

2,4 DIAMINO-QUINOLINA SUSTITUIDA COMO NUEVOS AGENTES ANTI- CANCERIGENOS

• Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con derivados novedosos de
2-primaria amino-4-secundaria amino-quinolinas, su
fabricación, composiciones farmacéuticas que las comprenden y
su uso como medicamentos. Los compuestos activos de la presente
invención son útiles para el tratamiento y prevención de
10 enfermedades neoplásticas y no neoplásticas proliferativas.

• Antecedentes de la invención

El descubrimiento de droga de nuevos agentes anti-cancerígenos
recientemente se ha movido de ensayos basados en célula a un
acercamiento más enfocado *in vitro* en proteínas asistidas bien
15 caracterizadas, aisladas y de transfección de objetivos
susceptibles a fármacos. Este paradigma de descubrimiento de
droga enfocado en proteínas es bien descrito en el estado del
arte con el gran esfuerzo producido en el campo de
descubrimiento de drogas en el diseño racional de inhibidores
20 de quinasa humana que permiten explorar el quinoma humano. De
hecho, la quinasa humana se puede mutar y usualmente se lleva
a cabo la desregulación de quinasa en la transformación
maligna, el crecimiento y la evolución última de metástasis de
cánceres humanos. Esta implicación de quinasa en el desarrollo

y la proliferación de cánceres está bien establecida por ejemplo en leucemia, linfoma, cáncer de pulmón de célula no pequeña, melanoma, colon, seno, riñón, hepatocarcinoma... Hoy en día, a pesar de este gran esfuerzo en dirigir las disfunciones

5 de quinasa humana en algunos cánceres, el progreso clínico del uso de inhibidor de quinasa en terapia anti-cancerígena obviamente no está asociado con la curación o la remisión, y varios cánceres parecen permanecer naturalmente resistentes al uso clínico de inhibidores de quinasa (por ejemplo, carcinoma

10 hepatocelular). Además, los inhibidores de quinasa pueden seleccionar *in vivo* algunas cepas mutadas y resistentes o las células transformadas pueden encontrar trayectos igualmente compensatorios. En este contexto, decidimos tomar en cuenta todo el compartimiento celular y un ambiente de cultivo celular

15 con el desarrollo de un ensayo de detección celular fenotípica imparcial. Además, el entendimiento molecular y la descripción molecular de la transformación celular, el crecimiento de cáncer y la evolución de metástasis aún permanecen en constante desarrollo, con por ejemplo la reciente descripción del

20 concepto de células madre de cáncer (CSC) o células iniciadoras de tumores (TIC). Los efectos inesperados en la detección celular pueden sugerir otros objetivos o interacciones específicas para el descubrimiento de un nuevo objetivo susceptible a fármacos. Por lo tanto, el desarrollo de nuevos

agentes anti-cancerígenos aún permanece como un reto único con resultado impredecible y un lugar para el descubrimiento de nuevos e innovadores compuestos.

Los inventores han preparado una nueva serie de diversidad
5 orientada de librería de compuestos de 2-amino primaria-2-amino
secundaria-arilquinolina la cual fue examinada contra un panel
de líneas celulares de cáncer humano (MOLM14, KG-1, MV4-11,
A375, HCT116, HepG2, huh-7, MDA-MB-231, CAK1-1, 786-O) y
células primarias de cáncer derivadas del paciente que permiten
10 descubrir agentes novedosos anti-cancerígenos. Además, esta
clase de compuestos muestra igualmente una actividad adicional
contra células madre cancerígenas humanas (CSC) las cuales son
amplícamente incriminadas en la recurrencia y la reincidencia
de cánceres después de la terapia anti-cancerígena. Un ensayo
15 ALDH bien descrito en el arte fue utilizado como marcador
funcional de célula madre de cáncer para describir la actividad
contra CSC (Greve, B y otros, Citometría A 2012 (81) 284-293,
Liu, S y otros PLoS Uno 2013 (25) e81050, Ran, D. y otros Exp.
Hematol. 2009 (37) 1423-1434, Cheung, A. M. y otros Leucemia
20 2007 (21) 1423-1430, Pearce, D. J. y otros Células Madre 2005
(23) 752-760).

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es suministrar
agentes activos para prevenir o inhibir la proliferación
celular en una variedad de organismos, y suministrar métodos

para su síntesis. Otro objeto de la presente invención es suministrar una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de agentes activos de la invención, solos o en combinación con otros agentes activos, y
5 un adyuvante farmacéuticamente aceptable, diluyente o portador.

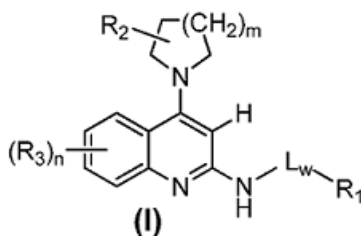
Otro objeto de la presente invención es suministrar agentes activos para uso en terapia.

Otro objeto de la presente invención es suministrar un método
10 para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad proliferativa y/o neoplástica.

Otro objeto de la presente invención es suministrar un método para inhibir el crecimiento o diferenciación de una Célula Madre de Cáncer (CSC), una célula iniciadora de tumor, una
15 célula similar a mesenquimal asociada con cáncer, una célula cancerosa mesenquimal, o una célula mesenquimal.

• Resumen de la invención

La presente invención suministra el compuesto de la fórmula (I)



20

En donde

- 5
10
15
20

R_1 se puede seleccionar de un arilo C6-C10 sustituido o no por R_9 ; un heteroarilo de anillo de 5 a 8 miembros que comprende 1, 2, o 3 heteroátomos seleccionados de O, N y S sustituidos o no por R_9 ; un heteroarilo fusionado como se define que comprende de 8 a 13 átomos que incluyen 1, 2, 3, 4 heteroátomos seleccionados de O, N y S y que comprende por lo menos 2 átomos de carbono sustituidos o no por R_9 ;

L_w se puede seleccionar de un alquilo (C1-C10) opcionalmente sustituido; un alquilo (C1-C10) lineal o ramificado sustituido por R_4 ; un cicloalquilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquenilo (C5-C10) opcionalmente sustituido; un alquenilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un alquinilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; C=O; SO, SO₂; (C=O)-NR₈; (C=O)-O; (C=O)-O-(C1-C4)alquilo; SO₂-NR₈; NR₈; en donde R_4 se puede seleccionar de H; un alquilo (C1-C10) opcionalmente sustituido; un alquenilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un alquinilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquenilo (C5-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquinilo (C8-C10) opcionalmente sustituido; un arilo (C6-C10) opcionalmente sustituido; un heteroarilo con anillo de 5 a 8 miembros o un heteroarilo fusionado como se define que comprende de 8 a 13 átomos incluyendo 1, 2, 3, 4 heteroátomos seleccionados

de O, N y S y que comprende por lo menos 2 átomos de carbono
sustituídos o no con uno o más grupos sustituyentes
independientemente seleccionados de hidrógeno, átomo de
halógeno, alquilo (C1-C10) sustituido por uno o más átomos
5 de halógeno, alcoxi (C1-C10), hidroxil, ciano, nitro,
carboxi, $\text{NR}_8\text{R}_8'$, un anillo de 4 a 9 miembros saturados o
insaturados que comprende 1, 2 o hasta 3 heteroátomos
independientemente seleccionados de O, N y S:

- R_2 se selecciona de NR_5R_6 ;
- 10 • R_3 se puede seleccionar de un átomo de hidrógeno; un átomo
de halógeno; un alquilo (C1-C10) lineal o ramificado
sustituido o no por uno o más átomos de halógeno, hidroxilo,
alcoxi, $-\text{NR}_5\text{R}_6$; un alquenilo (C2-C10); un alquinilo (C2-C10);
un cicloalquilo (C3-C10); un cicloalquenilo (C5-C10); un
15 cicloalquinilo (C8-C10); un alcoxi (C1-C10); un hidroxilo;
un nitro; un ciano; un NR_5R_6 ; un $\text{O}-(\text{R}_7)$; un $(\text{CO})-\text{R}_7$; un $(\text{CO})-$
 $\text{O}-\text{R}_7$; un $(\text{CO})-\text{NR}_5\text{R}_6$; un $\text{O}-(\text{CO})-\text{R}_7$; un $\text{O}-(\text{CO})-\text{NR}_5\text{R}_6$; un NR_5-
 $(\text{CO})-\text{R}_7$; un $\text{NR}_5-(\text{CO})-\text{OR}_7$; un $\text{NR}_5-(\text{CO})-\text{NR}_5\text{R}_6$; un $-(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-)_m-$
 OR_{11} ; un $-(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-)_m-\text{NR}_{11}\text{R}_{11}'$; un SO_2-R_7 ; un $\text{NR}_5-\text{SO}_2-\text{R}_7$; un
20 $\text{SO}_2\text{NR}_5\text{R}_6$; un $\text{NR}_5-(\text{C}2-\text{C}6)-\text{alquilo}-\text{NR}_5\text{R}_6$; un arilo opcionalmente
sustituido; un bencilo opcionalmente sustituido; un
heteroarilo opcionalmente sustituido de anillo de 5 a 8
miembros que comprende 1, 2, o 3 heteroátomos seleccionados
de O, N y S; un heteroarilo fusionado opcionalmente

sustituido como se define que comprende de 8 a 13 átomos que incluyen 1, 2, 3, 4 heteroátomos seleccionados de O, N y S y que comprende por lo menos 2 átomos de carbono; un heterociclilo opcionalmente sustituido de anillo de 4 a 9 miembros saturado o insaturado que comprende 1, 2 o hasta 3 heteroátomos independientemente seleccionados de O, N y S;

- R₅ y R₆ se pueden seleccionar independientemente de un hidrógeno; un alquilo (C1-C10) opcionalmente sustituido; un alquenilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un alquinilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquenilo (C5-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquinilo (C8-C10) opcionalmente sustituido; un (CO)-R₇, un (CO)-O-R₇; un (CO)-NR₈R₈'; un SO₂-R₇; un SO₂-NR₈R₈'; un alquilo (C1-C10) sustituido con NR₈R₈'; un cicloalquilo (C3-C10) sustituido con NR₈R₈'; un arilo opcionalmente sustituido; un bencilo opcionalmente sustituido; un heteroarilo opcionalmente sustituido de anillo de 5 a 8 miembros que comprende 1, 2, o 3 heteroátomos seleccionados de O, N y S; un heterociclilo opcionalmente sustituido de anillo de 4 a 9 miembros saturado o insaturado que comprende 1, 2 o hasta 3 heteroátomos independientemente seleccionados de O, N y S; o R₅ y R₆ se pueden vincular juntos con el átomo de nitrógeno al cual se unen covalentemente para formar un grupo heterociclilo que

forma un anillo de 4 a 9 miembros el cual puede contener 1, 2 o 3 heteroátomos adicionales seleccionados de O, N y S;

- R_7 y $R_{7'}$ se pueden seleccionarse independientemente de un hidrógeno; un alquilo (C1-C10) opcionalmente sustituido; un alquenilo (C3-C10) opcionalmente sustituido); un alquinilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquenilo (C5-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquinilo (C8-C10) opcionalmente sustituido; un alquilo C1-C10 lineal o ramificado sustituido con $NR_8R_{8'}$; un arilo (C6-C10) opcionalmente sustituido; un bencilo opcionalmente sustituido; un anillo heteroaromático de 5 a 8 miembros opcionalmente sustituido que comprende 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados de O, N y S;
- R_8 y $R_{8'}$ se pueden seleccionar independientemente de un hidrógeno; un alquilo (C1-C10) opcionalmente sustituido; un alquenilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un alquinilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquenilo (C5-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquinilo (C8-C10) opcionalmente sustituido; o R_8 y $R_{8'}$ se pueden unir juntos con el átomo de nitrógeno al cual se unen covalentemente para formar un grupo heterociclilo que forma un anillo de 4

9 miembros el cual puede contener 1, 2, o 3 heteroátomos adicionales seleccionados de O, N y S;

- R₉ se puede seleccionar independientemente de un hidrógeno; un átomo de halógeno; un alquilo (C1-C10) opcionalmente sustituido; un alquilo (C1-C10) lineal o ramificado sustituido por uno o más átomos de halógeno, un hidroxilo, un alcoxi; un alquenilo (C2-C10) opcionalmente sustituido; un alquinilo (C2-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquenilo (C5-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquinilo (C8-C10) opcionalmente sustituido; un alcoxi (C1-C10) opcionalmente sustituido; un hidroxilo; un nitro; un ciano; un NR₅R₆; un (CO)-R₇; un (CO)-O-R₇; un (CO)-NR₅R₆; un O-(CO)-R₇; un O-(CO)-NR₅R₆; un NR₅-(CO)-R₇; un NR₅-(CO)-OR₇; un NR₅-(CO)-NR₅R₆; un SO₂-R₇; un NR₅-SO₂-R₇; un SO₂-NR₅R₆; un alquilo (C1-C10) sustituido con NR₅R₆; un NR₅-(C2-C10)-alquilo-NR₅R₆; un -(O-CH₂CH₂-)_m-OR₁₁; un -(O-CH₂CH₂-)_m-NR₁₁R₁₁; un arilo (C6-C10) opcionalmente sustituido; un bencilo opcionalmente sustituido; un heteroarilo opcionalmente sustituido de anillo de 5 a 8 miembros que comprende 1, 2, o 3 heteroátomos seleccionados de O, N y S; y grupo heterociclilo opcionalmente sustituido que forma un anillo de 4 a 9 miembros el cual puede contener 1, 2, o 3

heteroátomos seleccionados de O, N y S; un $-NR_5R_{10}$; un $-O-$
 R_{10} ;

- R_{10} se puede seleccionar independientemente de un hidrógeno;
un arilo (C6-C12) sustituido o no por R_{12} ; un bencilo
5 sustituido o no por R_{12} ; un heteroarilo de anillo de 5 a 8
miembros que comprende 1, 2, o 3 heteroátomos seleccionados
de O, N y S sustituido o no por R_{12} ; un heteroarilo fusionado
definido como que comprende de 8 a 13 átomos que incluye 1,
2, 3, 4 heteroátomos seleccionados de O, N y S y que
10 comprende por lo menos 2 átomos de carbono sustituidos o no
por R_{12} ; un heterociclilo que forma un anillo de 4 a 9
miembros el cual puede contener 0, 1, 2, o 3 heteroátomos
seleccionados de O, N y S sustituido o no por R_{12} ;
- R_{11} y R_{11}' se pueden seleccionar independientemente de un átomo
15 de hidrógeno; un alquilo (C2-C10) opcionalmente sustituido;
un alquenilo (C3-C10) opcionalmente sustituido; un alquinilo
(C3-C10) opcionalmente sustituido; un cicloalquilo (C3-C10)
opcionalmente sustituido; un cicloalquenilo (C5-C10)
opcionalmente sustituido; un cicloalquinilo (C8-C10)
20 opcionalmente sustituido; un alquilo (C2-C10) lineal o
ramificado sustituido o no por uno o más átomos de halógeno;
o R_{11} y R_{11}' se pueden unir juntos con el átomo de nitrógeno
al cual se unen covalentemente para formar un grupo
heterociclilo que forma un anillo saturado o insaturado de

4 a 9 miembros el cual puede contener 1, 2, o 3 heteroátomos adicionales seleccionados de O, N y S;

- R_{12} se puede seleccionar de un átomo de hidrógeno; un átomo de halógeno; un alquilo (C1-C10) lineal o ramificado sustituido o no por uno o más átomos de halógeno, hidroxilo, alcoxí, $NR_{11}R_{11'}$; un alquénilo (C2-C10); un alquinilo (C2-C10); un cicloalquilo (C3-C10); un cicloalquénilo (C5-C10); un cicloalquinilo (C8-C10); un alcoxí (C1-C10); un hidroxilo; un nitro; un ciano; un $NR_{11}R_{11'}$; un O-(R_7); un (CO)- R_7 ; un (CO)-O- R_7 ; un (CO)- $NR_{11}R_{11'}$; un O-(CO)- R_7 ; un O-(CO)- $NR_{11}R_{11'}$; un NR_{11} -(CO)- R_7 ; un NR_{11} -(CO)-OR_{11'}; un NR_{11} -(CO)- $NR_{11}R_{11'}$; un -(O-CH₂CH₂)_m-OR₁₁; un -(O-CH₂CH₂)_m- $NR_{11}R_{11'}$; un SO₂- R_7 ; un NR₅-SO₂- R_7 ; un SO₂- $NR_{11}R_{11'}$; un NR_{11} -(C2-C6)-alquilo- $NR_{11}R_{11'}$; un arilo opcionalmente sustituido; un bencilo opcionalmente sustituido; un heteroarilo opcionalmente sustituido de anillo de 5 a 8 miembros que comprende 1, 2, o 3 heteroátomos seleccionados de O, N y S; un heteroarilo fusionado opcionalmente sustituido como se define que comprende de 8 a 13 átomos que incluyen 1, 2, 3, 4 heteroátomos seleccionados de O, N y S y que comprende por lo menos 2 átomos de carbono; un heterociclilo opcionalmente sustituido de anillo de 4 a 9 miembros saturado o insaturado que comprende 1, 2 o hasta 3 heteroátomos independientemente seleccionados de O, N y S;

- n puede representar un entero igual el cual puede tener cualquiera de los valores 0, 1, 2, 3, o 4;
- m puede representar un entero igual el cual puede tener cualquiera de los valores 1, 2 o 3;
- 5 • w puede representar un entero igual el cual puede tener cualquiera de los valores 0 o 1;

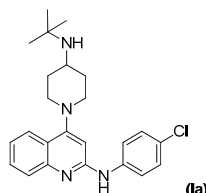
En donde el término "opcionalmente sustituido" significa opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes independientemente seleccionados de un átomo de halógeno, un
 10 alquilo (C1-C10) lineal o ramificado sustituido o no por uno o más átomos de halógeno, un alquenilo (C2-C10) lineal o ramificado sustituido o no por uno o más átomos de halógeno, un alquinilo (C2-C10) lineal o ramificado sustituido o no por uno o más átomos de halógeno, un cicloalquilo (C3-C10)
 15 sustituido o no por uno o más átomos de halógeno, un cicloalquenilo (C5-C10) sustituido o no por uno o más átomos de halógeno, un cicloalquinilo (C8-C10) sustituido o no por uno o más átomos de halógeno, un alcoxi (C1-C10), un hidroxilo, un ciano, un nitro, un $\text{NR}_8\text{R}_8'$ (con R_8 y R_8' como se describió
 20 anteriormente);

y cualquier sal farmacéuticamente aceptable, solvato, isómeros, estereoisómeros o mezclas de estereoisómeros, solvato o prodroga de los mismos.

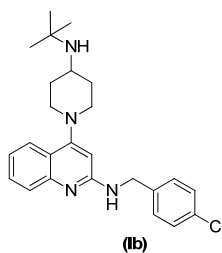
En algunas modalidades específicas, la invención suministra un compuesto seleccionado de:

2-(4-clorofenilamino)-4-(4-tert-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina de fórmula **(Ia)** **(1-5)**

5

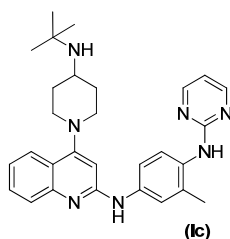


2-(4-clorobencilamino)-4-(4-tert-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina de fórmula **(Ib)** **(2-2)**

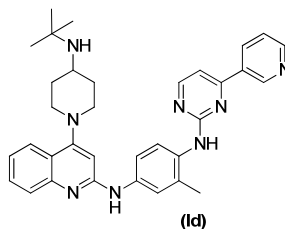


2-[3-metil-4-(pirimidin-2-ilamino)fenilamino]-4-(4-tert-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina **(3-4)** de fórmula **(Ic)**

10



2-{4-[4-(piridin-3-il)-2-pirimidinamino]-3-metil-fenilamino}-4-(4-tert-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina **(4-2)** de fórmula **(Id)**



o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato o prodroga de los mismos.

En algunas otras modalidades específicas, la invención
 5 suministra un compuesto seleccionado de sal clorhidrato de 2-(4-clorofenilamino)-4-(4-*tert*-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (**1-6**), sal clorhidrato de 2-(4-clorobenzilamino)-4-(4-*tert*-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (**2-3**), sal clorhidrato de 2-[3-metil-4-(pirimidin-2-ilamino)fenilamino]-
 10 4-(4-*tert*-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (**3-5**), sal clorhidrato de 2-{4-[4-(piridin-3-il)-2-pirimidinamino]-3-metil-fenilamino}-4-(4-*tert*-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (**4-3**).

En otro aspecto, la invención suministra una composición
 15 farmacéutica que puede comprender una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de acuerdo con lo anterior, o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato o prodroga del mismo, y un adyuvante farmacéuticamente aceptable, diluyente o portador.

20 En algunas modalidades particulares, la composición farmacéutica de la invención puede además comprender uno o más agentes anti-neoplásticos.

En algunas modalidades particulares, la composición farmacéutica de acuerdo con lo anterior puede comprender una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de la invención el cual se puede formular o co-formular en
5 nanopartículas.

En algunas modalidades específicas de la composición farmacéutica de la invención, las nanopartículas pueden comprender una composición liposomal biodegradable.

En algunas modalidades específicas de la composición
10 farmacéutica de la invención, las nanopartículas pueden comprender un polímero o copolímero biocompatible.

En algunas modalidades específicas de la composición farmacéutica de la invención, las nanopartículas pueden estar asociadas covalentemente o no covalentemente con un
15 polietilenglicol (PEG).

En algunas modalidades específicas de la composición farmacéutica de la invención, las nanopartículas pueden tener un tamaño promedio de aproximadamente 80 a aproximadamente 600 nm.

20 En algunas modalidades específicas de la composición farmacéutica de la invención, la nanopartícula puede tener una nanopartícula objetivo que contiene un motivo de señalización.
En algunas modalidades específicas, las nanopartículas pueden comprender una composición polimérica biodegradable.

En algunas modalidades específicas particulares, el polímero se puede basar en poli(ácido DL-Láctico-co-glicólico) que puede tener un peso molecular de 7 a 240 kDa; o un copolímero de ácido poliláctico (PLA) y ácido poliglicólico (PGA) donde la
5 proporción molecular puede estar entre 95:5 y 50:50.

En algunas modalidades específicas de la composición farmacéutica de la invención, las nanopartículas pueden comprender un artículo seleccionado de nanopartículas PLGA, nanopartículas PLGA-PEG (tipo bloque AB, BA, ABA o BAB, donde
10 A = PLGA y B = PEG) y nanopartículas objetivo.

En algunas modalidades específicas de la composición farmacéutica de la invención, las nanopartículas pueden comprender un artículo seleccionado de liposomas.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica de la
15 invención puede ser adecuada para liberación lenta o sostenida.

En algunas modalidades específicas, la composición farmacéutica de la invención puede ser adecuada para administración oral, parenteral, ocular, transdérmica, nasal, o para inhalación.

20 En algunas modalidades específicas de la composición farmacéutica de la invención, el compuesto activo de la invención puede estar asociado con al menos un agente anti-cancerígeno terapéuticamente activo.

En algunas modalidades específicas, la composición farmacéutica de la invención puede comprender una combinación de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención y una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o
5 más agentes anti-neoplásticos, en donde los componentes que constituyen dicha combinación pueden ser para uso simultáneo, separado o secuencia en terapia de cáncer.

En algunas modalidades específicas de la composición farmacéutica de la invención, el agente anti-neoplástico se
10 puede seleccionar del grupo que consiste de everolimus, cloroquine, hidroxiclороquina, trabectedin, abraxano, TLK 286, AV-299, DN-101, pazopanib, GSK690693, RTA 744, ON 0910.Na, AZD 6244 (ARRI-142886), AMN-107, TKI-258, GSK461364, AZD 1152, enzastaurin, vandetanib, ARQ-197, MK-0457, MLN8054, FA-739358,
15 R-763, AT-9263, pemetrexed, erlotinib, dasatanib, nilotinib, decatanib, panitumumab, amrubicin, oregovomab, Lep-etu, nolatrexed, azd2171, batabulin, ofatumumab, zanolimumab, edotecarin, tetrandrme, rubitecan, tesmilifeno, oblimersen, ticilimumab, ipilimumab, gosipol, Bio 111, 131-I-TM-601, ALT-
20 110, BIO 140, CC 8490, cilengitida, gimatecan. IL13-PE38QQR, TNO 1001, IPdR1 KRX-0402, lucantona, LI 317615, neuradiab, vitespan, Rta 744, Sdx 102, talampanel, atrasentano, Xr 311, romidepsina, ADS-100380, sunitinib, 5-fluorouracil, vorinostat, etoposida, gemcitabina, doxorubicina, irinotecano,

doxorubicin liposomal, 5'-deoxi-5-fluorouridina, vincristina, temozolomida, ZK-304709, seliciclib, PD0325901, AZD-6244, capecitabina, ácido L-Glutámico, N-[4-[2-(2-amino-4,7-dihidro-4-oxo-1H-pirrol[2,3-d]pirimidin-5-il)etil]benzoil]-

5 heptahidrato de sal de disodio, camptotecina, irinotecan etiquetado de PEG, tamoxifeno, citrato de toremifeno, anastrozol, exemestano, letrozol, DES(dietilstilbestrol), estradiol, estrógeno, estrógeno conjugado, bevacizumab, IMC-1C11, CIR-258, 3-[5-(metilsulfonilpiperadinemetil)-indolil]-

10 quinolona, vatalanib, AG-013736, AVE-0005, sal de acetato de [D-Ser(But)₆, Azgli₁₀] (piro-Glu-His-Trp-Ser-Tir-D-Ser(But)-Leu-Arg-Pro-Azgli-NH₂ acetato, acetado de goserelina, acetato de leuprolida, pamoato de triptorelin, acetato de medroxiprogesterona, caproato de hidroxiprogesterona, acetato

15 de megestrol, raloxifeno, bicalutamida, flutamida, nilutamida, acetato de megestrol, CP-724714; TAK-165, HKI-272, erlotinib, lapatanib, canertinib, anticuerpo ABX-EGF, erbitux, EKB-569, PKI-166, GW-572016, lonafamib, BMS-214662, tipifarnib; amifostina, NVP-LAQ824, ácido hidroxámico de suberoil analida,

20 ácido valproico, tricostatina A, FK-228, SU11248, sorafenib, KRN951, aminoglutetimida, arnsacrina, anagrelida, L-asparaginasa, vacuna Bacillus Calmette-Guerin (BCG), bleomicina, buserelina, busulfan, carboplatina, carmustina, clorambucil, cisplatina, cladribina, clodronato, ciproterona,

citarabina, dacarbazina, dactinomicina, daunorubicina,
dietilstilbestrol, epirubicina, fludarabina, fludrocortisona,
fluoximesterona, flutamida, gemcitabina, gleevec, hidroxiurea,
idarubicina, ifosfamida, imatinib, leuprolida, levamisol,
5 lomustina, mecloretamina, melfalan, 6-mercaptopurina, mesna,
metotrexato, mitomicin, mitotana, mitoxantrona, nilutamida,
octreotida, oxaliplatin, pamidronata, pentostatina,
plicamicina, porfimer, procarbacin, raltitrexed, rituximab,
estreptozocina, teniposida, testosterona, talidomida,
10 tioguanina, tiotepa, tretinoína, vindesina, ácido 13-cis-
retinoico, mostaza fenilalanina, mostaza uracilo,
estramustina, altretamina, floxuridina, 5-deoxiuridina,
citosina arabinosida, 6-mercaptopurina, deoxicoformicin,
calcitriol, valrubicin, mitramicin, vinblastina, vinorelbina,
15 topotecano, razoxin, marimastato, COL-3, neovastato, BMS-
275291, escualamina, endostatina, SU5416, SU6668, EMD121974,
interleuquina-12, 1M862, angiostatina, vitaxina, droloxifeno,
idoxifeno, espironolactona, finasterida, cimitidina,
trastuzumab, denileuquina diftitox, gefitinib, bortezomib,
20 paclitaxel, irinotecano, topotecano, doxorubicina, docetaxel,
vinorelbina, bevacizumab (anticuerpo monoclonal) y erbitux,
paclitaxel libre de cremofor, epitilona B, BMS-247550, BMS-
310705, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifen, pibendoxifeno, ERA-
923, arzoxifeno, fulvestrant, acolbifeno, lasofoxifeno,

idoxifeno, TSE-424, HMR-3339, ZK186619, PTK787/ZK 222584, VX-745, PD 184352, rapamicina, 40-O-(2-hidroxietil)-rapamicina, temsirolimus, AP-23573, RAD001, ABT-578, BC-210, LI294002, LI292223, LI292696, LI293684, LI293646, wortmanina, ZM336372, L-779,450, PEG-filgrastim, darbepoetina, eritropoietina, factor estimulante de colonia granulocita, zolendronato, prednisona, cetuximab, factor estimlante de colonia granulocito macrófago, histrelina, interferón pegilado alfa-2a, interferón alfa- 2a, interferón pegilado alfa-2b, interferón alfa-2b, azacitidina, PEG-L-asparaginasa, lenalidomida, gemtuzumab, hidrocortisona, interleuquina-11, dexrazoxana, alemtuzumab, ácido todo-transretinoico, quetoconazol, interleuquina-2, megestrol, mostaza de nitrógeno, metilprednisolona, ibritgumomab tiuxetan, andrógenos, decitabina, hexametilmelamina, bexaroteno, tositumomab, trióxido arsénico, cortisona, editronato, mitotano, ciclosporina, daunorubicina liposomal, Edwina-asparaginasa, estroncio 89, casopitant, netupitant, un antagonista receptor NK-1, palonosetrón, aprepitant, difenhidramina, hidroxizina, metoclopramida, lorazepam, alprazolam, haloperidol, droperidol, dronabinol, dexametasona, metilprednisolona, proclorperazina, granisetron, ondansetrón, dolasetrón, tropisetron, pegfilgrastim, epoetina alfa y darbepoetina alfa, ipilumumab, vemurafenib, inhibidor FLT-3,

un inhibidor VEGFR, un inhibidor EGFR TK, un inhibidor de quinasas auroras, un modulador PIK-1, un inhibidor Bcl-2, un inhibidor HDAC, un inhibidor c-MET, un inhibidor PARP, un inhibidor Cdk, un inhibidor EGFR TK, un inhibidor IGFR-TK, un anticuerpo anti-HGF, inhibidores de quinasas PI3, un inhibidor mTOR, un inhibidor AKT, un inhibidor JAK/STAT, un inhibidor de control-1 o 2, un inhibidor de quinasas de adhesión focal, un inhibidor de Map quinasas quinasas (MEK), un anticuerpo de trampa VEGF, y mezclas de los mismos.

10 En otro aspecto, la invención suministra un método para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad proliferativa y/o neoplásica, que puede comprender el paso de administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que comprende la misma, a un humano o un animal que necesita la misma.

En otro aspecto, la invención suministra un método para inhibir el crecimiento o diferenciación de una Célula Madre Cancerígena (CSC), una célula iniciadora de tumor, una célula similar a mesenquimal asociada con cáncer, una célula cancerígena mesenquimal, o una célula mesenquimal que puede comprender el paso de administrar una cantidad terapéuticamente activa de un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que comprende la misma, a un humano o un animal en necesidad de la misma.

En otro aspecto, la invención suministra un compuesto para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad proliferativa y/o neoplásica.

En otro aspecto, la invención suministra un compuesto para
5 inhibir el crecimiento o diferenciación de una Célula Madre Cancerígena (CSC), una célula iniciadora de tumor, una célula similar mesenquimal asociada con cáncer, una célula cancerígena mesenquimal, o una célula mesenquimal.

• Breve descripción de las figuras

10 Las anteriores y otras características y ventajas de la invención serán más fácilmente evidentes a través de los siguientes ejemplos, y con referencia a las figuras adjuntas, en donde:

La figura 1 muestra la disminución de las células de población
15 ALDH+ en células derivadas de paciente CRC (CPP19, CPP30 y CPP45) cuando se trata por el compuesto **2-3** (ensayo Aldefluor™);

La figura 2 muestra la inhibición, por el compuesto **2-3**, de formación tumerosfera de células derivadas de paciente de
20 cáncer colorectal de metástasis (CRC);

La figura 3 muestra el espectro ^1H NMR del compuesto **1-6** en DMSO- d_6 ;

La figura 4 muestra el espectro ^1H NMR del compuesto **2-3** en DMSO- d_6 ;

La figura 5 muestra el espectro ^1H NMR del compuesto **3-5** en $\text{DMSO}-d_6$;

La figura 6 muestra el espectro ^1H NMR del compuesto **4-3** en $\text{DMSO}-d_6$.

5 • Descripción detallada

En la presente descripción el término "alquilo", solo o en combinación con otros grupos, se refiere a un radical de hidrocarburo alifático saturado monovalente de cadena ramificada o recta de uno a veinte átomos de carbono, preferiblemente uno a dieciséis átomos de carbono, más preferiblemente uno a diez átomos de carbono. El término "alquilo inferior", solo o en combinación, significa un grupo alquilo de cadena recta o cadena ramificada con 1 a 6 átomos de carbono ("C₁-C₆-alquilo"), preferiblemente un grupo alquilo de cadena recta o ramificada con 1 a 5 átomos de carbono ("C₁-C₅-alquilo"), y particularmente se refiere a un grupo alquilo de cadena recta o ramificada con 1 a 3 átomos de carbono ("C₁-C₃-alquilo"). Ejemplos de grupos alquilo inferior de cadena recta o ramificada son metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, ter-butilo, los pentilos isoméricos, los hexilos isoméricos, preferiblemente metilo y etilo y propilo e isopropilo y más preferido metilo.

El término "alcoxi inferior" se refiere al grupo R'-O-, en donde R' es alquilo inferior y el término "alquilo inferior"

tiene el significado anteriormente dado. Ejemplos de grupos alcoxi inferiores son metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, isobutoxi, sec-butoxi y tert-butoxi, preferiblemente metoxi y etoxi e isopropoxi y tert-butoxi más preferido metoxi y etoxi.

El término "alquenilo inferior" significa un residuo de hidrocarburo de cadena recta o cadena ramificada que comprende una unión olefínica y 2 a 6 átomos de carbono ("C₂-C₆-alquenilo"), preferiblemente 2 a 5 átomos de carbono ("C₂-C₅-alquenilo"), particularmente preferido 2 a 4 átomos de carbono ("C₂-C₄-alquenilo"). Ejemplos de grupos alquenilo inferiores son etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo, isopropenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-pentenilo, isopentenilo. Los ejemplos preferidos son 2-propenilo, 2-butenilo e isopentenilo.

El término "alquinilo inferior" significa un residuo de hidrocarburo de cadena recta o cadena ramificada que comprende una unión alquino y 2 a 6 átomos de carbono ("C₂-C₆-alquinilo"), preferiblemente 2 a 5 átomos de carbono ("C₂-C₅-alquinilo"), particularmente preferido 2 a 4 átomos de carbono ("C₂-C₄-alquinilo"). Ejemplos de grupos alquinilo son etinilo, 1-propinilo, 2-propinilo, 1-butinilo, 3-butinilo, 4-butinilo, 1-but-2-ina, 1-pentinilo, pent-2-in-1-il, pent-3-in-1-il, pent-4-in-1-il, pent-2-in-3-il. Los ejemplos preferidos son propin-

1-il, propin-3-il, butin-1-il, butin-3i-1, butin-4-il, but-2-in-1-il.

El término "halógeno" se refiere a flúor, color, bromo y yodo, con flúor, cloro y bromo como preferidos.

- 5 El término "cicloalquilo" denota un grupo carbocíclico saturado que contiene de 3 a 7 átomos de carbono ("C₃-C₇-cicloalquilo"), tal como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo o cicloheptilo. Los cicloalquilos preferidos son ciclopropilo, ciclopentilo y ciclohexilo.
- 10 El término "grupo heterocíclico" significa completamente saturado o insaturado pero no completamente insaturado, por ejemplo grupos monocíclicos con 3 a 7 miembros o sistemas de anillo bicíclico fusionados con 7 a 11 miembros los cuales tienen por lo menos un heteroátomo seleccionado de átomo de
- 15 oxígeno, átomo de nitrógeno o átomo de azufre. Cada anillo del grupo heterocíclico puede tener por lo menos un heteroátomo seleccionado de átomos de nitrógeno, átomos de oxígeno y/o átomos de azufre. Los grupos heterocíclicos preferidos son pirrolidina, piperidina, piperazina, tetrahidrofurán, bis-
- 20 tetrahidrofurán y morfolina.

El término "carboxilo" significa el grupo -COOH.

El término "heteroarilo" en general se refiere a un anillo aromático con 5 u 11 miembros el cual comprende por lo menos un heteroátomo y puede adicionalmente comprende uno, dos, tres

o cuatro átomos seleccionados de nitrógeno, oxígeno, y/o azufre, tal como piridil, pirazinil, pirimidinil, piridazinil, 2-oxo-1,2-dihidropiridinil, oxadiazolil, isoxazolil, tiadiazolil, triazolil, tetrazolil, pirazolil, imidazolil, 5 tiofenil, furanil, oxazolil, isotiazolil, y tiazolil. El término "heteroarilo" además se refiere a grupos aromáticos bicíclicos o parcialmente insaturados que comprende dos anillos con 5 o 6 miembros, en los cuales uno o ambos anillos pueden contener uno, dos, tres o cuatro átomos seleccionados de 10 nitrógeno, oxígeno o azufre, tal como quinolinil, isoquinolinil, cinnolinil, pirazolil, imidazolil, tiazolil, tiofenil, furanil, oxazolil, isotiazolil, pirazolo[1,5-**a**]piridil, imidazo[1,2-**a**]piridil, quinoxalinil, quinazolil, benzotiazolil, benzotriazolil, 1H-benzo[d]imidazol, 15 benzo[**d**]isoxazolil, benzo[**d**]isotiazolil, benzo[**c**]isoxazolil, benzo[**c**]isotiazolil, indolil, isoindolinil, 6,7-dihidro-5H-pirrolo[3,4-**b**]piridinil, 2,3-dihidro-1H-pirrolo[3,4-**c**]piridinil, 6,7-dihidro-5H-pirrolo[3,4-**d**]pirimidinil, purinil, indazolil, indolizinil, imidazo[1,2-**a**]piridinil, 20 imidazo[1,5-**a**]piridinil, imidazo[1,5-**a**]pirazinil, imidazo[1,2-**a**]pirazinil, 1H-imidazo[4,5-**b**]pirazinil, pirazolo[1,5-**a**]piridinil, pirrolo[1,2-**a**]pirimidinil, pirrolo[1,2-**a**]pirazinil, pirrolo[1,2-**c**]pirimidinil, oxazolo[4,5-**b**]piridinil, oxazolo[4,5-**c**]piridinil,

	oxazolo[5,4- c]piridinil,	oxazolo[5,4- b]piridinil,
	tiazolo[4,5- b]piridinil,	tiazolo[4,5- c]piridinil,
	tiazolo[5,4- c]piridinil,	tiazolo[5,4- b]piridinil,
	oxazolo[5,4- d]pirimidinil,	oxazolo[4,5- d]pirimidinil,
5	tiazolo[5,4- d]pirimidinil,	tiazolo[4,5- d]pirimidinil,
	oxazolo[4,5- b]pirazinil,	tiazolo[4,5- b]pirazinil,
	isoxazolo[4,5- b]pirazinil,	isotiazolo[4,5- b]pirazinil,
	isoxazolo[4,5- d]pirimidinil,	isotiazolo[4,5- d]pirimidinil,
	isoxazolo[5,4- d]pirimidinil,	isotiazolo[5,4- d]pirimidinil,
10	isoxazolo[5,4- b]piridinil,	isotiazolo[5,4- c]pirimidinil,
	isoxazolo[5,4- c]piridinil,	isotiazolo[4,5- c]piridinil,
	isoxazolo[4,5- c]piridinil,	isoxazolo[4,5- b]piridinil,
	isoxazolo[4,3- d]pirimidinil,	istiazolo[4,3- d]pirimidinil,
	isoxazolo[3,4- d]pirimidinil,	isotiazolo[3,4- d]pirimidinil,
15	pirido[2,3- d]pirimidinil,	pirido[3,4- d]pirimidinil,
	pirido[4,3- d]pirimidinil,	pirido[3,2- d]pirimidinil,
	pirido[2,3- b]pirazinil,	pirido[3,4- b]pirazinil,
	[1,2,3]triazolo[4,5- b]piridinil,	[1,2,3]triazolo[4,5-
	c]piridinil, 3H-[1,2,3]triazolo[4,5- d]pirimidinil.	

Los grupos

heteroarilo preferidos son piridil, tiozolil, isotiazolil, oxazolil, isoxazolil, quinozolinil, y pirazinil.

El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a aquellas sales que retienen la efectividad y las propiedades biológicas de las bases libres y los ácidos libres, los cuales

no son biológicamente o de otra forma indeseables. Las sales se forman con ácidos inorgánicos tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, preferiblemente ácido clorhídrico, y
5 ácidos orgánicos tal como ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxílico, ácido maleico, ácido malónico, ácido salicílico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido glutárico, ácido cinnámico, ácido mandélico, ácido málico,
10 ácido metanesulfónico, ácido etanesulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido bencenosulfónico, N-acetilcisteína y similares. Adicionalmente, estas sales se pueden preparar a partir de la adición de una base inorgánica y una base orgánica al ácido libre. Las sales derivadas de una base inorgánica
15 incluyen, pero no se limitan a, las sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio y similares. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen, pero no se limitan a, sales de aminas primarias, secundarias, y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas que ocurren
20 naturalmente, aminas cíclicas y resinas básicas de intercambio de iones, tal como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, lisina, arginina, N-etilpiperidina, piperidina, resinas de poliamina y

similares. Los compuestos de la fórmula I también pueden estar presentes en la forma de zwitteriones.

Las sales farmacéuticamente aceptables particularmente preferidas de los compuestos de la fórmula I son las sales
5 clorhídricas.

Los compuestos de la fórmula I también se pueden solvar, por ejemplo hidratar. La solvación se puede efectuar en el curso del proceso de fabricación o puede tomar lugar, por ejemplo como consecuencia de propiedades higroscópicas de un compuesto
10 inicialmente anhidro de fórmula I o II (hidratación). El término "sales farmacéuticamente aceptables" también incluye solvatos fisiológicamente aceptables.

Los "isómeros" son compuestos que tienen fórmulas moleculares idénticas pero que difieren en la naturaleza o la secuencia de
15 la unión de sus átomos o en la disposición de sus átomos en el espacio. Los isómeros que difieren en la disposición de sus átomos en espacio se denominan "estereoisómeros". Los estereoisómeros que no son imágenes espejo entre sí se denominan "diastereoisómeros", y los estereoisómeros que son
20 imágenes espejo no superpuestas se denominan "enantiómeros", o algunas veces isómeros ópticos.

Como se usa acá, los términos "sujeto" o "paciente" se utilizan de forma intercambiable. Como se usa acá, los términos "sujeto" y "sujetos" se refieren a un animal (por ejemplo, aves,

reptiles, y mamíferos), preferiblemente un mamífero que incluye un no primate (por ejemplo, un camello, mono, cebra, vaca, cerdo, caballo, cabra, oveja, gato, perro, rata, y ratón) y un primate (por ejemplo, un mono, chimpancé, y un humano), y más
5 preferiblemente un humano.

Como se utiliza acá, los términos "terapias" o "terapia" se puede referir a cualquier protocolo, método, composiciones, formulaciones, y/o agentes que se pueden utilizar en la prevención, tratamiento, manejo, o mejora de una enfermedad,
10 incluyendo infecciones virales o bacterianas o síntomas asociados con los mismos, cánceres, etc. En ciertas modalidades, los términos "terapias" y "terapia" se refieren a terapia biológica, terapia de soporte, y/u otras terapias útiles en el tratamiento, manejo, prevención, o mejora de las
15 diferentes enfermedades conocidas para el experto en la materia.

El término "una cantidad terapéuticamente efectiva" de un compuesto significa una cantidad de compuesto que es efectiva para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de enfermedad o
20 prolongar la supervivencia del sujeto en tratamiento. La determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva está dentro del experto en la materia. La cantidad terapéuticamente efectiva o dosificación de un compuesto de acuerdo con esta invención puede variar dentro de amplios límites y se puede

determinar en una forma conocida en el arte. Dicha dosificación se ajustará a los requerimientos individuales en cada caso particular incluyendo los compuestos específicos que se administran, la ruta de administración, la condición a tratar, así como el paciente a tratar. En general, en el caso de administración oral o parenteral a humanos adultos con peso de aproximadamente 70 kg, una dosis diaria de 0.1 mg a 5 g, preferiblemente de aproximadamente 0.1 mg a 1 g, más preferiblemente de 0.5 mg a 500 mg, y más preferiblemente de aproximadamente 1 mg a 300 mg, debe ser adecuada, aunque el límite superior se puede superar cuando se indica. La dosis diaria se puede administrar como una dosis simple o en dosis divididas, o para administración parenteral, se puede dar como infusión continua.

El término "portador farmacéuticamente aceptable" está destinado a incluir cualquiera y todos los materiales compatibles con administración farmacéutica incluyendo solventes, medio de dispersión, recubrimientos, agentes antibacteriales o antifúngicos, agentes de retraso isotónico o de absorción, y otros materiales y compuestos compatibles con administración farmacéutica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional es incompatible con el compuesto activo, se contemplan los usos de los mismos en las composiciones de la invención. Compuestos complementariamente

activos también se pueden incorporar en las composiciones. Estas composiciones se pueden preparar al aplicar técnicas conocidas en el arte como se describe en *Formas de Dosis Farmacéutica de Ansel y Sistemas de Entrega de Droga* (Décima Edición) 2014, Editado por Loyd Allen, Howard C. Ansel, publicado por Wolters Kluwer Health y *Remington: La Ciencia y Práctica de Farmacia* (Vigésima segunda Edición) 2012, Editado por Loyd V. Allen, Publicado por Pharmaceutical Press, cada uno de los cuales se incorpora acá por referencia.

10 Como se utiliza acá, los términos “tratar”, “tratamiento” y “tratando” se refieren en el contexto de la administración de una terapia a un sujeto para tratar una infección viral se refiere a uno, dos, tres, cuatro, cinco o más de los siguientes efectos que resultan de la administración de una terapia o una

15 combinación de terapias: (i) la reducción o mejora de la severidad de una enfermedad y/o un síntoma asociado con la misma; (ii) la reducción en la duración de una enfermedad y/o un síntoma asociado con la misma; (iii) la regresión de una enfermedad y/o un síntoma asociado con la misma; (iv) la

20 reducción del título de un patógeno; (v) la reducción en fallo de órgano asociado con una enfermedad; (vi) la reducción en hospitalización de un sujeto; (vii) la reducción en longitud de hospitalización; (viii) el aumento en la supervivencia de un sujeto; (ix) la eliminación de una infección; (x) la

inhibición de la progresión de una infección y/o un síntoma asociado con la misma; (xi) la prevención de la propagación de un virus de una célula, tejido o sujeto a otra célula, tejido o sujeto; y/o (xii) la mejora del efecto terapéutico de otra
5 terapia.

“Prodroga” significa un compuesto que se somete a conversión al compuesto de la invención dentro de un sistema biológico. Una prodroga es un derivado químico inactivo o menos activo que la droga como tal. Después de la administración y la
10 difusión en el cuerpo, el derivado de prodroga se somete a uno o más procesos metabólicos que liberan la droga activa. La conversión de la prodroga en la droga es generalmente llevada a cabo bajo el control de procesos enzimáticos (usualmente por medios metabólicos, por ejemplo, hidrólisis, reducción u
15 oxidación) y menos frecuentemente por reacciones químicas clásicas durante su difusión en el cuerpo. La unión entre el portador y la droga puede ser, pero no se limita a, éster, amida, carbonato, carbamato, imina, acetal, éter (por ejemplo conjugación de glucoro), función oxidable y sistema molecular,
20 función reducible y sistema molecular reducible, función fotoactivada y sistema molecular fotoactivado. Por ejemplo, una prodroga de éster de un compuesto que contiene un grupo hidroxilo se puede convertir por hidrólisis in vivo a la molécula padre. Los esteres adecuados de los compuestos de la

invención que contienen un grupo hidroxilo, son por ejemplo, acetatos, citratos, lactatos, tatratos, malonatos, oxalatos, salicilatos, propionatos, succinatos, fumaratos, maleatos, metilen-bis- β -hidroxinaftoatos, gestisatos, isetionatos, di-p-
5 toluoiltartratos, metanosulfonatos, etanosulfonatos, bencenosulfonatos, p-toluenosulfonatos, ciclohexilsulfamatos y quinatos. Como otro ejemplo una prodroga de éster del compuesto de la invención que contiene un grupo carboxi se puede convertir por hidrólisis in vivo en molécula padre (Ejemplos
10 de prodrogas éster se describen por F.J. Leinweber, *Metab. Droga. Res.* 1987 (18) pp379, incorporado acá por referencia). De forma similar, una prodroga de acilo de un compuesto que contiene un grupo amino se puede convertir por hidrólisis in vivo en la molécula padre (ejemplos de prodrogas de estos y
15 otros grupos funcionales, incluyendo, amina, alcohol se describen en *Prodrogsa: Retos y Recompensas* (Partes 1 y 2); Ed. V Stella, R. Borchardt y otros, Springer, 2007, y *Prodrogas y Entrega Objetivo: Hacia Mejores Propiedades ADME* Ed. J. Rautio, Seies Ed. R. Mannhold, H. Kubinyi, G. Folkers. Wiley-VCH
20 VCH 2011, cada uno de los cuales se incorpora acá por referencia).

Un sistema portador de prodroga se utiliza generalmente con el fin de aumentar la solubilidad en agua o lípido, reducir la toxicidad, aumentar la estabilidad química o biológica de un

compuesto sensible, aumentar el tiempo de circulación en el cuerpo ($T_{1/2}$), aumentar la exposición de droga total (AUC) y la distribución de órgano (perfil PK-PD) y la orientación específica del sitio.

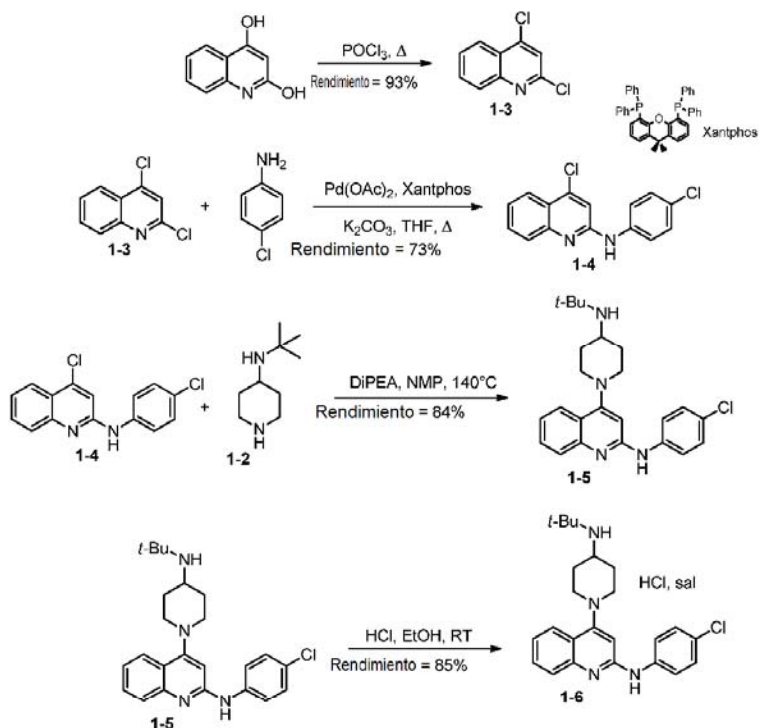
5 **Material y métodos con relación a los ejemplos 1, 2, 3 y 4**

Los reagentes y solventes se obtuvieron de proveedores comerciales y se utilizaron sin purificación adicional. El cloruro de Metileno seco se secó y se destiló sobre CaCl_2 y se almacenó sobre tamices moleculares 4^a bajo argón. El
10 tetrahidrofuran se secó sobre cetilo de sodio/benzofenona bajo argón y se destiló antes de su uso. Se realizaron purificaciones de cromatografía instantánea en gel de sílice Merck (40-63 μM o 15-40 μM) como la fase estacionaria.

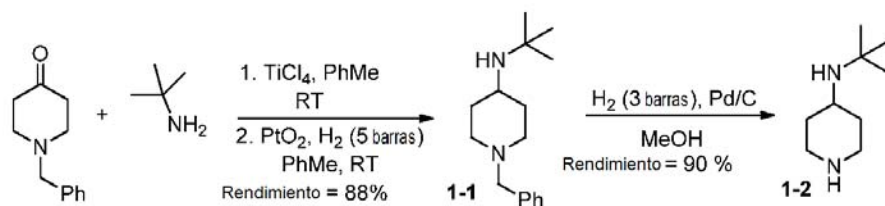
Los espectros NMR se registraron en Bruker Avance 300 MHz.
15 Cromatografía Analítica Líquida de Ultra Alto Desempeño - análisis de masa (UHPLC-MS): Aquidad de Aguas UPLC, UV DAD, acoplado a un tándem espectrómetro de masa cuadropol Waters Quattro Premier Xe.

Aquidad de Columna UPLC BEH C18 (2.1 x 50 mm) 1.7 μm , fase
20 móvil: A H_2O + 0.1% TFA, B: MeCN + 0.1% TFA. Las condiciones de elución comprendían un gradiente lineal (minuto/%B): 0/5% B, 4/98% B, tasa de flujo 0.4 ml/min.

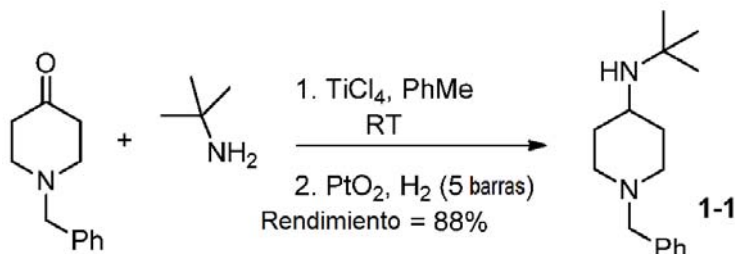
1. Ejemplo 1: Preparación de sal de clorhidrato de 2-(4-clorofenilamino)-4-(4-tert-butilaminopiperidin-1-il)-quinolina (1-6).



Preparación de 4-tert-butilaminopiperidina (1-2) intermedia:



5 1.1. Síntesis de 1-bencil-4-tert-butilaminopiperidina (1-1)

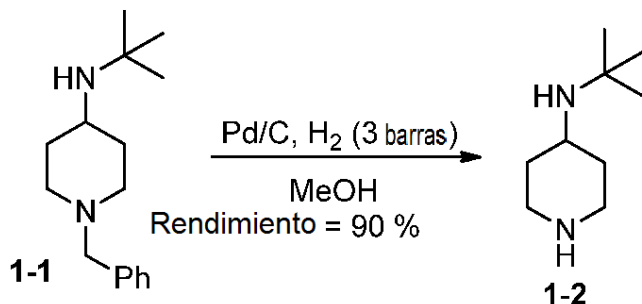


A una solución de N-bencil-4-piperidinona (60,0 g, 314 mmol) en 500 ml de tolueno seco y terc-butilamina (135 ml, 1,280 mmol) se añadió gota a gota a $T < 15^{\circ}\text{C}$, una solución de tetracloruro de titanio (23,0 ml, 210 mmol) en 250 ml de tolueno seco. La mezcla resultante se agitó a RT durante 20 h y luego se filtró a travez de una almohadilla Celite®. La solución de tolueno se transfirió a un reactor de hidrogenación de alta presión y se añadió el catalizador dióxido de Platino (160 mg, 0,70 mmol). Se introdujo hidrógeno en el reactor a una presión de 5 bares y la reacción procedió a temperatura ambiente durante 2 días. Después, la mezcla resultante se diluyó con una solución acuosa de NaOH de 2M (400 ml) y se filtró a través de una almohadilla Celite®. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con tolueno. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 filtrado y se concentró bajo presión reducida para dar 68,05 g (rendimiento 88%) de un aceite de color naranja que corresponde a 1-bencil-4-tert-butilaminopiperidina.

Masa: (ES+) $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{N}_2$ requerida 246; encontrada 247 [M+H]

$^1\text{HRMN}$ (300 MHz, CDCl_3)

1.2. Síntesis de 4-tert-butilaminopiperidina (1-2)



En un reactor químico de hidrógeno y a una solución de nitrógeno desgasificado de 1-bencil-4-tert-butilaminopiperidina (68,05 g, 276 mmol) en 700 ml de metanol se añadió bajo nitrógeno de

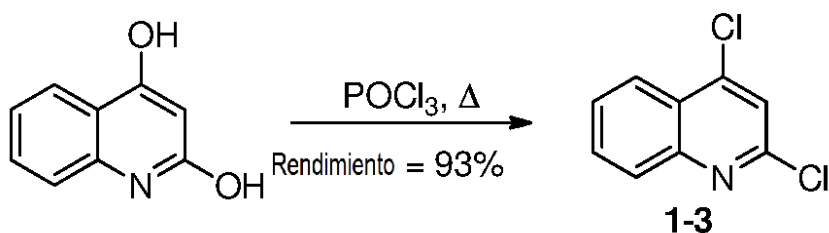
5 Paladio en polvo de carbono 10% en peso, 50% húmedo (29,40 g, 13,81 mmol, 5% mol). Se introdujo hidrógeno en el reactor a una presión de 3 bares y la reacción procedió a temperatura ambiente durante 2 días. A continuación, la mezcla resultante se filtró a través de una almohadilla Celite® y el filtrado se

10 concentró a presión reducida para dar 38,86 g (rendimiento 90%) de un sólido de color amarillo correspondiente a 4-tert-butilaminopiperidina.

Masa: (ES+) $\text{C}_9\text{H}_{20}\text{N}^2$ requerido 156; encontrado 157 [M+H]

$^1\text{HRMN}$ (300 MHz, CDCl_3)

15 1.3. Síntesis de 2,4-dicloroquinolina (1-3)

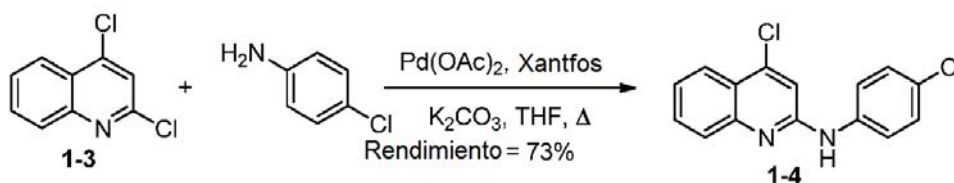


A quinolina-2,4-diol (50,0 g, 310 mmol) se añadió, gota a gota a 0°C, cloruro de fosforilo (250 ml, 2,682 mmol). La mezcla resultante se agitó y se calentó a reflujo durante la noche. Entonces, la mezcla se enfrió, se concentró a presión reducida y se co-evaporo dos veces con 500 ml de tolueno. Después, el residuo se recogió con DCM (500 ml) y se lavó con agua fría. La capa acuosa se extrajo con DCM y las capas orgánicas combinadas se combinaron y se secaron sobre MgSO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida para dar un sólido marrón (57,0 g, rendimiento del 93%) que corresponde a 2,4-dicloroquinolina.

Masa: (ES+) C₉H₅Cl₂N requerido 197; encontrado 198 [M+H]

¹HNMR (300 MHz, CDCl₃)

1.4. Síntesis de 2-(4-clorofenilamino)-4-cloroquinolina (1-4)



15

A una solución, bajo gas nitrógeno, de 2,4-dicloroquinolina (2,00 g, 10,1 mmol) en THF seco (20 ml) se añadió 4-cloroanilina (1,45 g, 11,1 mmol) y K₂CO₃ (3,91 g, 28,3 mmol). La mezcla resultante se desgasificó 5 min con nitrógeno, a continuación, Xantphos (590 mg, 1,01 mmol) y Pd(OAc)₂ se añadieron (120 mg, 0,5 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 2h. La mezcla de reacción se enfrió entonces a RT y se concentró

20

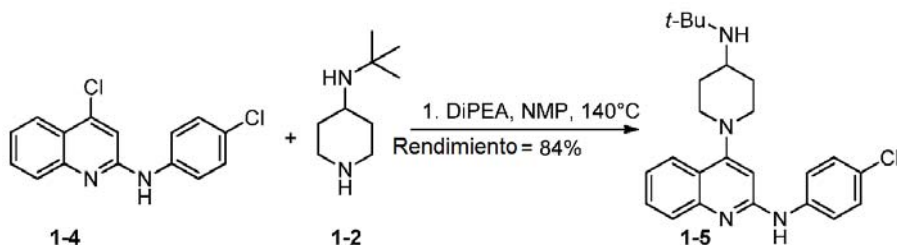
a presión reducida. El residuo se repartió entre agua y AcOEt y la capa acuosa se extrajo con AcOEt. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar un aceite amarillo.

5 El producto en bruto se purificó por cromatografía flash (gradiente de ciclohexano/AcOEt de 7/3 a 0/10) para dar 2,13 g (rendimiento 73%) de un sólido de color amarillo que corresponde a 2-(4-clorofenilamino)-4-cloroquinolina.

Masa: (ES+) C₁₅H₁₀Cl₂N₂ requerido 288; encontrado 289 [M+H]

10 ¹HRMN (300 MHz, CDCl₃)

1.5. Síntesis de 2-(4-clorofenilamino)-4-(4-tert-butilaminopiperidina-1-il) quinolina (1-5)



A una solución de 2-(4-clorofenilamino)-4-cloroquinolina (1,00 g, 3,46 mmol) y 4-(tert-butilamino)-piperidina (684 mg, 4,38 mmol) en 5 ml de NMP se añadió N,N-diisopropiletilamina (0,947 ml, 5,47 mmol) y la mezcla se calentó durante 24 horas a 140°C.

A continuación, la mezcla de reacción se enfrió, se diluyó con una solución acuosa de NaOH de 1N y la mezcla resultante se

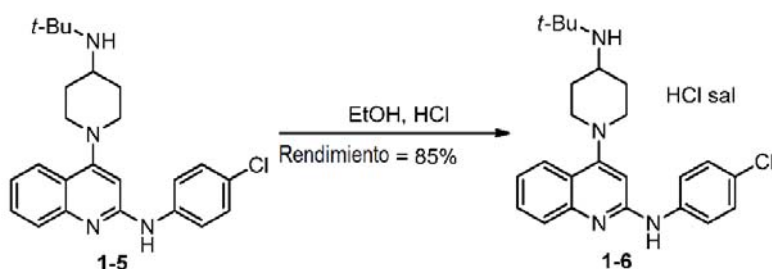
20 extrajo con AcOEt. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida

para dar un líquido marrón. El producto en bruto se purificó por cromatografía flash (gradiente de ciclohexano/AcOEt de 8/2 a 2/8) para dar un sólido amarillento. Este sólido se
 5 recristalizó en MeCN para dar 1,19 g (rendimiento 84%) de un sólido blanco que corresponde a 2-(4-clorofenilamino)-4-(4-tert-butilaminopiperidina-1-il)-quinolina.

HPLC-MS: $t_r = 1,24$ min, (ES +) $C_{24}H_{29}ClN_4$ requerido 408; encontrado 409 [M + H], 353 [M-FBU + H]

$^1\text{HRMN}$ (300 MHz, CDCl₃)

10 **1.6. Síntesis de sal de hidrocloreuro 2-(4-clorofenilamino)-4-(4-tert-butilaminopiperidina-1-il)-quinolina (1-6)**



A una suspensión de 2-(4-clorofenilamino)-4-(4-tert-butilaminopiperidina-1-il)-quinolina (440 mg, 1,1 mmol) en 4
 15 ml de EtOH, se añadió gota a gota 371 μl de una solución de 7,25 M de HCl en EtOH. El sólido se disolvió y la mezcla se agitó 20 min a RT. Después, la solución resultante se concentró a aproximadamente la mitad del volumen a presión reducida y se añadieron 6 ml de éter. La mezcla resultante se agitó 1h a
 20 temperatura ambiente para obtener un sólido blanco que se

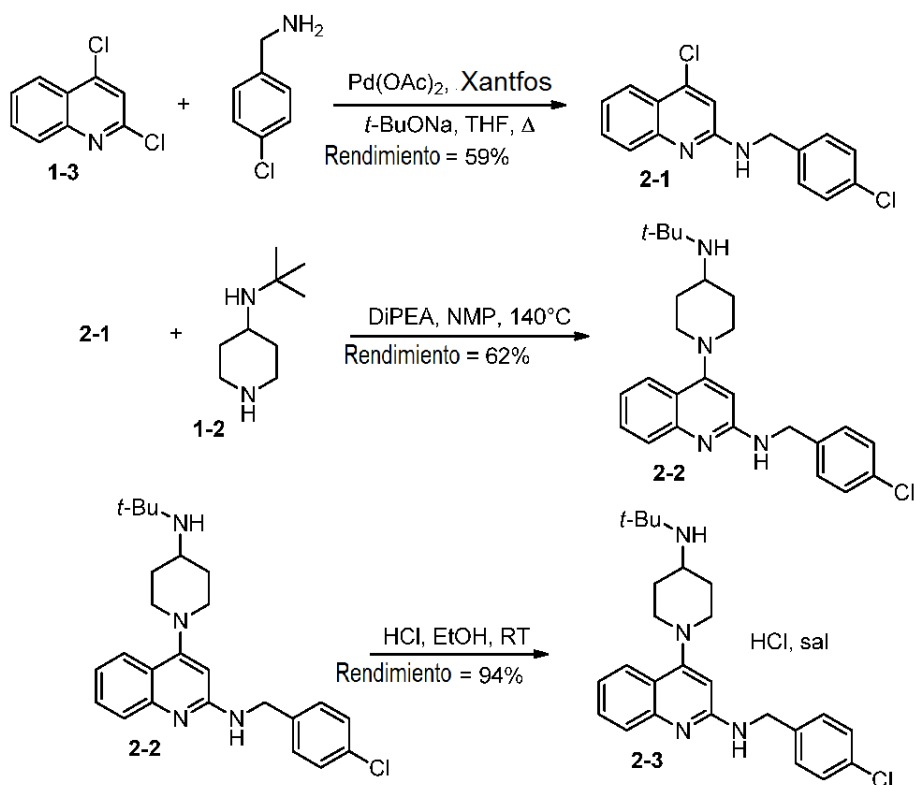
separó por filtración, se aclaró con éter y se secó bajo vacío a 45°C para dar 401 mg (rendimiento 85%) de un sólido blanco que corresponde a sal de hidrocloreto 2-(4-clorofenilamino)-4-(4-tert-butilaminopiperidina-1-il)-quinolina.

5 HPLC-MS: $t_r = 1,21$ min, (ES +) $C_{24}H_{29}ClN_4$ requerido 408; encontrado 409 [M + H], 353 [M-FBU + H]

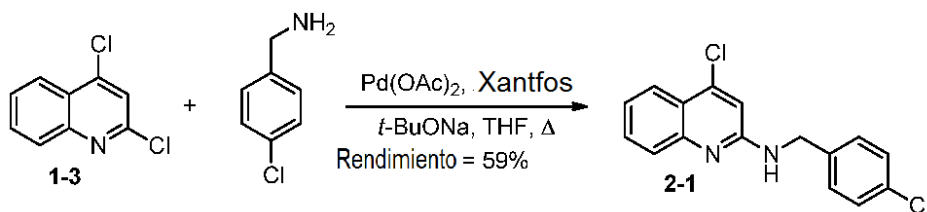
^1H NMR (300 MHz, CD 3 OD)

^{13}C NMR (75 MHz, CD 3 OD)

10 **2. Ejemplo 2: Preparación de sal de hidrocloreto 2-(4-clorobencilamino)-4-(4-tert-butilaminopiperidina-1-il)-quinolina (2-3)**



2.1. Síntesis de 2-(4-clorobencilamino)-4-cloroquinolina (2-1)

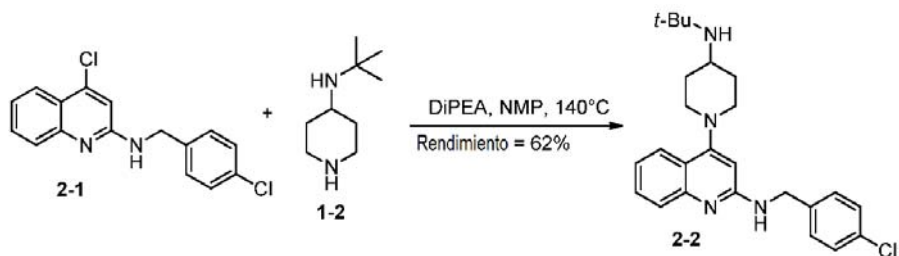


A una solución bajo gas nitrógeno de 2,4-dicloroquinolina (1,00 g, 5,05 mmol) en THF seco (10 ml) se añadió 4-clorobencilamina (1,46 g, 10,1 mmol) y *t*-BuONa (1,36 g, 14,1 mmol). La mezcla resultante se desgasificó 5 min con nitrógeno, a continuación, Xantphos (295 mg, 0,51 mmol) y Pd(OAc)₂ se añadieron (58 mg, 0,25 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 2h. La mezcla de reacción se enfrió luego a RT y se concentró bajo presión reducida. El residuo se repartió entre salmuera y AcOEt y la capa acuosa se extrajo con AcOEt. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar un aceite marrón. El producto en bruto se purificó por cromatografía flash (gradiente de ciclohexano/DCM de 5/5 a 0/10) para dar 897 mg (rendimiento 59%) de un sólido de color marrón que corresponde a 2-(4-clorobencilamino)-4-cloroquinolina.

MasA: (ES+) C₁₆H₁₂Cl₂N₂ requerido 302; encontrado 303 [M+H]

¹HNMR (300 MHz, CDCl₃)

20 2.2. Síntesis de 2-(4-clorobencilamino)-4-(4-tert-butylaminopiperidina-1-il)-quinolina (2-2)

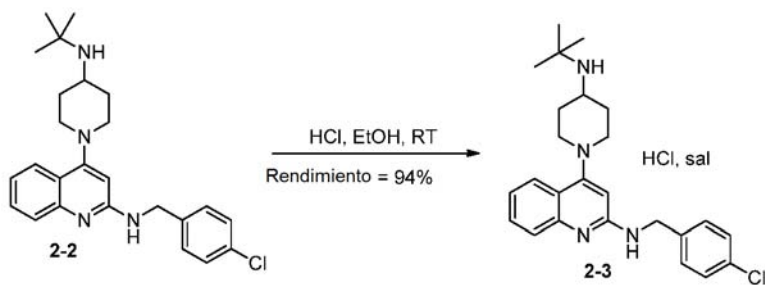


A una solución de 2-(4-clorobencilamino)-4-cloroquinolina (1,05 g, 3,46 mmol) y 4-(tert-butilamino)-piperidina (0,684 g, 4,38 mmol) en 5 ml de NMP se añadió N, N-Diisopropiletilamina (0,947 ml, 5,47 mmol) y la mezcla se calentó durante 22 h a 140°C. A continuación, la mezcla de reacción se enfrió, se diluyó con una solución acuosa de NaOH 1N y la mezcla resultante se extrajo con AcOEt. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar un aceite amarillo. El producto en bruto se purificó por cromatografía flash (gradiente de ciclohexano/AcOEt de 8/2 a 0/10) para dar un sólido amarillo. Este sólido se recristalizó en MeCN para dar 904 mg (rendimiento 62%) de un sólido blanco que corresponde a 2-(4-clorobencilamino)-4-(4-tert-butilaminopiperidina-1-il)-quinolina.

HPLC-MS: t_r = 1,30 min, (ES +) C₂₅H₃ClN₄ requerido 422; encontrado 423 [M + H], 368 [M-FBU + H]

¹HNMR (300 MHz, CDCl₃)

2.3. Síntesis de sal de hidrocloreuro 2-(4-clorobencilamino)-4-(4-tert-butilaminopiperidina-1-il)-quinolina (2-3)

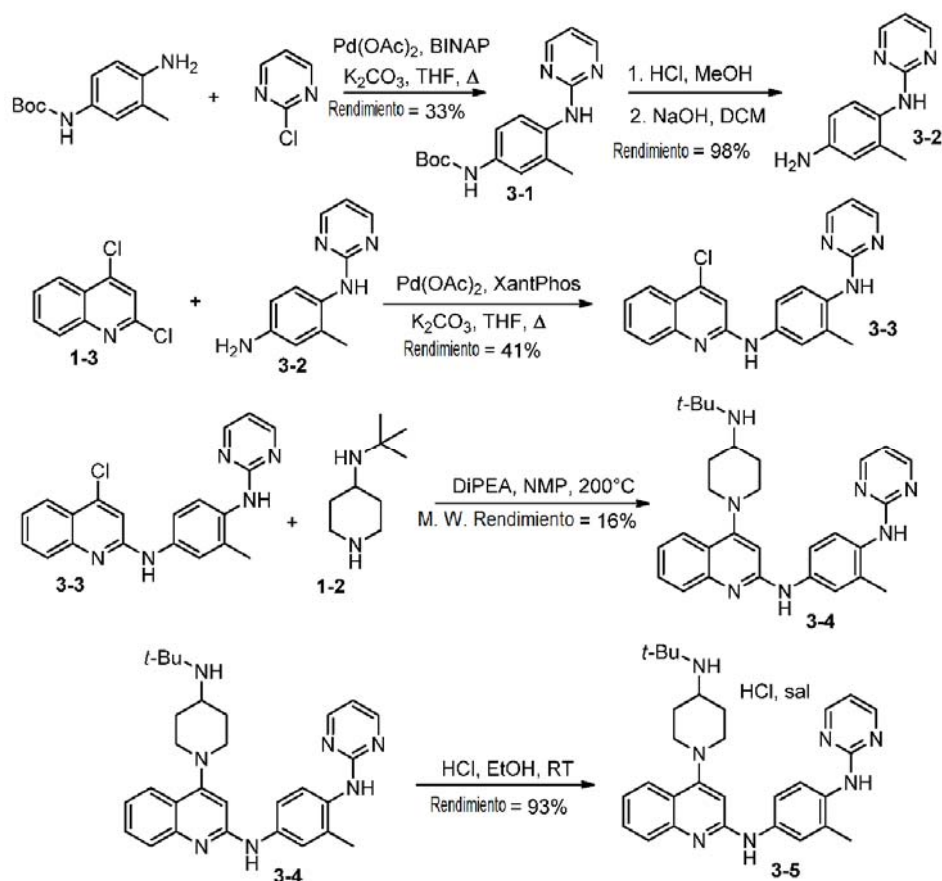


A una suspensión de 2-(4-clorobencilamino)-4-(4-tert-butylaminopiperidina-1-il)-quinolina (450 mg, 1,06 mmol) en 2,5 ml de EtOH, se añadió gota a gota 400 µl de una solución de HCl 7M en EtOH. El sólido se disolvió y la mezcla se agitó 3h a RT. Después, la solución resultante se concentró a presión reducida y se añadió éter. La mezcla resultante se agitó y se trituro a temperatura ambiente para obtener un sólido amarillento que se separó por filtración, se aclaró con éter y se secó bajo vacío. El sólido amarillento se disolvió en agua pura y después se liofilizó para dar 401 mg (rendimiento 94%) de un sólido blanco que corresponde a sal de hidrocloreuro 2-(4-clorobencilamino)-4-(4-tert-butylaminopiperidina-1-il)-quinolina.

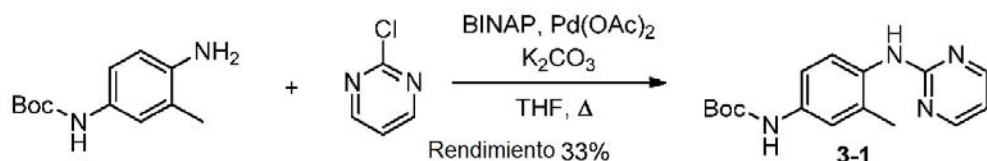
HPLC-MS: $t_r = 1,31$ min, (ES +) $C_{25}H_{31}ClN_4$ requerido 422; encontrado 423 [M + H], 369 [M-tBU + H]

$^1\text{HNMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6)

3. Ejemplo 3: Preparación de sal de hidrocloreuro 2-[3-metil-4-(pirimidin-2-ilamino)phenylamino]-4-(4-tert-butylaminopiperidina-1-il)-quinolina (3-5)



3.1. Síntesis de 2-metil-N¹-(pirimidin-2-il)-N⁴-(tert-butiloxicarbonil)-benceno-1,4-diamina (3-1)



5 Una solución de 2-metil-N⁴-(tert-butiloxicarbonil)-benceno-1,4-diamina (2,40 g, 10,8 mmol), 2-cloropirimidina (0,78 g, 6,5 mmol) y K₂CO₃ (2.24 g, 16,2 mmol) en THF seco (48 ml) se desgasificó con nitrógeno durante 15 minutos. Entonces, se añadieron Pd(OAc)₂ (58 mg, 0,26 mmol) y el ligando BINAP (320

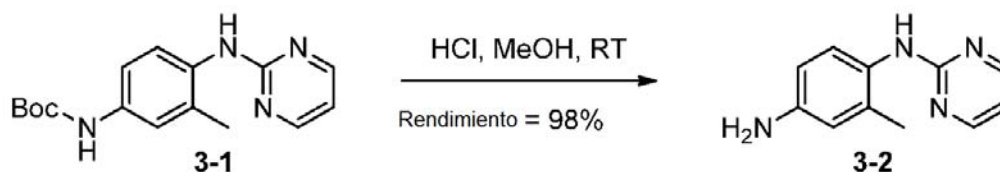
10 mg, 0,52 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó por

segunda vez durante 20 minutos. La mezcla de reacción se calentó finalmente a reflujo durante 1h. La mezcla de reacción se enfrió entonces a RT y se concentró a presión reducida. El residuo se repartió entre agua y AcOEt y la capa acuosa se extrajo con AcOEt. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía flash (gradiente ciclohexano/AcOEt desde 10/0 a 7/3) para dar 650 mg (rendimiento 33%) de un sólido de color marrón que corresponde a 2-metil-N¹-(pirimidin-2-il)-N⁴-(tert-butiloxicarbonil)-benceno-1,4-diamina.

HPLC-MS: t_r = 2,06 min, (ES +) C₁₆H₂₀N₄O₂ requerido 300; encontrado 301 [M + H]

¹HMNR (300 MHz, CD₃OD)

3.2. Síntesis de 2-metil-N¹-(pirimidin-2-il)-benceno-1,4-diamina (3-2)



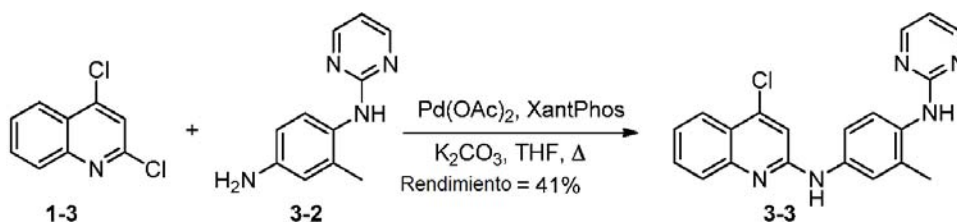
A 2-metil-N¹-(pirimidin-2-il)-(tert-butiloxicarbonil)-benceno-1,4-diamina (1,18 g, 3,93 mmol) se añadió gota a gota a RT una solución de HCl 3M en metanol (15 ml). Después, la mezcla de reacción se agitó durante 1h a RT. La reacción se concentró luego a presión reducida y el residuo se repartió

entre DCM y una solución acuosa de NaOH 1M y la capa acuosa se extrajo con DCM. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida para dar 787 mg (rendimiento 98%) de un aceite de color amarillo que corresponde a 2-metil-N1-(pirimidin-2-il)-benceno-1,4-diamina.

Masa: (ES+) C₁₁H₁₂N₄ requerido 200; encontrado 201 [M+H]

¹HNMR (300 MHz, CD₃OD)

3.3. Síntesis de 2-[4-(2-pirimidinilamino)-3-metil-fenilamino]-4-cloroquinolina (3-3)

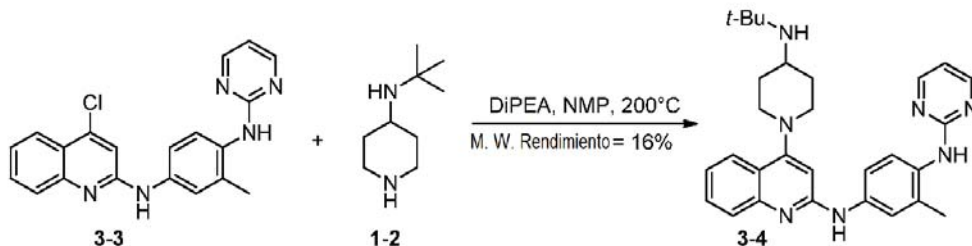


Una solución de 2-metil-N1-(pirimidin-2-il)-benceno-1,4-diamina (771 mg, 3,85 mmol), 2,4-dicloroquinolina (693 mg, 3,5 mmol) y K₂CO₃ (1,35 g, 9,80 mmol) en THF seco (7 ml) se desgasificó con nitrógeno durante 20 minutos. Entonces, se añadieron Pd(OAc)₂ (47 mg, 0,21 mmol) y el ligando Xantphos (61 mg, 0,10 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó por segunda vez durante 20 minutos. La mezcla de reacción se calentó finalmente a reflujo durante 4 h. La mezcla de reacción se enfrió entonces a RT y se concentró a presión reducida. El residuo se repartió entre agua y AcOEt y la capa acuosa se extrajo con AcOEt. Las capas orgánicas combinadas se secaron

sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía flash (gradiente ciclohexano/ AcOEt desde 10/0 a 5/5) para dar 520 mg (rendimiento 41%) de un sólido de color amarillo que corresponde a 2-[4-(2-pirimidinilamino) 3-metil-fenilamino]-4-cloroquinolina.

Masa: (ES+) C₂₀H₁₆ClN₅ requerido 361; encontrado 362 [M+H]

3.4. Síntesis de 2-[4-(2-pirimidinilamino)-3-metil-fenilamino]-4-(4-tert-butilaminopiperidina-1-il)-quinolina(3-4)

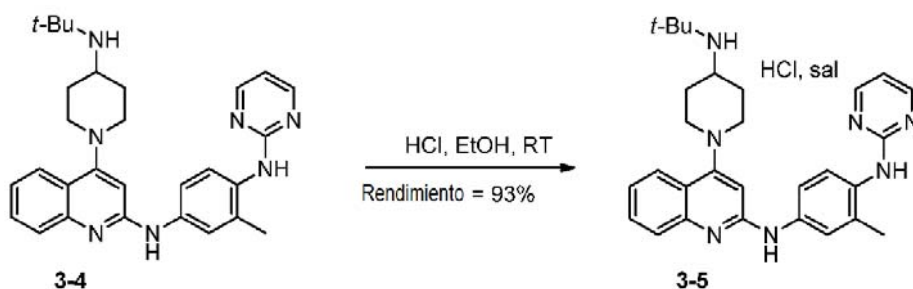


A una solución de 2-[4-(2-pirimidinilamino)-3-metil-fenilamino]-4-cloroquinolina (350 mg, 0,97 mmol) en NMP (1,5 ml) se añadió 4-tert-butilaminopiperidina (760 mg, 4,80 mmol). La solución resultante se calentó durante 30 minutos a 200°C en un horno de microondas de laboratorio. Después, la mezcla resultante se enfrió y se repartió entre agua y AcOEt y la capa acuosa se extrajo con AcOEt. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía flash (gradiente ciclohexano/AcOEt desde 10/0 a 5/5) para dar

75 mg (rendimiento 16%) de un sólido de color marrón que corresponde a 2-[4-(2-pirimidinilamino)-3-metil-fenilamino]-4-(4-tert-butilaminopiperidina-1-il)-quinolina.

HPLC-MS: $t_r = 1,15$ min, (ES +) $C_{29}H_{35}N_7$ requerido 481; encontrado 482 [M + H], 426 [M-tBU + H]

3.5. Síntesis de sal de hidrocloruro 2-[4-(2-pirimidinilamino)-3-metil-fenilamino]-4-(4-tert-butilaminopiperidina-1-il)-quinolina (3-5)

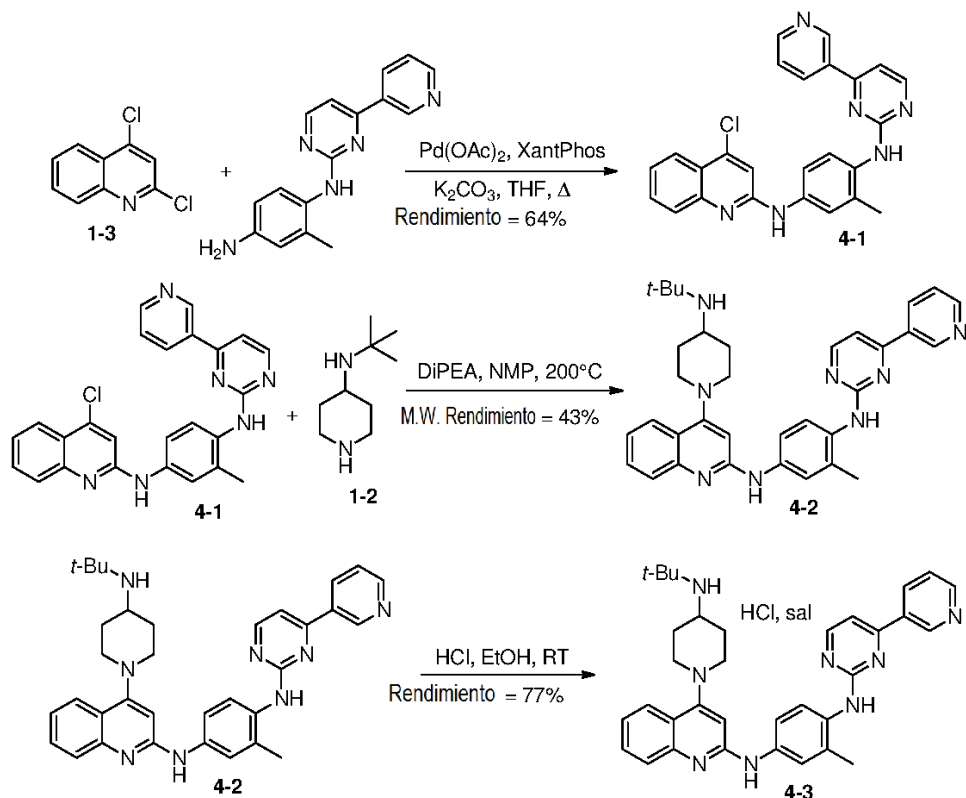


Se añadió una solución de HCl 3.0M en EtOH (290 μ l) gota a gota a 2-[4-(2-pirimidinilamino)-3-metil-fenilamino]-4-(4-tert-butilaminopiperidina-1-il)-quinolina (75 mg, 0,16 mmol). La mezcla resultante se filtró y se evaporó bajo presión reducida para dar 80 mg (rendimiento 93%) de un sólido correspondiente a sal de hidrocloruro 2-[4-(2-pirimidinilamino)-3-metil-fenilamino]-4-(4-tert-butilaminopiperidina-1-il)-quinolina.

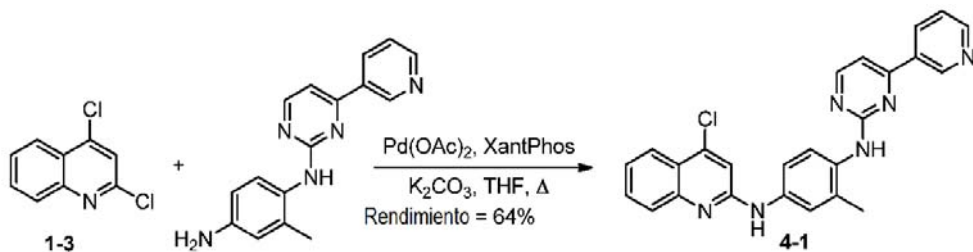
HPLC-MS: $t_r = 1,15$ min, (ES +) $C_{29}H_{35}N_7$ requerido 481; encontrado 482 [M + H], 426 [M-tBU + H]

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD + algunas gotas de DMSO-d_6)

4. Ejemplo 4: Preparación de sal de hidrocloruro 2-[3-metil-4-(pirimidin-2-ilamino)fenilamino]-4-(4-tert-butilaminopiperidina-1-il)-quinolina (4-3)



5 4.1. Síntesis de 2-[4-[4-(piridin-3-il)-2-pirimidinamino]-3-metil-fenilamino]-4-cloroquinolina (4-1)



Una solución de 2-metil-N1-[4-(piridina-3-il)-pirimidin-2-il]benceno-1,4-diamina (1,18 g, 4,26 mmol), 2,4-dicloroquinolina (767 mg, 3,87 mmol) en THF seco se añadió

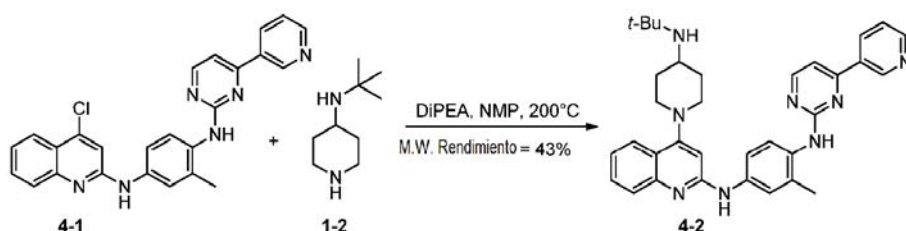
(11,9 ml) K_2CO_3 (2,7 g, 19,0 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó con nitrógeno durante 15 minutos. Luego, se añadieron el ligando de Xantphos (226 mg, 0,387 mmol) y $Pd(OAc)_2$ (44 mg, 0,19 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó por
 5 segunda vez durante 15 minutos. La mezcla de reacción se calentó finalmente a reflujo durante la noche. La mezcla de reacción se enfrió luego a RT y se concentró bajo presión reducida. El residuo se repartió entre agua y AcOEt y la capa acuosa se extrajo con AcOEt. Las capas orgánicas combinadas se
 10 secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía flash (gradiente ciclohexano/AcOEt de 10/0 a 0/10) para dar 1,08 g (rendimiento 64%) de un sólido de color pardo correspondiente a 2-{4-[4-(piridin-3-il)-2-pirimidinamino]-3-metil-fenilamino)-4-cloroquinolina.
 15

Masa: (ES+) $C_{25}H_{19}ClN_6$ requerido 438; encontrado 439 [M+H]

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD)

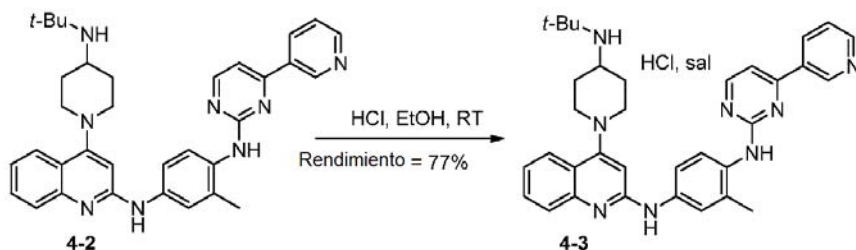
4.2. Síntesis de 2-{4-[4-(piridin-3-il)-2-pirimidinamino]3-metil-fenilamino}-4-(4-tert-butilaminopiperidina-1-il)-quinolina (4-2)

20



A una solución de 2-{4-[4-(piridin-3-il)-2-pirimidinamino]-3-metil-fenilamino}-4-cloroquinolina (1,0 g, 2,28 mmol) en NMP (10 ml) se añadió 4-tert-butilaminopiperidina (1,8 g, 11,0 mmol). La solución resultante se calentó durante 90 minutos a 200°C en un horno de microondas de laboratorio. La mezcla resultante se repartió entre agua y AcOEt y la capa acuosa se extrajo con AcOEt. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía flash (de AcOEt/DCM 3/2 después DCM / MeOH 9/1) para dar 1,01 g de un sólido amarillo que se recrystalizó en EtOH para dar 550 mg (rendimiento 43%) de un sólido de color blanco correspondiente a 2-{4-[4-(piridin-3-il)-2-pirimidinamino]3-metil-fenilamino}-4-(4-tert-butilaminopiperidina-1-il)-quinolina. HPLC-MS: t_r = 1,20 min, (ES +) C₃₄H₃₈N₈ requerido 558; encontrado 559 [M + H], 503 [M-tBU + H] ¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆)

4.3. Síntesis de sal de hidrocloreuro 2-{4-[4-(piridin-3-il)-2-pirimidinamino]3-metil-fenilamino}-4-(4-tert-butilaminopiperidina-1-il)-quinolina (4-3)



A una suspensión de 2-{4-[4-(piridin-3-il)-2-pyrimidinamino]3-metil-fenilamino}-4-(4-tert-butilaminopiperidina-1-il)-quinolina en EtOH (5,5 ml) se añadió gota a gota una solución
 5 3,0 M de HCl en EtOH (4 ml). El sólido amarillo formado se filtró y después se trituroó con ciclohexano. La suspensión se separó por filtración para dar 505 mg (rendimiento 77%) de un sólido blanco correspondiente a sal de hidrocloreuro 2-{4-[4-(piridin-3-il)-2-pyrimidinamino]3-metil-fenilamino}-4-(4-
 10 tert-butilaminopiperidina-1-il)-quinolina.

HPLC-MS: $t_r = 1,22$ min, (ES +) $C_{34}H_{38}N_8$ requerido 558; encontrado 559 [M + H], 503 [M-tFBU + H]
 1HNMR (300 MHz, CD_3OD + algunas gotas de $DMSO-d_6$) $^{13}CNMR$ (125 MHz, CD_3OD)

15 **5. Ejemplo 5: Perfil de la actividad de los compuestos 1-6, 2-3, 3-5 y 4-3 en MOLM-14, KG-1, MV4-11, A375, HCT-116, HepG2, Huh-7, MRC-5, MDA-MB-231, líneas de células ARPE-19 y células PBMC**

Cultivo de células: Todas las líneas celulares se mantuvieron
 20 en un medio que contiene 1% de penicilina-estreptomina (Dutscher, P06-07100) y 10% de suero bovino fetal (Gibco,

W3387L), excepto 20% para la línea celular KG-1 y PBMC, y se cultivaron a 37°C con 5% de CO₂.

HepG2, Huh7, HCT-116, MDA-MB-231 y las líneas de células A375 se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco
5 (Dutscher, L0103).

KG-1 y la línea celular MV4-11 se mantuvieron en medio de Dulbecco modificado por Iscove (Dutscher, L0190).

La línea celular MOLM-14 se mantuvo en medio MEM alfa (Gibco, 22561-021).

10 PBMC se mantuvo en un medio PMI 1640 (Dutscher, L0498).

La línea celular MRC-5 se mantuvo en MEM (Dutscher, L0416).

La línea celular ARPE-19 se cultivó en medio DMEM:F12 (Dutscher, L0093).

Ensayo de viabilidad celular: La viabilidad celular se midió
15 utilizando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo ® tal como se describe por el fabricante (Promega, Ref G7571) utilizando un luminómetro Infinito F200Pro (Tecan). En resumen, para las células adherentes, se sembraron células en 96 placas de pozo (blancas con fondo claro) en 90
20 µl de medios por pozo y se dejaron crecer durante la noche antes del ensayo. Para las células que crecen en suspensión, las células se sembraron en 96 placas de pozo inmediatamente antes del ensayo. El número de células sembradas por pozo se indica en la tabla 1 a continuación:

Tabla 1: Número de células sembradas por pozo para los ensayos de viabilidad celular

Entrada	Líneas celulares	Numero de células por pozo
1	HCT-116	2,000
2	A375	800
3	Huh7	10,000
4	HepG2	7,500
5	MOLM-14	10,000
6	KG-1	20,000
7	MV4-11	20,000
8	PBMC	10,000
9	MRC-5	5,000
10	ARPE-19	5,000
11	MDA-MB-231	10,000

5 Los compuestos se añadieron a diferentes concentraciones a cada pozo, y se incubaron cultivos celulares durante 72 h. El vehículo (H₂O) se utilizó como un control, y todos los compuestos se ensayaron en un porcentaje constante de H₂O. Después de la adición de 100 µl de CellTiter-Glo ®, la

10 luminiscencia se midió usando un F200Pro Infinito (Tecan). Los valores de EC₅₀ se determinaron como la dosis de compuesto

requerida para reducir los valores luminiscentes a 50% de la señal obtenida para los cultivos de células no tratadas. Los datos experimentales se analizaron mediante un programa de ordenador, Graphpad Prism v5 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA).

Todos los experimentos se realizaron al menos por duplicado y se repitieron dos veces independientemente.

Tabla 2: Ensayo de inhibición del crecimiento de la línea celular MOLM-14 en presencia de compuesto 1-6, 2-3, 3-5, 4-3

Compuestos	% de viabilidad celular de la línea celular MOLM-14	
	10 μ M	4 μ M
1-6	12.1	71.8
2-3	0.3	31.8
3-5	8.7	78.7
4-3	0.2	0.5

Tabla 3: Ensayo de inhibición del crecimiento de las líneas celulares MOLM-14, KG-1, MV4-11 y PBMC en presencia del compuesto 2-3

Células	MOLM-14	KG-1	MV4-11	PBMC
Descripción	Leucemia mieleoide aguda	Leucemia mielogeno sa aguda	Leucemia mielomonociti ca	Célula mononucle ar de

	FLT3-ITD Heterocigoto +/-	FLT3-ITD WT -/- fusiones FGFR1	bifenotípica B FLT3-ITD Homocigoto +/+	sangre periferal
EC ₅₀ (µM)	2.2	5.1	2.3	1.9

Tabla 4: Ensayo de inhibición del crecimiento de las líneas celulares A375, HCT-116, HepG2 y Huh-7 en presencia del compuesto 2-3

Líneas celulares	A375	HCT-116	HepG2	Huh-7
Descripción	Melanoma maligno	Carcinoma colorrectal	Carcinoma Hepatocelular	Carcinoma Hepatocelular
EC ₅₀ (µM)	1.0	1.6	0.9	1.7

5

Tabla 5: Ensayo de inhibición del crecimiento de líneas celulares MRC-5, MDA-MB-231 y ARPE-19 líneas en presencia del compuesto 2-3

Líneas celulares	MRC-5	MDA-MB-231	ARPE-19
-------------------------	--------------	-------------------	----------------

Descripción	Fibroblasto pulmonar de feto humano	Adenocarcinoma de seno	Epitelio pigmentado retinal humano
EC ₅₀ (μM)	≈3.4	2.0	≈6.9

Tabla 6: Ensayo de inhibición del crecimiento de líneas celulares MOLM-14, A375, HCT-116 y HepG2 en presencia del compuesto 4-3

Líneas celulares	MOLM-14	A375	HCT-116	HepG2
Descripción	Leucemia mieloide aguda	Melanoma maligno	Carcinoma colorrectal	Carcinoma Hepatocelular
EC ₅₀ (μM)	2.3	1.4	1.8	6.3

5

6. Ejemplo 6: ALDH + análisis de compartimento en línea celular MOLM-14

La línea celular MOLM-14 se cultivó en un medio MEM alfa suplementado con 10% v/v de suero bovino fetal, 1% penicilina-
10 estreptomycin y se mantuvo a 37°C con 5% de CO₂. 10.000 células se sembraron en 96 placas de pozo inmediatamente antes del ensayo.

Se añadió cada compuesto a diferentes concentraciones (combinaciones de seis concentraciones) a cada pozo, y se incubaron cultivos celulares durante 72 h. El vehículo (H₂O) se utilizó como un control, y todos los compuestos se ensayaron en un porcentaje constante de vehículo. El brote celular se midió utilizando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo[®] tal como se describe por el fabricante (Promega, ef G7571 Madison, WI, EE.UU.), utilizando un lector de placas Centro (Berthold, Francia).

En cada experimento, cada punto representa la media de triplicados en el cultivo celular.

Los datos experimentales se analizan usando un programa de ordenador, Graphpad Prism v5 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA) y los valores de EC₅₀ se determinaron como la dosis de compuesto requerida para reducir los valores de absorbancia al 50% de la señal obtenida para los cultivos celulares tratador por el vehículo.

El análisis del compartimiento de aldehído deshidrogenasa (ALDH) y el nivel de actividad alta de la actividad del aldehído deshidrogenasa (ALDH⁺) se utilizó para detectar la población de células iniciadoras de tumores (células madre de cáncer, CSC). El ensayo kit Aldefluor[™] (StemCell Technologies, 01700) permitido para evaluar la actividad de los fármacos sobre las células CSC como en una población de línea celular de leucemia

mieloide aguda MOLM-14 (ref: Storms, RW, Trujillo, AP, Springer, JB, Shah, L., Colvin, OM, Ludeman, SM, & Smith, C. (1999). El aislamiento de células progenitoras hematopoyéticas humanas primitivas sobre la base de la actividad de aldehído deshidrogenasa. Las actas de la Academia Nacional de Ciencias, 96 (16), 9118-9123). El ensayo kit Aldefluor™ se utilizó de acuerdo con el procedimiento descrito por el fabricante. Brevemente, la línea celular MOLM-14 se cultivó en un medio MEM alfa suplementado con 10% v/v de suero bovino fetal, 1% penicilina-estreptomicina y se mantuvo a 37°C con 5% de CO₂. 5.10⁵ células se utilizaron en este ensayo. Se añadió cada compuesto a diferentes concentraciones (véase la tabla 8), y se incubaron cultivos celulares durante 72 h. El vehículo (H₂O) se utilizó como un control, y todos los compuestos se ensayaron en un porcentaje constante de vehículo. Las células obtenidas del cultivo de células se incubaron durante 45 minutos a 37°C con tampón de ensayo Aldefluor™ que contiene el aminoacetaldehído Bodipy™, un sustrato de ALDH aldehído fluorescente. El ALDH convierte el BAAA sustrato fluorescente a la Bodipy™ ácido -aminoacético (BAA) que está retenido en la célula. Un inhibidor de eflujo activo está presente en el tampón de ensayo Adelfluor™ con el fin de evitar la salida activa de la célula del producto del sustrato ALDH dependiente del BAA convertido. La señal fluorescente es directamente

proporcional a la actividad ALDH en las células y se mide por citometría de flujo. Un control negativo se utiliza para medir el nivel de fondo de fluorescencia. Para tal propósito, se utilizó 4-(N,N-dietilamino) benzaldehído (DEAB) como inhibidor de la ALDH selectiva. Un recuento de células de viabilidad se realizó utilizando el Kit de Tinción Muerte Celular Roja Lejana Corregible LIVE/DEAD® (Invitrogen). Los datos experimentales son analizados utilizando un programa de ordenador, Graphpad Prism v5 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA) y los valores de EC₅₀ se determinaron como la dosis de compuesto requerida para reducir los valores de absorbancia al 50% de la señal obtenida para los cultivos celulares tratados con el vehículo.

Tabla 7: Ensayo de inhibición del crecimiento de la línea celular MOLM-14 en presencia de Citarabina y el compuesto 2-3

Compuestos	Citarabina	2-3 ^a
EC ₅₀ (μM)	0.290	2.2

^a: los EC₅₀ fueron obtenidos a partir del método descrito en el ejemplo, 5 véase la tabla 3

Tabla 8: la población ALDH disminuye en la línea celular MOLM-14 por el compuesto 2-3 usando el ensayo de kit Aldefluor™

Compuestos	Control	Citarabina		2-3		
		1 μM	3 μM	2.5 μM	5.0 μM	7.5 μM

Aldeflour™						
positivo	100	130	116	100	80	20
CSCs (%)						

7. Ejemplo 7: Ensayo de inhibición del crecimiento (EC_{50} μ M) de la línea celular Hep3B-Luc en presencia del compuesto 2-3

Antes del tratamiento del compuesto, el compuesto se disolvió en H₂O para hacer una solución madre de 10 mM. Las soluciones de trabajo (concentraciones finales de 5 pliegues) a continuación se prepararon con un medio MEM (Gibco, 1.128.319) que contiene 10% de suero bovino fetal (Gibco, 10099141).

Al realizar la prueba de ensayo, la dosis respuesta de la doxorubicina en la línea celular BEL-7402 (carcinoma hepatocelular primario humano) se utilizará como control interno en cada placa de ensayo para el ensayo. El medio MEM suplementado con 5% de H₂O (5x) será añadido en las células como controles negativos. La concentración final de H₂O fue del 1% en cada pozo.

La línea celular Hep3B-Luc (línea celular de carcinoma de hígado humano luciferasa transfectada para el modelo de tumor ortotópico) se cultivó en un medio MEM suplementado con 10% v/v de suero bovino fetal (FBS), 1% de penicilina-estreptomicina y se mantuvo a 37°C con 5% de CO₂. 800 células

se sembraron en 384 pozos planos blancos de fondo transparente (Corning, 3707).

Procedimiento del ensayo: Las células en fase logarítmica se recogieron y se contaron. Las suspensiones celulares se añadieron a cada pozo de las 384 placa de pozos a 800 células por pozo (volumen total 40 μ l). Los pozos de margen se llenan con tampón de PBS. El compuesto de ensayo a diversas concentraciones se añaden en duplicados (añadir 10 μ l 5x de soluciones de compuesto a la placa). La placa de ensayo se incuba durante 72h a 37°C/5% de CO₂ en una incubadora. La viabilidad celular se midió utilizando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® tal como se describe por el fabricante (Promega, G7571 ef). Después de la adición de 100 μ l de la solución CellTiter-Glo®, se midió la luminiscencia usando un luminómetro Pherastar Plus. Se registraron los datos por medio de Pherastar Plus. La adquisición y análisis de los datos se realizaron utilizando el programa Microsoft Excel y el software GraphPad Prism v.6.

Tabla 9: Ensayo de inhibición del crecimiento de la línea celular Hep3B-Luc en presencia del compuesto 2-3

Compuestos	Dexorubicina	2-3
Líneas celulares	BEL-7402	Hep3B-Luc
EC ₅₀ (μ M)	0.15	1.1

8. Ejemplo 8: Ensayo de inhibición del crecimiento (EC_{50} μM) de las líneas celulares CAKI-1 Y 786-0 en presencia del compuesto

2-3

Cultivo de células: las líneas celulares CAKI-1 y 786-0 se mantuvieron en un medio RPMI 1640 (Dutscher, L0498) que contiene 1% de penicilina-estreptomicina (Dutscher, P06-07100) y 10% de suero bovino fetal (Gibco, W3387L) y se cultivaron a 37°C con 5% de CO₂.

Medidas de viabilidad celular: se midió la viabilidad celular utilizando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® tal como se describe por el fabricante (Promega, Ref G7571) utilizando un luminómetro Infinito F200Pro (Tecan). Brevemente, se sembraron células en 96 placas de pozos (blanco con fondo claro) en 90 μl de medio por pozo y se dejaron crecer durante la noche antes del ensayo. El número de células sembradas por pozo se indica en la siguiente tabla:

Tabla 10: Número de células sembradas por pozo para los ensayos de viabilidad celular de CAKI-1 y 786-0

	Número de células por pozo
CAKI-1	2250
786-0	1250

Los compuestos 2-3 y dos compuestos de referencia (sorafenib y sunitinib) se añadieron a diferentes concentraciones a cada pozo, y se incubaron cultivos celulares durante 72 h. Para el análisis del compuesto 2-3, se utilizó H₂O como control negativo (= sin tratar) y todas las concentraciones se ensayaron en un porcentaje constante de H₂O. Para el análisis de Sorafenib y sunitinib, DMSO se usó como un control negativo (= sin tratar) y todas las concentraciones fueron probadas en un porcentaje constante de DMSO. 72h después de la incubación de los compuestos, 100 µl de CellTiter-Glo ® se añadieron a cada pozo y se midió la luminiscencia usando un F200Pro Infinito (Tecan). Los valores de EC₅₀ se determinaron como la dosis de compuesto requerida para reducir los valores luminiscentes a 50% de la señal obtenida para los cultivos de células no tratadas. Los datos experimentales se analizaron mediante un programa de ordenador, Graphpad Prism v5 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA). Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado y se repitieron al menos tres veces independientemente.

Tabla 11: Ensayo de inhibición del crecimiento de la línea celular CAKI-1 en presencia del compuesto de 2-3 y Sorafenib, Sunitinib como controles

Compuestos	EC ₅₀ (µM)	SD
2-3	1.4	0.1

Sofarenib	4.5	1.5
Sunitinib	1.7	0.7

Tabla 12: Ensayo de inhibición del crecimiento de la línea celular 786-0 en presencia del compuesto 2-3 y Sorafenib, Sunitinib como controles

Compuestos	EC ₅₀ (μ M)	SD
2-3	2.1	0.2
Sofarenib	6.8	1.7
Sunitinib	6.0	1.1

5

9. Ejemplo 9: Efecto in vitro del compuesto 2-3 en las células de cáncer de colon metastásico del hígado y subpoblación de células madre de cáncer de colon

El objetivo de este estudio fue evaluar in vitro la actividad
10 citotóxica del compuesto 2-3 contra las células derivadas de
pacientes de cáncer de colon metastásico de hígado recién
aisladas de pacientes y más específicamente en la subpoblación
de células madre cancerosas. Algunos métodos están actualmente
disponibles para realizar el seguimiento in vitro del CSC. Por
15 ejemplo, la actividad del aldehído deshidrogenasa (ALDH) se
puede utilizar como un marcador para identificar las células
madre humanas cancerosas en el cáncer de colon. Además, el CSC
puede ser enriquecido mediante el cultivo de células en

suspensión en un medio libre de suero suplementado con factores de crecimiento. En tales condiciones, solamente las CSC crecieron como clones tridimensionales multicelulares denominadas "tumoroesferas". Al tomar la ventaja de la capacidad de formación de las tumoroesferas, entonces podemos estimar la cantidad de células madre cancerosas en la muestra y por lo tanto evaluar el efecto de una molécula dada en la capacidad CSC de auto-renovación.

Cultivo de células tumorales derivadas de los pacientes

Las células de metástasis hepática derivadas del paciente (CPP19, 30, 36 y CPP45- véase la tabla 1 para las descripciones clínicas) se mantuvieron en DMEM completo (Gibco) con 10% de FBS. Las células se obtuvieron de biopsias proporcionadas por CHU-Caremeau (Nimes, Francia) dentro de un protocolo aprobado.

Los consentimientos informados firmados se obtuvieron de los pacientes antes de la adquisición de las muestras de acuerdo con todos los aspectos éticos y legales. Los tumores se lavaron, se desmenuzaron en fragmentos ($<2 \text{ mm}^3$) y se digirieron con Liberasa H (0.26U / ml, Roche), se re-suspendieron en Accumax (Sigma-Aldrich). Después de 2 horas a 37°C , la suspensión celular se filtró a través de una malla de $40 \mu\text{m}$ para obtener una única suspensión celular y se sembró en un medio DMEM, suplementado con FBS, glutamina, antibióticos y aminoácidos no esenciales. Cuando se formó una monocapa de

células tumorales derivadas del paciente, las células se separaron usando tripsina/EDTA y se resuspendieron en DMEM con 10% de FBS (para células adherentes) o medio M11 definido (para la formación de esfera). Las células se cultivaron en una
5 atmósfera humidificada a 37°C y 5% de CO₂.

Ensayos de toxicidad in vitro

Las células se sembraron en placas a 10⁴ células por pozo en placas de pozos P96 en DMEM con 10% de FBS. Después de 24 horas, las células se trataron con el compuesto 2-3 y la
10 viabilidad celular se evaluó 72 h post-tratamiento por medio del ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (Promega). Los EC₅₀ fueron calculados utilizando GraphPad Prism Software v6 (GraphPad Software, Inc La Jolla, CA).

Ensayo Aldefluor™ y clasificación de células activadas por 15 fluorescencia (FACS)

El ensayo Aldefluor™ (Stem Cell Technologies, 01700) se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Stem Cell Technologies). Las células ALDH^{positivas} se identificaron mediante la comparación de la misma muestra con y sin el
20 inhibidor de dietilaminobenzaldehído ALDH (DEAB). La entrada de FACS de la actividad de ALDH se fijó en 0,1% en presencia de DEAB. Las células se analizaron usando MACSQuant y los datos se analizaron mediante el software Cyflogic. Las células CPP36

no fueron utilizadas en estos análisis debido a su alto perfil de autofluorescencia celular.

Ensayos de formación de esfera

Se determinó la evaluación de la célula formadora de esfera después de la siembra de 500 células/200 µl de pozo en un medio M11 en pozos P96 en placas de fijación ultra-bajas (Corning). M11 es un medio DMEM/F12 (1:1) Gibco), suplementado con N2, glutamina 3 mM, glucosa 0,6%, insulina 4 g/ml (Sigma-Aldrich), HBasic-FGF 10 ng/ml (R & D Systems), y hEGF 20 ng / ml (R & D Systems). Las esferas de tamaño superior a 50 µm se contaron después de 10 días y se representan en el número de esferas por campo de imagen. Las células CPP45 no fueron utilizados en estos análisis debido a su incapacidad para formar tumoroesferas.

15 Análisis estadístico

Para cada experimento, los datos se muestran como medio SEM de tres experimentos independientes. Se utilizó GraphPad Prism Software v6 (GraphPad Software, Inc La Jolla, CA) para el análisis de datos, es decir, pruebas t de los estudiantes.

20 Tabla 13: Características clínicas de los pacientes de cáncer de colon

	CPP19	CPP30	CPP36	CPP45
Género	M	M	M	M
Edad	65	69	81	80

Mutación	KRAS	Ninguna	KRAS	KRAS
Clasificación TNM	T3N2am1	TxNxM1	T4N2bM1	T3N1cM1
Radioterapia	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Quimioterapia	Bevacizumab, folfiri	Bevacizumab Folfox, Folfiri Xelox	Bevacizumab y folfiri	Ninguna

• Evaluación in vitro de la citotoxicidad del compuesto 2-3 en células derivadas del paciente con cáncer colorrectal metastático del hígado (CRC)

5 El ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo®, como se describe por el fabricante (Promega, Ref G7571), se utilizó para determinar la citotoxicidad del compuesto 2-3 en las células derivadas de pacientes de CRC metastásicas hepáticas. La viabilidad celular de las células control no

10 tratadas se fijó en 100%. Las células se sembraron primero a una densidad de 10.000 células/100µL por pozo en placas P96 y se incubaron en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ a 37°C durante 24 horas. Las células fueron luego incubadas con disolvente (0,1% de DMSO, células de control sin tratar) o el

15 aumento de concentración del compuesto 2-3. Después de 72 horas

de incubación a una concentración que varía de 0,1 a 30 μM , el compuesto 2-3 demostró actividades citotóxicas de respuesta de dosis contra cuatro células derivadas del paciente CRC diferentes establecidas a partir de biopsias de metástasis de hígado fresco (Tabla 14).

Tabla 14: Ensayo de inhibición del crecimiento en células derivadas de pacientes de CRC metastásicas hepáticas en presencia del compuesto 2-3

CRC ID	CPP19	CPP30	CPP36	CPP45
EC ₅₀ (μM)	1.88	1.22	1.45	1.12

• ***Evaluación in vitro del compuesto 2-3 en células positivas Aldefluor™ a partir de células derivadas de pacientes de CRC metastásicas hepáticas***

Las células se sembraron primero a una densidad de 250.000 células/1000 μL por pozo en placas P96 y se incubaron en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ a 37°C durante 24 horas. Las células fueron incubadas con disolvente (0,1% de DMSO) o el aumento de concentración de compuesto 2-3 durante 72 horas. Se tripsinizaron las células, se recogieron, y se lavaron. Las partículas acelulares y las células muertas se excluyeron sobre la base de baja dispersión de luz y la positividad de mancha de células muertas Sytox Blue (Life Technologies) usando un citómetro de flujo MACSQuant (Miltenyi Biotec). El porcentaje

de células ALDH^{brillante}, se cuantificó luego usando el ensayo de Aldefluor™ (StemCell Technologies, 01700). El inhibidor de ALDH, dietilaminobenzaldehído (DEAB), se añadió para asegurar la identificación precisa de las células ALDH-positivas. Cuando se aplicó el inhibidor DEAB de ALDH, se redujo la fluorescencia (movido a la izquierda) y una puerta se elaboró para delinear el límite superior de estas células. Esta puerta se utiliza para seleccionar la subpoblación de alta tinción de ALDH. Como se muestra, después de 72 horas de incubación a una concentración que varía de 1 a 3 μ M, el compuesto 2-3 demuestra una disminución significativa ($p < 0,001$) y actividades citotóxicas de dosis-respuesta en contra de la subpoblación de células positiva Aldefluor™ en tres células derivadas de pacientes de CRC diferentes establecidas a partir de biopsias de metástasis de hígado fresco (Figura 1).

• El compuesto 2-3 bloquea la formación de tumoroesferas de células derivadas de pacientes de CRC metastásicas hepáticas.

La formación in vitro de tumoroesferas es ampliamente utilizada para identificar la presencia de células madre de cáncer (CSC) en tumores sólidos o poblaciones de células heterogéneas, ya que sólo estas células tienen la capacidad de auto-renovación. Se utilizó este ensayo como medida funcional de la frecuencia de CSC y la viabilidad, y examinamos la capacidad de las células del paciente derivadas de la metástasis de hígado para formar

tumoroesferas después del tratamiento con el compuesto 2-3. Para este propósito, las células se cultivaron primero en el matraz de cultivo de tejidos con medio DMEM completo con suero bovino fetal (FBS) como una monocapa hasta llegar cerca de la confluencia. Se tripsinizaron las células, se recogieron, se lavaron para eliminar el FBS y se pasaron a través de una malla de filtro de células de 40 μm . A continuación, la suspensión de una sola célula se cultivó en un medio CSC (es decir, un medio M11) que consiste en DMEM-F12 suplementado con 20 ng / ml de EGF, 20 ng / ml de bFGF y suplemento N2 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) en una placa de fijación ultra-baja P96 (Corning Life Sciences, Tewksbury, MA). Las células se sembraron a una densidad de 500 células/100 μL por pozo y se incubaron en una atmósfera humidificada con 5% de CO_2 a 37°C. Para determinar el efecto del compuesto 2-3 en la eficiencia de formación de tumoroesfera y el tamaño de la esfera, el compuesto 2-3 se añadió a dos concentraciones (0,3 μM o 3 μM) 24 horas después de la siembra en un volumen final de 200 μl de M11. Diez días más tarde, las placas se examinan para la formación de tumoroesfera (> 50 μm) usando un microscopio invertido. Se tomaron imágenes de contraste invertido y el tamaño de la esfera y el número se midieron y se contaron a partir de las imágenes manualmente. Como se muestra en la figura 2, el compuesto 2-3 indujo una disminución

drástica y dependiente de la dosis en la formación de tumoroesfera en las tres células derivadas del paciente CRC probadas, aisladas de metástasis hepáticas (CPP19, CPP30 y CPP36). De hecho, la eficacia de la formación de tumoroesfera se suprimió significativamente por 3 μ M del compuesto 2-3. En contraste, el tamaño de las tumoroesferas no disminuyó estadísticamente por el tratamiento, excepto a 3 μ M en células CPP19 ($p = 0,02$).

Ejemplo 10: Ensayo de inhibición del crecimiento (EC_{50} μ M) de la célula derivada del paciente de carcinoma Hepatocelular (HCC) en presencia del compuesto 2-3

Las células de carcinoma hepatocelular (HCC) derivadas del paciente se obtuvieron después de consentimiento informado por escrito bajo la aprobación de la junta de revisión institucional CrownBio y bajo el estricto cumplimiento de la declaración de Helsinki sobre la investigación médica en seres humanos.

Las células de carcinoma hepatocelular (HCC) derivadas del paciente se mantuvieron en un medio descrito respectivamente en la Tabla 15 que contenía penicilina-estreptomicina al 1% (Life Technologies, 15070-063), con suplementos para cultivo celular primario (PCS) que contienen hidrocortisona (50 nM), Factor de Crecimiento epidérmico (20 ng / ml), Factor de crecimiento de β -fibroblastos (10 ng / ml), heparina (2 g /

ml) ITS suplemento medio líquido (1X) y de aminoácidos no esenciales (NEAA, 0,01 mM, IX). La célula primaria se cultivó en una atmósfera humidificada (95% de humedad relativa) con 5% de CO₂ a 37°C.

5 **Tabla 15: medio de cultivo y condiciones de cultivo para las células de carcinoma hepatocelular (HCC) derivadas del paciente**

Entrada	Célula primaria	Medio de cultivo	Condición del cultivo
1	LI0050	DMEM/F12 + 10% FBS+PCS	37°C, 5% CO ₂ , 95% humedad relativa
2	LI0574	DMEM/F12 + 10% FBS+PCS	37°C, 5% CO ₂ , 95% humedad relativa
3	LI0612	DMEM/F12 + 10% FBS+PCS	37°C, 5% CO ₂ , 95% humedad relativa
4	LI0752	DMEM/F12 + 10% FBS+PCS	37°C, 5% CO ₂ , 95% humedad relativa
5	LI0801	DMEM/F12 + 10% FBS+PCS	37°C, 5% CO ₂ , 95% humedad relativa

6	LI1005	DMEM/F12 + 10% FBS+PCS	37°C, 5% CO ₂ , 95% humedad relativa
7	LI1098	DMEM/F12 + 10% FBS+PCS	37°C, 5% CO ₂ , 95% humedad relativa
8	LI1646	DMEM/F12 + 10% FBS+PCS	37°C, 5% CO ₂ , 95% humedad relativa

El ensayo de inhibición del crecimiento celular se realizó como se ha descrito previamente en el Ejemplo 5 utilizando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® tal como se describe por el fabricante (Promega, G7571 ef). El número de células sembradas por pozo (en 96 Microplacas negras de fondo claro planas de pozo, Cat # 3340, Corning ®) se describe en la tabla 16. Una pegatina negra (Cat # 6005189, Perkin Elmer) se colocó a la parte inferior de cada placa antes de grabar la luminiscencia CellTiter-Glo®.

Tabla 16: Número de células sembradas por pozo para los ensayos de viabilidad de célula derivada del paciente HCC

Entrada	Célula primaria	Medio de cultivo
1	LI0050	2,500

2	LI0574	3,000
3	LI0612	4,000
4	LI0752	3,500
5	LI0801	2,500
6	LI1005	2,500
7	LI1098	2000
8	LI1646	2000

Los datos experimentales se analizan usando un programa de ordenador, Graphpad Prism V 5.0 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA) y de los valores de EC_{50} se determinaron como la

5 dosis de compuesto requerida para reducir los valores de absorbancia al 50% de la señal obtenida para los cultivos de células tratados con el vehículo y fueron una media de al menos tres experimentos independientes.

Después de 72 horas de incubación, el compuesto 2-3 demostró

10 actividades citotóxicas de respuesta a la dosis contra ocho diferentes células derivadas del paciente HCC (véase la tabla 17).

Tabla 17: Ensayo de inhibición del crecimiento en las células derivadas del paciente de carcinoma hepatocelular (HCC) en

15 **presencia de compuesto 2-3, Sorafenib y Cisplatin**

		EC₅₀ (μM)		
Entrada	Células derivadas de pacientes HCC	2-3	Sorafenib	Cisplatin
1	LI0050	3.5	9.1	1.3
2	LI0574	2.4	8.7	3.6
3	LI0612	6.9	17.9	16.3
4	LI0752	0.5	6.3	2.6
5	LI0801	2.1	5.7	1.5
6	LI1005	3.2	14.5	5.9
7	LI1098	7.0	10.9	5.1
8	LI1646	1.4	10.3	10.0