

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 456 966**

51 Int. Cl.:

C07D 471/04 (2006.01)

C07D 498/04 (2006.01)

C07D 513/04 (2006.01)

A61K 31/4353 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2008 E 08849376 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 2227469**

54 Título: **Inhibidores de MAPK/ERK cinasa**

30 Prioridad:

12.11.2007 US 987279 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.04.2014

73 Titular/es:

**TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED
(100.0%)
1-1, DOSHOMACHI 4-CHOME CHUO-KU
OSAKA- SHI, OSAKA 541-0045, JP**

72 Inventor/es:

**ADAMS, MARK E.;
DONG, QING;
KALDOR, STEPHEN W.;
KANOUNI, TOUFIKE;
SCORAH, NICHOLAS y
WALLACE, MICHAEL B.**

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 456 966 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de MAPK/ERK cinasa

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a compuestos que pueden usarse para inhibir proteínas cinasas activadas por mitógeno (también conocidas como MEK y MAPK/ERK cinasas), tales como la proteína cinasa cinasa activada por mitógeno 1 (también conocida como MAPKK1, MAPK/ERK cinasa 1 y MEK1) y la proteína cinasa cinasa activada por mitógeno 2 (también conocida como MAPKK2, MAPK/ERK cinasa 2 y MEK2), así como a composiciones de la materia, kits y artículos de fabricación que comprenden estos compuestos. La invención también se refiere a compuestos según la presente invención para su uso como medicamentos. Los métodos de preparación de los compuestos de la presente invención, así como los productos intermedios útiles en tales métodos, se describen en el presente documento.

Antecedentes de la invención

Las rutas de señalización de proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) están implicadas en acontecimientos celulares tales como crecimiento, diferenciación y respuestas al estrés (J. Biol. Chem. (1993) 268, 14553-14556). Se han identificado cuatro rutas de MAPK paralelas hasta la fecha: ERK1/ERK2, JNK, p38 y ERK5. Estas rutas son cascadas de cinasa lineales en las que MAPKKK fosforila y activa MAPKK y MAPKK fosforila y activa MAPK. Hasta la fecha, se han identificado siete homólogos de MAPKK (MEK1, MEK2, MKK3, MKK4/SEK, MEK5, MKK6 y MKK7) y cuatro familias de MAPK (ERK1/2, JNK, p38 y ERK5). La activación de estas rutas regula la actividad de varios sustratos mediante fosforilación. Estos sustratos incluyen: factores de transcripción tales como TCF, c-myc, ATF2 y los componentes de AP-1, fos y Jun; componentes de superficie celular EGF-R; componentes citosólicos incluyendo PHAS-I, p90^{rk}, cPLA₂ y c-Raf-1; y componentes del citoesqueleto tales como tau y MAP2. Las cascadas de señalización de MAPK están implicadas en el control de procesos celulares incluyendo proliferación, diferenciación, apoptosis y respuestas al estrés.

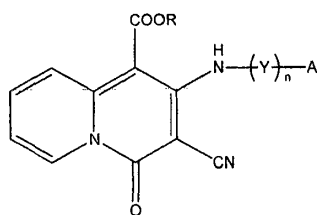
De las rutas de señalización de MAPK conocidas, la ruta RAF-MEK-ERK media en la señalización proliferativa y anti-apoptótica a partir de factores de crecimiento y factores oncogénicos tales como fenotipos mutantes de Ras y Raf que promueven el crecimiento, la progresión y la metástasis tumorales. En virtud de su papel fundamental mediando en la transmisión de señales que promueven el crecimiento a partir de múltiples receptores de factor de crecimiento, la ruta RAF-MEK-ERK proporciona dianas moleculares con aplicaciones terapéuticas potencialmente amplias en, por ejemplo, trastornos hiperproliferativos cancerosos y no cancerosos, inmunomodulación e inflamación.

MEK ocupa una posición posterior estratégica en la ruta RAF-MEK-ERK que cataliza la fosforilación de sus sustratos de MAPK, ERK1 y ERK2. Anderson *et al.* "Requirement for integration of signals from two distinct fosforilation pathways for activation of MAP kinase." Nature 1990, vol. 343, págs. 651-653. En la ruta de ERK, MAPKK se corresponde con MEK (MAP cinasa ERK cinasa) y MAPK se corresponde con ERK (cinasa regulada por señales extracelulares). No se han identificado sustratos para MEK distintos de ERK1 y ERK2. Seger *et al.* "Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells." J. Biol. Chem., 1992, vol. 267, págs. 14373-14381. Esta estrecha selectividad, además de la capacidad única para actuar como cinasa de especificidad doble, concuerda con el papel fundamental de MEK en la integración de señales en la ruta de MAPK. También parece que MEK se asocia fuertemente con MAP cinasa antes de fosforilarla, lo que sugiere que la fosforilación de MAP cinasa por MEK puede requerir una fuerte interacción anterior entre las dos proteínas. Puede encontrarse que tanto este requisito como la especificidad inusual de MEK sugieren que puede tener suficientes diferencias en su mecanismo de acción con respecto a otras proteínas cinasas que los inhibidores selectivos de MEK, funcionado posiblemente mediante mecanismos alostéricos en vez de mediante el bloqueo habitual del sitio de unión a ATP.

La acción constitutiva de MAPK se ha notificado en >30% de las líneas celulares de tumor primario incluyendo líneas celulares derivadas de colon, pulmón, mama, páncreas, ovario y riñón. Hoshino *et al.* "Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors." Oncogene, 1999, vol. 18, págs. 813-822. Se han detectado concentraciones superiores de MAPK/ERK activa (pMAPK/pERK) en tejido tumoral en comparación con tejido adyacente normal. Sivaraman *et al.* "Hyperexpression of mitogen-activated protein kinase in human breast cancer." J. Clin. Invest., 1997, vol. 99, págs. 1478-1483.

Existe una necesidad continuada de encontrar nuevos agentes terapéuticos para tratar enfermedades humanas. Las MAPK/ERK cinasas, específicamente pero sin limitarse a MEK1 y MEK2, son dianas especialmente atractivas para el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos debido a su importante papel en trastornos hiperproliferativos cancerosos (por ejemplo, cáncer de cerebro, de pulmón, de células escamosas, de vejiga, gástrico, pancreático, de mama, de cabeza, de cuello, renal, de riñón, de ovario, de próstata, colorrectal, de próstata, de colon, epidermoide, esofágico, testicular, ginecológico o de tiroides); trastornos hiperproliferativos no cancerosos (por ejemplo, hiperplasia benigna de la piel (por ejemplo, psoriasis), reestenosis e hipertrofia prostática benigna (BPH));

pancreatitis; enfermedad renal; dolor; impedir la implantación del blastocito; tratar enfermedades relacionadas con vasculogénesis o angiogénesis (por ejemplo, angiogénesis tumoral, enfermedad inflamatoria aguda y crónica tal como artritis reumatoide, aterosclerosis y enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedades cutáneas tales como psoriasis, eccema y esclerodermia, diabetes, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, degeneración macular asociada a la edad, hemangioma, glioma, melanoma, sarcoma de Kaposi y cáncer de ovario, de mama, de pulmón, pancreático, de próstata, de colon y epidermoide); asma; quimiotaxis de neutrófilos; choque séptico; enfermedades mediadas por células T en las que la supresión inmunitaria podría ser valiosa (por ejemplo, la prevención de rechazo de trasplantes de órganos, enfermedad de injerto contra huésped, lupus eritematoso, esclerosis múltiple y artritis reumatoide); estados en los que el influxo de neutrófilos dirige la destrucción de tejidos (por ejemplo, lesión por reperfusión en infarto de miocardio y accidente cerebrovascular y artritis inflamatoria); aterosclerosis; inhibición de respuestas de queratinocitos a cócteles de factores de crecimiento; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y otras enfermedades. El documento US 4935425 proporciona derivados de 4H-quinolizin-4-ona novedosos representados por la fórmula:



en la que R es un grupo alquilo o un grupo fenilalquilo; Y es un grupo alquilenos; n es cero o 1; A es un anillo heterocíclico aromático de 5 ó 6 miembros sustituido o no sustituido, un grupo cicloalquilo de 3 a 7 miembros sustituido o no sustituido o un anillo heterocíclico saturado de 5 a 7 miembros sustituido o no sustituido. Se expone que los compuestos presentan actividades inhibitoras selectivas frente a la formación de IgE y son útiles en el tratamiento de asma bronquial alérgica, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad y similares.

El documento US 2005/250782 da a conocer inhibidores de MEK útiles en el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas tales como cáncer.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a compuestos que tienen actividad para inhibir MAPK/ERK cinasas. La presente invención también proporciona composiciones, artículos de fabricación y kits que comprenden estos compuestos, así como compuestos según la presente invención para su uso como medicamentos. Los métodos de preparación de los compuestos de la presente invención, así como productos intermedios útiles en tales métodos, se describen en el presente documento.

En una realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de MEK según la presente invención como principio activo. Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden comprender opcionalmente el 0,001%-100% de uno o más inhibidores de esta invención. Estas composiciones farmacéuticas pueden administrarse o coadministrarse por una variedad de vías, incluyendo por ejemplo, por vía oral, por vía parenteral, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía intraarterial, por vía transdérmica, por vía sublingual, por vía intramuscular, por vía rectal, por vía transbucal, por vía intranasal, por vía liposomal, mediante inhalación, por vía vaginal, por vía intraocular, mediante administración local (por ejemplo mediante catéter o endoprótesis), por vía subcutánea, por vía intraadiposa, por vía intraarticular o por vía intratecal. Las composiciones también pueden administrarse o coadministrarse en formas farmacéuticas de liberación lenta.

La invención también se refiere a kits y otros artículos de fabricación para tratar estados patológicos asociados con MEK.

En una realización, se proporciona un kit que comprende una composición que comprende al menos un inhibidor de MEK de la presente invención en combinación con instrucciones. Las instrucciones pueden indicar el estado patológico para el que debe administrarse la composición, información de almacenamiento, información de dosificación y/o instrucciones que se refieren a cómo administrar la composición. El kit también puede comprender materiales de acondicionamiento. El material de acondicionamiento puede comprender un envase para alojar la composición. El kit también puede comprender opcionalmente componentes adicionales, tales como jeringuillas para la administración de la composición. El kit puede comprender la composición en formas de dosis individuales o múltiples.

En otra realización, se proporciona un artículo de fabricación que comprende una composición que comprende al menos un inhibidor de MEK de la presente invención en combinación con materiales de acondicionamiento. El material de acondicionamiento puede comprender un envase para alojar la composición. El envase puede comprender opcionalmente una etiqueta que indica el estado patológico para el que debe administrarse la

composición, información de almacenamiento, información de dosificación y/o instrucciones que se refieren a cómo administrar la composición. El kit también puede comprender opcionalmente componentes adicionales, tales como jeringuillas para la administración de la composición. El kit puede comprender la composición en formas de dosis individuales o múltiples.

5 También se describen métodos para preparar compuestos, composiciones y kits según la presente invención. Por ejemplo, se describen varios esquemas sintéticos en el presente documento para sintetizar compuestos según la presente invención.

10 También se describen métodos para usar compuestos, composiciones, kits y artículos de fabricación según la presente invención.

Los compuestos, composiciones, kits y artículos de fabricación se usan para inhibir la actividad de MEK y/o ERK. En particular, los compuestos, composiciones, kits y artículos de fabricación pueden usarse para inhibir la actividad de MEK1. Además, los compuestos, composiciones, kits y artículos de fabricación pueden usarse para inhibir la actividad de MEK2. Además, los compuestos, composiciones, kits y artículos de fabricación pueden usarse para inhibir la actividad de ERK1. Además, los compuestos, composiciones, kits y artículos de fabricación pueden usarse para inhibir la actividad de ERK2.

20 Los compuestos, composiciones, kits y artículos de fabricación se usan para tratar un estado patológico para el que MEK y/o ERK presentan actividad que contribuye a la patología y/o sintomatología del estado patológico.

En otra realización, se proporciona un compuesto según la presente invención para su uso como medicamento.

25 Se indica con respecto a todas las realizaciones anteriores que la presente invención pretende abarcar todas las formas ionizadas (por ejemplo, sales) y solvatos (por ejemplo, hidratos) farmacéuticamente aceptables de los compuestos, independientemente de si tales formas ionizadas y solvatos están especificados, puesto que en la técnica se conoce bien la administración de agentes farmacéuticos en forma ionizada o solvatada. También se indica que a menos que se especifique una estereoquímica particular, se prevé que la mención de un compuesto abarque todos los posibles estereoisómeros (por ejemplo, enantiómeros o diastereómeros dependiendo del número de centros quirales), independientemente de si el compuesto está presente como un isómero individual o una mezcla de isómeros. Además, a menos que se especifique lo contrario, se prevé que la mención de un compuesto abarque todas las posibles formas de resonancia y tautómeros. Con respecto a las reivindicaciones, se prevé que la expresión "compuesto de fórmula" abarque el compuesto y todas las formas ionizadas y solvatos farmacéuticamente aceptables, todos los posibles estereoisómeros y todas las posibles formas de resonancia y tautómeros a menos que se especifique específicamente lo contrario en la reivindicación particular.

Breve descripción de las figuras

40 La figura 1 ilustra las SEQ ID NOS: 1-6 a las que se hace referencia en esta solicitud.

Definiciones

45 A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos usados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones tendrán los siguientes significados para los fines de esta solicitud.

Se indica que, tal como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la", incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Además, las definiciones de términos de química habituales pueden encontrarse en trabajos de referencia, incluyendo Carey y Sundberg "ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY" 4^a ED. vols. A (2000) y B (2001), Plenum Press, Nueva York. Además, a menos que se indique lo contrario, se emplean métodos convencionales de espectroscopía de masas, RMN, HPLC, química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología, dentro del conocimiento de la técnica.

55 "Alicíclico" significa un resto que comprende una estructura de anillo no aromático. Los restos alicíclicos pueden estar saturados o parcialmente insaturados con uno, dos o más enlaces dobles o triples. Los restos alicíclicos también pueden comprender opcionalmente heteroátomos tales como nitrógeno, oxígeno y azufre. Los átomos de nitrógeno pueden estar opcionalmente cuaternizados u oxidados y los átomos de azufre puede estar opcionalmente oxidados. Los ejemplos de restos alicíclicos incluyen, pero no se limitan a restos con anillos (C₃₋₈) tales como ciclopropilo, ciclohexano, ciclopentano, ciclopenteno, ciclopentadieno, ciclohexeno, ciclohexadieno, cicloheptano, ciclohepteno, cicloheptadieno, ciclooctano, cicloocteno y ciclooctadieno.

60 "Alifático" significa un resto caracterizado por una disposición de cadena lineal o ramificada de átomos de carbono constituyentes y puede estar saturado o parcialmente insaturado con uno, dos o más enlaces dobles o triples.

65 "Alqueno" significa una cadena carbonada, lineal o ramificada que contiene al menos un doble enlace carbono-

carbono ($-\text{CR}=\text{CR}'$ o $-\text{CR}=\text{CR}'\text{R}$ ", en el que R, R' y R" son cada uno independientemente hidrógeno o sustituyentes adicionales). Los ejemplos de alquenoil incluyen vinilo, alilo, isopropenilo, pentenilo, hexenilo, heptenilo, 1-propenilo, 2-butenilo, 2-metil-2-butenilo y similares. En realizaciones particulares, "alquenoil", o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un alquenoil (C_{2-20}), un alquenoil (C_{2-15}), un alquenoil (C_{2-10}), un alquenoil (C_{2-5}) o un alquenoil (C_{2-3}). Alternativamente, "alquenoil", o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un alquenoil (C_2), un alquenoil (C_3) o un alquenoil (C_4).

"Alquenoileno" significa una cadena carbonada lineal o ramificada, divalente que tiene uno o más dobles enlaces carbono-carbono ($-\text{CR}=\text{CR}'$ -, en el que R y R' son cada uno independientemente hidrógeno o sustituyentes adicionales). Los ejemplos de alquenoileno incluyen eten-1,2-diilo, propen-1,3-diilo, metilen-1,1-diilo y similares. En realizaciones particulares, "alquenoileno", o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un alquenoileno (C_{2-20}), un alquenoileno (C_{2-15}), un alquenoileno (C_{2-10}), un alquenoileno (C_{2-5}) o un alquenoileno (C_{2-3}). Alternativamente, "alquenoileno", o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un alquenoileno (C_2), un alquenoileno (C_3) o un alquenoileno (C_4).

"Alcoxilo" significa un resto de oxígeno que tiene un sustituyente de alquilo adicional. Los grupos alcoxilo de la presente invención pueden estar opcionalmente sustituidos.

"Alquilo" representado por sí mismo significa un radical alifático, lineal o ramificado, saturado o insaturado que tiene una cadena de átomos de carbono. Se usan normalmente alquilo (C_X) y alquilo (C_{X-Y}) en los que X e Y indican el número de átomos de carbono en la cadena. Por ejemplo, alquilo (C_{1-6}) incluye alquilos que tienen una cadena de entre 1 y 6 carbonos (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo, isobutilo, terc-butilo, vinilo, alilo, 1-propenilo, isopropenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo, 2-metilalilo, etinilo, 1-propinilo, 2-propinilo y similares). Alquilo representado junto con otro radical (por ejemplo, como en arilalquilo, heteroarilalquilo y similares) significa un radical lineal o ramificado, saturado o insaturado, divalente que tiene el número de átomos indicado o cuando no se indican átomos significa una unión (por ejemplo, aril (C_{6-10})-alquilo (C_{1-3}) incluye, bencilo, fenetilo, 1-feniletilo, 3-fenilpropilo, 2-tienilmetilo, 2-piridinilmetilo y similares). En realizaciones particulares, "alquilo", o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un alquilo (C_{1-20}), un alquilo (C_{1-15}), un alquilo (C_{1-10}), un alquilo (C_{1-5}) o un alquilo (C_{1-3}). Alternativamente, "alquilo", o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un alquilo (C_1), un alquilo (C_2) o un alquilo (C_3).

"Alquilenilo", a menos que se indique lo contrario, significa un radical lineal o ramificado, alifático saturado, divalente. Se usan normalmente alquilenilo (C_X) y alquilenilo (C_{X-Y}) en los que X e Y indican el número de átomos de carbono en la cadena. Por ejemplo, alquilenilo (C_{1-6}) incluye metileno ($-\text{CH}_2$ -), etileno ($-\text{CH}_2\text{CH}_2$ -), trimetileno ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ -), tetrametileno ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ -), 2-metiltetrametileno ($-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2$ -), pentametileno ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ -) y similares. En realizaciones particulares, "alquilenilo", o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un alquilenilo (C_{1-20}), un alquilenilo (C_{1-15}), un alquilenilo (C_{1-10}), un alquilenilo (C_{1-5}) o un alquilenilo (C_{1-3}). Alternativamente, "alquilenilo", o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un alquilenilo (C_1), un alquilenilo (C_2) o un alquilenilo (C_3).

"Alquilideno" significa un radical alifático lineal o ramificado, insaturado, conectado a la molécula original por un doble enlace. Se usan normalmente alquilideno (C_X) y alquilideno (C_{X-Y}) en los que X e Y indican el número de átomos de carbono en la cadena. Por ejemplo, alquilideno (C_{1-6}) incluye metileno ($=\text{CH}_2$), etilideno ($=\text{CHCH}_3$), isopropilideno ($=\text{C}(\text{CH}_3)_2$), propilideno ($=\text{CHCH}_2\text{CH}_3$), alilideno ($=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$) y similares. En realizaciones particulares, "alquilideno", o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un alquilideno (C_{1-20}), un alquilideno (C_{1-15}), un alquilideno (C_{1-10}), un alquilideno (C_{1-5}) o un alquilideno (C_{1-3}). Alternativamente, "alquilideno", o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un alquilideno (C_1), un alquilideno (C_2) o un alquilideno (C_3).

"Alquinilo" significa una cadena carbonada, lineal o ramificada que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono ($-\text{C}\equiv\text{C}$ - o $-\text{C}\equiv\text{CR}$, en el que R es hidrógeno o un sustituyente adicional). Los ejemplos de alquinilo incluyen etinilo, propargilo, 3-metil-1-pentinilo, 2-heptinilo y similares. En realizaciones particulares, "alquinilo", o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un alquinilo (C_{2-20}), un alquinilo (C_{2-15}), un alquinilo (C_{2-10}), un alquinilo (C_{2-5}) o un alquinilo (C_{2-3}). Alternativamente, "alquinilo", o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un alquinilo (C_2), un alquinilo (C_3) o un alquinilo (C_4).

"Alquinileno" significa una cadena carbonada lineal o ramificada, divalente que tiene uno o más triples enlaces carbono-carbono ($-\text{CR}\equiv\text{CR}'$ -, en el que R y R' son cada uno independientemente hidrógeno o sustituyentes adicionales). Los ejemplos de alquinileno incluyen etin-1,2-diilo, propin-1,3-diilo y similares. En realizaciones particulares, "alquinileno", o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un alquinileno (C_{2-20}), un alquinileno (C_{2-15}), un alquinileno (C_{2-10}), un alquinileno (C_{2-5}) o un alquinileno (C_{2-3}). Alternativamente, "alquinileno", o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un alquinileno (C_2), un alquinileno (C_3) o un alquinileno (C_4).

"Amido" significa el radical $-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}$ -, $-\text{C}(=\text{O})-\text{NRR}'$, $-\text{NR}-\text{C}(=\text{O})$ - y/o $-\text{NR}-\text{C}(=\text{O})\text{R}'$, en el que cada R y R' son independientemente hidrógeno o un sustituyente adicional.

“Amino” significa un resto de nitrógeno que tiene dos sustituyentes adicionales en el que, por ejemplo, un átomo de hidrógeno o carbono está unido al nitrógeno. Por ejemplo, los grupos amino representativos incluyen -NH₂, -NHCH₃, -N(CH₃)₂, -NH(alquilo (C₁₋₁₀)), -N(alquilo (C₁₋₁₀))₂, -NH(arilo), -NH(heteroarilo), -N(arilo)₂, -N(heteroarilo)₂ y similares.

5 Opcionalmente, los dos sustituyentes junto con el nitrógeno también pueden formar un anillo. A menos que se indique lo contrario, los compuestos de la invención que contienen restos amino pueden incluir derivados protegidos de los mismos. Los grupos protectores adecuados para los restos amino incluyen acetilo, terc-butoxicarbonilo, benciloxicarbonilo y similares.

10 “Animal” incluye seres humanos, mamíferos no humanos (por ejemplo, perros, gatos, conejos, reses, caballos, ovejas, cabras, cerdos, ciervos y similares) y no mamíferos (por ejemplo, aves y similares).

“Aromático” significa un resto en el que los átomos constituyentes constituyen un sistema de anillos insaturado, todos los átomos en el sistema de anillos tienen hibridación sp^2 y el número total de electrones pi es igual a $4n+2$.

15 Un anillo aromático puede ser tal que los átomos del anillo sean sólo átomos de carbono o puedan incluir átomos de carbono y no de carbono (véase “heteroarilo”).

“Arilo” significa un conjunto de anillos monocíclico o policíclico en el que cada anillo es aromático o cuando está condensado a uno o más anillos forma un conjunto de anillos aromáticos. Si uno o más átomos del anillo no es carbono (por ejemplo, N, S), el arilo es un heteroarilo. Se usan normalmente arilo (C_x) y arilo (C_{x-y}) en los que X e Y indican el número de átomos de carbono en el anillo. En realizaciones particulares, “arilo”, o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un arilo (C₃₋₁₄), un arilo (C₃₋₁₀), un arilo (C₃₋₇), un arilo (C₈₋₁₀) o un arilo (C₅₋₇). Alternativamente, “arilo”, o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un arilo (C₅), un arilo (C₆), un arilo (C₇), un arilo (C₈), un arilo (C₉) o un arilo (C₁₀).

25 “Azaalquilo” significa un alquilo, tal como se definió anteriormente, excepto porque uno o más de los átomos de carbono que forman la cadena de alquilo están sustituidos con átomos de nitrógeno sustituidos o no sustituidos (-NR- o -NRR', en el que R y R' son cada uno independientemente hidrógeno o sustituyentes adicionales). Por ejemplo, un azaalquilo (C₁₋₁₀) se refiere a una cadena que comprende entre 1 y 10 carbonos y uno o más átomos de nitrógeno.

35 “Bicicloalquilo” significa un conjunto de anillos bicíclico saturado condensado, espiro o que forma puente. En realizaciones particulares, “bicicloalquilo”, o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un bicicloalquilo (C₄₋₁₅), un bicicloalquilo (C₄₋₁₀), un bicicloalquilo (C₆₋₁₀) o un bicicloalquilo (C₈₋₁₀). Alternativamente, “bicicloalquilo”, o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un bicicloalquilo (C₈), un bicicloalquilo (C₉) o un bicicloalquilo (C₁₀).

40 “Bicicloarilo” significa un conjunto de anillos bicíclico condensado, espiro o que forma puente en el que al menos uno de los anillos que comprende el conjunto es aromático. Se usan normalmente bicicloarilo (C_x) y bicicloarilo (C_{x-y}) en los que X e Y indican el número de átomos de carbono en el conjunto de anillos bicíclico y directamente unidos al anillo. En realizaciones particulares, “bicicloarilo”, o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un bicicloarilo (C₄₋₁₅), un bicicloarilo (C₄₋₁₀), un bicicloarilo (C₆₋₁₀) o un bicicloarilo (C₈₋₁₀). Alternativamente, “bicicloarilo”, o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un bicicloarilo (C₈), un bicicloarilo (C₉) o un bicicloarilo (C₁₀).

45 “Anillo de formación de puente” y “anillo que forma puente” tal como se usa en el presente documento se refiere a un anillo que está unido a otro anillo para formar un compuesto que tiene una estructura bicíclica o policíclica en la que dos átomos del anillo que son comunes a ambos anillos no están directamente unidos entre sí. Los ejemplos no exclusivos de compuestos comunes que tienen un anillo de formación de puente incluyen borneol, norbornano, 7-oxabicyclo[2.2.1]heptano y similares. Uno o ambos anillos del sistema bicíclico también puede comprender heteroátomos.

50 “Carbamoilo” significa el radical -OC(O)NRR', en el que R y R' son cada uno independientemente hidrógeno o sustituyentes adicionales.

55 “Carbociclo” significa un anillo que consiste en átomos de carbono.

60 “Carbonilo” significa el radical -C(=O)- y/o -C(=O)R, en el que R es hidrógeno o un sustituyente adicional. Se indica que el radical carbonilo puede estar sustituido adicionalmente con una variedad de sustituyentes para formar grupos carbonilo diferentes incluyendo ácidos, haluros de ácido, aldehídos, amidas, ésteres y cetonas.

65 “Carboxilo” significa el radical -C(=O)-O- y/o -C(=O)-OR, en el que R es hidrógeno o un sustituyente adicional. Se indica que los compuestos de la invención que contienen restos carboxilo pueden incluir derivados protegidos de los mismos, es decir, en los que el oxígeno está sustituido con un grupo protector. Los grupos protectores adecuados para restos carboxilo incluyen bencilo, terc-butilo y similares.

“Ciano” significa el radical -CN.

“Cicloalquilo” significa un conjunto de anillos no aromático, saturado monocíclico, bicíclico o policíclico. Se usan normalmente cicloalquilo (C_X) y cicloalquilo (C_{X-Y}) en los que X e Y indican el número de átomos de carbono en el conjunto de anillos. Por ejemplo, cicloalquilo (C_{3-10}) incluye ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, 2,5-ciclohexadienilo, biciclo[2.2.2]octilo, adamantan-1-ilo, decahidronaftilo, oxociclohexilo, dioxociclohexilo, tiociclohexilo, 2-oxobiciclo[2.2.1]hept-1-ilo y similares. En realizaciones particulares, “cicloalquilo”, o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un cicloalquilo (C_{3-14}), un cicloalquilo (C_{3-10}), un cicloalquilo (C_{3-7}), un cicloalquilo (C_{8-10}) o un cicloalquilo (C_{5-7}). Alternativamente, “cicloalquilo”, o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un cicloalquilo (C_5), un cicloalquilo (C_6), un cicloalquilo (C_7), un cicloalquilo (C_8), un cicloalquilo (C_9) o un cicloalquilo (C_{10}).

“Cicloalquileno” significa un conjunto de anillos divalente, saturado monocíclico, bicíclico o policíclico. Se usan normalmente cicloalquileno (C_X) y cicloalquileno (C_{X-Y}) en los que X e Y indican el número de átomos de carbono en el conjunto de anillos. En realizaciones particulares, “cicloalquileno”, o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un cicloalquileno (C_{3-14}), un cicloalquileno (C_{3-10}), un cicloalquileno (C_{3-7}), un cicloalquileno (C_{8-10}) o un cicloalquileno (C_{5-7}). Alternativamente, “cicloalquileno”, o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un cicloalquileno (C_5), un cicloalquileno (C_6), un cicloalquileno (C_7), un cicloalquileno (C_8), un cicloalquileno (C_9) o un cicloalquileno (C_{10}).

“Enfermedad” incluye específicamente cualquier estado no sano de un animal o parte del mismo e incluye un estado no sano que puede estar provocado, o ser inherente a, la terapia médica o veterinaria aplicada a ese animal, es decir, los “efectos secundarios” de tal terapia.

“Anillo condensado” tal como se usa en el presente documento se refiere a un anillo que está unido a otro anillo para formar un compuesto que tiene una estructura bicíclica en la que los átomos del anillo que son comunes a ambos anillos están unidos directamente entre sí. Los ejemplos no exclusivos de anillos condensados comunes incluyen decalina, naftaleno, antraceno, fenantreno, indol, furano, benzofurano, quinolina y similares. Los compuestos que tienen sistemas de anillos condensados pueden estar saturados, parcialmente saturados, ser carbocíclicos, heterocíclicos, aromáticos, heteroaromáticos y similares.

“Halo” significa fluoro, cloro, bromo o yodo.

“Heteroalquilo” significa alquilo, tal como se define en esta solicitud, siempre que uno o más de los átomos dentro de la cadena de alquilo sea un heteroátomo. En realizaciones particulares, “heteroalquilo”, o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un heteroalquilo (C_{1-20}), un heteroalquilo (C_{1-15}), un heteroalquilo (C_{1-10}), un heteroalquilo (C_{1-5}), un heteroalquilo (C_{1-3}) o un heteroalquilo (C_{1-2}). Alternativamente, “heteroalquilo”, o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un heteroalquilo (C_1), un heteroalquilo (C_2) o un heteroalquilo (C_3).

“Heteroarilo” significa un grupo aromático monocíclico, bicíclico o policíclico en el que al menos un átomo del anillo es un heteroátomo y los átomos del anillo restantes son carbono. Los grupos heteroarilo monocíclicos incluyen, pero no se limitan a, grupos aromáticos cíclicos que tienen cinco o seis átomos del anillo, en los que al menos un átomo del anillo es un heteroátomo y los átomos del anillo restantes son carbono. Los átomos de nitrógeno pueden estar opcionalmente cuaternizados y los átomos de azufre pueden estar opcionalmente oxidados. Los grupos heteroarilo de esta invención incluyen, pero no se limitan a, los derivados de furano, imidazol, isotiazol, isoxazol, oxadiazol, oxazol, 1,2,3-oxadiazol, pirazina, pirazol, piridazina, piridina, pirimidina, pirrolina, tiazol, 1,3,4-tiadiazol, triazol y tetrazol. “Heteroarilo” también incluye, pero no se limita a, anillos bicíclicos o tricíclicos, en los que el anillo de heteroarilo está condensado a uno o dos anillos seleccionados independientemente del grupo que consiste en un anillo de arilo, un anillo de cicloalquilo, un anillo de cicloalqueno y otro anillo de heteroarilo o heterocicloalquilo monocíclico. Estos heteroarilos bicíclicos o tricíclicos incluyen, pero no se limitan a, los derivados de benzo[b]furano, benzo[b]tiofeno, bencimidazol, imidazo[4,5-c]piridina, quinazolina, tieno[2,3-c]piridina, tieno[3,2-b]piridina, tieno[2,3-b]piridina, indolizina, imidazo[1,2-a]piridina, quinolina, isoquinolina, ftalazina, quinoxalina, naftiridina, quinolizina, indol, isoindol, indazol, indolina, benzoxazol, benzopirazol, benzotiazol, imidazo[1,5-a]piridina, pirazolo[1,5-a]piridina, imidazo[1,2-a]pirimidina, imidazo[1,2-c]pirimidina, imidazo[1,5-a]pirimidina, imidazo[1,5-c]pirimidina, pirrolo[2,3-b]piridina, pirrolo[2,3-c]piridina, pirrolo[3,2-c]piridina, pirrolo[3,2-b]piridina, pirrolo[2,3-d]pirimidina, pirrolo[3,2-d]pirimidina, pirrolo[2,3-b]pirazina, pirazolo[1,5-a]piridina, pirrolo[1,2-b]piridazina, pirrolo[1,2-c]pirimidina, pirrolo[1,2-a]pirimidina, pirrolo[1,2-a]pirazina, triazo[1,5-a]piridina, pteridina, purina, carbazol, acridina, fenazina, fenotiazeno, fenoxazina, 1,2-dihidropirrolo[3,2,1-h]indol, indolizina, pirido[1,2-a]indol y 2(1H)-piridinona. Los anillos de heteroarilo bicíclicos o tricíclicos pueden unirse a la molécula original mediante o bien el propio grupo heteroarilo o bien el grupo arilo, cicloalquilo, cicloalqueno o heterocicloalquilo al que está condensado. Los grupos heteroarilo de esta invención pueden estar sustituidos o no sustituidos. En realizaciones particulares, “heteroarilo”, o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un heteroarilo (C_{1-13}), un heteroarilo (C_{2-13}), un heteroarilo (C_{2-6}), un heteroarilo (C_{3-9}) o un heteroarilo (C_{5-9}). Alternativamente, “heteroarilo”, o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un heteroarilo (C_3), un heteroarilo (C_4), un heteroarilo (C_5), un heteroarilo (C_6), un heteroarilo (C_7), un heteroarilo (C_8) o un heteroarilo (C_9).

“Heteroátomo” se refiere a un átomo que no es un átomo de carbono. Los ejemplos particulares de heteroátomos incluyen, pero no se limitan a, nitrógeno, oxígeno y azufre.

- 5 “Resto de heteroátomo” incluye un resto en el que el átomo mediante el que se une el resto, no es un carbono. Los ejemplos de restos de heteroátomo incluyen -NR-, -N⁺(O⁻)=, -O-, -S- o -S(O)₂-, en el que R es hidrógeno o un sustituyente adicional.

- 10 “Heterobicicloalquilo” significa bicicloalquilo, tal como se define en esta solicitud, siempre que uno o más de los átomos dentro del anillo sea un heteroátomo. Por ejemplo, heterobicicloalquilo (C₉₋₁₂) tal como se usa en esta solicitud incluye, pero no se limita a, 3-aza-biciclo[4.1.0]hept-3-ilo, 2-aza-biciclo[3.1.0]hex-2-ilo, 3-aza-biciclo[3.1.0]hex-3-ilo y similares. En realizaciones particulares, “heterobicicloalquilo”, o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un heterobicicloalquilo (C₁₋₁₄), un heterobicicloalquilo (C₄₋₁₄), un heterobicicloalquilo (C₄₋₉) o un heterobicicloalquilo (C₅₋₉). Alternativamente, “heterobicicloalquilo”, o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un heterobicicloalquilo (C₅), un heterobicicloalquilo (C₆), heterobicicloalquilo (C₇), heterobicicloalquilo (C₈) o un heterobicicloalquilo (C₉).

- 20 “Heterobicicloarilo” significa bicicloarilo, tal como se define en esta solicitud, siempre que uno o más de los átomos dentro del anillo sea un heteroátomo. Por ejemplo, heterobicicloarilo (C₄₋₁₂) tal como se usa en esta solicitud incluye, pero no se limita a, 2-amino-4-oxo-3,4-dihidropteridin-6-ilo, tetrahidroisoquinolinilo y similares. En realizaciones particulares, “heterobicicloarilo”, o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un heterobicicloarilo (C₁₋₁₄), un heterobicicloarilo (C₄₋₁₄), un heterobicicloarilo (C₄₋₉), un heterobicicloarilo (C₅₋₉). Alternativamente, “heterobicicloarilo”, o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un heterobicicloarilo (C₅), heterobicicloarilo (C₆), heterobicicloarilo (C₇), heterobicicloarilo (C₈) o un heterobicicloarilo (C₉).

- 30 “Heterocicloalquilo” significa cicloalquilo, tal como se define en esta solicitud, siempre que uno o más de los átomos que forman el anillo sea un heteroátomo seleccionado, independientemente de N, O o S. Los ejemplos no exclusivos de heterocicloalquilo incluyen piperidilo, 4-morfolilo, 4-piperazinilo, pirrolidinilo, perhidropirrolizinilo, 1,4-diazaperhidroepinilo, 1,3-dioxanilo, 1,4-dioxanilo y similares. En realizaciones particulares, “heterocicloalquilo”, o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un heterocicloalquilo (C₁₋₁₃), un heterocicloalquilo (C₁₋₉), un heterocicloalquilo (C₁₋₆), un heterocicloalquilo (C₅₋₉) o un heterocicloalquilo (C₂₋₆). Alternativamente, “heterocicloalquilo”, o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un heterocicloalquilo (C₂), un heterocicloalquilo (C₃), un heterocicloalquilo (C₄), un heterocicloalquilo (C₅), un heterocicloalquilo (C₆), heterocicloalquilo (C₇), heterocicloalquilo (C₈) o un heterocicloalquilo (C₉).

- 40 “Heterocicloalquileno” significa cicloalquileno, tal como se define en esta solicitud, siempre que uno o más de los átomos de carbono miembros del anillo esté sustituido por un heteroátomo. En realizaciones particulares, “heterocicloalquileno”, o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un heterocicloalquileno (C₁₋₁₃), un heterocicloalquileno (C₁₋₉), un heterocicloalquileno (C₁₋₆), un heterocicloalquileno (C₅₋₉) o un heterocicloalquileno (C₂₋₆). Alternativamente, “heterocicloalquileno”, o bien solo o bien representado junto con otro radical, puede ser un heterocicloalquileno (C₂), un heterocicloalquileno (C₃), un heterocicloalquileno (C₄), un heterocicloalquileno (C₅), un heterocicloalquileno (C₆), heterocicloalquileno (C₇), heterocicloalquileno (C₈) o un heterocicloalquileno (C₉).

45 “Hidroxilo” significa el radical -OH.

“Cl₅₀” significa la concentración molar de un inhibidor que produce una inhibición del 50% de la enzima diana.

- 50 “Imino” significa el radical -CR(=NR') y/o -C(=NR')-, en el que R y R' son cada uno independientemente hidrógeno o un sustituyente adicional.

- 55 “Isómeros” significa compuestos que tienen fórmulas moleculares idénticas pero que difieren en la naturaleza o secuencia de 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 el espacio se denominan “estereoisómeros.” Los estereoisómeros que no son imágenes especulares entre sí se denominan “diastereómeros” y los estereoisómeros que no son imágenes especulares superponibles se denominan “enantiómeros” o en ocasiones “isómeros ópticos”. Un átomo de carbono unido a cuatro sustituyentes no idénticos se denomina un “centro quiral”. Un compuesto con un centro quiral tiene dos formas enantioméricas de quiralidad opuesta. Una mezcla de las dos formas enantioméricas se denomina una “mezcla racémica”. Un compuesto que tiene más de un centro quiral tiene 2ⁿ⁻¹ pares enantioméricos, en los que n es el número de centros quirales. Los compuestos con más de un centro quiral pueden existir o bien como un diastereómero individual o bien como una mezcla de diastereómeros, denominada “mezcla diastereomérica”. Cuando un centro quiral está presente, un estereoisómero puede estar caracterizado por la configuración absoluta de ese centro quiral. Configuración absoluta se refiere a la disposición en el espacio de los sustituyentes unidos al centro quiral. Los enantiómeros se caracterizan por la configuración absoluta de sus centros quirales y se describen por las reglas de secuenciación R y S de Cahn, Ingold y Prelog. En la técnica se conocen bien convenios de

nomenclatura estereoquímica, métodos para la determinación de estereoquímica y la separación de estereoisómeros (por ejemplo, véase "Advanced Organic Chemistry", 4ª edición, March, Jerry, John Wiley & Sons, Nueva York, 1992).

- 5 "Grupo saliente" significa el grupo con el significado asociado convencionalmente con él en química orgánica sintética, es decir, un átomo o grupo que puede desplazarse en condiciones de reacción (por ejemplo, alquilación). Los ejemplos de grupo salientes incluyen, pero no se limitan a, halo (por ejemplo, F, Cl, Br y I), alquilo (por ejemplo, metilo y etilo) y sulfoniloxilo (por ejemplo, mesiloxilo, etanosulfoniloxilo, bencenosulfoniloxilo y tosilo), tiometilo, tieniloxilo, dihalofosfinoiloxilo, tetrahalofosfoxilo, benciloxilo, isopropiloxilo, aciloxilo y similares.

- 10 "Resto que proporciona separación de X átomos" y "ligador que proporciona separación de X átomos" entre otros dos restos significa que la cadena de átomos que une directamente los otros dos restos tiene X átomos de longitud. Cuando X se facilita como un intervalo (por ejemplo, X_1-X_2), entonces la cadena de átomos tiene de al menos X_1 y no más de X_2 átomos de longitud. Se entiende que la cadena de átomos puede formarse a partir de una combinación de átomos que incluyen, por ejemplo, átomos de carbono, nitrógeno, azufre y oxígeno. Además, cada átomo puede estar unido opcionalmente a uno o más sustituyentes, según permitan las valencias. Además, la cadena de átomos puede formar parte de un anillo. Por consiguiente, en una realización, un resto que proporciona una separación de X átomos entre otros dos restos (R y R') puede representarse por $R-(L)_X-R'$ en la que cada L se selecciona independientemente del grupo que consiste en $CR''R'''$, NR'''' , O, S, CO, CS, $C=NR''''$, SO, SO_2 y similares, en los que dos cualquiera o más de R'', R''', R'''' y R'''' pueden tomarse juntos para formar un anillo sustituido o no sustituido.

"Nitro" significa el radical $-NO_2$.

- 25 "Oxaalquilo" significa un alquilo, tal como se definió anteriormente, excepto cuando uno o más de los átomos de carbono que forman la cadena de alquilo están sustituidos con átomos de oxígeno ($-O-$ o $-OR$, en el que R es hidrógeno o un sustituyente adicional). Por ejemplo, un oxaalquilo (C_{1-10}) se refiere a una cadena que comprende entre 1 y 10 carbonos y uno o más átomos de oxígeno.

- 30 "Oxoalquilo" significa un alquilo, tal como se definió anteriormente, excepto cuando uno o más de los átomos de carbono que forman la cadena de alquilo están sustituidos con grupos carbonilo ($-C(=O)-$ o $-C(=O)-R$, en el que R es hidrógeno o un sustituyente adicional). El grupo carbonilo puede ser un aldehído, cetona, éster, amida, ácido o haluro de ácido. Por ejemplo, un oxoalquilo (C_{1-10}) se refiere a una cadena que comprende entre 1 y 10 átomos de carbono y uno o más grupos carbonilo.

- 35 "Oxi" significa el radical $-O-$ o $-OR$, en el que R es hidrógeno o un sustituyente adicional. Por consiguiente, se indica que el radical oxi puede estar sustituido adicionalmente con una variedad de sustituyentes para formar diferentes grupos oxi incluyendo hidroxilo, alcoxilo, ariloxilo, heteroariloxilo o carboniloxilo.

- 40 "Farmacéuticamente aceptable" significa lo que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica y ni biológicamente ni de otra manera indeseable e incluye lo que es aceptable para su uso veterinario así como para su uso farmacéutico humano.

- 45 "Sales farmacéuticamente aceptables" significa sales de compuestos de la presente invención que son farmacéuticamente aceptables, tal como se definió anteriormente, y que presentan la actividad farmacológica deseada. Tales sales incluyen sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares; o con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido heptanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido o-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etanodisulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-clorobencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido canforsulfónico, ácido 4-metilbicyclo[2.2.2]oct-2-eno-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 4,4'-metilenbis(3-hidroxi-2-eno-1-carboxílico), ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido terc-butilacético, ácido laurilsulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico y similares.

- 60 Las sales farmacéuticamente aceptables también incluyen sales de adición de base que pueden formarse cuando los protones ácidos presentes pueden reaccionar con bases orgánicas o inorgánicas. Las bases inorgánicas aceptables incluyen hidróxido de sodio, carbonato de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de aluminio e hidróxido de calcio. Las bases orgánicas aceptables incluyen etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina y similares.

- 65 "Anillo policíclico" incluye anillos bicíclicos y multicíclicos. Los anillos individuales que comprenden el anillo policíclico pueden ser anillos condensados, espiro o de formación de puente.

"Derivados protegidos" significa derivados de inhibidores en los que un sitio o sitios reactivos están bloqueados con

grupos protectores. Los derivados protegidos son útiles en la preparación de inhibidores o ellos mismos pueden ser activos como inhibidores. Puede encontrarse una amplia lista de grupos protectores adecuados en T. W. Greene, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, 3ª edición, John Wiley & Sons, Inc. 1999.

5 “Anillo” y “conjunto de anillos” significa un sistema carbocíclico o heterocíclico e incluye sistemas aromáticos y no aromáticos. El sistema puede ser monocíclico, bicíclico o policíclico. Además, para sistemas bicíclicos y policíclicos, los anillos individuales que comprenden el anillo policíclico pueden ser anillos condensados, espiro o de formación de puente.

10 “Sujeto” y “paciente” incluye seres humanos, mamíferos no humanos (por ejemplo, perros, gatos, conejos, reses, caballos, ovejas, cabras, cerdos, ciervos y similares) y no mamíferos (por ejemplo, aves y similares).

15 “Sustituido o no sustituido” significa que un resto dado puede consistir solo en sustituyentes de hidrógeno a través de las valencias disponibles (no sustituido) o puede comprender adicionalmente uno o más sustituyentes que no son hidrógeno a través de las valencias disponibles (sustituido) que no se especifica de otra manera por el nombre del resto dado. Por ejemplo, isopropilo es un ejemplo de un resto de etileno que está sustituido con $-CH_3$. En general, un sustituyente que no es hidrógeno puede ser cualquier sustituyente que puede estar unido a un átomo del resto dado que se especifica que está sustituido. Los sustituyentes se seleccionan del grupo A, que consiste en halo, nitro, ciano, tio, oxi, hidroxilo, carboniloxilo, alcoxilo (C_{1-10}), ariloxilo (C_{4-12}), heteroariloxilo (C_{1-10}), carbonilo, oxicarbonilo, aminocarbonilo, amino, alquilamino (C_{1-10}), sulfonamido, imino, sulfonilo, sulfinilo, alquilo (C_{1-10}), haloalquilo (C_{1-10}), hidroxialquilo (C_{1-10}), carbonilalquilo (C_{1-10}), tiocarbonilalquilo (C_{1-10}), sulfonilalquilo (C_{1-10}), sulfinilalquilo (C_{1-10}), azaalquilo (C_{1-10}), iminoalquilo (C_{1-10}), cicloalquil (C_{3-12})-alquilo (C_{1-5}), heterocicloalquil (C_{3-12})-alquilo (C_{1-10}), arilalquilo (C_{1-10}), heteroaril (C_{1-10})-alquilo (C_{1-5}), bicicloaril (C_{9-12})-alquilo (C_{1-5}), heterobicicloaril (C_{8-12})-alquilo (C_{1-5}), cicloalquilo (C_{3-12}), heterocicloalquilo (C_{3-12}), bicicloalquilo (C_{9-12}), heterobicicloalquilo (C_{3-12}), arilo (C_{4-12}), heteroarilo (C_{1-10}), bicicloarilo (C_{9-12}) y heterobicicloarilo (C_{4-12}). Además, el propio sustituyente está opcionalmente sustituido con un sustituyente adicional. El sustituyente adicional se selecciona del grupo B, que consiste en halo, nitro, ciano, tio, oxi, hidroxilo, carboniloxilo, alcoxilo (C_{1-10}), ariloxilo (C_{4-12}), heteroariloxilo (C_{1-10}), carbonilo, oxicarbonilo, aminocarbonilo, amino, alquilamino (C_{1-10}), sulfonamido, imino, sulfonilo, sulfinilo, alquilo (C_{1-10}), haloalquilo (C_{1-10}), hidroxialquilo (C_{1-10}), carbonilalquilo (C_{1-10}), tiocarbonilalquilo (C_{1-10}), sulfonilalquilo (C_{1-10}), sulfinilalquilo (C_{1-10}), azaalquilo (C_{1-10}), iminoalquilo (C_{1-10}), cicloalquil (C_{3-12})-alquilo (C_{1-5}), heterocicloalquil (C_{3-12})-alquilo (C_{1-10}), arilalquilo (C_{1-10}), heteroaril (C_{1-10})-alquilo (C_{1-5}), bicicloaril (C_{9-12})-alquilo (C_{1-5}), heterobicicloaril (C_{8-12})-alquilo (C_{1-5}), cicloalquilo (C_{3-12}), heterocicloalquilo (C_{3-12}), bicicloalquilo (C_{9-12}), heterobicicloalquilo (C_{3-12}), arilo (C_{4-12}), heteroarilo (C_{1-10}), bicicloarilo (C_{9-12}) y heterobicicloarilo (C_{4-12}).

35 “Sulfinilo” significa el radical $-SO-$ y/o $-SO-R$, en el que R es hidrógeno o un sustituyente adicional. Se indica que el radical sulfinilo puede estar sustituido adicionalmente con una variedad de sustituyentes para formar diferentes grupos sulfinilo incluyendo ácidos sulfínicos, sulfinamidas, ésteres de sulfinilo y sulfóxidos.

40 “Sulfonilo” significa el radical $-SO_2-$ y/o $-SO_2-R$, en el que R es hidrógeno o un sustituyente adicional. Se indica que el radical sulfonilo puede estar sustituido adicionalmente con una variedad de sustituyentes para formar diferentes grupos sulfonilo incluyendo ácidos sulfónicos, sulfonamidas, ésteres de sulfonato y sulfonas.

45 “Cantidad terapéuticamente eficaz” significa la cantidad que, cuando se administra a un animal para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar tal tratamiento para la enfermedad.

“Tio” indica la sustitución de un oxígeno por un azufre e incluye, pero no se limita a, grupos que contienen $-SR$, $-S-$ y $=S$.

50 “Tioalquilo” significa un alquilo, tal como se definió anteriormente, excepto cuando uno o más de los átomos de carbono que forman la cadena de alquilo están sustituidos con átomos de azufre ($-S-$ o $-S-R$, en el que R es hidrógeno o un sustituyente adicional). Por ejemplo, un tioalquilo (C_{1-10}) se refiere a una cadena que comprende entre 1 y 10 carbonos y uno o más átomos de azufre.

55 “Tiocarbonilo” significa el radical $-C(=S)-$ y/o $-C(=S)-R$, en el que R es hidrógeno o un sustituyente adicional. Se indica que el radical tiocarbonilo puede estar sustituido adicionalmente con una variedad de sustituyentes para formar diferentes grupos tiocarbonilo incluyendo tioácidos, tioamidas, tioésteres y tiocetonas.

“Tratamiento” o “tratar” significa cualquier administración de un compuesto de la presente invención e incluye:

60 (1) impedir que se produzca la enfermedad en un animal que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que aún no ha experimentado o presentado la patología o sintomatología de la enfermedad,

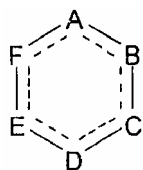
(2) inhibir la enfermedad en un animal que está experimentando o presentando la patología o sintomatología de la enfermedad (es decir, detener el desarrollo adicional de la patología y/o sintomatología), o

65 (3) mejorar la enfermedad en un animal que está experimentando o presentando la patología o sintomatología de la

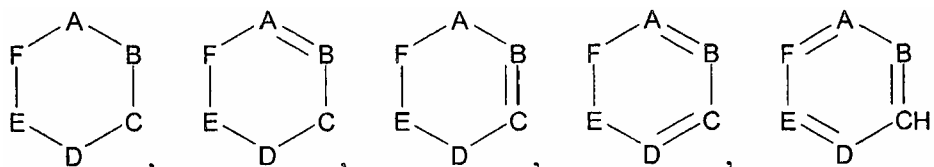
enfermedad (es decir, revertir la patología y/o sintomatología).

Con respecto a todas las definiciones proporcionadas en el presente documento se indica que las definiciones deben interpretarse en el sentido de que pueden estar incluidos sustituyentes adicionales seleccionados de los enumerados anteriormente. Por tanto, un alquilo C_1 indica que hay un átomo de carbono pero no indica cuáles son los sustituyentes en el átomo de carbono. Por tanto, un alquilo (C_1) comprende metilo (es decir, $-CH_3$) así como $-CRR'R''$ en el que R, R', y R'' pueden ser cada uno independientemente hidrógeno o un sustituyente adicional en el que el átomo unido al carbono es un heteroátomo o ciano. Por tanto, CF_3 , CH_2OH y CH_2CN , por ejemplo, son todos alquilos (C_1). De manera similar, términos tales como alquilamino y similares comprende dialquilamino y similares.

Se pretende que un compuesto que tiene una fórmula que está representada con una unión discontinua, incluya las fórmulas que tienen opcionalmente cero, uno o más dobles enlaces, tal como se ilustra y muestra a continuación:



representa



etc.

Además, se pretende que los átomos que constituyen los compuestos de la presente invención incluyan todas las formas isotópicas de tales de átomos. Isótopos, tal como se usa en el presente documento, incluyen los átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números másicos. A modo de ejemplo general y sin limitación, los isótopos de hidrógeno incluyen tritio y deuterio, y los isótopos de carbono incluyen ^{13}C y ^{14}C .

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a compuestos que pueden usarse para inhibir proteínas cinasas activadas por mitógeno (denominadas en el presente documento MEK) y, en particular, MAPK/ERK cinasa 1 (denominada en el presente documento MEK1) y/o MAPK/ERK cinasa 2 (denominada en el presente documento MEK2). La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas, kits y artículos de fabricación que comprenden tales compuestos. Métodos y productos intermedios útiles para preparar los compuestos se describen en el presente documento. Además, la presente invención se refiere a los compuestos para su uso como medicamentos. Se indica que los compuestos de la presente invención también pueden presentar actividad para otros miembros de la misma familia de proteínas y por tanto pueden usarse para tratar estados patológicos asociados con estos otros miembros de la familia.

MEK pertenece a la familia de enzimas de proteína cinasa. Las rutas de proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) están conservadas evolutivamente desde la levadura hasta el ser humano y responden a una variedad de señales extracelulares para inducir la diferenciación y proliferación celulares. La cascada de cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) es una de las tres rutas de señalización de MAPK principales y es la cascada predominante que controla la proliferación, migración, división y diferenciación celulares (Schaeffer, H. J., y Weber, M. J. (1999) Mol. Cell. Biol. 19, 2435-2444). En esta ruta, la unión de GTP a la proteína Ras inicia una cascada de tres proteínas cinasas, que conduce a la activación de ERK a través de las proteínas cinasas Raf-1 y MEK1/2 que intervienen. Las MEK1/2 cinasas son treonina/tirosina cinasas de especificidad doble que activan la ERK cinasa posterior fosforilando residuos de treonina y tirosina específicos de ERK, y se activan a sí mismas mediante la fosforilación de residuos de serina de MEK mediante la RAF cinasa anterior. MEK1 y MEK2 comparten un alto grado de similitud de secuencia de aminoácidos, particularmente en sus dominios cinasa, y ambas pueden fosforilar ERK (Zheng, C-F. y Guan, K. (1993) J. Biol. Chem. 268, 11435-11439).

Múltiples estudios han ligado la ruta de señalización RAF/MEK/ERK al crecimiento y la supervivencia de muchos tumores humanos diversos incluyendo, pero sin limitarse a cánceres de colon, páncreas, ovarios y de pulmón de células no pequeñas (revisado en: Sebolt-Leopold, J.S. y Herrera R. (2004) Nature Reviews: Cancer, 4, 937-947). Por estas razones ha existido un considerable interés en el desarrollo de inhibidores farmacéuticos de molécula pequeña de esta ruta.

Se indica que los compuestos de la presente invención también pueden presentar actividad inhibidora para otros miembros de la familia de proteínas cinasas y por tanto pueden usarse para tratar estados patológicos asociados con estos otros miembros de la familia.

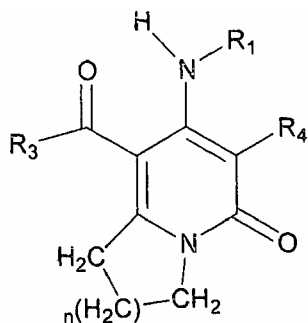
Estructura cristalina de MEK2

Takeda San Diego, Inc. resolvió la estructura cristalina de MEK2. El conocimiento de la estructura cristalina se usó para guiar el diseño de los inhibidores proporcionados en el presente documento.

La arquitectura global de las proteínas MEK se asemeja al plegamiento de la proteína cinasa de dos dominios conservado, que consiste en un lóbulo grande C-terminal compuesto principalmente por un dominio de hélice α y un lóbulo más pequeño N-terminal compuesto principalmente por una lámina β . El lóbulo en N contiene normalmente una hélice α individual denominada la hélice de control o C que influye en la unión productiva de nucleótidos en la región activa, que se ubica en la hendidura entre los dos dominios. Adicionalmente, la unión productiva de nucleótido y sustratos puede depender de un bucle de activación, o bucle A, que está en una conformación extendida cuando está activa, pero a menudo en una conformación inactiva replegada que ocluye al menos parcialmente la región activa. La fosforilación de residuos específicos dentro del bucle A puede ayudar a estabilizar la conformación extendida, activa. Los mecanismos inhibidores de cinasas comunes normalmente seleccionan como dianas alteraciones estructurales dentro de la hélice C o el bucle A.

Inhibidores de MEK1 y/o MEK2 y procesos para la preparación de los mismos

En uno de estos aspectos, la presente invención se refiere a compuestos que son útiles como inhibidores de MEK. En una realización, los inhibidores de MEK de la presente invención tienen la fórmula:



o un tautómero, enantiómero o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en la que:

n se selecciona del grupo que consiste en 1, 2 y 3;

R₁ se selecciona del grupo que consiste en arilo (C₄₋₁₂) y heteroarilo (C₁₋₁₀), cada uno no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo A;

R₃ es R₁₅O-NH-;

R₄ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halo, alquilo (C₁₋₅) y haloalquilo (C₁₋₅); cada uno no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo A;

R₁₅ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alcoxilo, alquilo (C₁₋₁₀), hidroxialquilo (C₁₋₁₀) y heterocicloalquil (C₃₋₁₂)-alquilo (C₁₋₁₀), cada uno no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo A;

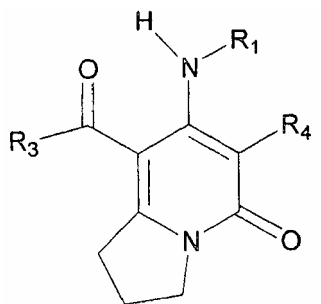
el grupo A consiste en halo, nitro, ciano, tio, oxi, hidroxilo, carboniloxilo, alcoxilo (C₁₋₁₀), ariloxilo (C₄₋₁₂), heteroariloxilo (C₁₋₁₀), carbonilo, oxicarbonilo, aminocarbonilo, amino, alquilamino (C₁₋₁₀), sulfonamido, imino, sulfonilo, sulfinilo, alquilo (C₁₋₁₀), haloalquilo (C₁₋₁₀), hidroxialquilo (C₁₋₁₀), carbonilalquilo (C₁₋₁₀), tiocarbonilalquilo (C₁₋₁₀), sulfonilalquilo (C₁₋₁₀), sulfinalalquilo (C₁₋₁₀), azaalquilo (C₁₋₁₀), iminoalquilo (C₁₋₁₀), cicloalquil (C₃₋₁₂)-alquilo (C₁₋₅), heterocicloalquil (C₃₋₁₂)-alquilo (C₁₋₁₀), arilalquilo (C₁₋₁₀), heteroaril (C₁₋₁₀)-alquilo (C₁₋₅), bicicloaril (C₉₋₁₂)-alquilo (C₁₋₅), heterobicicloaril (C₈₋₁₂)-alquilo (C₁₋₅), cicloalquilo (C₃₋₁₂), heterocicloalquilo (C₃₋₁₂), bicicloalquilo (C₉₋₁₂), heterobicicloalquilo (C₃₋₁₂), arilo (C₄₋₁₂), heteroarilo (C₁₋₁₀), bicicloarilo (C₉₋₁₂) y heterobicicloarilo (C₄₋₁₂), cada uno no sustituido o sustituido con un sustituyente adicional seleccionado del grupo B;

el grupo B consiste en halo, nitro, ciano, tio, oxi, hidroxilo, carboniloxilo, alcoxilo (C₁₋₁₀), ariloxilo (C₄₋₁₂), heteroariloxilo (C₁₋₁₀), carbonilo, oxicarbonilo, aminocarbonilo, amino, alquilamino (C₁₋₁₀), sulfonamido, imino,

sulfonilo, sulfinilo, alquilo (C₁₋₁₀), haloalquilo (C₁₋₁₀), hidroxialquilo (C₁₋₁₀), carbonilalquilo (C₁₋₁₀), tiocarbonilalquilo (C₁₋₁₀), sulfonilalquilo (C₁₋₁₀), sulfinilalquilo (C₁₋₁₀), azaalquilo (C₁₋₁₀), iminoalquilo (C₁₋₁₀), cicloalquil (C₃₋₁₂)-alquilo (C₁₋₅), heterocicloalquil (C₃₋₁₂)-alquilo (C₁₋₁₀), arilalquilo (C₁₋₁₀), heteroaril (C₁₋₁₀)-alquilo (C₁₋₅), bicicloaril (C₉₋₁₂)-alquilo (C₁₋₅), heterobicicloaril (C₈₋₁₂)-alquilo (C₁₋₅), cicloalquilo (C₃₋₁₂), heterocicloalquilo (C₃₋₁₂), bicicloalquilo (C₉₋₁₂), heterobicicloalquilo (C₃₋₁₂), arilo (C₄₋₁₂), heteroarilo (C₁₋₁₀), bicicloarilo (C₉₋₁₂) y heterobicicloarilo (C₄₋₁₂); y

“alquilo”, o bien solo o bien representado junto con otro radical, significa un radical alifático, lineal o ramificado, saturado o insaturado que tiene una cadena de átomos de carbono.

Aún en una realización adicional, los inhibidores de MEK de la presente invención tienen la fórmula:



o un tautómero, enantiómero o sal farmacéuticamente aceptable de los mismo.

Los ejemplos particulares de los compuestos según la presente invención incluyen, pero no se limitan a:

(R)-N-(2,3-dihidroxipropoxi)-6-fluoro-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

N-(1,3-dihidroxiopropan-2-iloxi)-6-fluoro-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

6-fluoro-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-N-(2-hidroxietoxi)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

(S)-N-(2,3-dihidroxipropoxi)-6-fluoro-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

7-fluoro-8-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-N-(2-hidroxietoxi)-6-oxo-2,3,4,6-tetrahidro-1H-quinolizina-9-carboxamida;

7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-N-(2-hidroxietoxi)-6-metil-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-N-(2-hidroxietoxi)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

6-cloro-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-N-(2-hidroxietoxi)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

7-(4-etinil-2-fluorofenilamino)-6-fluoro-N-(2-hidroxietoxi)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

6-fluoro-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-N-(3-hidroxipropoxi)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

6-cloro-N-(1,3-dihidroxiopropan-2-iloxi)-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

7-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-N-(2-hidroxietoxi)-6-metil-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

7-(4-etinil-2-fluorofenilamino)-N-(2-hidroxietoxi)-6-metil-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

(R)-N-(2,3-dihidroxipropoxi)-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-6-metil-5-oxi-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

(S)-N'-(2,3-dihidroxipropoxi)-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-6-metil-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

N-(1,3-dihidroxiopropan-2-iloxi)-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-6-metil-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

7-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-6-fluoro-N-(2-hidroxietoxi)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

(R)-6-cloro-N-(2,3-dihidroxipropoxi)-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

(S)-6-cloro-N-(2,3-dihidroxipropoxi)-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

(R)-N-(2,3-dihidroxipropoxi)-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida; y

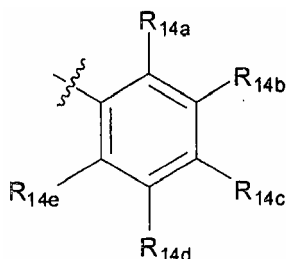
(S)-N-(2,3-dihidroxipropoxi)-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida.

Todavía en otra variación de cada una de las realizaciones y variaciones anteriores, n es 1. Aún en otra variación de cada una de las realizaciones y variaciones anteriores, n es 2. En una variación adicional de cada una de las realizaciones y variaciones anteriores, n es 3.

Todavía en otra variación adicional de cada una de las realizaciones y variaciones anteriores, R_1 es arilo (C_{4-12}), no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo A. Aún en una variación adicional de cada una de las realizaciones y variaciones anteriores, R_1 es un fenilo, no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo A. En otra variación de cada una de las realizaciones y variaciones anteriores, R_1 es bicicloarilo (C_{9-12}), no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo A. Todavía en otra variación de cada una de las realizaciones y variaciones anteriores, R_1 es un naftilo, no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo A. Aún en otra variación de cada una de las realizaciones y variaciones anteriores, R_1 es heterobicicloarilo (C_{4-12}), no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo A.

En una variación adicional de cada una de las realizaciones y variaciones anteriores, R_1 está sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidrógeno, halo, ciano, tio, alcoxilo, alquilo (C_{1-3}), hidroxialquilo (C_{1-3}) y cicloalquilo (C_{3-8}), cada uno no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo A. Todavía en una variación adicional de cada una de las realizaciones y variaciones anteriores, R_1 está sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidrógeno, fluoro, cloro, bromo, yodo, ciano, metiltio, metoxilo, trifluorometoxilo, metilo, etilo, trifluorometilo, etinilo, n-propanilo y ciclopropilo.

Aún en una variación adicional de cada una de las realizaciones y variaciones anteriores, R_1 tiene la fórmula:



en la que:

R_{14a} , R_{14b} , R_{14c} , R_{14d} y R_{14e} se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halo, ciano, tio, alcoxilo, alquilo (C_{1-3}) e hidroxialquilo (C_{1-3}), cada uno no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo A.

Aún en otra variación de cada una de las realizaciones y variaciones anteriores,

R_3 es $R_{11}O-L-O-NH-$,

L es alquileo (C_{1-10}), no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo A; y

R_{11} se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo (C_{1-5}), no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo A.

En una variación adicional de cada una de las realizaciones y variaciones anteriores, R_4 es hidrógeno. Todavía en una variación adicional de cada una de las realizaciones y variaciones anteriores, R_4 es halo. Aún en una variación adicional de cada una de las realizaciones y variaciones anteriores, R_4 se selecciona del grupo que consiste en alquilo (C_{1-5}) y haloalquilo (C_{1-5}), cada uno sustituido o no sustituido. En otra variación de cada una de las realizaciones y variaciones anteriores, R_4 es metilo.

Aún en otra variación de cada una de las realizaciones y variaciones anteriores, L es alquileo (C_{1-10}), no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo A. En una variación adicional de cada una de las realizaciones y variaciones anteriores, L es alquileo (C_{1-3}), no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo A.

Aún en otra variación de cada una de las realizaciones y variaciones anteriores, R_{14a} se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halo y alquilo (C_{1-5}), no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del

grupo A. En una variación adicional de cada una de las realizaciones y variaciones anteriores, R_{14a} se selecciona del grupo que consiste en fluoro, cloro y metilo.

Todavía en una variación adicional de cada una de las realizaciones y variaciones anteriores, R_{14c} se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halo, ciano, tio, alquilo (C₁₋₃) e hidroxialquilo (C₁₋₃), cada uno no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo A. Aún en una variación adicional de cada una de las realizaciones y variaciones anteriores, R_{14c} se selecciona del grupo que consiste en yodo y bromo.

Se indica que los compuestos de la presente invención pueden estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Además se indica que el compuesto puede estar presente como una mezcla de estereoisómeros, o el compuesto puede estar presente como un estereoisómero individual.

En otro de sus aspectos, se proporciona una composición farmacéutica que comprende como principio activo un compuesto según una cualquiera de las realizaciones y variaciones anteriores. En una variación particular, la composición es una formulación sólida adaptada para administración oral. En otra variación particular, la composición es una formulación líquida adaptada para administración oral. Aún en otra variación particular, la composición es un comprimido. Todavía en otra variación particular, la composición es una formulación líquida adaptada para administración parenteral.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto según una cualquiera de las realizaciones y variaciones anteriores, en la que la composición se adapta para la administración por una vía seleccionada del grupo que consiste en por vía oral, por vía parenteral, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía intraarterial, por vía transdérmica, por vía sublingual, por vía intramuscular, por vía rectal, por vía transbucal, por vía intranasal, por vía liposomal, mediante inhalación, por vía vaginal, por vía intraocular, mediante administración local (por ejemplo mediante catéter o endoprótesis), por vía subcutánea, por vía intraadiposa, por vía intraarticular y por vía intratecal.

Aún en otro de sus aspectos, se proporciona un kit que comprende un compuesto de una cualquiera de las realizaciones y variaciones anteriores; e instrucciones que comprenden una o más formas de información seleccionadas del grupo que consiste en indicación de un estado patológico para el que debe administrarse la composición, información de almacenamiento de la composición, información de dosificación e instrucciones que se refieren a cómo administrar la composición. En una variación particular, el kit comprende el compuesto en una forma de dosis múltiple.

Todavía en otro de sus aspectos, se proporciona un artículo de fabricación que comprende un compuesto de una cualquiera de las realizaciones y variaciones anteriores; y materiales de acondicionamiento. En una variación, el material de acondicionamiento comprende un envase para alojar el compuesto. En una variación particular, el envase comprende una etiqueta que indica uno o más miembros del grupo que consiste en un estado patológico para el que va a administrarse el compuesto, información de almacenamiento, información de dosificación y/o instrucciones que se refieren a cómo administrar el compuesto. En otra variación, el artículo de fabricación comprende el compuesto en una forma de dosis múltiple.

Los estados patológicos que pueden tratarse usando los compuestos de la presente invención pueden seleccionarse del grupo que consiste en trastornos hiperproliferativos cancerosos (por ejemplo, cáncer de cerebro, de pulmón, de células escamosas, de vejiga, gástrico, pancreático, de mama, de cabeza, de cuello, renal, de riñón, de ovario, de próstata, colorrectal, epidermoide, esofágico, testicular, ginecológico o tiroideo); trastornos hiperproliferativos no cancerosos (por ejemplo, hiperplasia benigna de la piel (por ejemplo, psoriasis), reestenosis, e hipertrofia prostática benigna (BPH)); pancreatitis; enfermedad renal; dolor; impedir la implantación del blastocito; tratar enfermedades relacionadas con vasculogénesis o angiogénesis (por ejemplo, angiogénesis tumoral, enfermedad inflamatoria aguda y crónica tal como artritis reumatoide, aterosclerosis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedades cutáneas tales como psoriasis, eccema y esclerodermia, diabetes, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, degeneración macular asociada a la edad, hemangioma, glioma, melanoma, sarcoma de Kaposi y cáncer de ovario, de mama, de pulmón, pancreático, de próstata, de colon y epidermoide); asma; quimiotaxis de neutrófilos (por ejemplo, lesión por reperusión en infarto de miocardio y accidente cerebrovascular y artritis inflamatoria); choque séptico; enfermedades mediadas por células T en las que la supresión inmunitaria sería valiosa (por ejemplo, la prevención de rechazo de trasplantes de órganos, enfermedad de injerto contra huésped, lupus eritematoso, esclerosis múltiple y artritis reumatoide); aterosclerosis; inhibición de respuestas de queratinocitos a cócteles de factores de crecimiento; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y otras enfermedades.

Todavía en otro de sus aspectos, la presente invención se refiere a un compuesto de cualquiera de las realizaciones y variaciones anteriores para su uso como medicamento.

Todavía en uno adicional de sus aspectos, la presente invención se refiere a un compuesto según una cualquiera de las realizaciones y variaciones anteriores para su uso en el tratamiento de trastornos hiperproliferativos; pancreatitis;

enfermedad renal; dolor; enfermedades que implican la implantación del blastocito; enfermedades relacionadas con vasculogénesis o angiogénesis; asma; quimiotaxis de neutrófilos; choque septicémico; enfermedades mediadas por células T en las que la supresión inmunitaria sería valiosa; aterosclerosis; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) e inhibición de respuestas de queratinocitos a cócteles de factores de crecimiento.

Sales e hidratos de inhibidores de MEK

Debe reconocerse que los compuestos de la presente invención pueden estar presentes y opcionalmente administrarse en forma de sales e hidratos que se convierten *in vivo* en los compuestos de la presente invención.

Por ejemplo, está dentro del alcance de la presente invención convertir los compuestos de la presente invención en y usarlos en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables derivadas de diversos ácidos y bases orgánicos e inorgánicos según procedimientos bien conocidos en la técnica.

Cuando los compuestos de la presente invención presentan una forma de base libre, los compuestos pueden prepararse como una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable haciendo reaccionar la forma de base libre del compuesto con un ácido orgánico o inorgánico farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, hidrohaluros tales como clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato; otros ácidos minerales y sus sales correspondientes tales como sulfato, nitrato, fosfato, etc.; y alquil y monoarilsulfonatos tales como etanosulfonato, toluenosulfonato y bencenosulfonato; y otros ácidos orgánicos y sus sales correspondientes tales como acetato, tartrato, maleato, succinato, citrato, benzoato, salicilato y ascorbato. Las sales de adición de ácido adicionales de la presente invención incluyen, pero no se limitan a: adipato, alginato, arginato, aspartato, bisulfato, bisulfito, bromuro, butirato, canforato, canforsulfonato, caprilato, cloruro, clorobenzoato, ciclopentanopropionato, digluconato, dihidrogenofosfato, dinitrobenzoato, dodecilsulfato, fumarato, galacterato (a partir de ácido múcico), galacturonato, glucoheptonato, gluconato, glutamato, glicerofosfato, hemisuccinato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hipurato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxi-etanosulfonato, yoduro, isetionato, iso-butirato, lactato, lactobionato, malato, malonato, mandelato, metafosfato, metanosulfonato, metilbenzoato, monohidrogenofosfato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oxalato, oleato, pamoato, pectinato, persulfato, fenilacetato, 3-fenilpropionato, fosfato, fosfonato y ftalato. Debe reconocerse que las formas de base libre normalmente diferirán un tanto de sus formas de sal respectivas en las propiedades físicas tales como solubilidad en disolventes polares, pero por el contrario las sales son equivalentes a sus formas de base libre respectivas para los fines de la presente invención.

Cuando los compuestos de la presente invención presentan una forma de ácido libre, puede prepararse una sal de adición de base farmacéuticamente aceptable haciendo reaccionar la forma de ácido libre del compuesto con una base orgánica o inorgánica farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de tales bases son hidróxidos de metales alcalinos incluyendo hidróxidos de potasio, sodio y litio; hidróxidos de metales alcalinotérreos tales como hidróxidos de bario y calcio; alcóxidos de metales alcalinos, por ejemplo, etanolato de potasio y propanolato de sodio; y diversas bases orgánicas tales como hidróxido de amonio, piperidina, dietanolamina y N-metilglutamina. También se incluyen las sales de aluminio de los compuestos de la presente invención. Las sales de base adicionales de la presente invención incluyen, pero no se limitan a: sales de cobre, férricas, ferrosas, de litio, de magnesio, mangánicas, manganosas, de potasio, de sodio y de zinc. Las sales de base orgánicas incluyen, pero no se limitan a, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas incluyendo aminas sustituidas que se producen de manera natural, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas, por ejemplo, arginina, betaína, cafeína, cloroprocaína, colina, N,N'-dibenciletilendiamina (benzatina), dicitlohexilamina, dietanolamina, 2-dietilaminoetanol; 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilendiamina, N-etilmorfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, iso-propilamina, lidocaína, lisina, meglumina, N-metil-D-glucamina, morfolina, piperazina, piperidina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromina, trietanolamina, trietilamina, trimetilamina, tripropilamina y tris-(hidroximetil)-metilamina (trometamina). Debe reconocerse que las formas de ácido libre normalmente diferirán un tanto de sus formas de sal respectivas en las propiedades físicas como solubilidad en disolventes polares, pero por el contrario las sales son equivalentes a sus formas de ácido libre respectivas para los fines de la presente invención.

Los compuestos de la presente invención que comprenden grupos que contienen nitrógeno básico pueden estar cuaternizados con agentes tales como haluros de alquilo (C_{1-4}), por ejemplo, cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, isopropilo y terc-butilo; sulfatos de dialquilo (C_{1-4}), por ejemplo, sulfatos de dimetilo, dietilo y diamilo; haluros de alquilo (C_{10-18}), por ejemplo, cloruros, bromuros y yoduros de decilo, dodecilo, laurilo, miristilo y estearilo; y haluros de arilalquilo (C_{1-4}), por ejemplo, cloruro de bencilo y bromuro de fenetilo. Tales sales permiten la preparación de compuestos de la presente invención tanto solubles en agua como solubles en aceite.

Los N-óxidos de los compuestos según la presente invención pueden prepararse mediante métodos conocidos por los expertos habituales en la técnica. Por ejemplo, los N-óxidos pueden prepararse tratando una forma no oxidada del compuesto con un agente oxidante (por ejemplo, ácido trifluoroperacético, ácido permaleico, ácido perbenzoico, ácido peracético, ácido meta-cloroperoxibenzoico o similares) en un disolvente orgánico inerte adecuado (por ejemplo, un hidrocarburo halogenado tal como diclorometano) a aproximadamente 0°C. Alternativamente, los N-óxidos de los compuestos pueden prepararse a partir del N-óxido de un material de partida apropiado.

También pueden prepararse derivados protegidos de los compuestos de la presente invención. Pueden encontrarse

ejemplos de técnicas que pueden aplicarse a la creación de grupos protectores y su eliminación en T.W. Greene, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, 3ª edición, John Wiley & Sons, Inc. 1999.

Los compuestos de la presente invención también pueden prepararse convenientemente, o formarse durante el procedimiento de la invención, como solvatos (por ejemplo, hidratos). Los hidratos de los compuestos de la presente invención pueden prepararse convenientemente mediante recristalización en una mezcla de disolventes acuosos/orgánicos, usando disolventes orgánicos tales como dioxina, tetrahidrofurano o metanol.

Una "sal farmacéuticamente aceptable", tal como se usa en el presente documento, pretende abarcar cualquier compuesto según la presente invención que se utilice en forma de una sal del mismo, especialmente cuando la sal confiere al compuesto propiedades farmacocinéticas mejoradas en comparación con la forma libre del compuesto o una forma de sal diferente del compuesto. La forma de sal farmacéuticamente aceptable también puede conferir inicialmente propiedades farmacocinéticas deseables al compuesto que no presentaba previamente, e incluso puede afectar positivamente a la farmacodinamia del compuesto con respecto a su actividad terapéutica en el organismo. Un ejemplo de una propiedad farmacocinética que puede verse afectada favorablemente es la manera en la que el compuesto se transporta a través de las membranas celulares, que a su vez puede afectar directa y positivamente a la absorción, distribución, biotransformación y excreción del compuesto. Aunque la vía de administración de la composición farmacéutica es importante, y diversos factores anatómicos, fisiológicos y patológicos pueden afectar de manera crítica a la biodisponibilidad, la solubilidad del compuesto depende habitualmente del carácter de la forma de sal particular del mismo que utiliza. Un experto en la técnica apreciará que una disolución acuosa del compuesto proporcionará la absorción más rápida del compuesto en el organismo de un sujeto que está tratándose, mientras que las disoluciones y suspensiones lipídicas, así como formas farmacéuticas sólidas, darán como resultado una absorción menos rápida del compuesto.

Composiciones que comprenden inhibidores de MEK

Puede usarse una amplia variedad de composiciones y métodos de administración conjuntamente con los compuestos de la presente invención. Tales composiciones pueden incluir, además de los compuestos de la presente invención, excipientes farmacéuticos convencionales y otros agentes farmacéuticamente inactivos convencionales. Adicionalmente, las composiciones pueden incluir agentes activos además de los compuestos de la presente invención. Estos agentes activos adicionales pueden incluir compuestos adicionales según la invención y/o uno o más de otros agentes farmacéuticamente activos.

Las composiciones pueden estar en forma gaseosa, líquida, semilíquida o sólida, formuladas de una manera adecuada para la vía de administración que va a usarse. Para la administración oral, normalmente se usan cápsulas y comprimidos. Para la administración parenteral, normalmente se usa la reconstitución de un polvo liofilizado, preparado tal como se describe en el presente documento.

Las composiciones que comprenden compuestos de la presente invención pueden administrarse o coadministrarse por vía oral, por vía parenteral, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía intraarterial, por vía transdérmica, por vía sublingual, por vía intramuscular, por vía rectal, por vía transbucal, por vía intranasal, por vía liposomal, mediante inhalación, por vía vaginal, por vía intraocular, mediante administración local (por ejemplo mediante catéter o endoprótesis), por vía subcutánea, por vía intraadiposa, por vía intraarticular o por vía intratecal. Los compuestos y/o composiciones según la invención también pueden administrarse o coadministrarse en formas farmacéuticas de liberación lenta.

Los inhibidores de MEK y las composiciones que los comprenden pueden administrarse o coadministrarse en cualquier forma farmacéutica convencional. Se pretende que la coadministración en el contexto de esta invención signifique la administración de más de un agente terapéutico, uno de los cuales incluye un inhibidor de MEK, en el transcurso de un tratamiento coordinado para lograr un desenlace clínico mejorado. Tal coadministración también puede ser coextensiva, es decir, se produce durante periodos de tiempo solapantes.

Las disoluciones o suspensiones usadas para la aplicación parenteral, intradérmica, subcutánea o tópica pueden incluir opcionalmente uno o más de los siguientes componentes: un diluyente estéril, tal como agua para inyección, solución salina, aceite fijo, polietilenglicol, glicerina, propilenglicol u otro disolvente sintético; agentes antimicrobianos, tales como alcohol bencílico y metilparabenos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico y bisulfito de sodio; agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); tampones, tales como acetatos, citratos y fosfatos; agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sodio o dextrosa, y agentes para ajustar la acidez o alcalinidad de la composición, tales como agentes alcalinos o acidificantes o tampones como carbonatos, bicarbonatos, fosfatos, ácido clorhídrico, y ácidos orgánicos tales como ácido acético y cítrico. Las preparaciones parenterales pueden incluirse opcionalmente en ampollas, jeringuillas desechables o viales de dosis individual o múltiple compuestos por vidrio, plástico u otro material adecuado.

Cuando los compuestos según la presente invención presentan solubilidad insuficiente, pueden usarse métodos para solubilizar los compuestos. Los expertos en la técnica conocen tales métodos, e incluyen, pero no se limitan a, usar codisolventes, tales como dimetilsulfóxido (DMSO), usar tensioactivos, tales como TWEEN, o disolución en

bicarbonato de sodio acuoso. También pueden usarse derivados de los compuestos, tales como profármacos de los compuestos en la formulación de composiciones farmacéuticas eficaces.

Con la mezcla o adición de los compuestos según la presente invención a una composición, puede formarse una disolución, suspensión, emulsión o similares. La forma de la composición resultante dependerá de varios factores, incluyendo el modo de administración previsto y la solubilidad del compuesto en el portador o vehículo seleccionado. La concentración eficaz necesaria para mejorar la enfermedad que está tratándose puede determinarse empíricamente.

Las composiciones según la presente invención se proporcionan opcionalmente para la administración a seres humanos y animales en formas farmacéuticas unitarias, tales como comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, polvos secos para inhaladores, gránulos, disoluciones o suspensiones estériles parenterales, y disoluciones o suspensiones orales, y emulsiones de aceite en agua que contienen cantidades adecuadas de los compuestos, particularmente las sales farmacéuticamente aceptables, preferiblemente las sales de sodio, de los mismos. Los compuestos farmacéutica y terapéuticamente activos y derivados de los mismos normalmente se formulan y se administran en formas farmacéuticas unitarias o formas farmacéuticas múltiples. Las formas de dosis unitarias, tal como se usa en el presente documento, se refieren a unidades físicamente diferenciadas adecuadas para sujetos humanos y animales y acondicionadas individualmente tal como se conoce en la técnica. Cada dosis unitaria contiene una cantidad predeterminada del compuesto terapéuticamente activo suficiente para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el portador, vehículo o diluyente farmacéutico requerido. Los ejemplos de formas de dosis unitarias incluyen ampollas y jeringuillas, comprimidos o cápsulas acondicionados individualmente. Las formas de dosis unitaria pueden administrarse en fracciones o múltiplos de las mismas. Una forma de dosis múltiple es una pluralidad de formas farmacéuticas unitarias idénticas acondicionadas en un envase individual que va a administrarse en forma de dosis unitaria segregada. Los ejemplos de formas de dosis múltiple incluyen viales, botellas de comprimidos o cápsulas o botellas de pinta o galones. Por tanto, la forma de dosis múltiple es un múltiplo de dosis unitarias que no están segregadas en el material de acondicionamiento.

Además de uno o más compuestos según la presente invención, la composición puede comprender: un diluyente tal como lactosa, sacarosa, fosfato de dicalcio o carboximetilcelulosa; un lubricante, tal como estearato de magnesio, estearato de calcio y talco; y un aglutinante tal como almidón, gomas naturales, tales como goma arábica, gelatina, glucosa, molasas, polivinilpirrolidina, celulosa y derivados de las mismas, povidona, crospovidonas y otros aglutinantes de este tipo conocidos por los expertos en la técnica. Las composiciones líquidas que pueden administrarse farmacéuticamente pueden prepararse, por ejemplo, disolviendo, dispersando o mezclando de otra manera un compuesto activo tal como se definió anteriormente y adyuvantes farmacéuticos opcionales en un portador, tal como, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, glicoles, etanol y similares, para formar una disolución o suspensión. Si se desea, la composición farmacéutica que va a administrarse también puede contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes o agentes de solubilización, agentes tamponantes de pH y similares, por ejemplo, acetato, citrato de sodio, derivados de ciclodextrina, monolaurato de sorbitano, trietanolamina, acetato de sodio, oleato de trietanolamina y otros de tales agentes. Los métodos actuales de preparación de tales formas farmacéuticas se conocen en la técnica o resultarán evidentes para los expertos en esta técnica; por ejemplo, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 15ª edición, 1975. La composición o formulación que va a administrarse contendrá, en cualquier caso, una cantidad suficiente de un inhibidor de la presente invención para reducir la actividad de MEK *in vivo*, tratando de este modo el estado patológico del sujeto.

Las formas farmacéuticas o composiciones pueden comprender opcionalmente uno o más compuestos según la presente invención en el intervalo del 0,005% al 100% (peso/peso) comprendiendo el resto sustancias adicionales tales como las descritas en el presente documento. Para la administración oral, una composición farmacéuticamente aceptable puede comprender opcionalmente uno cualquiera o los excipientes empleados más comúnmente, tales como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, talco, derivados de celulosa, croscarmelosa de sodio, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio, sacarina sódica, talco. Tales composiciones incluyen disoluciones, suspensiones, comprimidos, cápsulas, polvos, polvos secos para inhaladores y formulaciones de liberación sostenida, tales como, pero sin limitarse a, implantes y sistemas de administración microencapsulados, y polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como colágeno, acetato de etilvinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), poliortoésteres, poli(ácido láctico) y otros. Los expertos en la técnica conocen métodos para preparar estas formulaciones. Las composiciones pueden contener opcionalmente el 0,01%-100% (peso/peso) de uno o más inhibidores de MEK, opcionalmente el 0,1-95%, y opcionalmente el 1-95%.

Pueden prepararse sales, preferiblemente sales de sodio, de los inhibidores con portadores que protegen el compuesto frente a la eliminación rápida del organismo, tal como formulaciones de liberación a lo largo del tiempo o recubrimientos. Las formulaciones pueden incluir además otros compuestos activos para obtener combinaciones deseadas de propiedades.

Formulaciones para la administración oral

Las formas de dosificación farmacéutica orales pueden estar como un sólido, gel o líquido. Los ejemplos de formas

- farmacéuticas sólidas incluyen, pero no se limitan a comprimidos, cápsulas, gránulos y polvos a granel. Ejemplos más específicos de comprimidos orales incluyen pastillas para chupar y comprimidos masticables, fabricados por compresión que pueden estar recubiertos entéricamente, recubiertos con azúcar o recubiertos con película. Los ejemplos de cápsulas incluyen cápsulas de gelatina dura o blanda. Los gránulos y polvos pueden proporcionarse en formas no efervescentes o efervescentes. Cada uno puede combinarse con otros componentes conocidos por los expertos en la técnica.
- En determinadas realizaciones, los compuestos según la presente invención se proporcionan como formas farmacéuticas sólidas, preferiblemente cápsulas o comprimidos. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener opcionalmente uno o más de los siguientes componentes o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante; un diluyente; un agente disgregante; un lubricante; un deslizante; un agente edulcorante; y un agente aromatizante.
- Los ejemplos de aglutinantes que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, celulosa microcristalina, goma tragacanto, disolución de glucosa, mucílago de goma arábiga, disolución de gelatina, sacarosa y pasta de almidón.
- Los ejemplos de lubricantes que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, talco, almidón, estearato de magnesio o calcio, lycopodio y ácido esteárico.
- Los ejemplos de diluentes que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, lactosa, sacarosa, almidón, caolín, sal, manitol y fosfato de dicalcio.
- Los ejemplos de deslizantes que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, dióxido de sílice coloidal.
- Los ejemplos de agentes disgregantes que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, croscarmelosa de sodio, glicolato sódico de almidón, ácido algínico, almidón de maíz, almidón de patata, bentonita, metilcelulosa, agar y carboximetilcelulosa.
- Los ejemplos de agentes colorantes que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los colorantes FD y C solubles en agua certificados aprobados, mezclas de los mismos; y colorantes FD y C insolubles en agua suspendidos en hidrato de alúmina.
- Los ejemplos de agentes edulcorantes que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, sacarosa, lactosa, manitol y agentes edulcorantes artificiales tales como ciclamato de sodio y sacarina, y cualquier número de aromas secados por pulverización.
- Los ejemplos de agentes aromatizantes que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, aromas naturales extraídos de plantas tales como frutos y combinaciones sintéticas de compuestos que producen una sensación agradable, tales como, pero sin limitarse a menta y salicilato de metilo.
- Los ejemplos de agentes humectantes que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, monoestearato de propilenglicol, monooleato de sorbitano, monolaurato de dietilenglicol y lauril éter de polioxietileno.
- Los ejemplos de recubrimientos antieméticos que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, ácidos grasos, grasas, ceras, laca, laca amoniacal y ftalatos de acetato de celulosa.
- Los ejemplos de recubrimientos de película que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, polietilenglicol 4000 y ftalato de acetato de celulosa.
- Si se desea la administración oral, la sal del compuesto puede proporcionarse opcionalmente en una composición que la protege del entorno ácido del estómago. Por ejemplo, la composición puede formularse en un recubrimiento entérico que mantiene su integridad en el estómago y libera el compuesto activo en el intestino. La composición también puede formularse en combinación con un antiácido u otro componente de este tipo.
- Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, opcionalmente puede comprender adicionalmente un portador líquido tal como un aceite graso. Además, las formas unitarias de dosificación opcionalmente pueden comprender otros materiales diversos que modifican la forma física de la unidad de dosificación, por ejemplo, recubrimientos de azúcar y otros agentes entéricos.
- Los compuestos según la presente invención también pueden administrarse como componente de un elixir, suspensión, jarabe, oblea, gotas para rociado, chicle o similares. Un jarabe puede comprender opcionalmente, además de los compuestos activos, sacarosa como agente edulcorante y determinados conservantes, tintes y colorantes y aromas.
- Los compuestos de la presente invención también pueden mezclarse con otros materiales activos que no afectan a la acción deseada, o con materiales que complementan la acción deseada, tales como antiácidos, bloqueantes de

H2 y diuréticos. Por ejemplo, si un compuesto se usa para tratar asma o hipertensión, puede usarse con otros agentes broncodilatadores y antihipertensores, respectivamente.

Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables que pueden incluirse en comprimidos que comprenden compuestos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, aglutinantes, lubricantes, diluyentes, agentes disgregantes, agentes colorantes, agentes aromatizantes y agentes humectantes. Los comprimidos recubiertos entéricamente, debido al recubrimiento entérico, resisten la acción del ácido estomacal y se disuelven o disgregan en los intestinos neutros o alcalinos. Los comprimidos recubiertos con azúcar pueden ser comprimidos fabricados por compresión a los que se les aplican diferentes capas de sustancias farmacéuticamente aceptables. Los comprimidos recubiertos con película pueden ser comprimidos fabricados por compresión que se han recubierto con polímeros u otro recubrimiento adecuado. Los comprimidos fabricados por compresión múltiples pueden ser comprimidos fabricados por compresión compuestos por más de un ciclo de compresión utilizando las sustancias farmacéuticamente aceptables mencionadas anteriormente. Los agentes colorantes también pueden usarse en comprimidos. Los agentes aromatizantes y edulcorantes pueden usarse en comprimidos, y son especialmente útiles en la formación de comprimidos masticables y pastillas para chupar.

Los ejemplos de formas farmacéuticas orales líquidas que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, disoluciones acuosas, emulsiones, suspensiones, disoluciones y/o suspensiones reconstituidas a partir de gránulos no efervescentes y preparaciones efervescentes reconstituidas a partir de gránulos efervescentes.

Los ejemplos de disoluciones acuosas que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, elixires y jarabes. Tal como se usa en el presente documento, elixires se refiere a preparaciones hidroalcohólicas, transparentes, edulcoradas. Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en elixires incluyen, pero no se limitan a disolventes. Los ejemplos particulares de disolventes que pueden usarse incluyen glicerina, sorbitol, alcohol etílico y jarabe. Tal como se usa en el presente documento, jarabes se refiere a disoluciones acuosas concentradas de un azúcar, por ejemplo, sacarosa. Los jarabes opcionalmente pueden comprender además un conservante.

Emulsiones se refiere a sistemas de dos fases en los que un líquido se dispersa en forma de glóbulos pequeños por la totalidad del otro líquido. Las emulsiones pueden ser opcionalmente emulsiones de aceite en agua o agua en aceite. Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en emulsiones incluyen, pero no se limitan a líquidos no acuosos, agentes emulsionantes y conservantes.

Los ejemplos de sustancias farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en gránulos no efervescentes, que van a reconstituirse en una forma farmacéutica oral líquida, incluyen diluyentes, edulcorantes y agentes humectantes.

Los ejemplos de sustancias farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en gránulos efervescentes, que van a reconstituirse en una forma farmacéutica oral líquida, incluyen ácidos orgánicos y una fuente de dióxido de carbono.

Los agentes colorantes y aromatizantes pueden usarse opcionalmente en todas las formas farmacéuticas anteriores.

Los ejemplos particulares de conservantes que pueden usarse incluyen glicerina, metil y propilparabeno, ácido benzoico, benzoato de sodio y alcohol.

Los ejemplos particulares de líquidos no acuosos que pueden usarse en emulsiones incluyen aceite mineral y aceite de semilla de algodón.

Los ejemplos particulares de agentes emulsionantes que pueden usarse incluyen gelatina, goma arábica, tragacanto, bentonita y tensioactivos tales como monooleato de polioxietilensorbitano.

Los ejemplos particulares de agentes de suspensión que pueden usarse incluyen carboximetilcelulosa de sodio, pectina, tragacanto, Veegum y goma arábica. Los diluyentes incluyen lactosa y sacarosa. Los agentes edulcorantes incluyen sacarosa, jarabes, glicerina y agentes edulcorantes artificiales tales como ciclamato de sodio y sacarina.

Los ejemplos particulares de agentes humectantes que pueden usarse incluyen monoestearato de propilenglicol, monooleato de sorbitano, monolaurato de dietilenglicol y lauril éter de polioxietileno.

Los ejemplos particulares de ácidos orgánicos que pueden usarse incluyen ácido cítrico y tartárico.

Las fuentes de dióxido de carbono que pueden usarse en composiciones efervescentes incluyen bicarbonato de sodio y carbonato de sodio. Los agentes colorantes incluyen cualquiera de los colorantes FD y C solubles en agua aprobados certificados, y mezclas de los mismos.

Los ejemplos particulares de agentes aromatizantes que pueden usarse incluyen aromas naturales extraídos de plantas tales como frutas, y combinaciones sintéticas de compuestos que producen una sensación de sabor

agradable.

Para una forma farmacéutica sólida, la disolución o suspensión, en por ejemplo carbonato de propileno, aceites vegetales o triglicéridos, se encapsula preferiblemente en una cápsula de gelatina. Tales disoluciones, y la preparación y encapsulación de las mismas, se dan a conocer en las patentes estadounidenses n.ºs 4.328.245; 4.409.239; y 4.410.545. Para una forma farmacéutica líquida, la disolución, por ejemplo en un polietilenglicol, puede diluirse con una cantidad suficiente de un portador líquido farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, agua, para medirse fácilmente durante la administración.

Alternativamente, las formulaciones orales líquidas o semisólidas pueden prepararse disolviendo o dispersando el compuesto activo o la sal en aceites vegetales, glicoles, triglicéridos, ésteres de propilenglicol (por ejemplo, carbonato de propileno) y otros de tales portadores, y encapsulando estas disoluciones o suspensiones en vainas de cápsulas de gelatina dura o blanda. Otras formulaciones útiles incluyen las expuestas en las patentes estadounidenses n.ºs Re 28.819 y 4.358.603.

Inyectables, disoluciones y emulsiones

La presente invención también se refiere a composiciones diseñadas para administrar los compuestos de la presente invención mediante administración parenteral, generalmente caracterizada por inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa. Los inyectables pueden prepararse en cualquier forma convencional, por ejemplo como disoluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para la disolución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones.

Los ejemplos de excipientes que pueden usarse junto con inyectables según la presente invención incluyen, pero no se limitan a agua, solución salina, dextrosa, glicerol o etanol. Las composiciones inyectables también pueden comprender opcionalmente cantidades minoritarias de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes de pH, estabilizadores, potenciadores de la solubilidad, y otros de tales agentes, tales como por ejemplo, acetato de sodio, monolaurato de sorbitano, oleato de trietanolamina y ciclodextrinas. También se contempla en el presente documento la implantación de un sistema de liberación lenta o liberación sostenida, de manera que se mantenga un nivel constante de dosificación (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 3.710.795). El porcentaje de compuesto activo contenido en tales composiciones parenterales es altamente dependiente de la naturaleza específica del mismo, así como de la actividad del compuesto y las necesidades del sujeto.

La administración parenteral de las formulaciones incluye administraciones intravenosas, subcutáneas e intramusculares. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen disoluciones estériles listas para inyección, productos solubles secos estériles, tales como los polvos liofilizados descritos en el presente documento, listos para combinarse con un disolvente justo antes de su uso, incluyendo comprimidos hipodérmicos, suspensiones estériles listas para inyección, productos insolubles secos estériles listos para combinarse con un vehículo justo antes de su uso y emulsiones estériles. Las disoluciones pueden ser o bien acuosas o bien no acuosas.

Cuando se administran por vía intravenosa, los ejemplos de portadores adecuados incluyen, pero no se limitan a solución salina fisiológica o solución salina tamponada con fosfato (PBS) y disoluciones que contienen agentes espesantes y de solubilización, tales como glucosa, polietilenglicol y polipropilenglicol y mezclas de los mismos.

Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables que pueden usarse opcionalmente en preparaciones parenterales incluyen, pero no se limitan a vehículos acuosos, vehículos no acuosos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos, tampones, antioxidantes, anestésicos locales, agentes de suspensión y dispersión, agentes emulsionantes, agentes secuestrantes o quelantes y otras sustancias farmacéuticamente aceptables.

Los ejemplos de vehículos acuosos que pueden usarse opcionalmente incluyen inyección de cloruro de sodio, inyección de solución Ringer, inyección de dextrosa isotónica, inyección de agua estéril, inyección de solución de Ringer con lactato y dextrosa.

Los ejemplos de vehículos parenterales no acuosos que pueden usarse opcionalmente incluyen aceites fijos de origen vegetal, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo y aceite de cacahuete.

Los agentes antimicrobianos en concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas pueden añadirse a preparaciones parenterales, particularmente cuando las preparaciones están acondicionadas en envases de dosis múltiple y por tanto diseñadas para almacenarse y retirarse múltiples alícuotas. Los ejemplos de agentes antimicrobianos que pueden usarse incluyen fenoles o cresoles, mercuriales, alcohol bencílico, clorobutanol, ésteres del ácido metil y propil-p-hidroxibenzoico, timerosal, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio.

Los ejemplos de agentes isotónicos que pueden usarse incluyen cloruro de sodio y dextrosa. Los ejemplos de tampones que pueden usarse incluyen fosfato y citrato. Los ejemplos de antioxidantes que pueden usarse incluyen

bisulfato de sodio. Los ejemplos de anestésicos locales que pueden usarse incluyen clorhidrato de procaína. Los ejemplos de agentes de suspensión y dispersión que pueden usarse incluyen carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropilmetilcelulosa y polivinilpirrolidona. Los ejemplos de agentes emulsionantes que pueden usarse incluyen polisorbato 80 (TWEEN 80). Un agente secuestrante o quelante de iones metálicos incluye EDTA.

5 Los portadores farmacéuticos también pueden incluir opcionalmente alcohol etílico, polietilenglicol y propilenglicol para vehículos miscibles en agua e hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico para el ajuste de pH.

10 La concentración de un inhibidor en la formulación parenteral puede ajustarse de modo que una inyección administra una cantidad farmacéuticamente eficaz suficiente para producir el efecto farmacológico deseado. La concentración exacta de un inhibidor y/o dosificación que va a usarse dependerá en última instancia de la edad, el peso y el estado del paciente o animal tal como se conoce en la técnica.

15 Las preparaciones parenterales de dosis unitaria pueden acondicionarse en una ampolla, un vial o una jeringuilla con una aguja. Todas las preparaciones para la administración parenteral deben ser estériles, tal como se conoce y practica en la técnica.

20 Los inyectables pueden diseñarse para la administración local y sistémica. Normalmente una dosificación terapéuticamente eficaz se formula para contener una concentración de al menos aproximadamente el 0,1% p/p hasta aproximadamente el 90% p/p o más, preferiblemente más del 1% p/p del inhibidor de MEK en el/los tejido(s) tratado(s). El inhibidor puede administrarse de una vez, o puede dividirse en varias dosis más pequeñas para administrarse en intervalos de tiempo. Se entiende que la dosificación y la duración precisas del tratamiento serán una función de la ubicación donde se administra la composición por vía parenteral, del portador y de otras variables que pueden determinarse empíricamente usando protocolos de prueba conocidos o mediante extrapolación de datos de prueba *in vivo* o *in vitro*. Debe observarse que las concentraciones y los valores de dosificación también pueden variar con la edad del individuo tratado. Debe entenderse además que para cualquier sujeto particular, puede no ser necesario ajustar los regímenes de dosificación específicos a lo largo del tiempo según la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las formulaciones. Por tanto, se pretende que los intervalos de concentración tal como se exponen en el presente documento sean a modo de ejemplo y no se pretende que limiten el alcance o la práctica de las formulaciones reivindicadas.

30 El inhibidor de MEK puede suspenderse opcionalmente en forma micronizada u otra forma adecuada o puede derivatizarse para producir un producto activo más soluble o para producir un profármaco. La forma de la mezcla resultante depende de varios factores, incluyendo el modo previsto de administración y la solubilidad del compuesto en el portador o vehículo seleccionado. La concentración eficaz es suficiente para mejorar los síntomas del estado patológico y puede determinarse empíricamente.

Polvos liofilizados

40 Los compuestos de la presente invención también pueden prepararse como polvos liofilizados, que pueden reconstituirse para su administración como disoluciones, emulsiones y otras mezclas. Los polvos liofilizados también pueden formularse como sólidos o geles.

45 Puede prepararse un polvo liofilizado, estéril, disolviendo el compuesto en una disolución tampón de fosfato de sodio que contiene dextrosa u otro excipiente adecuado. La filtración estéril posterior de la disolución seguida por liofilización en condiciones normales conocidas por los expertos en la técnica proporciona la formulación deseada. Brevemente, el polvo liofilizado puede prepararse opcionalmente disolviendo dextrosa, sorbitol, fructosa, jarabe de maíz, xilitol, glicerina, glucosa, sacarosa u otro agente adecuado, aproximadamente al 1-20%, de manera preferible aproximadamente del 5 al 15%, en un tampón adecuado, tal como citrato, fosfato de sodio o potasio u otro tampón conocido por los expertos en la técnica normalmente a aproximadamente pH neutro. Entonces, se añade un inhibidor de MEK a la mezcla resultante, preferiblemente por encima de temperatura ambiente, más preferiblemente a aproximadamente 30-35°C y se agita hasta que se disuelve. Se diluye la mezcla resultante añadiendo más tampón hasta una concentración deseada. La mezcla resultante se filtra en condiciones estériles o se trata para eliminar los materiales particulados y para garantizar la esterilidad, y se distribuye en viales para la liofilización. Cada vial puede contener una única dosificación o múltiples dosificaciones del inhibidor.

Administración tópica

60 Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse como mezclas tópicas. Las mezclas tópicas pueden usarse para administración local y sistémica. La mezcla resultante puede ser una disolución, suspensión, emulsiones o similares y se formulan como cremas, geles, pomadas, emulsiones, disoluciones, elixires, lociones, suspensiones, tinturas, pastas, espumas, aerosoles, irrigaciones, pulverizaciones, supositorios, vendajes, parches dérmicos o cualquier otra formulación adecuada para administración tópica.

65 Los inhibidores de MEK pueden formularse como aerosoles para administración tópica, tal como mediante

inhalación (véanse las patentes estadounidenses n.ºs 4.044.126, 4.414.209 y 4.364.923, que describen aerosoles para la administración de un esteroide útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, particularmente asma). Estas formulaciones para administración a las vías respiratorias pueden estar en forma de un aerosol o disolución para un nebulizador, o como un polvo microfino para insuflación, solo o en combinación con un portador inerte tal como lactosa. En tal caso, las partículas de la formulación normalmente tendrán diámetros inferiores a 50 micrómetros, preferiblemente inferiores a 10 micrómetros.

Los inhibidores también pueden formularse para aplicación local o tópica, tal como para aplicación tópica a la piel y las membranas mucosas, tal como en el ojo, en forma de geles, cremas y lociones y para la aplicación al ojo o para aplicación intracisternal o intraespinal. Se contempla la administración tópica para la administración transdérmica y también para la administración a los ojos o la mucosa, o para terapias de inhalación. También pueden administrarse disoluciones nasales del inhibidor de MEK solo o en combinación con otros excipientes farmacéuticamente aceptables.

Formulaciones para otras vías de administración

Dependiendo del estado patológico que esté tratándose también pueden usarse otras vías de administración, tales como aplicación tópica, parches transdérmicos y administración rectal. Por ejemplo, las formas de dosificación farmacéutica para administración rectal son supositorios, cápsulas y comprimidos rectales para efecto sistémico. Supositorios rectales tal como se usa en el presente documento significan cuerpos sólidos para su inserción en el recto que se funden o ablandan a la temperatura corporal liberando uno o más principios farmacológicos o terapéuticamente activos. Las sustancias farmacéuticamente aceptables utilizadas en supositorios rectales son bases o vehículos y agentes para elevar el punto de fusión. Los ejemplos de bases incluyen manteca de cacao (aceite de teobroma), glicerina-gelatina, Carbowax, (polioxietilenglicol) y mezclas apropiadas de mono, di y triglicéridos de ácidos grasos. Pueden usarse combinaciones de las diversas bases. Los agentes para elevar el punto de fusión de los supositorios incluyen espermaceti y cera. Los supositorios rectales pueden prepararse o bien mediante el método de compresión o bien mediante moldeo. El peso típico de un supositorio rectal es de aproximadamente 2 a 3 g. Los comprimidos y cápsulas para administración rectal pueden fabricarse usando la misma sustancia farmacéuticamente aceptable y mediante los mismos métodos que para las formulaciones para administración oral.

Ejemplos de formulaciones

Los siguientes son ejemplos particulares de formulaciones orales, intravenosas y en comprimidos que pueden usarse opcionalmente con los compuestos de la presente invención. Se indica que estas formulaciones pueden variarse dependiendo del compuesto particular que esté usándose y de la indicación para la que debe usarse la formulación.

FORMULACIÓN ORAL

Compuesto de la presente invención	10-100 mg
Ácido cítrico monohidratado	105 mg
Hidróxido de sodio	18 mg
Aromatizante	
Agua	c.s.p. 100 ml

FORMULACIÓN INTRAVENOSA

Compuesto de la presente invención	0,1-10 mg
Dextrosa monohidratada	c.s.p. hacerla isotónica
Ácido cítrico monohidratado	1,05 mg
Hidróxido de sodio	0,18 mg
Agua para inyección	c.s.p. 1,0 ml

FORMULACIÓN EN COMPRIMIDOS

Compuesto de la presente invención	1%
Celulosa microcristalina	73%
Ácido esteárico	25%
Sílice coloidal	1%.

Kits que comprenden inhibidores de MEK

La invención también se refiere a kits y otros artículos de fabricación para tratar enfermedades asociadas con MEK. Se indica que con enfermedades se pretende cubrir todos los estados para los que MEK presenta actividad que contribuye a la patología y/o sintomatología del estado.

En una realización, se proporciona un kit que comprende una composición que comprende al menos un inhibidor de la presente invención en combinación con instrucciones. Las instrucciones pueden indicar el estado patológico para el que debe administrarse la composición, información de almacenamiento, información de dosificación y/o instrucciones que se refieren a cómo administrar la composición. El kit también puede comprender materiales de acondicionamiento. El material de acondicionamiento puede comprender un envase para alojar la composición. El kit también puede comprender opcionalmente componentes adicionales, tales como jeringuillas para la administración de la composición. El kit puede comprender la composición en formas de dosis individuales o múltiples.

En otra realización, se proporciona un artículo de fabricación que comprende una composición que comprende al menos un inhibidor de la presente invención en combinación con materiales de acondicionamiento. El material de acondicionamiento puede comprender un envase para alojar la composición. El envase puede comprender opcionalmente una etiqueta que indica el estado patológico para el que debe administrarse la composición, información de almacenamiento, información de dosificación y/o instrucciones que se refieren a cómo administrar la composición. El kit también puede comprender opcionalmente componentes adicionales, tales como jeringuillas para la administración de la composición. El kit puede comprender la composición en formas de dosis individuales o múltiples.

Se indica que el material de acondicionamiento usado en kits y artículos de fabricación según la presente invención puede formar una pluralidad de envases divididos tales como una botella dividida o un paquete de hoja dividido. El envase puede ser de cualquier conformación o forma convencional tal como se conoce en la técnica que esté compuesto por un material farmacéuticamente aceptable, por ejemplo una caja de papel o cartón, una botella o bote de vidrio o plástico, una bolsa resellable (por ejemplo, para contener un “repuesto” de comprimidos para su colocación en un envase diferente) o un paquete de blíster con dosis individuales para presionar el paquete según un calendario terapéutico. El envase que se emplee dependerá de la forma farmacéutica exacta implicada, por ejemplo una caja de cartón convencional en general no se usaría para contener una suspensión líquida. Es factible que puedan usarse más de un envase juntos en un paquete individual para comercializar una forma farmacéutica individual. Por ejemplo, los comprimidos pueden estar contenidos en una botella que a su vez está contenida dentro de una caja. Normalmente, el kit incluye indicaciones para la administración de los componentes por separado. La forma del kit es particularmente ventajosa cuando los componentes separados se administran preferiblemente en diferentes formas farmacéuticas (por ejemplo, oral, tópica, transdérmica y parenteral), se administran a diferentes intervalos de dosificación o cuando el médico que prescribe desea el ajuste de la dosis de los componentes individuales de la combinación.

Un ejemplo particular de un kit según la presente invención es un denominado paquete de blíster. Los paquetes de blíster se conocen bien en la industria de acondicionamiento y se están usando ampliamente para el acondicionamiento de formas de dosificación farmacéutica unitarias (comprimidos, cápsulas y similares). Los paquetes de blíster consisten en general en una lámina de material relativamente rígido cubierto con una hoja de un material de plástico preferiblemente transparente. Durante el procedimiento de acondicionamiento se forman huecos en la hoja de plástico. Los huecos tienen el tamaño y la conformación de comprimidos o cápsulas individuales que van a acondicionarse o pueden tener el tamaño y la conformación para alojar múltiples comprimidos y/o cápsulas que van a acondicionarse. A continuación, los comprimidos o cápsulas se colocan en los huecos en consecuencia y la lámina de material relativamente rígido se sella contra la hoja de plástico en la cara de la hoja que es opuesta con respecto a la dirección en la que se formaron los huecos. Como resultado, los comprimidos o cápsulas se sellan individualmente o se sellan colectivamente, según se desee, en los huecos entre la hoja de plástico y la lámina. Preferiblemente, la resistencia de la lámina es tal que los comprimidos o cápsulas pueden retirarse del paquete de blíster aplicando presión manualmente sobre los huecos por lo que se forma una abertura en la lámina en el lugar del hueco. El comprimido o cápsula puede retirarse entonces a través de dicha abertura.

Otra realización específica de un kit es un dispensador diseñado para dispensar las dosis diarias una cada vez en el orden de su uso pretendido. Preferiblemente, el dispensador está equipado con un recordatorio, para facilitar adicionalmente el cumplimiento con el régimen. Un ejemplo de un recordatorio de este tipo es un contador mecánico que indica el número de dosis diarias que se han dispensado. Otro ejemplo de un recordatorio de este tipo es una memoria de microchip alimentada por batería acoplada con un lector de cristal líquido, o una señal de recuerdo audible que, por ejemplo, lee la fecha en que se ha tomado la última dosis diaria y/o recuerda cuando debe tomarse la siguiente dosis.

Dosificación, huésped y seguridad

Los compuestos de la presente invención son estables y pueden usarse con seguridad. En particular, los compuestos de la presente invención son útiles como inhibidores de MEK para una variedad de sujetos (por

ejemplo, seres humanos, mamíferos no humanos y no mamíferos). La dosis óptima puede variar dependiendo de condiciones tales como, por ejemplo, el tipo de sujeto, el peso corporal del sujeto, la vía de administración y propiedades específicas del compuesto particular que está usándose. En general, la dosis diaria para administración oral a un adulto (peso corporal de aproximadamente 60 kg) es aproximadamente de 1 a 1000 mg, aproximadamente de 3 a 300 mg o aproximadamente de 10 a 200 mg. Se apreciará que la dosis diaria puede facilitarse en una única administración o en múltiples (por ejemplo, 2 ó 3) porciones al día.

Terapias de combinación

Una amplia variedad de agentes terapéuticos pueden tener un efecto aditivo o sinérgico terapéutico con inhibidores de MEK según la presente invención. Tales agentes terapéuticos pueden combinarse de manera aditiva o sinérgica con los inhibidores de MEK para inhibir el crecimiento celular no deseado, tal como el crecimiento celular inapropiado que da como resultado crecimiento tumoral o estados benignos no deseados.

En una realización, se proporciona un compuesto según la presente invención en combinación con un agente anti-proliferativo para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa celular, en el que las células se tratan con el compuesto según la presente invención antes, al mismo tiempo y/o después de tratar las células con el agente anti-proliferativo, denominado en el presente documento terapia de combinación. Se indica que el tratamiento de un agente antes de otro se denomina en el presente documento terapia secuencial, aunque los agentes también se administren juntos. Se indica que la terapia de combinación pretende cubrir cuando los agentes se administran uno antes o después del otro (terapia secuencial) así como cuando los agentes se administran al mismo tiempo.

Los ejemplos de agentes terapéuticos que pueden usarse en combinación con inhibidores de MEK incluyen, pero no se limitan a, agentes anticancerígenos, agentes alquilantes, agentes antibióticos, agentes antimetabólicos, agentes hormonales, agentes derivados de plantas y agentes biológicos.

Los agentes alquilantes son compuestos polifuncionales que tienen la capacidad de sustituir iones hidrógeno por grupos alquilo. Los ejemplos de agentes alquilantes incluyen, pero no se limitan a, biscloroetilaminas (mostaza nitrogenada, por ejemplo clorambucilo, ciclofosfamida, ifosfamida, mecloretamina, melfalán, mostaza de uracilo), aziridinas (por ejemplo tiotepa), alquilalcanosulfonatos (por ejemplo busulfano), nitrosoureas (por ejemplo carmustina, lomustina, estreptozocina), agentes alquilantes no clásicos (altretamina, dacarbazina y procarbazina), compuestos de platino (carboplatino y cisplatino). Estos compuestos reaccionan con grupos fosfato, amino, hidroxilo, sulfhidrilo, carboxilo e imidazol. En condiciones fisiológicas, estos fármacos se ionizan y producen un ion cargado positivamente que se une a ácidos nucleicos y proteínas propensos, lo que conduce a detención del ciclo celular y/o muerte celular. La terapia de combinación que incluye un inhibidor de MEK y un agente alquilante puede tener efectos sinérgicos terapéuticos sobre el cáncer y reducir los efectos secundarios asociados con estos agentes quimioterápicos.

Los agentes antibióticos son un grupo de fármacos que se producen de una manera similar a los antibióticos como una modificación de productos naturales. Los ejemplos de agentes antibióticos incluyen, pero no se limitan a, antraciclinas (por ejemplo doxorubicina, daunorubicina, epirubicina, idarubicina y antracenodiona), mitomicina C, bleomicina, dactinomycin, plicaticina. Estos agentes antibióticos interfieren con el crecimiento celular seleccionando como diana diferentes componentes celulares. Por ejemplo, se cree en general que las antraciclinas interfieren con la acción de la ADN topoisomerasa II en las regiones del ADN transcripcionalmente activo, lo que conduce a escisiones en la cadena de ADN. Se cree en general que la bleomicina es un quelante de hierro y forma un complejo activado, que entonces se une a bases de ADN, produciendo escisiones de cadena y muerte celular. La terapia de combinación que incluye un inhibidor de MEK y un agente antibiótico puede tener efectos sinérgicos terapéuticos sobre el cáncer y reducir los efectos secundarios asociados con estos agentes quimioterápicos.

Los agentes antimetabólicos son un grupo de fármacos que interfieren con procesos metabólicos vitales para la fisiología y proliferación de células cancerosas. Las células cancerosas que proliferan activamente requieren síntesis continua de grandes cantidades de ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y otros constituyentes celulares vitales. Muchos de los antimetabolitos inhiben la síntesis de nucleósidos de purina o pirimidina o inhiben las enzimas de la replicación del ADN. Algunos antimetabolitos también interfieren con la síntesis de ribonucleósidos y ARN y/o también con el metabolismo de aminoácidos y la síntesis de proteínas. Al interferir con la síntesis de constituyentes celulares vitales, los antimetabolitos pueden retrasar o detener el crecimiento de las células cancerosas. Los ejemplos de agentes antimetabólicos incluyen, pero no se limitan a, fluorouracilo (5-FU), floxuridina (5-FUdR), metotrexato, leucovorina, hidroxiaurea, tioguanina (6-TG), mercaptopurina (6-MP), citarabina, pentostatina, fosfato de fludarabina, cladribina (2-CDA), asparaginasa y gemcitabina. La terapia de combinación que incluye un inhibidor de MEK y un agente antimetabólico puede tener efectos sinérgicos terapéuticos sobre el cáncer y reducir los efectos secundarios asociados con estos agentes quimioterápicos.

Los agentes hormonales son un grupo de fármacos que regulan el crecimiento y el desarrollo de sus órganos diana. La mayoría de los agentes hormonales son esteroides sexuales y sus derivados y análogos de los mismos, tales como estrógenos, andrógenos y progestinas. Estos agentes hormonales pueden servir como antagonistas de receptores para los esteroides sexuales para regular por disminución la expresión del receptor y la transcripción de

genes vitales. Ejemplos de tales agentes hormonales son estrógenos sintéticos (por ejemplo dietilestilbestrol), antiestrógenos (por ejemplo tamoxifeno, toremifeno, fluoximesterol y raloxifeno), antiandrógenos (bicalutamida, nilutamida, flutamida), inhibidores de aromatasa (por ejemplo, aminoglutetimida, anastrozol y tetrazol), ketoconazol, acetato de goserelina, leuprolida, acetato de megestrol y mifepristona. La terapia de combinación que incluye un

5 inhibidor de MEK y un agente hormonal puede tener efectos sinérgicos terapéuticos sobre el cáncer y reducir los efectos secundarios asociados con estos agentes quimioterápicos.

Los agentes derivados de plantas son un grupo de fármacos que se derivan de plantas o se modifican basándose en la estructura molecular de los agentes. Los ejemplos de agentes derivados de plantas incluyen, pero no se limitan a,

10 alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vindesina, vinzolidina y vinorelbina), podofilotoxinas (por ejemplo, etopósido (VP-16) y tenipósido (VM-26)), taxanos (por ejemplo, paclitaxel y docetaxel). Estos agentes derivados de plantas actúan en general como agentes antimitóticos que se unen a tubulina e inhiben la mitosis. Se cree que las podofilotoxinas tales como el etopósido interfieren con la síntesis de ADN interaccionando con topoisomerasa II, lo que conduce a escisión de la cadena de ADN. La terapia de combinación que incluye un

15 inhibidor de MEK y un agente derivado de plantas puede tener efectos sinérgicos terapéuticos sobre el cáncer y reducir los efectos secundarios asociados con estos agentes quimioterápicos.

Los agentes biológicos son un grupo de biomoléculas que provocan la regresión de cáncer/tumor cuando se usan solos o en combinación con quimioterapia y/o radioterapia. Los ejemplos de agentes biológicos incluyen, pero no se

20 limitan a, proteínas de inmunomodulación tales como citocinas, anticuerpos monoclonales frente a antígenos tumorales, genes supresores de tumores y vacunas contra el cáncer. La terapia de combinación que incluye un inhibidor de MEK y un agente biológico puede tener efectos sinérgicos terapéuticos sobre el cáncer, potenciar las respuestas inmunitarias del paciente a señales tumorigénicas y reducir los posibles efectos secundarios asociados con este agente quimioterápico.

Las citocinas presentan actividad de inmunomodulación profunda. Algunas citocinas tales como interleucina-2 (IL-2, aldesleucina) e interferón han demostrado actividad antitumoral y se han aprobado para el tratamiento de pacientes con carcinoma metastásico de células renales y melanoma maligno metastásico. IL-2 es un factor de crecimiento de

30 células T que es fundamental para las respuestas inmunitarias mediadas por células T. Se cree que los efectos tumorales selectivos de la IL-2 en algunos pacientes son el resultado de una respuesta inmunitaria mediada por células que discrimina entre el propio organismo y otro distinto. Los ejemplos de interleucinas que pueden usarse conjuntamente con inhibidor de MEK incluyen, pero no se limitan a, interleucina 2 (IL-2) e interleucina 4 (IL-4), interleucina 12 (IL-12).

Los interferones incluyen más de 23 subtipos relacionados con actividades solapantes, estando todos los subtipos de IFN dentro del alcance de la presente invención. El IFN ha demostrado actividad frente a muchos tumores

35 malignos sólidos y hematológicos, pareciendo ser estos últimos particularmente sensibles.

Otras citocinas que pueden usarse conjuntamente con un inhibidor de MEK incluyen aquellas citocinas que ejercen

40 profundos efectos sobre la hematopoyesis y las funciones inmunitarias. Los ejemplos de tales citocinas incluyen, pero no se limitan a, eritropoyetina, CSF de granulocitos (filgrastina) y CSF de granulocitos, macrófagos (sargramostim). Estas citocinas pueden usarse conjuntamente con un inhibidor de MEK para reducir la toxicidad mielopoyética inducida por quimioterapia.

También pueden usarse otros agentes de inmunomodulación distintos de citocinas conjuntamente con un inhibidor de MEK para inhibir el crecimiento celular anómalo. Los ejemplos de tales agentes de inmunomodulación incluyen, pero no se limitan a bacilo de Calmette-Guerin, levamisol y octreotida, un octapéptido de acción prolongada que imita los efectos de la hormona que se produce de manera natural, somatostatina.

Los anticuerpos monoclonales frente a antígenos tumorales son anticuerpos provocados frente a antígenos expresados por tumores, preferiblemente antígenos específicos de tumores. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal HERCEPTIN® (Trastuzumab) se produce frente al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) que se sobreexpresa en algunos tumores de mama incluyendo el cáncer de mama metastásico. La sobreexpresión de la proteína HER2 está asociada con una enfermedad más agresiva y un peor pronóstico en la clínica.

55 HERCEPTIN® se usa como agente individual para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico cuyos tumores sobreexpresan la proteína HER2. La terapia de combinación que incluye un inhibidor de MEK y HERCEPTIN® puede tener efectos sinérgicos terapéuticos sobre tumores, especialmente sobre cánceres metastásicos.

Otro ejemplo de anticuerpos monoclonales frente a antígenos tumorales es RITUXAN® (rituximab) que se produce frente a CD20 en células de linfoma y reduce selectivamente células B maduras y pre-B CD20+ normales y malignas. RITUXAN® se usa como agente individual para el tratamiento de pacientes con linfoma no Hodgkin de células B CD20+, folicular o de bajo grado con recidiva o que no responde al tratamiento. La terapia de combinación que incluye un inhibidor de MEK y RITUXAN® puede tener efectos sinérgicos terapéuticos no sólo sobre el linfoma,

65 sino también sobre otras formas o tipos de tumores malignos.

Los genes supresores de tumores son genes que funcionan para inhibir el crecimiento y los ciclos de división celulares, impidiendo por tanto el desarrollo de neoplasia. Las mutaciones en genes supresores de tumores hacen que la célula ignore uno o más de los componentes de la red de señales inhibitoras, salvando los puntos de control del ciclo celular y dando como resultado una tasa superior de crecimiento celular controlado-cáncer. Los ejemplos de genes supresores de tumores incluyen, pero no se limitan a, DPC-4, NF-1, NF-2, RB, p53, WT1, BRCA1 y BRCA2.

DPC-4 está implicado en el cáncer pancreático y participa en una ruta citoplasmática que inhibe la división celular. NF-1 codifica para una proteína que inhibe Ras, una proteína inhibidora citoplasmática. NF-1 está implicado en neurofibromas y feocromocitomas del sistema nervioso y en leucemia mieloide. NF-2 codifica para una proteína nuclear que está implicada en meningioma, schwannoma y ependimoma del sistema nervioso. RB codifica para la proteína pRB, una proteína nuclear que es un inhibidor principal del ciclo celular. RB está implicado en retinoblastoma así como en cáncer de huesos, de vejiga, de pulmón de células pequeñas y de mama. P53 codifica para la proteína p53 que regula la división celular y puede inducir apoptosis. La mutación y/o inactividad de p53 se encuentra en una amplia variedad de cánceres. WT1 está implicado en el tumor de Wilms de los riñones. BRCA1 está implicado en el cáncer de mama y ovario y BRCA2 está implicado en el cáncer de mama. El gen supresor de tumores puede transferirse a células tumorales donde ejerce sus funciones supresoras de tumores. La terapia de combinación que incluye un inhibidor de MEK y un supresor de tumores puede tener efectos sinérgicos terapéuticos sobre pacientes que padecen diversas formas de cánceres.

Las vacunas contra el cáncer son un grupo de agentes que inducen la respuesta inmunitaria específica del organismo a tumores. La mayoría de las vacunas contra el cáncer en investigación y desarrollo y en ensayos clínicos son antígenos asociados a tumores (TAA). TAA son estructuras (es decir proteínas, enzimas o hidratos de carbono) que están presentes en células tumorales y están relativamente ausentes o disminuidas en células normales. En virtud de que son casi exclusivos de la célula tumoral, los TAA proporcionan dianas para que el sistema inmunitario reconozca y produzca su destrucción. Los ejemplos de TAA incluyen, pero no se limitan a gangliósidos (GM2), antígeno específico de próstata (PSA), alfa-fetoproteína (AFP), antígeno carcinoembrionario (CEA) (producido por cánceres de colon y otros adenocarcinomas, por ejemplo cáncer de mama, pulmón, gástrico y páncreas), antígenos asociados con melanoma (MART-1, gp100, MAGE 1,3, tirosinasa), fragmentos E6 y E7 de papilomavirus, células completas o partes/lisados de células tumorales autólogas y células tumorales alogénicas.

Puede usarse un adyuvante para aumentar la respuesta inmunitaria a TAA. Los ejemplos de adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, bacilo de Calmette-Guerin (BCG), lipopolisacáridos de endotoxinas, hemocianina de lapa californiana (GKLH), interleucina-2 (IL-2), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y citoxano, un agente quimioterápico que se cree que reduce la supresión inducida por tumor cuando se administra en dosis bajas.

Ejemplos adicionales de agentes terapéuticos que pueden usarse en combinación con inhibidores de MEK incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de la señalización de P13/Akt. Los ejemplos de inhibidores de P13/Akt que pueden usarse en combinación con inhibidores de MEK incluyen, pero no se limitan a, inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). Los ejemplos de inhibidores de HER2 incluyen, pero no se limitan a, Herceptin® (trastuzumab) y Tykerb® (lapatinib). Tykerb®, una pequeña molécula que puede administrarse por vía oral, inhibe los componentes de tirosina cinasa de los receptores ErbB1 y ErbB2. La estimulación de ErbB1 y ErbB2 está asociada con la proliferación celular y con múltiples procesos implicados en la progresión, invasión y metástasis tumorales. Se ha notificado la sobreexpresión de estos receptores en una variedad de tumores humanos y está asociada con un mal pronóstico y con supervivencia global reducida.

Los ejemplos todavía adicionales de agentes terapéuticos que pueden usarse en combinación con inhibidores de MEK incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de histona desacetilasa (HDAC). Los ejemplos de inhibidores de HDAC que pueden usarse en combinación con inhibidores de MEK incluyen, pero no se limitan a, ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA).

Ejemplos

Preparación de inhibidores de MEK

Pueden desarrollarse diversos métodos para sintetizar compuestos según la presente invención. En los ejemplos se proporcionan métodos representativos para sintetizar estos compuestos. Se observa, sin embargo, que los compuestos de la presente invención también pueden sintetizarse mediante otras rutas sintéticas que otros pueden idear.

Se reconocerá fácilmente que determinados compuestos según la presente invención tienen átomos con uniones a otros átomos que confieren una estereoquímica particular al compuesto (por ejemplo, centros quirales). Se reconoce que la síntesis de compuestos según la presente invención puede dar como resultado la creación de mezclas de diferentes estereoisómeros (es decir, enantiómeros y diastereómeros). A menos que se especifique una estereoquímica particular, se pretende que la mención de un compuesto abarque a todos los posibles estereoisómeros diferentes.

Se conocen en la técnica diversos métodos para separar mezclas de diferente estereoisómeros. Por ejemplo, puede hacerse reaccionar una mezcla racémica de un compuesto con un agente de resolución ópticamente activo para formar un par de compuestos diastereoisoméricos. Los diastereómeros pueden separarse entonces con el fin de recuperar los enantiómeros ópticamente puros. También pueden usarse compuestos disociables para resolver enantiómeros (por ejemplo, sales diastereoisoméricas cristalinas). Los diastereómeros normalmente tienen propiedades físicas suficientemente distintas (por ejemplo, puntos de fusión, puntos de ebullición, solubilidades, reactividad, etc.) y pueden separarse fácilmente aprovechando estas disimilitudes. Por ejemplo, los diastereómeros normalmente pueden separarse mediante cromatografía o mediante técnicas de separación/resolución basadas en diferencias de solubilidad. Puede encontrarse una descripción más detallada de técnicas que pueden usarse para resolver estereoisómeros de compuestos a partir de su mezcla racémica en Jean Jacques Andre Collet, Samuel H. Wilen, *Enantiomers, Racemates and Resolutions*, John Wiley & Sons, Inc. (1981).

Los compuestos según la presente invención también pueden prepararse como una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable haciendo reaccionar la forma de base libre del compuesto con un ácido orgánico o inorgánico farmacéuticamente aceptable. Alternativamente, puede prepararse una sal de adición de base farmacéuticamente aceptable haciendo reaccionar la forma de ácido libre del compuesto con una base orgánica o inorgánica farmacéuticamente aceptable. Los ácidos y bases orgánicos e inorgánicos adecuados para la preparación de las sales farmacéuticamente aceptables de compuestos se exponen en la sección de definiciones de esta solicitud. Alternativamente, las formas de sal de los compuestos pueden prepararse usando sales de los materiales de partida o productos intermedios.

Las formas de ácido libre o base libre de los compuestos pueden prepararse a partir de la forma de sal de adición de base o sal de adición de ácido correspondiente. Por ejemplo, un compuesto en una forma de sal de adición de ácido puede convertirse en la base libre correspondiente mediante el tratamiento con una base adecuada (por ejemplo, disolución de hidróxido de amonio, hidróxido de sodio y similares). Un compuesto en una forma de sal de adición de base puede convertirse en el ácido libre correspondiente mediante el tratamiento con un ácido adecuado (por ejemplo, ácido clorhídrico, etc.).

Los N-óxidos de compuestos según la presente invención pueden prepararse mediante métodos conocidos por los expertos habituales en la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse N-óxidos mediante el tratamiento de una forma no oxidada del compuesto con un agente oxidante (por ejemplo, ácido trifluoroperacético, ácido permaleico, ácido perbenzoico, ácido peracético, ácido meta-cloroperoxibenzoico o similares) en un disolvente orgánico inerte adecuado (por ejemplo, un hidrocarburo halogenado tal como diclorometano) a aproximadamente 0°C. Alternativamente, los N-óxidos de los compuestos pueden prepararse a partir del N-óxido de un material de partida apropiado.

Pueden prepararse compuestos en una forma no oxidada a partir de N-óxidos de compuestos mediante el tratamiento con un agente reductor (por ejemplo, azufre, dióxido de azufre, trifenilfosfina, borohidruro de litio, borohidruro de sodio, tricloruro de fósforo, tribromuro o similares) en un disolvente orgánico inerte adecuado (por ejemplo, acetonitrilo, etanol, dioxano acuoso o similares) a de 0 a 80°C.

Pueden prepararse derivados protegidos de los compuestos mediante métodos conocidos por los expertos habituales en la técnica. Puede encontrarse una descripción detallada de las técnicas aplicables a la creación de grupos protectores y su eliminación en T.W. Greene, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, 3ª edición, John Wiley & Sons, Inc. 1999.

Los compuestos según la presente invención pueden prepararse convenientemente, o formarse durante el procedimiento de la invención, como solvatos (por ejemplo, hidratos). Pueden prepararse convenientemente hidratos de compuestos de la presente invención mediante recristalización en una mezcla de disolventes acuosa/orgánica, usando disolventes orgánicos tales como dioxina, tetrahidrofuran o metanol.

Los compuestos según la presente invención también pueden prepararse como sus estereoisómeros individuales haciendo reaccionar una mezcla racémica del compuesto con un agente de resolución ópticamente activo para formar un par de compuestos diastereoisoméricos, separando los diastereómeros y recuperando el enantiómero ópticamente puro. Aunque la resolución de enantiómeros puede llevarse a cabo usando derivados diastereoisoméricos covalentes de compuestos, se prefieren complejos disociables (por ejemplo, sales diastereoisoméricas cristalinas). Los diastereómeros tienen propiedades físicas distintas (por ejemplo, puntos de fusión, puntos de ebullición, solubilidades, reactividad, etc.) y pueden separarse fácilmente aprovechando estas disimilitudes. Los diastereómeros pueden separarse mediante cromatografía o, preferiblemente, mediante técnicas de separación/resolución basadas en diferencias de solubilidad. Entonces se recupera el enantiómero ópticamente puro, junto con el agente de resolución, mediante cualquier medio práctico que no diera como resultado racemización. Puede encontrarse una descripción más detallada de las técnicas aplicables a la resolución de estereoisómeros de compuestos a partir de su mezcla racémica en Jean Jacques Andre Collet, Samuel H. Wilen, *Enantiomers, Racemates and Resolutions*, John Wiley & Sons, Inc. (1981).

- 5 Tal como se usan en el presente documento, los símbolos y convenios usados en estos procedimientos, esquemas y ejemplos están de acuerdo con los usados en la bibliografía científica contemporánea, por ejemplo, Journal of the American Chemical Society o Journal of Biological Chemistry. En general se usan abreviaturas convencionales de única letra o de tres letras para designar residuos de aminoácido, que se supone que están en la configuración L a menos que se indique lo contrario. A menos que se indique lo contrario, todos los materiales de partida se obtuvieron de proveedores comerciales y se usaron sin purificación adicional. Específicamente, pueden usarse las siguientes abreviaturas en los ejemplos y a lo largo de toda la memoria descriptiva:

μl (microlitros)	Ac (acetilo)
atm (atmósfera)	ATP (Adenosina trifosfatasa)
BOC (terc-butiloxycarbonilo)	BOP (cloruro bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico)
BSA (albúmina sérica bovina)	CBZ (benciloxycarbonilo)
CDI (1,1-carbonildiimidazol)	DCC (diciclohexilcarbodiimida)
DCE (dicloroetano)	DCM (diclorometano)
DMAP (4-dimetilaminopiridina)	DME (1,2-dimetoxietano)
DMF (N,N-dimetilformamida)	DMPU (N,N'-dimetilpropileno urea)
DMSO (dimetilsulfóxido)	EDCI (clorhidrato de etilcarbodiimida)
EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)	Et (etilo)
Et ₂ O (dietil éter)	EtOAc (acetato de etilo)
Fmoc (9-fluorenilmetoxycarbonilo)	g (gramos)
h (horas)	HOAc o AcOH (ácido acético)
HOBT (1-hidroxibenzotriazol)	HOSu (N-hidroxisuccinimida)
HPLC (cromatografía de líquidos a alta presión)	Hz (hercios)
i.v. (intravenoso)	IBCF (cloroformiato de isobutilo)
i-PrOH (isopropanol)	l (litros)
M (molar)	mCPBA (ácido meta-cloroperbenzoico)
Me (metilo)	MeOH (metanol)
mg (miligramos)	MHz (megahercios)
min. (minutos)	ml (mililitros)
mM (milimolar)	mmol (milimoles)
mol (moles)	MOPS (ácido morfolinopropanosulfónico)
pf (punto de fusión)	NaOAc (acetato de sodio)
OMe (metoxilo)	psi (libras por pulgada cuadrada)
RP (fase inversa)	TA (temperatura ambiente)
SPA (ensayo de proximidad de centelleo)	TBAF (fluoruro de tetra-n-butilamonio)
TBS (t-butildimetilsililo)	tBu (terc-butilo)
TEA (triethylamina)	TFA (ácido trifluoroacético)
TFAA (anhídrido trifluoroacético)	THF (tetrahidrofurano)
TIPS (triisopropilsililo)	CCF (cromatografía en capa fina)
TMS (trimetilsililo)	TMSE (2-(trimetilsilil)etilo)
Tr (tiempo de retención)	

- 10 Todas las referencias a éter o Et₂O son a dietil éter; y salmuera se refiere a una disolución acuosa saturada de NaCl. A menos que se indique lo contrario, todas las temperaturas se expresan en °C (grados centígrados). Todas las reacciones se realizan bajo una atmósfera inerte a TA a menos que se indique lo contrario.

Los espectros de ^1H -RMN se registraron en un dispositivo Bruker Avance 400. Los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón (ppm). Las constantes de acoplamiento son en unidades de hercios (Hz). Los patrones de fraccionamiento describen multiplicidades aparentes y se designan como s (singlete), d (doblete), t (triplete), q (cuartete), m (multiplete), a (ancho).

5 Los espectros de masas (EM) de baja resolución y los datos de pureza del compuesto se obtuvieron en un sistema de CL/EM Aguas ZQ de cuadrupolo único equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI), detector UV (220 y 254 nm) y detector de dispersión de luz evaporativa (ELSD). Se realizó la cromatografía en capa fina en placas de gel de sílice de 0,25 mm de E. Merck (60F-254), se visualizó con luz UV, ácido fosfomolibdico etanólico, disolución de ninhidrina o p-anisaldehído. Se realizó la cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (230-400 de malla, Merck).

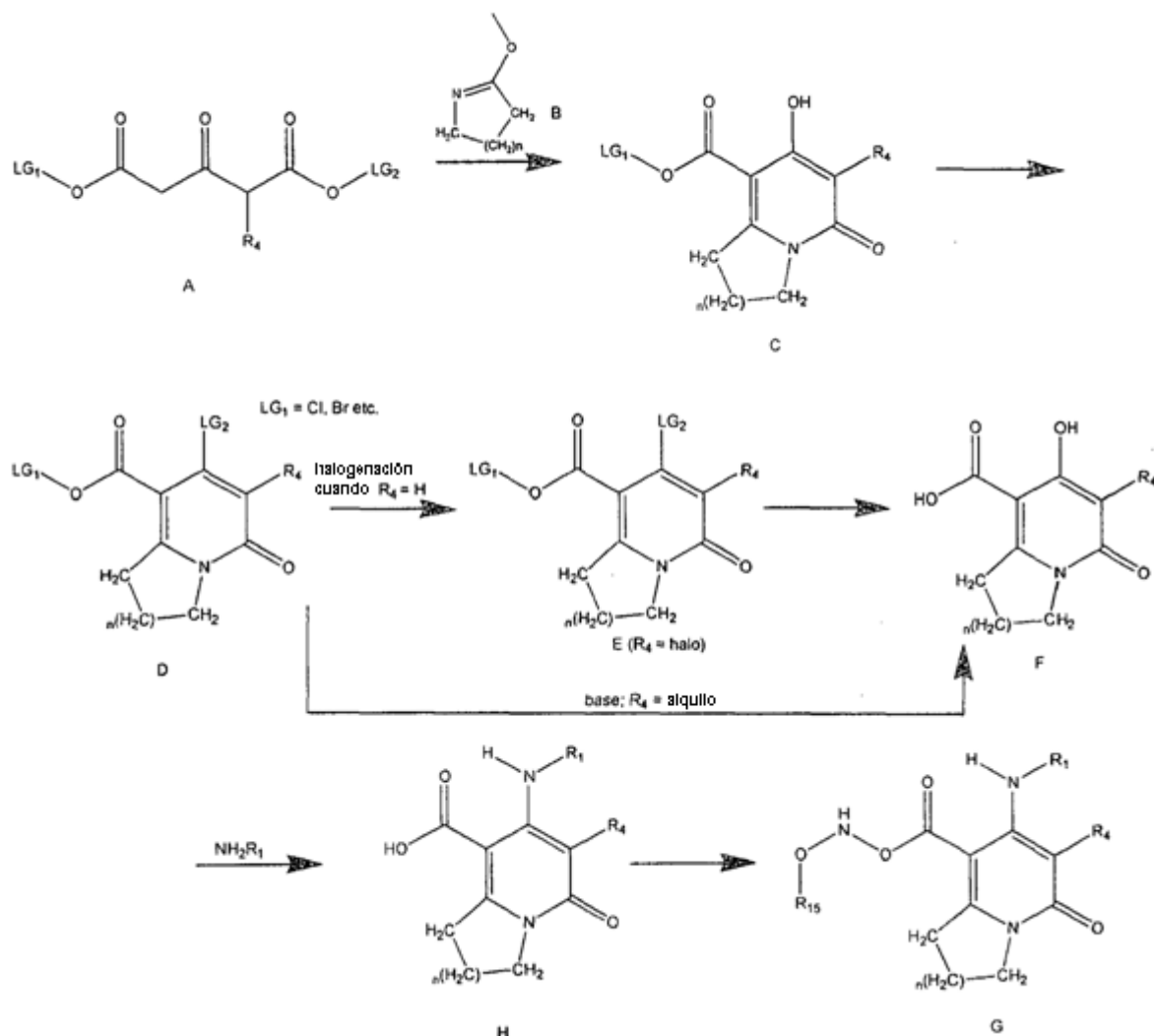
15 Los materiales de partida y reactivos usados en la preparación de estos compuestos o bien están disponibles de proveedores comerciales tales como Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), Bachem (Torrance, CA), Sigma (St. Louis, MO) o bien pueden prepararse mediante métodos bien conocidos por un experto habitual en la técnica, siguiendo procedimientos descritos en referencias convencionales tales como Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, volúmenes 1-17, John Wiley and Sons, Nueva York, NY, 1991; Rodd's Chemistry of Carbon Compounds, volúmenes 1-5 y suplementos, Elsevier Science Publishers, 1989; Organic Reacciones, volúmenes 1-40, John Wiley and Sons, Nueva York, NY, 1991; March J.: Advanced Organic Chemistry, 4ª ed., John Wiley and Sons, Nueva York, NY; y Larock: Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers, Nueva York, 1989.

Esquemas sintéticos para los compuestos de la presente invención

25 Los compuestos según la presente invención pueden sintetizarse según los esquemas de reacción mostrados a continuación. Los expertos en la técnica podrían idear fácilmente otros esquemas de reacción. También debe apreciarse que una variedad de disolventes, temperaturas y otras condiciones de reacción diferentes pueden variarse para optimizar los rendimientos de las reacciones.

30 En las reacciones descritas a continuación en el presente documento puede ser necesario proteger grupos funcionales reactivos, por ejemplo grupos hidroxilo, amino, imino, tio o carboxilo, cuando éstos se desean en el producto final, para evitar su participación no deseada en las reacciones. Pueden usarse grupos protectores convencionales según la práctica convencional, por ejemplo véase T.W. Greene y P. G. M. Wuts en "Protective Groups in Organic Chemistry" John Wiley and Sons, 1991.

Esquema 1:



A una mezcla de compuesto A y compuesto B en un disolvente orgánico apropiado (THF o DMF, etc.), se le añade una base, tal como trietilamina (~0,3 eq.). Puede agitarse la reacción a de 0 a 100°C (por ejemplo, durante de 12 a 72 h) para dar el compuesto C, que puede transformarse en el compuesto D con $POCl_3$ o $POBr_3$. Cuando $X_1 = CH$, el compuesto D se halogena opcionalmente para dar el compuesto E. Tras la hidrólisis con una base, tal como NaOH, puede transformarse el compuesto D o E en el compuesto F. Entonces puede someterse el compuesto F a reacción de desplazamiento de anilina G con LiHMDS, KHMDS o LDA a de -78°C a 50°C para proporcionar el compuesto H. La reacción de acoplamiento potenciada por EDCl o algún otro agente de acoplamiento (PyBop, DCC, etc.) de H con una amina (NHR_9R_{10}) da el compuesto G.

Los componentes quirales pueden separarse y purificarse usando cualquiera de una variedad de técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los componentes quirales pueden purificarse usando cromatografía de fluidos supercríticos (CFS). En una variación particular, se realizan análisis de CFS/EM analíticos quirales usando un sistema de CFS analítico Berger (AutoChem, Newark, DE) que consiste en un módulo de control de fluido con bomba dual de CFS Berger con una bomba de fluido supercrítico Berger FCM 1100/1200 y una bomba de fluido modificador FCM 1200, un horno Berger TCM 2000 y un inyector automático Alcott 718. El sistema integrado puede controlarse mediante el software BI-SFC Chemstation versión 3.4. La detección puede llevarse a cabo con un detector ZQ 2000 de Waters operado en modo positivo con una interfaz de ESI y un intervalo de barrido de desde 200-800 Da con 0,5 segundos por barrido. Pueden realizarse separaciones cromatográficas en una columna ChiralPak AD-H, ChiralPak AS-H, ChiralCel OD-H o ChiralCel OJ-H (5 μ , 4,6 x 250 mm; Chiral Technologies, Inc. West Chester, PA) con metanol a del 10 al 40% como el modificador y con o sin acetato de amonio (10 mM). Puede utilizarse cualquiera de una variedad de velocidades de flujo incluyendo, por ejemplo, 1,5 ó 3,5 ml/min. con una presión de entrada fijada a 100 bar. Adicionalmente, puede usarse una variedad de condiciones de inyección de muestra incluyendo, por ejemplo, inyecciones de muestra de o bien 5 o bien 10 μ l en metanol a una concentración de 0,1 mg/ml.

En otra variación, se realizan separaciones quirales preparativas usando un sistema de purificación Berger MultiGram II SFC. Por ejemplo, pueden cargarse muestras en una columna ChiralPak AD (21 x 250 mm, 10 μ). En variaciones particulares, la velocidad de flujo para la separación puede ser de 70 ml/min., el volumen de inyección de hasta 2 ml y la presión de entrada se fija a 130 bar. Pueden aplicarse inyecciones continuas para aumentar la eficacia.

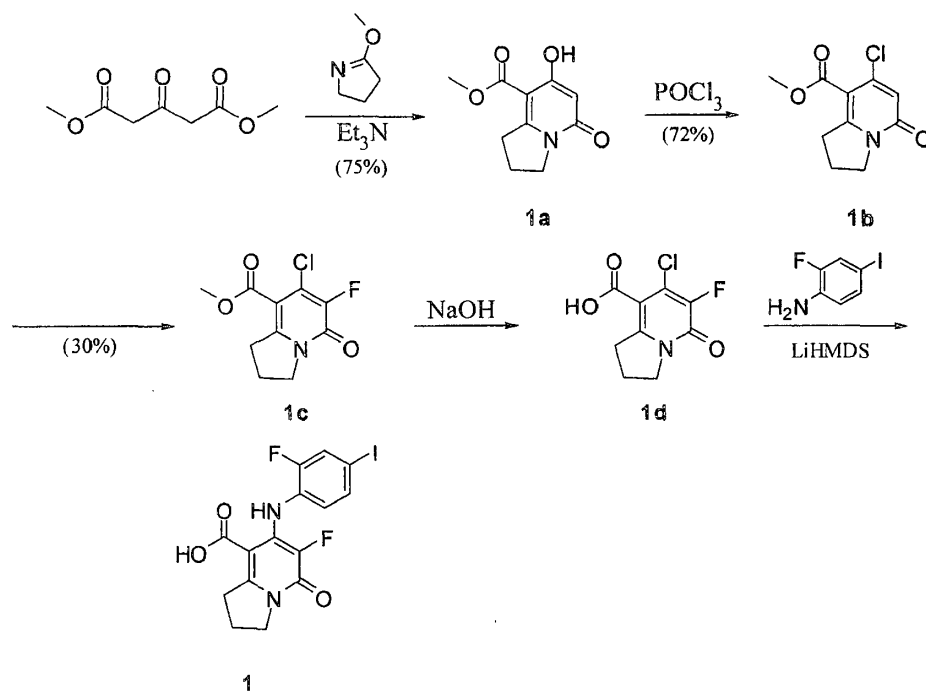
En cada uno de los procedimientos o esquemas de reacción anteriores, pueden seleccionarse los diversos sustituyentes de entre los diversos sustituyentes enseñados de otro modo en el presente documento.

En el presente documento se exponen descripciones de las síntesis de compuestos particulares según la presente invención basándose en el esquema de reacción anterior.

Ejemplos de inhibidores de MEK

La presente invención se ilustra adicionalmente, pero sin limitarse por, los siguientes ejemplos que describen la síntesis de compuestos particulares según la invención.

Ejemplo 1 (referencia): Ácido 6-fluoro-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxílico



7-Hidroxi-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxilato de metilo (1a): Se añadió trietilamina (0,5 ml, 3,6 mmol) a una mezcla de 1,3-acetonadicarboxilato de dimetilo (16,3 ml, 111 mmol) y 5-metoxi-3,4-dihidro-2H-pirrol (10 g, 101 mmol) y se agitó la reacción durante 72 h. Se recogió el sólido blanco mediante filtración, se aclaró con éter y se secó a vacío para dar 15,8 g (75%) de compuesto 1a. ^1H -RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 11,11 (s, 1H), 5,54 (s, 1H), 3,94 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz), 3,80 (s, 3H), 3,36 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz), 2,02-2,11 (m, 2H). EM (ES) $[m+H]$ calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_4$, 210; hallado 210.

7-Cloro-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxilato de metilo (1b): Se agitó el compuesto 1a (8,0 g, 38,3 mmol) en oxicloruro fosforoso (20 ml, 218 mmol) a TA. Se añadió dimetilanilina (1 ml, 7,9 mmol) y se agitó la reacción durante 16 h. Se concentró la disolución a vacío, se extinguió con hielo y se hizo básica con disolución saturada de NaHCO_3 . Se concentró la disolución acuosa a vacío. Se llevó el residuo a MeOH al 20%/CH₂Cl₂ y se eliminaron las sales inorgánicas insolubles mediante filtración. Se concentraron las fases orgánicas y se purificaron mediante cromatografía en gel de sílice (EtOAc al 75%/CH₂Cl₂) para dar 6,02 g (69%) de compuesto 1b como un sólido blanco. ^1H -RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 6,46 (s, 1H), 3,99 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz), 3,78 (s, 3H), 3,30 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz), 2,04-2,14 (m, 2H). EM (ES) $[m+H]$ calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{ClNO}_3$, 228, 230; hallado 228, 230.

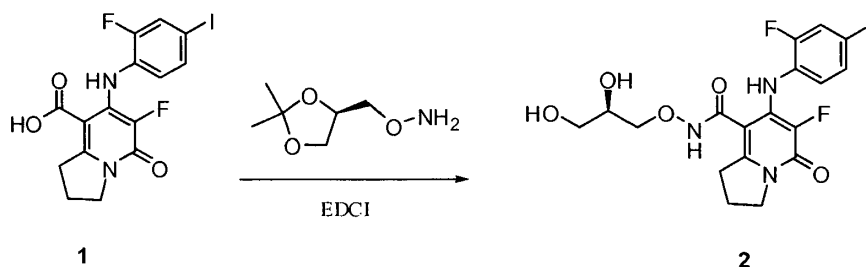
7-Cloro-6-fluoro-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxilato de metilo (1c): Se agitó el compuesto 1b (1,36 g, 5,98 mmol) en DMF (10 ml) a 88°C. Se añadió gota a gota Selectfluor® (2,54 g, 7,17 mmol) en DMF (8 ml) y se agitó la reacción durante 1 h. Se añadió Selectfluor® adicional (1,2 g, 3,39 mmol) en DMF (5 ml) y se agitó la reacción 1 h más. Se concentró la disolución a vacío y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (EtOAc al 75%/CH₂Cl₂)

para dar 460 mg (31%) de compuesto 1c como un sólido blanco. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 4,18 (t, 2H, J = 7,6 Hz), 3,86 (s, 3H), 3,37 (t, 2H, J = 7,6 Hz), 2,20-2,28 (m, 2H). EM (ES) $[\text{m}+\text{H}]$ calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{ClFNO}_3$, 246, 248; hallado 246, 248.

5 Ácido 7-cloro-6-fluoro-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxílico (1d): Se agitó el compuesto 1c (460 mg, 1,9 mmol) en una disolución de THF (10 ml), MeOH (5 ml) y NaOH 1 N (5 ml) a TA durante 20 h. Se hizo ácida la disolución con HCl 1 N y se extrajo (3x) con CHCl_3 . Se secaron las fases orgánicas (MgSO_4) y se concentraron a vacío para dar 380 mg (88%) de compuesto 1d como un sólido blanco. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 4,15 (t, 2H, J = 7,6 Hz), 3,31 (t, 2H, J = 7,6 Hz), 2,19-2,27 (m, 2H). EM (ES) $[\text{m}+\text{H}]$ calculado para $\text{C}_9\text{H}_7\text{ClFNO}_3$, 232, 234; hallado 232, 234.

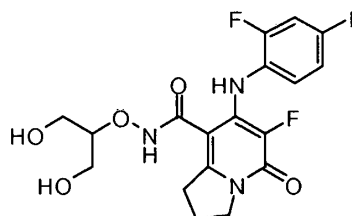
15 Ácido 6-fluoro-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxílico (ejemplo 1): Se agitó el compuesto 1d (240 mg, 1,04 mmol) y 2-fluoro-4-yodoanilina (493 mg, 2,08 mmol) en THF seco (10 ml) a 0°C bajo nitrógeno. Se añadió gota a gota LiHMDS (1 M en THF, 3,11 ml, 3,11 mmol) y se agitó la reacción 4 h mientras se calentaba hasta TA. Se extinguió la disolución con HCl 1 N y se extrajo con MeOH al 10%/CH $_2$ Cl $_2$ (3x). Se secaron las fases orgánicas (MgSO_4) y se concentraron a vacío. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice (MeOH del 10% al 16%/CH $_2$ Cl $_2$) dio 238 mg (53%) del ejemplo 1 como un sólido tostado. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, MeOD- d_4): δ 7,22-7,31 (m, 2H), 6,67 (t, 1H, J = 8,0 Hz), 4,06 (t, 2H, J = 7,6 Hz), 3,45 (t, 2H, J = 7,6 Hz), 2,05-2,15 (m, 2H). EM (ES) $[\text{m}+\text{H}]$ calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{F}_2\text{IN}_2\text{O}_3$, 433; hallado 433.

20 Ejemplo 2: (R)-N-(2,3-Dihidroxipropoxi)-6-fluoro-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida



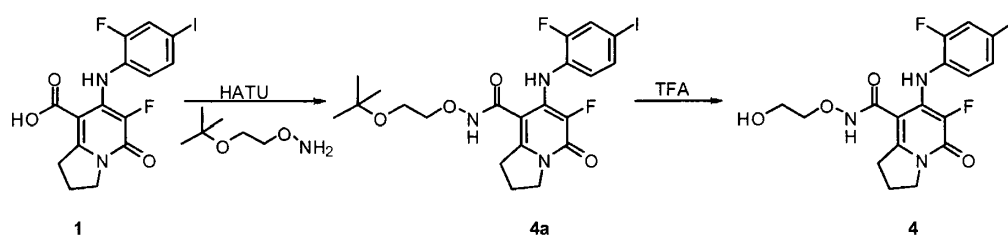
25 Se agitaron el compuesto del ejemplo 1 (82 mg, 0,19 mmol), (R)-(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metoxiamina (véase Bailey *et al.*, J. Med. Chem., 34, 1991, 51-65; 56 mg, 0,38 mmol) y HOBt (28 mg, 0,21 mmol) en CH $_2$ Cl $_2$ (4 ml) con DMF (0,5 ml) a t.a. Se añadieron EDC (47 mg, 0,25 mmol) y luego trietilamina (40 μl , 0,29 mmol) y se agitó la reacción durante 16 h. Se lavó la disolución con HCl 0,1 N y salmuera, se secó (MgSO_4) y se concentró a vacío. Se agitó el residuo en MeOH (2,0 ml) y agua (200 μl) con ácido p-toluenosulfónico (16 mg, 0,08 mmol) durante 4 h. Se añadió trietilamina (50 μl) y se concentró la disolución a vacío. La purificación mediante HPLC preparativa dio 48 mg (48%) del compuesto del título como un sólido blanco. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 11,50 (s, 1H), 8,04 (s, 1H), 7,57 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 7,40 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 6,79 (t, 1H, J = 8,8 Hz), 4,00 (t, 2H, J = 7,6 Hz), 3,77-3,84 (m, 1H), 3,62-3,68 (m, 2H), 3,28-3,36 (m, 2H), 3,17 (t, 2H, J = 7,6 Hz), 2,01-2,09 (m, 2H). EM (ES) $[\text{m}+\text{H}]$ calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{F}_2\text{IN}_3\text{O}_5$, 522; hallado 522.

35 Ejemplo 3: N-(1,3-Dihidroxipropan-2-iloxi)-6-fluoro-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida



40 Se preparó el compuesto del título del ejemplo 1 y O-(2-fenil-1,3-dioxan-5-il)hidroxilamina (véase el documento WO05/110410) con un rendimiento del 30% según el procedimiento para la preparación del ejemplo 2. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7,36 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 7,30 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 6,59 (t, 1H, J = 8,8 Hz), 4,07 (t, 2H, J = 7,6 Hz), 3,78-3,86 (m, 1H), 3,60-3,70 (m, 4H), 3,23 (t, 2H, J = 7,6 Hz), 2,10-2,20 (m, 2H). EM (ES) $[\text{m}+\text{H}]$ calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{F}_2\text{IN}_3\text{O}_5$, 522; hallado 522.

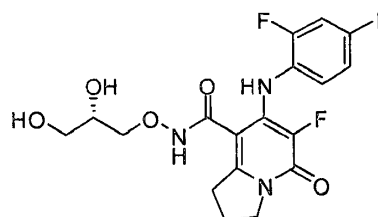
Ejemplo 4: 6-Fluoro-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-N-(2-hidroxietoxi)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida



(2-Terc-butoxi-etoxi)-amida del ácido 6-fluoro-7-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidro-indolizin-8-carboxílico (4a): Se agitaron el compuesto del ejemplo 1 (656 mg, 1,52 mmol), HATU (870 mg, 2,28 mmol) y N-metilmorfolina (835 μ l, 7,59 mmol) en DMF (7,6 ml) a t.a. durante 10 min. Se añadió O-(2-terc-butoxi-etil)-hidroxilamina (303 mg, 2,28 mmol) y se agitó la reacción a 70°C durante 16 h. La purificación mediante HPLC preparativa dio 730 mg (73%) de compuesto 4a como un sólido beis. EM (ES) [m+H] calculado para $C_{21}H_{24}F_2IN_3O_4$, 548; hallado 548.

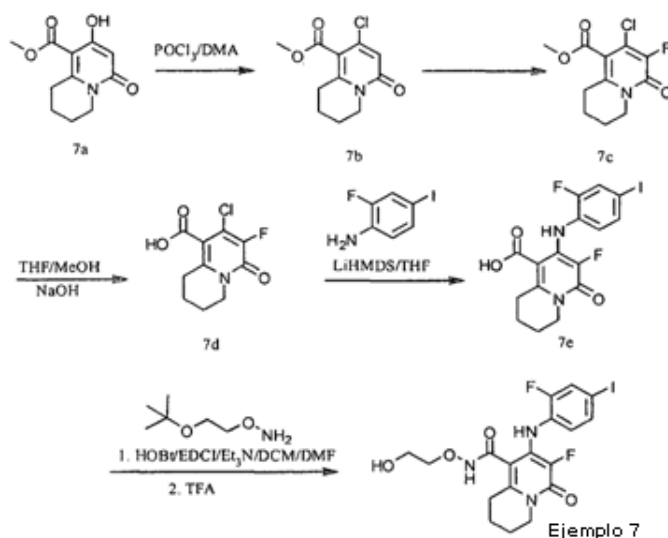
6-Fluoro-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-N-(2-hidroxietoxi)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida (ejemplo 4): Se disolvió el compuesto 4a (730 mg, 1,33 mmol) en TFA (4 ml) y se agitó a t.a. durante 1 hora. La purificación mediante HPLC preparativa dio 393 mg (60%) del compuesto del título como un sólido blanco. 1H -RMN (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 11,47 (s a, 1H) 8,06 (s a, 1H) 7,58 (dd, 1H, J = 10,7, 1,6 Hz) 7,42 (d, 1H, J = 8,8 Hz,) 6,80 (td, 1H, J = 8,7, 2,8 Hz) 4,01 (t, 2H, J = 7,3 Hz) 3,77 (t, 2H, J = 4,8 Hz) 3,45 (t, 2H, J = 4,8 Hz), 3,18 (t, 2H, J = 7,7 Hz) 2,11-2,16 (m, 2H). EM (ES) [m+H] calculado para $C_{17}H_{16}F_2IN_3O_4$, 492; hallado 492.

Ejemplo 5: (S)-N-(2,3-Dihidroxipropoxi)-6-fluoro-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida



Se preparó el compuesto del título del ejemplo 1 y (S)-(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metoxiamina (véase, Bailey *et al.*, J. Med. Chem., 34, 1991, 51-65) con un rendimiento del 12,5% según el procedimiento para la preparación del ejemplo 2. 1H -RMN (400 MHz, MeOD) δ 7,39 (dd, 1H, J = 10,2, 1,9 Hz) 7,33 (dd, 1H, J = 8,3, 1,0 Hz) 6,75 (td, 1H, J = 8,6, 2,5 Hz) 4,05 (t, 2H, J = 7,3 Hz) 3,59-3,81 (m, 3H) 3,45 (d, 2H, J = 5,3 Hz) 3,16 (t, 2H, J = 8,0 Hz) 2,08-2,20 (m, 2H). EM (ES) [m+H] calculado para $C_{18}H_{18}F_2IN_3O_5$, 522; hallado 522.

Ejemplo 7: 7-Fluoro-8-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-N-(2-hidroxietoxi)-6-oxo-2,3,4,6-tetrahidro-1H-quinolizin-9-carboxamida



8-Hidroxi-6-oxo-2,3,4,6-tetrahidro-1H-quinolizin-9-carboxilato de metilo (7a): Se añadió 1,3-acetonadicarboxilato de

dimetilo (8,1 g, 46,6 mmol) a una mezcla de trietilamina (0,26 ml, 1,86 mmol) y o-metilvalerolactona (4,8 g, 42,4 mmol) y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 48 h. Se concentró la disolución a vacío y se filtraron los cristales resultantes y se lavaron con dietil éter para dar 5,35 g (52%) de compuesto 7a como un sólido blanco. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10,89 (s, 1H), 5,59 (s, 1H), 3,80 (t, 2H, J = 6,2 Hz), 3,75 (s, 3H), 2,74 (t, 2H, J = 6,7 Hz), 2,45-2,57 (m, 2H), 1,65-1,69 (m, 2H). EM (ES) [m+H] calculado para C₁₁H₁₃NO₄ 224; hallado 224.

8-Cloro-6-oxo-2,3,4,6-tetrahidro-1H-quinolizin-9-carboxilato de metilo (7b): Se suspendió 8-hidroxi-6-oxo-2,3,4,6-tetrahidro-1H-quinolizin-9-carboxilato de metilo (7a, 2 g, 9,52 mmol, 1 eq.) en oxidloruro fosforoso (5,3 ml, 57 mmol, 6 eq.) y dimetilalanilina (242 µl, 1,9 mmol, 0,2 eq.) bajo nitrógeno y se agitó a TA durante 16 h. Se concentró la disolución a vacío, se extinguió con hielo y se hizo básica con disolución saturada de NaHCO₃. Se concentró la disolución acuosa a vacío y se trituró el residuo en MeOH al 20%/DCM. Se eliminaron las sales inorgánicas mediante filtración y se evaporó el filtrado hasta la sequedad. Se purificó el sólido resultante mediante cromatografía ultrarrápida usando EtOAc al 75%/DCM como eluyente para dar el compuesto del título como un sólido blanco. (1,43 g, 63%) [M+H] calculado para C₁₁H₁₂ClNO₃, 242; hallado, 242

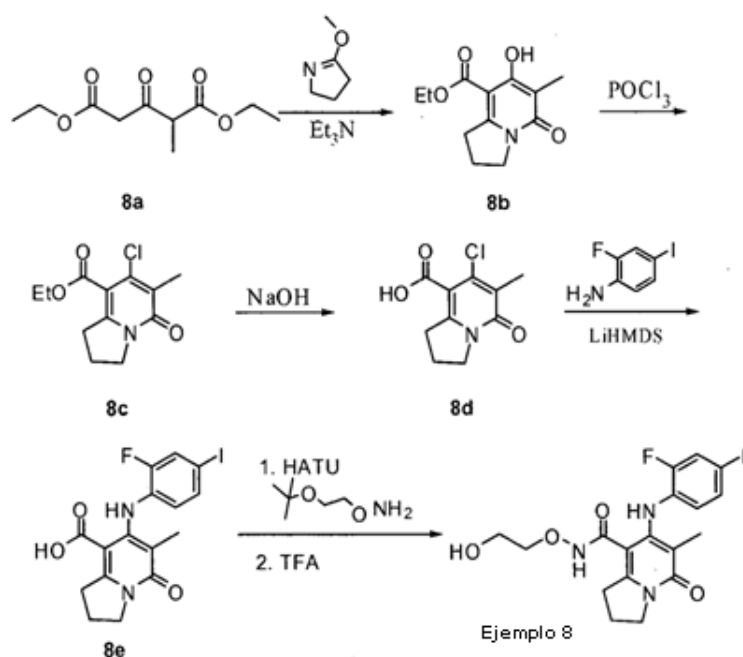
8-Cloro-7-fluoro-6-oxo-2,3,4,6-tetrahidro-1H-quinolizin-9-carboxilato de metilo (7c): Se disolvió 8-cloro-6-oxo-2,3,4,6-tetrahidro-1H-quinolizin-9-carboxilato de metilo (7b, 1,23 g, 5,1 mmol, 1 eq.) en DMF (10 ml) a 88°C. Se añadió gota a gota Selectfluor (3,61 g, 10,2 mmol, 2 eq.) en DMF (10 ml) y se calentó la mezcla durante 2 horas. Tras concentración a vacío, se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida usando EtOAc al 20-70%/hexano como eluyente para dar el compuesto del título como un sólido blanquecino (600 mg, 45%). [M+H] calculado para C₁₁H₁₁ClFNO₃, 260; hallado, 260

Ácido 8-cloro-7-fluoro-6-oxo-2,3,4,6-tetrahidro-1H-quinolizin-9-carboxílico (7d): Se disolvió 8-cloro-7-fluoro-6-oxo-2,3,4,6-tetrahidro-1H-quinolizin-9-carboxilato de metilo (7c, 600 mg, 2,43 mmol) en THF (10 ml) y MeOH (5 ml). Se añadió NaOH 1 N (5 ml) y se agitó la disolución a TA durante la noche. Se acidificó la disolución con HCl 4 N, luego se extrajo en DCM y se lavó la fase orgánica x3 con DCM. Se evaporaron las fases orgánicas para dar el compuesto del título que se usó sin purificación adicional (426 mg, 72%). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,61 - 1,79 (m, 4 H) 2,83 (t, J=6,06 Hz, 2 H) 3,94 (t, J=6,32 Hz, 2 H) 13,75 (s. a., 1 H) [M+H] calculado para C₁₀H₉ClFNO₃, 246; hallado, 246

Ácido 7-fluoro-8-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-6-oxo-2,3,4,6-tetrahidro-1H-quinolizin-9-carboxílico (7e): Se mezclaron 8-cloro-7-fluoro-6-oxo-2,3,4,6-tetrahidro-1H-quinolizin-9-carboxílico (7d, 426 mg, 1,74 mmol, 1 eq.) y 2-fluoro-4-yodoanilina (827 mg, 3,49 mmol, 2 eq.) en THF anhidro (10 ml) a 0°C bajo N₂. Se añadió gota a gota hexametildisilazida de litio 1 N en THF (5,23 ml, 5,23 mmol, 3 eq.) y se agitó la mezcla durante 4 horas mientras se permitió que la temperatura volviera hasta TA. Se evaporó la disolución y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida usando MeOH al 10-16% en DCM como eluyente. Esto proporcionó el compuesto del título como un sólido tostado (216 mg, 28%). [M+H] calculado para C₁₆H₁₃F₂IN₂O₃, 447; hallado, 447.

7-Fluoro-8-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-N-(2-hidroxietoxi)-6-oxo-2,3,4,6-tetrahidro-1H-quinolizin-9-carboxamida (ejemplo 7): Se agitaron ácido 7-fluoro-8-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-6-oxo-2,3,4,6-tetrahidro-1H-quinolizin-9-carboxílico (7e, 216 mg, 0,48 mmol, 1 eq.), O-(2-terc-butoxi)etilhidroxilamina (129 mg, 0,97 mmol, 2 eq.) y N-hidroxibenzotriazol (82 mg, 0,53 mmol, 1,1 eq.) en DCM (12 ml) y DMF (1,5 ml). Se añadieron 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (111 mg, 0,58 mmol, 1,2 eq.) y trietilamina (101 µl, 0,73 mmol, 1,5 eq.) y se agitó la disolución a TA durante 16 horas. Tras el lavado con HCl 0,1 N (30 ml), luego con salmuera (30 ml) se secó la fase orgánica sobre sulfato de magnesio y se evaporó hasta la sequedad. Se disolvió el residuo en TFA y se agitó durante 2 horas, luego se eliminó el disolvente a vacío. Se purificó el residuo mediante HPLC para dar el compuesto del título como un sólido blanco (58 mg, 24%). ¹H-RMN (400 MHz, MeOD) δ ppm 1,75 - 1,90 (m, 2 H) 1,90 - 2,01 (m, 2 H) 2,76 - 2,90 (m, 2 H) 3,14 (d, J=3,28 Hz, 2 H) 3,49 (d, J=3,28 Hz, 1 H) 3,68 - 3,77 (m, 1 H) 3,89 (t, J=4,29 Hz, 2 H) 3,99 - 4,10 (m, 2 H) 5,50 (s, 1 H) 6,83 - 6,95 (m, 1 H) 7,39 - 7,52 (m, 2 H) [M+H] calculado para C₁₈H₁₈F₂IN₃O₄, 506; hallado, 506

Ejemplo 8: 7-(2-Fluoro-4-yodofenilamino)-N-(2-hidroxietoxi)-6-metil-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida



7-Hidroxi-6-metil-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizina-8-carboxilato de etilo (8b): Se añadió el compuesto 8a (Aust. J. Chem., 1999, 52, 1013-1020, 7 g, 32,3 mmol) a una mezcla de trietilamina (0,16 ml, 1,15 mmol) y 2-metoxi-1-pirrolina (2,9 g, 29,4 mmol) y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 10 días. Se concentró la disolución a vacío y se filtró el sólido resultante y se lavó con dietil éter para dar 1,83 g (22%) del compuesto del título como un polvo sólido blanco. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11,47 (s, 1H), 4,33 (q, 2H, J = 7,1 Hz), 4,00 (t, 1H, J = 7,6 Hz), 3,44 (t, 2H, J = 8,0 Hz), 2,03-2,16 (m, 2H), 1,83 (s, 3H), 1,33 (t, 3H, J = 7,1 Hz). EM (ES) [m+H] calculado para C₁₂H₁₅NO₄, 238; hallado 238.

7-Cloro-6-metil-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizina-8-carboxilato de etilo (8c): Se agitó el compuesto 8b (659 mg, 2,8 mmol) en oxidocloruro fosforoso (1,5 ml, 15,8 mmol) a TA. Se añadió dimetilaminilina (0,07 ml, 0,56 mmol) y se agitó la reacción durante 16 h. Se concentró la disolución a vacío, se extinguió con hielo y se hizo básica con disolución saturada de NaHCO₃. Se concentró la disolución acuosa a vacío. Se llevó el residuo a MeOH al 20%/CH₂Cl₂ y se eliminaron las sales inorgánicas insolubles mediante filtración. Se concentraron las fases orgánicas y se purificaron mediante cromatografía en gel de sílice (EtOAc al 75%/CH₂Cl₂) para dar 450 mg (63%) de compuesto 8c como un sólido blanco. EM (ES) [m+H] calculado para C₁₂H₁₄ClNO₃, 256; hallado 256.

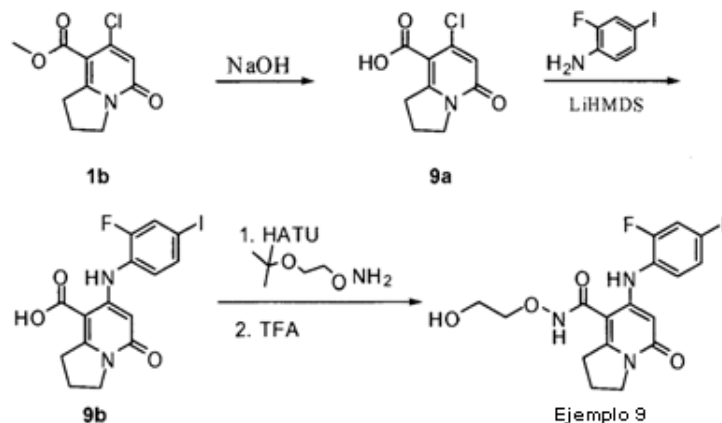
Ácido 7-cloro-6-metil-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizina-8-carboxílico (8d): Se agitó el compuesto 8c (225 mg, 0,88 mmol) en una disolución de THF (4 ml), MeOH (2 ml) y NaOH 1 N (2 ml) a t.a. durante 20 h. Se hizo ácida la disolución con HCl 1 N y se extrajo (3x) con CHCl₃. Se secaron las fases orgánicas (MgSO₄) y se concentraron a vacío para dar 190 mg (95%) de compuesto 8d como un sólido blanco. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13,16 (s, 1H), 4,01 (t, 2H, J = 6,9 Hz), 3,26 (t, 2H, J = 7,6 Hz), 1,96-2,17 (m, 5H). EM (ES) [m+H] calculado para C₁₀H₁₀ClNO₃, 228; hallado 228.

Ácido 7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-6-metil-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizina-8-carboxílico (8e): Se agitó el compuesto 8d (183 mg, 1,04 mmol) y 2-fluoro-4-yodoanilina (384 mg, 1,62 mmol) en THF seco (8 ml) a 0°C bajo nitrógeno. Se añadió gota a gota LiHMDS (1 M en THF, 2,4 ml, 2,4 mmol) y se agitó la reacción 4 h mientras se calentaba hasta TA. Se extinguió la disolución con HCl 1 N y se extrajo con MeOH al 10%/CH₂Cl₂ (3x). Se secaron las fases orgánicas (MgSO₄) y se concentraron a vacío. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice (MeOH del 10% al 20%/CH₂Cl₂) dio 76 mg (22%) de compuesto 8e como un sólido tostado. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7,57 (d, 1H, J = 9,1 Hz), 7,37 (d, 1H, J = 8,3 Hz), 6,38 (t, 1H, J = 9,0 Hz), 4,00 (t, 2H, J = 7,6 Hz), 3,41 (t, 2H, J = 8,1 Hz), 2,06-2,09 (m, 2H), 1,61 (s, 3H). EM (ES) [m+H] calculado para C₁₆H₁₄FIN₂O₃, 429; hallado 429.

7-(2-Fluoro-4-yodofenilamino)-N-(2-hidroxietoxi)-6-metil-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizina-8-carboxamida (ejemplo 8): Se añadió el compuesto 8e (76 mg, 0,23 mmol) a una suspensión de O-(2-terc-butoxi-etil)-hidroxilamina (véase el documento WO05/110410, 47 mg, 0,36 mmol), HATU (103 mg, 0,27 mmol) y N-metilmorfolina (0,10 ml, 0,90 mmol) en DMF (3 ml). Se calentó la reacción hasta 75°C durante 16 h y se concentró a vacío. Se disolvió el aceite resultante en 3 ml de TFA y se permitió que se agitara a TA durante 2 h. Entonces se añadió MeOH (3 ml) y se hizo básica con carbonato de potasio. Se permitió que se agitara durante 30 minutos, se separó por filtración el sólido y se concentró el filtrado a vacío. Se llevó el residuo a DMSO (1,5 ml) y metanol (1,5 ml) y se purificó mediante HPLC preparativa (25/40, agua/acetonitrilo) para dar 4 mg (5%) del ejemplo 8 como un sólido blanco. ¹H-RMN (400 MHz, MeOD): δ 7,43 (d, 1H, J = 8,9 Hz), 7,33 (d, 1H, J = 7,6 Hz), 6,43 (t, 1H, J = 8,6 Hz), 4,14 (t, 2H, J = 7,3 Hz), 3,85 (m,

2H), 3,67 (m, 2H), 3,29 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz), 2,09-2,27 (m, 2H), 1,83 (s, 3H). EM (ES) $[m+H]$ calculado para $C_{18}H_{19}FIN_3O_4$, 488; hallado 488.

Ejemplo 9: 7-(2-Fluoro-4-yodofenilamino)-N-(2-hidroxietoxi)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida

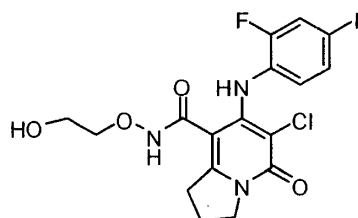


Ácido 7-cloro-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxílico (9a): Se agitó el compuesto 1b (800 mg, 3,52 mmol) en una disolución de THF (10 ml), MeOH (5 ml) y NaOH 1 N (5 ml) a t.a. durante 20 h. Se hizo ácida la disolución con HCl 1 N y se extrajo (3x) con $CHCl_3$. Se secaron las fases orgánicas ($MgSO_4$) y se concentraron a vacío para dar 637 mg (85%) de compuesto 9a como un sólido blanco. 1H -RMN (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ 13,17 (s, 1H), 6,43 (s, 1H), 3,99 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz), 3,32 (t, 2H, $J = 7,8$ Hz), 1,95-2,21 (m, 2H). EM (ES) $[m+H]$ calculado para $C_9H_8ClNO_3$, 214; hallado 214.

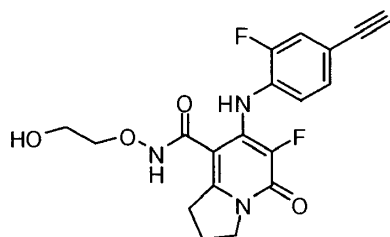
Ácido 7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxílico (9b): Se agitó el compuesto 9a (637 mg, 3,0 mmol) y 2-fluoro-4-yodoanilina (1,42 g, 6,0 mmol) en THF seco (20 ml) a $0^\circ C$ bajo nitrógeno. Se añadió gota a gota LiHMDS (1 M en THF, 9,0 ml, 9,0 mmol) y se agitó la reacción 4 h mientras se calentaba hasta t.a. Se extinguió la disolución con HCl 1 N y se extrajo con MeOH al 10%/ CH_2Cl_2 (3x). Se concentraron las fases orgánicas a vacío y se recogió el sólido blanco resultante para dar 202 mg (15%) de compuesto 9b. 1H -RMN (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ 10,01 (s, 1H), 7,76 (d, 1H, $J = 9,4$ Hz), 7,58 (m, 1H), 7,28 (t, 1H, $J = 8,9$ Hz), 5,36 (s, 1H), 3,93 (m, 2H), 3,46 (t, 2H, $J = 7,7$ Hz), 2,04-2,06 (m, 2H). EM (ES) $[m+H]$ calculado para $C_{15}H_{12}FIN_2O_3$, 415; hallado 415.

7-(2-Fluoro-4-yodofenilamino)-N-(2-hidroxietoxi)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida (ejemplo 9): Se añadió el compuesto 9b (202 mg, 0,49 mmol) a una suspensión de O-(2-terc-butoxi-etil)-hidroxilamina (véase el documento WO05/110410, 130 mg, 0,98 mmol), HATU (279 mg, 0,74 mmol) y N-metilmorfolina (0,27 ml, 2,45 mmol) en DMF (3 ml). Se calentó la reacción hasta $75^\circ C$ durante 16 h y se concentró a vacío. Se disolvió el aceite resultante en 3 ml de TFA y se permitió que se agitara a temperatura ambiente durante 2 h. Entonces se añadió MeOH (3 ml) y se hizo básica con carbonato de potasio. Se permitió que se agitara durante 30 minutos, se filtró el sólido y se concentró el filtrado a vacío. Se llevó el residuo a DMSO (1,5 ml) y metanol (1,5 ml) y se purificó mediante HPLC preparativa (25/40, agua/acetonitrilo) para dar 46 mg (20%) del ejemplo 9. 1H -RMN (400 MHz, MeOD): δ 7,62 (dd, 1H, $J = 8,3, 1,8$ Hz), 7,60 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz), 7,16 (t, 1H, $J = 8,2$ Hz), 5,64 (s, 1H), 3,97-4,18 (m, 4H), 3,60-3,86 (m, 2H), 3,30-3,35 (m, 2H), 2,01-2,33 (m, 2H). EM (ES) $[m+H]$ calculado para $C_{17}H_{17}FIN_3O_4$, 474; hallado 474.

Ejemplo 10: 6-Cloro-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-N-(2-hidroxietoxi)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida



Se disolvió el compuesto del ejemplo 9 (22 mg, 0,047 mmol) en DMF (2 ml) y se añadió N-clorosuccinimida (8 mg, 0,056 mmol) y se permitió que se agitara la reacción a t.a. durante 4 h. Se concentró la mezcla a vacío y se purificó mediante HPLC preparativa (25/35, agua/acetonitrilo) para dar 5 mg (21%) del compuesto del título. 1H -RMN (400 MHz, MeOD): δ 7,98 (s, 1H), 7,50 (dd, 1H, $J = 10,0, 1,6$ Hz), 7,44 (m, 1H), 6,87 (t, 1H, $J = 8,6$ Hz), 4,17 (t, 2H, $J = 7,8$ Hz), 3,59 (m, 2H), 3,34 (m, 2H), 3,17 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz), 2,43 (m, 2H). EM (ES) $[m+H]$ calculado para $C_{17}H_{16}ClFIN_3O_4$, 508; hallado 508.

Ejemplo 11: 7-(4-Etinil-2-fluorofenilamino)-6-fluoro-N-(2-hidroxietoxi)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida

5

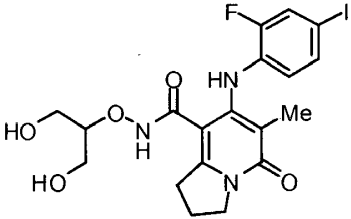
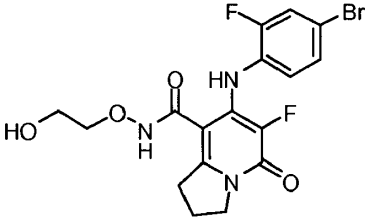
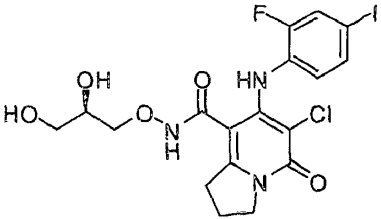
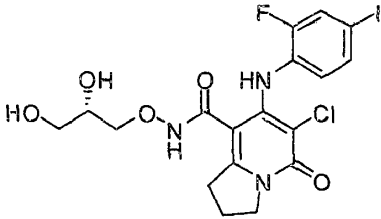
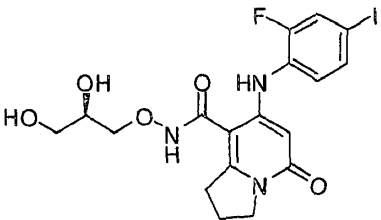
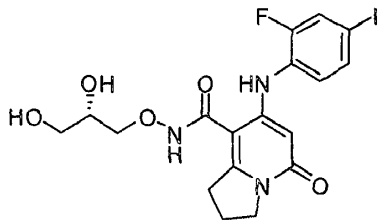
Se agitaron el compuesto del ejemplo 4 (25 mg, 0,051 mmol), TMS-acetileno (6 mg, 0,051 mmol), yoduro de cobre (1 mg, 0,0005 mmol), trietilamina (1,0 ml, 0,014 mmol) y diclorobis(trifenilfosfina)paladio (II) (1 mg, 0,0005 mmol) en THF/DMF 1:1 (2 ml) a temperatura ambiente durante 3 h. Se concentró la disolución a vacío y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (MeOH al 10%/CH₂Cl₂) para dar a un aceite tostado. Se disolvió el producto intermedio en THF/MeOH 1:1 (2 ml) y se añadió carbonato de potasio sólido (14 mg, 0,10 mmol) y se agitó la mezcla durante 1 h. Se separó por filtración el carbonato de potasio y se concentró la disolución a vacío y se purificó mediante HPLC preparativa (25/50, agua/acetonitrilo) para dar 12 mg (60%) del compuesto del título como un sólido blanco. ¹H-RMN (400 MHz, MeOD-d₄): δ 7,15-7,27 (m, 2H), 7,00 (t, 1H, J = 8,3 Hz), 4,16 (t, 1H, J = 7,3 Hz), 3,83-3,84 (m, 2H), 3,68 -3,69 (m, 2H), 3,51 (s, 1H), 3,27 (t, 2H, J = 7,6 Hz), 2,28 (s, 1H), 2,24 (m, 2H). EM (ES) [m+H] calculado para C₁₉H₁₇F₂N₃O₄, 390; hallado 390.

10

15

Además de lo anterior, pueden usarse los esquemas de reacción anteriores y variaciones de los mismos para preparar lo siguiente:

<p>6-fluoro-7-(2-fluoro-4-iodofenilamino)-N-(3-hidroxipropoxi)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida</p>	<p>6-cloro-N-(1,3-dihidroxiopropan-2-iloxi)-7-(2-fluoro-4-iodofenilamino)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida</p>
<p>7-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-N-(2-hidroxietoxi)-6-metil-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida</p>	<p>7-(4-etinil-2-fluorofenilamino)-N-(2-hidroxietoxi)-6-metil-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida</p>
<p>(R)-N-(2,3-dihidroxiopropoxi)-7-(2-fluoro-4-iodofenilamino)-6-metil-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida</p>	<p>(S)-N-(2,3-dihidroxiopropoxi)-7-(2-fluoro-4-iodofenilamino)-6-metil-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida</p>

 <p>N-(1,3-dihydroxipropan-2-iloxi)-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-6-metil-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida</p>	 <p>7-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-6-fluoro-N-(2-hidroxietoxi)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida</p>
 <p>(R)-6-cloro-N-(2,3-dihidroxiopropoxi)-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida</p>	 <p>(S)-6-cloro-N-(2,3-dihidroxiopropoxi)-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida</p>
 <p>(R)-N-(2,3-dihidroxiopropoxi)-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida</p>	 <p>(S)-N-(2,3-dihidroxiopropoxi)-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida</p>

Pruebas biológicas

- 5 Puede someterse a ensayo la actividad de compuestos como inhibidores de MEK *in vitro*, *in vivo* o en una línea celular. Además, pueden examinarse los compuestos según la presente invención para determinar la actividad frente a una o más MEK. A continuación se facilitan ensayos para determinar la actividad frente a MEK1 y ERK1.

Pueden obtenerse MEK1, MEK2 y ERK1 purificadas de la siguiente forma.

- 10 Para MEK1, puede amplificarse ADN que codifica para los residuos 2-393 (del. de aa 32-51, S218E/S222D) de la secuencia de longitud completa de la enzima humana mediante PCR y clonarse en los sitios BamHI/XbaI de pFastbac (Invitrogen), que incorpora una etiqueta de 6 histidinas en el extremo N-terminal. La delección de los residuos 32-51 y las dos mutaciones, S218E y S222D, pueden obtenerse mediante PCR de cambio rápido. La SEQ ID NO: 1 corresponde a los residuos 2-393, con delección de los residuos 32-51 y mutaciones S218E/S222D, y con la
- 15 etiqueta de 6 histidinas del extremo N-terminal. La SEQ ID NO: 2 es la secuencia de ADN que se usó para codificar la SEQ ID NO: 1.

- Para MEK2, puede amplificarse ADN que codifica para los residuos 1-400 (S222E/S226D) de la secuencia de longitud completa de la enzima humana mediante PCR y clonarse en pFastbac (Invitrogen), que incorpora una
- 20 etiqueta de 6 histidinas en el extremo N-terminal. Las dos mutaciones, S222E y S226D, pueden obtenerse mediante PCR de cambio rápido. La SEQ ID NO: 3 corresponde a los residuos 1-400 con mutaciones S222E/S226D, y con la etiqueta de 6 histidinas del extremo N-terminal y la SEQ. I.D. n.º 4 es la secuencia de ADN que se usó para codificar la SEQ ID NO: 3.

- 25 Para ERK1, puede amplificarse ADN que codifica para los residuos 1-379 de la secuencia de longitud completa de la enzima humana mediante PCR y clonarse en los sitios Small/Sall de pGEX-6p-3 (GE Healthcare), que incorpora una etiqueta de GST en el extremo N-terminal. La SEQ ID NO: 5 corresponde a los residuos 1-379 con la etiqueta de GST del extremo N-terminal. La SEQ ID NO: 6 es la secuencia de ADN que se usó para codificar la SEQ ID NO: 5.

- 30 Puede generarse baculovirus recombinante que incorpora los constructos de MEK1 y MEK2 mediante transposición

usando el sistema Bac-to-Bac (Invitrogen). Pueden generarse reservas virales de alto título mediante la infección de células Sf9 de *Spodoptera frugiperda*; puede llevarse a cabo la expresión de proteína recombinante mediante la infección de Sf9 de *Spodoptera frugiperda* (Invitrogen) en biorreactores Wave de 5 l (Wave Biotech).

- 5 Puede aislarse proteína recombinante de extractos celulares mediante pase sobre resina ProBond (Invitrogen). Entonces pueden purificarse adicionalmente extractos parcialmente purificados de todas las MEK1 mediante cromatografía de líquidos a alta presión sobre una resina de filtración en gel SEC2000. Puede determinarse la pureza de las proteínas MEK1 y MEK2 en gel SDS-PAGE desnaturalizante. Entonces pueden concentrarse MEK1 y MEK2 purificadas hasta una concentración final de 3,4 mg/ml y 5,4 mg/ml, respectivamente. Las proteínas o bien
10 pueden almacenarse a -78°C en un tampón que contiene TRIS-HCl 50 mM pH 7,6, NaCl 250 mM, EDTA 0,1 mM y TCEP 0,125 mM o bien a -20°C en presencia de glicerol (concentración final de glicerol al 50%).

- Puede generarse la proteína recombinante que incorpora los constructos de ERK1 mediante la transformación del vector de expresión en una cepa de *E. coli* HD5α (Invitrogen). Para expresar la proteína ERK1, la cepa de *E. coli*
15 transformada puede ponerse en cultivo a 37°C hasta una DO de 0,6, y luego inducirse añadiendo IPTG hasta una concentración final de 0,5 mM, y continuar con el cultivo de la célula durante la noche a 25°C.

- Puede aislarse la proteína ERK1 recombinante de extractos celulares mediante pase sobre Glutathione (Amersham). Entonces pueden purificarse adicionalmente los extractos parcialmente purificados de ERK1 mediante cromatografía de líquidos a alta presión sobre una resina de filtración en gel BioSep SEC3000. Puede determinarse la pureza de la proteína ERK1 en gel SDS-PAGE desnaturalizante. Entonces puede concentrarse ERK1 purificada hasta una
20 concentración final de 1,9 mg/ml. Las proteínas o bien pueden almacenarse a -78°C en un tampón que contiene TRIS-HCl 25 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM y TCEP 0,25 mM o bien a -20°C en presencia de glicerol (concentración final de glicerol al 50%).

- 25 Debe observarse que también son adecuados una variedad de otros sistemas de expresión y huéspedes para la expresión de MEK1 y ERK1, tal como apreciaría fácilmente un experto en la técnica.

- 30 Las propiedades inhibitoras de los compuestos en relación con MEK1 o MEK2 pueden determinarse usando un formato de placa negra de 384 pocillos en las siguientes condiciones de reacción: HEPES 50 mM pH 7,3, NaCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, Brij35 al 0,01%, MEK1 1 nM o MEK2 4 nM, ERK1 25 nM, ATP 400 μM, IPTTPITTYFFK-5FAM-COOH 500 nM (FI-Erktide) y DMSO al 1%. El producto de reacción se determina cuantitativamente mediante polarización fluorescente usando perlas IMAP progresivas de Molecular Devices.

- 35 La reacción de ensayo puede iniciarse de la siguiente forma: se añadieron 2 μl de la mezcla de FI-Erktide 1,5 μM y ERK 75 nM con 2 μl de inhibidor (diluciones en serie 2 veces para 11 puntos de datos para cada inhibidor) que contenía DMSO al 3% a cada pocillo de la placa, seguido por la adición de 2 μl de la mezcla de MEK 1 3 nM o MEK2 12 nM y ATP 1200 μM para iniciar la reacción (la concentración de enzima final fue de 1 nM para MEK1 o 4 nM para MEK2). Entonces puede incubarse la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 22 min. y extinguirse y
40 desarrollarse mediante la adición de 20 μl de dilución 1:200 de perlas IMAP progresivas (Molecular Devices) en tampón A al 80%, tampón B al 20% y Tween 20 al 0,003%. Puede medirse la polarización de fluorescencia de las mezclas de reacción resultantes tras una incubación de 1 hora a temperatura ambiente.

- 45 Pueden calcularse los valores de CI₅₀ mediante ajuste de la curva no lineal de las concentraciones del compuesto y la señal de polarización de fluorescencia para la ecuación CI₅₀ convencional. En la tabla 1 se facilitan los valores de CI₅₀ para compuestos seleccionados.

TABLA 1: CI₅₀ de compuestos a modo de ejemplo frente a MEK1

EJEMPLO	CI ₅₀ (nM)
1 (referencia)	≤ 100
2	≤ 100
3	≤ 100
4	≤ 100
5	≤ 100
7	≤ 100
8	≤ 100
9	≤ 100
10	≤ 100
11	≤ 100

Medición de la actividad inhibidora de producción de TNF- α : Se sembraron células THP-1 cultivadas en medio RPMI1640 (GIBCO BRL) que contenían suero de ternero fetal al 10% en una placa de 96 pocillos a 1×10^5 células/pocillo y se añadió un compuesto de prueba disuelto en DMSO a una concentración final de 0,0256 – 10 μ M. Tras cultivar en una incubadora de CO₂ a 37°C durante 1 hora, se añadió LPS (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a una concentración final de 100 ng/ml. Tras cultivar en una incubadora de CO₂ durante 2 horas, se midió la concentración de TNF- α del sobrenadante mediante ELISA. Se calculó la concentración del compuesto de prueba necesaria para la inhibición al 50% de la producción de TNF- α (valor de CI₅₀) mediante el paquete preclínico SAS V5.0 (SAS Institute, Japón). En la tabla 1 se facilitan los valores para compuestos seleccionados. En la tabla 2 se facilitan los valores de CI₅₀ para compuestos seleccionados.

TABLA 2: CI₅₀ de compuestos a modo de ejemplo en la producción de TNF- α .

EJEMPLO	CI ₅₀ (nM)
4	21
8	8,1

Evaluación de la eficacia farmacológica en un modelo de artritis inducida por colágeno en ratas: Se evaluó la eficacia farmacológica de compuestos de prueba en un modelo de artritis inducida por colágeno en ratas. Se disolvió colágeno bovino de tipo II en disolución acuosa de ácido acético 0,05 M a una concentración de 3 mg/ml. Se emulsionó la disolución de colágeno obtenida en un volumen igual de adyuvante incompleto de Freund y se usó como emulsión para el estudio. Se sensibilizaron ratas Lewis hembras (de 6 semanas de edad) mediante inyección intradérmica en el lomo con 0,5 ml de emulsión. Siete días después (día 0), se administró a las ratas otra inyección intradérmica de 0,2 ml de la emulsión en la base de la cola. Se asignaron las ratas en grupos (grupos experimentales y grupos control) dependiendo del volumen de pata medido mediante un pletismómetro (Ugo Basil) y el peso corporal. A cada grupo experimental se le administró por vía oral el compuesto de prueba suspendido en disolución de metilcelulosa al 0,5% (5 ml/kg) dos veces al día durante el periodo entre el día 4 y el día 14. A los grupos control se les administró por vía oral disolución de metilcelulosa al 0,5% (5 ml/kg). Se calculó la cantidad de dosis del compuesto necesaria para la inhibición del 50% de la hinchazón de la pata (valor de DE₃₀) mediante el paquete preclínico SAS V5.0 (SAS Institute, Japón) tomando la cantidad de volumen de pata en el grupo control (día 14 menos día 4) como el 100%. En la tabla 3 se facilitan los valores de DE₃₀ para los compuestos de prueba.

TABLA 3: DE₃₀ de compuestos a modo de ejemplo en el estudio de artritis inducida por colágeno en ratas

EJEMPLO	DE ₃₀ (mg/kg, bid)
4	0,06
8	0,02

Resultará evidente para los expertos en la técnica que pueden realizarse diversas modificaciones y variaciones en los compuestos, composiciones, kits y métodos de la presente invención sin apartarse del alcance de la invención. Por tanto, se pretende que la presente invención cubra las modificaciones y variaciones de esta invención siempre que entren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Lista de secuencias

<110> Takeda Pharmaceutical Company Limited

<120> Inhibidores de MAPK/ERK cinasa

<130> P040595EP

<140> 08849376.2

<141> 07-11-2008

<150> Documento US 60/987.279

<151> 12-11-2007

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 400

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Residuos 2-393 de MEK1 humana con delección de los residuos 32-51, mutaciones S218E y S222D y una etiqueta de 6 histidinas en el extremo N-terminal.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1).. (28)

<223> Etiqueta de 6 histidinas del extremo N-terminal

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29) .. (400)

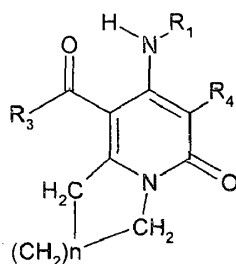
5 <223> Residuos 2-393 de MEK1 humana con delección de los residuos 32-51 y mutaciones S218E y S222D

<400> 1

Met	Ser	Tyr	Tyr	His	His	His	His	His	His	Asp	Tyr	Asp	Ile	Pro	Thr
1				5					10				15		
Thr	Glu	Asn	Leu	Tyr	Phe	Gln	Gly	Ala	Met	Gly	Ser	Pro	Lys	Lys	Lys
			20					25					30		
Pro	Thr	Pro	Ile	Gln	Leu	Asn	Pro	Ala	Pro	Asp	Gly	Ser	Ala	Val	Asn
		35					40					45			
Gly	Thr	Ser	Ser	Ala	Glu	Thr	Asn	Leu	Glu	Ala	Phe	Leu	Thr	Gln	Lys
	50					55					60				
Gln	Lys	Val	Gly	Glu	Leu	Lys	Asp	Asp	Asp	Phe	Glu	Lys	Ile	Ser	Glu
65					70					75					80
Leu	Gly	Ala	Gly	Asn	Gly	Gly	Val	Val	Phe	Lys	Val	Ser	His	Lys	Pro
				85					90					95	

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula:



o un tautómero, enantiómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

n se selecciona del grupo que consiste en 1, 2 y 3;

R₁ se selecciona del grupo que consiste en arilo (C₄₋₁₂) y heteroarilo (C₁₋₁₀), cada uno no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo A;

R₃ es R₁₅O-NH-;

R₄ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halo, alquilo (C₁₋₅) y haloalquilo (C₁₋₅), cada uno no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo A; y

R₁₅ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alcoxilo, alquilo (C₁₋₁₀), hidroxialquilo (C₁₋₁₀) y heterocicloalquil (C₃₋₁₂)-alquilo (C₁₋₁₀), cada uno no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo A;

el grupo A consiste en halo, nitro, ciano, tio, oxi, hidroxilo, carboniloxilo, alcoxilo (C₁₋₁₀), ariloxilo (C₄₋₁₂), heteroariloxilo (C₁₋₁₀), carbonilo, oxicarbonilo, aminocarbonilo, amino, alquilamino (C₁₋₁₀), sulfonamido, imino, sulfonilo, sulfinilo, alquilo (C₁₋₁₀), haloalquilo (C₁₋₁₀), hidroxialquilo (C₁₋₁₀), carbonilalquilo (C₁₋₁₀), tiocarbonilalquilo (C₁₋₁₀), sulfonylalquilo (C₁₋₁₀), sulfonilalquilo (C₁₋₁₀), azaalquilo (C₁₋₁₀), iminoalquilo (C₁₋₁₀), cicloalquil (C₃₋₁₂)-alquilo (C₁₋₅), heterocicloalquil (C₃₋₁₂)-alquilo (C₁₋₁₀), arilalquilo (C₁₋₁₀), heteroaril (C₁₋₁₀)-alquilo (C₁₋₅), bicicloaril (C₉₋₁₂)-alquilo (C₁₋₅), heterobicicloaril (C₈₋₁₂)-alquilo (C₁₋₅), cicloalquilo (C₃₋₁₂), heterocicloalquilo (C₃₋₁₂), bicicloalquilo (C₉₋₁₂), heterobicicloalquilo (C₃₋₁₂), arilo (C₄₋₁₂), heteroarilo (C₁₋₁₀), bicicloarilo (C₉₋₁₂) y heterobicicloarilo (C₄₋₁₂), cada uno no sustituido o sustituido con un sustituyente adicional seleccionado del grupo B;

el grupo B consiste en halo, nitro, ciano, tio, oxi, hidroxilo, carboniloxilo, alcoxilo (C₁₋₁₀), ariloxilo (C₄₋₁₂), heteroariloxilo (C₁₋₁₀), carbonilo, oxicarbonilo, aminocarbonilo, amino, alquilamino (C₁₋₁₀), sulfonamido, imino, sulfonilo, sulfinilo, alquilo (C₁₋₁₀), haloalquilo (C₁₋₁₀), hidroxialquilo (C₁₋₁₀), carbonilalquilo (C₁₋₁₀), tiocarbonilalquilo (C₁₋₁₀), sulfonylalquilo (C₁₋₁₀), sulfonilalquilo (C₁₋₁₀), azaalquilo (C₁₋₁₀), iminoalquilo (C₁₋₁₀), cicloalquil (C₃₋₁₂)-alquilo (C₁₋₅), heterocicloalquil (C₃₋₁₂)-alquilo (C₁₋₁₀), arilalquilo (C₁₋₁₀), heteroaril (C₁₋₁₀)-alquilo (C₁₋₅), bicicloaril (C₉₋₁₂)-alquilo (C₁₋₅), heterobicicloaril (C₈₋₁₂)-alquilo (C₁₋₅), cicloalquilo (C₃₋₁₂), heterocicloalquilo (C₃₋₁₂), bicicloalquilo (C₉₋₁₂), heterobicicloalquilo (C₃₋₁₂), arilo (C₄₋₁₂), heteroarilo (C₁₋₁₀), bicicloarilo (C₉₋₁₂) y heterobicicloarilo (C₄₋₁₂); y

“alquilo”, o bien solo o bien representado junto con otro radical, significa un radical alifático, lineal o ramificado, saturado o insaturado que tiene una cadena de átomos de carbono.

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que R₁ es fenilo, no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo A.

3. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que R₁ está sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidrógeno, halo, ciano, tio, alcoxilo, alquilo (C₁₋₃), hidroxialquilo (C₁₋₃) y cicloalquilo (C₃₋₈), cada uno no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo A.

4. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que R₁ está sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidrógeno, fluoro, cloro, bromo, yodo, ciano, metiltio, metoxilo, trifluorometoxilo, metilo, etilo, trifluorometilo, etinilo, n-propanolilo y ciclopropilo.

5. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que R₃ es R₁₁O-L-O-NH- en la que

L es alquileo (C₁₋₁₀), no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo A y R₁₁ se

selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo (C_{1-5}), no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo A.

6. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que R_3 es $R_{11}O-L-O-NH-$ en la que

L es alquileo (C_{1-3}), no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo A y R_{11} se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo (C_{1-5}), no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo A.

7. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que R_4 es hidrógeno.

8. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que R_4 es halo.

9. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que R_4 es metilo.

10. Compuesto según la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en

(R)-N-(2,3-dihidroxiopropoxi)-6-fluoro-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

N-(1,3-dihidroxiopropan-2-iloxi)-6-fluoro-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

6-fluoro-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-N-(2-hidroxietoxi)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

(S)-N-(2,3-dihidroxiopropoxi)-6-fluoro-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

7-fluoro-8-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-N-(2-hidroxietoxi)-6-oxo-2,3,4,6-tetrahidro-1H-quinolizina-9-carboxamida;

7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-N-(2-hidroxietoxi)-6-metil-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-N-(2-hidroxietoxi)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

6-cloro-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-N-(2-hidroxietoxi)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

7-(4-etinil-2-fluorofenilamino)-6-fluoro-N-(2-hidroxietoxi)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

6-fluoro-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-N-(3-hidroxiopropoxi)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

6-cloro-N-(1,3-dihidroxiopropan-2-iloxi)-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

7-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-N-(2-hidroxietoxi)-6-metil-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

7-(4-etinil-2-fluorofenilamino)-N-(2-hidroxietoxi)-6-metil-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

(R)-N-(2,3-dihidroxiopropoxi)-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-6-metil-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

(S)-N-(2,3-dihidroxiopropoxi)-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-6-metil-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

N-(1,3-dihidroxiopropan-2-iloxi)-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-6-metil-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

7-(4-bromo-2-fluorofenilamino)-6-fluoro-N-(2-hidroxietoxi)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

(R)-6-cloro-N-(2,3-dihidroxiopropoxi)-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

(S)-6-cloro-N-(2,3-dihidroxiopropoxi)-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida;

(R)-N-(2,3-dihidroxiopropoxi)-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida; y

(S)-N-(2,3-dihidroxiopropoxi)-7-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizin-8-carboxamida.

11. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el compuesto está en forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

12. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el compuesto está presente en una mezcla de estereoisómeros.

13. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el compuesto comprende un

estereoisómero individual.

14. Composición farmacéutica que comprende como principio activo un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 y un excipiente.

5

15. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, para su uso como medicamento.

16. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, para su uso en el tratamiento de cáncer.

FIGURA 1A

Residuos 2-393 de MEK1 humana que codifican para secuencia de proteína, con delección de los residuos 32-51, mutaciones S218E y S222D, y con una etiqueta de 6 histidinas del extremo N-terminal [SEQ ID NO: 1]

```

Met Ser Tyr Tyr His His His His His His Asp Tyr Asp Ile Pro Thr
1      5      10      15

Thr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ala Met Gly Ser Pro Lys Lys Lys
      20      25      30

Pro Thr Pro Ile Gln Leu Asn Pro Ala Pro Asp Gly Ser Ala Val Asn
      35      40      45

Gly Thr Ser Ser Ala Glu Thr Asn Leu Glu Ala Phe Leu Thr Gln Lys
      50      55      60

Gln Lys Val Gly Glu Leu Lys Asp Asp Asp Phe Glu Lys Ile Ser Glu
65      70      75      80

Leu Gly Ala Gly Asn Gly Gly Val Val Phe Lys Val Ser His Lys Pro
      85      90      95

Ser Gly Leu Val Met Ala Arg Lys Leu Ile His Leu Glu Ile Lys Pro
      100     105     110

Ala Ile Arg Asn Gln Ile Ile Arg Glu Leu Gln Val Leu His Glu Cys
      115     120     125

Asn Ser Pro Tyr Ile Val Gly Phe Tyr Gly Ala Phe Tyr Ser Asp Gly
      130     135     140

Glu Ile Ser Ile Cys Met Glu His Met Asp Gly Gly Ser Leu Asp Gln
145     150     155     160

Val Leu Lys Lys Ala Gly Arg Ile Pro Glu Gln Ile Leu Gly Lys Val
      165     170     175

Ser Ile Ala Val Ile Lys Gly Leu Thr Tyr Leu Arg Glu Lys His Lys
      180     185     190

```

FIGURA 1B

Ile	Met	His	Arg	Asp	Val	Lys	Pro	Ser	Asn	Ile	Leu	Val	Asn	Ser	Arg
		195					200					205			
Gly	Glu	Ile	Lys	Leu	Cys	Asp	Phe	Gly	Val	Ser	Gly	Gln	Leu	Ile	Asp
	210					215					220				
Glu	Met	Ala	Asn	Asp	Phe	Val	Gly	Thr	Arg	Ser	Tyr	Met	Ser	Pro	Glu
225					230					235					240
Arg	Leu	Gln	Gly	Thr	His	Tyr	Ser	Val	Gln	Ser	Asp	Ile	Trp	Ser	Met
				245					250					255	
Gly	Leu	Ser	Leu	Val	Glu	Met	Ala	Val	Gly	Arg	Tyr	Pro	Ile	Pro	Pro
			260					265					270		
Pro	Asp	Ala	Lys	Glu	Leu	Glu	Leu	Met	Phe	Gly	Cys	Gln	Val	Glu	Gly
		275					280					285			
Asp	Ala	Ala	Glu	Thr	Pro	Pro	Arg	Pro	Arg	Thr	Pro	Gly	Arg	Pro	Leu
	290					295					300				
Ser	Ser	Tyr	Gly	Met	Asp	Ser	Arg	Pro	Pro	Met	Ala	Ile	Phe	Glu	Leu
305					310					315					320
Leu	Asp	Tyr	Ile	Val	Asn	Glu	Pro	Pro	Pro	Lys	Leu	Pro	Ser	Gly	Val
				325					330					335	
Phe	Ser	Leu	Glu	Phe	Gln	Asp	Phe	Val	Asn	Lys	Cys	Leu	Ile	Lys	Asn
			340					345					350		
Pro	Ala	Glu	Arg	Ala	Asp	Leu	Lys	Gln	Leu	Met	Val	His	Ala	Phe	Ile
		355					360					365			
Lys	Arg	Ser	Asp	Ala	Glu	Glu	Val	Asp	Phe	Ala	Gly	Trp	Leu	Cys	Ser
	370					375					380				
Thr	Ile	Gly	Leu	Asn	Gln	Pro	Ser	Thr	Pro	Thr	His	Ala	Ala	Gly	Val
385					390					395					400

FIGURA 1C**Secuencia de ADN que codifica para SEQ ID NO: 1 [SEQ ID NO: 2].**

atgtcgtact accatcacca tcaccatcac gattacgata toccaacgac cgaaaacctg	60
tattttcagg gcgcatggg atccccaag aagaagccga cgcccatcca gctgaacccg	120
gccccgacg gctctgcagt taacgggacc agctctgcgg agaccaactt ggaggccttt	180
cttaccaga agcagaagg gggagaactg aaggatgacg actttgagaa gatcagtgag	240
ctgggggctg gcaatggcg tgtggtgttc aaggtctccc acaagccttc tggcctggtc	300
atggccagaa agctaattca tctggagatc aaaccgcga tccggaacca gatcataagg	360
gagctgcagg ttctgcatga gtgcaactct ccgtacatcg tgggcttcta tgggtgcttc	420
tacagcgatg gcgagatcag tatctgcatg gagcacatgg atggagggtc tctggatcaa	480
gtcctgaaga aagctggaag aattcctgaa caaatttttag gaaaagttag cattgctgta	540
ataaaaggcc tgacatatct gagggagaag cacaagatca tgcacagaga tgtcaagccc	600
tccaacatcc tagtcaactc ccgtggggag atcaagctct gtgactttgg ggtcagcggg	660
cagctcatcg acgaaatggc caacgacttc gtgggcacaa ggtcctacat gtcgccagaa	720
agactccagg ggactcatta ctctgtgcag tcagacatct ggagcatggg actgtctctg	780
gtagagatgg cggttgggag gtatcccatc cctcctccag atgccaagga gctggagctg	840
atgtttgggt gccagggtga aggagatgcg gctgagaccc caccaggcc aaggaccccc	900
gggaggcccc ttagctcata cggaatggac agccgacctc ccatggcaat ttttgagttg	960
ttggattaca tagtcaacga gcctcctcca aaactgcca gtggagtgtt cagtctggaa	1020
tttcaagatt ttgtgaataa atgcttaata aaaaaccccg cagagagagc agatttgaag	1080
caactcatgg ttcattgcttt tatcaagaga tctgatgctg aggaagtgga ttttgcaggt	1140
tggctctgct ccaccatcgg ccttaaccag ccagcacac caaccatgc tgctggcgtc	1200
taa	1203

FIGURA 1D

**Residuos 1-400 de MEK2 humana que codifican para secuencia de proteína,
con mutaciones S222E y S226D, y con una etiqueta de 6 histidinas del
extremo N-terminal [SEQ ID NO: 3]**

Met	Ser	Tyr	Tyr	His	His	His	His	His	His	Asp	Tyr	Asp	Ile	Pro	Thr	1	5	10	15
Thr	Glu	Asn	Leu	Tyr	Phe	Gln	Gly	Ala	Met	Glu	Pro	Met	Leu	Ala	Arg	20	25	30	
Arg	Lys	Pro	Val	Leu	Pro	Ala	Leu	Thr	Ile	Asn	Pro	Thr	Ile	Ala	Glu	35	40	45	
Gly	Pro	Ser	Pro	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Ser	Glu	Ala	Asn	Leu	Val	Asp	50	55	60	
Leu	Gln	Lys	Lys	Leu	Glu	Glu	Leu	Glu	Leu	Asp	Glu	Gln	Gln	Lys	Lys	65	70	75	80
Arg	Leu	Glu	Ala	Phe	Leu	Thr	Gln	Lys	Ala	Lys	Val	Gly	Glu	Leu	Lys	85	90	95	
Asp	Asp	Asp	Phe	Glu	Arg	Ile	Ser	Glu	Leu	Gly	Ala	Gly	Asn	Gly	Gly	100	105	110	
Val	Val	Thr	Lys	Val	Gln	His	Arg	Pro	Ser	Gly	Leu	Ile	Met	Ala	Arg	115	120	125	
Lys	Leu	Ile	His	Leu	Glu	Ile	Lys	Pro	Ala	Ile	Arg	Asn	Gln	Ile	Ile	130	135	140	
Arg	Glu	Leu	Gln	Val	Leu	His	Glu	Cys	Asn	Ser	Pro	Tyr	Ile	Val	Gly	145	150	155	160
Phe	Tyr	Gly	Ala	Phe	Tyr	Ser	Asp	Gly	Glu	Ile	Ser	Ile	Cys	Met	Glu	165	170	175	
His	Met	Asp	Gly	Gly	Ser	Leu	Asp	Gln	Val	Leu	Lys	Glu	Ala	Lys	Arg	180	185	190	

FIGURA 1E

Ile	Pro	Glu	Glu	Ile	Leu	Gly	Lys	Val	Ser	Ile	Ala	Val	Leu	Arg	Gly
		195					200					205			
Leu	Ala	Tyr	Leu	Arg	Glu	Lys	His	Gln	Ile	Met	His	Arg	Asp	Val	Lys
	210					215					220				
Pro	Ser	Asn	Ile	Leu	Val	Asn	Ser	Arg	Gly	Glu	Ile	Lys	Leu	Cys	Asp
225					230					235					240
Phe	Gly	Val	Ser	Gly	Gln	Leu	Ile	Asp	Glu	Met	Ala	Asn	Asp	Phe	Val
				245					250					255	
Gly	Thr	Arg	Ser	Tyr	Met	Ala	Pro	Glu	Arg	Leu	Gln	Gly	Thr	His	Tyr
			260					265					270		
Ser	Val	Gln	Ser	Asp	Ile	Trp	Ser	Met	Gly	Leu	Ser	Leu	Val	Glu	Leu
		275					280					285			
Ala	Val	Gly	Arg	Tyr	Pro	Ile	Pro	Pro	Pro	Asp	Ala	Lys	Glu	Leu	Glu
	290					295					300				
Ala	Ile	Phe	Gly	Arg	Pro	Val	Val	Asp	Gly	Glu	Glu	Gly	Glu	Pro	His
305					310					315					320
Ser	Ile	Ser	Pro	Arg	Pro	Arg	Pro	Pro	Gly	Arg	Pro	Val	Ser	Gly	His
				325					330					335	
Gly	Met	Asp	Ser	Arg	Pro	Ala	Met	Ala	Ile	Phe	Glu	Leu	Leu	Asp	Tyr
			340					345					350		
Ile	Val	Asn	Glu	Pro	Pro	Pro	Lys	Leu	Pro	Asn	Gly	Val	Phe	Thr	Pro
		355					360					365			
Asp	Phe	Gln	Glu	Phe	Val	Asn	Lys	Cys	Leu	Ile	Lys	Asn	Pro	Ala	Glu
	370					375					380				
Arg	Ala	Asp	Leu	Lys	Met	Leu	Thr	Asn	His	Thr	Phe	Ile	Lys	Arg	Ser
385					390					395					400

FIGURA 1F

Glu Val Glu Glu Val Asp Phe Ala Gly Trp Leu Cys Lys Thr Leu Arg
405 410 415

Leu Asn Gln Pro Gly Thr Pro Thr Arg Thr Ala Val
420 425

Secuencia de ADN que codifica para SEQ ID NO: 3 [SEQ ID NO: 4]

```

atgtcgtact accatcacca tcaccatcac gattacgata tcccaacgac cgaaaacctg      60
tattttcagg ggcocatgga acccatgctg gcccgaggga agccggtgct gcggcgctc      120
accatcaacc ctaccatcgc cgagggccca tccctacca gcgaggcgcc ctccgaggca      180
aacctggtgg acctgcagaa gaagctggag gagctggaac ttgacgagca gcagaagaag      240
cggctggaag cttttctcac ccagaaagcc aaggctcggc aactcaaaga cgatgacttc      300
gaaaggatct cagagctggg cgcgggcaac ggcgggggtg tcaccaaagt ccagcacaga      360
ccctcgggcc tcatcatggc caggaagctg atccaccttg agatcaagcc ggccatccgg      420
aaccagatca tccgcgagct gcaggtcctg cacgaatgca actcgccgta catcgtgggc      480
ttctacgggg ctttctacag tgacggggag atcagcattt gcatggaaca catggacggc      540
ggctccctgg accaggtgct gaaagaggcc aagaggattc ccgaggagat cctggggaaa      600
gtcagcatcg cggttctccg gggcttggcg tacctccgag agaagcacca gatcatgcac      660
cgagatgtga agccctcaa catcctcgtg aactctagag gggagatcaa gctgtgtgac      720
ttcgggggtg gcgccagct catagacgaa atggccaacg acttcgtggg cacgcgctcc      780
tacatggctc cggagcgggt gcagggcaca cattactcgg tgcagtcgga catctggagc      840
atgggcctgt ccctggtgga gctggccgct ggaaggtacc ccatcccccc gcccgacgcc      900
aaagagctgg aggccatctt tggccggccc gtggtcgacg ggaagaagg agagcctcac      960
agcatctcgc ctcgccgag gccccccggg cgcctcgta gcggtcacgg gatggatagc     1020
cggcctgcc a tggccatctt tgaactcctg gactatattg tgaacgagcc acctcctaag     1080

```

FIGURA 1G

```

ctgcccacg gtgtgttcac ccccgacttc caggagtttg tcaataaatg cctcatcaag 1140
aaccagcgg agcgggcgga cctgaagatg ctcacaaacc acaccttcac caagcgggcc 1200
gagggtggaag aagtggattt tgccggctgg ttgtgtataaa ccctgcggct gaaccagccc 1260
ggcacaccca cgcgcaccgc cgtgtaa 1287

```

**Residuos 1-379 de ERK1 humana que codifican para secuencia de proteína,
con una etiqueta de GST del extremo N-terminal [SEQ ID NO: 5]**

```

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
1           5           10           15

Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
          20           25           30

Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
          35           40           45

Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
50           55           60

Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
65           70           75           80

Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu
          85           90           95

Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser
100          105          110

Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu
115          120          125

Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn
130          135          140

Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp
145          150          155          160

```

FIGURA 1H

Val	Val	Leu	Tyr	Met	Asp	Pro	Met	Cys	Leu	Asp	Ala	Phe	Pro	Lys	Leu
				165					170					175	
Val	Cys	Phe	Lys	Lys	Arg	Ile	Glu	Ala	Ile	Pro	Gln	Ile	Asp	Lys	Tyr
			180					185					190		
Leu	Lys	Ser	Ser	Lys	Tyr	Ile	Ala	Trp	Pro	Leu	Gln	Gly	Trp	Gln	Ala
		195					200					205			
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Asp	His	Pro	Pro	Lys	Ser	Asp	Leu	Glu	Val	Leu
	210					215					220				
Phe	Gln	Gly	Pro	Leu	Gly	Ser	Pro	Asn	Ser	Gly	Met	Ala	Ala	Ala	Ala
225					230					235					240
Ala	Gln	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Glu	Pro	Arg	Arg	Thr	Glu	Gly	Val	Gly
				245					250					255	
Pro	Gly	Val	Pro	Gly	Glu	Val	Glu	Met	Val	Lys	Gly	Gln	Pro	Phe	Asp
			260					265					270		
Val	Gly	Pro	Arg	Tyr	Thr	Gln	Leu	Gln	Tyr	Ile	Gly	Glu	Gly	Ala	Tyr
		275					280					285			
Gly	Met	Val	Ser	Ser	Ala	Tyr	Asp	His	Val	Arg	Lys	Thr	Arg	Val	Ala
	290					295					300				
Ile	Lys	Lys	Ile	Ser	Pro	Phe	Glu	His	Gln	Thr	Tyr	Cys	Gln	Arg	Thr
305					310					315					320
Leu	Arg	Glu	Ile	Gln	Ile	Leu	Leu	Arg	Phe	Arg	His	Glu	Asn	Val	Ile
				325					330					335	
Gly	Ile	Arg	Asp	Ile	Leu	Arg	Ala	Ser	Thr	Leu	Glu	Ala	Met	Arg	Asp
			340					345					350		
Val	Tyr	Ile	Val	Gln	Asp	Leu	Met	Glu	Thr	Asp	Leu	Tyr	Lys	Leu	Leu
		355					360					365			

FIGURA 11

Lys Ser Gln Gln Leu Ser Asn Asp His Ile Cys Tyr Phe Leu Tyr Gln
 370 375 380
 Ile Leu Arg Gly Leu Lys Tyr Ile His Ser Ala Asn Val Leu His Arg
 385 390 395 400
 Asp Leu Lys Pro Ser Asn Leu Leu Ile Asn Thr Thr Cys Asp Leu Lys
 405 410 415
 Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Ile Ala Asp Pro Glu His Asp His
 420 425 430
 Thr Gly Phe Leu Thr Glu Tyr Val Ala Thr Arg Trp Tyr Arg Ala Pro
 435 440 445
 Glu Ile Met Leu Asn Ser Lys Gly Tyr Thr Lys Ser Ile Asp Ile Trp
 450 455 460
 Ser Val Gly Cys Ile Leu Ala Glu Met Leu Ser Asn Arg Pro Ile Phe
 465 470 475 480
 Pro Gly Lys His Tyr Leu Asp Gln Leu Asn His Ile Leu Gly Ile Leu
 485 490 495
 Gly Ser Pro Ser Gln Glu Asp Leu Asn Cys Ile Ile Asn Met Lys Ala
 500 505 510
 Arg Asn Tyr Leu Gln Ser Leu Pro Ser Lys Thr Lys Val Ala Trp Ala
 515 520 525
 Lys Leu Phe Pro Lys Ser Asp Ser Lys Ala Leu Asp Leu Leu Asp Arg
 530 535 540
 Met Leu Thr Phe Asn Pro Asn Lys Arg Ile Thr Val Glu Glu Ala Leu
 545 550 555 560
 Ala His Pro Tyr Leu Glu Gln Tyr Tyr Asp Pro Thr Asp Glu Pro Val
 565 570 575

FIGURA 1J

Ala Glu Glu Pro Phe Thr Phe Ala Met Glu Leu Asp Asp Leu Pro Lys
 580 585 590

Glu Arg Leu Lys Glu Leu Ile Phe Gln Glu Thr Ala Arg Phe Gln Pro
 595 600 605

Gly Val Leu Glu Ala Pro
 610

Secuencia de ADN que codifica para SEQ ID NO: 5 [SEQ ID NO: 6]

```

atgtccccta tactagggtta ttggaaaatt aagggccttg tgcaaccac tgcacttctt      60
ttggaatatc ttgaagaaaa atatgaagag catttgtagt agcgcgatga aggtgataaa      120
tggcgaaaca aaaagtttga attgggtttg gagtttccca atcttcctta ttatattgat      180
ggtgatgtta aattaacaca gtctatggcc atcatagctt atatagctga caagcacaac      240
atgttgggtg gttgtccaaa agagcgtgca gagatttcaa tgcttgaagg agcgggtttt      300
gatattagat acggtgtttc gagaattgca tatagtaaag actttgaaac tctcaaagtt      360
gattttctta gcaagctacc tgaaatgctg aaaatgttcg aagatcgttt atgtcataaa      420
acatatattaa atggtgatca tgtaacccat cctgacttca tgttgtatga cgctcttgat      480
gttgttttat acatggaccc aatgtgcctg gatgcgttcc caaaattagt ttgttttaaa      540
aaacgtattg aagctatccc acaaattgat aagtacttga aatccagcaa gtatatagca      600
tggcctttgc agggctggca agccacgttt ggtggtggcg accatcctcc aaaatcggat      660
ctggaagttc tgttccaggg gccctggga tccccgaatt ccgggatggc ggcgggcgcg      720
gctcaggggg gcgggggcg ggagccccgt agaaccgagg gggtcggccc ggggggtccc      780
ggggaggtgg agatggtgaa ggggcagccg ttcgacgtgg gccgcgcta cacgcagttg      840
cagtacatcg gcgagggcgc gtacggcatg gtcagctcgg cctatgacca cgtgcgcaag      900
actcgcgtgg ccatcaagaa gatcagcccc ttcgaaacatc agacctactg ccagcgcacg      960
ctccgggaga tccagatcct gctgcgcttc cgccatgaga atgtcatcgg catccgagac     1020
attctgcggg cgtccaccct ggaagccatg agagatgtct acattgtgca ggacctgatg     1080

```

FIGURA 1K

gagactgacc	tgtacaagtt	gctgaaaagc	cagcagctga	gcaatgacca	tatctgctac	1140
ttcctctacc	agatcctgcg	gggcctcaag	tacatccact	ccgccaacgt	gctccaccga	1200
gatctaaaagc	cctccaaact	gctcatcaac	accacctgcg	accttaagat	ttgtgatttc	1260
ggcctggccc	ggattgccga	tcctgagcat	gaccacaccg	gcttcctgac	ggagtatgtg	1320
gctacgcgct	ggtaaccggc	cccagagatc	atgctgaact	ccaagggcta	taccaagtcc	1380
atcgacatct	ggctctgtgg	ctgcattctg	gctgagatgc	tctctaaccg	gcccatcttc	1440
cctggcaagc	actacctgga	tcagctcaac	cacattctgg	gcatectggg	ctccccatcc	1500
caggaggacc	tgaattgtat	catcaacatg	aaggcccgaa	actacctaca	gtctctgccc	1560
tccaagacca	aggtggcttg	ggccaagctt	ttccccaagt	cagactccaa	agcccttgac	1620
ctgctggacc	ggatgttaac	ctttaacccc	aataaacgga	tcacagtgga	ggaagcgctg	1680
gctcaccctt	acctggagca	gtactatgac	ccgacggatg	agccagtggc	cgaggagccc	1740
ttcaccttcg	ccatggagct	ggatgaccta	cctaaggagc	ggctgaagga	gctcatcttc	1800
caggagacag	caagcttcca	gcccggagtg	ctggaggccc	cctag		1845