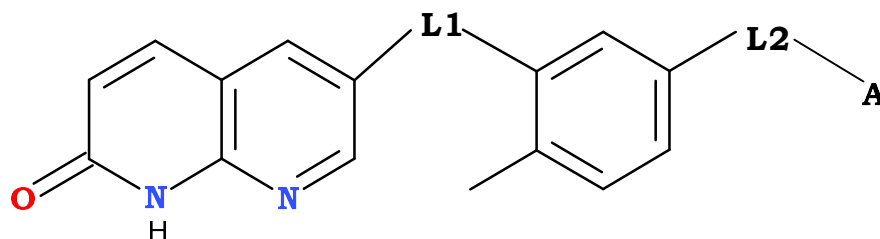


CAMPO DE LA INVENCION:

La presente invención se refiere a nuevas 1H-1, 8-naftiridin-2-onas antiproliferativas de la fórmula general (I) o sus sales farmacéuticamente aceptables:



Fórmula (I);

en la cual los grupos variables son como se definen aquí, y a su preparación y uso en el tratamiento terapéutico de trastornos relacionados con la inhibición de tirosina cinasas en mamíferos.

ARTE PREVIO DE LA INVENCION:

Las tirosina cinasas son una gran familia de proteínas que juegan un papel central en la regulación de varios trastornos, particularmente en el manejo de trastornos proliferativos. La desregulación de la actividad tirosina cinasa ha surgido como el principal mecanismo por el cual las células cancerosas evaden las limitaciones fisiológicas normales sobre el crecimiento, la proliferación y la supervivencia. Un importante mecanismo que conduce a la desregulación de las tirosinas cinasas es la mutación. La leucemia mieloide crónica (CML - *chronic myeloid leukaemia*) es un syndrome del trastorno de las células madre hematopoyético mielodisplásico crónico. El 95% de las CML resultan de una translocación recíproca entre el cromosoma-9 y el cromosoma-22 del cromosoma Philadelphia. Secuencias de la región de rotura de conglomerados (BCR - *break point cluster region*) del cromosoma en la translocación se yuxtaponen con la tirosina cinasa c-ABL del cromosoma-9. El gen de fusión produce una proteína mutante de 210 KDa, en la cual el primer exón de c-ABL se ha reemplazado por secuencias BCR, que codifican uno cualquiera de los dos aminoácidos 927 o 902. Otra proteína de fusión BCR-ABL de 185 KDa, que contiene secuencias BCR del exón 1 fusionadas al exón 2-11 de c-ABL, se encuentra en el 10% de los pacientes adultos con leucemia linfoblástica aguda (ALL - *acute lymphoblastic leukemia*). El producto génico quimérico BCR-ABL tiene una actividad tirosina cinasa varias veces mayor que su contraparte normal y se correlaciona con el fenotipo de la enfermedad.

Las tirosinas cinasas forman una porción significativa de todas las oncoproteínas, constituyendo un centro de atención como posibles dianas para la terapia antineoplásica. El fármaco antineoplásico Gleevec / Glivec / Imatinib Mesilato (Novartis STI571) es un medicamento que se ha constituido en un éxito de ventas para el tratamiento de CML y el tumor estromal gastrointestinal metastásico c-kit-positivo. El Gleevec inhibe selectiva y efectivamente la actividad cinasa de la proteína de fusión BCR-ABL, la cual es responsable de la señalización proliferativa constitutiva. Aunque el Imatinib es altamente efectivo desde el punto de vista terapéutico - con esperanzas y previsiones de éxito, que mejoran con el transcurso del tiempo - para la remisión sostenida y el potencial de limitar severamente o eliminar la evolución y transformación de la enfermedad, un buen número de pacientes no responden al Imatinib, o lo hacen por debajo de niveles óptimos. La erradicación de la enfermedad puede ser imposible con el Imatinib.

Con el uso del Imatinib se han desarrollado distintos patrones de resistencia y mutaciones de la cinasa Abl, las cuales alteran la unión del Imatinib o favorecen conformaciones de cinasa inaccesibles al Imatinib, Dasatinib y Nilotinib, los inhibidores de cinasa Abl alternos disponibles y restauran la remisión hematológica y citogénica en la mayoría de los pacientes con deficiencia primaria o resistencia adquirida en fase crónica. En la enfermedad avanzada y el cromosoma Filadelfia (Ph)+ ALL, las respuestas son más limitadas y la recidiva es común.

Las mutaciones de la cinasa ABL se agrupan generalmente en cuatro categorías principales y se asocian con residuos de aminoácidos numerados particulares: el bucle de unión del ATP (bucle p), particularmente los mutantes Y253 y E255; los mutantes T315; los mutantes M351; y el bucle de activación (bucle a), particularmente los mutantes H396. El modelamiento del Imatinib y otros inhibidores de cinasas con estructura cristalina de la región catalítica de la cinasa ABL sugiere que las mutaciones pueden interrumpir los puntos de contacto del medicamento críticos o inducir o favorecer una conformación de la cinasa Abl en la cual se reduce o imposibilita la unión del medicamento. Denominadas ahora la posición “guardavallas”, las mutaciones en la treonina 315 confieren resistencia al Imatinib y a los inhibidores de cinasa Abl de “segunda generación” Abl, el Nilotinib y el Dasatinib.

En consecuencia, existe una necesidad insatisfecha con respecto al tratamiento de pacientes que tienen la mutación T315I. La omacetaxina (homoharringtonina) está aprobada por la FDA para el tratamiento de pacientes adultos con leucemia mieloide crónica (CML) crónica de fase acelerada o crónica con resistencia y/o intolerancia a dos o más inhibidores de tirosina cinasa

(TKIs - *tyrosine kinase inhibitors*). Sin embargo, se administra subcutáneamente con un mecanismo no específico de acción. Otros fármacos candidatos incluyen el Rebastinib (WO 2008/046003) y el Ponatinib (WO 2007/075869). El Ponatinib (ICLUSIG) es un fármaco candidato aprobado para administración oral y se desarrolla por Ariad Pharmaceuticals para el tratamiento de leucemia mieloide crónica (CML) y leucemia linfoblástica aguda (ALL) cromosoma Filadelfia-positiva (Ph+). El Ponatinib estaba previsto para tener como mira (*to target*) no solo el BCR-ABL nativo, sino también sus isoformas que portan mutaciones que confieren resistencia al tratamiento con inhibidores de tirosina cinasa existentes, incluyendo especialmente la mutación T315I, para la cual no existe una terapia efectiva. Sin embargo, la Dirección de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU. (FDA) suspendió temporalmente las ventas del medicamento en los Estados Unidos de América en el 2013 debido “al riesgo de coágulos de sangre mortales y al estrechamiento severo de los vasos sanguíneos”. Esta suspensión se levantó posteriormente en parte con la información de prescripción revisada, una nueva "Advertencia de Recuadro Negro" y una "Estrategia de Evaluación y Mitigación de Riesgos" existentes.

En consecuencia, existe una necesidad de inhibidores selectivos de tirosina cinasas más nuevos, que sean oralmente activos, más seguros que las terapias existentes, particularmente con respecto a una disminución en el riesgo de coágulos de sangre mortales y estrechamiento serio de los vasos sanguíneos, y que sean eficaces contra las mutaciones de cinasa, incluyendo el mutante T315I. La presente invención se refiere a una nueva familia de 1H-1, 8-naftiridin-2-onas, las cuales son potentes inhibidores de tirosina cinasa Abl, y sus formas mutadas, incluyendo el mutante T315I. Los compuestos de la presente invención carecen de algunas de las desventajas de los productos farmacéuticos existentes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS:

Figura - 1 muestra patrones de difracción de rayos x en polvo (XRPDs - *x-ray powder diffraction patterns*) para NRC-21T

Figura - 2 muestra patrones de difracción de rayos x en polvo (XRPDs) para la sal clorhidrato de NRC-21T

Figura - 3 muestra la actividad anti-proliferativa de NRC-21T en varias líneas celulares leucémicas

Figura - 4 muestra la propiedad anti-invasiva de NRC-21T sobre la línea celular Baf3/T315I

Figura - 5 muestra el establecimiento de antagonismo de NRC-21T en un tumor inducido por T315I en ratones en ratones lampiños (*nude mice*)

Figura - 5A muestra el establecimiento de antagonismo de NRC-21T en un tumor inducido por T315I en ratones lampiños; fotografías del tumor

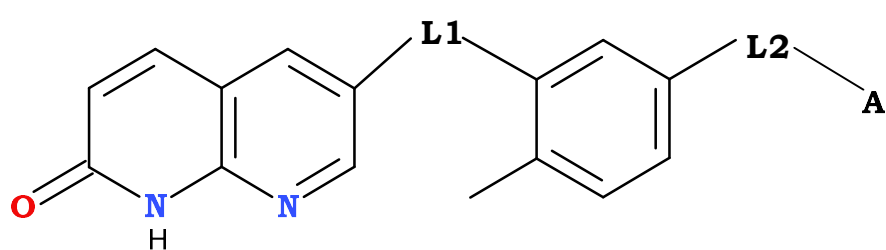
Figura - 5B muestra el establecimiento de antagonismo de NRC-21T en un tumor inducido por T315I en ratones lampiños; fotografías del bazo

Figura - 6A muestra un estudio de tiempo de supervivencia de NRC-21T

Figura - 6B muestra fotografías del bazo bajo el estudio del tiempo de supervivencia

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION:

La presente invención se refiere a un compuesto de la fórmula (I)



Fórmula (I)

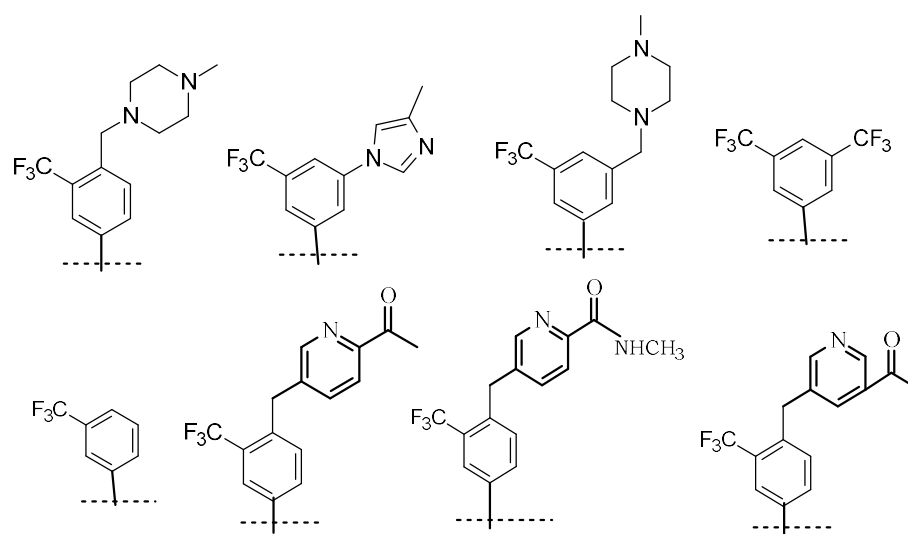
o sus sales farmacéuticamente aceptables; en donde,

L1 es un conector seleccionado de un enlace de carbono insaturado; preferiblemente un triple enlace carbono-carbono o un doble enlace carbono-carbono;

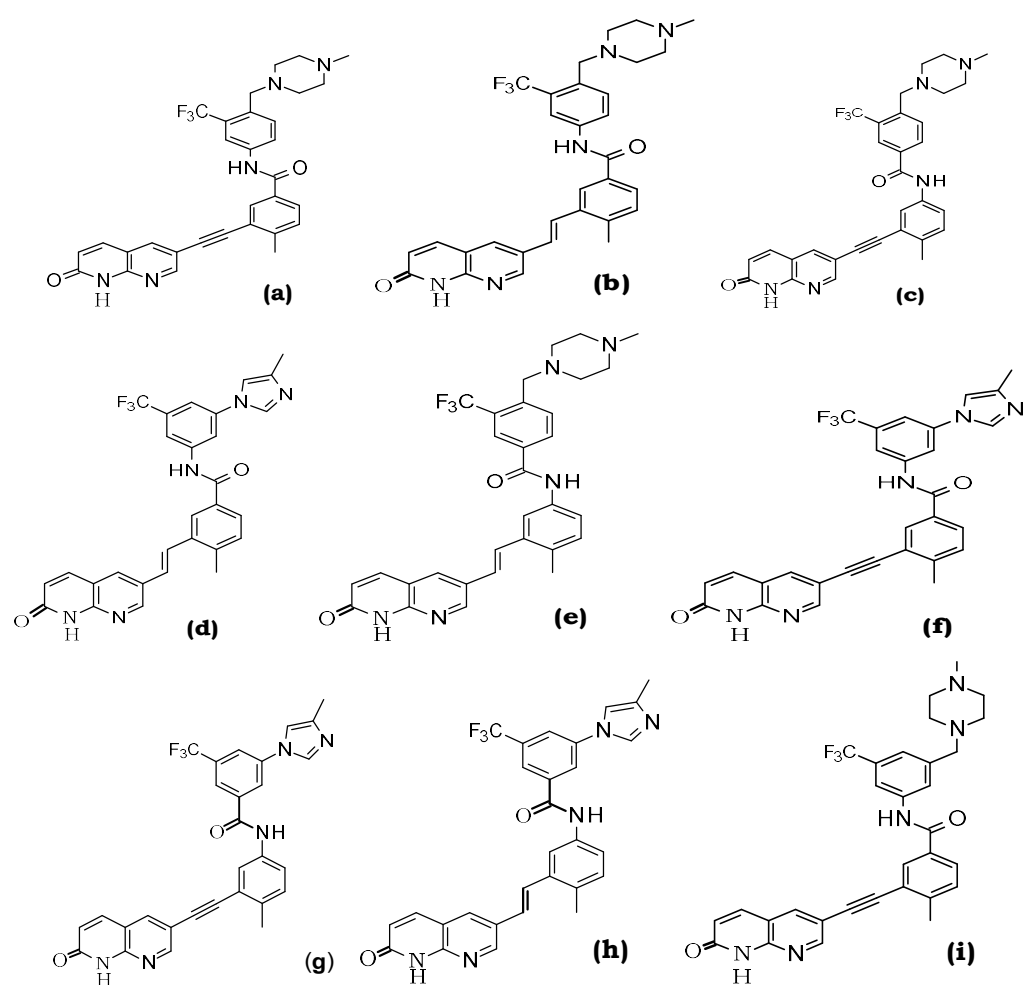
L2 es un conector seleccionado de NHC(O)-, C(O)NH-;

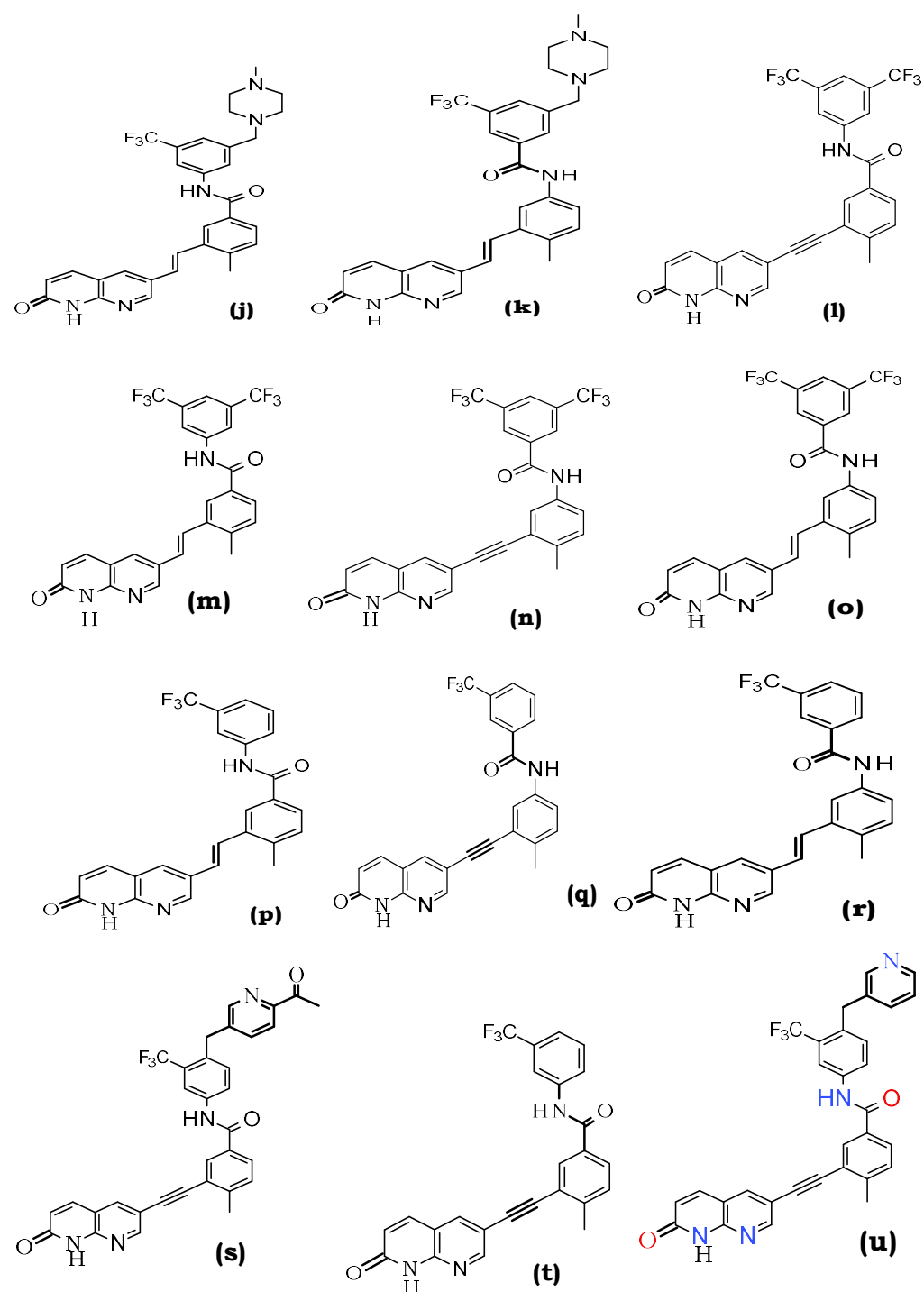
el anillo A incluye, aunque no se limita a, un anillo arilo o heteroarilo de 5 o 6 miembros, sustituido.

Ejemplos ilustrativos de los grupos de anillo A incluyen:



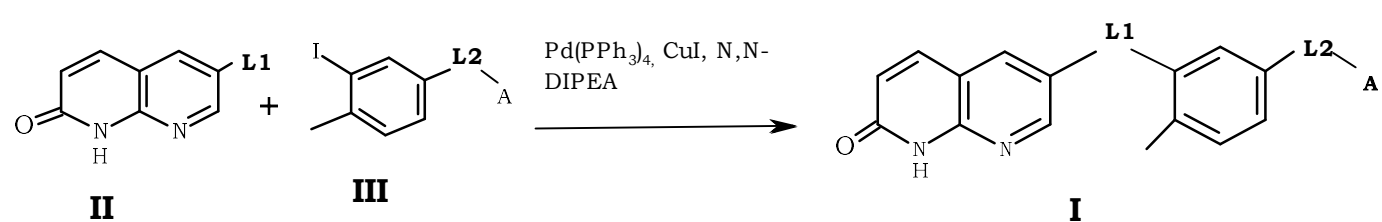
Ejemplos no limitantes del compuesto de fórmula (I) incluyen, pero no se limitan a, los que tienen las siguientes estructuras:





Compuestos de fórmula I (a-u)

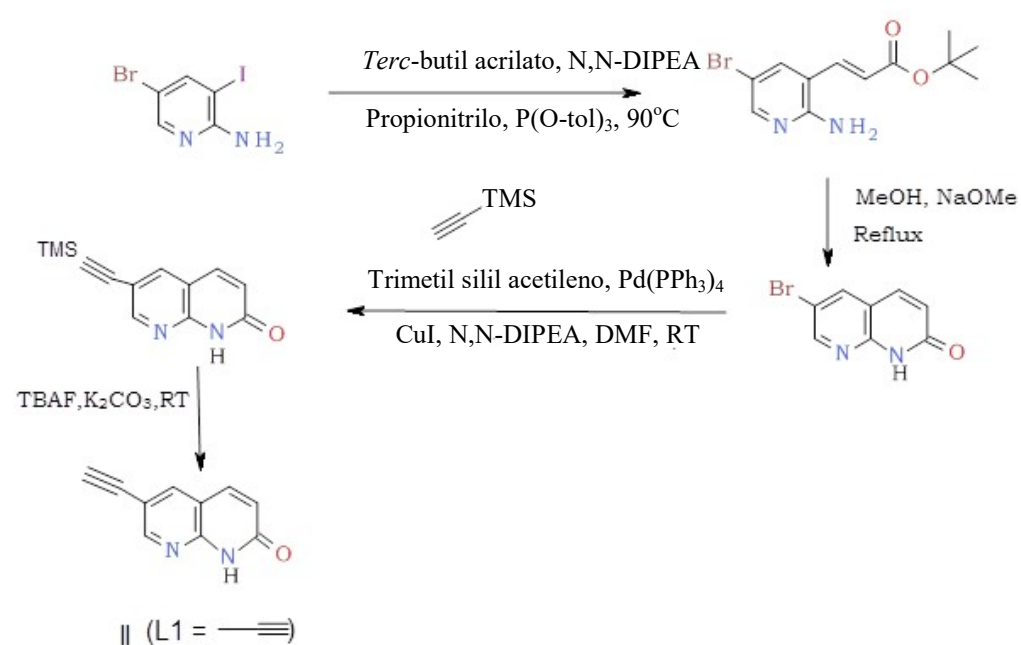
La presente invención proporciona un proceso para la preparación de compuestos de fórmula (I) por acoplamiento de Sonogashira, catalizado por paladio, de 6-sustituidas naftiridin-2-onas (II) con yodobenzamidas (III). La representación esquemática es la siguiente:



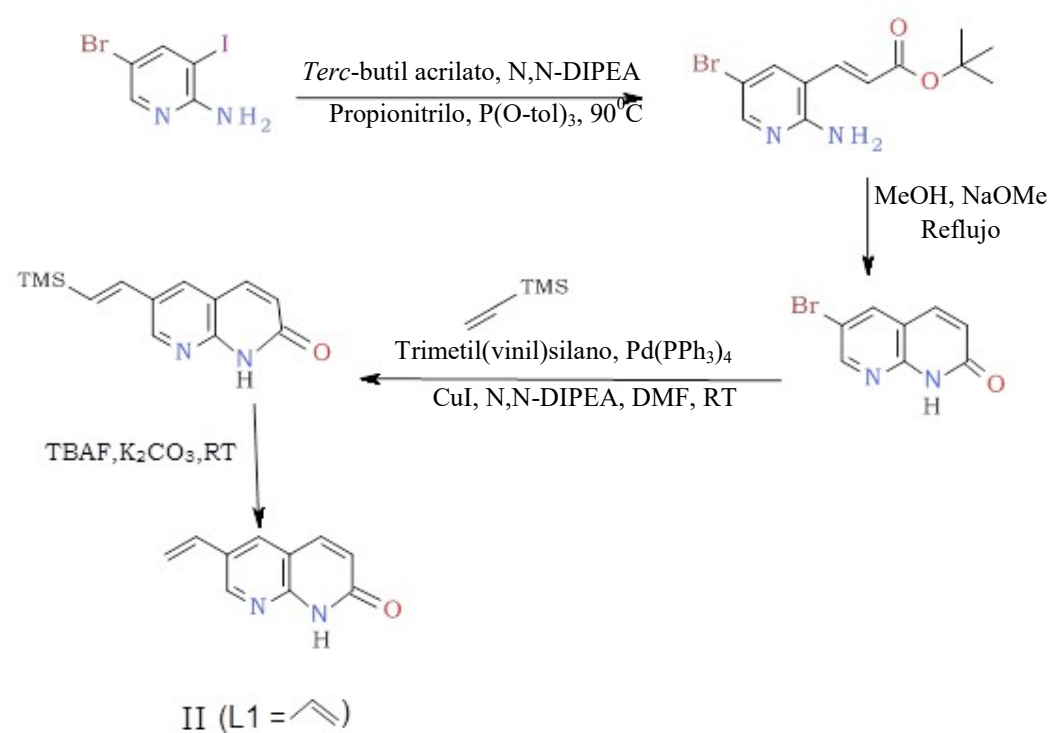
Esquema - 1

Varios enfoques sintéticos generales ilustrativos a la preparación de dos intermedios claves II y III, basados en transformaciones conocidas, se ilustran en los esquemas 2 a 5.

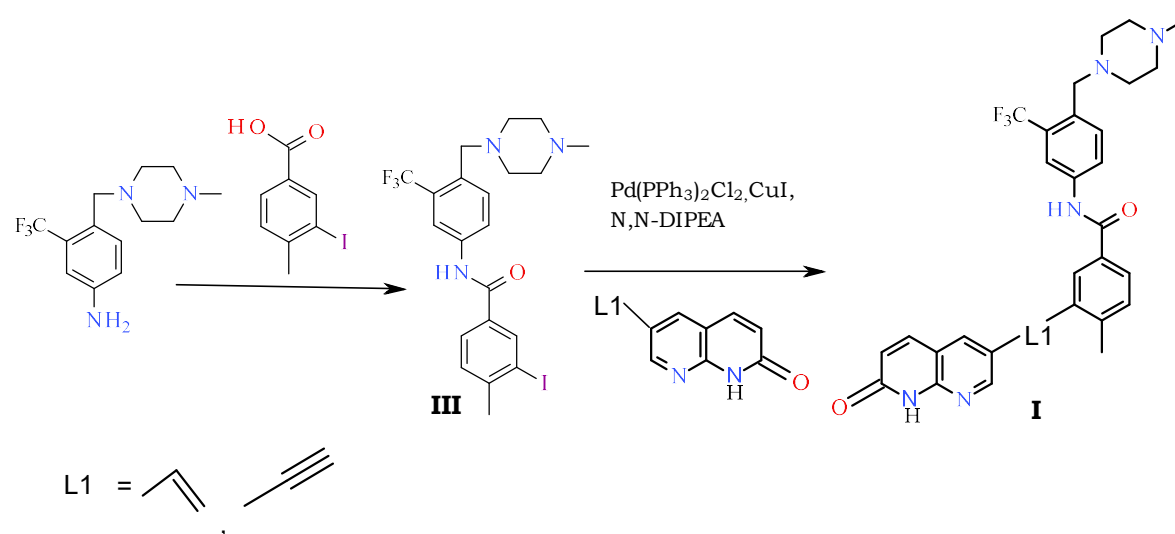
Esquema - 2: Representa la preparación de los intermedios-II: (primer conjunto)



Esquema - 3: Representa la preparación de los intermedios-II: (segundo conjunto)



Esquema - 4: Representa la preparación de los intermedios-III y el compuesto de fórmula (I)



El compuesto de fórmula (I) puede prepararse de acuerdo con los esquemas ya indicados. El compuesto de fórmula (I) puede convertirse en sus N-óxidos, o sus sales farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, ácidos inorgánicos apropiados son, ácidos halogenados, tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, o ácido fosfórico. Ácidos orgánicos apropiados son, por ejemplo, ácidos carboxílico, fosfónico, sulfónico o sulfámico, por ejemplo ácido acético, ácido propiónico, ácido octanoico, ácido decanoico, ácido dodecanoico, ácido glicólico, ácido

láctico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido adípico, ácido pimélico, ácido subérico, ácido azelaico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido oxálico, aminoácidos, tales como arginina o lisina, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido metilmaleico, ácido ciclohexanocarboxílico, ácido adamantanocarboxílico, ácido benzoico, ácido fenoxi benzoico, ácido 2-acetoxi benzoico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido ftálico, ácido fenilacético, ácido mandélico, ácido cinámico, ácido metano- o etano-sulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 1,5-naftaleno-disulfónico, ácido 2-, 3- o 4-metilbencenosulfónico, ácido metilsulfúrico, ácido etilsulfúrico, ácido dodecilsulfúrico, ácido N-ciclohexilsulfámico, ácido N-metil-, N-etil- o N-propil-sulfámico, u otros ácidos protónicos orgánicos, tales como ácido ascórbico.

Para fines de aislamiento o purificación es también posible usar sales farmacéuticamente inaceptables, por ejemplo picratos o percloratos. Para uso terapéutico, se emplean únicamente sales farmacéuticamente aceptables o compuestos libres (donde sea pertinente en la forma de preparados farmacéuticos) y, en consecuencia, estas se prefieren.

Los compuestos de fórmula (I) o N-óxidos o sus sales farmacéuticamente aceptables inhiben en grados variables las tirosina cinasas de receptor y no receptor, las cuales juegan un papel en la regulación del crecimiento y la transformación en células de mamíferos, incluyendo células humanas. Las tirosina cinasas de receptor pueden ser cinasas de la familia EGF, v.g. cinasa ErbB2 (HER-2), cinasa ErbB3, cinasa ErbB4; cinasa de receptor del factor de crecimiento insulinoide (cinasa IGF-1), especialmente los miembros de la familia de las tirosina cinasas de receptor PDGF, tales como la cinasa de receptor PDGF- α y PDGF- β , JAK-2, la cinasa de receptor CSF-1, las fosfatidilinositol 3-cinasas (PI-3-cinasas o PI3Ks), AKT, CDK, mTOR, cinasa de receptor Kit, Flt-3, Flt-4, FGFR-1, FGFR-3, FGFR-4, c-Met, RON, c-Ret, ALK y cinasa de receptor VEGF. Las tirosina cinasas de no receptor pueden ser cinasas tales como cinasa Abl/Bcr-abl, Arg, cinasas de la familia Src, cinasa c-Src, c-Yes. Lck, Lyn y Fyn. Se ha descubierto que los compuestos de la presente invención inhiben especialmente la cinasa Abl/Bcr-Abl, incluyendo las formas mutantes; las cinasas Lyn y Lck. Los compuestos de fórmula (I) o N-óxidos o sus sales farmacéuticamente aceptables inhiben en grados variables las formas mutantes de la cinasa Abl/Bcr-Abl, las cuales incluyen los mutantes del bucle P de la cinasa, es decir, L284V, G250E, Q225H, Y253F & E255K; los mutantes de la hélice C de la cinasa, es decir, D276G y E279H; los mutantes de la región de unión de ATP de la cinasa, es decir, V299L, T315I y F317L; el mutante de contacto SH2 de la cinasa, es decir, M351T; el

mutante de la región de unión a sustrato de la cinasa, es decir, F359V; los mutantes del bucle A de la cinasa, es decir, L384M, H395P, H396R y G398R; y la cinasa del mutante del lóbulo C-terminal, es decir, F486S.

Se ha descubierto que los compuestos de la presente invención inhiben especialmente los mutantes importantes de las cinasas abl/Bcr-Abl, es decir, Q252H, Y253F, M351T, H396P y, más particularmente, los compuestos de fórmula (I) inhiben la forma altamente resistente de la cinasa mutada, es decir, el mutante T315I.

Por lo demás, la presente invención se relaciona con un método para el tratamiento de una enfermedad neoplásica dependiente de tirosina cinasas, especialmente leucemia mielógena crónica (CML - *chronic myelogenous leukemia*), leucemia linfocítica crónica (CLL - *chronic lymphocytic leukemia*), leucemia linfoblástica aguda (ALL - *acute lymphoblastic leukemia*), leucemia mieloide aguda (AML *acute myeloid leukemia*), síndrome mielodisplásico, melanoma, tumores de células germinales, tumor estromal gastrointestinal (GIST - *gastrointestinal stromal tumour*), cáncer pulmonar amicrocítico (NSCLC - *non-small cell lung cancer*), mastocitosis, neuroblastoma, glioblastoma, astrocitoma, carcinoma hepatocelular, cáncer de células renales, cáncer de mama, esclerosis sistémica cutánea, cáncer de próstata y colorrectal y demás tumores sólidos, remisiones de diabetes.

La presente invención se refiere por lo demás a un método para el tratamiento de una enfermedad neoplásica que responde a una inhibición de la actividad de una proteína cinasa, el cual comprende administrar un compuesto de fórmula (I) o un N-óxido o su sal farmacéuticamente aceptable, en una cantidad efectiva contra la citada enfermedad, a un mamífero que requiere el citado tratamiento.

En particular, la presente invención se refiere a un método de tratamiento de trastornos proliferativos especialmente leucemia, independientemente de la etiología del trastorno, que responde a la inhibición de las tirosina cinasas ya mencionadas, particularmente la tirosina cinasa Abl/Bcr-Abl y a una o más de sus formas mutadas severas. El tratamiento comprende administrar un compuesto de fórmula (I) o un N-óxido o su sal farmacéuticamente aceptable, en una cantidad efectiva contra la citada enfermedad, a un mamífero que requiere el citado tratamiento.

La eficacia biológica de los compuestos de la presente invención se ha establecido mediante evaluación de la eficacia *in vitro* en la línea de células K562, BCR-abl-positiva, y las líneas de células mutantes Baf3/T315i, M351T, E255K y WT; el análisis de invasión Matrigel; la determinación de MTD del NRC21T; el establecimiento de antagonismo de NRC21T en tumores inducidos por T315I en ratones lampiños; establecimiento del tiempo de supervivencia de NRC21T en ratones lampiños.

Con base en estos estudios, los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la presente invención muestran eficacia terapéutica especialmente contra trastornos dependientes de tirosina cinasas (TK), particularmente en enfermedades proliferativas.

La presente invención se relaciona asimismo con composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad efectiva del compuesto de fórmula (I) o un N-óxido o una sal farmacéuticamente aceptable, especialmente una cantidad efectiva en la prevención o terapia de una de las enfermedades ya mencionadas, de un ingrediente activo junto con portadores farmacéuticamente aceptables que son apropiados para administración tópica, entérica, por ejemplo oral o rectal, o parenteral, y pueden ser orgánicos o inorgánicos, sólidos o líquidos. Además del (de los) ingrediente(s) activo(s), las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden contener uno o más excipientes o coadyuvantes. La selección de los excipientes y las cantidades a usar pueden determinarse fácilmente por el científico de la formulación, basándose en la experiencia y la consideración de los procedimientos estándar, así como de los trabajos de referencia en el campo.

Los diluyentes aumentan el volumen (*bulk*) de una composición farmacéutica sólida, y pueden hacer a una presentación posológica farmacéutica, que contiene la composición, más fácil de manejar por el paciente y el cuidador. Diluyentes para composiciones sólidas incluyen, por ejemplo, celulosa microcristalina (v.g., Avicel®), celulosa microfina, lactosa, almidón, almidón pregelatinizado, carbonato de calcio, sulfato de calcio, azúcar, dextratos, dextrina, dextrosa, fosfato de calcio dibásico dihidratado, fosfato de calcio tribásico, caolín, carbonato de magnesio, óxido de magnesio, maltodextrina, manitol, polimetacrilatos (v.g., Eudragit®), cloruro de potasio, celulosa en polvo, cloruro de sodio, sorbitol y talco.

Composiciones farmacéuticas sólidas que se compactan en una forma posológica, tales como cápsulas, pueden comprender excipientes cuyas funciones incluyen contribuir a cohesionar el ingrediente activo y otros excipientes entre sí después de la compresión. Aglutinantes para composiciones farmacéuticas sólidas incluyen acacia, ácido algínico, carbómero (v.g., carbopol), carboximetilcelulosa sódica, dextrina, etil celulosa, gelatina, goma de guar, aceite vegetal hidrogenado, hidroxietil celulosa, hidroxipropil celulosa (v.g., Klucel(R)), hidroxipropil metil celulosa (v.g., Methocel®), glucosa líquida, silicato de aluminio y magnesio, maltodextrina, metilcelulosa, polimetacrilatos, povidona (v.g., Kollidon®), Plasdone®), almidón pregelatinizado, alginato de sodio y almidón.

La velocidad de disolución de una composición farmacéutica sólida, compactada, en el estómago del paciente puede aumentarse por la adición de un desagregante a la composición. Los desagregantes incluyen ácido algínico, carboximetilcelulosa cálcica, carboximetilcelulosa sódica (v.g., Ac-Di-Sol®, Primellose®), dióxido de silicio coloidal, croscarmelosa sódica, crospovidona (v.g., Kollidon®, Polyplasdone®), goma de guar, silicato de aluminio y magnesio, metil celulosa, celulosa microcristalina, polacrilina potásica, celulosa en polvo, almidón pregelatinizado, alginato de sodio, glicolato de almidón sódico (v.g., Explotab®) y almidón.

Pueden agregarse reductores de fricción (*glidants*) para incrementar del deslizamiento del polvo de una composición sólida no compactada y mejorar la exactitud de la dosificación. Los excipientes que pueden funcionar como reductores de fricción incluyen dióxido de silicio coloidal, trisilicato de magnesio, celulosa en polvo, almidón, talco y fosfato de calcio tribásico.

Cuando una presentación farmacéutica, tal como una cápsula, se elabora por compactación de una composición en polvo, la composición se somete a presión de un punzón y una matriz. Algunos excipientes e ingredientes activos tienen una tendencia a adherirse a las superficies del punzón y la matriz, lo cual puede ocasionar que el producto presente picaduras (*pitting*) y otras irregularidades superficiales. Puede agregarse un lubricante a la composición para reducir la adhesión y facilitar la liberación del producto de la matriz. Los lubricantes incluyen estearato de magnesio, estearato de calcio, monoestearato de glicerilo, palmitoestearato de glicerilo, aceite de ricino hidrogenado, aceite vegetal hidrogenado, aceite mineral, polietilén

glicol, benzoato de sodio, laurilsulfato sódico, estearilfumarato sódico, ácido esteárico, talco y estearato de cinc.

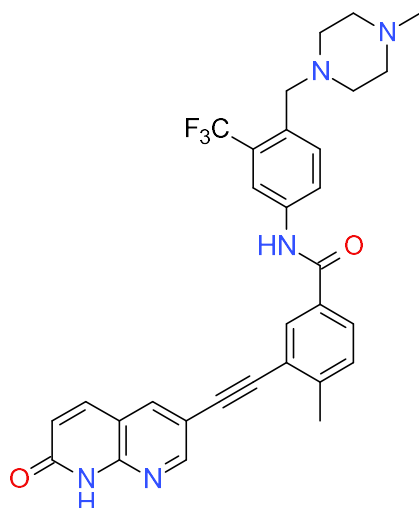
Agentes saborizantes y potenciadores del sabor hacen la presentación farmacéutica más agradable al gusto del paciente. Agentes saborizantes y potenciadores del sabor comunes para productos farmacéuticos, que pueden incluirse en la composición de la presente invención incluyen maltol, vainilla, etil vainilla, mentol, ácido cítrico, ácido fumárico, etil maltol, y ácido tartárico. Las composiciones sólidas pueden colorearse igualmente usando cualquier colorante farmacéuticamente aceptable para mejorar su apariencia y/o facilitar la identificación por el paciente.

Los detalles de la presente invención se consignan en los Ejemplos incluidos a continuación, los cuales se dan con fines ilustrativos únicamente y no pretenden limitar el ámbito de la invención en modo alguno.

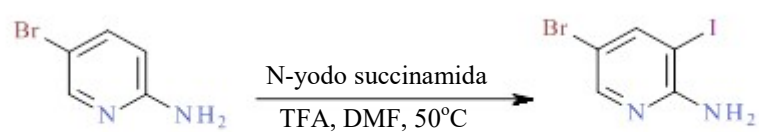
SECCIÓN EXPERIMENTAL:

Ejemplo - 1

4-Metil-N-[4-[(4-metilpiperazin-1-il) metil]-3-(trifluorometil) fenil]-3-[2-(7-oxo-8H-1, 8-naftiridin-3-il) etinil]benzamida (código de desarrollo: NRC21T)

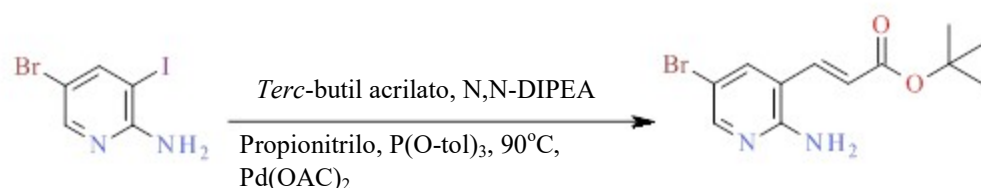


1.1 2-Amino-5-bromo-3-yodo piridina



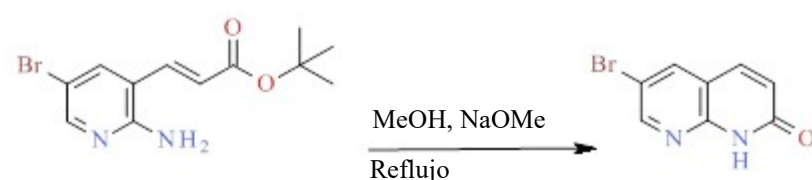
A una solución de 2-amino-5-bromo piridina en DMF, se agregó ácido trifluoroacético (1,1 equivalente) a temperatura ambiente, seguido por la adición de N-yodo succinimida (1,1 equivalente) y la mezcla de reacción se calentó a 50°C durante 180 minutos. Luego de completada la reacción, la masa de la reacción se enfrió a temperatura ambiente y el producto se precipitó agregando la mezcla de reacción a agua. Después de neutralizar con tiosulfato de sodio y 1N NaOH, el compuesto del título se recogió por filtración como un sólido color marrón con 90% de rendimiento.

1.2 (E)-*tert*-butil 3-(2-amino-5-bromopiridin-3-il) acrilato



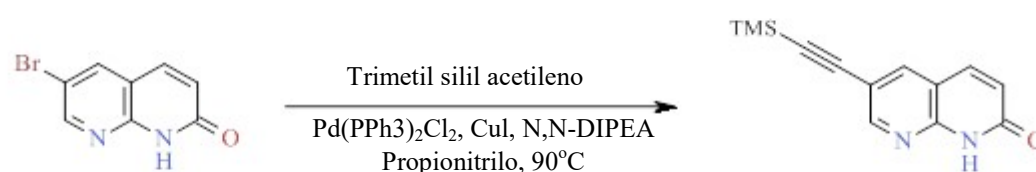
A una solución de 2-amino-5-bromo-3-yodo piridina (1 equivalente), *tert*-butil acrilato (2 equivalentes), e isopropanol (2 equivalentes), nitrito de etilo (3 equivalentes) se agregó propionitrilo (10 equivalentes) y luego DMF (10 equivalentes). La solución se desoxigenó con gas nitrógeno durante 15 minutos. La mezcla se trató con Pd(OAc)₂ (0,1 equivalente) y P(O-tol)₃ (0,2 equivalente) luego se calentó a 90°C durante 16 horas y, a continuación, se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice. El filtrado se concentró, se diluyó con agua, se extrajo con acetato de etilo, y la capa orgánica se concentró bajo vacío por debajo de 60°C. El compuesto se recogió por filtración usando hexano como solvente (70% de rendimiento). ESI MS m/z 299 (100%).

1.3 6-Bromo-1H-1, 8-naftiridin-2-ona



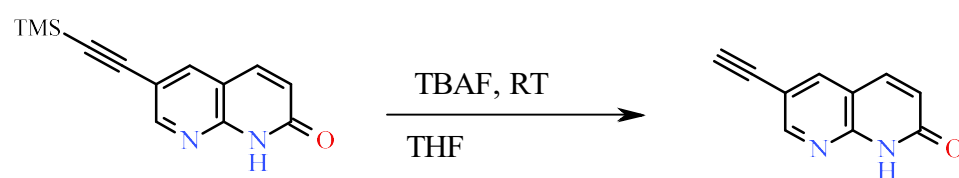
Una solución de (E)-*tert*-butil 3-(2-amino-5-bromopiridin-3-il) acrilato (1 equivalente) en metanol anhidro se trató con metóxido de sodio (4,9M, 5 equivalentes) bajo una atmósfera de gas nitrógeno. La solución se calentó a temperatura de reflujo durante 3 horas, luego se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla se enfrió en un baño de agua helada y se trató con agua bajo agitación rápida para producir un precipitado. El sólido se filtró y se lavó con agua. Se secó bajo presión reducida para producir un sólido blancuzco (80% de rendimiento). ESI MS m/z 225 (100%).

1.4 6-(2-Trimetilsililetinil)-1H-1, 8-naftiridin-2-ona



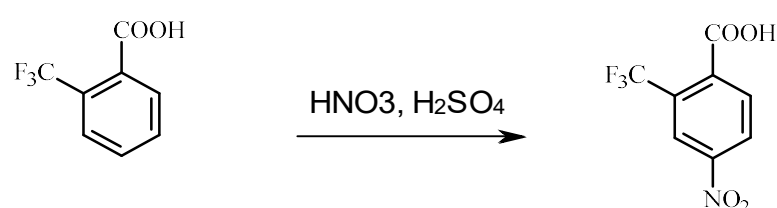
Una mezcla de 6-bromo-1H-1, 8-naftiridin-2-ona (1 equivalente), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0,1 equivalente), CuI (0,15 equivalente), (i-Pr)₂EtN (4 equivalentes) en propionitrilo se desoxigenó con gas nitrógeno durante 15 minutos. A continuación se agregó trimetil silil acetileno (2 equivalentes) y se calentó a 90°C durante 10 horas. Seguidamente la masa de la reacción se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice a temperatura ambiente. El filtrado se concentró y el compuesto se recogió por filtración usando propionitrilo como solvente a 0-5°C (60% de rendimiento).

1.5 6-Etinil-1H-1, 8-naftiridin-2-ona



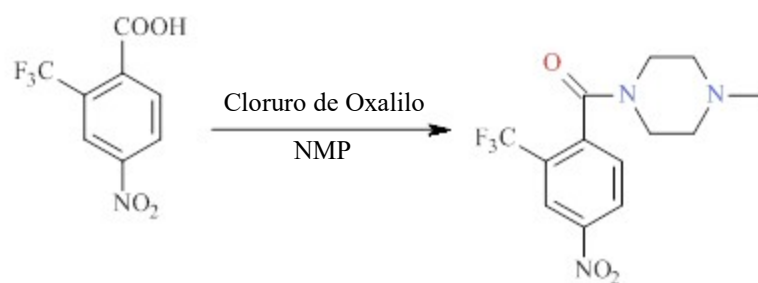
A una solución de 6-(2-trimetilsilietinil)-1H-1, 8-naftiridin-2-ona (1 equivalente) en THF (10 veces) se agregó lentamente 1M de solución TBAF en THF (1,1 equivalente) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de gas nitrógeno durante 15 minutos y se agitó durante 15 minutos. Se observó la formación del producto extinguiendo la masa de reacción en agua. El producto se recogió por filtración a 0-5°C. Para la purificación posterior, se realizó recristalización en acetona como solvente (80% de rendimiento).

1.6 Ácido 4-nitro-2-(trifluorometil) benzoico (SC1)



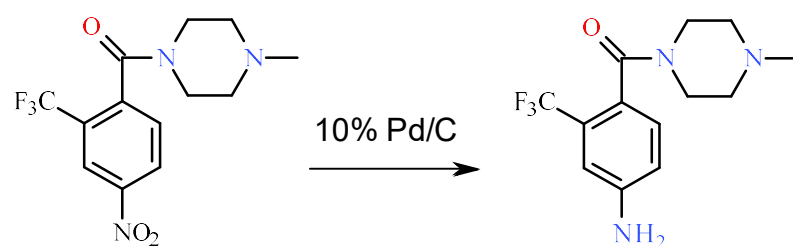
Bajo una atmósfera de gas nitrógeno, una mezcla agitada mecánicamente de ácido 2-trifluorometil benzoico (1 equivalente) y H₂SO₄ concentrado (22 equivalentes) se enfrió en un baño helado a 0-5°C. Posteriormente se agregó gota a gota ácido nítrico fumante (9,8 equivalentes) a 0-5°C durante 60 minutos. Se retiró el baño helado y se continuó la agitación durante 120 minutos a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se vertió en agua helada y se agitó durante 60 minutos a temperatura ambiente. La suspensión se filtró, se lavó con agua enfriada y se obtuvo el compuesto crudo del título. Para retirar el regioisómero, el producto crudo se recristalizó de agua (45% de rendimiento). M.P.: 137-142°C

1.7 (4-Metilpiperazin-1-il)-[4-nitro-2-(trifluorometil) fenil]metanona (SC2)



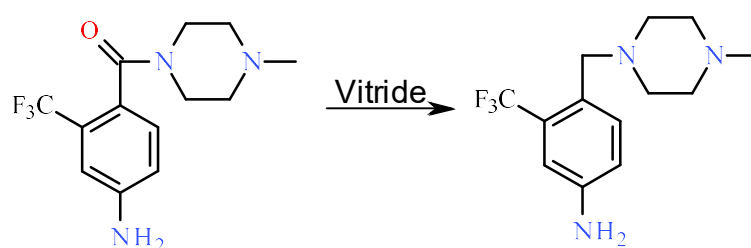
A una solución helada de ácido 4-nitro-2-(trifluorometil) benzoico (1 equivalente), CH_2Cl_2 (15 veces) y DMF (0,5 equivalente) bajo una atmósfera de nitrógeno, se agregó gota a gota cloruro de oxalilo (2 equivalentes). Después de 4 horas, la solución resultante se concentró en vacío. El residuo se disolvió en CH_2Cl_2 y se agregó gota a gota a una solución helada de N-metil piperazina (2,1 equivalentes) en CH_2Cl_2 . Después de agitar durante 3 horas, la mezcla se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó con agua, 3 porciones de solución 10% de Na_2CO_3 , agua y salmuera. La fase orgánica se concentró para obtener el compuesto del título como un aceite (96% de rendimiento).

1.8 [4-Amino-2-(trifluorometil) fenil]-(4-metilpiperazin-1-il)metanona (SC3)



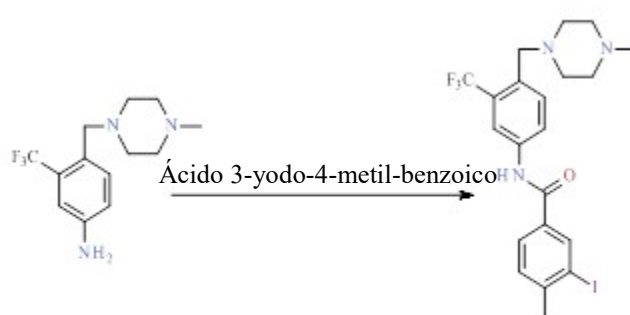
A una solución de (4-metilpiperazin-1-il)-[4-nitro-2-(trifluorometil) fenil]metanona (1 equivalente) en metanol (3 veces) se agregó 10% Pd/C bajo una atmósfera de nitrógeno. A continuación se agregó lentamente 66% de solución de formiato de amonio (5 equivalentes) a temperatura ambiente (exotérmica). Después de agitar durante 120 minutos, se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice. El filtrado se concentró y se diluyó con agua, se extrajo con CH_2Cl_2 y se lavó con agua. Después de la concentración de CH_2Cl_2 , el compuesto se recogió por filtración usando hexano como solvente (90% de rendimiento).

1.9 4-[(4-Metilpiperazin-1-il) metil]-3-(trifluorometil) anilina (SC4)



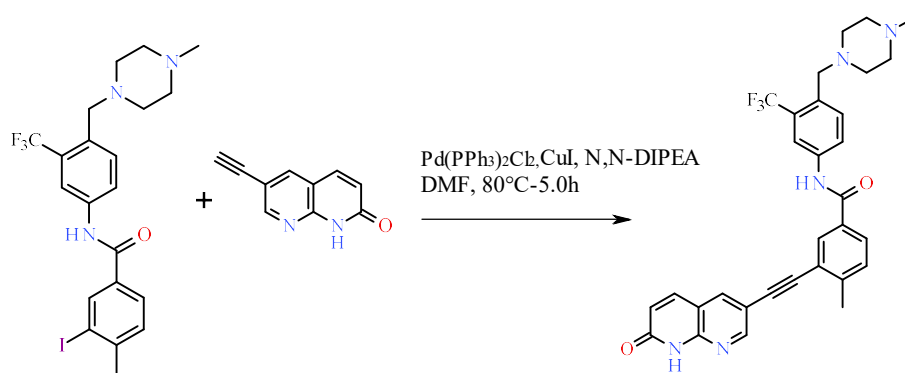
A una solución de vitride® (3 equivalentes) en tolueno (6 veces) bajo una atmósfera de nitrógeno se agregó lentamente por lotes [4-amino-2-(trifluorometil) fenil]-(4-metilpiperazin-1-il)metanona (1 equivalente) a temperatura ambiente durante 2 horas (exotérmica). Después de agitar durante 4 horas a 65°C, se agregó lentamente 8% de una solución de NaOH acuoso (12 equivalentes) durante 1 hora a temperatura ambiente. La solución resultante se agitó durante 30 minutos, se extrajo con tolueno, las capas de tolueno combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron. La cristalización de hexano en ebullición produjo el compuesto del título (50% de rendimiento).

1.10 3-Yodo-4-metil-N-[4-[(4-metilpiperazin-1-il) metil]-3-(trifluorometil) fenil] benzamida (SC5)



A una solución de 4-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-3-(trifluorometil)anilina (0,7 equivalente) en THF (4 veces) bajo una atmósfera de nitrógeno se agregó cloruro de 3-yodo-4-metil benzoilo (1 equivalente, preparado a partir de la reacción de ácido 3-yodo-4-metilbenzoico y SOCl₂) en THF a temperatura ambiente durante 30 minutos, seguido por la adición gota a gota de (i-Pr)₂EtN (2 equivalentes) y 4-DMAP (0,2 equivalente). Luego de agitar a temperatura ambiente durante 120 minutos, la mezcla de reacción se extinguió con agua y se extrajo con acetato de etilo. Luego de secar sobre Na₂SO₄, la capa de acetato etilo se concentró para proporcionar el producto crudo. Se agregó acetona a este producto crudo y se convirtió en sal de HCl usando IPA-HCl (85% de rendimiento).

1.11 4-Metil-N-[4-[(4-metilpiperazin-1-il) metil]-3-(trifluorometil) fenil]-3-[2-(7-oxo-8H-1, 8-naftiridin-3-il) etinil]benzamida (código de desarrollo: NRC21T)

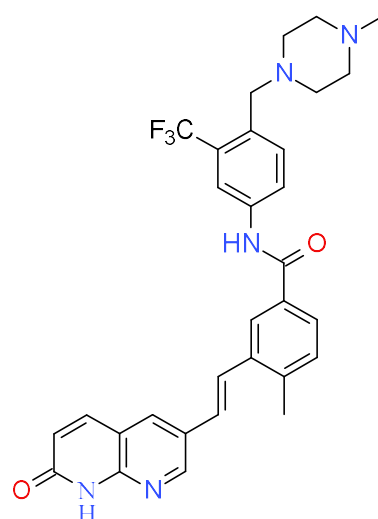


Una mezcla de 3-yodo-4-metil-N-[4-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-3-(trifluorometil) fenil]benzamida (0,8 equivalente, preparada de acuerdo con el numeral 1, SC5), 6-etinil-1H-1,8-naftiridin-2-ona (1 equivalente, preparada de acuerdo con el numeral 1.5), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0,1 equivalente), CuI (0,15 equivalente), (i-Pr)₂EtN (4 equivalentes), en DMF bajo una atmósfera de nitrógeno se desoxigenó con gas nitrógeno durante 30 minutos. La masa de la reacción se calentó a 80°C durante 5 horas. Se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice a temperatura ambiente y el filtrado se concentró, se diluyó con agua y metanol (mezcla 1:2). El compuesto se recogió por filtración y se secó. La XRD se muestra en **Figura - 1**. El compuesto se sometió a formación de sal con HCl concentrado en medio metanol para producir el compuesto del título como sal diclorhidrato hidratada (70% de rendimiento). La XRD se muestra en **Figura - 2**.

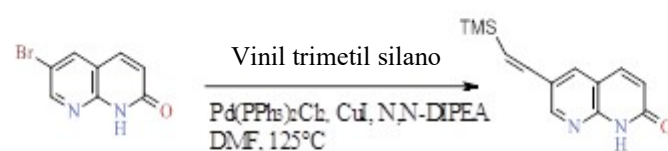
¹HNMR (400MHz, DMSOD₆) δ 12.430 (s, 1H), 10.678 (s, 1H), 8.742 (s, 1H), 8.397 (s, 1H), 8.288 (s, 1H), 8.156 (d, 2H), 7.958 (d, 2H), 7.893 (s, 1H), 7.537 (d, 1H), 6.645 (d, 1H), 3.946 (bs, 2H), 3.169-3.474 (bs, 8H), 2.794 (s, 3H), 2.586 (s, 3H). ESI MS m/z -560.3(M+H)⁺.

Ejemplo - 2:

4-Metil-N-[4-[(4-metilpiperazin-1-il) metil]-3-(trifluorometil) fenil]-3-[(E)-2-(7-oxo-8H-1, 8-naftiridin-3-il) vinil] benzamida (código de desarrollo: NRC20T)

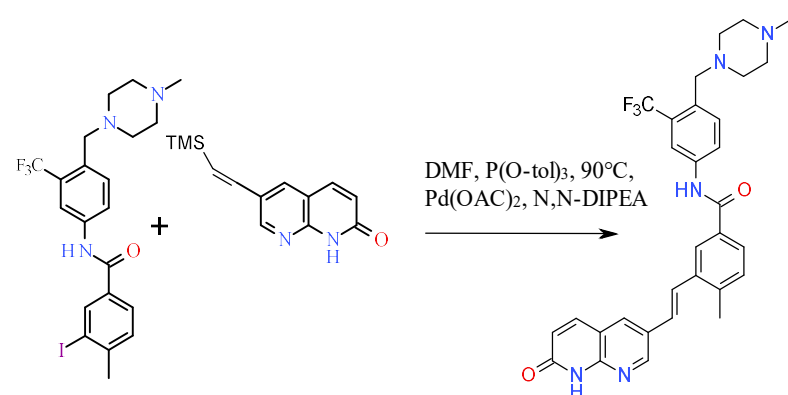


2.1 6-[2-Trimetilsililvinil]-1H-1, 8-naftiridin-2-ona



Una mezcla de 6-bromo-1H-1, 8-naftiridin-2-ona (1 equivalente, la cual se preparó de acuerdo con el numeral 1.3), Pd (PPh₃)₂Cl₂ (0,1 equivalente), CuI (0,15 equivalente), (i-Pr)₂EtN (4 equivalentes) en DMF (15 veces) se desoxigenó con nitrógeno durante 15 minutos. Seguidamente se agregó vinil trimetil silano (2 equivalentes) y se calentó a 125°C durante 10 horas. La reacción se monitoreó por cromatografía de capa fina. Se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice a temperatura ambiente. El filtrado se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (eluido con 20 a 30% de acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título como un sólido (30% de rendimiento). ESI MS m/z -245.22(M+H)⁺.

2.2 4-Metil-N-[4-[(4-metilpiperazin-1-il) metil]-3-(trifluorometil) fenil]-3-[(E)-2-(7-oxo-8H-1, 8-naftiridin-3-il) vinil]benzamida (código de desarrollo: NRC20T)

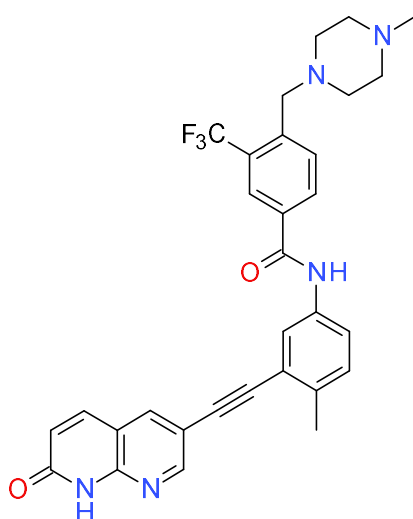


Una mezcla de 3-yodo-4-metil-N-[4-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-3-(trifluorometil)fenil]benzamida (1 equivalente, preparada según el Ejemplo SC5), 6-[2-trimetilsililvinil]-1H-1,8-naftiridin-2-ona (1 equivalente), Pd(OAc)₂ (0,1 equivalente), P(O-tol)₃ (0,2 equivalente), (i-Pr)₂EtN (4 equivalentes), en DMF se desoxigenó con gas nitrógeno durante 30 minutos. A continuación se calentó a 90°C durante 7 horas. Se filtró través de una almohadilla de gel de sílice a temperatura ambiente, el filtrado se concentró, y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (eluido con 10% metanol/cloruro de metileno) para proporcionar el compuesto del título como un sólido. El compuesto se sometió formación de sal clorhidrato usando metanol e IPA-HCl.

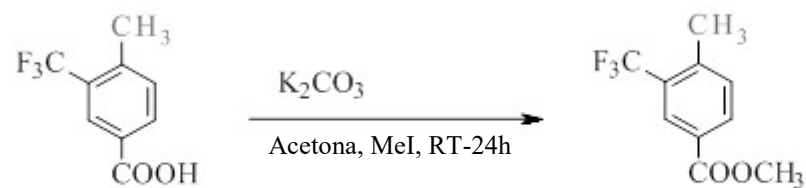
¹HNMR (400MHz, DMSOD₆) δ 12.283 (s, 1H), 10.772-10.802 (s, 1H), 8.822 (s, 1H), 8.521 (s, 1H), 8.367 (s, 2H), 8.233 (s, 1H), 8.042 (s, 1H), 7.950-7.974 (d, 1H), 7.835-7.854 (d, 1H), 7.577-7.618 (d, 1H), 7.409-7.465 (d, 2H), 6.611-6.634 (d, 1H), 4.155 (bs, 2H), 3.075-3.550 (bs, 8H), 2.806 (s, 3H), 2.529 (s, 3H). ESI MS m/z -562.2(M+H)⁺.

Ejemplo - 3:

N-[4-Metil-3-[2-(7-oxo-8H-1, 8-naftiridin-3-il) etinil] fenil]-4-[(4-metil piperazin-1-il) metil]-3-(trifluorometil)benzamida (código de desarrollo: NRC19T)

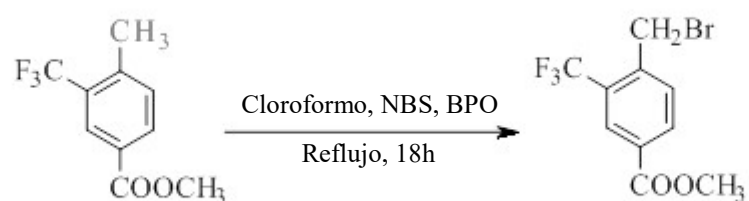


3.1 Metil 4-metil-3-(trifluorometil) benzoato



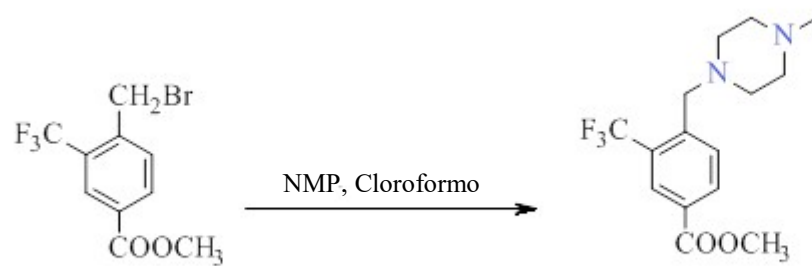
A una mezcla de ácido 4-metil-3-(trifluorometil) benzoico (1 equivalente), K_2CO_3 (1,5 equivalente) en acetona (15 veces) se agregó MeI (1,5 equivalente) a temperatura ambiente. Se continuó la agitación durante 24 horas. La reacción se monitoreó por cromatografía de capa fina. Las sales se filtraron y el filtrado resultante se concentró, se diluyó con agua, se extrajo con acetato de etilo. La concentración de la capa orgánica produjo un aceite amarillo pálido (95% de rendimiento). ESI MS m/z -219 ($M+H$)⁺.

3.2 Metil 4-(bromometil)-3-(trifluorometil) benzoato



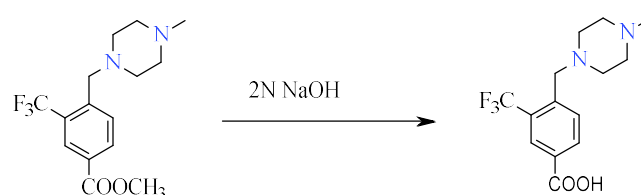
A una solución de metil-4-metil-3-(trifluorometil) benzoato (1 equivalente) en cloroformo se agregó N-bromosuccinimida (1,1 equivalente) y peróxido de benzoílo (0,01 equivalente). La mezcla de reacción se calentó a reflujo de un día para otro (18 horas). A continuación se enfrió a temperatura ambiente, se lavó con agua, se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró. Se purificó por cromatografía en gel de sílice (eluido con 1% de acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (65% de rendimiento). ESI MS m/z -297.

3.3 Metil 4-[(4-metilpiperazin-1-il) metil]-3-(trifluorometil) benzoato



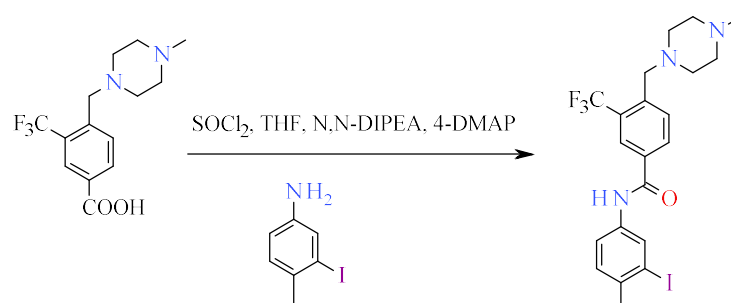
A una solución de metil 4-(bromometil)-3-(trifluorometil) benzoato (1 equivalente) en cloroformo (6 veces) se agregó a N-metilpiperazina (3 equivalentes) a temperatura ambiente. La solución resultante se agitó durante 3 horas, la masa de la reacción se lavó con agua y se concentró con cloroformo para obtener el producto (95% de rendimiento). ESI MS m/z – 317 $(M+H)^+$.

3.4 Ácido 4-[(4-metilpiperazin-1-il) metil]-3-(trifluorometil) benzoico



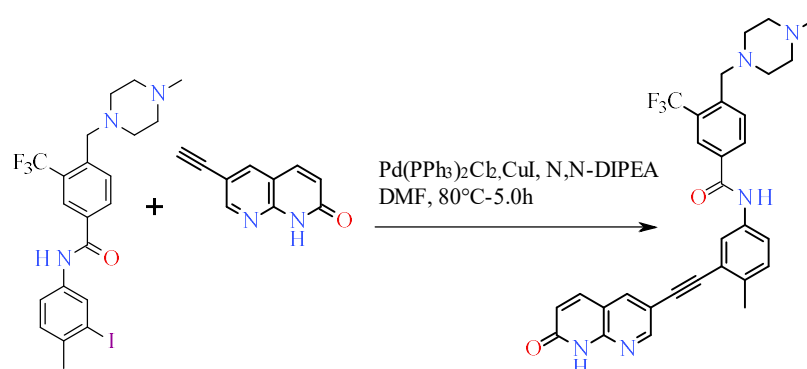
A una solución de metil 4-[(4-metilpiperazin-1-il) metil]-3-(trifluorometil) benzoato (1 equivalente) en etanol (10 veces) se agregó una solución 2N NaOH (2 equivalentes) a temperatura ambiente. La solución resultante se agitó durante 3 horas. La mezcla de reacción se concentró y se acidificó con 2N HCl acuoso hasta que se formó un sólido blanco. El compuesto se recogió por filtración a 0-5°C. (85% de rendimiento). ESI MS m/z -303.3 $(M+H)^+$.

3.5 N-(3-Yodo-4-metil-fenil)-4-[(4-metilpiperazin-1-il) metil]-3-(trifluoro metil) benzamida



A una solución de 3-yodo-4-metil anilina (0,7 equivalente) en THF (10 veces) bajo una atmósfera de gas nitrógeno se agregó cloruro de 4-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-3-(trifluorometil)benzoílo (1 equivalente, preparado a partir de la reacción de ácido 4-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-3-(trifluorometil)benzoico y SOCl_2) en THF (4 veces) a temperatura ambiente durante 30 minutos, seguido por la adición gota a gota de $(i\text{-Pr})_2\text{EtN}$ (4 equivalentes) y 4-DMAP (0,2 equivalente). Luego de agitar a temperatura ambiente durante 120 minutos, la mezcla de reacción se extinguió con agua y se extrajo con acetato de etilo. La capa de acetato de etilo se concentró para proporcionar el producto crudo. Se agregó acetona a este producto crudo y se aisló como sal HCl empleando IPA-HCl (40% de rendimiento). ESI MS m/z -518 $(\text{M}+\text{H})^+$.

3.6 N-[4-Metil-3-[2-(7-oxo-8H-1, 8-naftiridin-3-il) etinil] fenil]-4-[(4-metil piperazin-1-il) metil]-3-(trifluorometil)benzamida (código de desarrollo: NRC19T)

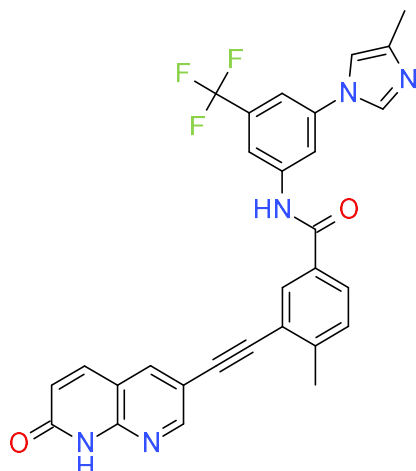


Una mezcla de N-(3-yodo-4-metil-fenil)-4-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-3-(trifluorometil)benzamida (0,8 equivalente, preparada de acuerdo con el numeral 3.5), 6-etinil-1H-1,8-naftiridin-2-ona (1 equivalente, preparada de acuerdo con el numeral 1.5), $\text{Pd(PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (0,1 equivalente), CuI (0,15 equivalente), $(i\text{-Pr})_2\text{EtN}$ (4 equivalentes), en DMF (20 veces) se desoxigenó con gas nitrógeno durante 30 minutos. Se calentó a 80°C durante 5 horas y se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice a temperatura ambiente. El filtrado se concentró, se diluyó con agua y se agitó durante 1 hora. El compuesto se recogió por filtración. Se agregó metanol al compuesto húmedo ya citado y el producto se aisló como la sal HCl empleando IPA-HCl (40% de rendimiento).

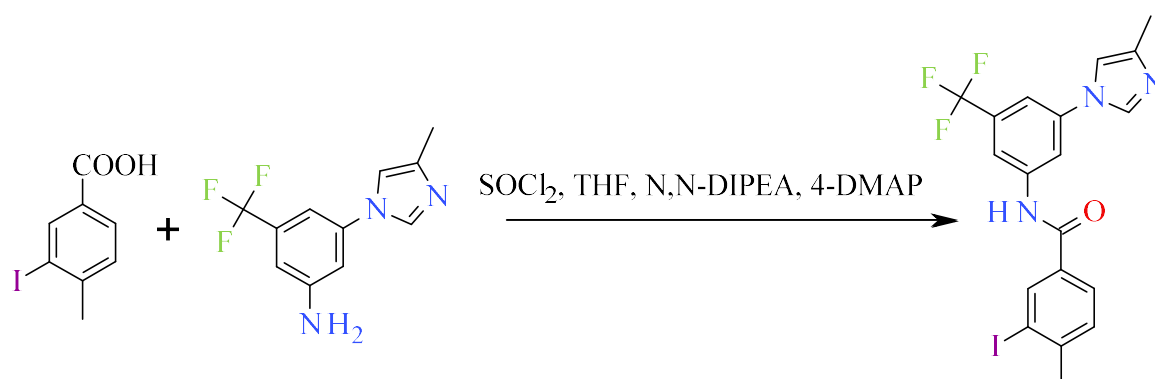
$^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO-d_6) δ 12.403 (s, 1H), 10.626 (s, 1H), 8.716-8.721 (s, 1H), 8.384-8.390 (s, 1H), 8.338-8.348 (d, 2H), 8.143 (s, 1H), 8.063-8.069 (s, 1H), 7.945-7.969 (d, 1H), 7.706-7.732 (d, 1H), 7.342-7.364 (d, 1H), 6.636-6.659 (d, 1H), 4.114 (bs, 2H), 2.894-3.502 (bs, 8H), 2.790 (s, 3H), 2.482 (s, 3H). ESI MS m/z -560.28 $(\text{M}+\text{H})^+$.

Ejemplo - 4:

4-Metil-N-[3-(4-metilimidazol-1-il)-5-(trifluorometil) fenil]-3-[2-(7-oxo-8H-1, 8-naftiridin-3-il)etinil]benzamida (código de desarrollo: NRC18T)

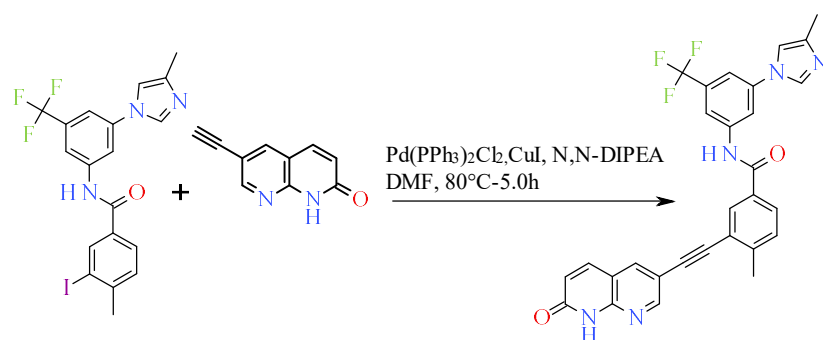


4.1 3-Yodo-4-metil-N-[3-(4-metilimidazol-1-il)-5- trifluorometil) fenil] benzamida



A una solución de 3-(4-metilimidazol-1-il)-5-(trifluorometil)anilina (0,7 equivalente, preparada de acuerdo con los métodos conocidos en la literatura) en THF bajo una atmósfera de nitrógeno se agregó cloruro de 3-yodo-4-metil benzoílo (1 equivalente, preparado a partir de la reacción de ácido 3-yodo-4-metilbenzoico y SOCl_2) en THF a temperatura ambiente durante 30 minutos, seguido por la adición gota a gota de $(i\text{-Pr})_2\text{EtN}$ (2 equivalentes) y 4-DMAP (0,2 equivalente). Luego de agitar a temperatura ambiente por más de 3 horas, la mezcla de reacción se extinguió con agua. La mezcla resultante se agitó a $0\text{-}5^\circ\text{C}$ durante 60 minutos. El compuesto se recogió por filtración. Este compuesto se purificó posteriormente por cromatografía en gel de sílice (eluído con 2% metanol/cloroformo) para proporcionar el compuesto del título (85% de rendimiento). ESI MS m/z - 486.2 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

4.2 4-Metil-N-[3-(4-metilimidazol-1-il)-5-(trifluorometil) fenil]-3-[2-(7-oxo-8H-1, 8-naftiridin-3-il)etinil]benzamida (código de desarrollo: NRC18T)

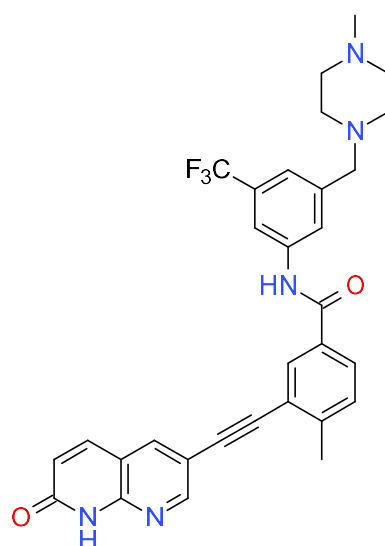


Una mezcla de 3-yodo-4-metil-N-[3-(4-metilimidazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil] benzamida (0,8 equivalente, preparado de acuerdo con el numeral 4.1), 6-etinil-1H-1,8-naftiridin-2-ona (1 equivalente, preparado de acuerdo con el numeral 1.5), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0,1 equivalente), CuI (0,15 equivalente), (i-Pr)₂EtN (4 equivalentes), en DMF (20 veces) se desoxigenó con gas nitrógeno durante 30 minutos. Se calentó a 80°C durante 5 horas, se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice a temperatura ambiente. El filtrado se concentró, se diluyó con agua, se agitó durante 1 hora y se filtró. Se agregó acetona al compuesto húmedo ya indicado y el producto se aisló como la sal HCl empleando IPA-HCl (20% de rendimiento).

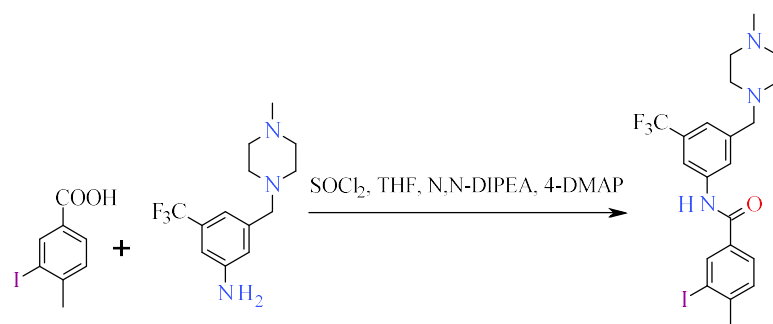
¹HNMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 12.440 (s, 1H), 11.034 (s, 1H), 9.668 (s, 1H), 8.736-8.741 (s, 1H), 8.634 (s, 1H), 8.392-8.397 (s, 1H), 8.320 (s, 1H), 8.252 (s, 1H), 7.950-8.051 (m, 4H), 7.557-7.577 (d, 1H), 6.647-6.671 (d, 1H), 2.591 (s, 3H), 2.377 (s, 3H). ESI MS m/z -528.27 (M+H)⁺.

Ejemplo - 5:

4-Metil-N-[3-[(4-metilpiperazin-1-il) metil]-5-(trifluorometil) fenil]-3-[2-(7-oxo-8H-1, 8-naftiridin-3-il)etinil]benzamida (código de desarrollo: NRC17T)

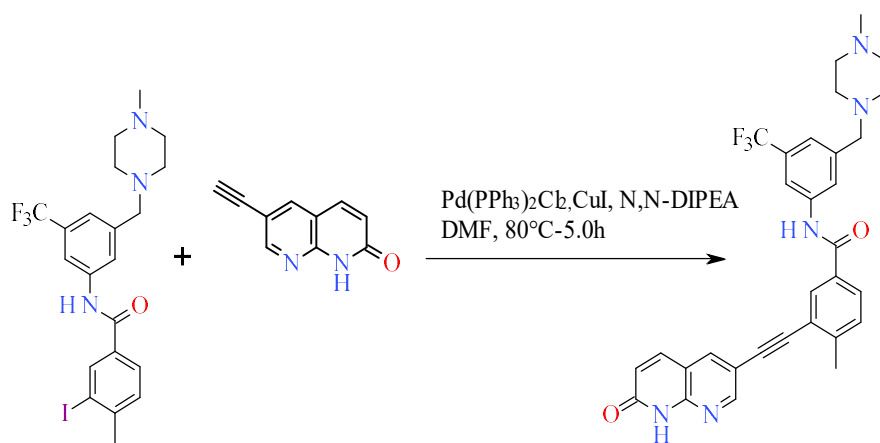


5.1 3-Yodo-4-metil-N-[3-[(4-metilpiperazin-1-il) metil]-5-(trifluorometil) fenil] benzamida



A una solución de 3-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-5-(trifluorometil)anilina (0,7 equivalente, preparada de acuerdo con los métodos de la literatura) en THF bajo una atmósfera de nitrógeno se agregó cloruro de 3-yodo-4-metil benzoílo (1 equivalente, preparado a partir de la reacción de ácido 3-yodo-4-metilbenzoico y SOCl_2) en THF a temperatura ambiente durante 30 minutos seguido por la adición gota a gota de $(i\text{-Pr})_2\text{EtN}$ (2 equivalente) y 4-DMAP (0,2 equivalente). Luego de agitar a temperatura ambiente durante más de 3 horas, la mezcla de reacción se extinguió con agua. La mezcla resultante se extrajo con acetato de etilo y el producto formado se aisló como la sal HCl en acetona. ESI MS m/z - $(M+1)^+$.

5.2 4-Metil-N-[3-[(4-metilpiperazin-1-il) metil]-5-(trifluorometil) fenil]-3-[2-(7-oxo-8H-1,8-naftiridin-3-il)etinil]benzamida (código de desarrollo: NRC17T)



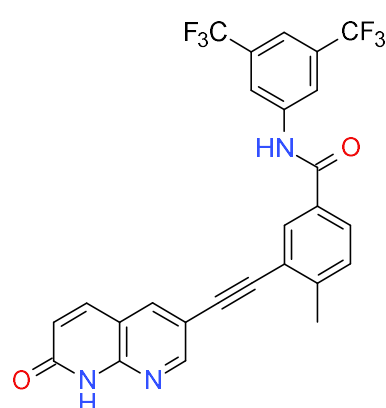
Una mezcla de 3-yodo-4-metil-N-[3-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-5-(trifluorometil) fenil]benzamida (0,8 equivalente, preparada de acuerdo con el numeral 5.1), 6-etinil-1H-1,8-naftiridin-2-ona (1 equivalente, preparada de acuerdo con el numeral 1.5), $\text{Pd(PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (0,1 equivalente), CuI (0,15 equivalente), $(i\text{-Pr})_2\text{EtN}$ (4 equivalentes), en DMF (20 veces) se desoxigenó con gas nitrógeno durante 30 minutos. Se calentó a 80°C durante 5 horas, se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice a temperatura ambiente. El filtrado se concentró,

se diluyó con agua, se agitó durante 1 hora y se filtró. Se agregó metanol y el producto se aisló como la sal HCl empleando IPA-HCl (25% de rendimiento).

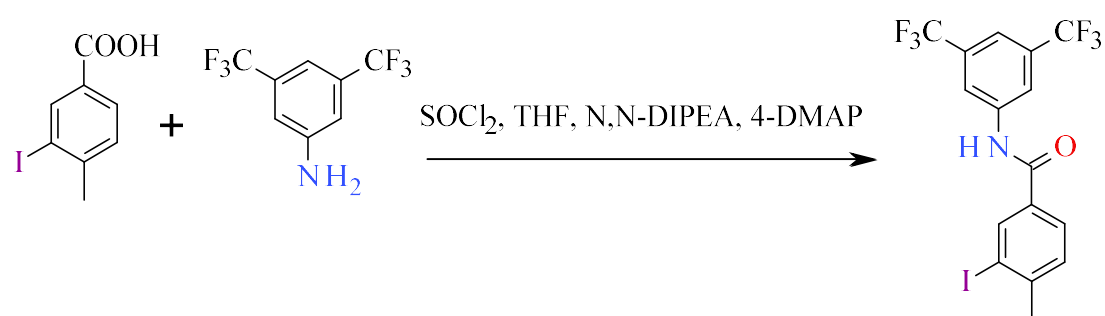
^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 12.432 (s, 1H), 10.796 (s, 1H), 8.741 (s, 1H), 8.399 (s, 1H), 8.322 (s, 1H), 8.222 (s, 2H), 7.964 (d, 2H), 7.814 (s, 1H), 7.542 (d, 1H), 6.647 (d, 1H), 4.363 (s, 2H), 3.394 (bs, 8H), 2.818 (s, 3H), 2.589 (s, 3H). ESI MS m/z - (M+1) $^+$.

Ejemplo - 6:

N-[3, 5-Bis (trifluorometil) fenil]-4-Metil-3-[2-(7-oxo-8H-1, 8-naftiridin-3-il)etinil]benzamida (código de desarrollo: NRC16T)

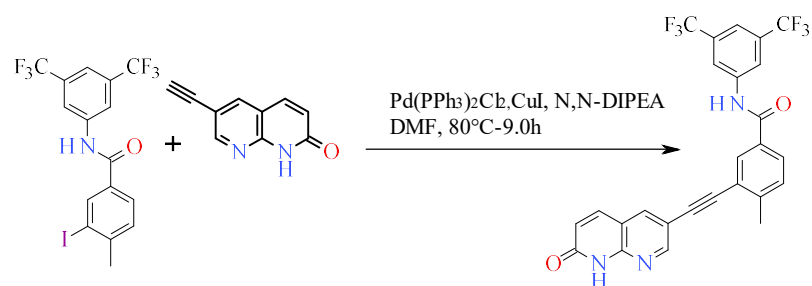


6.1 N-[3, 5-Bis (trifluorometil) fenil]-3-iodo-4-metil-benzamida



A una solución de 3,5-bis trifluoro metil anilina (0,7 equivalente) en THF (6 veces) bajo una atmósfera de gas nitrógeno se agregó cloruro de 3-yodo-4-metil benzoílo (1 equivalente, preparado a partir de la reacción ácido 3-yodo-4-metilbenzoico y SOCl_2) en THF a temperatura ambiente durante 30, minutos seguido por la adición gota a gota de $(i\text{-Pr})_2\text{EtN}$ (2 equivalentes) y 4-DMAP (0,2 equivalente). Luego de agitar a temperatura ambiente durante más de 3 horas, la mezcla de reacción se extinguió con agua. La mezcla resultante se extrajo con acetato de etilo y se concentró. Se agregó acetona al residuo resultante y se formó la sal HCl usando IPA-HCl (85% de rendimiento). ESI MS m/z – 474 (M+H) $^+$.

6.2 N-[3, 5-Bis (trifluorometil) fenil]-4-metil-3-[2-(7-oxo-8H-1, 8-naftiridin-3-il) etinil]benzamida (código de desarrollo: NRC16T)

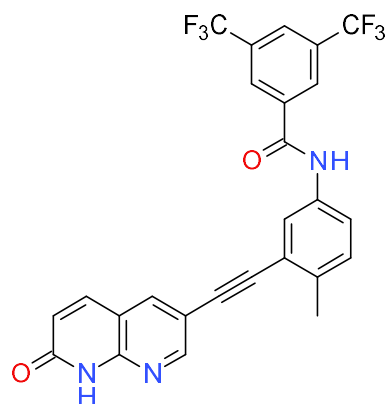


Una mezcla de N-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]-3-yodo-4-metilbenzamida (0,8 equivalente, preparada de acuerdo con el numeral 6.1), 6-etinil-1H-1,8-naftiridin-2-ona (1 equivalente, preparada de acuerdo con el numeral 1.5), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0,1 equivalente), CuI (0,15 equivalente), (i-Pr)₂EtN (4 equivalentes), en DMF se desoxigenó con gas nitrógeno durante 30 minutos. Se calentó a 80°C durante 9 horas, se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice a temperatura ambiente. El filtrado se concentró, se diluyó con agua, se agitó durante 1 hora y se filtró. Se agregó metanol y el compuesto se filtró como sal HCl por tratamiento con IPA-HCl (60% de rendimiento).

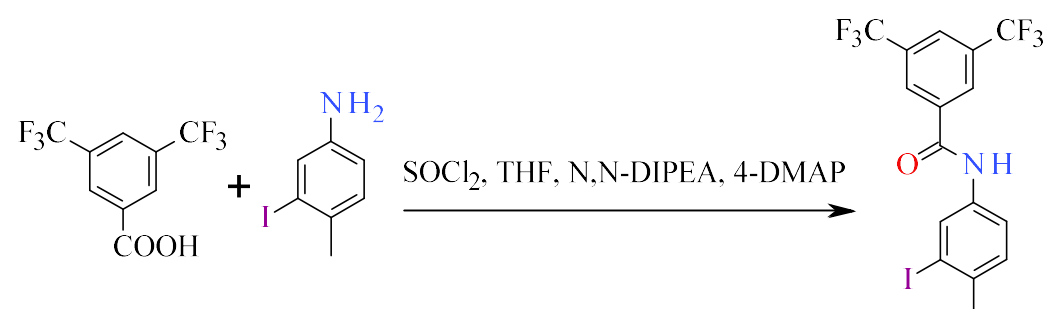
¹HNMR (400MHz, DMSOD₆) δ 12.429 (s, 1H), 10.874 (s, 1H), 8.746 (s,1H), 8.545 (s,2H), 8.402 (s, 1H), 8.223 (s, 1H), 7.956-7.979 (d, 2H), 7.839 (s, 1H), 7.563-7.582 (d, 1H), 6.646-6.668 (d, 1H), 2.594 (s, 3H). ESI MS m/z -516.13 (M+H)⁺.

Ejemplo - 7:

N-[4-Metil-3-[2-(7-oxo-8H-1, 8-naftiridin-3-il) etinil] fenil]-3, 5-bis (trifluorometil)benzamida (código de desarrollo: NRC15T)

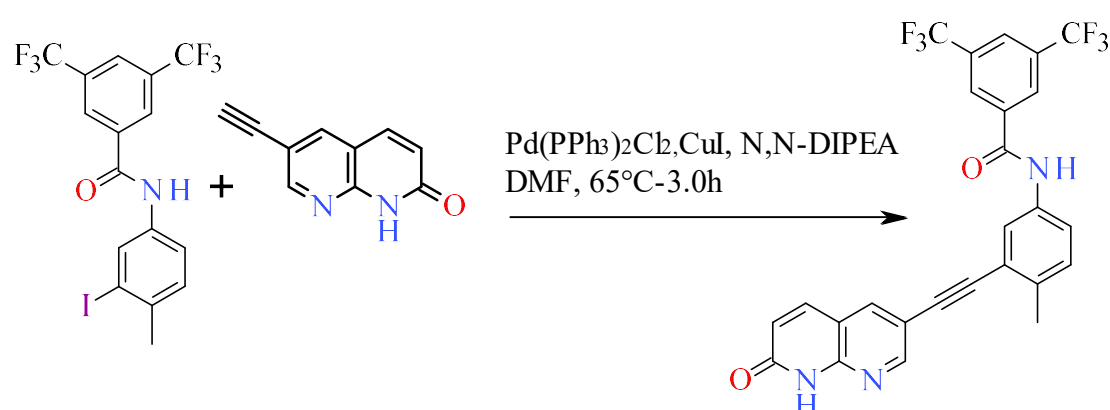


7.1 N-(3-Yodo-4-metil-fenil)-3, 5-bis (trifluorometil)benzamida



A una solución de 3-yodo-4- metil anilina (0,7 equivalente) en THF (6 veces) bajo una atmósfera de nitrógeno se agregó cloruro de 3,5-bis trifluorometilbenzoílo (1 equivalente, preparado a partir de la reacción de ácido 3,5-bis trifluorometilbenzoico y SOCl_2) en THF a temperatura ambiente durante 30 minutos, seguido por la adición gota a gota de $(i\text{-Pr})_2\text{EtN}$ (4 equivalentes) y 4-DMAP (0,2 equivalente). Luego de agitar a temperatura ambiente durante 3 horas, la mezcla de reacción se extinguió con agua. La mezcla resultante se extrajo con acetato de etilo, se concentró y el compuesto se recogió agregando hexano y filtrando (44% de rendimiento).

7.2 N-[4-Metil-3-[2-(7-oxo-8H-1, 8-naftiridin-3-il)etnil]fenil]-3,5-bis (trifluoro metil)benzamida (código de desarrollo: NRC15T)

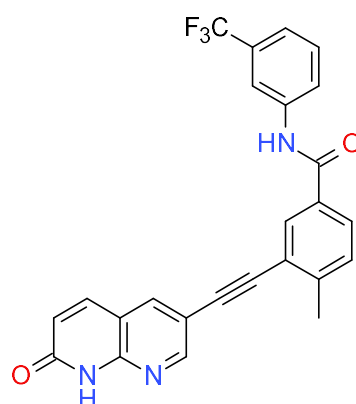


Una mezcla de N-(3-yodo-4-metil-fenil)-3,5-bis(trifluorometil)benzamida (0,8 equivalente, preparada de acuerdo con el numeral 7.1), 6-etinil-1H-1,8-naftiridin-2-ona (1 equivalente, preparada de acuerdo con el Ejemplo 1.5), $\text{Pd(PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (0,1 equivalente), CuI (0,15 equivalente), $(i\text{-Pr})_2\text{EtN}$ (4 equivalentes), en DMF se desoxigenó con gas nitrógeno durante 30 minutos. Se calentó a 65°C durante 3 horas y se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice a temperatura ambiente. El filtrado se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo. La capa de acetato de etilo se concentró y se formó la sal HCl en acetona como solvente.

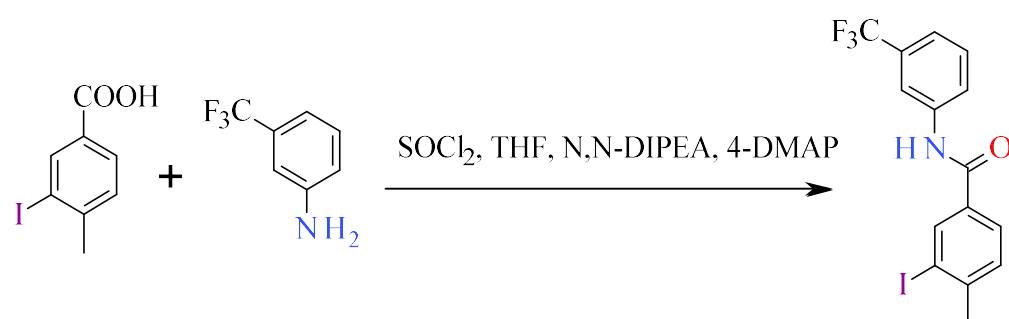
^1H NMR (400MHz, DMSO D_6) δ 12.403 (s, 1H), 10.743 (s, 1H), 8.716 (s, 1H), 8.636 (s, 2H), 8.382 (s, 2H), 8.039 (s, 1H), 7.942 (d, 1H), 7.701 (d, 1H), 7.365 (d, 1H), 6.635 (d, 1H), 2.490 (s, 3H). ESI MS m/z - $(\text{M}+\text{H})^+$.

Ejemplo - 8:

4-Metil-3-[2-(7-oxo-8H-1, 8-naftiridin-3-il) etinil]-N-[3-(trifluorometil) fenil] benzamida
(código de desarrollo: NRC14T)

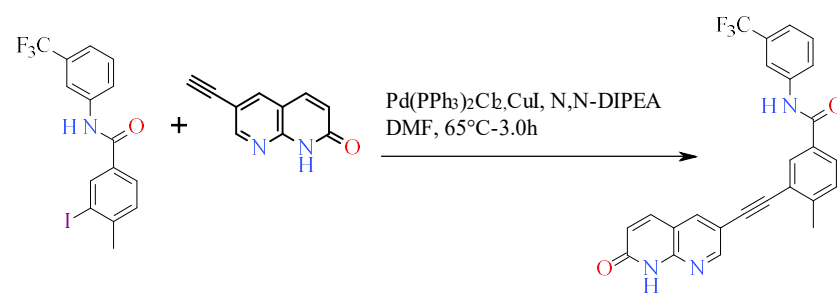


8.1 3-Yodo-4-metil-N-[3-(trifluorometil) fenil]benzamida



A una solución de 3-trifluorometil anilina (0,7 equivalente) en THF bajo una atmósfera de nitrógeno se agregó cloruro de 3-yodo-4-metil benzoílo (1 equivalente, preparado a partir de la reacción de ácido 3-yodo-4-metilbenzoico y SOCl_2) en THF a temperatura ambiente durante 30 minutos, seguido por la adición gota a gota de $(i\text{-Pr})_2\text{EtN}$ (2 equivalentes) y 4-DMAP (0,2 equivalente). Luego de agitar a temperatura ambiente durante más de 3 horas, la mezcla de reacción se extinguió en agua. La mezcla resultante se extrajo con acetato de etilo y se concentró. El compuesto se recogió por filtración usando hexano como solvente (49,2% de rendimiento). ESI MS m/z - $(\text{M}+1)^+$.

8.2 4-Metil-3-[2-(7-oxo-8H-1, 8-naftiridin-3-il) etinil]-N-[3-(trifluorometil) fenil] benzamida (código de desarrollo: NRC14T)

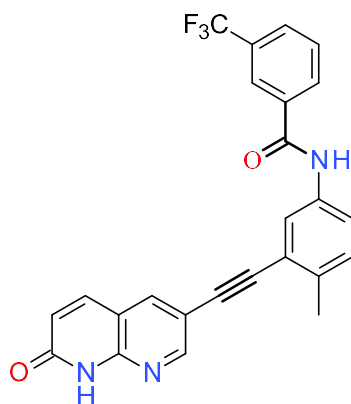


Una mezcla de 3-yodo-4-metil-N-[3-(trifluorometil)fenil]benzamida (0,8 equivalente, preparada de acuerdo con el numeral 8.1), 6-etinil-1H-1,8-naftiridin-2-ona (1 equivalente, preparada de acuerdo con el numeral 1.5), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0,1 equivalente), CuI (0,15 equivalente), (i-Pr)₂EtN (4 equivalentes), en DMF (20 veces) se desoxigenó con gas nitrógeno durante 30 minutos. Se calentó a 65°C durante 3 horas, se filtró través de una almohadilla de gel de sílice a temperatura ambiente y el filtrado se diluyó con agua. El compuesto se recogió por filtración y formación de sal HCl.

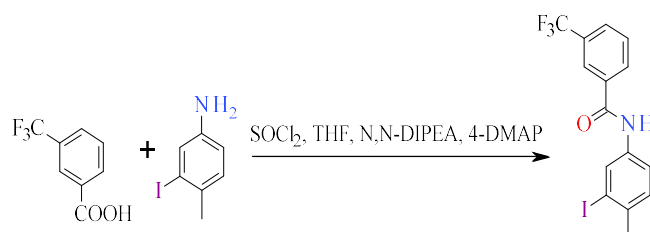
¹HNMR (400MHz, DMSOD₆) δ 12.426 (s, 1H), 10.595 (s, 1H), 8.742 (s,1H), 8.395 (s,1H), 8.260 (s, 1H), 8.192 (s, 1H), 8.079 (d, 1H), 7.935 (d, 2H), 7.596 (t, 1H), 7.533 (d, 1H), 7.459 (d, 1H), 6.644 (d, 1H), 2.587 (s, 3H). ESI MS m/z - (M+H)⁺.

Ejemplo - 9:

N-[4-Metil-3-[2-(7-oxo-8H-1, 8-naftiridin-3-il)etinil]fenil]-3-(trifluorometil) benzamida (código de desarrollo: NRC13T)

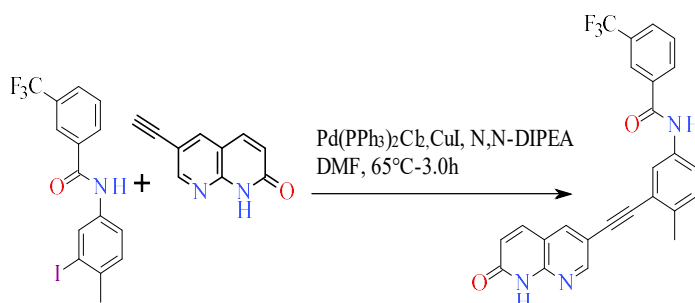


9.1 N-(3-Yodo-4-metil-fenil)-3-(trifluorometil)benzamida



A una solución de 3-yodo-4- metil anilina (0,7 equivalente) en THF bajo una atmósfera de nitrógeno se agregó cloruro de 3-trifluoro metil benzoílo (1 equivalente, preparada a partir de la reacción de ácido 3- trifluorometil benzoico y SOCl_2) en THF a temperatura ambiente durante 30 minutos, seguido por la adición gota a gota de $(i\text{-Pr})_2\text{EtN}$ (4 equivalentes) y 4-DMAP (0,2 equivalente). Luego de agitar a temperatura ambiente durante 3 horas, la mezcla de reacción se extinguió con agua. La mezcla resultante se extrajo con acetato de etilo, se concentró y el compuesto se aisló agregando n-hexano.

9.2 N-[4-Metil-3-[2-(7-oxo-8H-1, 8-naftiridin-3-il)etinil]fenil]-3-(trifluoro metil) benzamida (código de desarrollo: NRC13T)



Una mezcla de N-(3-yodo-4-metil-fenil)-3-(trifluorometil)benzamida (0,8 equivalente, preparada de acuerdo con el numeral 9.1), 6-etinil-1H-1,8-naftiridin-2-ona (1 equivalente, preparada de acuerdo con el numeral 1.5), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (0,1 equivalente), CuI (0,15 equivalente), $(i\text{-Pr})_2\text{EtN}$ (4 equivalentes), en DMF se desoxigenó con gas nitrógeno durante 30 minutos. Se calentó a 65°C durante 3 horas, se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice a temperatura ambiente y el filtrado se diluyó con agua. La mezcla resultante se agitó durante 1 hora y el compuesto se recogió por filtración y sal HCl usando IPA- HCl .

$^1\text{HNMR}$ (400MHz, DMSO-d_6) δ 12.400 (s, 1H), 10.523 (s, 1H), 8.718 (s, 1H), 8.381 (s, 1H), 8.317 (s, 1H), 8.272 (d, 1H), 8.055 (s, 1H), 7.940 (d, 2H), 7.786 (t, 1H), 7.704 (d, 1H), 7.343 (d, 1H), 6.635 (d, 1H), 2.484 (s, 3H). ESI MS m/z - $(\text{M}+\text{H})^+$.

Ejemplo-10:

Evaluación *in vitro*:

Todos los compuestos experimentales se evaluaron con respecto a la eficacia *in vitro* empleando líneas de células estándar usadas para la detección selectiva (*screening*) de compuestos antineoplásicos.

Se usó Ponatinib como fármaco candidato de referencia para una evaluación comparativa de la eficacia y la seguridad. Una muestra de laboratorio de la sustancia farmacéutica Ponatinib se sintetizó internamente empleando el procedimiento divulgado en US8114874.

Estudios *in vitro* de NRC-21T en la línea de células K562, BCR-abl positivas, y líneas de células mutantes Baf3/T315i, M351T, E255K y WT.

Los compuestos experimentales y el fármaco de referencia estándar (Ponatinib) se disolvieron en medio de cultivo celular y DMSO en una concentración de 10mM para estudios *in vitro*. La solución patrón concentrada (*stock solution*) se diluyó aún más con el mismo medio de cultivo celular y se usó en concentraciones de 0,1nm a 10µm. La proliferación de las células por análisis MTT se hizo en la siguiente forma: 1000 a 10.000 células se sembraron por pocillo en una placa de 96 pocillos y diferentes concentraciones de Pon-21T que variaban desde 10µm a 0,1nM se agregaron en triplicado. Después de incubar las células con NRC-21T durante el período de tiempo requerido de 24-72 horas, se agregaron 15µl de 5mg/ml MTT y se incubaron durante 4 horas más a 37⁰C y 5% CO₂. Transcurridas 4 horas, se disolvieron cristales de formazano en solución amortiguadora solubilizante de un día para otro a 37⁰C. Se midió la absorbancia en un lector Elisa con una longitud de onda dual de 570-630-nm. Mediante análisis MTT se calcularon los valores IC₅₀ del NRC21T. Los valores IC₅₀ obtenidos por análisis MTT se tabularon en la Tabla - 1A & Tabla - 1B y células de control, Ponatinib y NRC21T se fotografiaron bajo microscopio invertido y se presentaron. (**Figura - 3**)

Tabla 1A: Valores IC₅₀ obtenidos del análisis

Denominación de la línea de células	Denominación de la Molécula / valores IC ₅₀ (nM)	
	PONATINIB	NRC21T (Ejemplo - 1)
Baf3/T315I	8	14
Baf3/M351T	2	2
Baf3/ E255K	15	16
Baf3/WT	1	11
K562	4	7

Tabla - 1B: Valores IC₅₀ obtenidos del análisis MTT

S. n.º	Denominación de la	Valores IC ₅₀ (nM)
--------	--------------------	-------------------------------

	molécula	K562	T315I
1.	Ponatinib	4	11
2.	NRC-20T (Ejemplo - 2)	33	155
3.	NRC-19T (Ejemplo - 3)	7	334
4.	NRC-18T (Ejemplo - 4)	No realizado	228
5.	NRC-17T (Ejemplo - 5)	21	712
6.	NRC-16T (Ejemplo - 6)	No realizado	>10000
7.	NRC-15T (Ejemplo - 7)	20	7691
8.	NRC-14T (Ejemplo - 8)	8	1039
9.	NRC-13T (Ejemplo - 9)	9	1508

Ejemplo - 11:

Análisis de invasión en matrigel:

Se evaluó la invasividad *in vitro* de células cancerosas leucémicas mutantes BaF3/T315i en la presencia de una concentración especificada de NRC21T. Células T315i (3X10⁵) se suspendieron en 300µl de medio libre de suero y se pusieron en el compartimiento superior de cámaras *transwell* pre-recubiertas con matrigel (Millipore, catálogo n.º ECM550, USA). El compartimiento inferior de las cámaras se llenó con 500 µl de medio de suero (10% FBS) y las células se dejaron migrar durante 72 horas. Luego de la incubación, las células se fijaron y tiñeron con el colorante provisto junto con el kit y se cuantificaron usando el lector de placas Elisa a 560nm. Los análisis en Matrigel *in vitro* de las células T315i en la presencia de una concentración especificada de NRC-21T se presentan en la Tabla 2 y la **Figura - 4**.

Tabla 2: Propiedad Anti-invasiva de NRC-21T en la línea de células T315i

Línea de células	Producto de prueba	Porcentaje de la propiedad anti-invasiva
BaF3/T315I	Ponatinib	12%
	NRC-21T	28%

Ejemplo - 12

Determinación de la Dosis Máxima Tolerada (MTD - *Maximum tolerated dose*) de NRC21T. El estudio MTD se llevó a cabo según las pautas OECD 420]

El estudio se llevó a cabo usando 5 ratones Swiss Albino (2 machos + 3 hembras) que pesaban 18-30 gramos. Todos los animales se mantuvieron en ayunas durante 3 horas antes de la

administración oral del fármaco. La muestra se administró inmediatamente a todos los animales de acuerdo con su peso corporal. Luego de la administración del fármaco experimental todos los animales se observaron durante ½ hora, 1 hora, 2 horas, 4 horas y se observó la mortalidad durante 14 días. Al final de 14 días, todos los animales que sobrevivieron se sacrificaron para someterlos a autopsia y se les abrió el estómago y se observaron con respecto a la absorción del fármaco a través del tubo digestivo (GIT - *Gastrointestinal tract*).

- **NRC21T: MTD > 2000 mg.kg, p.o (dosis única, observación 14 días)**
- **Ponatinib: MTD = 50 mg/kg, p.o (dosis única, observación 14 días)**

Conclusión: Puesto que la MTD del NRC21T es mayor que 2000 mg/kg, p.o de acuerdo con las pautas ICH, se infiere que NRC21T es un fármaco experimental más seguro que el Ponatinib. Además, el NRC21T tiene valores IC_{50} comparables con respecto al Ponatinib. En consecuencia, el fármaco experimental de esta invención, NRC21T, se constituye en un candidato superior en términos de seguridad y eficacia.

Ejemplo-12 Establecimiento de Antagonismo de NRC21T en un Tumor inducido por T315I en Ratones Lampiños: [Clackson et al. 2009, cancer cells November 6; 16(5): 401-412]:

El estudio se llevó a cabo con 18 ratones lampiños (9 machos + 9 hembras): El peso de los ratones lampiños se registró inicialmente antes de la inoculación de la línea de células y los ratones se repartieron en grupos en la siguiente forma:

- Grupo – I: Control Positivo (3 machos + 3 hembras)
- Grupo – II: NRC21T (3 machos + 3 hembras)
- Grupo – III: Ponatinib (3 machos + 3 hembras)

La línea de células se inoculó en los ratones lampiños por vía subcutánea en el flanco del miembro posterior derecho con una concentración de 1×10^6 células/0,2 ml. Se observó a los animales diariamente con respecto a la aparición del tumor. Se midió el volumen del tumor usando la fórmula $\frac{1}{2} l \times w^2$ (l = longitud del tumor & w = ancho del tumor). Cuando el volumen medio del tumor se registró por encima de 400 mm^3 , se inició el tratamiento con los fármacos ya indicados. Los fármacos mencionados se administraron diariamente por vía oral durante 30 días. Se registraron a diario los pesos de los ratones lampiños antes de la dosificación y se efectuaron mediciones del tumor en día alternos usando un calibre Vernier

digital. Los animales supervivientes se sacrificaron una vez completada la dosificación durante 30 días y se recolectaron los órganos (tumor con piel y bazo).

S. n.º	Grupo	Número de animales	Volumen Inicial del Tumor (Media ± SEM) (mm³)	Volumen del tumor después del tratamiento (Media ± SEM)(mm³)						
				3.º DÍA	5.º DÍA	7.º DÍA	9.º DÍA	11.º DÍA	13.º DÍA	15.º DÍA
I	Control (2% goma acacia +	6	418,91 ± 51,96	418,91 ± 51,96	1033,8 ± 234,44	1289,98 ± 291,38	1609,66 ± 427,58	2174,92 ± 678,99	2111,92 ± 360,31	2367,41 ± 384,49

El estudio se describe en **Figura - 5, Figura - 5A y Figura - 5B.**

	2% SLS)									
II	NRC21T (200 mg/kg, p.o)	6	921,35 ± 176,32	721,18 ± 141,41	183,97 ± 8,66	106,59 ± 11,90	83,21 ± 8,83	48,88 ± 4,36	10,61 ± 2,3	Tumor completamente ausente
III	Ponatinib (50 mg/kg, p.o)	6	864,59 ± 155,55	574,59 ±103,13	168,23 ± 13,92	25,59 ± 8,27	22,59 ± 4,45	Todos los ratones murieron	0	0

Ejemplo-13

Establecimiento del Tiempo de Supervivencia de NRC21T en Ratones con Inmunodeficiencia Combinada Severa (SCID - *severe combined immunodeficiency*) [Clackson et al. 2009, cancer cells November 6; 16(5): 401-412]

El estudio se llevó a cabo usando 30 ratones SCID (15 machos + 15 hembras). Todos los ratones SCID se inyectaron con la línea de células T315I por vía intravenosa en la vena de la cola con una concentración de 1 X 10⁶ células/0,1 ml. La distribución en grupos fue la siguiente:

- Grupo – I: Control Positivo (5 machos + 5 hembras) (tratados con vehículo)
- Grupo – II: NRC21T (5 machos + 5 hembras) (200 mg/kg, p.o)
- Grupo – III: Ponatinib (5 machos + 5 hembras) (10 mg/kg, p.o)

72 horas después de la inyección se inició la administración de los fármacos a los grupos respectivos. A todos los animales en los grupos se les administraron los fármacos respectivos durante 30 días. En el caso de mortalidad durante el estudio, se recolectaron el bazo y el hígado y se enviaron para histopatología. Se sacrificaron los animales en estado moribundo, se recolectaron el bazo y el hígado y se enviaron para histopatología. Los resultados del estudio se presentan en **Figura - 6A y Figura - 6B**.

Resultados:

Tiempo de Supervivencia

S. n. ^o	Grupo	Tiempo Medio de Supervivencia (Media $\pm$ SEM) (días)
1	Control Positivo	20 $\pm$ 0,68
2	NRC21T	36 $\pm$ 0
3	Ponatinib	36 $\pm$ 0