



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 318 276**

51 Int. Cl.:
A61K 31/4725 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04718960 .0**
96 Fecha de presentación : **10.03.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1603566**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.12.2005**

54 Título: **Uso de los derivados de la isoquinolina para tratar el cáncer y las enfermedades relacionadas con la quinasa MAP.**

30 Prioridad: **11.03.2003 US 453624 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

73 Titular/es: **NOVARTIS AG.**
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

72 Inventor/es: **Batt, David, Bryant;**
Bold, Guido;
Kim, Sunkyu;
Ramsey, Timothy, Michael y
Sabio, Michael, Lloyd

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 318 276 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

Uso de los derivados de la isoquinolina para tratar el cáncer y las enfermedades relacionadas con la quinasa MAP.

5 **Resumen**

La presente invención se relaciona con el descubrimiento de que ciertos compuestos inhiben la quinasa RAF, una quinasa serina/treonina que funciona en la ruta de señalización de la quinasa MAP, y con el uso de los compuestos para el tratamiento de la enfermedad caracterizada por excesiva señalización en la ruta de señalización de la quinasa MAP, melanoma.

Antecedentes

Las células comunican diversos aspectos de su ambiente extracelular a los núcleos utilizando diversas rutas de transducción de señal. Muchas de estas señales se transmiten por proteínas quinasas que activan diversos factores a través de la transferencia de grupos fosfato. La interferencia de transducción de señales por la inhibición de la actividad de la quinasa apropiada puede tener un beneficio clínico como ha sido demostrado por el imatinib, un inhibidor de bcr-abl quinasa, que se comercializa como su sal mesilato bajo la marca GLEEVEC (en los Estados Unidos) o GLIVEC.

La ruta de señalización de la quinasa MAP se conoce en el oficio como una de las rutas para los factores de crecimiento para enviar su señal para proliferar a partir del ambiente extracelular al núcleo celular. Los factores de crecimiento activan los receptores transmembrana localizados en la superficie celular que a su vez inicia una cascada por lo cual RAS se activa y recluta la quinasa RAF a la membrana donde se activa y a su vez activa la quinasa MEK que luego activa quinasa ERK. La quinasa ERK activada se puede mover a los núcleos cuando se activan los diversos factores de transcripción de genes. Las aberraciones en esta ruta pueden conducir a la transcripción del gen alterado, crecimiento celular y contribuir a la tumorigenicidad por la regulación negativa de la apoptosis y la transmisión de señales proliferativas y angiogénicas. Se ha demostrado que los inhibidores de quinasa RAF bloquean la señalización a través de la ruta de señalización de la quinasa MAP.

La familia de la quinasa RAF se conoce por tener tres miembros designados C-RAF, también conocidos como RAF-1, B-RAF y A-RAF. Ha sido reportado que la quinasa B-RAF comúnmente se activa por una de varias mutaciones de punto somático en cáncer humano, incluyendo 59% de las líneas celulares del melanoma analizadas. Ver, Davies, H. *et al*, Nature 417, 949-954 (2002). Sorprendentemente, en la actualidad se ha encontrado que los compuestos utilizados en el método descrito aquí son inhibidores eficientes de la quinasa RAF, particularmente quinasa C-RAF y quinasas B-RAF salvajes y mutadas, particularmente la quinasa B-RAF mutante V599E.

Los compuestos utilizados en el presente método de tratamiento se describen, por ejemplo, en U.S. Published Application 2002-0010191 y WO 01/58899, como agentes antiangiogénicos debido a su capacidad para inhibir el factor de crecimiento endotelial vascular. Sin embargo, estas publicaciones no sugieren que los compuestos de isoquinolina poseen propiedades de inhibición de la quinasa RAF y no sugieren que los compuestos tendrían los beneficios terapéuticos asociados con las propiedades de inhibición de la quinasa RAF.

En WO 01/23375, se revelan las piridinas y piridazinas sustituidas, las cuales tienen la intención de tener actividad de anti-angiogénesis y por consiguiente, son de uso en enfermedades VEGF - mediadas en tanto seres humanos como otros mamíferos. No se hace mención del melanoma.

La propiedad de inhibición de la quinasa RAF de los compuestos los hace útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento de las enfermedades proliferativas caracterizadas por un ruta de señalización aberrante de la quinasa MAP, particularmente muchos cánceres caracterizados por la sobreexpresión de quinasa RAF o una activación de la mutación de quinasa RAF, tal como melanoma que tiene B-RAF mutada, especialmente en donde la B-RAF mutada es el mutante V599E. La presente invención también proporciona un método para tratar otras enfermedades caracterizadas por una ruta de señalización aberrante de la quinasa MAP, particularmente donde B-RAF se muta, por ejemplo lunares Nevi benignos que tienen B-RAF mutada, con los compuestos.

Descripción

La invención también se relaciona con el uso de un compuesto de fórmula I para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad de melanoma caracterizada por excesiva señalización a través de la ruta de señalización de la quinasa MAP.

El paciente es un mamífero, generalmente un humano, que sufre de una enfermedad de melanoma que se caracteriza por la excesiva señalización a través de la ruta quinasa MAP. Esto se puede medir por el estado de activación de anticuerpos específicos a los miembros de ruta por métodos tales como análisis Western blot o inmunohistoquímica. Tales métodos son conocidos por aquellos de habilidad en el oficio.

En general, la enfermedad de melanoma de la invención se caracteriza por excesiva señalización a través de la ruta de señalización de la quinasa MAP, es una enfermedad proliferativa, particularmente un cáncer caracterizado por el aumento de la actividad de la quinasa RAF, por ejemplo uno que sobreexpresa la quinasa B- o C- RAF de tipo salvaje, o que expresa una activación de la quinasa RAF mutante, por ejemplo una quinasa B-RAF mutante. La quinasa B-RAF mutada es especialmente prevalente en muchos melanomas.

De acuerdo con la presente divulgación, se toma una muestra de tejido enfermo del paciente, por ejemplo, como un resultado de una biopsia o resección, y se analizan para determinar si el tejido produce una quinasa RAF mutante, tal como una quinasa B-RAF mutante o sobreexpresa una quinasa RAF de tipo salvaje, tal como quinasa B- o C- RAF de tipo salvaje. Si la prueba indica que la quinasa RAF mutante se produce o que una quinasa RAF se sobreproduce en el tejido enfermo, el paciente se trata, mediante la administración de una cantidad efectiva de inhibición RAF de un compuesto inhibidor de RAF de la reivindicación 1.

Además de acuerdo con la presente divulgación es el uso de un compuesto de fórmula I descrito aquí para la preparación de un medicamento para el tratamiento de melanoma que comprende

(a) prueba de tejido de melanoma del paciente para determinar si el tejido de melanoma expresa la quinasa RAF mutante o sobreexpresa una quinasa RAF de tipo salvaje y (b) tratamiento del paciente si el tejido de melanoma se encuentra para sobreexpresar una quinasa RAF del tipo salvaje o expresar una activación de la quinasa B-RAF mutante con una cantidad efectiva de inhibición de la quinasa RAF de un compuesto de fórmula I.

Sin embargo, también es posible reducir la ruta de señalización de la quinasa MAP con un compuesto de inhibición de la quinasa RAF si otra quinasa en la cascada es la causa de la excesiva señalización en la ruta. De esta manera, la presente invención además se relaciona con el uso de un compuesto de la reivindicación 1, la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad caracterizada por excesiva señalización en la ruta de señalización de la quinasa MAP atribuida a una causa diferente de una mutación de activación en o la sobreexpresión de una quinasa RAF.

Las muestras de tejido se analizan por métodos generalmente conocidos en el oficio. Por ejemplo, se detectan mutaciones B-RAF por PCR de alelo específica, DHPLC, espectroscopía de masas y sobreexpresión de B- o C-RAF de tipo salvaje detectada por inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, o análisis Western blot. Un método particularmente útil de detección de mutaciones B-RAF es el método basado en reacción en cadena de polimerasa descrito en el Ejemplo D1. Métodos similares se utilizan para determinar si otras quinasas en la cascada se mutan o sobreexpresan.

Un aspecto particularmente importante de la presente divulgación se relaciona con un método para tratar el melanoma, que comprende (a) prueba del tejido de melanoma de un paciente para determinar si el tejido de melanoma expresa la quinasa RAF mutante o sobreexpresa una quinasa RAF de tipo salvaje y (b) tratamiento del paciente con una cantidad efectiva de inhibición de la quinasa RAF de un compuesto que inhibe RAF descrito aquí, si el tejido de melanoma se encuentra que sobreexpresa una quinasa RAF del tipo salvaje o expresa una activación de la quinasa B-RAF mutante.

Un aspecto importante de esta divulgación se relaciona con un método para tratar el melanoma, que comprende (a) prueba del tejido de melanoma de un paciente para determinar si el tejido de melanoma sobreexpresa la actividad de la quinasa B-RAF o quinasa C-RAF y (b) tratamiento del paciente con una cantidad efectiva de inhibición de la quinasa RAF de un compuesto que inhibe RAF descrito aquí, si el tejido de melanoma se encuentra que sobreexpresa la actividad de la quinasa B-RAF o quinasa C-RAF.

Otro aspecto importante de esta divulgación se relaciona con un método para tratar el melanoma, que comprende (a) prueba del tejido de melanoma de un paciente para determinar si el tejido de melanoma expresa la quinasa B-RAF mutante y (b) tratamiento del paciente con una cantidad efectiva de inhibición de la quinasa RAF de un compuesto que inhibe RAF descrito aquí, si el tejido de melanoma se encuentra que expresa la quinasa B-RAF mutante.

Generalmente, la mutación de la quinasa B-RAF es una de aquellas descritas en el artículo citado Davies *et al.* Estas mutaciones se resumen en la Tabla 1.

TABLA 1

Mutación B-RAF	cambio de la proteína
G1388A	G463E
G1388T	G463V
G1394C	G465A
G1394A	G465E
G1394T	G465V
G1403C	G468A
G1403A	G468E
G1753A	E585K
T1782G	F594L
G1783C	G595R
C1786G	L596V
T1787G	L596R
T1796A	V599E
TG1796-97AT	V599D

De esta manera, la presente invención se relaciona con el uso descrito en la reivindicación 1 en el tratamiento de una enfermedad caracterizada por una quinasa B-RAF mutante activa, que comprende la detección de una mutación en el gen quinasa B-RAF o proteína en una muestra de tejido de un paciente y tratamiento del paciente con un compuesto que inhibe la quinasa B-RAF efectiva, de acuerdo con las reivindicaciones.

Un aspecto importante de esta invención incluye aquellas instancias en donde la quinasa B-RAF mutante muestra una mutación descrita en la Tabla 1, especialmente la mutación V599E.

Un aspecto particularmente importante de esta invención incluye aquellas instancias en donde la enfermedad es melanoma y la quinasa B-RAF mutante muestra una mutación descrita en la Tabla 1, especialmente la mutación V599E.

Por consiguiente, esta invención incluye el uso de la reivindicación 1 para el tratamiento de melanoma caracterizado por la quinasa B-RAF mutante, que comprende la detección de una mutación en el gen quinasa B-RAF seleccionado del G1388A, G1388T, G1394C, G1394A, G1394T, G1403C, G1403A, G1753A, T1782G, G1783C, C1786G, T1787G, T1796A y TG1796-97AT, o la mutación correspondiente en la proteína quinasa RAF, en una muestra de tejido de un paciente y el tratamiento del paciente con un compuesto que inhibe la quinasa B-RAF efectivo descrito aquí.

Dentro del contexto de la presente divulgación, los términos generales utilizados aquí para describir los compuestos de fórmula (I) tienen los siguientes significados, a menos que se indique de otra manera.

El término "C₁ a 7" indica un radical que tiene hasta y que incluye un máximo de 7, se prefiere hasta e incluyendo un máximo de 4 átomos de carbono, siendo los radicales en cuestión sin ramificar o ramificados una o más veces.

Cualquier referencia a los compuestos, o sales en el plural siempre se debe entender que incluyen un compuesto, o una sal.

Los átomos de carbono asimétricos que pueden estar presentes (por ejemplo en los compuestos de fórmula I (o un N-óxido de estos) en donde n = 1 y R es un alquilo inferior) pueden tener la configuración (R), (S) o (R,S), preferiblemente la configuración (R) o (S). Los sustituyentes en un doble enlace o un anillo pueden estar en la forma cis (= Z) o trans (= E). Por consiguiente, los compuestos presentes pueden estar en la forma de mezclas isoméricas o en la forma de isómeros puros, preferiblemente en la forma de un diastereoisómero enantioméricamente puro.

El índice r es preferiblemente 0 o 1.

El índice n es preferiblemente 0 o 1, especialmente 0. También puede ser 2.

El índice m es preferiblemente 0, 1 o 2, especialmente 0, o también 1.

ES 2 318 276 T3

De los miembros del anillo A, B, D, E y T en la fórmula I, no más de tres deben ser N, y los otros son CH o CQ. Preferiblemente, los miembros del anillo A, B, D y E son cada uno CH o CQ y T es N.

5 Cuando G es un grupo divalente $-\text{CH}_2\text{-O-}$, $-\text{CH}_2\text{-S-}$ o $-\text{CH}_2\text{-NH-}$, el grupo metileno, en cada caso se une al anillo que tiene los miembros del anillo A, B, D, E y T, mientras el hetero átomo (O, S o NH) se une al anillo isoquinolina en la fórmula I.

10 El alquileo C_1 a γ G puede ser ramificado o, preferiblemente, no ramificado y especialmente es un alquileo $\text{C}_1\text{-C}_4$ ramificado o, preferiblemente, no ramificado, especialmente metileno ($-\text{CH}_2\text{-}$), etileno ($-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), trimetileno ($-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$) o tetrametileno ($-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$). G es preferiblemente un metileno. El alquileo C_1 a γ G es preferiblemente no sustituido, pero puede ser sustituido por un aciloxi, oxo, halógeno o hidroxil.

15 El acil en los sustituyentes aciloxi-alquileo C_1 a γ sustituido G es preferiblemente arilcarboniloxi, > en donde el arilo es como se define abajo, especialmente benzoiloxi o alcanoiloxi, más especialmente benzoiloxi; aciloxi-alquileo sustituido es especialmente el benzoiloxi-metileno sustituido.

G como hidroxil-sustituido alquileo C_1 a γ es preferiblemente el hidroximetileno ($-\text{CH}(\text{OH})\text{-}$).

20 Un sustituyente alquileo C_1 a γ oxo-sustituido G preferido es el carbonil ($-\text{C}(\text{O})\text{-}$).

Los sustituyentes halógeno-alquileo C_1 a γ sustituido G son monohalo a perhalo alquileo sustituido, tal como difluorometileno.

25 Alquilo C_1 a γ es especialmente un alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$, por ejemplo n-butil, sec-butil, ter-butil, n-propil, iso-propil o, especialmente, metilo o también etil, o, en el caso de Y como alquilo C_1 a γ , puede ser especialmente el isopentil.

30 Aril es preferiblemente un radical aromático que tiene de 6 a 14 átomos de carbono, tal como fenil, bifenil, naftil, fluorenil o fenantrenil, especialmente fenil, el radical arilo que es no sustituido o sustituido por uno o más sustituyentes, preferiblemente hasta tres, especialmente uno o dos sustituyentes, especialmente seleccionados del amino, mono- o di-sustituido amino, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, hidroxil, hidroxil eterificado o esterificado, nitro, ciano, carboxil, carboxil esterificado, alcanoil, carbamoil, N-mono- o N,N-di-carbamoil sustituido, amidino, guanidino, mercapto, sulfo, feniltio, fenil-alquiltio C_1 a γ , alquilfeniltio, fenil sulfenil, fenil alquilsulfenil C_1 a γ , alquilfenilsulfenil, fenilsulfenil, fenil alcanosulfenil C_1 a γ , alquilfenilsulfenil, alquenil C_1 a γ , tal como etenil, fenil, arilalquil, tal como benzil o 1-metilo-1-fenil-etil, alquiltio C_1 a γ , tal como metiltio alquilo C_1 a γ silil, tal como trimetilsilil C_1 a γ alcanoil, 35 tal como acetil, cicloalquilo no sustituido o sustituido, alquilmercapto C_1 a γ , tal como metilmercapto ($-\text{S-CH}_3$), halo-alquilmercapto C_1 a γ , tal como trifluorometilmercapto ($-\text{S-CF}_3$), alcanosulfenil C_1 a γ , halo-alcanosulfenil C_1 a γ , tal como, especialmente, trifluorometanosulfenil, dihidroxibora ($-\text{B}(\text{OH})_2$), heterociclil, y alquilenodioxi C_1 a γ , tal como metilenodioxi, unidos a los átomos de carbono adyacentes del anillo o en donde dos posiciones adyacentes se sustituyen por un alquileo o alquilenilo para formar un anillo de 5 a 7 miembros que se fusiona al anillo arilo; arilo 40 es preferiblemente el fenil que es no sustituido o sustituido por uno o dos sustituyentes idénticos o diferentes a partir del grupo anterior especialmente halógeno, especialmente flúor o cloro; alquilo C_1 a γ , especialmente metilo, etil, propil o t-butil; halo-alquilo C_1 a γ , especialmente trifluorometil; hidroxil; alcoxi C_1 a γ , especialmente metoxi o etoxi; fenil-alcoxi inferior, alcanoil C_1 a γ , tal como acetil, feniloxil, halo-alquilo C_1 a γ , tal como trifluorometoxi o 1,1,2,2-tetrafluoroetiloxil, alcocarbonil C_1 a γ , tal como etoxicarbonil, alquilmercapto C_1 a γ , tal como metilmercapto, halo- 45 alquilmercapto C_1 a γ , tal como trifluorometilmercapto, hidroxil-alquilo C_1 a γ , tal como hidroximetil, alcanosulfenil C_1 a γ , tal como metanosulfenil, halo-alcanosulfenil C_1 a γ , tal como trifluorometanosulfenil, fenilsulfenil; más especialmente por uno o dos sustituyentes idénticos o diferentes seleccionados del alquilo C_1 a γ no sustituido o sustituido, especialmente metilo, t-butil o trifluorometil y halógeno, especialmente flúor o cloro.

50 Heteroarilo es preferiblemente un radical heterocíclico insaturado en el anillo de enlace y es preferiblemente mono- o también bi- o tri-cíclico; en donde al menos en el anillo que une al radical de la molécula de fórmula I uno o más, preferiblemente de uno a cuatro, especialmente uno o dos, átomos de carbono de un radical arilo correspondiente han sido reemplazados por un hetero átomo seleccionado del grupo que consiste de nitrógeno, oxígeno y azufre, el anillo de enlace que tiene preferiblemente de 4 a 12, especialmente de 5 a 7, átomos de anillo; en donde el heteroarilo es 55 no sustituido o sustituido por uno o más, especialmente de uno a tres, idénticos o diferentes sustituyentes a partir del grupo que consiste de los sustituyentes mencionados anteriormente como sustituyentes del arilo; y es especialmente un radical heteroarilo seleccionado del grupo que consiste de imidazolil, tienil, furil, piranil, tiantrenil, isobenzofuranil, benzofuranil, cromenil, 2H-pirrolil, pirrolil, alquilo inferior-imidazolil sustituido, benzimidazolil, pirazolil, tiazolil, isotiazolil, oxazolil, isoxazolil, piridil, pirazinil, pirimidinil, piridazinil, indolizil, isoindolil, 3H-indolil, indolil, 60 indazolil, triazolil, tetrazolil, purinil, 4H-quinolizil, isoquinolil, quinolil, ftalazinil, naftiridinil, quinoxalil, quinazolinil, cinolinil, pteridinil, carbazolil, fenantridinil, acridinil, perimidinil, fenantrolinil y furazanil, cada uno de aquellos radicales que se une *vía* un anillo que tiene al menos un hetero átomo en el radical de la molécula de fórmula I; se prefiere especialmente el piridil.

65 El término "inferior" se entenderá en el sentido de " C_{1-7} " en toda la aplicación.

Amino mono- o di-sustituido es especialmente un amino que es sustituido por uno o dos radicales idénticos o diferentes de un alquilo inferior, tal como metilo; hidroxil-alquilo inferior, tal como 2-hidroxietil; fenil-alquilo inferior;

alcanoil inferior, tal como acetil-, benzoil; benzoil sustituido, en donde el radical fenilo es no sustituido o, especialmente, es sustituido por uno o más, preferiblemente uno o dos, sustituyentes seleccionados del nitro y amino, o también del halógeno, amino, N-alquilamino inferior, N,N-di-alquilamino inferior, hidroxil, ciano, carboxi, alcóxicarbonil inferior, alcanoil inferior y carbamoil; y fenil-alcóxicarbonil inferior en donde el radical fenil es no sustituido o, especialmente, es sustituido por uno o más, preferiblemente uno o dos, sustituyentes seleccionados del nitro y amino, o también del halógeno, amino, N-alquilamino inferior, N,N-di-alquilamino inferior, hidroxil, ciano, carboxi, alcóxicarbonil inferior, alcanoil inferior y carbamoil; y es preferiblemente N-alquilamino inferior, tal como N-metilamino, hidroxil-alquilamino inferior, tal como 2-hidroxietilamino, fenil-alquilamino inferior, tal como benzilamino, N,N-di-alquilamino inferior, N-fenil-alquilo inferior-N-alquilamino inferior, N,N-di-alquilfenilamino inferior, alcanoilamino inferior, tal como acetilamino, o un sustituyente seleccionado del grupo que consiste de benzoilamino y fenil-alcóxicarbonilamino inferior, en donde en cada caso el radical fenilo es no sustituido o, especialmente, es sustituido por un nitro o amino, o también por un halógeno, amino, N-alquilamino inferior, N,N-di-alquilamino inferior, hidroxil, ciano, carboxi, alcóxicarbonil inferior, alcanoil inferior o por un carbamoil, o adicional o alternativamente al grupo de radicales precedente, por un aminocarbonilamino.

El halógeno es especialmente flúor, cloro, bromo o yodo, más especialmente flúor, cloro o bromo, en particular flúor y cloro.

El alquilo tiene preferiblemente hasta un máximo de 12 átomos de carbono y es especialmente un alquilo inferior, más especialmente metilo, o también etilo, n-propil, isopropil o ter-butil.

Alquilo sustituido es especialmente un alquilo inferior, preferiblemente metilo, que puede contener uno o más, especialmente hasta tres, sustituyentes seleccionados especialmente a partir del grupo que consiste de halógeno, especialmente flúor, por ejemplo trifluorometil o perfluoroalquilo general, y también amino, N-alquilamino inferior, N,N-di-alquilamino inferior, N-alcanoilamino inferior, hidroxil, ciano, carboxi, alcóxicarbonil inferior y fenil-alcóxicarbonil inferior. El trifluorometil es un importante alquilo sustituido.

El hidroxil eterificado es especialmente un alquilo C_8-C_{20} , tal como n-decilo, alcóxi inferior (preferido), tal como metoxi, etoxi, isopropilo o n-pentilo, fenil-alcóxi inferior, tal como benzilo, o también fenilo, o, adicional o alternativamente al grupo precedente, alquilo C_8-C_{20} , tal como n-decilo, halo-alcóxi inferior, tal como trifluorometilo o 1,1,2,2-tetrafluoroeto.

El hidroxil esterificado es especialmente un alcanoilo inferior, benzoilo, alcóxicarbonilo inferior, tal como ter-butoxicarbonilo, o fenil-alcóxicarbonilo inferior, tal como benziloxicarbonilo.

El carboxi esterificado es especialmente un alcóxicarbonil inferior, tal como ter-butoxicarbonil o etoxicarbonil, fenilalcóxicarbonil inferior o feniloxicarbonil.

El alcanoil es especialmente un alquilo-carbonil, más especialmente alcanoil inferior, por ejemplo acetil.

N-Mono- o N,N-di-carbamoil sustituido es especialmente sustituido en el terminal nitrógeno por uno o dos sustituyentes alquilo inferior, fenil-alquilo inferior o hidroxil-alquilo inferior.

El alquilfeniltio es especialmente un alquilfeniltio inferior.

El alquilfenilsulfinil es especialmente un alquilfenilsulfinil inferior.

El alquilfenilsulfonil es especialmente un alquilfenilsulfonil inferior.

El piridil Y es preferiblemente el 3- o 4-piridil.

El cicloalquilo no sustituido o sustituido es preferiblemente un cicloalquilo C_3-C_8 , el cual es no sustituido o es sustituido del mismo modo que el arilo, especialmente como se define para el fenil. Se da preferencia al ciclohexil, o también ciclopropil o ciclopropil. Se da preferencia también a un 4-alquilo inferior-ciclohexil, tal como el 4-ter-butilciclohexil.

Si esta presente, Z es preferiblemente un amino, hidroxil-alquilamino inferior, tal como 2-hidroxietilamino, alcanoilamino inferior, tal como acetilamino, nitrobenzoilamino, tal como 3-nitrobenzoilamino, aminobenzoilamino, tal como 4-aminobenzoilamino, fenil-alcóxicarbonilamino inferior, tal como benziloxicarbonilamino, o halógeno, tal como bromo; solo preferiblemente un sustituyente está presente ($m = 1$), especialmente uno de los sustituyentes mencionados últimamente, especialmente el halógeno. Se da muy especial preferencia a un compuesto de fórmula I (o un N-óxido de estos) en donde Z no está presente ($m = 0$).

Heterocicil es especialmente un heterociclo de cinco- o seis-miembros que tiene 1 o 2 hetero átomos seleccionados del grupo que consiste de nitrógeno, oxígeno y azufre, heterociclo que puede ser insaturado o completa o parcialmente saturado, y es no sustituido o sustituido, especialmente por un alquilo inferior, tal como metilo; se da preferencia a un radical seleccionado del 2-metilo-pirimidin-4-il, oxazol-5-il, 2-metilo-1,3-dioxolan-2-il, 1H-pirazol-3-il y 1-metilo-pirazol-3-il.

El aril en la forma de fenil que es sustituido por un alquilenodioxio inferior, tal como metilenodioxio, unidos a dos átomos de carbono adyacentes es preferiblemente el 3,4-metilenodioxifenil.

Un N-óxido de un compuesto de fórmula I es preferiblemente un N-óxido en el cual un nitrógeno del anillo de isoquinolina o un nitrógeno en el anillo que tiene los miembros del anillo A, B, D y E lleva un átomo de oxígeno, o más de uno de los átomos de nitrógeno mencionados lleva un átomo de oxígeno.

Las sales son especialmente las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula I (o un N-óxido de estas).

Tales sales se forman, por ejemplo, por compuestos de fórmula I (o un N-óxido de estos) que tienen un átomo de nitrógeno básico como sales de adición de ácido, preferiblemente con ácidos orgánicos o inorgánicos, especialmente las sales farmacéuticamente aceptables. Los ácidos orgánicos apropiados son, por ejemplo, ácidos hidrohálicos, tales como ácido clorhídrico; ácido sulfúrico; o ácido fosfórico. Los ácidos orgánicos apropiados son, por ejemplo, ácidos carboxílico, fosfónico, sulfónico o sulfámico, por ejemplo ácido acético, ácido propiónico, ácido octanoico, ácido decanoico, ácido dodecanoico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido 2-hidroxibutírico, ácido glucónico, ácido glucosamonocarboxílico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido adipico, ácido pimelico, ácido suberico, ácido azelaico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido glucarico, ácido galactarico, aminoácidos, tales como ácido glutámico, ácido aspártico, N-metilglicina, ácido acetilaminoacético, N-acetilaspargina, N-acetilcisteína, ácido pirúvico, ácido acetoacético, fosfoserina, ácido 2- o 3-glicerofosfórico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido metilmaleico, ácido ciclohexanocarboxílico, ácido benzoico, ácido salicílico, ácido 1- o 3-hidroxinaftil-2-carboxílico, ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico, ácido 2-fenoxibenzoico, ácido 2-acetoxibenzoico, ácido 4-aminosalicílico, ácido ftálico, ácido fenilacético, ácido glucurónico, ácido galacturónico, ácido metano o etano-sulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido benzenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 1,5-naftalenodisulfónico, ácido N-ciclohexilsulfámico, ácido N-metil-, N-etil- o N-propil-sulfámico, u otros ácidos orgánicos protónicos, tales como ácido ascórbico.

Cuando los radicales cargados negativamente, tales como carboxi o sulfo, están presentes, las sales con bases también se pueden formar, por ejemplo sales metálicas o de amoníaco, tales como sales de metal alcalino o de metal alcalinotérreo, por ejemplo sales de sodio, potasio, magnesio o calcio, o sales de amoníaco con amoníaco o aminas orgánicas apropiadas, tales como monoaminas terciarias, por ejemplo trietilamina o tri(2-hidroxietil)amina, o bases heterocíclicas, por ejemplo N-etilpiperidina o N,N'-dimetilpiperazina.

Cuando un grupo básico y un grupo ácido están presentes en la misma molécula, un compuesto de fórmula I (o un N-óxido de este) también puede formar sales internas.

Para el aislamiento o purificación también es posible utilizar sales inaceptables farmacéuticamente, por ejemplo picratos o percloratos. Solamente las sales farmacéuticamente aceptables o los compuestos libres (opcionalmente en la forma de composiciones farmacéuticas) se utilizan terapéuticamente, y por consiguiente estas se prefieren.

En vista de la relación cercana entre los compuestos en forma libre y en la forma de sus sales, incluyendo también aquellas sales que se pueden utilizar como intermedios, por ejemplo en la purificación de los compuestos novedosos o para su identificación, anteriormente y de ahora en adelante cualquier referencia a los compuestos libres, también se debe entender que incluye las sales correspondientes, como apropiadas y convenientes.

La presente invención además se relaciona con el uso de acuerdo con las reivindicaciones para inhibir la quinasa RAF, que comprende el contacto de la quinasa RAF con un compuesto de fórmula (I). Preferiblemente, la quinasa RAF es la quinasa B- o C-RAF, o una quinasa RAF mutante, especialmente una quinasa B-RAF mutante, particularmente la V599E mutante.

Los compuestos de fórmula I (o N-óxidos de estos) tienen valiosas propiedades farmacológicas, según se describe anteriormente.

Un compuesto de fórmula I (o un N-óxido de este) se puede administrar de forma aislada o en combinación con uno o más agentes terapéuticos, siendo posible para las combinaciones fijas que se utilizan o para un compuesto de acuerdo con la invención y uno o más agentes terapéuticos que se administran de manera escalonada a lo largo del tiempo o independientemente una de la otra, o la administración combinada de combinaciones fijas y de uno o más agentes terapéuticos es posible. En particular, la administración de un compuesto de fórmula I (o un N-óxido de este) para el tratamiento de tumores se puede llevar a cabo, junto o adicionalmente, en combinación con quimioterapia (combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos, especialmente citostáticos, o con hormonas o compuestos que tienen una actividad similar a una hormona), radioterapia, inmunoterapia, tratamiento quirúrgico o combinaciones de estos. La terapia a largo plazo, también es posible, como terapia adyuvante en combinación con otros métodos de tratamiento, tales como los que se acaban de mencionar. También es posible, un tratamiento para mantener la condición de un paciente después de la remisión del tumor o incluso un tratamiento quimiopreventivo, por ejemplo en el caso de pacientes en riesgo.

Allí entran en consideración como agentes terapéuticos con los compuestos que de acuerdo con la invención se pueden combinar especialmente uno o más compuestos antiproliferativos, citostáticos o citotóxicos, por ejemplo

uno o más agentes quimioterapéuticos seleccionados del grupo que comprenden un inhibidor de la biosíntesis de la poliamina, un inhibidor de una proteína quinasa diferente, especialmente una proteína quinasa C, o de una proteína quinasa tirosina, tal como proteína quinasa tirosina receptora del factor de crecimiento epidérmico, un inhibidor de un factor de crecimiento, tal como factor de crecimiento endotelial vascular, una citoquina, un regulador de crecimiento negativo, tal como TGF- β o IFN- β , un inhibidor de la aromataza, análogos de hormonas u hormona, y un agente citostático convencional.

Los compuestos de acuerdo con la invención no solo están destinados para el tratamiento (profiláctico y, preferiblemente, terapéutico) de seres humanos, sino también para el tratamiento de otros animales de sangre caliente, por ejemplo de animales comercialmente útiles, por ejemplo roedores, tales como ratones, conejos o ratas, o conejillos de Indias.

En general, la invención se relaciona también con el uso de un compuesto de fórmula I (o un N-óxido de este) en la inhibición de la actividad de la quinasa RAF de acuerdo con las reivindicaciones.

Un compuesto de fórmula I (o un N-óxido de este) también se puede utilizar para propósitos de diagnóstico, por ejemplo con el fin de que los tumores obtenidos de los animales de sangre caliente, especialmente seres humanos, como el "huésped" original y transplantados en ratones, se pueda evaluar para reducir el crecimiento después de la adición de tal compuesto, de esta manera con el fin de estudiar su sensibilidad con el compuesto en cuestión, por lo tanto, permite que los posibles métodos de tratamiento para una enfermedad tumoral en el huésped original se averigüe y determine mejor: esto no es parte de la invención.

En los grupos de compuestos de fórmula I preferidos, mencionados a continuación, las definiciones de sustituyentes a partir de las definiciones generales, mencionadas anteriormente, se pueden utilizar convenientemente, por ejemplo con el fin de reemplazar más definiciones generales por definiciones que sean más específicas o, especialmente, por definiciones que se indican como preferidas; la preferencia es en cada caso dada a las definiciones indicadas anteriormente como preferidas o mencionados a modo de ejemplo.

Se da preferencia a un compuesto de fórmula I en donde

r es de 0 a 2, preferiblemente 0;

n es 0 o 1;

m es 1 o, especialmente, 0;

A, B, D y E son cada uno CH y T es N, o A, D y E son cada uno CH y B y T son N, o A, B, E y T son CH y D es N, o A, T, D y E son CH y B es N; particularmente en donde A, B, D y E son cada uno CH y T es N, o A, D y E son cada uno CH y B y T son N.

G es un alquileo inferior, especialmente metileno o etileno (-CH₂-CH₂-), -CH₂-NH-, -CH₂-O-, hidroximetileno o benzoiloximetileno;

Q es un metilo que se une a A, a D o a A y D;

R es un H o alquilo inferior, especialmente H o metilo;

X es -NR-, oxa o tia, especialmente -NH- es un fenil que es no sustituido o sustituido por uno o dos sustituyentes idénticos o diferentes seleccionados del grupo que consiste de amino; alcanoilamino inferior, especialmente acetilamino; halógeno, especialmente flúor, cloro o bromo; alquilo inferior no sustituido o sustituido, especialmente metilo, etil, propil, t-butil o halo-alquilo inferior, especialmente trifluorometil; hidroxil; alcoxi inferior, especialmente metoxi o etoxi; fenil-alcoxi inferior, especialmente benziloxi; ciano, inferior alquienil, tal como etenil, alcoxi C₈-C₁₂, especialmente n-deciloxi, alcoxicarbonil inferior, tal como ter-butoxicarbonil, carbamoil, alquilcarbamoil inferior, tal como N-metilo- o N-ter-butil-carbamoil, alcanoil inferior, tal como acetil, feniloxi, halo-alquiloxi inferior, tal como trifluorometoxi o 1,1,2,2-tetrafluoroetiloxi, alcoxicarbonil inferior, tal como etoxicarbonil, alquilmercapto inferior, tal como metilmercapto, halo-alquilmercapto inferior, tal como trifluorometilmercapto, hidroxialquilo inferior, tal como hidroximetil o 1-hidroximetil, alcanosulfonil inferior, tal como metanosulfonil, halo-alcanosulfonil inferior, tal como trifluorometanosulfonil, fenilsulfonil y alquilenodioxo inferior, tal como metilenodioxo, unidos a dos átomos de carbono adyacentes o en donde dos posiciones adyacentes se sustituyen por un alquileo o alquienileno para formar un anillo de 5 a 7 miembros que se fusiona al anillo fenilo, especialmente por uno o dos sustituyentes seleccionados del halógeno, tal como cloro o bromo, alquilo inferior no sustituido, tal como metilo, y halo-alquilo inferior sustituido, tal como trifluorometil, Y es especialmente un fenil o fenil que es sustituido por uno o dos sustituyentes idénticos o diferentes, que son especialmente halógenos, especialmente flúor o cloro, y/o alquilo inferior no sustituido o sustituido; Z es un amino; N-alquilamino inferior, tal como N-metilamino; hidroxil-alquilamino inferior, tal como 2-hidroxietilamino; fenilalquilamino inferior, tal como benzilamino; N,N-di-alquilamino inferior; N-fenil-alquilo inferior-N-alquilamino inferior; N,N-di-alquilfenilamino inferior; alcanoilamino inferior, tal como acetilamino; o un sustituyente seleccionado del grupo que consiste de benzoilamino y fenil-alcoxicarbonilamino inferior, en donde el radical fenilo en cada caso es no sustituido o, especialmente, es sustituido por un nitro o por un amino, o también por un halógeno, amino, N-al-

ES 2 318 276 T3

quilamino inferior, N,N-di-alquilamino inferior, hidroxilo, ciano, carboxi, alcóxicarbonil inferior, alcanóil inferior o por un carbamóil; o Z es un halógeno, especialmente bromo; más especialmente amino, acetilamino, nitrobenzoylamino, aminobenzoylamino, 2-hidroxietilamino, benziloxycarbonilamino o bromo; y/o una sal o N-óxido de estos.

5 Se da especial preferencia a un compuesto de fórmula I en donde
r es 0;
10 n es 0;
m es 0;
B, D, E y T son CH y A es N (3-piridil), o especialmente en donde A, B, D y E son cada uno CH y T es N (4-
15 piridil);
G es un alquileo inferior, especialmente el metileno;
X es -NR- especialmente -NH-;
20 Y es un fenil que es no sustituido o sustituido por uno o dos sustituyentes idénticos o diferentes seleccionados del grupo que consiste de halógeno, especialmente flúor o, más especialmente, cloro o bromo; alquilo inferior, especialmente metilo; y halo-alquilo inferior, especialmente trifluorometil; especialmente 4-clorofenil, 2-, 3- o 4-metilfenil, 4-
25 3-yodofenil, 3,4-bis(trifluorometil)fenil o 3-bromo-4-etilfenil;
o una sal de estos.

30 Se da especial preferencia también a un compuesto de fórmula I en donde
r es 0;
n es de 0 a 2;
35 m es 0;
A, B, D y E son cada uno CH y T es N;
40 G es un metileno;
R es un H;
X es -NR-, especialmente -NH-; y
45 Y es un fenil que es no sustituido o sustituido por un halógeno, especialmente flúor o cloro, o por un alquilo inferior, tal como metilo o trifluorometil, alcoxi inferior, especialmente metoxi, tal como 4-clorofenil, 4-metoxifenil o 4-trifluorometoxifenil; naftil; ciclohexil que es no sustituido o sustituido por un alquilo inferior, especialmente por ter-butil, tal como 4-ter-butilciclohexil; indolil que es no sustituido o sustituido por un halógeno, especialmente por un flúor, especialmente el 6-fluorindol-3-il; o alquilo inferior, especialmente el isopentil;
50 o una sal de estos donde un grupo que forma una sal está presente.

55 En particular, se da preferencia también a un compuesto de fórmula I en donde
r es 0;
n es 0;
60 m es 0;
B, D, E y T son CH y A es N o A, B, D y E son cada uno CH y T es N;
65 G es un alquileo inferior;
X es -NH-;

ES 2 318 276 T3

Y es un fenil que es no sustituido o sustituido por uno o dos sustituyentes idénticos o diferentes, seleccionados del grupo que consiste de halógeno y alquilo inferior.

Se da preferencia también a un compuesto de fórmula I en donde

r es 0;

n es de 0 a 2;

m es 0;

A, B, D y E son cada uno CH y T es N;

G es un metileno;

R es un H;

X es -NR; y

Y es un fenil que es no sustituido o sustituido por un halógeno, alquilo inferior, alcoxi inferior o ciclohexil que es no sustituido

o sustituido por un alquilo inferior.

En particular, los compuestos especialmente útiles incluyen aquellos en donde

r es 0;

n es 0;

m es 0;

A, B, D y E son cada uno CH y T es N;

G es un metileno;

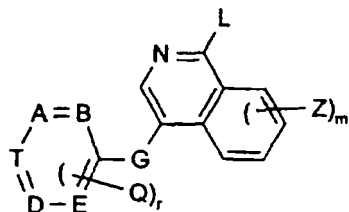
X -NH-; y

Y es un fenil que es sustituido por uno o dos sustituyentes idénticos o diferentes seleccionados de un halógeno y alquilo inferior.

Se da especial preferencia a tales compuestos en donde Y es un fenil que es sustituido en la posición-4 por un t-butil o trifluorometil.

Los compuestos de acuerdo con la invención se pueden preparar por procesos conocidos *per se* para otros compuestos, especialmente mediante

a) la reacción de un compuesto de fórmula II



(II)

en donde r, m, A, B, D, E, T, G, Q y Z son como se definen para un compuesto de fórmula I y L es un grupo saliente nucleofugal, con un compuesto de fórmula III



en donde n, R, X y Y son como se definen para un compuesto de fórmula I, los grupos funcionales en los compuestos de fórmula II y de fórmula III que son, no participan en la reacción, que es en la forma protegida, si es necesario, y eliminando cualquiera de los grupos protectores que están presentes, en donde los compuestos iniciales mencionados en el proceso a) también pueden estar en la forma de sales donde un grupo que forma una sal está presente y la reacción en la forma de sal es posible;

y, si se desea, convertir un compuesto de fórmula I resultante, o un N-óxido de este, en un compuesto de fórmula I diferente o un N-óxido de este, convertir un compuesto de fórmula I libre, o un N-óxido de este, en una sal, convertir una sal de un compuesto de fórmula I resultante, o de un N-óxido de este, en el compuesto libre o en una sal diferente, y/o separar una mezcla de compuestos de fórmula I isoméricos, o su N-óxido, en los isómeros individuales.

Descripción detallada de las variantes del proceso

En la siguiente, descripción más detallada del proceso de preparación, r, n, m, A, B, D, E, G, Q, R, X, Y y Z son como se definen para los compuestos de fórmula I, a menos que se indique de otra manera.

Proceso a)

En el compuesto de fórmula II, un grupo saliente nucleofugal L es especialmente un halógeno, más especialmente bromo, yodo o, muy especialmente, cloro.

La reacción entre el compuesto de fórmula II y el compuesto de fórmula III tiene lugar en apropiados solventes polares inertes, especialmente alcoholes, por ejemplo alcanoles inferiores, tales como metanol, propanol o, especialmente, etanol o n-butanol, o esta tiene lugar en un baño sin la adición de un solvente, especialmente cuando uno de los reactivos está en forma líquida. La reacción tiene lugar a temperaturas elevadas, preferiblemente de aproximadamente 60°C a temperatura de reflujo, por ejemplo bajo condiciones de reflujo o a una temperatura de aproximadamente 90 a aproximadamente 110°C. El compuesto de fórmula III también se puede utilizar en la forma de una sal, por ejemplo en la forma de una sal de adición de ácido con un ácido fuerte, tal como un haluro de hidrógeno, por ejemplo en la forma de la sal clorhidrato, o el ácido correspondiente, por ejemplo ácido clorhídrico, se puede adicionar en un solvente apropiado, por ejemplo un éter, tal como dioxano.

Cuando uno o más grupos funcionales, por ejemplo carboxi, hidroxil, amino o mercapto, en un compuesto de fórmula II y/o III están presentes en forma protegida o deben estar presentes en forma protegida puesto que, no participan en la reacción, los grupos protectores son grupos que se utilizan habitualmente en la síntesis de compuestos peptídicos, pero también en la síntesis de cefalosporinas y penicilinas así como de derivados de ácido nucleico y azúcares. Los grupos protectores pueden ya estar presentes en los precursores y están para proteger los grupos funcionales en cuestión contra las reacciones secundarias indeseadas, tales como acilaciones, eterificaciones, esterificaciones, oxidaciones, solubilización y similares. Los grupos protectores para grupos funcionales en las materias primas cuya reacción se debe evitar, especialmente los grupos carboxi, amino, hidroxil y mercapto, incluyen especialmente aquellos grupos protectores (grupos protectores convencionales) que se utilizan habitualmente en la síntesis de compuestos peptídicos, cefalosporinas, penicilinas o derivados de ácido nucleico y azúcares. Los grupos protectores pueden estar presentes ya en los precursores y son para proteger los grupos funcionales en cuestión contra reacciones secundarias indeseadas, tales como acilaciones, eterificaciones, esterificaciones, oxidaciones, solubilización, etc. En algunos casos los grupos protectores pueden causar las reacciones a proceder selectivamente, por ejemplo estereoselectividad. Es una característica de los grupos protectores que se puedan retirar fácilmente, es decir, sin reacciones secundarias indeseadas, por ejemplo por solubilización, por reducción, por fotólisis o enzimáticamente, por ejemplo también bajo condiciones análogas a las condiciones fisiológicas, y que no estén presentes en los productos finales. El experto en el oficio conocerá o puede fácilmente averiguar que grupos protectores son apropiados en las reacciones mencionadas anteriormente y de ahora en adelante.

La protección de los grupos funcionales por medio de tales grupos protectores, los grupos protectores por si mismos, y las reacciones para su eliminación se describen, por ejemplo, en trabajos estándar tales como J. F. W. McOmie, "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, London and New York 1973, in Th. W. Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", Wiley, New York 1981, in "The Peptides"; Volume 3 (E. Gross and J. Meienhofer, eds.), Academic Press, London and New York 1981, in "Methoden der organischen Chemie", Houben Weyl, 4th edition, Volume 15/I, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974, in H.-D. Jakubke and H. Jeschkeit, "Aminosäuren, Peptide, Proteine",

Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach and Basle 1982, y in Jochen Lehmann, "Chemie der Kohlenhydrate: Monosaccharide und Derivate", Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974.

Los grupos protectores mencionados en los Ejemplos preferiblemente se introducen y, si se necesita, se retiran análogamente a los métodos mencionados.

Etapas adicionales del proceso

En las etapas adicionales del proceso, que se realizan, si se desea, los grupos funcionales en los compuestos iniciales que no son para participar en la reacción pueden estar presentes en forma desprotegida o en forma protegida, por ejemplo protegidos por uno o más de los grupos protectores mencionados anteriormente en el proceso a). Todos o algunos de los grupos protectores a continuación se retiran por uno de los métodos mencionados en el proceso a).

Las sales de los compuestos de fórmula I (o un N-óxido de estos) que tienen un grupo que forma una sal, se pueden preparar de una manera conocida *per se*. Por ejemplo, las sales de adición de ácido de compuestos de fórmula I o sus N-óxidos se pueden obtener, por ejemplo, por tratamiento con un ácido o un reactivo de intercambio aniónico apropiado. También es posible convertir las sales que tienen dos moléculas de ácido (por ejemplo un dihaluro de un compuesto de fórmula I (o de un N-óxido de este)) en las sales que tienen una molécula de ácido por compuesto de fórmula I (o N-óxido de este) (por ejemplo en un monohaluro); esto se puede lograr, por ejemplo, por calentamiento al estado derretido o, por ejemplo, por calentamiento en forma sólida bajo un vacío alto a temperatura elevada, por ejemplo de 130 a 170°C, una molécula del ácido que se expulsa por una molécula de un compuesto de fórmula I (o de un N-óxido de este).

Las sales se pueden convertir en los compuestos libres de modo habitual, por ejemplo por tratamiento con un agente básico apropiado, por ejemplo con carbonatos de metal alcalino, carbonatos de hidrógeno o hidróxidos, por ejemplo carbonato de potasio o hidróxido de sodio.

Las mezclas estereoisoméricas, por ejemplo mezclas de diastereoisómeros, se pueden separar en los isómeros correspondientes de una manera conocida *per se* por medio de procedimientos de separación apropiados. Por ejemplo, las mezclas diastereoisoméricas se pueden separar en los diastereoisómeros individuales por cristalización fraccional, cromatografía, partición de solvente y similares. La separación se puede llevar a cabo tanto en la etapa de una de las materias primas o en el caso de los compuestos de fórmula I por sí mismos. Los enantiómeros se pueden separar por formación de sales diastereoisoméricas, por ejemplo por la formación de sales con un ácido quirál enantioméricamente puro, o por métodos cromatográficos, por ejemplo por cromatografía, por ejemplo, HPLC, sobre materiales portadores cromatográficos con ligandos quirales.

Un compuesto de fórmula I se puede convertir en un correspondiente N-óxido. La reacción se realiza con un agente de oxidación apropiada, preferiblemente un peróxido, por ejemplo un ácido m-cloroperbenzoico, en un solvente apropiado, por ejemplo un hidrocarburo halogenado, tal como cloroformo o cloruro de metileno, o en un ácido alcano-carboxílico inferior, tal como ácido acético, preferiblemente a una temperatura de 0°C a la temperatura de ebullición de la mezcla de reacción, especialmente aproximadamente a temperatura ambiente.

Un compuesto de fórmula I (o un N-óxido de este) en donde Z es un alcanoilamino inferior, se puede hidrolizar con el compuesto amino correspondiente (Z = amino), por ejemplo por hidrólisis con un ácido inorgánico, especialmente ácido clorhídrico (HCl), en solución acuosa, siendo posible adicionar otros solventes, preferiblemente a temperatura elevada, por ejemplo bajo reflujo.

Un compuesto de fórmula I (o un N-óxido de este) en donde Z es un amino sustituido por uno o dos radicales idénticos o diferentes seleccionados del alquilo inferior, hidroxi-alquilo inferior y fenil-alquilo inferior se puede convertir en el compuesto que es correspondientemente sustituido en el grupo amino, por ejemplo, por reacción con un alquilo inferior haluro, un hidroxialquilo inferior haluro, que es hidroxi-prottegido, si es necesario (ver el proceso a)), o un fenil-alquilo inferior haluro bajo condiciones de reacción análogas a aquellas mencionadas bajo el proceso a). Para la introducción de los sustituyentes 2-hidroxi-alquilo inferior en el grupo amino Z, la adición inicial de un epóxido (por ejemplo óxido de etileno) también es posible. La adición se realiza especialmente en solución acuosa y/o en la presencia de solventes polares, tales como alcoholes, por ejemplo metanol, etanol, isopropanol o etilenglicol, éteres, tales como dioxano, amidas, tales como dimetil formamida, o fenoles, tales como fenol, también bajo condiciones anhidras, en solventes apolares, tales como benceno y tolueno, o en emulsiones benceno/agua, opcionalmente en la presencia de catalizadores ácidos o básicos, por ejemplo de soluciones alcalinas, tales como solución de hidróxido de sodio, o en la presencia de catalizadores de fase sólida dopados con hidrazina, tales como óxido de aluminio, en éteres, por ejemplo dietil éter, generalmente a temperaturas de aproximadamente 0°C a la temperatura de ebullición de la mezcla de reacción en cuestión, preferiblemente desde 20°C a temperatura de reflujo, cuando sea apropiado bajo presión elevada, por ejemplo en un tubo de bomba, por lo cual la temperatura de ebullición también se puede exceder, y/o bajo un gas inerte, tal como nitrógeno o argón. La alquilación reductiva de un grupo amino Z con un alcanoaldehído inferior, un fenil-alcanoaldehído inferior o un hidroxi-alcanoaldehído inferior, el cual es hidroxi-prottegido si es necesario, también es posible. La alquilación reductiva preferiblemente tiene lugar con la hidrogenación en la presencia de un catalizador, especialmente un catalizador de metal noble, tal como platino o, especialmente, paladio, que esta preferiblemente unido a un material soporte, tal como carbón, o un catalizador de metal pesado, tal como nickel Raney, a presión normal o a presiones entre 0.1 y 10 megapascals (MPa), o con reducción por medio

de hidruros complejos, tales como hidruros de boro, especialmente cianoborohidruros de metal alcalino, por ejemplo cianoborohidruro de sodio, en la presencia de un ácido apropiado, preferiblemente de un ácido relativamente débil, tal como un ácido alcanocarboxílico inferior o, especialmente, un ácido sulfónico, tal como p-tolueno-ácido sulfónico; en solventes habituales, por ejemplo alcoholes, tales como metanol o etanol, o éteres, por ejemplo éteres cíclicos, tales como tetrahidrofurano, en la ausencia o presencia de agua.

En un compuesto de fórmula I (o un N-óxido de este), un grupo amino Z se puede convertir por acilación en un grupo amino que es sustituido por un alcanoil inferior, benzoil, benzoil sustituido o por un fenil-alcoxycarbonil inferior en donde el radical fenilo es no sustituido o sustituido. Los ácidos correspondientes contienen un grupo carboxi libre o están en la forma de derivados de ácido reactivo de estos, por ejemplo en la forma de los ésteres activos derivados o anhídridos reactivos, también amidas cíclicas reactivas. Los derivados de ácido reactivo también se pueden formar *in situ*. los ésteres activos son especialmente ésteres que son insaturados en el átomo de carbono ligado del radical que se esterifica, por ejemplo del tipo vinil éster, tal como vinil ésteres (obtenibles, por ejemplo, por transesterificación de un éster correspondiente mediante vinil acetato; método vinil éster activo), carbamoil ésteres (obtenibles, por ejemplo, mediante el tratamiento del ácido correspondiente con un isoxazolio reactivo; 1,2-oxazolio o método de Woodward), o ésteres 1-alcoxivinil inferior (obtenibles, por ejemplo, mediante el tratamiento del ácido correspondiente con un alcoxiaetileno inferior; método del etoxiaetileno), o ésteres del tipo amidino, tales como ésteres N,N'-amidino disustituido (obtenibles, por ejemplo, mediante el tratamiento del ácido correspondiente con una apropiada N,N'-carbodiimida disustituida, por ejemplo N,N'-díciclohexilcarbodiimida o, especialmente, N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida; método de la carbodiimida) o ésteres N,N-amidino disustituido (obtenibles, por ejemplo, mediante el tratamiento del ácido correspondiente con una N,N-cianamida disustituida; método de la cianamida), los apropiados arilo ésteres, especialmente fenil ésteres convenientemente sustituidos por un sustituyente electrofílico (obtenibles, por ejemplo, mediante el tratamiento del ácido correspondiente con un fenol convenientemente sustituido, por ejemplo 4-nitrofenol, 4-metilsulfonilfenol, 2,4,5-triclorofenol, 2,3,4,5,6-pentaclorofenol o 4-fenildiazofenol, en la presencia de un agente de condensación, tal como N,N'-díciclohexilcarbodiimida; método de ésteres de arilo activos), cianometil ésteres (obtenibles, por ejemplo, mediante el tratamiento del ácido correspondiente con cloroacetónitrilo en la presencia de una base; método de cianometil ésteres), tioésteres, especialmente no sustituidos o sustituidos, por ejemplo feniltio ésteres, nitro-sustituidos (obtenibles, por ejemplo, mediante el tratamiento del ácido correspondiente con tiofenoles no sustituidos o sustituidos, por ejemplo tiofenoles, nitro-sustituidos, *inter alia* por medio del método anhídrido o de la carbodiimida; método de tioésteres activos), o, especialmente, amino o amido ésteres (obtenibles, por ejemplo, mediante el tratamiento del ácido correspondiente con un compuesto N-hidroxiamino o N-hidroxiamido, por ejemplo N-hidroxisuccinimida, N-hidroxipiperidina, N-hidroxiptalimida, N-hidroxi-5-norborneno-2,3-ácido dicarboxílico imida, 1-hidroxibenzotriazol o 3-hidroxi-3,4-dihidro-1,2,3-benzotriazin-4-ona, por ejemplo por el método anhídrido o de la carbodiimida; método N-hidroxi ésteres activos). También se pueden utilizar, ésteres internos, por ejemplo γ -lactonas. Los anhídridos de ácidos pueden ser simétricos o, preferiblemente, anhídridos mezclados de aquellos ácidos, por ejemplo anhídridos con ácidos orgánicos, tales como haluros de ácido, especialmente cloruros de ácido (obtenibles, por ejemplo, mediante el tratamiento del ácido correspondiente con tionil cloruro, pentacloruro de fósforo, fosgeno o oxalil cloruro; método de ácido cloruro), azidas (obtenibles, por ejemplo, de un éster de ácido correspondiente *vía* la hidrazida correspondiente y tratamiento de estos con ácido nitroso; método de la azida), anhídridos con ácido carbónico semiesteres, por ejemplo ácido carbónico alquilo inferior semiesteres (especialmente ácido clorofórmico metil éster) (obtenibles, por ejemplo, mediante el tratamiento del ácido correspondiente con ácido clorofórmico alquilo inferior ésteres o con un 1-alcoxycarbonil inferior-2-alcoxi inferior-1,2-dihidroquinolina; método anhídridos de ácido Q-alquilcarbonico mezclado), o anhídridos con dihalogenados, especialmente diclorinados, ácido fosfórico (obtenibles, por ejemplo, mediante el tratamiento del ácido correspondiente con oxiclورو de fósforo; método oxiclورو de fósforo), anhídridos con otros derivados de ácido fosfórico (por ejemplo aquellos que se pueden obtener con fenil N-fenilfosforamidocloridrato, o por la reacción ácido fosfórico alquil amidas en la presencia de anhídridos de ácido sulfónico y/o aditivos que reducen la racemización, tal como N-hidroxibenzotriazol, o en la presencia de ácido cianofosfónico dietil éster) o con derivados de ácido fosforoso, o anhídridos con ácidos orgánicos, tales como anhídridos mezclados con ácidos carboxílicos orgánicos (obtenibles, por ejemplo, mediante el tratamiento del ácido correspondiente con un alcano-inferior o fenil-inferior ácido alcano-carboxílico haluro no sustituido o sustituido, por ejemplo ácido fenilacético, ácido pivalico o cloruro de ácido trifluoroacético; método de anhídridos de ácido carboxílico mezclados) o con ácidos sulfónicos orgánicos (obtenibles, por ejemplo, mediante el tratamiento de una sal, tal como una sal de metal alcalino, del ácido correspondiente con un apropiado haluro de ácido sulfónico orgánico, tal como alcano- o arilo-inferior, por ejemplo ácido metano- o p-tolueno-sulfónico cloruro; método de anhídridos de ácido sulfónico mezclados) así como anhídridos simétricos (obtenibles, por ejemplo, por condensación del ácido correspondiente en la presencia de una carbodiimida o de 1-dietilaminopropino; método de anhídridos simétricos). Las amidas cíclicas apropiadas son especialmente amidas con diazaciclos de cinco-miembros de naturaleza aromática, tal como amidas con imidazoles, por ejemplo imidazol (obtenibles, por ejemplo, mediante el tratamiento del ácido correspondiente con N,N'-carbonildiimidazol; método del imidazol), o pirazol, por ejemplo 3,5-dimetilpirazol (obtenibles, por ejemplo, *vía* la hidrazida ácida mediante el tratamiento con acetilacetona; método de pirazolidina). Como se menciona, los derivados de ácido carboxílico que se utilizan como agentes acilantes también se pueden formar *in situ*. Por ejemplo, ésteres N,N'-amidino disustituidos se pueden formar *in situ* por la reacción de la mezcla del material inicial de fórmula I y el ácido utilizado como agente acilante en la presencia de una apropiada N,N'-carbodiimida disustituida, por ejemplo N,N'-díciclohexilcarbodiimida o, especialmente, N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida. Adicionalmente, los amino o amido ésteres de los ácidos utilizados como agente acilante se pueden formar en la presencia del material inicial de fórmula I que será acilado, por la reacción de una mezcla del ácido correspondiente y las materias primas amino en la presencia de una N,N'-carbodiimida disustituida, por ejemplo N,N'-díciclohexilcarbodiimida, y de una N-hidroxiamina o N-hidroxiamida, por ejemplo N-hidroxisuccinimida, opcionalmente en la presencia de una base

apropiada, por ejemplo 4-dimetilaminopiridina. Adicionalmente, la activación se puede lograr *in situ* por reacción con compuestos N,N,N',N'-tetraalquiluronio, tales como O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetra-metiluronio hexafluorofosfato, O-(1,2-dihidro-2-oxo-1-piridil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato (en la ausencia o presencia de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno-(1,5,5)) o O-(3,4-dihidro-4-oxo-1,2,3-benzotriazolin-3-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato. Finalmente, los anhídridos del ácido fosfórico del ácido carboxílico se pueden preparar *in situ* por la reacción de un ácido fosfórico alquil amida, tal como ácido fosfórico hexametiltriámina, en la presencia de un ácido sulfónico anhídrido, tal como ácido 4-toluenesulfónico anhídrido, con una sal, tal como un tetrafluoroborato, por ejemplo tetrafluoroborato de sodio, o con un derivado diferente de ácido hexametilfosfórico triámina, tal como benzotriazol-1-il-oxi tris(dimetilamino)fosfonio hexafluoruro, preferiblemente en la presencia de un aditivo que reduce la racemización, tal como N-hidroxibenzotriazol. Si se desea, una base orgánica se adiciona, preferiblemente una amina terciaria, por ejemplo una tri-alquilamina inferior, especialmente etildiisopropilamina o, más especialmente, trietilamina, y/o una base heterocíclica, por ejemplo 4-dimetilaminopiridina o, preferiblemente, N-metilmorfolina o piridina. La condensación, preferiblemente se lleva a cabo en un solvente inerte, aprótico, preferiblemente anhídrido o mezcla de solventes, por ejemplo en una amida de ácido carboxílico, por ejemplo formamida o dimetilformamida, un hidrocarburo halogenado, por ejemplo cloruro de metileno, tetracloruro de carbono o clorobenceno, una cetona, por ejemplo acetona, un éter cíclico, por ejemplo tetrahidrofurano o dioxano, un éster, por ejemplo acetato de etilo, o un nitrilo, por ejemplo acetonitrilo, o en una mezcla de estos, cuando sea apropiado a temperatura reducida o elevada, por ejemplo en un rango de temperatura de aproximadamente -40°C a aproximadamente +100°C, preferiblemente de aproximadamente -10°C a aproximadamente +70°C, donde los arilsulfonil ésteres se utilizan también a aproximadamente de +100°C a +200°C, especialmente a temperaturas entre 10 y 30°C, y, cuando sea apropiado, bajo una atmósfera de gas inerte, por ejemplo una atmósfera de nitrógeno o argón. Solventes acuosos, por ejemplo alcohólico, por ejemplo etanol, o solventes aromáticos, por ejemplo benceno o tolueno, también son posibles.

Un grupo nitro Z en un compuesto de fórmula I se puede reducir a un grupo amino, por ejemplo por reducción con metales o hidrogenación selectiva; por ejemplo por reacción con sulfato de magnesio/amoníaco en una mezcla agua/alcohol, tal como metanol/agua, a temperatura elevada, por ejemplo de 30 a 60°C (ver Synth. Commun. 25(2), 4025-4028 (1995)); por reacción con zinc/borohidruro en una amida ácida, tal como dimetilformamida, a temperaturas inferiores de la temperatura ambiente, por ejemplo a aproximadamente 0°C; por reacción con mezclas de 1,1'-diocetil-4,4'-bipiridinio dibromuro/sodio tetrationato/carbonato de potasio en agua/hidrocarburo halogenado, por ejemplo mezclas de agua/cloruro de metileno, a temperatura elevada, por ejemplo de 25 a 35°C (ver Tetrahedron Lett. 34(46), 7445-7446 (1993)); con borohidruro de sodio sobre un intercambiador iónico Amberlyte IRA-400 en el cloruro forma en un alcohol, tal como metanol/agua, a temperaturas preferidas entre 0 a 40°C (ver Synthetic Commun. 19(5/6), 805-811 (1989)); con borohidruro de potasio en una mezcla hidrocarburo halogenado/alcohol, por ejemplo cloruro de metileno/metanol, a temperaturas preferidas entre 10 a 35°C (ver Synthetic Commun. 19(17), 3047-3050 (1989)); con borohidruro de sodio en dioxano; con borano en tetrahidrofurano; por hidrogenación en la presencia de Pd/C en un alcohol a una temperatura preferida entre 0 a 35°C y en la presencia de formiato de amonio (ver Tetrahedron Lett. 25(32), 3415-3418 (1989)); con tetracloruro de titanio/hidruro de litio aluminio o tetracloruro de titanio/magnesio en un éter, tal como tetrahidrofurano (ver Bull. Chem. Soc. Belg. 97(1), 51-53 (1988)); o con cloruro de amonio férrico/agua a temperatura elevada, preferiblemente bajo reflujo (Synth. Commun. 22, 3189-3195 (1992)).

En un compuesto de fórmula I en donde G es un alquilo inferior aciloxi-sustituido y los otros radicales son como se definen para la fórmula I, el radical acil se puede retirar por hidrólisis, produciendo el compuesto de fórmula I correspondiente en donde G es un alquileo inferior hidroxí-sustituido. La hidrólisis preferiblemente se lleva a cabo bajo condiciones habituales, por ejemplo en la presencia de ácidos o bases, tales como HCl o NaOH, en solución acuosa o en un solvente o mezcla de solventes apropiados.

A partir de un compuesto de fórmula I en donde G es un alquilo inferior aciloxi-sustituido también es posible, preparar un compuesto de fórmula I en donde G es un alquileo inferior. La reacción en este caso preferiblemente se lleva a cabo con hidrogenación catalítica (hidrógeno en la presencia de un catalizador apropiado) en un solvente habitual o mezcla de solventes.

Condiciones generales del proceso

Todas las etapas del proceso mencionadas en el presente texto, se pueden llevar a cabo bajo condiciones de reacción que son conocidas *per se*, preferiblemente aquellas mencionadas específicamente, en la ausencia o, habitualmente, en la presencia de solventes o diluentes, preferiblemente aquellas que son inertes hacia los reactivos utilizados y son solventes para estos, en la ausencia o presencia de catalizadores, agentes de condensación o agentes neutralizantes, por ejemplo intercambiadores iónicos, tales como intercambiadores catiónicos, por ejemplo en la forma H⁺, dependiendo de la naturaleza de la reacción y/o de los reactivos a temperatura reducida, normal o elevada, por ejemplo en un rango de temperatura de aproximadamente -100°C a aproximadamente 190°C, preferiblemente de aproximadamente -80°C a aproximadamente 150°C, por ejemplo desde -80 a -60°C, a temperatura ambiente, desde -20 a 40°C o en el punto de ebullición del solvente utilizado, bajo presión atmosférica o en un recipiente cerrado, cuando sea apropiado bajo presión, y/o en una atmósfera inerte, por ejemplo bajo una atmósfera de argón o nitrógeno.

En todas las materias primas y los compuestos intermedios, las sales pueden estar presentes, cuando los grupos que forman una sal están presentes. Las sales también pueden estar presentes durante la reacción de tales compuestos, a condición que la reacción no se deteriore, por esta razón.

En todas las etapas de la reacción, las mezclas isoméricas que forman se pueden separar en los isómeros individuales, por ejemplo diastereoisómeros o enantiómeros, o en cualquiera de las mezclas de isómeros deseadas, por ejemplo racematos o mezclas diastereoisoméricas, por ejemplo análogamente a los métodos descritos bajo "Etapas adicionales del proceso".

En ciertos casos, por ejemplo en el caso de hidrogenaciones, es posible lograr reacciones estereoselectivas así que, por ejemplo, es más fácil obtener isómeros individuales.

Los solventes apropiados, a partir de los cuales se pueden seleccionar para una reacción particular incluyen, por ejemplo, agua, ésteres, tales como alquilo inferior alcanosatos inferiores, por ejemplo diacetato de etilo, éteres, tales como éteres alifáticos, por ejemplo dietil éter, o éteres cíclicos, por ejemplo tetrahidrofurano, hidrocarburos aromáticos líquidos, tales como benceno o tolueno, alcoholes, tales como metanol, etanol o 1- o 2-propanol, nitrilos, tal como acetonitrilo, hidrocarburos halogenados, tales como cloruro de metileno, amida ácidas, tales como dimetilformamida, bases, tales como bases de nitrógeno heterocíclicas, por ejemplo piridina, ácidos carboxílicos, tales como ácidos alcanocarboxílicos inferior, por ejemplo ácido acético, anhídridos de ácido carboxílico, tales como anhídridos de ácido alcanico inferior, por ejemplo anhídrido acético, hidrocarburos cíclicos, lineales o ramificados, tales como ciclohexano, hexano o isopenteno, o mezclas de estos solventes, por ejemplo soluciones acuosas, a menos que se indique de otra manera en la descripción de los procesos. Tales mezclas de solventes también se pueden utilizar en el tratamiento final, por ejemplo por cromatografía o partición.

La invención se relaciona también con aquellas formas del proceso en el cual un compuesto obtenible como un intermedio en cualquier etapa se utiliza como material inicial y las etapas remanentes se realizan, o el proceso se interrumpe en cualquier etapa, o un material inicial se forma bajo las condiciones de reacción o se utiliza en la forma de un derivado reactivo o sal, o un compuesto obtenible por el proceso de acuerdo con la invención se produce bajo las condiciones del proceso y se procesa además *in situ*. Allí preferiblemente se utilizan aquellas materias primas que dan lugar a los compuestos descritos anteriormente como preferidos, especialmente por ser particularmente preferidos, más especialmente preferidos y/o muy especialmente preferidos.

La preparación de los compuestos de fórmula I (o N-óxidos de estos) preferiblemente se lleva a cabo análogamente a los procesos y etapas del proceso mencionados en los Ejemplos.

Los compuestos de fórmula I (o N-óxidos de estos), incluyendo sus sales, también se pueden obtener en la forma de hidratos, o sus cristales pueden incluir, por ejemplo, el solvente utilizado para la cristalización (presencia en la forma de solvatos).

Composiciones farmacéuticas y sus usos

La presente invención se relaciona también con las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula I (o un N-óxido de este) como ingrediente activo y se puede utilizar especialmente en el tratamiento de la enfermedad mencionada en el principio. Se da especial preferencia a las composiciones para administración enteral, tal como nasal, bucal, rectal o, especialmente, oral, y parenteral, tal como administración intravenosa, intramuscular o subcutánea, a animales de sangre caliente, especialmente seres humanos. Las composiciones contienen el ingrediente activo en sí mismo o, preferiblemente, junto con un portador farmacéuticamente aceptable. La dosis del ingrediente activo depende de la enfermedad que se tratará y de la especie, su edad, peso y condición individual, datos farmacocinéticos individuales y del modo de administración.

La invención se relaciona también con las composiciones farmacéuticas para utilizar en un método para tratar el cuerpo del humano o animal profilácticamente o, especialmente, terapéuticamente, de acuerdo con las reivindicaciones en la forma de composiciones para el tratamiento de melanoma y con el uso para el tratamiento las enfermedades reivindicadas.

Se da preferencia a una composición farmacéutica que sea apropiada para la administración a un animal de sangre caliente, especialmente un ser humano o un mamífero comercialmente útil, el cual sufre de la enfermedad caracterizada por una ruta de señalización de la quinasa MAP aberrante del melanoma, que comprende un compuesto de fórmula I (o un N-óxido de este), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, cuando los grupos que forman una sal están presentes, en una cantidad que es efectiva en la inhibición de la quinasa RAF, particularmente una quinasa RAF mutante, junto con al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

Se da preferencia también a una composición farmacéutica para el tratamiento de melanoma profiláctico o, especialmente, terapéutico en un animal de sangre caliente, especialmente un ser humano o un mamífero comercialmente útil, que necesita de dicho tratamiento, especialmente el que sufre de la citada enfermedad, que comprende un novedoso compuesto de fórmula I (o un N-óxido de este), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, como ingrediente activo en una cantidad que es efectiva profilácticamente o, especialmente, terapéuticamente contra las mencionadas enfermedades.

Las composiciones farmacéuticas contienen de aproximadamente 1% a aproximadamente 95% de ingrediente activo, las formas de dosificación que sean en forma de dosis única preferiblemente comprenden cerca de 20% a aproximadamente 90% del ingrediente activo, y las formas de dosificación que no sean en forma de dosis úni-

ca preferiblemente comprenden cerca de 5% a aproximadamente 20% del ingrediente activo. Las formas de dosis por unidad son, por ejemplo, grageas, tabletas, ampollas, viales, supositorios o cápsulas. Otras formas de dosificación son, por ejemplo, ungüentos, cremas, pastas, espumas, tinturas, lápiz de labios, gotas, aerosoles, dispersiones, etc.. Ejemplos son las cápsulas que contienen aproximadamente 0.05 g a aproximadamente 1.0 g del ingrediente activo.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se preparan de una manera conocida *per se*, por ejemplo por medio de procesos convencionales de mezclado, granulación, fabricación, disolución o liofilización.

Preferiblemente se utilizan soluciones del ingrediente activo, también en adición suspensiones o dispersiones, especialmente soluciones acuosas isotónicas, dispersiones o suspensiones, las cuales, en el caso de, por ejemplo, composiciones liofilizadas que contienen la sustancia activa sola o junto con un portador, por ejemplo manitol, se pueden preparar antes de usar. Las composiciones farmacéuticas se pueden esterilizar y/o contener excipientes, por ejemplo conservantes, estabilizadores, agentes de humectación y/o emulsionantes, solubilizadores, sales para regular la presión osmótica y/o soluciones reguladoras, y se preparan de una manera conocida *per se*, por ejemplo por medio de procesos convencionales de disolución o liofilización. Las soluciones o suspensiones mencionadas pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad, tales como sodio carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa, dextran, polivinilpirrolidona o gelatina, o solubilizadores, por ejemplo Tween 80 [polioxietileno (20)sorbitan monooleato; marca comercial de ICI Americas, Inc, USA].

Las suspensiones en aceite comprenden como componente el aceite vegetal, aceites sintéticos o semi-sintéticos habituales para propósitos de inyección. Se pueden mencionar como tales especialmente ésteres de ácidos grasos líquidos, que comprenden como el componente ácido un ácido graso de cadena larga que tiene de 8 a 22, especialmente de 12 a 22, átomos de carbono, por ejemplo ácido laúrico, ácido tridecílico, ácido mirístico, ácido pentadecílico, ácido palmítico, ácido margárico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido behénico o los correspondientes ácidos insaturados, por ejemplo ácido oleico, ácido elaidico, ácido erucico, ácido brasídico o ácido linoleico, opcionalmente con la adición de antioxidantes, por ejemplo vitamin E, β -caroteno o 3,5-di-ter-butil-4-hidroxitolueno. El componente alcohólico de aquellos ésteres de ácidos grasos tiene un máximo de 6 átomos de carbono y es un mono- o polihídrico, por ejemplo alcohol, mono-, di- o tri-hídrico, por ejemplo metanol, etanol, propanol, butanol o pentanol o sus isómeros, pero especialmente glicol y glicerol. Ejemplos de ésteres de ácidos grasos que pueden ser mencionados son, por consiguiente: etil oleato, isopropil miristato, isopropil palmitato, "Labrafil M 2375" (polioxietilenglicerol trioleato de Gattefossé, Paris), "Labrafil M 1944 CS" (glicéridos poliglicosilados insaturados preparados por alcoholisis de aceite de la semilla de albaricoque y compuesto de glicéridos y polietilen glicol éster; Gattefossé, France), "Labrasol" (glicéridos poliglicosilados saturados preparados por alcoholisis de TCM y compuestos de glicéridos y polietilen glicol éster; Gattefossé, France) y/o "Miglyol 812" (triglicérido de ácidos grasos saturados que tiene una longitud de cadena entre C₈ a C₁₂ de Hüls AG, Germany), pero especialmente aceites vegetales, tales como aceite de semilla de algodón, aceite de almendra, aceite de oliva, aceite de castor, aceite de ajonjolí, aceite de soja y, más especialmente, aceite de cacahuete.

La preparación de las composiciones para inyección se realiza de modo habitual bajo condiciones estériles, así como también la introducción de estos, por ejemplo, en ampollas o viales y el sellado de los contenedores.

Las composiciones farmacéuticas para administración oral se pueden obtener, por ejemplo, por combinación del ingrediente activo con uno o más portadores sólidos, granulación de una mezcla resultante, cuando sea apropiado, y tratamiento de la mezcla o gránulos, si se desea, cuando sea apropiado por adición de excipientes adicionales, a las tabletas o núcleos de grageas.

Los portadores apropiados son especialmente rellenos, tales como azúcares, por ejemplo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol, preparaciones de celulosa y/o fosfatos de calcio, por ejemplo fosfato tricalcio o fosfato hidrógeno de calcio, también aglutinantes, tales como almidones, por ejemplo maíz, trigo, arroz o almidón de patata, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, sodio carboximetilcelulosa y/o polivinilpirrolidona, y/o, si se desea, desintegrantes, tales como los almidones anteriormente-mencionados, también almidón carboximetil, polivinilpirrolidona reticulada, ácido alginico o una sal de estos, tal como alginato de sodio. Excipientes adicionales son especialmente acondicionadores de flujo y lubricantes, por ejemplo ácido silícico, talco, ácido esteárico o sales de estos, tal como magnesio o calcio estearato, y/o polietilenglicol, o derivados de estos.

Los núcleos de las grageas pueden estar provistos de, cubiertas apropiadas, opcionalmente entéricas, que utilizan *inter alia* soluciones concentradas de azúcar que pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, o soluciones de recubrimiento en solventes orgánicos apropiados o mezclas de solventes o, para la preparación de cubiertas entéricas, soluciones de apropiadas preparaciones de celulosa, tal como acetilcelulosa ftalato o hidroxipropilmetilcelulosa ftalato. Los colorantes o pigmentos se pueden adicionar a las tabletas o cubiertas de grageas, por ejemplo para propósitos de identificación o para indicar diferentes dosis de ingrediente activo.

Las composiciones farmacéuticas para administración oral también son cápsulas de gelatina dura y cápsulas de sellado blandas que consisten de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de gelatina dura pueden contener el ingrediente activo en la forma de gránulos, por ejemplo en mezcla con rellenos, tales como almidón de maíz, aglutinantes y/o deslizantes, tales como talco o estearato de magnesio, y opcionalmente estabilizadores. En

ES 2 318 276 T3

las cápsulas blandas el ingrediente activo preferiblemente se disuelve o suspende en excipientes líquidos apropiados, tales como aceites grasos, aceite de parafina o polietilenglicoles líquidos o ésteres de ácidos grasos de etilenglicol o propilenglicol, igualmente es posible adicionar estabilizadores y detergentes, por ejemplo del tipo éster de ácido graso polioxietilenosorbitan.

Las composiciones farmacéuticas administrables vía rectal apropiadas son, por ejemplo, supositorios que consisten de una combinación del ingrediente activo con una base de supositorio. Las bases de supositorios apropiadas son, por ejemplo, triglicéridos naturales o sintéticos, hidrocarburos parafina, polietileno glicoles o alcoholes superiores.

Para la administración parenteral son apropiados, especialmente, las soluciones acuosas de un ingrediente activo en forma soluble en agua, por ejemplo en la forma de una sal soluble en agua, o suspensiones para inyección acuosa que contienen sustancias que incrementan la viscosidad, por ejemplo sodio carboximetilcelulosa, sorbitol y/o dextran y, si se desea, estabilizadores. El ingrediente activo, opcionalmente junto con los excipientes, también puede ser en la forma de un liofilizado y se puede hacer en una solución antes de la administración parenteral por la adición de solventes apropiados.

Las soluciones utilizadas, por ejemplo, para administración parenteral también se pueden utilizar como soluciones de infusión.

Los conservantes preferidos son, por ejemplo, antioxidantes, tales como ácido ascórbico, o microbicidas, tal ácido sórbico o ácido benzoico.

La invención se relaciona especialmente con el uso para el tratamiento de una de las enfermedades patológicas que se caracteriza por una ruta de señalización de la quinasa MAP aberrante, especialmente una enfermedad sensible para la inhibición de la quinasa RAF, a saber melanoma. Los compuestos de fórmula I (o un N-óxido de estos) se pueden administrar profiláctica o terapéuticamente como tal o en la forma de composiciones farmacéuticas, preferiblemente en una cantidad que es efectiva contra las mencionadas enfermedades, a un animal de sangre caliente, por ejemplo un ser humano, que requiere de dicho tratamiento, los compuestos que se utilizan especialmente en la forma de composiciones farmacéuticas. En el caso de un peso corporal de aproximadamente 70 kg, se administra una dosis diaria de aproximadamente 0.1 g a aproximadamente 5 g, preferiblemente de aproximadamente 0.5 g a aproximadamente 2 g, de un compuesto de la presente invención.

La dosificación, composición y preparación de formulaciones farmacéuticas preferidas (medicamentos) que se utilizan en cada caso particular se describen anteriormente.

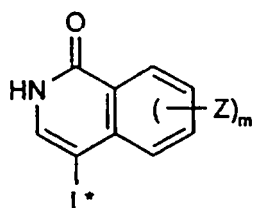
Materias primas

Las materias primas utilizadas y las condiciones de reacción elegidas son preferiblemente de tal forma que los compuestos mencionados como preferidos, se obtienen.

Las materias primas de las fórmulas II y III son conocidas, se pueden preparar mediante procesos conocidos *per se*, o son disponibles comercialmente; en particular, se pueden preparar por procesos análogos a aquellos mencionados en los Ejemplos.

En la preparación de materias primas, cualquiera de los grupos funcionales presentes que no es para participar en la reacción puede estar en forma protegida, si es necesario. Los grupos protectores preferidos, su introducción y su eliminación se describen en el proceso a) o en los Ejemplos. En lugar de las materias primas e intermedios en cuestión, también es posible hacer reaccionar las sales de estos cuando, los grupos que forman una sal están presentes y en la reacción en cuestión también es posible utilizar una sal. Por lo tanto, cualquier referencia anteriormente y de ahora en adelante a las materias primas también tiene la intención de incluir sus sales, cuando sea posible y conveniente.

Los compuestos de fórmula II en donde G es $-\text{CH}_2\text{-O-}$, $-\text{CH}_2\text{-S-}$, $-\text{CH}_2\text{-NH-}$, oxa, tia o NR- y los otros símbolos son como se definen para la fórmula I se pueden preparar, por ejemplo, por la reacción de un compuesto de fórmula IV

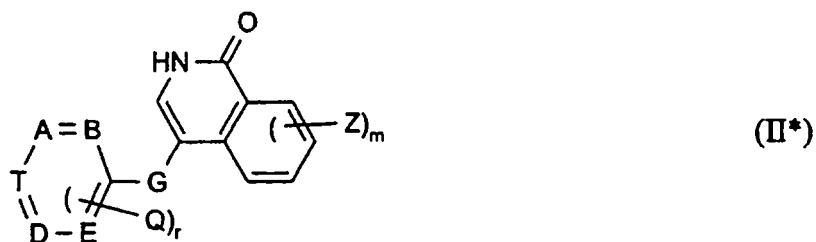


(IV)

en donde L* es un grupo saliente nucleofugal, especialmente halo, tal como bromo, y m y Z y los enlaces se indican por líneas onduladas son como se definen para un compuesto de fórmula I (especialmente m = 0, i.e. Z no esta presente - el compuesto de fórmula IV correspondiente en donde L* es un bromo, disponible comercialmente de SPECS & BIOSPECS, Rijswijk, Holland), con un compuesto de fórmula V



en donde G es -CH₂-O-, -CH₂-S- o -CH₂-NH-, o es oxa, tia o -NR-, y A, B, D, E, T, Q y r son como se definen para los compuestos de fórmula I, preferiblemente bajo condiciones análogas a aquellas mencionadas en el proceso a) para la reacción de un compuesto de fórmula II con un compuesto de fórmula III, o con catálisis del complejo de paladio con Pd⁰, por ejemplo con complejos tetrakis(trifenilfosfinil)paladio, complejos de paladio(0)-P(o-tolil)₃, complejos de paladio(0) con quelante bis(fosfinas) (ver, por ejemplo, J. Org. Chem. 61, 7240-7241 (1996)) o similares, preferiblemente con Pd⁰ en la presencia de un carbonato de metal alcalino, tal como K₂CO₃, en un solvente apropiado, tal como tolueno, a temperatura elevada, preferiblemente bajo reflujo. Luego se obtuvo un compuesto de fórmula II*



en donde m y Z y los enlaces indicados por líneas onduladas, y A, B, D, E, T, Q y r son como se definen para un compuesto de fórmula I, y en donde G es -CH₂-O-, -CH₂-S- o -CH₂-NH-, o es oxa, tia o NR-.

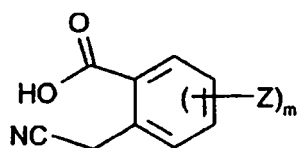
El compuesto de fórmula II correspondiente se pueden preparar a partir de este, por la introducción de un grupo nucleofugal L, como se define para la fórmula II, utilizando un correspondiente ácido anhídrido, por ejemplo cloruro fosforil (POCl₃) para la introducción de L = Cl o un reactivo diferente mencionado a continuación para la conversión de un compuesto de fórmula XII en un compuesto de fórmula II.

Las materias primas de fórmulas IV y V son conocidas, se pueden preparar por procesos conocidos *per se*, o son disponibles comercialmente.

Un compuesto de fórmula II en donde G es un metileno y los otros símbolos son como se definen para un compuesto de fórmula I se pueden preparar, por ejemplo, por la reacción de una lactona de fórmula VI

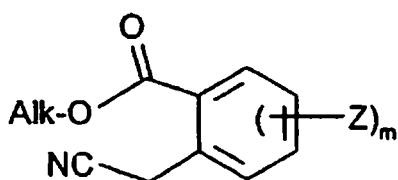


en donde Z y m son como se definen para un compuesto de fórmula I, con un cianuro de metal alcalino, especialmente cianuro de potasio, a temperatura elevada, por ejemplo desde 100°C a 200°C (ver Org. Synthesis, Coll. Vol. 3, 174), produciendo un ácido cianometilbenzoico de fórmula VII



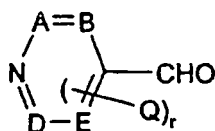
(VII)

en donde los radicales son como se definen para la fórmula VI; el compuesto de fórmula VII luego se convierte en el éster de alquilo inferior, por ejemplo por adición de una apropiada di-alquilformamida inferior di-alquilacetil inferior, tal como dimetilformamida dimetilacetil, con el compuesto de fórmula VII en un solvente apropiado, por ejemplo un halo-alcano inferior, tal como diclorometano, y la agitación de la mezcla para completar la reacción, preferiblemente a temperaturas entre 0 a 60°C, por ejemplo a aproximadamente temperatura ambiente. Se obtiene el éster del alquilo inferior correspondiente de fórmula VIII



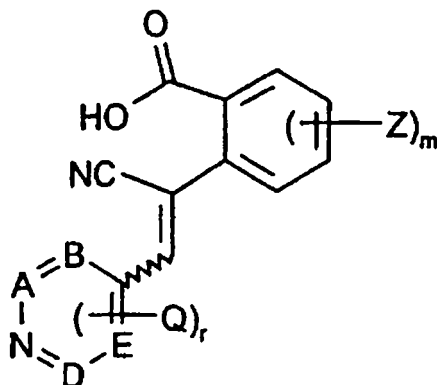
(VIII)

en donde Alk es un alquilo inferior, especialmente metilo, y los otros radicales son como se definen para la fórmula VI. El éster luego se hace reaccionar en un solvente apropiado, por ejemplo un éter, tal como tetrahidrofurano, o un éster, tal como etil propionato, o mezclas de estos, con un aldehído de fórmula IX



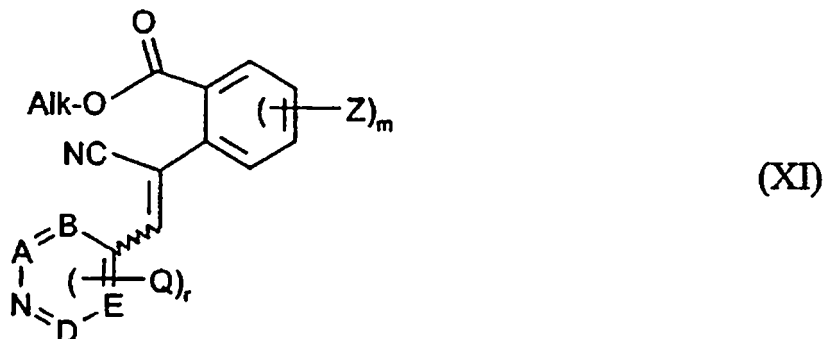
(IX)

en donde A, B, D, E, Q y r son como se definen para un compuesto de fórmula I, en la presencia de un alcohol, tal como metanol, y del alcoholato correspondiente, tal como un metanolato de metal alcalino, por ejemplo metanolato de sodio, a una temperatura de preferiblemente 0°C a temperatura de reflujo, preferiblemente a aproximadamente de 5 a 30°C, produciendo el compuesto de fórmula X

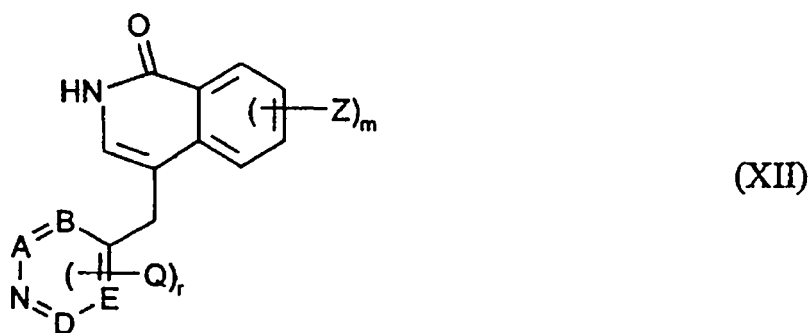


(X)

en donde los radicales A, B, D, E, Q y Z y los índices r y m son como se definen para un compuesto de fórmula I; aquel compuesto se convierte (bajo condiciones análogas a aquellos para la preparación del éster de alquilo inferior de fórmula VIII) en el correspondiente alquilo inferior éster de fórmula XI



en donde Alk es un alquilo inferior, especialmente metilo, y los otros radicales son como se definen para la fórmula X. La posterior hidrogenación en la presencia de un catalizador apropiado, especialmente un catalizador de estructura, tal como cobalto Raney o, especialmente, nickel Raney, en un solvente apropiado, tal como un éter, por ejemplo tetra-hidrofurano, o un alcohol, tal como metanol, o mezclas de estos, a temperaturas preferidas entre 10 a 80°C, a presiones entre 0.5 a 100 bares, especialmente aproximadamente a presión normal, produce un compuesto de isoquinolina de fórmula XII



en donde los radicales A, B, D, E, Q y Z y los índices r y m son como se definen para un compuesto de fórmula I.

El compuesto de fórmula XII luego se convierte en el compuesto de fórmula II correspondiente, o una sal de este, por medio de un reactivo apropiado para la introducción del grupo saliente nucleofugal, por ejemplo un haluro fosforil o pentahaluro de fósforo, especialmente cloruro de fosforil (POCl₃) o pentacloruro de fósforo, sin un solvente o en un solvente apropiado, por ejemplo acetonitrilo, en la ausencia o, preferiblemente, en la presencia de un ácido correspondiente, por ejemplo de un ácido hidrohálico, tal como ácido clorhídrico, a temperaturas preferidas entre 40°C a temperatura de reflujo, preferiblemente a aproximadamente de 40 a 60°C.

De una manera análoga, es posible utilizar compuestos análogos a aquellos de fórmula IX en donde, sin embargo, el lugar del grupo -CHO- se toma por un grupo alcanoaldehído inferior correspondiente, *vía* compuestos análogos a aquellos de fórmulas X a XII en donde el lugar del grupo metilideno (fórmula X, XI) o del grupo metileno (fórmula XII) se toma por un grupo alquilideno inferior o alquilenio inferior correspondiente, para preparar los compuestos de fórmula II correspondientes en donde G es un alquilenio inferior.

Las otras materias primas son conocidas, se pueden preparar por procesos conocidos *per se*, o son disponibles comercialmente, o, en particular, se pueden preparar por procesos análogos a aquellos mencionados en los Ejemplos.

ES 2 318 276 T3

Los Ejemplos que siguen sirven para ilustrar la invención.

Ejemplos de Síntesis (Referencia)

Ejemplo S1

1-(3,5-Dimetilanilino)-4-[(piridin-4-il)-metilo]-isoquinolina (= N-(3,5-dimetil-fenil)-[4-(piridin-4-il-metilo)-isoquinolin-1-il]-amina)

Con la exclusión de la humedad, 100 mg (0.825 mmol) de 3,5-dimetil-anilina se disuelven en 4 ml de etanol, y se adicionan 196 ml (0.784 mmol) de HCl (4N en dioxano). Después de la adición de 200 mg (0.785 mmol) de 1-cloro-4-[(piridin-4-il)-metilo]-isoquinolina, la mezcla se calienta por 8 horas a 90°C. Luego se realiza, la concentración por evaporación; el residuo se lleva en 4 ml de agua, 1 ml de solución saturada de amoníaco y 20 ml de CH₂Cl₂, y la fase orgánica se separa completamente, se seca con Na₂SO₄ (anhidro) y se concentra nuevamente por evaporación. Columna de cromatografía (SiO₂; acetato de etilo/hexano 3:1) y cristalización a partir de acetato de etilo/hexano produce el compuesto de título: m.p. 156-158°C; FA-B-MS: (M+H)⁺=340; Anal. calc. (C₂₃H₂₁N₃ 0.1 H₂O) C 80.95%, H 6.26%, N 12.31%; *encontrado* C 80.9%, H 6.2%, N 12.4%.

La material prima se prepara como sigue:

S1a) 2-Cianometil-ácido benzoico metil éster

Con calentamiento suave, se disuelven 175 g (1.08 mol) de 2-cianometil-ácido benzoico (para la preparación ver: Org. Synthesis, Coll, Vol. 3, 174) en 1.7 litros de CH₂Cl₂; se adicionan gota a gota 242 ml (≈90%, 1.6 mol) de dimetilformamida dimetilacetal, a temperatura ambiente, y la agitación se realiza por 38 horas para completar la reacción. La mezcla de reacción se lava con 2 x 1.2 litros de solución saturada de NaHCO₃ y salmuera. Las fases acuosas se extraen utilizando 2 porciones de CH₂Cl₂, y las fases orgánicas se secan (Na₂SO₄) y se concentran por evaporación. Columna de cromatografía (SiO₂; acetato de etilo/hexano 1:4-, aplicado en acetato de etilo/hexano/CH₂Cl₂) produce el compuesto de título: m.p. 49-50°C Anal. calc. (C₁₀H₉NO₂) C 68.56%, H 5.18%, N 8.00%; *encontrado* C 68.5%, H 5.1%, N 7.9%.

S1b) Ácido 2-[(1-Ciano-2-(piridin-4-il)-vinil]-benzoico

Con la exclusión del aire, se adicionan 127.7 ml (1.35 mol) de piridina-4-carbaldehído (Fluka, Buchs, Switzerland) a una solución de 215.6 g (1.23 mol) de ácido 2-cianometil-benzoico metil éster en 1.8 litros de THF. La mezcla se enfría a 8-9°C, se adicionan gota a gota 297 ml (1.6 mol) de una solución 5.4M de metanolato de sodio en metanol, en el curso de 20 minutos, y la mezcla se agita por 1.5 horas entre 10 y 15°C. La mezcla luego se ajusta a pH 6.0 utilizando aproximadamente 350 ml de HCl 4N y luego se agita por una hora a 5°C. El compuesto de título se cristaliza y se filtra completamente con aspiración y se lava cuidadosamente con THF/agua 2:1 y THF: m.p. 218-219°C; FAB-MS: (M+H)⁺=251; Anal. calc. (C₁₅H₁₀N₂O₂) C 71.99%, H 4.03%, N 11.19%; *encontrado* C 71.9%, H 4.1%, N 11.1%.

S1c) Ácido 2-[(1-Ciano-2-(piridin-4-il)-vinil]-benzoico metil éster

Con la exclusión de humedad, 211 g (0.843 mol) de ácido 2-[(1-ciano-2-(piridin-4-il)-vinil]-benzoico se suspendieron en 3.3 litros de CH₂Cl₂; se adicionan 169 ml (≈90%, 1.1 mol) de dimetilformamida dimetilacetal (Fluka, Buchs, Switzerland) a temperatura ambiente, y se realiza agitación por 22 horas para completar la reacción. La mezcla de reacción se filtra, y el residuo se lava cuidadosamente con CH₂Cl₂ y se descarta. La concentración del filtrado por evaporación, cromatografía (SiO₂; acetato de etilo) y la cristalización a partir de acetato de etilo/hexano produce el compuesto de título: m.p. 102-104°C; FAB-MS: (M+H)⁺=265; Anal. calc. (C₁₆H₁₂N₂O₂) C 72.72%, H 4.58%, N 10.60%; *encontrado* C 72.7%, H 4.8%, N 10.5%.

S1d) 4-(Piridin-4-il-metilo)-2H-isoquinolin-1-ona

En la presencia de 5 x 40 g de nickel Raney (adicionado a intervalos), 163 g (617 mmol) de ácido 2-[(1-ciano-2-(piridin-4-il)-vinil]-benzoico metil éster se hidrogenan en 3 litros de THF a 40°C por 90 horas. La mezcla de reacción se filtra, y el filtrado se concentra por evaporación y se cristaliza a partir de acetonitrilo/acetato de etilo (→ compuesto de título). Además se puede obtener el producto del licor madre por cromatografía (SiO₂; acetato de etilo-acetona): m.p. 189-190°C; FAB-MS: (M+H)⁺=237; Anal. calc. (C₁₅H₁₂N₂O . 0.05 H₂O) C 75.96%, H 5.14%, N 11.81%; *encontrado* C 75.8%, H 5.2%, N 11.9%.

S1e) 1-Cloro-4-(piridin-4-ilmetil)-isoquinolina

Con la exclusión de aire, 32.7 g (139 mmol) de 4-(piridin-4-il-metilo)-2H-isoquinolin-1-ona se hacen en una suspensión en 560 ml de acetonitrilo, y 69.2 ml (277 mmol) de HCl 4N en dioxano y se adicionan 31.7 ml (346 mmol) de POCl₃. La mezcla se agita por 22 horas a 50°C y luego se enfría en un baño de hielo, y se adiciona una solución de 128.6 g de NaHCO₃ en 1.64 litros de agua en el curso de 30 minutos. Durante la adición, primero se forma una solución clara y luego el compuesto de título precipita y, después de 15 minutos, se puede filtrar completamente, se lava cuidadosamente con agua y éter y se seca bajo un vacío alto a 60°C: m.p. 119-120°C; FAB-MS: (M+H)⁺=255;.

Ejemplo S2

1-(3-Clorobenzilamino)-4-[(piridin-4-il)-metilo]-isoquinolina

Con la exclusión de humedad, 1.6 ml (13.1 mmol) de 3-clorobenzilamina y 800 mg (3.14 mmol) de 1-cloro-4-(piridin-4-ilmetil)-isoquinolina (Ejemplo 1e) se agitan por 2 horas a 150°C. La mezcla se suspende en acetato de etilo, se adiciona 1 ml de solución concentrada de amoníaco, se realiza un lavado con agua y salmuera, y la fase orgánica se seca (Na₂SO₄) y se concentra por evaporación. Columna de cromatografía (SiO₂; acetato de etilo) produce el compuesto de título: m.p. 141-142°C; FAB-MS: (M+H)⁺=360; Anal. calc. (C₂₂H₁₈N₃Cl) C 73.43%, H 5.04%, N 11.68%, Cl 9.85%; encontrado C 73.2%, H 5.1%, N 11.6%, Cl 9.9%.

Ejemplo S3

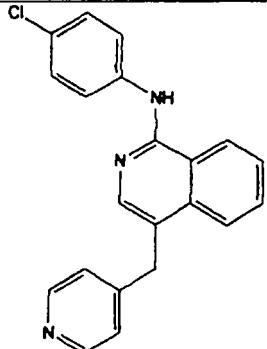
1-(4-t-butilanilino)-4-[(piridin-4-il)-metilo]-isoquinolina

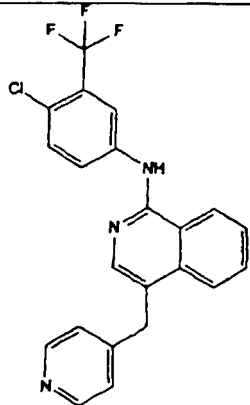
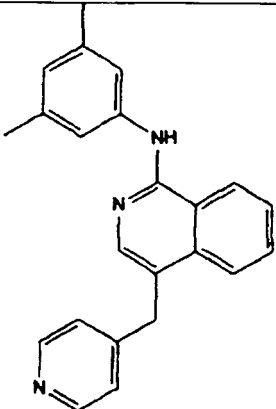
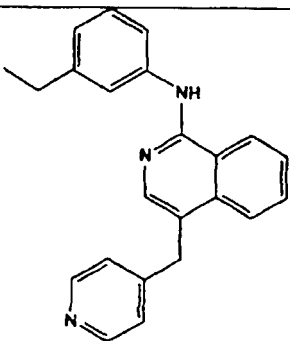
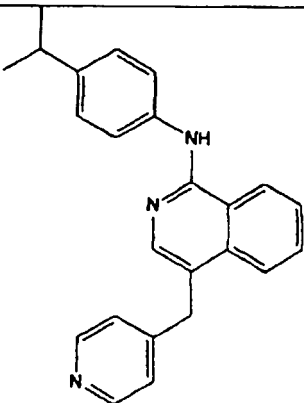
Con la exclusión de humedad, 27.5 ml (172.7 mmol) de 4-t-butil-anilina y 7.0 g (27.5 mmol) de 1-cloro-4-(piridin-4-ilmetil)-isoquinolina (Ejemplo 1e) se agitan por 3 horas a 80°C bajo un manto de nitrógeno. La mezcla luego se enfría y se somete a partición entre 5% (peso/volumen) de NaHCO₃ (acuoso) y acetato de etilo. La fase de acetato de etilo se seca sobre MgSO₄ y se evapora. La cromatografía instantánea (silica gel, 50% (v/v) acetato de etilo/hexano) seguido por la cristalización a partir de hexano en un baño de hielo seco/alcohol isopropílico produce 8.6 g de un polvo de color amarillo claro, m.p. 157-159°C; Anal. calc. C 81.71%, H 6.86%, N 11.43%; encontrado C 81.88%, H 6.85%, N 11.43%.

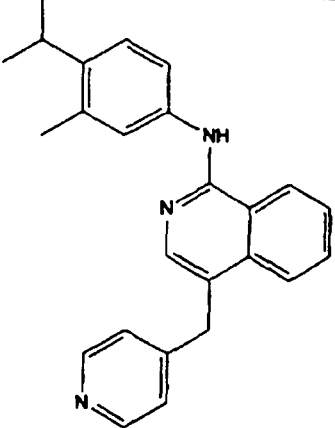
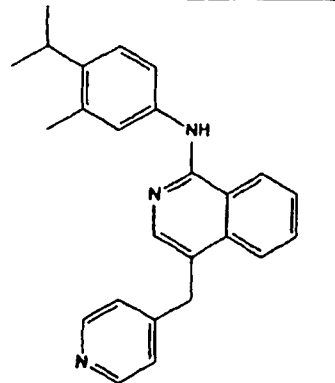
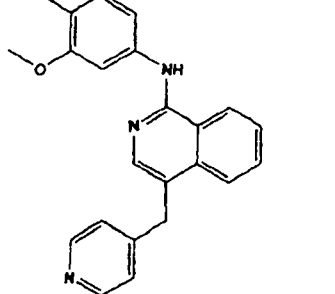
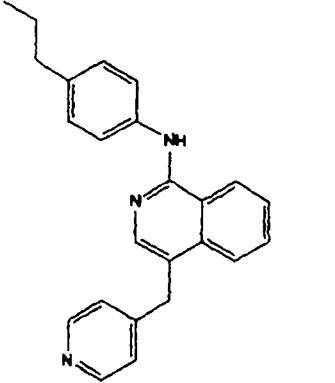
Ejemplos Biológicos

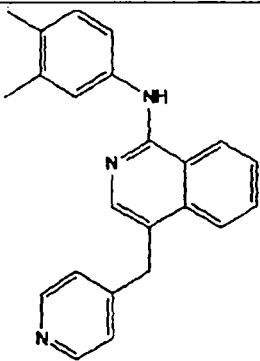
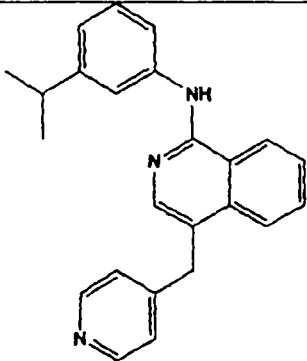
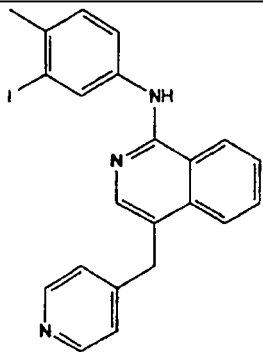
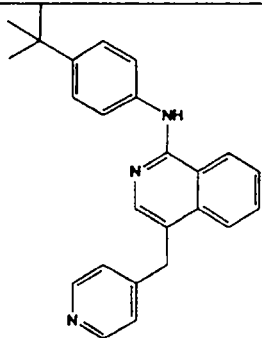
Proteínas activas de B-Raf, C-Raf, y V599E B-Raf de secuencia humana se purifican a partir de células de insecto utilizando el sistema de expresión baculoviral. La inhibición de Raf se analiza en microplacas de 96-pozos cubiertas con IκBα y se bloquean con Super-block. La fosforilación de IκBα en Serina 36 se detecta utilizando un anticuerpo específico fosfo-IκBα (Cell Signaling #9246), un anticuerpo fosfatasa alcalina IgG anti-ratón conjugado secundario (Pierce # 31320), y un sustrato de fosfatasa alcalina, ATTOPHOS (Promega, #S101).

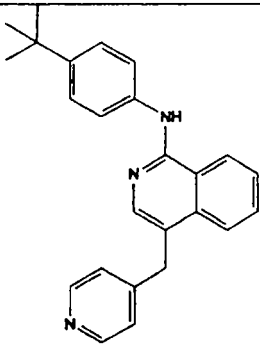
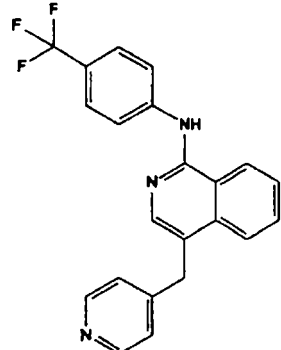
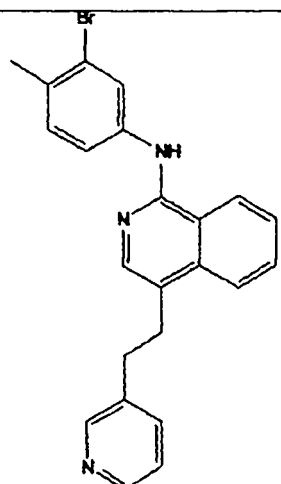
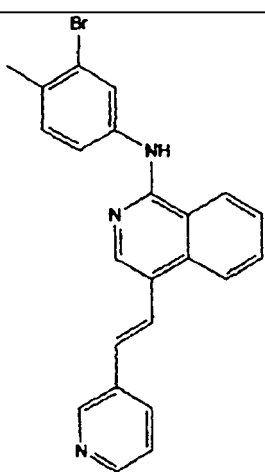
Cada uno de los siguientes compuestos inhibe C-R.AF de tipo salvaje en una IC₅₀ entre 0.01 a 3.5 micromoles/litro y/o B-RAF de tipo salvaje en una IC₅₀ entre 0.03 a 3.7 micromoles/litro y/o B-RAF mutante (V599E) en una IC₅₀ entre 0.01 a 3.4 micromoles/litro.

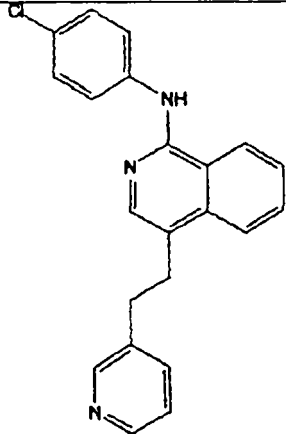
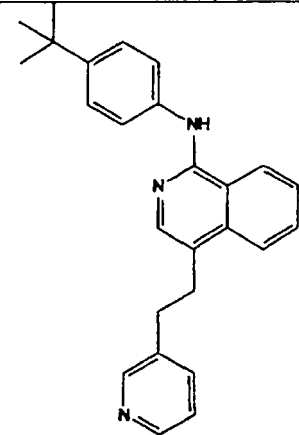
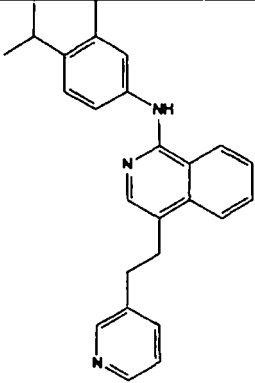
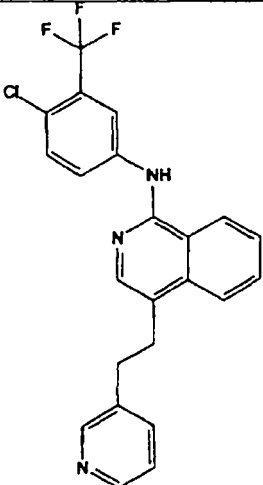
Ejemplo No.		Punto de fusión (°C)	MS(M+H) ⁺
1.		182-183	346

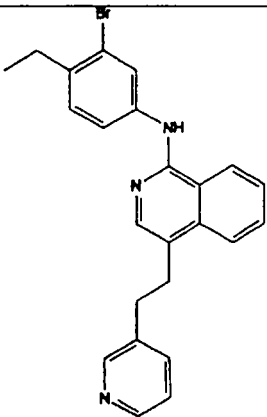
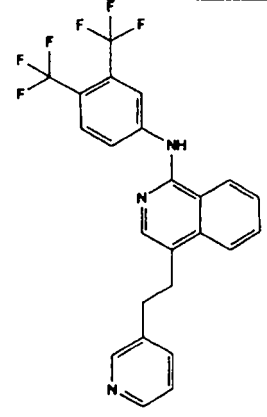
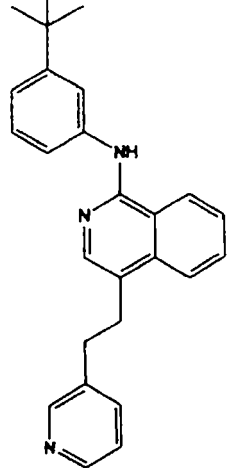
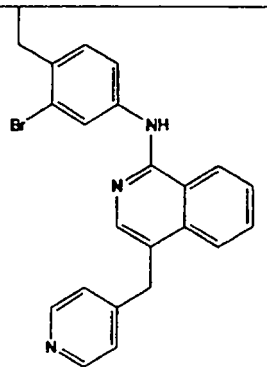
2.		205-206	441
3.		144-145	340
4.		146-148	340
5.		158-159	354

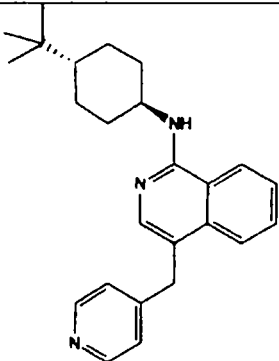
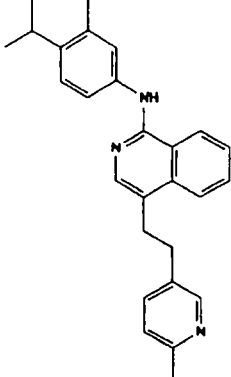
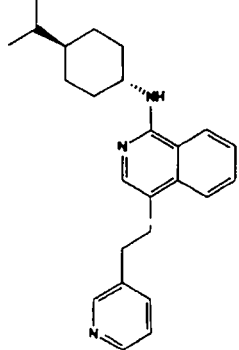
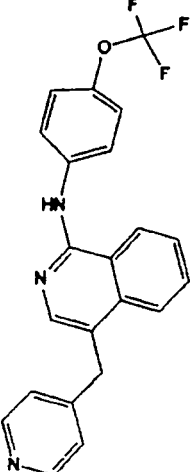
6.			368
7.			368
8.			356
9.		118-119	354

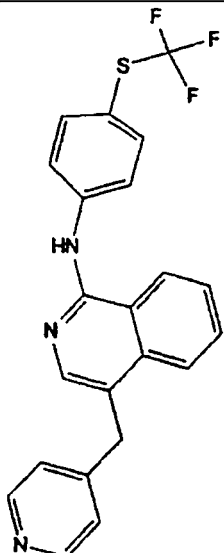
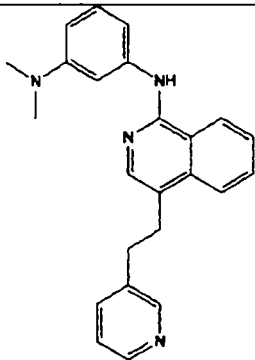
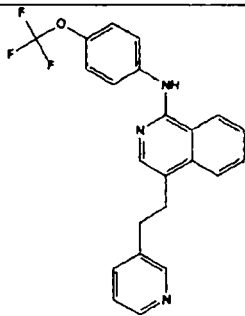
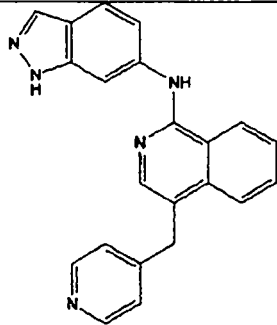
10.		144-145	340
11.		143-145	354
12.		149-150	452
13.			

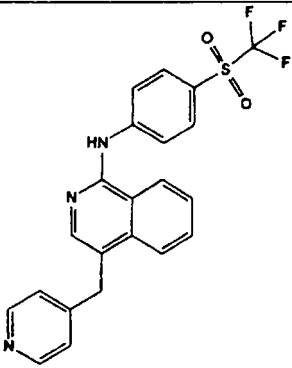
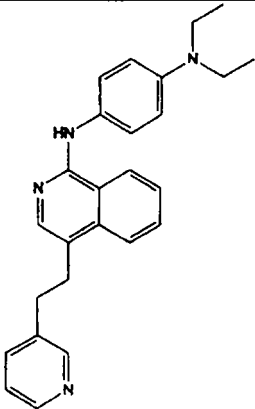
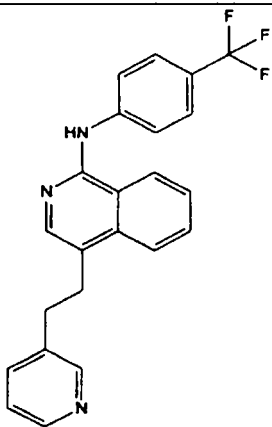
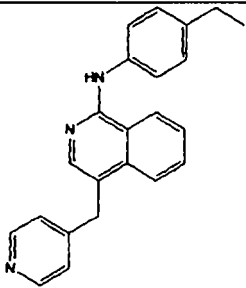
14.		158-159	368
15.		160-161	380
16.		167-168	404/406
17.			416

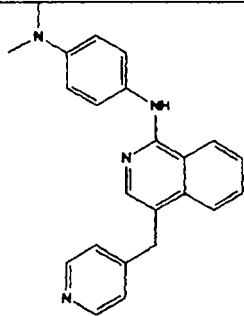
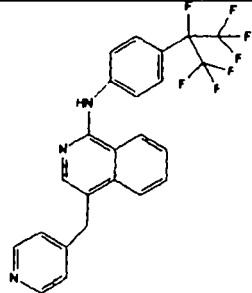
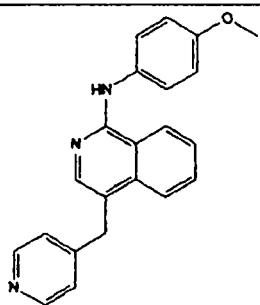
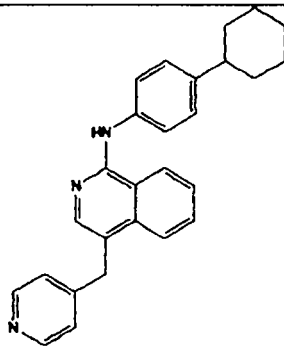
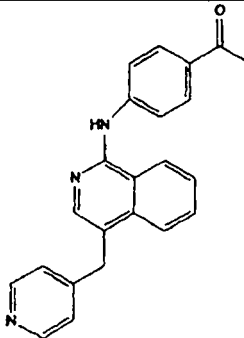
18.			359
19.		81	
20.		133-134	
21.			159

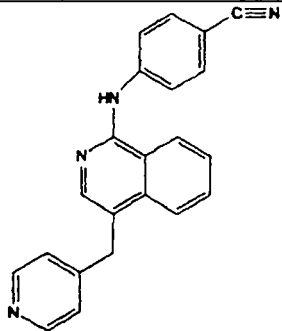
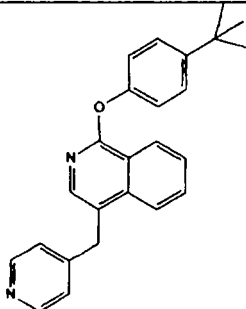
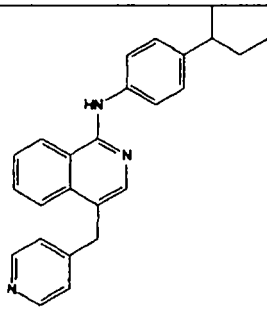
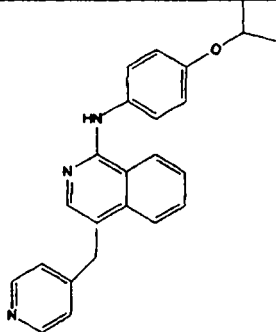
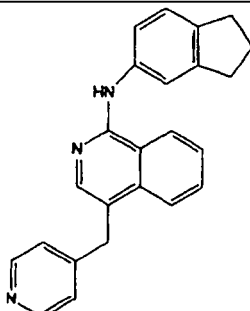
22.			119
23.		124-125	
24.		133-134	
25.		418/420	

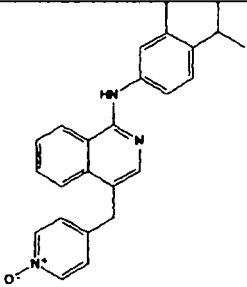
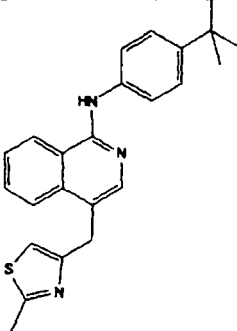
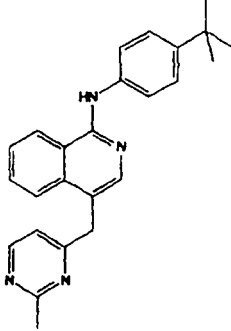
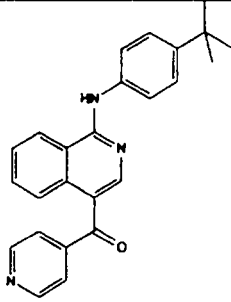
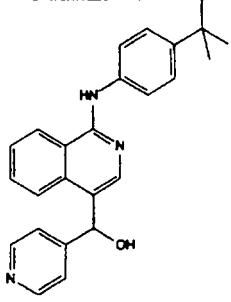
26.			374
27.			aceite
28.		89-92	
29.			396

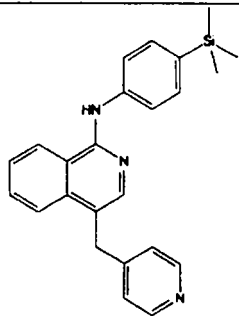
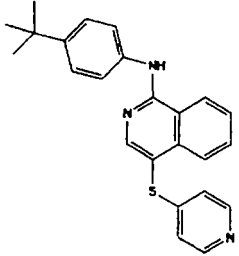
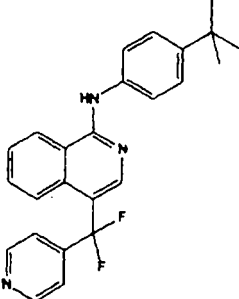
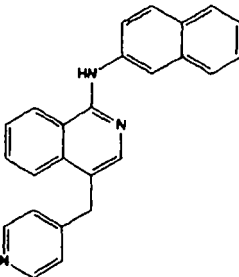
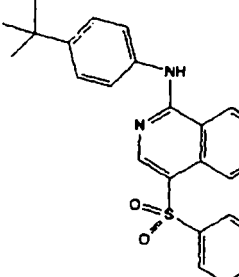
30.			412
31.			369
32.			410
33.			332

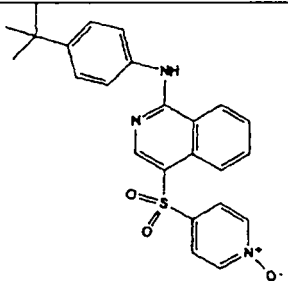
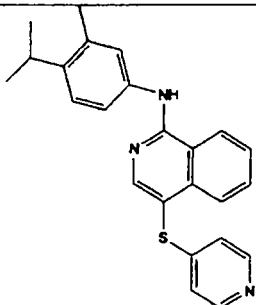
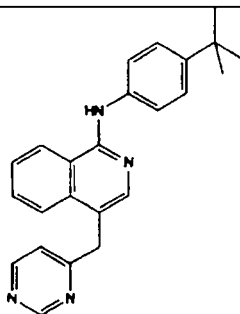
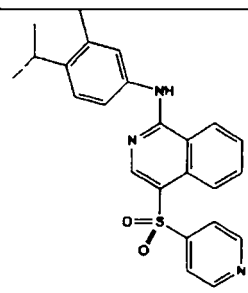
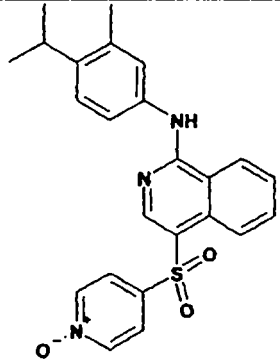
34.			444
35.			397
36.			394
37.			340

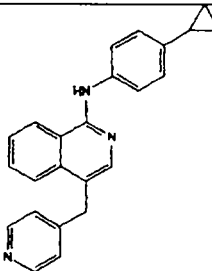
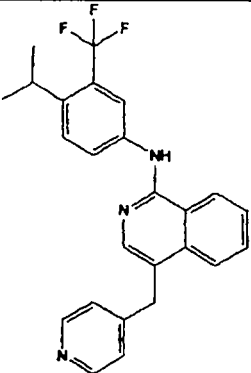
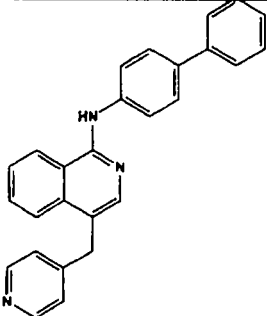
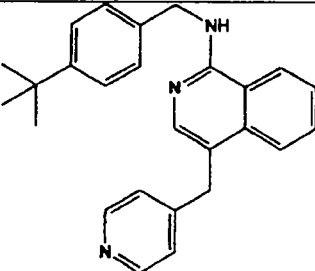
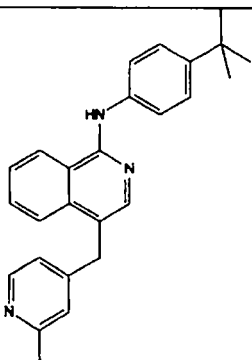
38.			355
39.			480
40.			342
41.			394
42.			354

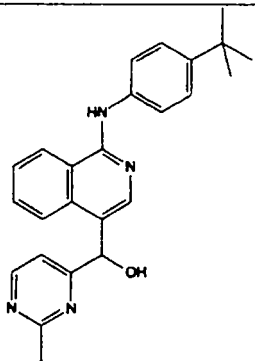
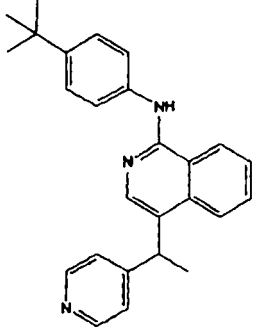
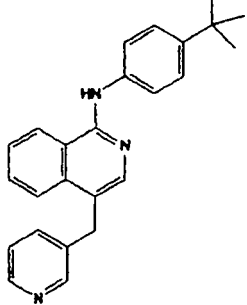
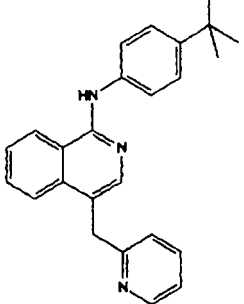
43.			337
44.			369
45.			368
46.			370
47.			352

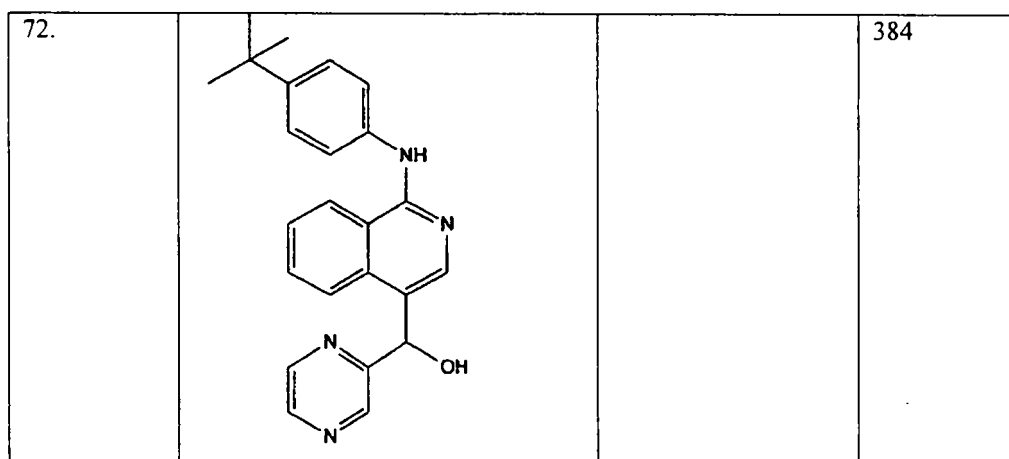
48.		384
49.		388
50.		383
51.		382
52.		384

53.			384
54.			386
55.			404
56.			362
57.			418

58.		434
59.		386
60.		369
61.		418
62.		433

63.		351
64.		422
65.		387
66.		382
67.		382

68.			399
69.			382
70.			368
71.			368



Ejemplo D1

Detección de la Mutación T1796A en el Gen Humano B-Raf (Ejemplo referencia)

Cebador de detección: GATTTTGGTCTAGCTACAGA

Segundo Cebador: GACTTTCTAGTAACTCAGCAG

El ADN genómico se aísla a partir de células humanas de una línea celular de melanoma utilizando un GENELUTE kit de ADN genómico de mamífero (Sigma cat # G1 N 350). Las reacciones PCR se realizan sobre un equipo de PCR (MJ Research, Model PTC100) en un volumen total de 50 microlitros utilizando el PCR Core kit por Roche (cat # 1578 553). La mezcla de reacción PCR contiene 5 microlitros de 10X solución reguladora de reacción, 1 microlitro de dNTPs 10 mM, 100-1000 ng de ADN plantilla, 0.5 microlitros de polimerasa Taq (2.5-5 unidades), 1 microlitro de un stock 31 uM de cada cebador.

Las condiciones de PCR son como sigue:

95°C 3 minutos

94°C 1 minutos	35 Ciclos
50°C 30 segundos	
72°C 1 minutos	

72°C 10 minutos

4°C

Después de la amplificación, 8 microlitros de la mezcla de reacción PCR se mezcla con 2 microlitros de solución reguladora de carga de la muestra de ácido nucleico [BioRad cat #161-0767]. Los 10 microlitros muestra se cargan sobre un gel al 1.5% de agarosa [GIBCO-BRL cat # 15510-027] que contiene 0.3 ug/ml de bromuro de etidio [Pierce cat #17898]. Estándares de peso molecular [100 bp de escalera de ADN de Invitrogen cat # 10380-012] se cargan en una senda adyacente. El ADN se separa por electroforesis en solución reguladora TAE (Tris-acetato 0.04 M, EDTA 0.01 M, ácido acético glacial 0.02M pH 8.4) [Roche cat #1666690]. Las condiciones de electroforesis son 120 voltios por 30-40 minutos. Después de la separación, el gel se expone a luz UV y una se toma una foto en un sistema de documentación AlphaImager2000.

Generalmente, dos bandas se detectan en el gel. La banda de migración más rápida corre delante del marcador 100 bp y representa los cebadores. El ADN que resulta de la amplificación de PCR del T1796A mutante específico tiene un tamaño previsto de 152 bp y migra entre el estándar de 100 bp y el estándar de 200 bp como se predice. El producto de amplificación PCR se confirma por secuenciación. La presencia del producto de amplificación PCR demuestra que la mutación T1796A está presente en el ADN plantilla. La ausencia del producto de amplificación PCR se evidencia que la mutación esta ausente en el tejido muestra.

ES 2 318 276 T3

Otras mutaciones B-RAF se detectan por este método utilizando el cebador de detección y el segundo cebador indicado para la mutación en las siguientes tablas:

SEQ ID NO:	Cebador de Detección segmento oligonucleotido(5'→3')	Mutación B-RAF
1	ACAGTGGGACAAAGAATTGA	G1388A
2	ACAGTGGGACAAAGAATTGT	G1388T
3	GGACAAAGAATTGGATCTGC	G1394C
4	GGACAAAGAATTGGATCTGA	G1394A
5	GGACAAAGAATTGGATCTGT	G1394T
6	ATTGGATCTGGATCATTGTC	G1403C
7	ATTGGATCTGGATCATTGA	G1403A
8	GAGTAATAATATATTCTTCATA	G1753A
9	CAGTAAAAATAGGTGATTTG	T1782G
10	CAGTAAAAATAGGTGATTTTC	G1783C
11	GTAAAAATAGGTGATTTTGGTG	C1786G
12	GTAAAAATAGGTGATTTTGGTCG	T1787G
13	GATTTTGGTCTAGCTACAGA	T1796A
14	GATTTTGGTCTAGCTACAGAT 97AT	TG1796-
15	TGTCACCACATTACATACTTACC	G1388A
16	TGTCACCACATTACATACTTACC	G1388T
17	TGTCACCACATTACATACTTACC	G1394C
18	TGTCACCACATTACATACTTACC	G1394A
19	TGTCACCACATTACATACTTACC	G1394T
20	TGTCACCACATTACATACTTACC	G1403C
21	TGTCACCACATTACATACTTACC	G1403A
22	GACTTTCTAGTAACTCAGCAG	G1753A
23	GACTTTCTAGTAACTCAGCAG	T1782G
24	GACTTTCTAGTAACTCAGCAG	G1783C
25	GACTTTCTAGTAACTCAGCAG	C1786G
26	GACTTTCTAGTAACTCAGCAG	T1787G
27	GACTTTCTAGTAACTCAGCAG	T1796A
28	GACTTTCTAGTAACTCAGCAG	TG1796-97AT

Estos ejemplos tienen por objeto describir con más detalle, esta invención.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citada por el aspirante es solamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de la patente Europea. Aún cuando se ha tenido gran cuidado en recopilar las referencias, los errores u omisiones no se pueden excluir y la EPO desconoce toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 20020010191 A [0005]
- WO 0158899 A [0005]

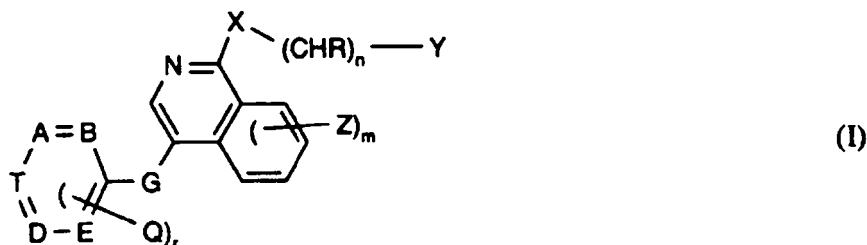
- WO 0123375 A [0006]

Literatura no-patente citada en la descripción

- **DAVIES**, H. *et al.* *Nature*, 2002, vol. 417, 949-954 [0004]
- J. F. W. **MCOMIE**. Protective Groups in Organic Chemistry. *Plenum Press*, 1973 [0084]
- TH. W. **GREENE**. Protective Groups in Organic Synthesis. *Wiley*, 1981 [0084]
- The Peptides. *Academic Press*, 1981, vol. 3 [0084]
- **HOUBEN WEYL**. Methoden der organischen Chemie. *Georg Thieme Verlag*, 1974, vol. 15/I [0084]
- H.-D. **JAKUBKE**; H. **JESCHEIT**. Aminosäuren, Peptide, Proteine. *Verlag Chemie*, 1982 [0084]
- **JOCHEN LEHMANN**. Chemie der Kohlenhydrate: Monosaccharide und Derivate. *Georg Thieme Verlag*, 1974 [0084]
- *Synth. Commun.*, 1995, vol. 25 (2), 4025-4028 [0094]
- *Tetrahedron Lett.*, 1993, vol. 34 (46), 7445-7446 [0094]
- *Synthetic Commun*, 1989, vol. 19 (5/6), 805-811 [0094]
- *Synthetic Commun*, 1989, vol. 19 (17), 3047-3050 [0094]
- *Tetrahedron Lett.*, 1989, vol. 25 (32), 3415-3418 [0094]
- *Bull. Chem. Soc. Belg.*, 1988, vol. 97 (1), 51-53 [0094]
- *Synth. Commun*, 1992, vol. 22, 3189-3195 [0094]
- *J. Org. Chem.*, 1996, vol. 61, 7240-7241 [0127]
- *Org. Synthesis, Coll.*, vol. 3, 174 [0130]
- *Org. Synthesis, Coll*, vol. 3, 174 [0136]

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de fórmula (I)



en donde

r es de 0 a 2;

n es de 0 a 2;

m es de 0 a 4;

A, B, D, E y T son cada uno independientemente de los otros N o CH, con la condición que al menos uno, pero no más de tres, de A, B, D, E y T sean N;

G es un alquileo C_1 a C_7 , $-\text{CH}_2\text{-O-}$, $-\text{CH}_2\text{-S-}$, $-\text{CH}_2\text{-NH-}$, $-\text{SO}_2\text{-}$, oxa ($-\text{O-}$), tia ($-\text{S-}$) o $-\text{NR-}$, o alquileo C_{1-7} sustituido por un aciloxi, oxo, halógeno o hidroxilo.

Q es un alquilo C_1 a C_7 , especialmente metilo;

R es un H o un alquilo C_1 a C_7 ;

X es Y, $-\text{N(R)-}$, oxa o tio; preferiblemente $-\text{NH-}$;

Y es un H, alquilo C_1 a C_7 no sustituido o sustituido, arilo, heteroarilo o cicloalquilo no sustituido o sustituido; y

Z es un amino, amino mono- o di-sustituido, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, hidroxilo, hidroxilo eterificado o esterificado, nitro, ciano, carboxi, carboxi esterificado, alcanilo, carbamoilo, N-mono- o N,N-di-carbamoilo sustituido, amidino, guanidino, mercapto, sulfo, feniltio, fenil-alquiltio C_1 a C_7 , alquilfeniltio, fenilsulfinil, fenil-alquilsulfinil C_1 a C_7 , alquilfenilsulfinil, fenilsulfonyl, fenil-alcanosulfonyl C_1 a C_7 o alquilfenilsulfonyl, y donde, si más de un radical Z está presente ($m \geq 2$), los sustituyentes Z son idénticos o diferentes;

o un N-óxido o una sal farmacéuticamente aceptable de estos para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad **caracterizada** por excesiva señalización a través de la ruta de señalización de la quinasa MAP, el Melanoma a condición que el compuesto de fórmula (I) no sea el compuesto en donde A, B, D, E, son CH, T es N, G es metileno, X es NH, Y es para $-\text{CL-fenil}$.

2. Un uso de acuerdo con la reivindicación 1 respectivamente en donde

r es de 0 a 2;

n es 0 o 1;

m es 0 o 1;

A, B, D y E son cada uno CH y T es N, o A, D y E son cada uno CH y B y T son N, o A, B, E y T son CH y D es N, o A, T, D y E son CH y B es N; particularmente en donde A, B, D y E son cada uno CH y T es N, o A, D y E son cada uno CH y B y T son N. G es alquileo C_1 a C_7 , $-\text{CH}_2\text{-NH-}$, $-\text{CH}_2\text{-O-}$, hidroximetileno o benzoiloxi-metileno;

Q es un metilo;

R es un H o un alquilo C_1 a C_7 ;

X es $-\text{NR-}$, oxa o tia;

Y es un fenil que es no sustituido o sustituido por uno o dos sustituyentes idénticos o diferentes seleccionados del grupo que consiste de amino; alcanoilamino C₁ a C₇; halógeno; alquilo C₁ a C₇ no sustituido o sustituido; hidroxil; alcoxi C₁ a C₇; fenil-alcoxi C₁ a C₇; ciano, alquenil C₁ a C₇, alcoxi C₈-C₁₂, alcoxycarbonil C₁ a C₇, carbamoil, alquil-carbamoil C₁ a C₇, alcanoil C₁ a C₇, feniloxi, halo-alquiloxi C₁ a C₇, alcoxycarbonil C₁ a C₇, alquilmercapto C₁ a C₇, halo-alquilmercapto C₁ a C₇, hidroxil-alquilo C₁ a C₇, alcanosulfonil C₁ a C₇, halo-alcanosulfonil C₁ a C₇, fenilsulfonil y alquilenodioxo C₁ a C₇ unidos a dos átomos de carbono adyacentes o en donde las dos posiciones adyacentes se sustituyen por un alquilenilo o alquenilenilo para formar un anillo de 5 a 7 miembros que se fusiona con el anillo fenilo;

Z es un amino; N-alquilamino C₁ a C₇; hidroxil-alquilamino C₁ a C₇; fenil-alquilamino C₁ a C₇; N,N-di-alquilamino C₁ a C₇; N-fenil-alquilo C₁ a C₇ -N-alquilamino C₁ a C₇; N,N-di-alquilfenilamino C₁ a C₇; alcanoilamino C₁ a C₇; benzoilamino y fenil-alcoxycarbonilamino C₁ a C₇, en donde el radical fenilo en cada caso es no sustituido o sustituido por un nitro, amino, halógeno, amino, N-alquilamino C₁ a C₇, N,N-di-alquilamino C₁ a C₇, hidroxil, ciano, carboxil, alcoxycarbonil C₁ a C₇, alcanoil C₁ a C₇, carbamoil, 2-hidroxietilamino, benziloxycarbonilamino o bromo.

3. Un uso de acuerdo con la reivindicación 1 respectivamente en donde

r es 0;

n es 0;

m es 0;

B, D, E y T son CH y A es N o A, B, D y E son cada uno CH y T es N;

G es un alquilenilo C₁₋₇;

X es -NH-;

Y es un fenil que es no sustituido o sustituido por uno o dos sustituyentes idénticos o diferentes, seleccionados del grupo que consiste de halógeno y alquilo C₁ a C₇.

4. Un uso de acuerdo con la reivindicación 1 respectivamente en donde

r es 0;

n es de 0 a 2;

m es 0;

A, B, D y E son cada uno CH y T es N;

G es un metileno;

R es un H;

X es -NR; y

Y es un fenil que es no sustituido o sustituido por un halógeno, alquilo C₁ a C₇, alcoxi C₁ a C₇ o ciclohexil que es no sustituido o sustituido por un alquilo C₁ a C₇.

5. Un uso de acuerdo con la reivindicación 1 respectivamente en donde

r es 0;

n es 0;

m es 0;

A, B, D y E son cada uno CH y T es N;

G es un metileno;

X -NH-; y

Y es un fenil que es sustituido por uno o dos sustituyentes idénticos o diferentes seleccionados del halógeno y alquilo C₁ a C₇.

ES 2 318 276 T3

6. Un uso de acuerdo con la reivindicación 5 en donde Y es un fenil que es sustituido en la posición-4 por un t-butil.

7. Un uso de acuerdo con la reivindicación 5 en donde Y es un fenil que es sustituido en la posición-4 por un trifluorometil.

8. Uso de un compuesto de la reivindicación 1 en donde el melanoma expresa una quinasa RAF mutante o sobre expresa una quinasa RAF de tipo salvaje.

9. Un uso de acuerdo con la reivindicación 8 respectivamente en donde

r es de 0 a 2;

n es 0 o 1;

m es 0 o 1;

A, B, D y E son cada uno CH y T es N, o A, D y E son cada uno CH y B y T son N, o A, B, E y T son CH y D es N, o A, T, D y E son CH y B es N; particularmente en donde A, B, D y E son cada uno CH y T es N, o A, D y E son cada uno CH y B y T son N.

G es un alquilenos C₁ a C₇, -CH₂-NH-, -CH₂-O-, hidroximetileno o benzoiloxi-metileno;

Q es un metilo;

R es un H o alquilo C₁ a C₇;

X es -NR-, oxa o tia;

Y es un fenil que es no sustituido o sustituido por uno o dos sustituyentes idénticos o diferentes seleccionados del grupo que consiste de amino; alcanoilamino C₁ a C₇; halógeno; alquilo C₁ a C₇ no sustituido o sustituido; hidroxil; alcoxi C₁ a C₇; fenil-alcoxi C₁ a C₇; ciano, alquenal C₁ a C₇, alcoxi C₈-C₁₂, alcóxycarbonil C₁ a C₇, carbamoil, alquil-carbamoil C₁ a C₇, alcanoil C₁ a C₇, feniloxil, halo-alquilo C₁ a C₇, alcóxycarbonil C₁ a C₇, alquilmercapto C₁ a C₇, halo-alquilmercapto C₁ a C₇, hidroxil-alquilo C₁ a C₇, alcanosulfonil C₁ a C₇, halo-alcanosulfonil C₁ a C₇, fenilsulfonil y alquilenodioxil C₁ a C₇ unidos a dos átomos de carbono adyacentes o en donde dos posiciones adyacentes se sustituyen por un alquilenos o alquilenos para formar un anillo de 5 a 7 miembros que se fusiona al anillo fenilo;

Z es un amino; N-alquilamino C₁ a C₇; hidroxil-alquilamino C₁ a C₇; fenil-alquilamino C₁ a C₇; N,N-di-alquilamino C₁ a C₇; N-fenil-alquilo C₁ a C₇-N-alquilamino C₁ a C₇; N,N-di-alquilfenilamino C₁ a C₇; alcanoilamino C₁ a C₇; benzoilamino y fenil-alcóxycarbonilamino C₁ a C₇, en donde el radical fenilo en cada caso es no sustituido o sustituido por un nitro, amino, halógeno, amino, N-alquilamino C₁ a C₇, N,N-di-alquilamino C₁ a C₇, hidroxil, ciano, carboxil, alcóxycarbonil C₁ a C₇, alcanoil C₁ a C₇, carbamoil, 2-hidroxietilamino, benziloxycarbonilamino o bromo.

10. Un uso de acuerdo con la reivindicación 8 respectivamente en donde

r es 0;

n es 0;

m es 0;

B, D, E y T son CH y A es N o A, B, D y E son cada uno CH y T es N;

G es un alquilenos C₁ a C₇;

X es -NH-;

Y es un fenil que es no sustituido o sustituido por uno o dos sustituyentes idénticos o diferentes seleccionados del grupo que consiste de halógeno y alquilo C₁ a C₇.

11. Un uso de acuerdo con la reivindicación 8 respectivamente en donde

r es 0;

n es de 0 a 2;

m es 0;

ES 2 318 276 T3

A, B, D y E son cada uno CH y T es N;

G es un metileno;

5 R es un H;

X es -NR; y

10 Y es un fenil que es no sustituido o sustituido por un halógeno, alquilo C₁ a C₇, alcoxi C₁ a C₇ o ciclohexil que es no sustituido o sustituido por un alquilo inferior.

12. Un uso de acuerdo con la reivindicación 8 respectivamente en donde

15 r es 0;

n es 0;

m es 0;

20 A, B, D y E son cada uno CH y T es N;

G es un metileno;

25 X -NH-; y

Y es un fenil que es sustituido por uno o dos sustituyentes idénticos o diferentes seleccionados de un halógeno y un alquilo C₁ a C₇.

30 13. Un uso de acuerdo con la reivindicación 12 en donde Y es un fenil que es sustituido en la posición-4 por un t-butil.

14. Un uso de acuerdo con la reivindicación 8 respectivamente en donde el melanoma expresa una quinasa RAF mutante.

35 15. Un uso de acuerdo con la reivindicación 14 en donde la quinasa RAF mutante corresponde a una mutación en el gen quinasa B-RAF seleccionado de G1388A, G1388T, G1394C, G1394A, G1394T, G1403C, G1403A, G1753A, T1782G, G1783C, C1786G, T1787G, T1796A y TG1796-97AT.

40 16. Un uso de acuerdo con la reivindicación 13 donde el melanoma expresa una quinasa RAF mutante.

17. Un uso de acuerdo con la reivindicación 16 en donde la quinasa RAF mutante es una mutación V599E.

45

50

55

60

65

ES 2 318 276 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Novartis AG	
5	<120> Método del tratamiento	
	<130> 4-32905A	
	<160> 28	
	<170> PatentIn version 3.2	
10	<210> 1	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 1	
	acagtgggac aaagaattga	20
20	<210> 2	
	<211> 20	
	<212> ADN	
25	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 2	
30	acagtgggac aaagaattgt	20
	<210> 3	
	<211> 20	
35	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 3	
	ggacaaagaa ttggatctgc	20
45	<210> 4	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<400> 4	
	ggacaaagaa ttggatctga	20
55	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> ADN	
60	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 5	
65	ggacaaagaa ttggatctgt	20
	<210> 6	

ES 2 318 276 T3

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
5	<400> 6	
	attggatctg gatcatttgc	20
10	<210> 7	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 7	
20	attggatctg gatcatttga	20
	<210> 8	
	<211> 23	
25	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 8	
30	gagtaataat atattcttc ata	23
	<210> 9	
35	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 9	
	cagtaaaaat aggtgatttg	20
45	<210> 10	
	<211> 21	
	<212> ADN	
50	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 10	
55	cagtaaaaat aggtgatttt c	21
	<210> 11	
	<211> 22	
60	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 11	
65	gtaaaaatag gtgattttgg tg	22
	<210> 12	

ES 2 318 276 T3

	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
5	<400> 12	
	gtaaaaatag gtgatttgg tcg	23
10	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 13	
20	gattttggtc tagctacaga	20
	<210> 14	
	<211> 21	
25	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 14	
30	gattttggtc tagctacaga t	21
	<210> 15	
35	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 15	
	tgtcaccaca ttacatactt acc	23
45	<210> 16	
	<211> 23	
	<212> ADN	
50	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 16	
	tgtcaccaca ttacatactt acc	23
55	<210> 17	
	<211> 23	
	<212> ADN	
60	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 17	
65	tgtcaccaca ttacatactt acc	23
	<210> 18	

ES 2 318 276 T3

	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
5	<400> 18	
	tgccaccaca ttacatactt acc	23
10	<210> 19	
	<211> 23	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 19	
20	tgccaccaca ttacatactt acc	23
	<210> 20	
	<211> 23	
25	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 20	
30	tgccaccaca ttacatactt acc	23
	<210> 21	
35	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 21	
	tgccaccaca ttacatactt acc	23
45	<210> 22	
	<211> 21	
	<212> ADN	
50	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 22	
55	gactttctag taactcagca g	21
	<210> 23	
	<211> 21	
60	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 23	
65	gactttctag taactcagca g	21
	<210> 24	

ES 2 318 276 T3

	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
5	<400> 24	
	gactttctag taactcagca g	21
10	<210> 25	
	<211> 21	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 25	
20	gactttctag taactcagca g	21
	<210> 26	
	<211> 21	
25	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 26	
30	gactttctag taactcagca g	21
	<210> 27	
35	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 27	
	gactttctag taactcagca g	21
45	<210> 28	
	<211> 21	
	<212> ADN	
50	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 28	
55	gactttctag taactcagca g	21
60		
65		