quinasas. Bischoff et al. demostraron que Aurora2 es oncogénica y está amplificada en cánceres colorrectales humanos (EMBO J, 1998, 17, 3052-3065). También se ha ejemplificado en cánceres que implican tumores epiteliales tales como cáncer de mama.

25 Se ha descubierto un nuevo azaindol sustituido que tiene propiedades farmacéuticas valiosas, en particular, la capacidad de inhibir proteína quinasas y, más particularmente, la capacidad de inhibir selectivamente la quinasa Syk. Este compuesto de azaindol está relacionado con los descritos en la Patente de Estados Unidos 6.770.643, pero no se describe

30 específicamente en esta patente.

COMPENDIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I:



(I)

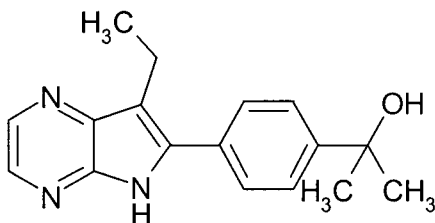
- 5 una sal farmacéuticamente aceptable o un profármaco del mismo, o un solvato de dicho compuesto, su sal o su profármaco.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula I, y a un método para usar el compuesto de fórmula I para el

10 tratamiento o prevención de una afección fisiológica relacionada con Syk en un paciente.

La invención también se refiere a un proceso para preparar un compuesto que es un intermedio útil en la preparación de un compuesto de fórmula I.

- En otro aspecto, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que
- 15 comprenden compuestos de fórmula general (I):



(I)

- 20 el N-óxido correspondiente y el profármaco; y una sal farmacéuticamente aceptable y solvato (por ejemplo, hidrato) de dicho compuesto; y el N-óxido y el profármaco; junto con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25

FIGURA 1: Esquema de reacción para preparar un compuesto de Fórmula I.

FIGURA 2: Diámetro medio de la articulación del tobillo de ratas a las que se les ha inyectado colágeno de tipo II de origen nasal bovino en adyuvante incompleto de Freund y
5 tratadas con A003397769, el compuesto de Fórmula I (3,0, 10 ó 30 mg/kg b.i.d.) desde el día 6 al día 21. Diámetros medios de la articulación del tobillo de ratas LEW hembra sensibilizadas por inyección intradérmica de colágeno en adyuvante incompleto de Freund (400 µg/400 µl/rata) los días 0 y 7. Los animales recibieron la dosificación los días 6 - 21.

10 FIGURA 3: Análisis de erosión del hueso (relación entre superficie ósea y volumen óseo) en el calcáneo de ratas CIA tratadas con A003397769 (3,0, 10 ó 30 mg/kg).

FIGURA 4: Diámetro medio de la articulación del tobillo de ratas a las que se les ha inyectado colágeno de tipo II de origen nasal bovino en adyuvante incompleto de Freund y
15 tratadas con A003397769 (3,0 mg/kg) solo o en combinación con Metotrexato (0,1 ó 0,2 mg/kg) desde el día 6 al día 20 ó 21 y en comparación con los animales que han recibido la dosis de vehículo. Efectos del inhibidor de SYK, A003397769 (3,0 mg/kg b.i.d.), como monoterapia o en combinación con Metotrexato sobre rata CIA.

20 FIGURA 5: Diámetro medio de la articulación del tobillo de ratas a las que se les ha inyectado colágeno de tipo II de origen nasal bovino en adyuvante incompleto de Freund y tratadas con A003397769 (10 mg/kg) solo o en combinación con Metotrexato (0,1 ó 0,2 mg/kg) desde el día 6 al día 20 ó 21 y en comparación con los animales que han recibido la dosis de vehículo. Efectos del inhibidor de SYK, A003397769 (10 mg/kg b.i.d.), como
25 monoterapia o en combinación con Metotrexato sobre rata CIA.

FIGURA 6: Análisis de erosión del hueso (relación entre la superficie del hueso y el volumen óseo) en el calcáneo de ratas CIA tratadas con A003397769 (3,0 ó 10 mg/kg) solo o en combinación con Metotrexato (0,1 ó 0,2 mg/kg).

30

FIGURA 7: Diámetro medio de la articulación del tobillo de ratas a las que se les ha inyectado colágeno de tipo II de origen nasal bovino en adyuvante incompleto de Freund y tratadas terapéuticamente con A003397769A (10 y 30 mg/kg b.i.d) desde el día 12 al día 21. Diámetros medios de la articulación del tobillo de ratas Lewis hembra sensibilizadas por
35 inyección intradérmica de colágeno en adyuvante incompleto de Freund (400 µg/400

μl/rata) los días 0 y 7. Media de las dos patas.

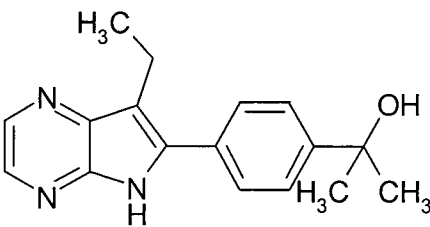
FIGURA 8: Análisis de erosión del hueso (relación entre la superficie ósea y el volumen óseo) en el calcáneo de ratas CIA tratadas terapéuticamente con A003397769A (10 ó 30 mg/kg b.i.d.).

FIGURA 9: Efectos del compuesto de Fórmula I sobre el peso de la rata.

FIGURA 10: Efectos del compuesto de Fórmula I sobre la concentración de hemoglobina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula general (I):



(I)

que también puede conocerse como: 2-[4-(7-Etil-5H-pirrolo[2,3-b]pirazin-6-il)-fenil]-propan-2-ol.

En la presente memoria descriptiva, la expresión "compuesto de la invención", y expresiones equivalentes, pretende incluir un compuesto de fórmula general (I) como se ha descrito anteriormente en este documento, incluyendo dicha expresión los profármacos, las sales farmacéuticamente aceptable y los solvatos, por ejemplo, hidratos, cuando el contexto lo permita. Análogamente, la referencia a intermedios, reivindicados o no por sí mismos, pretende incluir sus sales y solvatos, cuando el contexto lo permita. Por claridad, en algunas ocasiones se indican en el texto casos particulares en los que el contexto lo permite, pero estos casos son puramente ilustrativos y no pretenden excluir otros casos cuando el contexto lo permita.

Abreviaturas usadas en este documento:

ATP adenosina trifosfato

5 DTT ditioneitol

PBS solución salina tamponada con fosfato

Como se ha usado anteriormente y se usa a lo largo de la descripción de la invención, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique otra cosa, tienen los
10 siguientes significados:

El término "paciente" incluye seres humanos y otros mamíferos.

El término "profármaco" se refiere a un compuesto que puede convertirse in vivo por medios
15 metabólicos (por ejemplo, por hidrólisis) en un compuesto de fórmula (I), incluyendo N-óxidos del mismo. Por ejemplo, un éster de un compuesto de fórmula (I) que contiene un grupo hidroxilo puede convertirse por hidrólisis in vivo en la molécula parental. Como alternativa, un éster de un compuesto de fórmula (I) que contiene un grupo carboxilo puede convertirse por hidrólisis in vivo en la molécula parental.

20

Son ésteres adecuados de los compuestos de fórmula (I) que contienen un grupo hidroxilo, por ejemplo, acetatos, citratos, lactatos, tartratos, malonatos, oxalatos, salicilatos, propionatos, succinatos, fumaratos, maleatos, metileno-bis-β-hidroxinaftoatos, gentisatos, isetionatos, di-p-toluoiltartratos, metanosulfonatos, etanosulfonatos, bencenosulfonatos,
25 p-toluenosulfonatos, ciclohexilsulfamatos y quinatos.

Una clase especialmente útil de ésteres de compuestos de fórmula (I) que contienen un grupo hidroxilo puede formarse a partir de restos ácidos seleccionados entre los descritos por Bundgaard et. al., J. Med. Chem., 1989, 32, páginas 2503-2507, e incluye (aminometil)-
30 benzoatos sustituidos, por ejemplo dialquilamino-metilbenzoatos en los que los dos grupos alquilo pueden estar unidos y/o interrumpidos con un átomo de oxígeno o con un átomo de nitrógeno opcionalmente sustituido, por ejemplo, un átomo de nitrógeno alquilado, más especialmente (morfolino-metil)benzoatos, por ejemplo, 3- o 4-(morfolinometil)-benzoatos, y (4-alkilpiperazin-1-il)benzoatos, por ejemplo, 3- o 4-(4-alkilpiperazin-1-il)benzoatos.

35

Algunos de los compuestos de la presente invención son básicos, y tales compuestos son útiles en forma de la base libre o en forma de una sal de adición de ácidos farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 Las sales de adición de ácidos son una forma de uso más conveniente; y en la práctica, el uso de la forma de sal equivale intrínsecamente al uso de la forma de base libre. Los ácidos que pueden usarse para preparar las sales de adición de ácidos incluyen preferiblemente los que producen, cuando se combinan con la base libre, sales farmacéuticamente aceptables, es decir, sales cuyos aniones no son tóxicos para el paciente en dosis farmacéuticas de las
- 10 sales, para que los efectos inhibidores beneficiosos intrínsecos de la base libre no estén viciados por los efectos secundarios atribuibles a los aniones. Aunque se prefieren sales farmacéuticamente aceptable de dichos compuestos básicos, todas las sales de adición de ácidos son útiles como fuentes de la forma de base libre incluso si la sal particular, per se, se desea sólo como producto intermedio como, por ejemplo, cuando la sal se forma únicamente
- 15 para fines de purificación e identificación, o cuando se usa como intermedio para preparar una sal farmacéuticamente aceptable por procedimientos de intercambio iónico. Las sales farmacéuticamente aceptables dentro del alcance de la invención incluyen las obtenidas a partir de ácidos minerales y ácidos orgánicos, e incluyen hidroháluros, por ejemplo, hidroclo-
ruros e hidrobromuros, sulfatos, fosfatos, nitratos, sulfamatos, acetatos, citratos,
- 20 lactatos, tartratos, malonatos, oxalatos, salicilatos, propionatos, succinatos, fumaratos, maleatos, metileno-bis-b-hidroxinaftoatos, gentisatos, isetionatos, di-p-toluoiltartratos, metano-sulfonatos, etanosulfonatos, bencenosulfonatos, p-toluenosulfonatos, ciclohexilsulfamatos y quinatos.
- 25 Además de ser útiles por sí mismas como compuestos activos, las sales de los compuestos de la invención son útiles para los fines de purificación de los compuestos, por ejemplo por explotación de las diferencias de solubilidad entre las sales y los compuestos parentales, productos secundarios y/o materiales de partida por técnicas bien conocidas por los especialistas en la técnica.
- 30 Los compuestos de la invención muestran una actividad farmacológica útil y, por consiguiente, se incorporan en composiciones farmacéuticas y se usan en el tratamiento de pacientes que padecen ciertos trastornos médicos. Por lo tanto, la presente invención proporciona, de acuerdo con un aspecto adicional, compuestos de la invención y
- 35 composiciones que contienen compuestos de la invención para uso en terapia.

Los compuestos dentro del alcance de la presente invención inhiben o bloquean la actividad catalítica de la quinasas de acuerdo con los ensayos descritos en la bibliografía y procedimientos in vitro que se describen a continuación en este documento, y donde se cree

5 que los resultados de dichos ensayos están correlacionados con la actividad farmacológica en seres humanos y otros mamíferos. Por lo tanto, en una realización adicional, la presente invención proporciona compuestos de la invención y composiciones que contienen compuestos de la invención para uso en el tratamiento de un paciente que padece, o

10 sometido a, afecciones que pueden mejorarse por la administración de inhibidores de proteína quinasas (por ejemplo, Syk, FAK, KDR o Aurora2). Por ejemplo, los compuestos de la presente invención son útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, por ejemplo, asma; dermatosis inflamatorias (por ejemplo, psoriasis, dermatitis herpetiformis, eccema, vasculitis necrotizante y cutánea, enfermedad bulosa); rinitis alérgica y conjuntivitis alérgica; inflamación de las articulaciones, incluyendo artritis, artritis

15 reumatoide y otras afecciones artríticas tales como espondilitis reumatoide, artritis gotosa, artritis traumática, artritis por rubeola, artritis psoriásica y osteoartritis. Los compuestos también son útiles en el tratamiento de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (COPD), sinotivis aguda, diabetes autoinmune, encefalomiелitis autoinmune, colitis, aterosclerosis, enfermedad vascular periférica, enfermedad cardiovascular, esclerosis múltiple, reestenosis,

20 miocarditis, linfomas de células B, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de injerto contra hospedador y otros eventos de rechazo asociados con trasplantes, cánceres y tumores (tales como cánceres colorrectal, de próstata, de mama, de tiroides, de colon y de pulmón) y enfermedad inflamatoria del intestino. Además, los compuestos son útiles como agentes anti-angiogénicos tumorales. Y además, los compuestos

25 de la invención son útiles como agentes para controlar las células tumorales.

Una realización especial de los métodos terapéuticos de la presente invención es el tratamiento de inflamación de las articulaciones.

30 Otra realización especial de los métodos terapéuticos de la presente invención es el tratamiento de artritis reumatoide.

Una realización especial de los métodos terapéuticos de la presente invención es el tratamiento de cánceres, tumores y otros trastornos proliferativos.

35

Otra realización especial de los métodos terapéuticos de la presente invención es el tratamiento de cánceres que implican tumores líquidos.

5 Otra realización especial de los métodos terapéuticos de la presente invención es el tratamiento de linfoma de células del manto.

Otra realización especial más de los métodos terapéuticos de la presente invención es el tratamiento de trastornos por inhibición de la angiogénesis.

10 De acuerdo con otro aspecto más de la invención, se proporciona un método para el tratamiento de un paciente humano o animal que padece, o que es propenso a padecer, afecciones que pueden mejorarse por la administración de un inhibidor de proteína quinasas (por ejemplo, Syk, FAK, KDR o Aurora2), por ejemplo, afecciones como las que se han descrito anteriormente en este documento, que comprende la administración al paciente de
15 una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una composición que contiene un compuesto de la invención. La expresión "cantidad eficaz" pretende describir una cantidad de compuesto de la presente invención eficaz en la inhibición de la actividad catalítica de una proteína quinasa, tal como Syk, FAK, KDR o Aurora2, y produciendo de esta manera el efecto terapéutico deseado.

20 Debe entenderse que las referencias de este documento al tratamiento incluyen terapia profiláctica así como tratamiento de afecciones establecidas.

La presente invención también incluye dentro de su alcance composiciones farmacéuticas
25 que comprenden un compuesto de la invención en asociación con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un compuesto de la invención puede administrarse por cualquier medio adecuado. En la práctica, un compuesto de la presente invención puede administrarse en general por vía
30 parenteral, tópica, rectal, oral o por inhalación; especialmente por la vía oral o por inhalación.

Las composiciones de acuerdo con la invención pueden prepararse de acuerdo con los métodos convencionales, usando uno o más adyuvantes o excipientes farmacéuticamente
35 aceptable. Los adyuvantes comprenden, inter alia, diluyentes, medios acuosos estériles y

diversos disolventes orgánicos no tóxicos. Las composiciones pueden presentarse en forma de comprimidos, píldoras, gránulos, polvos, disoluciones o suspensiones acuosas, disoluciones inyectables, elixires o jarabes, y pueden contener uno o más agentes que se eligen del grupo que comprende edulcorantes, aromatizantes, colorantes o estabilizantes

5 para obtener preparaciones farmacéuticamente aceptables. La elección del vehículo y el contenido de la sustancia activa en el vehículo se determinan en general de acuerdo con las propiedades químicas y de solubilidad del compuesto activo, la vía de administración particular y las disposiciones a observar en la práctica farmacéutica. Por ejemplo, para preparar comprimidos pueden usarse excipientes tales como lactosa, citrato sódico,

10 carbonato cálcico, fosfato dicálcico y agentes disgregantes tales como almidón, ácidos algínicos y ciertos silicatos complejos combinados con lubricantes tales como estearato magnésico, laurilsulfato sódico y talco. Para preparar una cápsula, es ventajoso usar lactosa y polietilenglicoles de alto peso molecular. Cuando se usan suspensiones acuosas, éstas pueden contener agentes emulsionantes o agentes que facilitan la suspensión. También

15 pueden usarse diluentes tales como sacarosa, etanol, polietilenglicol, propilenglicol, glicerol y cloroformo o mezclas de los mismos.

Para la administración parenteral, se usan emulsiones, suspensiones o soluciones de los productos de acuerdo con la invención en aceite vegetal, por ejemplo aceite de sésamo,

20 aceite de cacahuete o aceite de oliva, o soluciones acuosas-orgánicas, tales como agua y propilenglicol, ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo, así como soluciones acuosas estériles de las sales farmacéuticamente aceptables. Las soluciones de las sales de los productos de acuerdo con la invención son especialmente útiles para la administración por inyección intramuscular o subcutánea. Las soluciones acuosas, que también comprenden

25 soluciones de las sales en agua pura destilada, pueden usarse para administración intravenosa, con la condición de que su pH se ajuste adecuadamente, que estén juiciosamente tamponadas, que se conviertan en isotónicas con una cantidad suficiente de glucosa o cloruro sódico y que se esterilicen por calentamiento, irradiación o microfiltración.

30 Para administración tópica, pueden usarse geles (basados en agua o alcohol), cremas o pomadas que contienen compuestos de la invención. Los compuestos de la invención también pueden incorporarse en un gel o matriz base para aplicación en un parche, que permitiría una liberación controlada del compuesto a través de la barrera transdérmica.

35

Para administración por inhalación, los compuestos de la invención pueden disolverse o suspenderse en un vehículo apropiado para usar en un nebulizador o un aerosol de suspensión o solución, o pueden absorberse o adsorberse en un vehículo sólido apropiado para uso en un inhalador de polvo seco.

5

Las composiciones sólidas para administración rectal incluyen supositorios formulados de acuerdo con métodos conocidos y que contienen al menos un compuesto de la invención.

- El porcentaje de ingrediente activo en las composiciones de la invención puede variar, pero es necesario que constituya una proporción de forma que se obtenga una dosificación adecuada. Obviamente, pueden administrarse diversas formas de dosificación unitaria aproximadamente al mismo tiempo. La dosis empleada se determinará por el médico y depende del efecto terapéutico deseado, la vía de administración, la duración del tratamiento y el estado del paciente. En el adulto, las dosis son en general de aproximadamente 0,001 a
- 10 aproximadamente 50, preferiblemente de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal al día por inhalación, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100, preferiblemente de 0,1 a 70 y más especialmente de 0,5 a 10 mg/kg de peso corporal al día por administración oral, y de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 10, preferiblemente de 0,01 a 1 mg/kg de peso corporal al día por administración intravenosa.
- 15
- 20 En cada caso concreto, las dosis se determinarán de acuerdo con los factores diferenciados del sujeto que se va a tratar, como la edad, peso, estado de salud general y otras características que pueden influir en la eficacia del producto medicinal.

- Los compuestos de acuerdo con la invención pueden administrarse con tanta frecuencia como sea necesario, con el fin de obtener el efecto terapéutico deseado. Algunos pacientes pueden responder rápidamente a una dosis mayor o menor y pueden considerarse adecuadas dosis de mantenimiento mucho más débiles. En el caso de otros pacientes, puede ser necesario proporcionar tratamientos a largo plazo en la proporción de 1 a 4 dosis al día, de acuerdo con los requisitos fisiológicos de cada paciente en particular. En general, el
- 25
- 30 producto activo puede administrarse por vía oral de 1 a 4 veces al día. Por supuesto, para algunos pacientes, será necesario prescribir no más de una o dos dosis al día.

- Los compuestos de la invención pueden prepararse mediante la aplicación o adaptación de métodos conocidos, y esto significa los métodos utilizados hasta la fecha o descritos en la
- 35 bibliografía, por ejemplo, los descritos por R.C. Larock en Comprehensive Organic

Transformations, VCH publishers, 1989.

- En las reacciones que se describen a continuación en este documento, puede ser necesario proteger grupos funcionales reactivos, por ejemplo grupos hidroxilo, amino, imino, tio o carboxi, en los casos en los que se desean en el producto final, para evitar su participación indeseada en las reacciones. Pueden usarse grupos protectores convencionales de acuerdo con la práctica convencional, por ejemplo véase T.W. Greene y P. G. M. Wuts en "Protective Groups in Organic Chemistry" John Wiley y Sons, 1991.
- 5
- 10 Se apreciará que los compuestos de la invención pueden contener centros asimétricos. Estos centros asimétricos pueden estar, independientemente, en la configuración R o S. Para los especialistas en la técnica será evidente que ciertos compuestos de la invención también pueden mostrar isomería geométrica. Debe apreciarse que la presente invención incluye isómeros y estereoisómeros geométricos individuales y sus mezclas, incluyendo mezclas
- 15
- racémicas, de los compuestos de la fórmula (I) definidos anteriormente en este documento. Tales isómeros pueden separarse de sus mezclas mediante la aplicación o adaptación de métodos conocidos, por ejemplo técnicas cromatográficas y técnicas de recristalización, o se preparan por separado a partir de los isómeros apropiados de sus compuestos intermedios.
- 20
- De acuerdo con un aspecto más de la invención, las sales de adición de ácidos de los compuestos de esta invención pueden prepararse por reacción de la base libre con el ácido apropiado, por aplicación o adaptación de métodos conocidos. Por ejemplo, las sales de adición de ácidos de los compuestos de esta invención pueden prepararse disolviendo la base libre en agua o una solución alcohólica acuosa u otros disolventes adecuados que
- 25
- contienen el ácido apropiado y aislando la sal al evaporar la solución, o haciendo reaccionar la base libre y el ácido en un disolvente orgánico, en cuyo caso la sal se separa directamente, o puede obtenerse por concentración de la solución.
- 30
- Las sales de adición de ácidos de los compuestos de esta invención pueden regenerarse a partir de las sales por aplicación o adaptación de métodos conocidos. Por ejemplo, los compuestos parentales de la invención pueden regenerarse a partir de sus sales de adición de ácido por tratamiento con un álcali, por ejemplo, solución acuosa de bicarbonato sódico o solución acuosa de amoníaco.
- 35
- Los compuestos de esta invención pueden regenerarse a partir de sus sales de adición de

bases mediante la aplicación o adaptación de métodos conocidos. Por ejemplo, los compuestos parentales de la invención pueden regenerarse a partir de sus sales de adición de bases con un ácido, por ejemplo, ácido clorhídrico.

5 Los compuestos de la presente invención pueden prepararse o formarse convenientemente durante el proceso de la invención, en forma de solvatos (por ejemplo, hidratos). Se pueden preparar hidratos de compuestos de la presente invención, convenientemente, mediante recristalización en una mezcla de disolventes acuosa/orgánica, utilizando disolventes orgánicos, tales como dioxano, tetrahidrofurano o metanol.

10 De acuerdo con otro aspecto de la invención, las sales de adición de bases de los compuestos de esta invención pueden prepararse mediante la reacción del ácido libre con la base apropiada, mediante la aplicación o adaptación de métodos conocidos. Por ejemplo, las sales de adición de bases de los compuestos de esta invención pueden prepararse disolviendo el
15 ácido libre en agua o en una solución acuosa de alcohol o en otros disolventes adecuados que contienen la base apropiada y aislando la sal por evaporación de la solución, o haciendo reaccionar el ácido libre y la base en un disolvente orgánico, en cuyo caso la sal se separa directamente o puede obtenerse por concentración de la disolución.

20 Los materiales de partida e intermedios pueden prepararse por la aplicación o adaptación de métodos conocidos, por ejemplo métodos con los que se describen en el Ejemplo o sus equivalentes químicos obvios.

25 La presente invención se ejemplifica adicionalmente, pero sin limitación, mediante el siguiente Ejemplo ilustrativo.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) ^1H a 300 MHz se registraron en instrumentos Varian Mercury. En los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN), los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm en relación con tetrametilsilano. Las
30 abreviaturas tienen los siguientes significados: s = singlete; d = doblete; t = triplete; m = multiplete; c = cuadruplete; dd = doblete de dobletes; ddd = doblete de dobles dobletes.

Los experimentos de Cromatografía Líquida de Alta Presión - Espectrometría de Masas (LCMS) para determinar los tiempos de retención (R_T) e iones de másicos asociados se
35 realizan usando el siguiente método. Los Espectros de Masas (MS) se registran usando un

espectrómetro de masas de tiempo de vuelo Micromass LCT. El método es ionización de electronebulización positiva, explorando la masa m/z de 100 a 1000. La cromatografía líquida se realiza en un Agilent™ 1100 Series Binary Pump & Degasser; fase estacionaria: columna Phenomenex Synergi™ 2 μ Hydro-RP 20 x 4,0 mm, fase móvil: A = ácido fórmico (FA) al 0,1% en agua, B = FA al 0,1% en acetonitrilo. Volumen de inyección de 5 μ l por CTC Analytical PAL System. El flujo es de 1 ml/minuto. El gradiente es 5% de B a 90% de B en 3 minutos y 90% de B a 100% de B en 2 minutos. Los detectores auxiliares son: detector UV Agilent 1100 Series, longitud de onda = 220 nm y temperatura del detector Sedere SEDEX™ 75 Evaporative Light Scattering (ELS) = 46 °C, presión de nitrógeno = 4 bar.

Los valores R_F de la cromatografía de capa fina (TLC) se determinaron usando placas de sílice Merck™.

15 EJEMPLO 1

2-[4-(7-Etil-5H-pirrolo[2,3-b]pirazin-6-il)-fenil]-propan-2-ol

Se preparó un total de 6,0 g de 2-[4-(7-etil-5H-pirrolo[2,3-b]pirazin-6-il)fenil]propan-2-ol (compuesto 1) en dos etapas a partir de *n*-propilpirazina (compuesto 2) y 4-acetilbenzonitrilo (compuesto 3).

La síntesis del compuesto 1 se realizó como se indica a continuación. El acoplamiento de *n*-propilpirazina (compuesto 2) y 4-acetilbenzonitrilo (compuesto 3) con bis(trimetilsilil)amida sódica en tetrahidrofurano a 40°C dio el compuesto intermedio 4 con un rendimiento de 30%. La reacción del compuesto 4 con cloruro de metilmagnesio en tetrahidrofurano a 0°C dio el compuesto deseado 1 con un rendimiento de 74% después de la recrystalización en 2-propanol. La síntesis se muestra en la Figura 1.

30 PARTE EXPERIMENTAL

2-[4-(7-Etil-5H-pirrolo[2,3-b]pirazin-6-il)fenil]etanona (compuesto 4). Una solución de *n*-propilpirazina (compuesto 2, 912 mg, 7,46 mmol) en tetrahidrofurano (5 ml) se añadió gota a gota, durante un periodo de siete minutos, a una solución de bis(trimetilsilil)amida sódica

- (solución 2 M en THF; 13 ml, 26 mmol, 3,5 equiv) a 20°C. Se obtuvo una solución de color púrpura-rojo oscuro y la temperatura cayó hasta 16,4°C. Se añadió una solución de 4-acetilbenzonitrilo (compuesto 3, 1,08 g, 7,4 mmol) en tetrahidrofurano (5 ml) durante un periodo de 18 minutos a 13,3°C. La temperatura cayó hasta 12,6°C y se produjo una solución
- 5 parda. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una hora, se calentó a aproximadamente 35°C durante seis horas y después se dejó en agitación a temperatura ambiente durante aproximadamente 60 horas. La mezcla se vertió en bicarbonato sódico acuoso saturado (200 ml) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 150 ml). El acetato de etilo se lavó con agua (100 ml) y se concentró en el Buchi a una temperatura del baño de 40°C y de
- 10 80 a 10 torr para dar un sólido de color amarillo oscuro. El sólido se trituró con éter dietílico (25 ml), se filtró y se lavó con éter (25 ml). El sólido se secó al aire para dar 600 mg (30,3%) del compuesto 4 en forma de un sólido amarillo: ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃, figura 1) δ 8,5 (1H, d, J = 2 Hz), 8,15 (2H, d, J = 8 Hz), 8,1 (1H, d, J = 3 Hz), 7,9 (2H, d, J = 8 Hz), 3,1 (2H, c, J = 9 Hz), 2,7 (3H, s), 1,4 (3H, t, J = 9 Hz).
- 15 1-[4-(7-Etil-5H-pirrolo[2,3-b]pirazin-6-il)fenil]propan-2-ol (compuesto 1). A una solución enfriada de (~5°C) de cloruro de metilmagnesio (3 M en THF; 81,3 ml, 244 mmol, 10 equiv.) en tetrahidrofurano (116 ml) se le añadió gota a gota una solución del compuesto 4 (6,5 g, 24,4 mmol) en tetrahidrofurano (348 ml), durante noventa minutos, manteniendo la
- 20 temperatura a aproximadamente 0°C mediante la velocidad de adición. Se observó una solución amarilla brillante después de la adición. Después de una hora, el análisis por TLC (1/1 de acetato de etilo/*n*-heptano) demostró que no quedaba material de partida y una nueva mancha que se movía a un R_f menor. La extracción se inactivó mediante la adición cuidadosa de una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico (aproximadamente 660
- 25 ml). Apareció una masa espesa y a la mezcla se la añadieron acetato de etilo (250 ml) y agua (250 ml). La capa acuosa se retiró y se extrajo de nuevo con acetato de etilo (2 x 250 ml). Las fracciones de acetato de etilo se combinaron, se lavaron con agua (2 x 200 ml) y se concentraron en el Buchi a una temperatura del baño de 40°C y de 80 a 10 torr, para dar 7,5 g (109%) de 1 en forma de un sólido beige claro: ¹H RMN (DMSO-*d*₆, figura 2) δ 12,0 (1H, s), 8,35 (1H, d, J = 3,5 Hz), 8,2 (1H, d, J = 3,5 Hz), 7,6 (4H, s), 5,1 (1H, s), 2,9 (2H, c, J = 8
- 30 Hz), 1,5 (6H, s), 1,3 (3H, t, J = 8 Hz).

Este material se combinó con el material de un experimento anterior. El material combinado (8,5 g) se calentó a reflujo con 2-propanol (150 ml) para dar una solución parda, clara,

35 transparente, que se filtró mientras permanecía caliente a través de un embudo Buchner

caliente, al vacío. Se formó un precipitado en el matraz de filtro y la mezcla se calentó hasta el punto de ebullición para dar una solución transparente. El material se dejó enfriar a temperatura ambiente con agitación, para dar un sólido amarillo claro, que se filtró, se lavó con 2-propanol frío y se secó en la estufa de vacío a 50°C para dar 6,0 g (71%) del compuesto 1 en forma de un sólido amarillo claro: LCMS: $R_T = 2,55$ minutos, MS: 282 (M+H); ^1H RMN (DMSO- d_6 , figura 3) δ 12,0 (1H, s), 8,35 (1H, d, J = 3 Hz), 8,2 (1H, d, J = 3 Hz), 7,6 (4H, s), 5,1 (1H, s), 2,9 (2H, c, J = 9 Hz), 1,5 (6H, s), 1,3 (3H, t, J = 9 Hz).

El análisis elemental del compuesto 1 se muestra en la TABLA 1.

10

PORCENTAJE TEÓRICO

POR ELEMENTO: C 72,57%, H 6,81%, N 14,93%, O 5,69%

EXPERIMENTAL 1: C 72,46%, H 7,05%, N 15,07%

15

TABLA 1

20

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO IN VITRO PARA SYK

Nombre del Ensayo:	Tirosina (Y) Quinasa de Bazo
Nombre Corto:	Syk
Formato de Ensayo:	Fosforilación de Sustrato
Formato de Detección:	FlashPlate con estreptavidina
Modulación:	Inhibición

25

Se diseñan microplacas FlashPlate Plus con estreptavidina de PerkinElmer Life Sciences™ para ensayos radiométricos en placa. El interior de cada pocillo se recubre permanentemente con una capa fina de material de centelleo basado en poliestireno seguido de la unión covalente de estreptavidina. Estas placas son adecuadas para una amplia diversidad de aplicaciones de ensayo que utilizan moléculas de captura biotiniladas. Poly (Glu,Tyr) 4:1 (PGT) es un copolímero aleatorio que puede actuar como sustrato para proteína quinasas con especificidad por tirosinas. este ensayo mide la fosforilación de un sustrato de PGT-Biotina por Syk. La enzima transfiere el $[\gamma^{33}P]$ -fosfato desde $[\gamma^{33}P]$ -ATP al sustrato

30

35

polimérico. El ensayo se realizó en solución en una placa de 384 pocillos sin unión. Después de detener la reacción usando ácido fosfórico, la mezcla de reacción se transfirió a una Flashplate con estreptavidina de 384 pocillos. El sustrato biotinilado se capturó en la placa y se retiraron por lavado otros reactivos incluyendo ATP caliente. Después se contó la radiactividad en cada pocillo.

La reacción enzimática se realizó en una placa sin unión de 384 pocillos. La concentración final de reactivo/pocillo fue: Syk 7,77 nM, sustrato de PGT-Biotina 15,5 nM, 0,1 µCi de ³³P-ATP, Tris 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, MnCl₂ 3 mM, DTT 1 mM y 0,1 mg/ml de γ-Globulinas. El volumen de reacción fue: 22 µl. Tiempo de reacción: 120 minutos Temperatura: Temperatura ambiente La reacción se detuvo por medio de la adición de 20 µl de ácido fosfórico al 9% y se transfirieron 30 µl de la mezcla de reacción a una Flashplate con estreptavidina de 384 pocillos. Después de 90 minutos de incubación a temperatura ambiente, la placa se lavó con 0,02% de Tween-20 en Tris 50 mM, pH 7,5. La radiactividad se contó en un contador de centelleo Top Count™.

La dilución enzimática se preparó y se mantuvo en hielo antes del uso. Se añadieron MnCl₂ y DTT preparados recientemente al tampón de ensayo antes de uso.

En la tabla 2 se muestran materiales para el ensayo.

Materiales	Proveedor	Número de Catálogo	P.mol.	Función
Tris 1 M, pH 7,5	Fisher	BP1757-500		Tampón
MgCl ₂ 1 M	Sigma	M-1028	95,2	Cofactor enzimático
MnCl ₂ 1 M	Sigma	M-1787	125,8	Cofactor enzimático
DTT	Sigma	D-5545	154,2	Antioxidante
γ-Globulinas	Sigma	G-5009		Estabilizador de Proteínas
DMSO	Sigma-Aldrich	15,493-9		Disolvente
Estaurosporina	Sigma	S-4400	466,5	Inhibidor de

				Referencia
Ácido fosfórico (al 85%)	Sigma	P-6560	98,0	Solución de parada
[γ -33P]-ATP 1 mCi	PerkinElmer	NEG6xx		Sustrato
10 x PBS, pH 7,4	Fisher	BP399-1		Tampón de lavado
Tween 20	Fisher	BP337-500	1227,54	Detergente
placa de polipropileno de 384 pocillos	Corning	3657		Placa de compuestos
Placa de 384 pocillos sin unión	Corning	3652		Placa de reacción
Flashplate con estreptavidina de 384 pocillos	PerkinElmer	SMP-410 (A)		Placa de captura
Película de sellado Top Seal A	Packard	6005185		Sellado de Placa
Lavador Automático Elx405	Bio-Tek			Lavador de placas
Top Count	Packard			Contador
FX Station	Beckman			Manipulador de líquidos
Beckman 2000	Beckman			Manipulador de líquidos

TABLA 2

Enzima:

- 5
- Se produjo Syk marcada (0,184 mg/ml, PM = 35.531,81 Da) y se purificó por métodos conocidos en la técnica.

Sustrato

- 10
- Se adquirió Poly (Glu,Tyr) 4:1 conjugado con biotina en Cisbio international™ (nº de catálogo 61GT0BLB, lote nº 16).

En la Tabla 3 se muestran las soluciones de ensayo usadas.

Reactivo	Agentes químicos	Disolvente	Concentración
Tampón de Ensayo	Tris, pH 7,5	H ₂ O	50 mM

73

MnCl ₂ y DTT recién añadido	MnCl ₂ MgCl ₂ DTT γ-globulinas		3 mM 10 mM 1 mM 0,1%
Solución de Enzima & Sustrato	Syk	Tampón de Ensayo	7,77 nM
Mantener en placas sin unión	Sustrato de PGT- Biotina		15,5 nM
Solución de ATP / ³³ P- ATP	ATP/ ³³ P-ATP	Tampón de Ensayo	0,1 μCi/pocillo
Solución de parada	Ácido fosfórico	H ₂ O	9%
Tampón de lavado	Tween -20	1 x PBS, pH 7,4	0,02%

TABLA 3

Dilución del compuesto:

- 5

1.

Los compuestos se recibieron como 10 μl/pocillo de concentración 10 mM en DMSO al 100% en una placa de polipropileno de fondo en U de 96 pocillos con la fila H vacía. Se añadieron 90 μl/pocillo de DMSO al 100% para producir 100 μl de compuesto 1 mM, y la placa se volvió a cerrar y se almacenó a temperatura ambiente en la oscuridad.
- 10

2.

Preparación de la placa de destino del compuesto: En una placa de polipropileno de fondo redondo de 384 pocillos (placa de almacenamiento Corning), se añadieron 23 μl/pocillo de H₂O a las columnas 3 y 13, y 20 μl/pocillo de DMSO al 30% a las columnas 4 a 12 y a las columnas 14 a 22 (dejando vacías las filas O y P).
- 15

3.

Preparación de diluciones de compuestos (10 diluciones, 300 μM, 100 μM, 30 μM, -- etc) en Biomek 2000™ usando el programa Kinase Profiling: Usando puntas de 20 μl de las que se había retirado la octava (fila H), se transfirieron 10 μl/pocillo de compuesto 1 mM desde la columna 1 de la placa de procedencia a la columna 3 de la placa de destino para obtener la primera dilución 300 μM. Después de esto, en la placa de destino, se mezclaron y transfirieron 10 μl/pocillo de una dilución 300 μM de la columna 3 a la 4 para obtener una dilución 100 μM. Se mezcló y se transfirieron 10 μl/pocillo de la dilución 100 μM de la columna 4 a la 5 para obtener
- 20

JA

- la dilución 30 μ M, --- etc. Se realizaron diluciones por duplicado para cada compuesto, por ejemplo, se transfirieron 10 μ l/pocillo de compuesto de A1 en la placa de procedencia a A3 y B3 en la placa de destino. Se repitió la mezcla y la transferencia. Después, se transfirieron 10 μ l/pocillo de compuesto 1 mM desde la
- 5 columna 2 en la placa de procedencia a la columna 13 de la placa de destino para obtener una dilución 300 μ M. Después de esto, en la placa de destino se mezclaron y se transfirieron 10 μ l/pocillo de una dilución 300 μ M desde la columna 13 a la 14 para obtener la dilución 100 μ M --- etc. Con una placa de procedencia de 96 pocillos llena con la fila H vacía pueden prepararse hasta seis placas de destino de
- 10 compuesto.
4. Preparación de la placa parental de compuesto patrón: se añadieron 5 μ l/pocillo de solución de Roscovitine 10 mM en DMSO al 100% a H1 y H2 en una placa de polipropileno de fondo en U de 96 pocillos, y después se diluyeron hasta una solución 1 mM con 45 μ l/pocillo de DMSO al 100%.
- 15 5. Preparación de la placa de destino con compuesto patrón: En una placa de polipropileno de fondo redondo de 384 pocillos (placa de almacenamiento Corning™), se añadieron 23 μ l/pocillo de H₂O a las columnas 3 y 13, y 20 μ l/pocillo de DMSO al 30% a las columnas 4 a 12 y a las columnas 14 a 22 (sólo las filas O y P).
- 20 6. Preparación de diluciones de compuesto patrón (10 diluciones, 300 μ M, 100 μ M, 30 μ M, --- etc) en Biomek 2000™ usando el programa Profiling Standard: Usando una sola punta de 20 μ l se transfirieron 10 μ l/pocillo de compuesto patrón 1 mM desde H1 en la placa parental a O1 en la placa de destino para obtener la primera dilución 300 μ M. Después de esto, en la placa de destino, se mezclaron y transfirieron 10
- 25 μ l/pocillo de una dilución 300 μ M de la columna O3 a la O4 para obtener una dilución 100 μ M. Se mezcló y se transfirieron 10 μ l/pocillo de la dilución 100 μ M de la columna O4 a la O5 para obtener la dilución 30 μ M, --- etc. Se realizaron diluciones por duplicado para cada compuesto patrón, por ejemplo, se transfirieron 10 μ l/pocillo de compuesto de H1 en la placa parental a O3 y P3 en la placa de
- 30 destino. Se repitió la mezcla y la transferencia. Después, se transfirieron 10 μ l/pocillo de compuesto 1 mM desde H2 en la placa parental a O13 en la placa de destino para obtener una dilución 300 μ M. Después de esto, en la placa de destino, se mezclaron y transfirieron 10 μ l/pocillo de una dilución 300 μ M de la columna O13 a la O14 para obtener una dilución 100 μ M --- etc.

75

7. En la placa de destino de compuesto patrón, se añadieron 20 µl/pocillo de DMSO al 30% (control elevado) a A a H y 20 µl/pocillo de H₃PO₄ al 45% (control bajo) a I a J en la columna 23.

5 Procedimiento de ensayo:

1. A la placa de ensayo (placa de 384 pocillos sin unión Corning™) se le añadieron 10 µl de solución de enzima y sustrato y 2 µl de compuesto de ensayo, y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min (etapa de preincubación de enzima/compuesto).
- 10 2. La reacción se inició añadiendo 10 µl de solución de ATP/ ³³P-ATP.
3. Se incubó a temperatura ambiente durante 120 min.
4. La reacción se detuvo por la adición de 20 µl de tampón de parada.
5. Se transfirieron 30 µl de mezcla de reacción a una Flashplate con estreptavidina de 384 pocillos.
- 15 8. Se incubó a temperatura ambiente durante 90 min.
9. Se lavó la Flashplate de estreptavidina 2 veces con 100 µl/pocillo de tampón de lavado usando un lavador automático Elx405.
10. La placa se cerró herméticamente y se leyó (40 seg/pocillo) en un contador de centelleo Top Count™.

20

*El ensayo se realizó desde la etapa 1 a la etapa 5 usando la estación Biomek™ FX.

Ecuación para ajuste de la curva en la determinación del valor de CI₅₀:

25 $Y = \text{Inferior} + (\text{Superior} - \text{Inferior}) / (1 + 10^{((\text{LogCI}_{50} - X) * \text{Pendiente de la curva}))}$

X es el logaritomo de la concentración.

Y es la respuesta.

Y empieza en la parte inferior y va hasta la parte superior con una forma sigmoidea.

30 Esto es idéntico a la ecuación "logística de cuatro parámetros".

El compuesto de Fórmula I produjo un valor de CI₅₀ de 1,7 nanoMolar con este ensayo.

ENSAYO DE VIABILIDAD DE LÍNEAS CELULARES MALIGNAS
HEMATOLÓGICAS USANDO REACTIVO MTS

35

1. OBJETIVO

Este método pretende determinar la viabilidad de una línea de células de tumor líquido después del tratamiento con un compuesto de ensayo. Las células tumorales se mantienen en suspensión en crecimiento en fase logarítmica. El día de uso, las células se resuspenden a una densidad de 0,05 a 0,1 millones/ml y las células se incuban en una placa de 96 pocillos con los compuestos de ensayo durante 96 horas. La viabilidad de las células se midió incubando las células con reactivo MTS de Promega. La viabilidad de las células es proporcional al cambio de absorbancia a 490 nm. Comparando la absorbancia entre las células de control y las células tratadas con compuesto, el impacto de los compuestos de ensayo sobre la viabilidad celular se determina como un porcentaje de la viabilidad de las células de control.

2. PROCEDIMIENTO

A. Materiales

1. Células:

Se obtienen líneas de células de tumor líquido de la American Tissue Culture Collection o de DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH).

2. Medio de cultivo:

RPMI completo: Medio RPMI-1640 con HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico) 25 mM y L-glutamina (Gibco/Invitrogen™, N° de Cat. 22400-089) + suero bovino fetal (FBS) inactivado con calor al 10% (Gibco/Invitrogen™, N° Cat. 16140-071) + 1x Penicilina/Estreptomicina (Gibco/Invitrogen, N° Cat. 15070-063) + 50 µg/ml de Plasmocin (Invivogen™, N° Cat. ant-mpt)

cRPMI sin rojo de fenol: Medio RPMI-1640 sin rojo de fenol, L-glutamina (Gibco/Invitrogen™, N° Cat. Gibco/Invitrogen, 11835-030) + suero bovino fetal (FBS) inactivado con calor al 10% (Gibco/Invitrogen, N° Cat. 16140-071) + 1x Penicilina/estreptomicina (Gibco/Invitrogen™, N° Cat. 15070-063)

3. Otros reactivos líquidos:

Reactivo MTS de Promega™ (Cell Titer 96 Aqueous N° Cat. G358B)

Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma™, N° Cat. D2650)

Jf

4. Consumibles:

Placas transparentes estériles de poliestireno de 96 pocillos tratadas con cultivo de tejidos con tapa (Falcon™, N° Cat. 3072)

5

5. Equipo:

Lector de placas, 96 pocillos (SpectraMAX GeminiEM™, Molecular Devices, Estados Unidos)

10 B. Método

Día 1: Preparación de compuestos de ensayo

Disolver y diluir en serie los compuestos de ensayo en DMSO a una concentración 1000x.

15 Diluir los compuestos de ensayo 1:100 en cRPMI sin rojo de fenol en placas estériles de cultivo de tejidos de poliestireno de 96 pocillos

Usar una pipeta de 12 canales para transferir 10 µl de solución de compuesto diluida a la placa de 96 pocillos vacía a usar para la incubación de células

Después de la adición de 100 µl de cultivos celulares, la concentración final de compuestos de ensayo sería 1x.

20 Día 1: Preparación de células de tumor líquido para el tratamiento con compuesto

Recoger las células en RPMI completo en cultivos en fase logarítmica a densidades de aproximadamente 0,3-0,7 millones/ml. Contar las células y ajustar a 0,1 millones/ml en cRPMI sin rojo de fenol (para las células de crecimiento rápido con un tiempo de duplicación igual o menor de 24 horas, por ejemplo, K562, usar 0,05 millones/ml en lugar

25 de evitar el exceso de crecimiento).

Transferir triplicados de 100 µl de células a los pocillos de placas transparentes de 96 pocillos para un total de 10000 células/pocillo. Obsérvese que cada pocillo ya contiene 10 µl de compuesto de ensayo concentrado 10x preparado como se ha indicado anteriormente.

Incubación de células

30 Incubar las células durante 72-96 horas a 37°C en un incubador de cultivo de tejidos que contiene 5% de CO₂.

C- Medición: Determinación de la viabilidad celular

1. Descongelar el reactivo MTS de Promega y añadir 20 µl a cada pocillo con una
35 pipeta de repetición.

2.
- Mezclar el reactivo en el pocillo sacudiendo la placa y poner la placa en un incubador de cultivo de tejidos de CO2 a 37°C.
3.
- Preparar el control blanco "sin células" añadiendo el reactivo MTS a una fila de pocillos que contienen 100 µl de cRPMI sin rojo de fenol solo.
- 5
4.
- Incubar a 37°C hasta que la absorbancia a 490 nm para las células de control sea >1,5.
5.
- Mezclar el cultivo de células sacudiendo para asegurar que el color es uniforme en los pocillos, asegurándose de que no hay burbujas de aire. Si hay burbujas, centrifugar la placa a 1000 x g en una centrífuga de sobremesa para eliminar las burbujas de aire.
- 10
6.
- Leer la absorbancia en el lector de placas de 96 pocillos Molecular Devices.

D-Análisis de resultados:

1.
- Copiar y pasar los datos de texto a una hoja de cálculo Excel
2.
- Calcular la media de los datos del blanco “sin células” y restar este valor de la absorbancia de cada pocillos que contiene células.
- 15
3.
- Calcular la media de los datos de los pocillos por triplicado corregidos con respecto al blanco y calcular la desviación típica para la variación de la réplica.
4.
- Calcular la media de los datos de las células de control:
5.
- Calcular la media de los datos de las células tratadas con compuesto como un porcentaje de la media de los datos de las células de control como se indica a continuación:
- 20
- (Valor de tratamiento con compuesto/valor de control) * 100 = % de valor de control

Resultados:

Se ha determinado la actividad anti-proliferación del compuesto de Fórmula I. Como se muestra en la Tabla 4, el compuesto de Fórmula I es consistentemente activo en el ensayo de dos líneas de células MCL de Jeko-1 y Granta-519. Además, el compuesto de Fórmula I parece ser inhibidor de un espectro relativamente amplio de líneas de células malignas hematológicas (6 de 15).

25

		CI50 (µM)	% de Inhibición a conc. máx. (10 µM)
Enfermedad	Línea celular	A003397769 N = 4	A003397769 N = 4
AML	HL-60	3,7, 8,1, >10, >10	35
AML	KG-1	1,9	91
AML	ML-2	> 10	28

B-ALL	Nalm-6	5,5	84
B-CLL	JVM-2	3,5, 3,6, 7,7, >10	60
B-CLL	JVM-2	6,8, 7,0, 8,4, >10	59
B-NHL	DLCL-2	1,4, >10, >10, >10	0
B-NHL	DOHH-2	4,5	75
CML	Jurl-MK1	1,2, >10, >10, >10	28
CML	K562	3,9, >10, >10, >10	21
MCL	Jeko-1	3,1	97
MCL	Granta-519	3,4	67
MM	1-363	5,5	61
MM	RPMI8226	> 10	36
T-ALL	Jurkat	6,8, >10, >10, >10	43

Tabla 4: Efectos del compuesto Syk sobre la viabilidad de líneas de células de tumor líquido (ensayo de MTS)

5 INHIBICIÓN DE ARTRITIS INDUCIDA POR COLÁGENO EN RATA

Introducción

La artritis inducida por colágeno (CIA) es un modelo bien caracterizado de artritis reumatoide (RA) humana que puede inducirse en roedores genéticamente susceptibles después de la inmunización con colágeno de tipo II (cII) en adyuvante. Tanto CIA como RA presentan una hinchazón/inflamación severa de las articulaciones, hiperplasia sinovial y erosión del cartílago y erosión del hueso. Esta artritis inflamatoria crónica inducida por inmunización con cII comprende tanto un componente de células T, como se demuestra por la CIA atenuada en ratones deficientes en células T, como un componente de células B. Los ratones deficientes en células B, los ratones xid o los ratones con una mutación null en CXCR5 no pueden desarrollar CIA.

Métodos:

20 Inmunización y exposición: Se inmunizaron ratas Lewis hembra el día 0 y se expusieron el día 7 a cII de origen nasal bovino mezclado con adyuvante incompleto de Freund a una concentración final de colágeno de 1,0 mg/ml. A los animales se les inyectaron en la base de

la cola 400 µg de cII.

- 5 Régimen de dosificación profiláctico: El compuesto de Fórmula I (3,0, 10 y 30 mg/kg) se dosificó por vía oral (p.o.) dos veces al día (b.i.d.) empezando el día 6 y continuando hasta el día 21.

- 10 Régimen de dosificación de combinación: A ratas se les dosificó el compuesto de Fórmula I (3,0 y 10 mg/kg, p.o., b.i.d.) o Metotrexato (MTX, 0,1 y 0,2 mg/kg, p.o., q.d.) como monoterapia o en combinaciones consistentes en cada dosis del compuesto de Fórmula I con cada dosis de MTX empezando el día 6 y continuando hasta el día 21.

Régimen de dosificación terapéutica: El compuesto de Fórmula I (10 y 30 mg/kg, p.o., b.i.d.) se administró por vía oral empezando el día 12 y continuando hasta el día 21.

- 15 Patología de las articulaciones: Se midió la hinchazón de la articulación del tobillo con una aproximación de 0,01 mm usando calibres electrónicos digitales. Las mediciones se realizaron 7 veces a lo largo del estudio empezando el día 6 y terminado el día 21. Los pesos corporales se registraron en los mismos días. El día 21, se retiraron las patas traseras en el nacimiento del pelo justo por encima del tobillo y se fijaron en formalina tamponada neutra al 10%.

- 25 Análisis MicroCT: Las articulaciones del tobillo se examinaron usando un escáner cone-beam µCT. Primero se obtuvo una exploración por selección del volumen de examen de las muestras, seguido de la colocación, medición y reconstrucción informática. En las articulaciones del tobillo, se analizó la relación entre la superficie del hueso y el volumen óseo, que describe la complejidad de la superficie del hueso en un cierto volumen.

- 30 Análisis Estadístico: Para la hinchazón/inflamación de la articulación, los datos se analizaron usando el software Everstat v.5 y un ANOVA de medición repetido de 2 vías con ensayo post de Dunnett. Los datos MicroCT se analizaron por Everstat usando un ANOVA de 1 vía y un ensayo de comparación múltiple de Newman-Keuls. Los datos se presentan como la media ± SEM y los valores de p de <0,05 se consideran significativos.

- 35 Resultados:

Dosificación Profiláctica:

Medición con calibre digital de hinchazón/inflamación de la articulación (Figura 2).

- El compuesto de Fórmula I (3,0 mg/kg) redujo significativamente la hinchazón/inflamación del tobillo en comparación con ratas tratadas con vehículo el día 12 únicamente.
- 5 - El compuesto de Fórmula I (10 mg/kg) redujo significativamente la hinchazón/inflamación del tobillo en comparación con ratas tratadas con vehículo los días 12 a 19.
- El compuesto de Fórmula I (30 mg/kg) redujo significativamente la hinchazón/inflamación del tobillo en comparación con ratas tratadas con vehículo del día 12 al día 21.

10 Análisis MicroCT (Figura 3).

- El compuesto de Fórmula I (3, 10 ó 30 mg/kg, b.i.d.) demostró reducciones significativas en la erosión del hueso cuando se comparó con las ratas tratadas con vehículo (medido por la proporción entre superficie ósea y volumen óseo).

15 Dosificación de Combinación:

Mediciones con Calibre Digital de la hinchazón/inflamación de las articulaciones (Figura 4, 5).

- El compuesto de Fórmula I (10 mg/kg) redujo significativamente la hinchazón/inflamación del tobillo en comparación con ratas tratadas con vehículo del día 15 al 21.
- 20 - La terapia de combinación del compuesto de Fórmula I (10 mg/kg) más MTX (0,2 ó 0,1 mg/kg) demostró una reducción significativa en la hinchazón/inflamación del tobillo del día 15 – día 21 en comparación con la observada en ratas dosificadas con el compuesto de Fórmula I (10 mg/kg) o MTX (0,2 ó 0,1 mg/kg) como monoterapia.
- El compuesto de Fórmula I (3,0 mg/kg) como monoterapia o como terapia de combinación
- 25 con MTX (0,1 mg/kg) no pudo impactar significativamente sobre la gravedad de la enfermedad como se mide por la hinchazón/inflamación de la articulación.
- El compuesto de Fórmula I (3,0 mg/kg) como terapia de combinación con MTX (0,2 mg/kg) demostró una reducción significativa en la hinchazón/inflamación de las articulaciones superior a la observada cuando se dosificó cualquier fármaco como
- 30 monoterapia en las medidas tomadas desde los días 18 a 21.

Análisis MicroCT (Figura 6):

- Las imágenes tridimensionales demostraron una erosión del hueso/destrucción significativa en las articulaciones de ratas tratadas con vehículo.
- La dosificación de las ratas con el compuesto de Fórmula I (10 mg/kg, po, bid) produjo una
- 35 reducción significativa en la erosión del hueso frente a las ratas tratadas con vehículo. No se

observó una reducción significativa en las ratas que recibieron 3 mg/kg del compuesto de Fórmula I.

- La monoterapia con MTX (0,2 mg/kg, po, qd) produjo una reducción significativa en la erosión del hueso. Este efecto no se vio en las ratas que recibieron 0,1 mg/kg de MTX.

- 5 - Cuando se trataron con combinaciones del compuesto de Fórmula I y MTX, todos los grupos demostraron una reducción significativa en la relación entre la superficie ósea y el volumen óseo en comparación con las ratas tratadas con vehículo.

- La terapia de combinación del compuesto de Fórmula I (10 mg/kg, bid, po) con MTX (0,2 mg/kg, qd) produjo una protección aditiva de la erosión del hueso frente a la observada en
10 ratas que recibieron monoterapia con el compuesto de Fórmula I o MTX.

Dosificación Terapéutica

Medición con calibre digital de hinchazón/inflamación de la articulación (Figura 7).

- Incluso cuando se administró en un régimen terapéutico en el que la dosificación se retrasó
15 hasta que la artritis fue visualmente evidente, el compuesto de Fórmula I (10 y 30 mg/kg, p.o., b.i.d.) redujo significativamente la hinchazón/inflamación del tobillo desde el día 15 – 21

Análisis MicroCT (Figura 8):

- En comparación con las ratas tratadas con vehículo, las ratas CIA que recibieron la dosis
20 terapéutica del compuesto de Fórmula I (10 mg/kg ó 30 mg/kg) presentaron una reducción significativa en la erosión del hueso como se mide por la relación entre superficie ósea y volumen óseo.

Sumario:

- 25 Estos estudios confirman que la inhibición de la quinasa syk por el compuesto de Fórmula I puede retrasar significativamente tanto el inicio como la progresión de CIA en rata como se mide por una reducción en la hinchazón/inflamación de las articulaciones y erosión del hueso. De manera importante, se observó una inhibición significativa de la progresión de la
30 enfermedad y de la gravedad en ratas en las que la dosificación se retrasó hasta que fueron evidentes signos visibles de artritis. Normalmente, las nuevas terapias clínicas para RA se administran en combinación con MTX. Nuestros datos en un modelo de roedor de artritis demuestran efectos aditivos cuando el compuesto de Fórmula I se dosifica en combinación con MTX, lo que indica que la terapia de combinación del compuesto de Fórmula I y MTX
35 podría producir efectos clínicos sinérgicos en pacientes con RA.

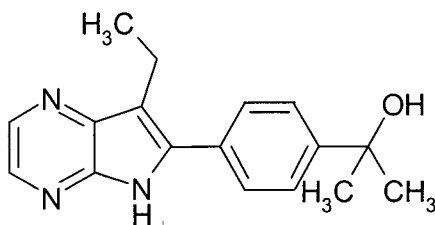
ENSAYO DE ANGIOGÉNESIS

- Se anestesiaron ratas Lewis hembra (5 semanas de edad, 150-175 g) usando xilazina (4 mg/kg) y ketamina (80 mg/kg). Después se implantaron esponjas de celulosa (diámetro 10 mm, Vivoxid Ltd.TM, Turku, Finlandia) que contenían 50 µl de solución de FGF-2 (factor de crecimiento de fibroblastos 2) (que contenía 400 ng de FGF-2) o vehículo (solución fisiológica salina, albúmina de suero bovino 0,08%) por vía subcutánea en el lomo de los animales. Durante los dos días siguientes, se indujo la angiogénesis adicionalmente por medio de la inyección diaria a través de la piel y dentro de las esponjas de 50 µl de solución de FGF-2 o vehículo (condiciones basales). Una semana después de la implantación de las esponjas, los animales se sacrificaron usando una sobredosis de pentobarbital y las esponjas se extrajeron por disección. Después, las esponjas se cortaron y se homogeneizaron en tampón de lisis (NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton X100 1%, desoxicolato sódico al 0,5%, NaF 10 mM, Tris/HCl 30 mM pH 7,8 que contenía un cóctel de inhibidor de proteasa (P8340, Sigma-AldrichTM, St Louis, Estados Unidos)) usando tubos D Lysing Matrix (MP BiomedicalsTM, Illkirch, Francia) en un homogeneizador Fastprep (QbiogeneTM, Illkirch, Francia). La concentración de hemoglobina, que indica el volumen vascular, se determinó usando el ensayo Drabkin (Pierce BiotechnologyTM, Rockford, Illinois, Estados Unidos).
- Los compuestos se administraron por sonda oral como una suspensión en solución acuosa de metilcelulosa al 0,6%, Tween 80 al 0,5%.

- En la Figura 9 se muestran los efectos del compuesto de Fórmula I con respecto al peso de la rata. En la Figura 10 se muestran los efectos del compuesto de Fórmula I sobre la concentración de hemoglobina (mg/ml).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):



5

(I)

o un N-óxido o un profármaco correspondiente; o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de dicho compuesto; y el N-óxido y el profármaco de la sal y el solvato.

- 10 2. Una composición farmacéutica, que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, junto con al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

3. Un método para tratar la inflamación de las articulaciones en un paciente, que comprende: administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto
15 de acuerdo con la reivindicación 1.

4. Un método para tratar la artritis reumatoide en un paciente, que comprende: administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo
20 con la reivindicación 1.

5. Un método para tratar la inflamación de las articulaciones en un paciente, que comprende: administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto
de acuerdo con la reivindicación 1, en combinación con metotrexato.

- 25 6. Un método para tratar la artritis reumatoide en un paciente, que comprende: administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo
con la reivindicación 1, en combinación con metotrexato.

7. Un método para tratar un tumor en un paciente, que comprende: administrar a un
30 paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con la

82

reivindicación 1.

8. Un método para tratar un linfoma de las células del manto en un paciente, que comprende: administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto
- 5 de acuerdo con la reivindicación 1.

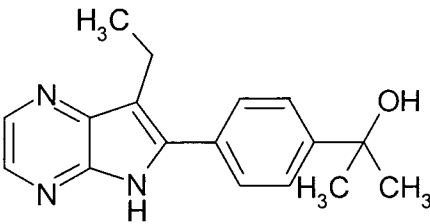
9. Un método para inhibir la angiogénesis en un paciente, que comprende: administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1.

10

RESUMEN

INHIBIDOR DE QUINASA

5 La invención se refiere a un compuesto de fórmula (I):



(I)

10 y a los profármacos y sales farmacéuticamente aceptable y solvatos de tales compuestos y de sus profármacos. Tal compuesto tienen propiedades farmacéuticas valiosas, en particular la capacidad de inhibir proteína quinasas.

15

20

25

30 WPC14775 / ID.145870

87

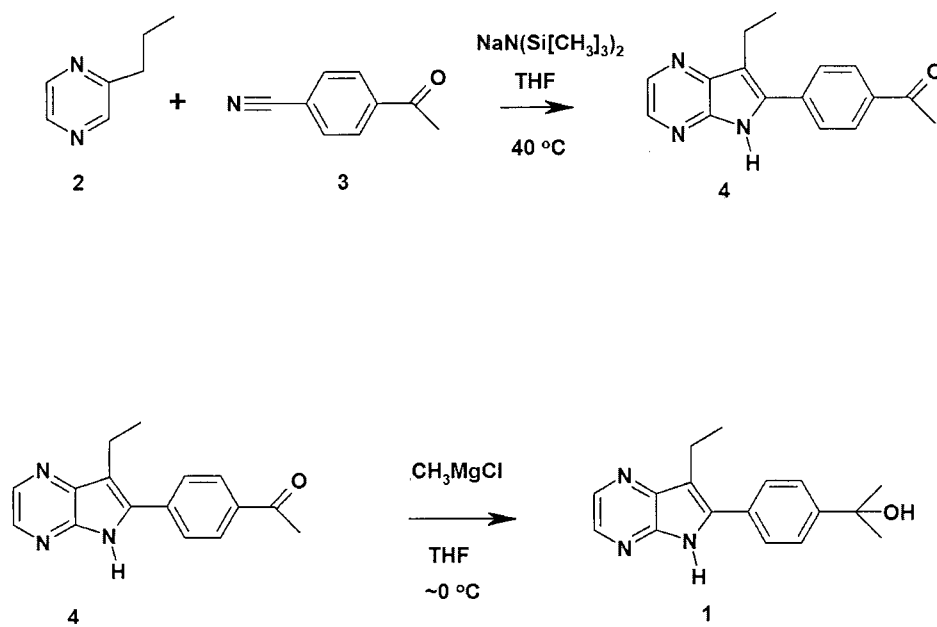


FIGURA 1

88

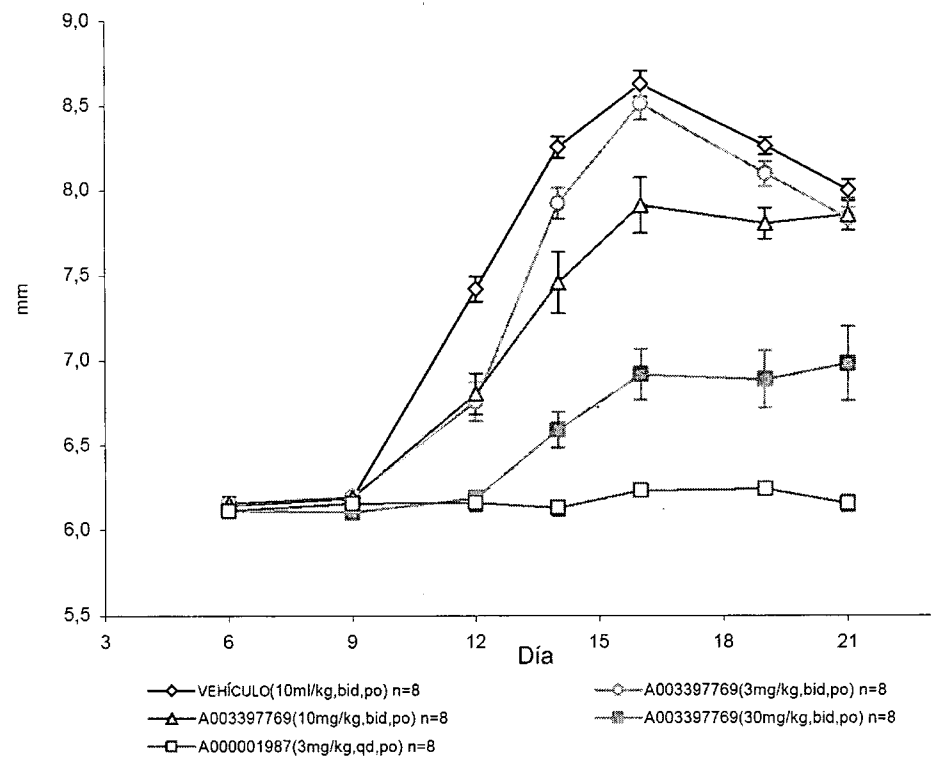
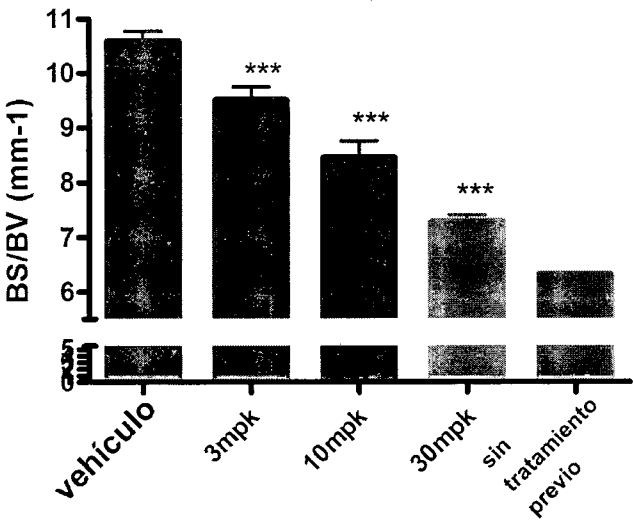


FIGURA 2

Relación entre superficie ósea y volumen óseo



***p<0,001 en comparación con el grupo de vehículo

FIGURA 3

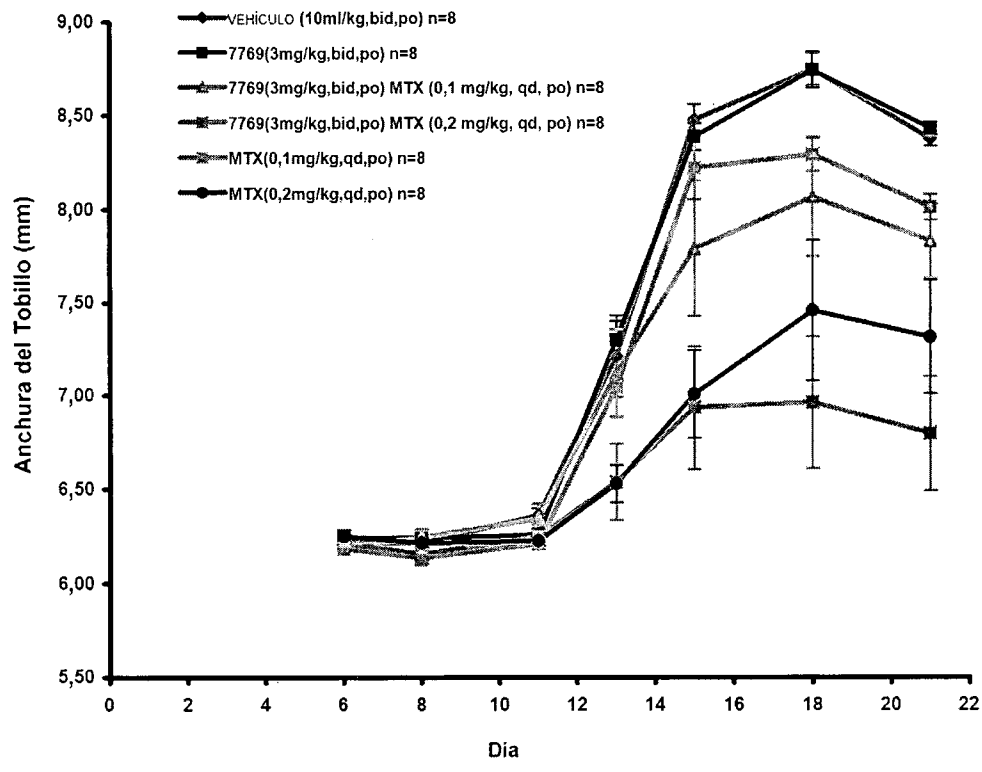


FIGURA 4

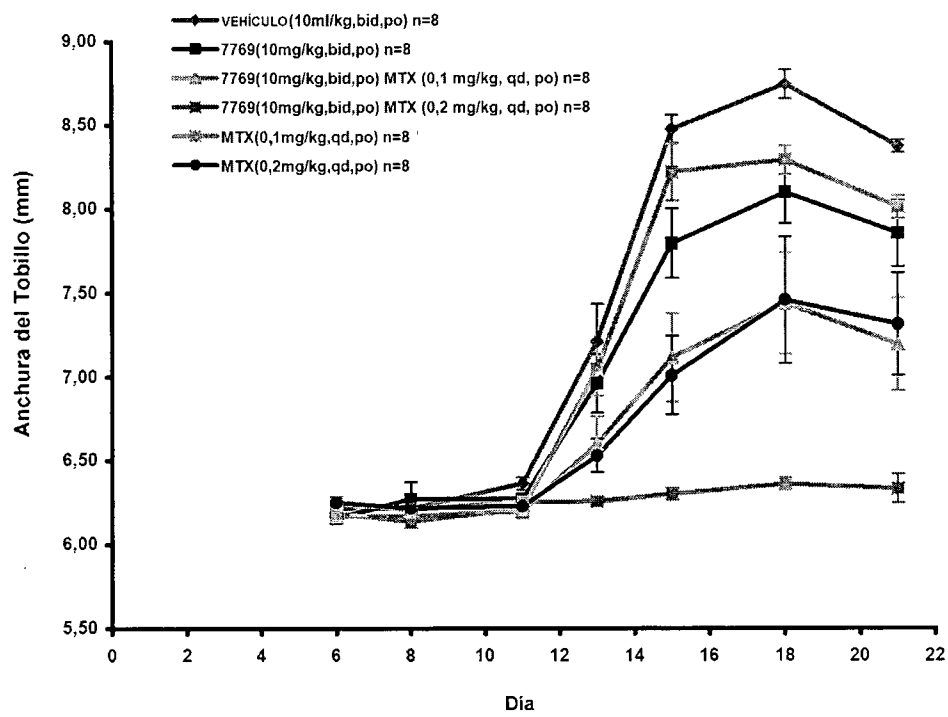
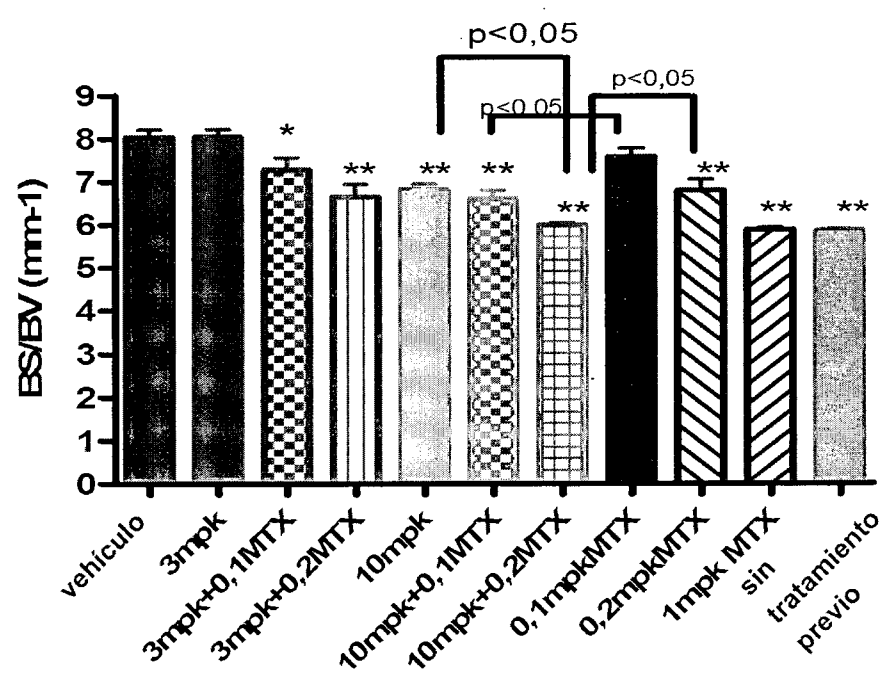


FIGURA 5

Relación entre superficie ósea y volumen óseo
en tobillos de ratas CIA tratadas con A003397769



* P<0,05 ** P<0,001 en comparación con el grupo de vehículo

FIGURA 6

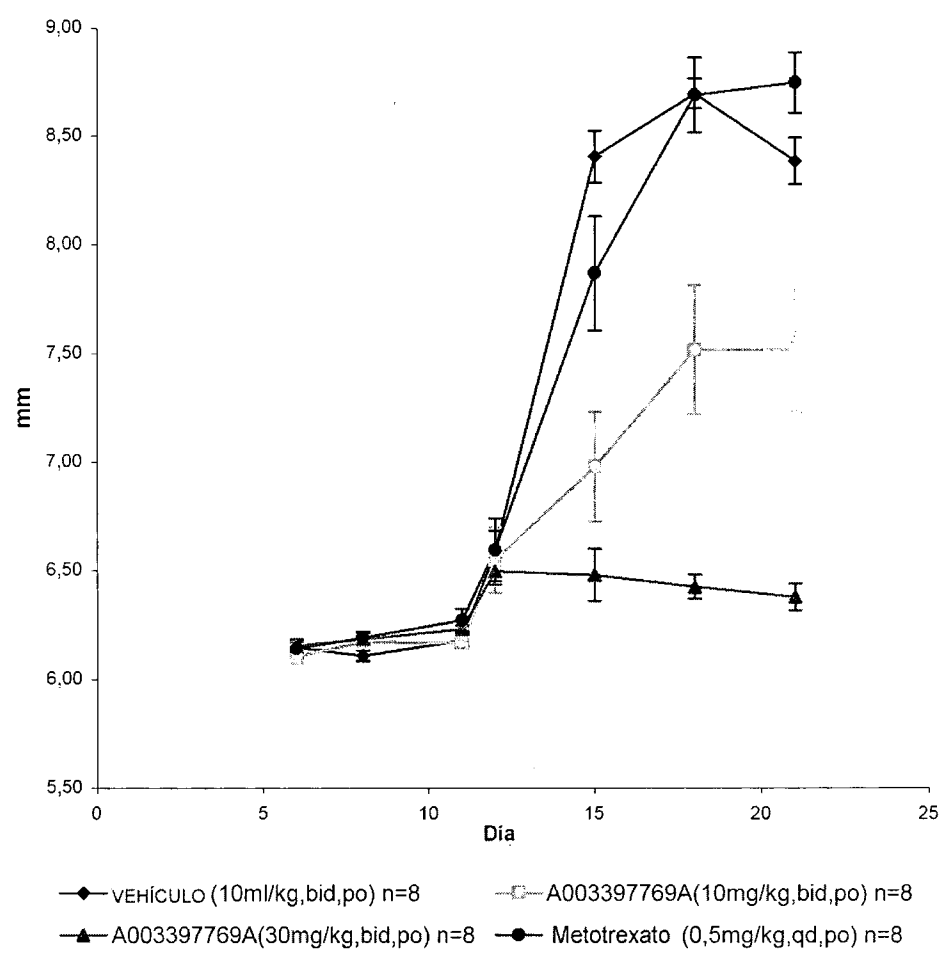
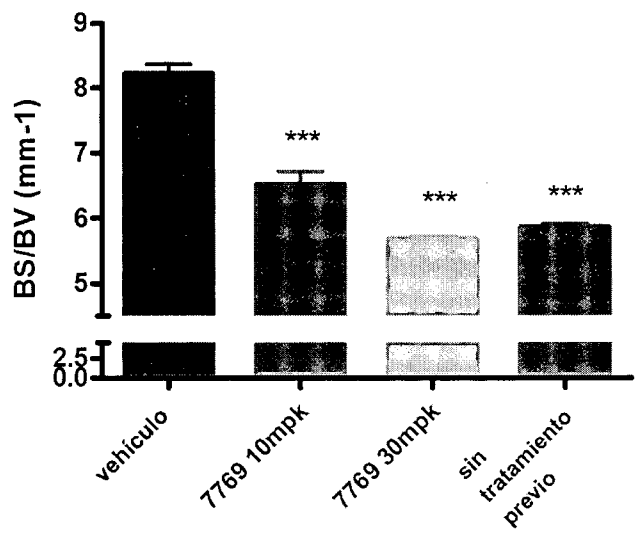


FIGURA 7

Relación entre superficie ósea y volumen óseo



***p<0,001 en comparación con el grupo de vehículo

FIGURA 8

95.

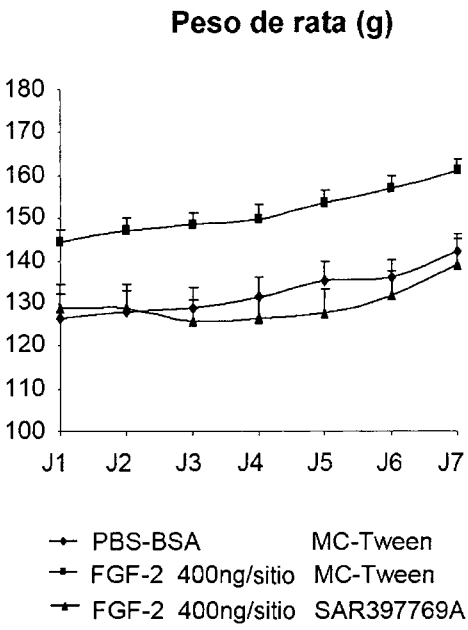


FIGURA 9

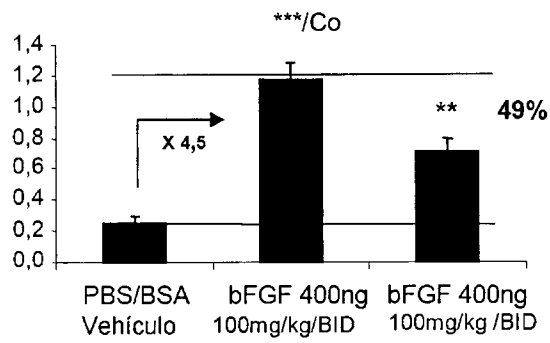


FIGURA 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/078103

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07D487/04 A61K31/4985 A61P19/02

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

B. FIELDS SEARCHED

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

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BEILSTEIN 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.
X	US 6 770 643 B2 (COX, PAUL J. [US] ET AL.) 3 August 2004 (2004-08-03) cited in the application Abstract; column 3, line 9 to column 4, line 22; claims 17, 24-25, 28; columns 151/152: compound A29-B34. -----	1-9

☐ 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

15 February 2008

Date of mailing of the international search report

26/02/2008

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

Weisbrod, Thomas

98

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/078103

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

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

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

Although claims 3-9 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 No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search reportcovers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

99

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2007/078103

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6770643	B2	US 2004009983 A1	15-01-2004
		US 2004198737 A1	07-10-2004

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference US2006205WO	FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/PEA/416		
International application No. PCT/US2007/078103	International filing date (day/month/year) 11.09.2007	Priority date (day/month/year) 11.09.2006			
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. C07D487/04					
Applicant Sanofi-Aventis					
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ sent to the applicant and to the International Bureau a total of <u>1</u> sheets, as follows: ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).					
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ 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 Article 35(2) 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					
Date of submission of the demand 2008-06-11		Date of completion of this report 05.08.2008			
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465		Authorized officer Weisbrod, Thomas Telephone No. +49 89 2399-8931			



**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/US2007/078103

201

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on

- ☒ 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 (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))

2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report):*

Description, Pages

1-30 as originally filed

Claims, Numbers

1-6 as originally filed

7-13 filed with telefax on 11.06.2008

Drawings, Sheets

1/10-10/10 as originally filed

- ☐ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing (*specify*):
- ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing (*specify*):
- ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):

5. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 70.2 (e)).

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US2007/078103

202

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

1. 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. 3-9

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 3-9 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 (*specify*):
- ☐ no international search report has been established for the said claims Nos.
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:
- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b) and 13ter.2.
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic 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

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US2007/078103

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-13</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-13</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-2,10-13</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

204

Re Item I

Basis of the opinion

- 1 Basis for new amended claims 10-13 is to be found on page 9, lines 9-15 of the description. The amendments comply thus with Article 19(2) and 34(2)(b) PCT.
- 2 The application is now directed to compounds (I) (claims 1, 10-13) and subject-matter referring to them (claims 2-9).

Re Item III

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

Claims 3-9 relate to a subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 39.1(iv)/67.1(iv) PCT.

Re Item V

Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

- 1 Reference is made to US-B2-6 770 643 (**D1**), cited in the application.
- 2 Novelty

The present compounds (I) are generally comprised within the compounds of **D1** (cf. claim 17: $X^1 = N$; $R^2 = \text{lower alkyl}$; $R^3 = H$; $(R^{10})_p = R^4 = \text{alkyl substituted by OH}$) but not specifically disclosed therein. The claimed matter is thus a novel selection from **D1**.
- 3 Inventive Step
 - 3.1 The application describes the synthesis of the parent compound according to formula (I) (example 1). According to the application, the claimed compounds inhibit protein kinases and, more particularly, they allegedly inhibit selectively Syk kinase (the

105

application, page 4, lines 21-23). The application, furthermore, shows that the exemplified compound binds to Syk kinase (cf. pages 18-23), inhibits a series of hematological malignant cell lines (cf. pages 23-26), collagen induced arthritis (pages 26-30), and angiogenesis (cf. page 30).

- 3.2 The present compounds (I) are a novel selection from **D1** because they are generally but not specifically disclosed therein. The compounds of **D1** are kinase inhibitors, particularly, selective Syk kinase inhibitors (**D1**, column 3, lines 10-13); exactly as the present compounds (I). The compounds of **D1** are useful against conditions which can be ameliorated by protein kinase inhibitors e.g. inhibitors of Syk, FAK, KDR or Aurora2. Such conditions include e.g. cancers and tumours; B cell lymphomas i.e. a hematological malignancy; joint inflammation including arthritis and arthritic conditions. Additionally, the **D1** compounds are useful as anti-angiogenic agents (cf. **D1**, column 158, line 50 to column 159, line 43).

Merely as a solution of the problem of selecting from **D1** Syk-kinase inhibitors which would be useful against e.g. hematological malignancies, arthritis or pathological angiogenesis, the claimed compounds are obvious to the skilled artisan, because such activities are taught in **D1**, at least to a certain extend. Hence, claims 1-13 do not involve an inventive step.

- 3.3 Inventive step may be acknowledged if the selected compounds (I) were characterised by a substantiated unexpected effect in comparison with the structurally most similar compound of **D1** (i.e. the present parent compound (I) vis-à-vis A29-B34 = 2[4-(7-Methyl-5H-pyrrolo[2,3-b]pyrazin-6-yl)phenyl]propan-2-ol of **D1**). Only in the presence of a substantiated unexpected effect in comparison with **D1**, the objective technical problem could be reformulated as "the selection of Syk kinase inhibitors which would have unexpected biological activities beyond that of the compounds of **D1**". As such a substantiated unexpected effect is at present not evident, inventive step cannot be acknowledged for claims 1-13.
- 4 Claims 3-9 relate to a subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 39.1(iv)/67.1(iv) PCT. The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as

106

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2007/078103

patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for a first or further medical treatment.

107

US2006/205

32

7. A method of treating a tumor in a patient, comprising: administering to a patient in need thereof an effective amount of a compound according to claim 1.
- 5 8. A method of treating a mantle cell lymphoma in a patient, comprising: administering to a patient in need thereof an effective amount of a compound according to claim 1.
9. A method of inhibiting angiogenesis in a patient, comprising: administering to a patient in need thereof an effective amount of a compound according to claim 1.
- 10 10. The compound according to claim 1, wherein the salt is selected from: hydrochloride, hydrobromide, sulphate, phosphate, nitrate, sulfamate, acetate, citrate, lactate, tartrate, malonate, oxalate, salicylate, propionate, succinate, fumarate, maleate, methylene-bis-b-hydroxynaphthoate, gentisate, isethionate, di-p-toluoyltartrate, methane-sulfonate, 15 ethanesulfonate, benzenesulfonate, p-toluenesulfonate, cyclohexylsulfamate and quinate.
11. The compound according to claim 1, wherein the salt is hydrochloride.
12. The compound according to claim 1, wherein the salt is acetate.
- 20 13. The compound according to claim 1, wherein the salt is citrate.

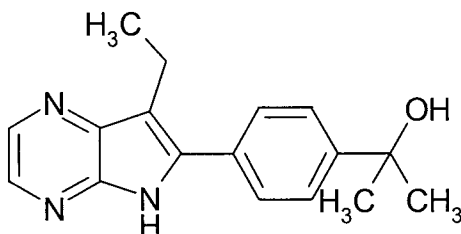
AMENDED SHEET

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

PARA REALIZAR EL EXAMEN DE
PATENTABILIDAD

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):



5

(I)

o un N-óxido o un profármaco correspondiente; o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de dicho compuesto; y el N-óxido y el profármaco de la sal y el solvato.

- 10 2. Una composición farmacéutica, que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, junto con al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

3. Un método para tratar la inflamación de las articulaciones en un paciente, que comprende: administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de
15 acuerdo con la reivindicación 1.

4. Un método para tratar la artritis reumatoide en un paciente, que comprende: administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con la
reivindicación 1.

20

5. Un método para tratar la inflamación de las articulaciones en un paciente, que comprende: administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en combinación con metotrexato.

- 25 6. Un método para tratar la artritis reumatoide en un paciente, que comprende: administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en combinación con metotrexato.

7. Un método para tratar un tumor en un paciente, que comprende: administrar a un
30 paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1.

8. Un método para tratar un linfoma de las células del manto en un paciente, que comprende: administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de

acuerdo con la reivindicación 1.

9. Un método para inhibir la angiogénesis en un paciente, que comprende: administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1.

5

10. El compuestos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la sal se selecciona de entre: hidrocloruro, hidrobromuro, sulfato, fosfato, nitrato, sulfamato, acetato, citrato, lactato, tartrato, malonato, oxalato, salicilato, propionato, succinato, fumarato, maleato, metileno-bis-b-hidroxinaftoato, gentisato, isetionato, di-p-toluoiltartrato, metano-sulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato, ciclohexilsulfamato y quinato.

10

11. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la sal es clorhidrato.

12. El compuesto de la reivindicación 1, en donde la sal es acetato.

15

13. El compuesto de la reivindicación 1, en donde la sal es citrato.

20

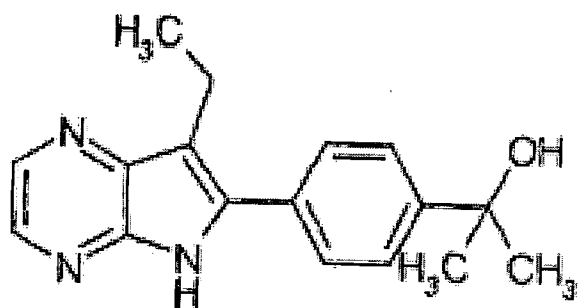
25

30

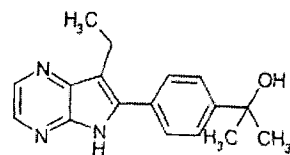
35

40

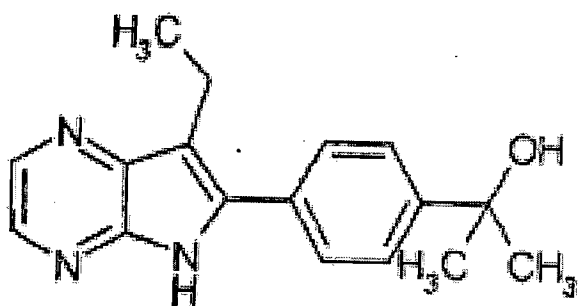
WPC14775 / ID.145872



(I)



(I)



(I)

123

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 16,803
FECHA : MARZO 2 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-025278- -00000-0000

Fecha: 2009-03-11 16:56:10 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 113

***** CONSIGNACION *****

POSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	19779045	02/03/2009	49,796,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Cob 14775-891088-9



No. 09-025278- -00000-0000

Fecha: 2009-03-11 16:56:10

Dep. 2020 NUECREACION

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 379 FASENACIONALII

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 113

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 ☐

Sandra Rodríguez
Firma Responsable

Fecha 4-4-09

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

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
SANOFI AVENTIS

REFERENCIA	Radicación No.	9 25278
	Solicitud internacional	PCT/US2007/078103
	Fecha inicio fase nacional	11/04/2009
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	~5102

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, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

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

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única 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 08 MAYO 2009
adpall