



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 348 099**

51 Int. Cl.:

C07D 209/34 (2006.01) **A61K 31/404** (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01) **A61P 11/06** (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01) **A61P 19/02** (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) **A61P 29/00** (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06753563 .3**

96 Fecha de presentación : **11.05.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1891008**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.02.2008**

54 Título: **Oxindoles como inhibidores de cinasa.**

30 Prioridad: **10.06.2005 EP 05012559**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.11.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.11.2010

73 Titular/es: **Merck Patent GmbH**
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE

72 Inventor/es: **Sirrenberg, Christian;**
Kordowicz, Maria;
Zenke, Frank;
Greiner, Hartmut;
Brüge, David y
Burgdorf, Lars, Thore

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

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).

OXINDOLES COMO INHIBIDORES DE CINASA**DESCRIPCIÓN****Campo de la invención**

5

La presente invención se refiere a los oxindoles, su uso como activadores o inhibidores de proteína cinasas, un método para su fabricación, su uso para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades y su uso para la fabricación de una composición farmacéutica.

10

Antecedentes de la invención

15

Las proteína cinasas están implicadas en las rutas de señalización para actividades celulares tan importantes como las respuestas a señales extracelulares y los puntos de regulación del ciclo celular. La inhibición o activación de proteína cinasas específicas proporciona un medio de intervención en estas rutas de señalización, por ejemplo, para bloquear el efecto de una señal extracelular, para liberar a una célula del punto de regulación del ciclo celular, etc. Los defectos en la actividad de las proteína cinasas se asocian con diversas afecciones patológicas o clínicas, en las que existe un defecto en la señalización mediada por dichas proteína cinasas. Entre estas afecciones se incluyen aquellas asociadas con defectos en la regulación del ciclo celular o en la respuesta a señales extracelulares, como trastornos inmunológicos, enfermedades autoinmunes e inmunodeficiencias; trastornos hiperproliferativos, que pueden ser psoriasis, artritis, inflamación, endometriosis, deformidad cicatricial, cáncer, etc.

20

25

30

La activación aberrante de la ruta de señalización de Ras-Raf-MAP cinasa contribuye al proceso de oncogénesis, es decir, la conversión de una célula normal en una célula maligna. Se han dilucidado muchos detalles moleculares, cómo el módulo de señalización de la MAPK inicia la proliferación o

inhibe la respuesta apoptótica, explicando así cómo se puede alterar el equilibrio homeostático entre la proliferación y la muerte celular. MKK1 y MKK2, también conocidas como MEK1 y MEK2, representan un elemento clave en esta cascada de señalización. Las MEK son activadas mediante la fosforilación por la cinasa Raf que, a su vez, fosforila y activa sus sustratos auténticos ERK1 y ERK2. Las mutaciones oncogénicas de Ras, las mutaciones en la cinasa efectora B-Raf e incluso la sobreexpresión y mutación de factores de crecimiento pueden llevar a una activación persistente de la ruta de MAPK, justificando el potencial de los inhibidores de dicha ruta a nivel de Raf, MEK o ERK como agentes terapéuticos antioncogénicos prometedores.

Por tanto, se pueden usar compuestos que son activos en la modulación de proteína cinasas purificadas, por ejemplo, la modulación de la fosforilación de un sustrato específico en presencia del compuesto, para el tratamiento de enfermedades y afecciones dependientes de proteína cinasas, como cáncer, crecimiento tumoral, arterosclerosis, degeneración macular asociada a la edad, retinopatía diabética, enfermedades inflamatorias y similares, en mamíferos.

Los amino-oxindoles se conocen a partir de los documentos WO9952869, WO9962882, WO04026829, WO04009546, WO04009547, EP104860, US4145422, WO03027102 y WO0149287. La 3-(1-amino-2-fenil-etiliden)-1-metil-1,3-dihidro-indol-2-ona se conoce a partir de Wenkert, E. y col., J. Am. Chem. Soc. (1958), 80, 4899-4903 y la 3-(amino-fenil-metilen)-1,3-dihidro-indol-2-ona se conoce a partir de Stauss, U. y col., Helv. Chim. Acta (1972), 55(3), 771-780.

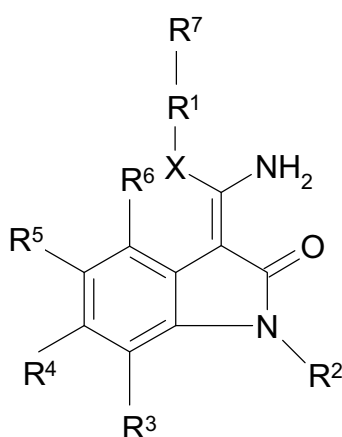
Se conocen compuestos descritos como posibles inhibidores de MEK a partir, por ejemplo, de los documentos WO03062191, WO04056789, WO03077914, WO03077855, WO04041811 y WO04048386.

De este modo, puesto que sigue existiendo una necesidad de agentes terapéuticos ventajosos, un objeto preferido de la presente invención era proporcionar nuevos compuestos farmacéuticamente activos. Un objetivo particularmente preferido de la presente invención era proporcionar moduladores eficaces de una o más proteína cinasas, especialmente seleccionadas a partir del grupo compuesto por Raf, MEK, PKB, Tie2, PDGFR, Met, SGK1, IGF1R y VEGFR.

10 Breve descripción de la invención

Sorprendentemente, los compuestos con fórmula general I muestran actividades farmacéuticas ya que actúan como moduladores eficaces (activadores o inhibidores) de una o más proteína cinasas seleccionadas entre el grupo compuesto por Raf, MEK, PKB, Tie2, PDGFR, Met, SGK1, IGF1 R y VEGFR.

Por tanto, una realización de la presente invención son compuestos de fórmula I, Compuesto de fórmula I,



donde

X es $(CH_2)_p$,
 p es 0 – 5,
 R¹ es Ar o Het,

R^2, R^3, R^4, R^6, R^7 son H,

R^5 es Hal,

Ar es arilo,

Het es heteroarilo,

5 y las sales, solvatos y estereoisómeros de los mismos fisiológicamente aceptables, incluyendo mezclas de los mismos en todas las proporciones.

Una realización especialmente preferida de la presente invención son compuestos según la fórmula I, seleccionados entre el grupo compuesto por

10 a) 3-(amino-fenil-metilen)-5-cloro-1,3-dihidro-indol-2-ona,

b) 3-(amino-fenil-metilen)-5-bromo-1,3-dihidro-indol-2-ona

y las sales, derivados, profármacos, solvatos y estereoisómeros de los mismos fisiológicamente aceptables, incluyendo mezclas de los mismos en todas las proporciones.

15

Las sales adecuadas y las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos según la invención son sales convencionales no tóxicas que incluyen sales de adición de ácido como sales de ácidos orgánicos (p. ej., acetato, trifluoroacetato, maleato, tartrato, metanosulfonato, bencenosulfonato, 20 formato y toluenosulfonato), sales de ácidos inorgánicos (p. ej., hidrocloreuro, hidrobromuro, hidroyoduro, sulfato, nitrato y fosfato), sales con un aminoácido (p. ej., arginina, ácido aspártico y ácido glutámico) o sales de metales como sales de metales alcalinos (p. ej., sal sódica y sal de potasio) y sales de metales alcalinotérreos (p. ej., sal de calcio, sal de magnesio), sales de 25 amonio o sales de bases orgánicas (p. ej., sal de trimetilamina, sal de trietilamina, sal de piridina, sal de metilpiridina, sal de dicitclohexilamina y sal de N,N'-dibenciletilendiamina).

30

El término «derivados farmacéuticamente utilizables» o «derivados farmacéuticamente aceptables» se considera que significa, por ejemplo, las sales de los compuestos según la invención y compuestos profármacos así denominados. El término se refiere a cualquier derivado farmacéuticamente

aceptable de un compuesto de la presente invención, por ejemplo, un éster o una amida que, tras su administración a un mamífero, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto de la presente invención o un metabolito activo del mismo. Dichos derivados son evidentes para los expertos en la material, sin excesiva experimentación, y con referencia a las enseñanzas de Burger's Medicinal Chemistry And Drug Discovery, 5^a edición, Vol. 1: Principles and Practice, que se incorpora en este documento por referencia al grado en que muestra los derivados fisiológicamente funcionales.

10

El término «derivados profármacos» se considera que significa, por ejemplo, compuestos de la presente invención que han sido modificados, por ejemplo, con grupos alquilo o acilo, azúcares u oligopéptidos y que son rápidamente escindidos en el organismo, liberando así principios activos según la invención. Estos también incluyen derivados de polímeros biodegradables de los compuestos según la invención, como se describe, por ejemplo, en Int. J. Pharm. 115, 61-67 (1995).

15

La invención también se refiere a mezclas de los compuestos según la invención, por ejemplo, mezclas de dos diastereoisómeros, por ejemplo, en la proporción 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:100 o 1:1000. Estas son mezclas particularmente preferibles de compuestos estereoisoméricos.

20

Adicionalmente, la invención comprende las formas poliméricas de los compuestos según la invención, por ejemplo, las formas amórficas y polimórficas cristalinas.

25

Según se usa en este documento, el término «solvato» se refiere preferiblemente a un complejo de estequiometría variable formado por un soluto y un solvente. El término solvatos de los compuestos se considera, por tanto, que significa aducciones de moléculas inertes de solvente sobre los compuestos, que se forman debido a sus fuerzas mutuas de atracción. Dichos solventes,

30

para el propósito de la invención, pueden no interferir con la actividad biológica del soluto. Preferiblemente, el solvente usado es un solvente farmacéuticamente aceptable. Entre los ejemplos de solventes idóneos farmacéuticamente aceptables se incluyen, sin limitación, agua, etanol y ácido acético.

5 Más preferiblemente el solvente usado es agua. Los solvatos son, por ejemplo, monohidratos, dihidratos o alcoholatos.

Algunos de los compuestos descritos en este documento pueden contener uno o más átomos quirales o, por el contrario, pueden ser capaces de existir

10 como dos o más estereoisómeros, que normalmente son enantiómeros y/o diastereoisómeros. En consecuencia, los compuestos de esta invención son mezclas de estereoisómeros, especialmente mezclas de enantiómeros, así como estereoisómeros purificados, especialmente enantiómeros purificados, o mezclas enriquecidas estereoisoméricamente, especialmente mezclas

15 enriquecidas enantioméricamente. También se incluye dentro del alcance de la invención los isómeros individuales de los compuestos de la presente invención, así como cualquier mezcla parcial o completamente equilibrada de los mismos. La presente invención también cubre los isómeros individuales de los compuestos representados por las fórmulas anteriores como mez-

20 clas con isómeros de los mismos, en los que uno o más centros quirales están invertidos. Además, se entiende que todos los tautómeros y mezclas de tautómeros de los compuestos de la presente invención se incluyen dentro del alcance de los compuestos de la presente invención y, preferiblemente, las fórmulas y subfórmulas correspondientes a ellos.

25 Los racematos obtenidos se pueden resolver en isómeros mecánica o químicamente mediante métodos conocidos *per se*. Los diastereoisómeros se forman preferiblemente a partir de la mezcla racémica mediante la reacción con un agente de resolución ópticamente activo. Ejemplos de agentes de

30 resolución adecuados son ácidos ópticamente activos, como las formas D y L del ácido tartárico, ácido diacetiltartárico, ácido dibenzoiltartárico, ácido mandélico, ácido málico, ácido láctico o los diversos ácidos canforsulfónicos

5 ópticamente activos, como el ácido β -canforsulfónico. También es ventajosa la resolución de enantiómeros con la ayuda de una columna cargada con un agente de resolución ópticamente activo (p. ej., dinitrobenzoilfenilglicina); un ejemplo de eluyente idóneo es una mezcla de hexano/isopropanol/acetonitrilo.

10 La resolución por diastereoisómeros también se puede realizar mediante procesos de purificación convencionales, como por ejemplo, cromatografía o cristalización fraccionada.

También es posible, por supuesto, obtener compuestos ópticamente activos de la presente invención mediante los métodos descritos anteriormente usando materias primas que ya son ópticamente activas.

15 A menos que se indique lo contrario, se debe entender que la referencia a los compuestos de la presente invención incluye preferiblemente la referencia a las subfórmulas correspondientes a ellos. También se entiende que las siguientes realizaciones, que incluyen usos y composiciones, aunque relacionados con respecto a los compuestos de la presente invención, también son
20 preferiblemente aplicables a subfórmulas.

Según se usa en este documento, los términos «grupo», «resto» y «radical» o «grupos», «restos» y «radicales» se usan normalmente como sinónimos, respectivamente, según la práctica común en la técnica.

25 Según se usa en este documento, el término «opcionalmente» significa que el acontecimiento (o acontecimientos) descrito posteriormente puede o no ocurrir, e incluye tanto los acontecimientos que se producen como los acontecimientos que no se producen.

30 Según se usa en este documento, el término «sustituido» se refiere preferiblemente a la sustitución con el sustituyente o sustituyentes mencionados,

permitiéndose múltiples grados de sustitución, a menos que se indique lo contrario.

5 Son sujeto de la presente invención, especialmente, compuestos de la presente invención en los que uno o más sustituyentes o grupos, preferiblemente la parte principal de los sustituyentes o grupos, tienen un significado que se indica como preferido, más preferido, incluso más preferido o especialmente preferido.

10 Según se usa en este documento, el término «halógeno» o «hal» se refiere preferiblemente a flúor (F), cloro (Cl), bromo (Br) o yodo (I).

Según se usa en este documento, el término «A» o «alquilo» se refiere preferiblemente a una cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que tiene de
15 uno a doce átomos de carbono, en la que opcionalmente se sustituyen de 1 a 5 átomos de H por F y/o Cl, permitiéndose múltiples grados de sustitución. Ejemplos de «alquilo» como se usa en este documento incluyen, aunque sin limitaciones, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, t-butilo, n-pentilo, isopentilo y similares.

20 Según se usa en este documento, el término «cicloalquilo» se refiere preferiblemente a un sistema de anillo cíclico de hidrocarburo no aromático, con uno o más anillos unidos entre sí, teniendo cada anillo preferiblemente entre tres y siete átomos de carbono, que opcionalmente incluye un enlazador
25 alquilo, preferiblemente un enlazador alquilo C₁₋₆, a través del cual se puede unir. Opcionalmente, en el «cicloalquilo» se sustituyen de 1 a 5 átomos de H por F y/o Cl, permitiéndose múltiples grados de sustitución. El alquilo o el grupo alquilo C₁₋₆ es como se define anteriormente. Como ejemplo, los grupos «cicloalquilo» incluyen, aunque sin limitaciones, ciclopropilo, ciclobutilo,
30 ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo.

Según se usa en este documento, el término «Ar» o «arilo» se refiere preferiblemente a un anillo benceno o un sistema de anillo de benceno, que está opcionalmente sustituido por A, Ar, OR⁸, SR⁸, OAr, SAr, N(R⁸)₂, NHar, NAr₂, Hal, NO₂, CN, COR⁸, COAr, S(O)_mA, S(O)_mAr, NHCOA, NHCOAr, NHSO₂A, NHSO₂Ar, SO₂N(R⁸)₂, O(CH₂)_nN(R⁸)₂, O(CH₂)_nNHR⁸, O(CH₂)_n-morfolino, O(CH₂)_n-piperazina, O(CH₂)_n-pirrolidina, O(CH₂)_n-piperidina, O-piperidina, O(CH₂)_n-oxopiperazina, O(CH₂)_n-oxomorfolino, O(CH₂)_n-oxopirrolidina, O(CH₂)_nC(CH₃)₂(CH₂)_nN(R⁸)₂, N(CH₂)_nC(CH₃)₂(CH₂)_nN(R⁸)₂, O(CH₂)_nN(R⁸)SO_mA, O(CH₂)_nN(R⁸)SO_mAr, O(CH₂)_nN(R⁸)SO_mN(R⁸)₂A, (CH₂)_nN(R⁸)SO_mA, (CH₂)_nN(R⁸)SO_mAr, (CH₂)_nN(R⁸)SO_mN(R⁸)₂A, O(CH₂)_nSO_mA, O(CH₂)_nSO_mAr, O(CH₂)_nSO_mN(R⁸)A, (CH₂)_nSO_mA, (CH₂)_nSO_mAr, (CH₂)_nSO_mN(R⁸)A y similares, permitiéndose múltiples grados de sustitución. Entre los ejemplos de grupos «arilo» se incluyen, pero sin limitaciones, fenilo, 2-naftilo, 1-naftilo, bifenilo, antracilo y fenantracilo, así como derivados sustituidos de los mismos.

Según se usa en este documento, el término «Het» o el término «heteroarilo» se refiere preferiblemente a un anillo aromático monocíclico de cinco a siete átomos, o a un sistema de anillo aromático bicíclico fusionado que comprende dos de estos anillos aromáticos de cinco a siete átomos. Estos anillos heteroarilos contienen uno o más heteroátomos de nitrógeno, azufre y/u oxígeno, donde N-óxidos, S-óxidos y dióxidos son sustituciones con heteroátomos admisibles y pueden sustituirse opcionalmente por uno o más sustituyentes, seleccionados entre el grupo compuesto por A, Ar, OR⁸, SR⁸, OAr, SAr, N(R⁸)₂, NHar, NAr₂, Hal, NO₂, CN, COR⁸, COAr, S(O)_mA, S(O)_mAr, NHCOA, NHCOAr, NHSO₂A, NHSO₂Ar, SO₂N(R⁸)₂, O(CH₂)_nN(R⁸)₂, O(CH₂)_nNHR⁸, O(CH₂)_n-morfolino, O(CH₂)_n-piperazina, O(CH₂)_n-pirrolidina, O(CH₂)_n-piperidina, O-piperidina, O(CH₂)_n-oxopiperazina, O(CH₂)_n-oxomorfolina, O(CH₂)_n-oxopirrolidina, O(CH₂)_nC(CH₃)₂(CH₂)_nN(R⁸)₂, N(CH₂)_nC(CH₃)₂(CH₂)_nN(R⁸)₂, O(CH₂)_nN(R⁸)SO_mA, O(CH₂)_nN(R⁸)SO_mAr, O(CH₂)_nN(R⁸)SO_mN(R⁸)₂A, (CH₂)_nN(R⁸)SO_mA, (CH₂)_nN(R⁸)SO_mAr, (CH₂)_nN(R⁸)SO_mN(R⁸)₂A, O(CH₂)_nSO_mA, O(CH₂)_nSO_mAr,

O(CH₂)_nSO_mN(R⁸)A, (CH₂)_nSO_mA, (CH₂)_nSO_mAr, (CH₂)_nSO_mN(R⁸)A y similares. Entre los ejemplos de restos «heteroarilo» se incluyen, aunque sin limitaciones, furanilo, tiofenilo, piranilo, pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, tiazolilo, piridinilo, pirazinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, triazolilo, tetrazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, oxadiazolilo, oxopiridilo, tiadiazolilo, isotiazolilo, piridazilo, pirimidinilo, benzofuranilo, benzotiofenilo, indolilo, indazolilo y similares.

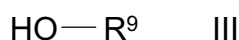
La nomenclatura utilizada en este documento para definir los compuestos, especialmente los compuestos según la invención, en general se basa en las normas de la organización IUPAC para compuestos químicos y, especialmente, para compuestos orgánicos.

Una realización adicional preferida de la presente invención es un método para la fabricación de un compuesto según la fórmula I, caracterizada porque

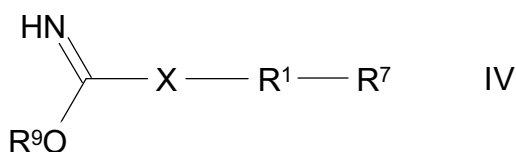
a) un nitrato aromático o heteroaromático según la fórmula II,



donde R¹, R⁷ y X son como se define anteriormente, reacciona con un alcohol de cadena lineal o ramificada según la fórmula III,

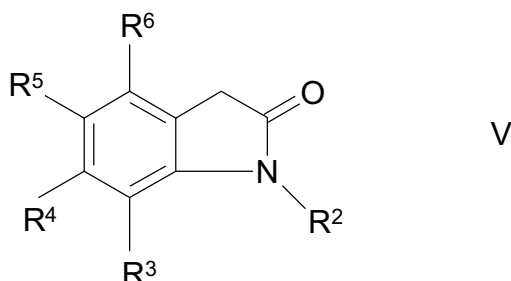


donde R⁹ es (CH₂)_q y q es 1 – 10, y que el producto según la fórmula IV,



donde R^1 , R^7 , R^9 y X son como se define anteriormente, reacciona a continuación con un compuesto según la fórmula V,

5



10

donde R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 son como se define anteriormente, o

b) un compuesto de fórmula I se aísla y/o trata con un ácido o una base, para obtener la sal del mismo.

15

También puede obtenerse una sal fisiológicamente aceptable de un compuesto según la fórmula I aislando y/o tratando el compuesto de fórmula I obtenido mediante la reacción descrita con un ácido o una base.

20

Para una descripción más detallada de los procesos de fabricación, véase también el ejemplo 1 y la descripción general que aparece a continuación de las condiciones preferidas.

25

Todos los productos sin procesar se sometieron a cromatografía convencional usando mezclas de solventes que contenían metanol, etanol, isopropanol, n-hexano, ciclohexano, etilacetato, diclorometano o éter de petróleo, respectivamente.

30

Los compuestos de fórmula I y también las materias primas para su preparación se preparan mediante procedimientos como los descritos en los ejemplos o mediante procedimientos conocidos *per se*, como se describe en la literatura (por ejemplo, en trabajos convencionales, como Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie [Métodos de química orgánica], Georg

Thieme Verlag, Stuttgart; Organic Reactions, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York), para ser precisos en las condiciones de reacción que son conocidas y adecuadas para dichas reacciones. También puede hacerse uso aquí de variantes que sean conocidas *per se*, aunque estas no se mencionan con mayor detalle.

Las materias primas para el proceso reivindicado también pueden obtenerse, si se desea, *in situ* sin necesidad de aislarlas de la mezcla de reacción, sino en su lugar, convertirlas inmediatamente después en los compuestos de fórmula I. Por otro lado, es posible realizar la reacción por etapas.

Preferiblemente, la reacción de los compuestos tiene lugar en presencia de un solvente idóneo, que preferiblemente es inerte en las condiciones respectivas de reacción. Son ejemplos de solventes idóneos hidrocarburos, como hexano, éter de petróleo, benceno, tolueno o xileno; hidrocarburos clorados, como tricloroetileno, 1,2-dicloroetano, tetraclorometano, cloroformo o diclorometano; alcoholes, como metanol, etanol, isopropanol, n-propanol, n-butanol o tert-butanol; éteres, como éter dietílico, éter diisopropílico, tetrahydrofurano (THF) o dioxano; éteres de glicol, como éter monometílico o monoetilico de etilenglicol o éter dimetílico de etilenglicol (diglima); cetonas, como acetona o butanona; aminas, como trietilamina; amidas, como acetamida, dimetilacetamida, dimetilformamida (DMF) o N-metilpirrolidinona (NMP); nitrilos, como acetonitrilo; sulfóxidos, como dimetilsulfóxido (DMSO); compuestos nitrogenados, como nitrometano o nitrobenceno; ésteres, como acetato de etilo, o mezclas de dichos solventes o con agua. En general, se prefieren los solventes polares. Ejemplos de solventes polares idóneos son hidrocarburos clorados, alcoholes, éteres de glicol, nitrilos, amidas y sulfóxidos o mezclas de los mismos. Son más preferidos 1,4-dioxano, 1-butanol y trietilamina.

Según lo establecido anteriormente, la temperatura de reacción está entre aproximadamente -100°C y 300°C, más preferiblemente entre 0 y 250°C,

incluyendo preferiblemente la irradiación en un microondas, dependiendo de la etapa de la reacción y las condiciones empleadas.

5 Los tiempos de reacción están, generalmente, dentro del intervalo de unos minutos a varios días, dependiendo de la reactividad de los respectivos compuestos y de las respectivas condiciones de reacción. Los tiempos de reacción idóneos se determinan fácilmente mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, monitorizando la reacción. En función de las temperaturas de reacción proporcionadas anteriormente, los tiempos de reacción
10 idóneos generalmente están dentro del intervalo comprendido entre 10 min y 48 horas.

Una base de formula I puede convertirse en la sal de adición de ácido asociada usando un ácido, por ejemplo, mediante la reacción de cantidades
15 equivalentes de la base y el ácido en, preferiblemente, un solvente inerte como etanol, seguido de evaporación. Los ácidos idóneos para esta reacción son, en particular, aquellos que proporcionan sales fisiológicamente aceptables. Por tanto, es posible utilizar ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido sulfúrico, ácido sulfuroso, ácido ditiónico, ácido nítrico, ácidos hidrácidos,
20 como ácido clorhídrico o ácido bromhídrico; ácidos fosfóricos, como por ejemplo, ácido ortofosfórico, ácido sulfámico; otros ácidos orgánicos, en particular, ácidos alifáticos, alicíclicos, aralifáticos, aromáticos o carboxílicos heterocíclicos monobásicos o polibásicos, sulfónico o sulfúrico, por ejemplo, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido octa-
25 noico, ácido decanoico, ácido hexadecanoico, ácido octadecanoico, ácido piválico, ácido dietilacético, ácido malónico, ácido succínico, ácido pimélico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido málico, ácido cítrico, ácido glucónico, ácido ascórbico, ácido nicotínico, ácido isonicotínico, ácido metano o etanosulfónico, ácido etanodisulfónico, ácido 2-
30 hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido trimetoxibenzoico, ácido adamantanocarboxílico, ácido p-toluensulfónico, ácido glicólico, ácido embónico, ácido clorofenoxiacético, ácido aspártico, ácido glutámico, prolina,

ácido glioxílico, ácido palmítico, ácido paraclorofenoxiisobutírico, ácido ciclohexanocarboxílico, glucosa 1-fosfato, ácidos naftalenmono y disulfónicos o ácido laurilsulfúrico.

- 5 Pueden usarse sales con ácidos fisiológicamente inaceptables, por ejemplo picratos, para aislar y/o purificar los compuestos de fórmula I.

- Por otro lado, los compuestos de fórmula I pueden convertirse en las correspondientes sales metálicas, en especial, en sales de metales alcalinos o
10 alcalinotérreos, o en las correspondientes sales de amonio, usando bases (por ejemplo, hidróxido sódico, hidróxido potásico, carbonato sódico o carbonato potásico). Las sales idóneas son además sales de amonio sustituidas, por ejemplo, las sales dimetil, dietil y diisopropilamonio, sales monoetanol, dietanol y diisopropanolamonio, ciclohexil y dicitclohexilamonio, sales
15 dibenciletilendiamonio, además, por ejemplo, de sales con arginina o lisina.

- Si se desea, las bases libres de fórmula I pueden liberarse de sus sales mediante tratamiento con bases fuertes, como hidróxido sódico, hidróxido potásico, carbonato sódico o carbonato potásico, siempre que la molécula no
20 presente otros grupos ácidos. En los casos en que los compuestos de fórmula I tengan grupos ácidos libres, la formación de sales puede conseguirse, asimismo, mediante el tratamiento con bases. Las bases idóneas son hidróxidos de metales alcalinos, hidróxidos de metales alcalinotérreos o bases orgánicas en forma de aminas primarias, secundarias o terciarias.

- 25 Cada etapa de la reacción descrita en este documento puede ir seguida, opcionalmente, de uno o más procedimientos de trabajo y/o procedimientos de aislamiento. En la técnica se conocen estos procedimientos idóneos, por ejemplo, a partir de trabajos convencionales, como Houben-Weyl, Methoden
30 der organischen Chemie [Métodos de química orgánica], Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart. Entre los ejemplos de estos procedimientos, pero sin limitaciones, se incluyen evaporación de un solvente, destilación, cristalización,

cristalización fraccionada, procedimientos de extracción, procedimientos de lavado, procedimientos de digestión, procedimientos de filtración, cromatografía, cromatografía por HPLC y procedimientos de secado, especialmente procedimientos de secado al vacío y/o a temperatura elevada.

5

Las enfermedades proliferativas son causadas por un defecto en el sistema de señalización intracelular o en el mecanismo de transducción de señales de determinadas proteínas. Uno de los principales mecanismos por el cual la regulación celular se lleva a cabo es mediante la transducción de señales extracelulares a través de la membrana, que a su vez modulan las rutas bioquímicas dentro de la célula. La fosforilación de proteínas representa una vía por la que se propagan las señales intracelulares de molécula a molécula, dando lugar finalmente a una respuesta celular. Estas cascadas de transducción de señales están muy reguladas y a menudo se solapan, como resulta evidente de la existencia de muchas proteína cinasas y fosfatasa.

La fosforilación de proteínas se produce predominantemente en restos de serina, treonina o tirosina, por lo que las proteína cinasas se han clasificado según su especificidad por el sitio de fosforilación, es decir, serina/treonina cinasas y tirosina cinasas. Al ser la fosforilación un proceso tan ubicuo dentro de las células y puesto que los fenotipos celulares están en gran medida influenciados por la actividad de estas rutas, actualmente se cree que diversos estados patológicos y/o enfermedades son atribuibles a la activación aberrante o a mutaciones funcionales de los componentes moleculares de las cascadas de cinasas. Entre los defectos se incluye un cambio en la actividad intrínseca o en la concentración celular de una o más proteínas señalizadoras en la cascada de señalización. La célula puede producir un factor de crecimiento que se una a sus propios receptores, originando un bucle autocrino que estimula continuamente la proliferación. Las mutaciones o la sobreexpresión de proteínas de señalización intracelular conducen a señales mitogénicas falsas dentro de la célula. En consecuencia, se ha prestado considerable atención a la caracterización de las proteína cinasas y a los compuestos que son capaces de modular su actividad (para una revi-

25

30

sión, véase: Weinstein-Oppenheimer y col. *Pharma. & Therap.*, 2000, 88: 229-279).

5 Las tirosina cinasas son una clase de enzimas que catalizan la transferencia del fosfato terminal de la adenosina trifosfato a restos tirosina de los sustratos proteicos. Se cree que las tirosina cinasas, a través de la fosforilación del sustrato, tienen una función crucial en la transducción de señales para numerosas funciones celulares. Aunque aún no están claros los mecanismos precisos de la transducción de señales, las tirosina cinasas han demostrado
10 su importancia como factores contribuyentes en la proliferación celular, la carcinogénesis y la diferenciación celular. Las tirosina cinasas se pueden clasificar como tirosina cinasas de tipo receptor o tirosina cinasas de tipo no receptor. Las tirosina cinasas de tipo receptor tienen una parte extracelular, una parte transmembrana y una parte intracelular, mientras que las tirosina
15 cinasas de tipo no receptor son exclusivamente intracelulares.

Las tirosina cinasas constan de una gran variedad de receptores transmembrana con diferente actividad biológica. De este modo, se han identificado aproximadamente 20 subfamilias diferentes de tirosina cinasas de tipo
20 receptor. Una subfamilia de tirosina cinasas, conocida como subfamilia HER, está constituida por EGFR, HER2, HER3 y HER4. Entre los ligandos de esta subfamilia de receptores se incluyen el factor de crecimiento epidérmico, TGF- α , anfirregulina, HB-EGF, betacelulina y herregulina. Otra subfamilia de estas tirosina cinasas de tipo receptor es la subfamilia de la insulina, que
25 incluye INS-R, IGF-IR e IR-R. En la subfamilia de PDGF se incluyen los receptores PDGF- α y - β , CSFIR, c-kit y FLK-II. Además, existe la familia de FLK, que consta del receptor con dominio inserto cinasa (KDR), la cinasa hepática fetal-1 (FLK-1), la cinasa hepática fetal-4 (FLK-4) y la tirosina cinasa fms-1 (flt-1). Las familias de PDGF y FLK normalmente se tratan juntas debido a las semejanzas entre los dos grupos. Para una discusión detallada de las tirosina cinasas de tipo receptor, véase Plowman y col., DN & P
30

7(6): 334-339, 1994, que se incorpora en el presente documento por referencia.

5 Las tirosina cinasas de tipo no receptor constan, asimismo, de varias subfamilias, como Src, Frk, Btk, Csk, Abl, Zap70, Fes/Fps, Fak, Jak, Ack y LIMK. Cada una de estas subfamilias se subdivide además en receptores diferentes. Por ejemplo, la subfamilia Src es una de las más grandes. Incluye Src, Yes, Fyn, Lyn, Lck, Blk, Hck, Fgr y Yrk. La subfamilia de enzimas Src se ha asociado a la oncogénesis. Para una discusión más detallada sobre las tiro-

10 sina cinasas de tipo no receptor, véase Bolen *Oncogene*, 8: 2025-2031 5 (1993), que se incorpora en el presente documento por referencia.

Tanto las tirosina cinasas de tipo receptor como las de tipo no receptor están implicadas en las rutas de señalización celular que conducen a numerosas

15 situaciones patológicas, como el cáncer, la psoriasis y las respuestas hiperinmunológicas. Se ha propuesto que diversas tirosina cinasas de tipo receptor y los factores de crecimiento que se unen a ellas, juegan un papel en la angiogénesis, aunque algunas pueden estimular este proceso indirectamente (Mustonen y Alitalo, *J. Cell Biol.* 129: 895-898, 1995). Una de estas

20 tirosina cinasas de tipo receptor es la cinasa hepática fetal 1, también denominada FLK-1. El análogo humano de FLK-1 es el receptor con dominio inserto cinasa KDR, que también se conoce como receptor 2 del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares o VEGFR-2, porque se une a VEGF con alta afinidad. Por último, la versión murina de este receptor se ha

25 denominado también NYK (Oelrichs y col., *Oncogene* 8 (1): 11-15, 1993). KDR y VEGF son una pareja receptor-ligando que tiene una función vital en la proliferación de células endoteliales vasculares y en la formación y germinación de vasos sanguíneos, conocidas como vasculogénesis y angiogénesis, respectivamente. La angiogénesis se caracteriza por una actividad excesiva del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). VEGF realmente

30 está constituido por una familia de ligandos (Klagsburn y D'Amore, *Cytokine & Growth Factor Reviews* 7: 259-270, 1996). VEGF se une al receptor de

tirosina cinasa transmembrana de alta afinidad KDR y a la tirosina cinasa similar a fms-1 relacionada, también conocida como Flt-1 o receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-1). Los cultivos celulares y experimentos con genes silenciados indican que cada receptor contribuye a aspectos diferentes de la angiogénesis. KDR media en la función mitogénica de VEGF, mientras que Flt-1 parece modular las funciones no mitogénicas, como las asociadas con la adhesión celular. Mediante la inhibición de KDR se modula el nivel de actividad mitogénica de VEGF. De hecho, se ha demostrado que el crecimiento tumoral es susceptible a los efectos angiogénicos de los antagonistas del receptor de VEGF (Kim y col., Nature 362, pág. 841-844, 1993).

Los tumores sólidos pueden, por tanto, tratarse con inhibidores de tirosina, ya que estos tumores dependen de la angiogénesis para la formación de los vasos sanguíneos que son necesarios para sustentar su crecimiento. Entre estos tumores sólidos se incluyen leucemias monocíticas, carcinomas de cerebro, aparato genitourinario, sistema linfático, estómago, laringe y pulmón, como adenocarcinoma de pulmón y carcinoma microcítico de pulmón. Ejemplos adicionales son los carcinomas en los que se observa sobreexpresión o activación de los oncogenes activados por Raf (por ejemplo, K-Ras y Erb-B). Entre dichos carcinomas se incluyen el carcinoma pancreático y el de mama. Los inhibidores de estas tirosina cinasas son, por tanto, idóneos para la prevención y el tratamiento de enfermedades proliferativas causadas por estas enzimas. La actividad angiogénica de VEGF no se limita a tumores. VEGF es responsable de la actividad angiogénica producida en o cerca de la retina en la retinopatía diabética. Este crecimiento vascular en la retina conduce a la degeneración visual que culmina con la ceguera. Los niveles oculares de ARNm y proteína VEGF se elevan debido a afecciones como la oclusión de la vena retiniana en primates y a niveles de pO_2 reducidos en ratones, lo que conlleva neovascularización. Las inyecciones intraoculares de anticuerpos monoclonales anti-VEGF o inmunofusiones del receptor VEGF inhiben la neovascularización ocular tanto en modelos de primates

como de roedores. Independientemente de la causa de la inducción de VEGF en la retinopatía diabética humana, la inhibición del VEGF ocular es adecuada para el tratamiento de esta enfermedad.

5 La expresión de VEGF también aumenta significativamente en regiones hipóxicas de tumores animales y humanos adyacentes a áreas de necrosis. Además, VEGF está regulado por incremento mediante la expresión de los oncogenes Ras, Raf, Scr y p53 mutante (todos ellos importantes en la lucha contra el cáncer). Los anticuerpos monoclonales anti-VEGF inhiben el creci-
10 miento de tumores humanos en ratones desnudos. Aunque las mismas células tumorales continúan expresando VEGF en cultivo, los anticuerpos no reducen su tasa mitótica. De este modo, VEGF derivado de tumores no funciona como factor mitogénico autocrino. Por consiguiente, VEGF contribuye al crecimiento tumoral *in vivo* estimulando la angiogénesis a través de sus
15 actividades paracrinas quimiotácticas y mitogénicas en las células endoteliales vasculares. Estos anticuerpos monoclonales también inhiben el crecimiento de carcinomas de colon humanos normalmente menos vascularizados en ratones atímicos y reducen el número de tumores originados a partir de células inoculadas.

20 La expresión de una construcción de unión a VEGF de Flk-1, Flt-1, el homólogo del receptor de KDR de ratón truncado para eliminar los dominios citoplásmicos de tirosina cinasa pero que retiene el anclaje a membrana, detiene virtualmente el crecimiento de un glioblastoma trasplantable en rato-
25 nes, presumiblemente mediante el mecanismo negativo dominante de formación de heterodímeros con receptores VEGF transmembrana de células endoteliales.

30 Las células madre embrionarias, que normalmente crecen como tumores sólidos en ratones desnudos, no producen tumores detectables si se silencian los dos alelos de VEGF. En conjunto, estos datos indican el papel de VEGF en el crecimiento de tumores sólidos. La inhibición de KDR o Flt-1

está implicada en la angiogénesis patológica y estos receptores, siendo estos receptores idóneos para el tratamiento de enfermedades en las que la angiogénesis es parte de la patología global, por ejemplo, la inflamación y la vascularización retiniana diabética, así como diversas formas de cáncer, ya
5 que se sabe que el crecimiento tumoral depende de la angiogénesis (Weidner y col., N. Engl. J. Med., 324, pág. 1-8, 1991).

Por tanto, una realización preferida de la presente invención es el uso de un compuesto de la presente invención como modulador de VEGFR o su uso
10 para la prevención o tratamiento de trastornos mediados por VEGFR.

La angiopoyetina 1 (Ang1), un ligando de la tirosina cinasa de tipo receptor específica de endotelio TIE-2, es un nuevo factor angiogénico (Davis y col., Cell, 1996, 87: 1161-1169; Partanen y col., Mol. Cell Biol., 12: 1698-1707
15 (1992); patentes de EE. UU. Nº 5.521.073; 5.879.672; 5.877.020 y 6.030.831). El acrónimo TIE significa «tirosina cinasa con dominios de homología con Ig y EGF». TIE se utiliza para la identificación de una clase de tirosina cinasas de tipo receptor que se expresan exclusivamente en células endoteliales vasculares y en células hematopoyéticas tempranas.
20 Las cinasas del receptor TIE se caracterizan normalmente por la presencia de un dominio similar a EGF y un dominio similar a la inmunoglobulina (Ig), que consta de unidades plegadas extracelulares estabilizadas mediante puentes disulfuro intercatenarios (Partanen y col. Curr. Topics Microbiol. Immunol., 1999, 237: 159-172). A diferencia de VEGF, que ejerce su función
25 durante las etapas tempranas del desarrollo vascular, Ang1 y su receptor TIE-2 actúan durante las etapas tardías de desarrollo vascular, es decir, durante la transformación vascular (transformación se refiere a la formación de la luz vascular) y maduración (Yancopoulos y col., Cell, 1998:661-664; Peters, K.G., Circ. Res., 1998, 83(3): 342-3; Suri y col., Cell 87, 1171-1180
30 (1996)).

Como consecuencia, se esperaría que la inhibición de TIE-2 interrumpiera la transformación y maduración de un nuevo sistema vascular iniciado por la angiogénesis y debería, así, interrumpirse el proceso de angiogénesis.

Además, la inhibición en el sitio de unión al dominio cinasa de VEGFR-2 bloquearía la fosforilación de restos de tirosina y serviría para interrumpir el inicio de la angiogénesis. Debe asumirse, por tanto, que la inhibición de TIE-2 y/o VEGFR-2 debe prevenir la angiogénesis tumoral y servir para frenar o eliminar completamente el crecimiento tumoral. En consecuencia, podría proporcionarse tratamiento para el cáncer y otras enfermedades asociadas con una angiogénesis inapropiada.

La presente invención también se refiere, por tanto, a métodos para la regulación, modulación o inhibición de TIE-2 en la prevención y/o tratamiento de enfermedades asociadas con una actividad TIE-2 regulada por incremento o alterada. En particular, los compuestos según la invención también pueden emplearse en el tratamiento de determinadas formas de cáncer. Asimismo, los compuestos según la invención se pueden usar para proporcionar efectos aditivos o sinérgicos en determinadas quimioterapias antineoplásicas existentes y/o se pueden usar para restablecer la eficacia de ciertas quimioterapias y radioterapias antineoplásicas existentes.

La proteína cinasa PKB (también conocida como AKT y RAC-PK) es un miembro de la familia AKT/PKB de serina/treonina cinasas y se ha demostrado que participa en un grupo diverso de rutas de señalización en neoplasias malignas humanas (Nicholson y col., Cell. Signal., 2002, 14, 381-395). PKB, como otros miembros de la familia AKT/PKB, se localiza en el citosol de células no estimuladas y se trasloca a la membrana celular tras la estimulación. La traslocación de PKB se puede activar por numerosos ligandos, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento de fibroblastos básico, por el estrés celular, como por ejemplo, choque térmico e hiperosmolaridad, así como por insulina (Bos, Trends Biochem. Sci., 1995, 20, 441-442), y otros

- estudios han demostrado que esta activación se realiza a través de la cinasa PI3 que es sensible a wortmanina (Franke y col., Science, 1997, 275, 665-668). Una vez localizada en la membrana plasmática, se ha demostrado que PKB media en varias funciones dentro de la célula, como la apoptosis, los efectos metabólicos de la insulina, la inducción de diferenciación y/o proliferación, la síntesis de proteínas y las respuestas al estrés (Alessi y Cohen, Curr. Opin. Genet. Dev., 1998, 8: 55-62; Downward, Curr. Opin. Cell Biol., 1998, 10, 262-267).
- PKB fue clonada independientemente en 1991 por tres grupos (Bellacosa y col., Science, 1991, 254, 274-277; Coffey y Woodgett, Eur. J. Biochem., 1991, 201, 475-481; Jones y col., Cell Regul., 1991, 2, 1001- 1009), aunque su asociación con el carcinoma gástrico primario humano había sido reconocida ya en 1987 (Staal y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1987, 84, 5034-5037). La secuenciación de PKB α mostró la homología dentro de los dominios cinasa con las isozimas PKA (aproximadamente el 68%) y PKC (aproximadamente el 73%) (Jones y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1991, 88, 4171-5), un hecho que llevó a rebautizarla como PKB. Existen tres isoformas celulares de PKB y dos variantes de ajuste (PKB α , β , γ , β_1 y γ_1 ; Brazil y col. Trends in Bio Sci, 2001, 26, 657-663). Se encontró que PKB α estaba amplificada o sobreexpresada en adenocarcinomas gástricos y en una línea celular de cáncer de mama (Staal y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1987, 84, 5034-7; Jones y col., Cell Regul., 1991, 2, 1001-9). PKB β está amplificada o sobreexpresada en el 3% de los cánceres de mama (Bellacosa y col., Int. J. Cancer, 1995 64, 280-5), el 12% de los pancreáticos (Cheng y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1996, 93, 3636-41) y el 15% de los de ovario (Bellacosa y col., Int. J. Cancer, 1995, 64, 280-5; Cheng y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1992, 89, 9267-71).
- PKB γ está sobreexpresada en el cáncer de mama deficiente en receptores de estrógenos y en líneas celulares de próstata independientes de andrógenos (Nakatani y col., J. Biol. Chem. 1999, 274, 21528-32). Se ha propuesto

que PKB es un gen que está implicado en el reordenamiento cromosómico en la banda cromosómica 14q32. Se sabe que este locus sufre reordenamiento en neoplasias malignas de células T humanas, como por ejemplo, leucemias prolinfocíticas y leucemias infantiles de linaje mixto (Staal y col., Genomics, 1988, 2, 96-98).

PKB también tiene su función en la prevención de la «muerte celular programada» o apoptosis mediante la fosforilación inhibitoria de ASK-1, Bad, caspasa-9 y FKHR (para una revisión, véase Nicholson y col., Cell Signalling 2001, 14, 281-395). Se ha demostrado que PKB proporciona una señal de supervivencia (para una revisión, véase Lawlor y col., J. of Cell Science 2001, 114, 2903-2910) a las células para protegerlas de diversos agentes, como la radiación UV (Dudek y col., Science, 1997, 275, 661-665), la privación de IGF-1 procedente de las células neurales, la pérdida de adhesión a la matriz celular, el estrés y el choque térmico (Alessi y Cohen, Curr. Opin. Genet. Dev., 1998, 8: 55-62).

La fosfatasa específica doble PTEN (fosfatasa y homólogo de tensina deletado en el cromosoma diez) aumenta el nivel de $\text{PtdIns}(3, 4, 5)\text{P}_3$ en la célula mediante la fosforilación de dicho compuesto. $\text{PtdIns}(3, 4, 5)\text{P}_3$ se une al dominio PH (dominio de homología de Pleckstrin) de PKB. Esta unión es un paso esencial para la traslocación a membrana y la activación de PKB. PTEN es un gen supresor tumoral mutado en una gran proporción de líneas celulares de glioblastoma y melanoma, carcinomas de próstata avanzados y carcinomas de endometrio. Además, está deletado en > 80% de los pacientes con afecciones hereditarias, como, por ejemplo, la enfermedad de Crowden, la enfermedad de Lhermitte-Duclose y el síndrome de Bannayan-Zonana. Los pacientes muestran muchos aspectos similares, como múltiples tumores benignos (harmatomas) y mayor susceptibilidad a neoplasias malignas de mama y tiroides (Di Cristofano y col. Cell, 2000, 100, 387-390).

Las líneas celulares de ratones PTEN^{+/-} heterocigotos (los ratones PTEN^{-/-} heterocigotos no son viables) muestran un aumento de los niveles de PtdIns(3, 4, 5)P₃ paralelo a la mayor actividad PKB, con reducción concomitante de la sensibilidad a la apoptosis (Di Christofano y col. Nat. Genet. 1998, 19, 348-355; Stambolic y col., Cell, 1998, 95, 29-39, Myers y col., Proc. Natl. Acad. Si. U.S.A., 1998, 96: 13513-13518). PKB también es capaz de estimular la progresión del ciclo celular inhibiendo al inhibidor del ciclo celular p21 (Zhou y col.; Nat. Cell Biol., 2002, 3: 245-252). Estos hallazgos pueden explicar la sobreexpresión de PKB observada en células cancerosas, lo que permite la supervivencia y proliferación preferenciales de los carcinomas evitando su progresión normal a la apoptosis.

Por tanto, una realización preferida de la presente invención es el uso de un compuesto de la presente invención como modulador de PKB o su uso para la prevención o tratamiento de trastornos mediados por PKB.

Algunas de las mutaciones más comunes que conducen a la regulación por incremento de señales mitogénicas y enfermedades proliferativas se producen en genes que codifican la proteína conocida como Ras, una proteína G que se activa cuando se une a GTP y se inactiva cuando se une a GDP. Los receptores de factores de crecimiento mencionados anteriormente, y muchos otros receptores mitogénicos, cuando están activados, hacen que Ras pase del estado unido a GDP al estado unido a GTP. Esta señal es un requisito absoluto para la proliferación en la mayoría de los tipos celulares. Los defectos en este sistema de señalización, especialmente en la desactivación del complejo Ras-GTP, son frecuentes en cánceres y conducen a la activación crónica de la cascada de señalización por debajo de Ras.

El Ras activado causa, a su vez, la activación de una cascada de serina/treonina cinasas. Uno de los grupos de cinasas que se sabe requiere un complejo Ras-GTP activo para su propia activación es la familia Raf.

La presente invención, por tanto, se refiere a los compuestos de la presente invención como inhibidores de cinasas Raf. La fosforilación de proteínas es un proceso fundamental para la regulación de las funciones celulares. La acción coordinada tanto de proteína cinasas como de fosfatasa controla los
5 grados de fosforilación y, por consiguiente, la actividad de proteínas diana específicas. Una de las funciones predominantes de la fosforilación de proteínas es en la transducción de señales, donde las señales extracelulares se amplifican y propagan mediante una cascada de acontecimientos de fosforilación y desfosforilación de proteínas, por ejemplo, en la ruta p21^{ras}/Raf.

10

El gen p21^{ras} se descubrió como un oncogén de los virus de sarcoma de rata Harvey (H-Ras) y Kirsten (K-Ras). En humanos, las mutaciones características en el gen Ras celular (c-Ras) se han asociado con muchos tipos diferentes de cáncer. Se ha demostrado que estos alelos mutantes, que hacen
15 que Ras esté constitutivamente activo, transforman células en cultivo, como por ejemplo, la línea celular murina NIH 3T3.

El oncogén p21^{ras} es un factor contribuyente principal para el desarrollo y progresión de carcinomas sólidos humanos y está mutado en el 30% de
20 todos los carcinomas humanos (Bolton y col. (1994) Ann. Rep. Med. Chem., 29, 165-74; Bos. (1989) Cancer Res., 49: 4682-9). En su forma normal no mutada, la proteína Ras es un elemento clave de la cascada de transducción de señales dirigida por receptores de factores de crecimiento en casi todos los tejidos (Avruch y col. (1994) Trends Biochem. Sci., 19: 279-83).

25

Bioquímicamente, Ras es una proteína de unión al nucleótido guanina y, alternando entre una forma unida a GTP activada y una forma unida a GDP en reposo, está estrictamente controlada por la actividad GTPasa endógena de Ras y otras proteínas reguladoras. El producto del gen Ras se une al tri-
30 fosfato de guanosina (GTP) y al difosfato de guanosina (GDP) e hidroliza GTP a GDP. Ras está activo en el estado unido a GTP. En los mutantes Ras de células cancerosas, la actividad GTPasa endógena está reducida y, como

consecuencia, la proteína transmite señales de crecimiento constitutivas a efectores anterógrados, como por ejemplo, la enzima cinasa Raf. Esto conduce al crecimiento canceroso de las células que llevan estos mutantes (Magnuson y col. (1994) Semin. Cancer Biol., 5, 247-53). El protooncogén Ras requiere un protooncogén c-Raf-1 funcionalmente intacto para transducir las señales de crecimiento y diferenciación mediante tirosina cinasas de tipo receptor y no receptor en eucariotas superiores.

Es necesario que Ras esté activado para la activación del protooncogén c-Raf-1, aunque las etapas bioquímicas a través de las cuales Ras activa la proteína (Ser/Thr) cinasa Raf-1 están ahora bien caracterizadas. Se ha demostrado que la inhibición del efecto de Ras activo por la inhibición de la ruta de señalización de la cinasa Raf mediante la administración de anticuerpos desactivadores frente a la cinasa Raf o mediante la coexpresión de cinasa Raf dominante negativa o MEK dominante negativa (MAPKK), el sustrato de la cinasa Raf, conduce a la reversión de células transformadas al fenotipo de crecimiento normal (véase Daum y col. (1994) Trends Biochem. Sci., 19, 474-80; Fridman y col. (1994) J Biol. Chem., 269, 30105-8. Kolch y col. (1991) Nature, 349, 426-28 y para una revisión Weinstein-Oppenheim y col. Pharm. & Therap. (2000), 88, 229-279).

De forma similar, la inhibición de la cinasa Raf (mediante oligonucleótidos complementarios) se ha correlacionado *in vitro* e *in vivo* con la inhibición del crecimiento de diversos tipos tumorales humanos (Monia y col., Nat. Med. 1996, 2, 668-75).

Las proteína cinasas específicas de serina y treonina Raf son enzimas citosólicas que estimulan el crecimiento celular en diversos sistemas celulares (Rapp, U.R. y col. (1988) en The Oncogene Handbook; T. Curran, E.P. Reddy y A. Skalka (eds.) Elsevier Science Publishers; Países Bajos, pág. 213-253; Rapp, U.R., y col. (1988) Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol. 53:

173-184; Rapp, U.R., y col. (1990) *Inv Curr. Top. Microbiol. Immunol.* Potter y Melchers (eds.), Berlin, Springer-Verlag 166: 129-139).

Se han caracterizado tres isozimas:

5

C-Raf (Raf-1) (Bonner, T.I., y col. (1986) *Nucleic Acids Res.* 14: 1009-1015). A-Raf (Beck, T.W., y col. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15: 595-609) y B-Raf (Qkawa, S., y col. (1998) *Mol. Cell. Biol.* 8: 2651-2654; Sithanandam, G. y col. (1990) *Oncogene*: 1775). Estas enzimas difieren en su expresión en
10 varios tejidos. Raf-1 se expresa en todos los órganos y en todas las líneas celulares que se han examinado y A y B-Raf se expresan en los tejidos urogenital y cerebral, respectivamente (Strom, S.M. (1990) *Oncogene* 5: 345-351).

15

Los genes Raf son protooncogenes: pueden iniciar la transformación maligna de células cuando se expresan en formas específicamente alteradas. Los cambios genéticos que conducen a la activación oncogénica generan una proteína cinasa constitutivamente activa mediante la eliminación o interferencia con un dominio regulador negativo N-terminal de la proteína
20 (Heidecker, G., y col. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10: 2503-2512; Rapp, U.R., y col. (1987) en *Oncogenes and Cancer*; S. A. Aaronson, J. Bishop, T. Sugimura, M. Terada, K. Toyoshima y P. K. Vogt (eds.) Japan Scientific Press, Tokio).

20

La microinyección en células NIH 3T3 de versiones oncogénicamente activadas, pero no de tipo salvaje, de la proteína Raf preparadas con vectores de expresión de *Escherichia coli* da lugar a una transformación morfológica y estimula la síntesis de ADN (Rapp, U.R., y col. (1987) en *Oncogenes and Cancer*; S. A. Aaronson, J. Bishop, T. Sugimura, M. Terada, K. Toyoshima y P. K. Vogt (ed.) Japan Scientific Press, Tokio; Smith, M. R., y col. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10: 3828-3833).

25

30

En consecuencia, Raf-1 activado es un activador intracelular del crecimiento celular. La proteína serina cinasa Raf-1 es candidata a efector anterógrado

de la transducción de señales mitogénicas, puesto que los oncogenes Raf superan la parada de crecimiento resultante de un bloqueo de la actividad celular de Ras debido a una mutación celular (células revertientes Ras) o a la microinyección de anticuerpos anti-Ras (Rapp, U.R., y col. (1988) en The Oncogene Handbook, T. Curran, E.P. Reddy y A. Skalka (ed.), Elsevier Science Publishers; Países Bajos, pág. 213-253; Smith, M.R., y col. (1986) Nature (Londres) 320: 540-543).

La función de c-Raf es necesaria para la transformación mediante diversos oncogenes unidos a membrana y para la estimulación del crecimiento por mitógenos que contienen el suero (Smith, M.R., y col. (1986) Nature (Londres) 320: 540-543). La actividad proteína serina cinasa de Raf-1 se regula mediante mitógenos a través de la fosforilación (Morrison, D.K., y col. (1989) Cell 58: 648-657), que también afecta a su distribución subcelular (Olah, Z., y col. (1991) Exp. Brain Res. 84: 403; Rapp, U.R., y col. (1988) Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol. 53: 173-184). Los factores de crecimiento que activan Raf-1 son el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Morrison, D.K., y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8855-8859), el factor estimulante de colonias (Baccarini, M., y col. (1990) EMBO J. 9: 3649-3657), la insulina (Blackshear, P.J., y col. (1990) J. Biol. Chem. 265: 12115-12118), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Morrison, R.K., y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8855-8859), la interleucina-2 (Turner, B.C., y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1227) y la interleucina-3 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (Carroll, M.P., y col. (1990) J. Biol. Chem. 265: 19812-19817).

Después del tratamiento de células con mitógeno, la proteína serina cinasa Raf-1 transitoriamente activada se trasloca al área perinuclear y al núcleo (Olah, Z., y col. (1991) Exp. Brain Res. 84: 403; Rapp, U.R., y col. (1988) Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol. 53: 173-184). Las células que contienen Raf activado tienen alterado su patrón de expresión génica (Heidecker, G., y col. (1989) en Genes and signal transduction in multistage carcino-

genesis, N. Colburn (ed.), Marcel Dekker, Inc., Nueva York, pág. 339-374) y los oncogenes Raf activan la transcripción a partir de promotores dependientes de Ap-1/PEA3 en ensayos de transfección transitoria (Jamal, S., y col. (1990) *Science* 344: 463-466; Kaibuchi, K., y col. (1989) *J. Biol. Chem.* 264: 20855-20858; Wasylyk, C., y col. (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9: 2247-2250).

Existen al menos dos rutas independientes para la activación de Raf-1 por mitógenos extracelulares: una que incluye a la proteína cinasa C (KC) y una segunda iniciada por proteína tirosina cinasas (Blackshear, P.J., y col. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:12131-12134; Kovacina, K.S., y col. (1990) *J. Biol. Chem.* 265: 12115-12118; Morrison, D.K., y col. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8855-8859; Siegel, J.N., y col. (1990) *J. Biol. Chem.* 265: 18472-18480; Turner, B.C., y col. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1227). En cada caso, la activación implica la fosforilación de la proteína Raf-1. La fosforilación de Raf-1 puede ser una consecuencia de una cascada de cinasas amplificada por la autofosforilación o puede estar causada en su totalidad por la autofosforilación iniciada tras la unión de un posible ligando activador al dominio regulador de Raf-1, análogo a la activación de PKC por diacilglicerol (Nishizuka, Y. (1986) *Science* 233: 305-312).

20

Las enzimas cinasas MAPK/ERK («MEK») son cinasas de doble especificidad implicadas, por ejemplo, en la inmunomodulación, inflamación y enfermedades proliferativas como cáncer y restenosis. Estas cinasas de la familia Raf activan MEK (p. ej., MEK1 y MEK2) que entonces activa la MAP cinasa, ERK (ERK1 y ERK2). La activación de la MAP cinasa por mitógenos parece ser esencial para la proliferación; la activación constitutiva de esta cinasa es suficiente para inducir la transformación celular. El bloqueo de la señalización posterior a Ras, por ejemplo, mediante el uso de una proteína Raf-1 dominante negativa, puede inhibir completamente la mitogénesis, ya esté inducida por receptores de la superficie celular o por mutantes Ras oncogénicos. Aunque Ras no es por sí misma una proteína cinasa, participa en la activación de Raf y de otras cinasas, más probablemente a través de un

25

30

mecanismo de fosforilación. Una vez activada, Raf y otras cinasas fosforilan MEK en dos restos serina muy próximos, S²¹⁸ y S²²² en el caso de MEK1, que constituye el requisito para la activación de MEK como cinasa. MEK, a su vez, fosforila la MAP cinasa en un resto tirosina, Y¹⁸⁵, y en un resto treonina, T¹⁸³, separados por un único aminoácido. Esta doble fosforilación activa la MAP cinasa al menos 100 veces. La MAP cinasa activada puede entonces catalizar la fosforilación de un gran número de proteínas, como varios factores de transcripción y otras cinasas. Muchas de estas fosforilaciones mediadas por la MAP cinasa son mitogénicamente activadoras para la proteína diana, como una cinasa, un factor de crecimiento u otra proteína celular. Además de Raf-1 y MEKK, otras cinasas activan MEK, y la propia MEK parece ser una cinasa de integración de señales. La opinión actual es que MEK es muy específica para la fosforilación de la MAP cinasa. De hecho, no se ha descubierto hasta la fecha ningún sustrato de MEK, aparte de la MAP cinasa y ERK, y MEK no fosforila péptidos basados en la secuencia de fosforilación de la MAP cinasa, ni tampoco fosforila la MAP cinasa desnaturalizada. MEK también parece estar fuertemente asociado con la MAP cinasa antes de su fosforilación, lo que sugiere que la fosforilación de la MAP cinasa por MEK puede requerir una fuerte interacción previa entre las dos proteínas. Ambos requisitos y la inusual especificidad de MEK son indicativos de que puede tener un mecanismo de acción suficientemente diferente con respecto a otras proteína cinasas como para que se puedan encontrar inhibidores selectivos de MEK, posiblemente funcionando a través de mecanismo alostéricos antes que a través del bloqueo usual del sitio de unión de ATP. Se ha encontrado que los compuestos de la presente invención son inhibidores de MEK y son útiles en el tratamiento de diversos estados patológicos proliferativos, como afecciones relacionadas con la hiperactividad de MEK, así como enfermedades moduladas por la cascada de MEK.

30

Los inhibidores selectivos de MEK1 y MEK2 son aquellos compuestos que inhiben las enzimas MEK1 o MEK2, respectivamente, sin inhibición sustan-

cial de otras enzimas como MKK3, PKC, Cdk2A, fosforilasa cinasa, EGF y C-src. En general, un inhibidor selectivo de MEK1 o MEK2 tiene una IC_{50} para MEK1 o MEK2 que es al menos una cincuentava parte (1/50) de su IC_{50} para una de las otras enzimas mencionadas anteriormente. Preferiblemente, un inhibidor selectivo tiene una IC_{50} que es al menos 1/100, más preferiblemente 1/500 y aún más preferiblemente 1/1.000, 1/5.000 o menos que su IC_{50} o una o más de las enzimas mencionadas anteriormente.

La identificación de pequeños compuestos, que inhiben, regulan y/o modulan específicamente la transducción de señales de proteína cinasas y que pueden utilizarse como medicamentos para el tratamiento de diversas enfermedades es, por tanto, deseable y un objetivo de la presente invención.

Los compuestos descritos son útiles tanto como tratamiento profiláctico como terapéutico para trastornos o afecciones relacionadas con el cambio de actividad de una o más de la cinasas mencionadas anteriormente, especialmente la hiperactividad de MEK, así como enfermedades o afecciones moduladas por dichas cascadas de cinasas.

De este modo, una realización preferida adicional de la presente invención es el uso de un compuesto de fórmula I para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de trastornos.

La invención, por tanto, también se refiere a compuestos de fórmula I y las sales, derivados, profármacos, solvatos y estereoisómeros de los mismos fisiológicamente aceptables, incluido mezclas de los mismos en todas las proporciones como medicamentos.

Una realización preferida adicional de la presente invención es el uso de los compuestos según la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de trastornos, que están causados, mediados y/o propagados por proteína cinasas.

Una realización preferida adicional de la presente invención es el uso de los compuestos según la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de trastornos, que están causados, mediados y/o propagados por proteína cinasas, caracterizada porque las proteína

5 cinasas son MEK1 o MEK2. Normalmente, los trastornos discutidos en el presente documento se dividen en dos grupos, trastornos hiperproliferativos y no hiperproliferativos. En este contexto, la infección o enfermedades infecciosas, psoriasis, artritis, inflamación, endometriosis, deformidad cicatricial, hiperplasia prostática benigna, enfermedades inmunológicas, enfermedades

10 autoinmunes e inmunodeficiencias deben ser consideradas como trastornos no cancerosos, de los cuales la infección, artritis, inflamación, enfermedades inmunológicas, enfermedades autoinmunes e inmunodeficiencias son normalmente consideradas trastornos no hiperproliferativos. En este contexto, el

15 cáncer cerebral, cáncer de pulmón, cáncer espinocelular, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer hepático, cáncer renal, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer esofágico, cáncer ginecológico, cáncer de tiroides, linfoma, leucemia crónica y leucemia aguda deben ser considerados como trastornos cancerosos, todos los cuales se consideran normalmente trastornos hiperproliferativos.

20 Así, una realización preferida de la presente invención es el uso de un compuesto de fórmula I para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de trastornos, caracterizada porque los trastornos se seleccionan entre el grupo compuesto por trastornos hiperproliferativos y no

25 hiperproliferativos.

En una realización preferida de la presente invención el trastorno no es canceroso.

30 Por tanto, los compuestos de fórmula I se pueden usar para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de trastornos, que se seleccionan entre el grupo compuesto por psoriasis, artritis, artritis reuma-

toide, inflamación, endometriosis, deformidad cicatricial, infección por *Helicobacter pylori*, infección por el virus Influenza A, infección por VIH, infección por el virus de la hepatitis (B) (VHB), infección por el virus del papiloma humano (VPH), infección por citomegalovirus (CMV) e infección por el virus de Epstein-Barr (EBV), hiperplasia prostática benigna, inmunodeficiencias, enfermedad autoinmune, enfermedades inmunológicas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, enfermedad inflamatoria intestinal, fibrosis, aterosclerosis, restenosis, vasculopatía, enfermedad cardiovascular, ictus (como ictus isquémico focal agudo e isquemia cerebral global), insuficiencia

5 cardíaca, fibrosis quística, hepatomegalia, cardiomegalia, choque séptico, enfermedad de Alzheimer, dolor crónico o neuropático, enfermedad renal y trastornos de angiogénesis, trastornos proliferativos de células mesangiales, nefropatía diabética, retinopatía diabética, nefroesclerosis maligna, síndromes de microangiopatía trombótica, rechazo de xenoinjerto (trasplante de

10 célula(s), piel, extremidad, órgano o médula ósea), glomerulopatías, trastornos metabólicos y enfermedades neurodegenerativas.

Las infecciones según la invención, aunque no se limitan a las infecciones causadas por microorganismos patógenos, como bacterias, hongos, virus y

20 protozoos, son por ejemplo, gripe (Pleschka, S. y col. Nature Cell Biol. 2001, 3, páginas 301-305), retrovirus, por ejemplo, infección por VIH (Yang, X. y col. J. Biol. Chem. 1999, 274, páginas 27981-27988; Popik, W., y col., Mol Cel Biol. 1996, 16, páginas 6532-6541), hepatitis B (Benn, J., y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 1995, 92, páginas 11215-11219), hepatitis C (Aoki y col. J.

25 Virol. 2000, 74, páginas 1736-1741), papilomavirus, parainfluenza, rinovirus, adenovirus, *Helicobacter pylori* e infecciones virales y bacterianas de la piel (p. ej., herpes labial, verrugas, varicela, molusco contagioso, herpes zóster, furúnculos, celulitis, erisipelas, impétigo, tiña, pie de atleta y dermatofitosis).

30 Además, una realización preferida de la presente invención es el uso de un compuesto de fórmula I para la fabricación de un medicamento para el tra-

tamiento y/o prevención de trastornos, caracterizada porque los trastornos se seleccionan entre el grupo compuesto por trastornos hiperproliferativo.

5 Existen muchos trastornos asociados con una desregulación de la proliferación celular. Entre las afecciones de interés se incluyen, aunque sin limitaciones, las siguientes. Los compuestos en cuestión son útiles para el tratamiento de diversas afecciones en las que existe proliferación y/o migración de células de músculo liso y/o células inflamatorias dentro de la capa íntima de un vaso, lo que origina un flujo sanguíneo restringido a través de dicho
10 vaso, por ejemplo, lesiones oclusivas de la neoíntima. Entre las vasculopatías de interés se incluyen al ateroesclerosis, vasculopatía coronaria del injerto tras un trasplante, estenosis de injerto de vena, estenosis de injerto protésico perianastomótico, restenosis tras angioplastia o colocación de endoprótesis y similares.

15 Adicionalmente, los compuestos de fórmula I muestran preferiblemente propiedades antiangiogénicas. Así, los compuestos de la presente invención se pueden emplear ventajosamente en el tratamiento de una o más enfermedades que afectan a mamíferos y que se caracterizan por proliferación celular
20 en el área de trastornos asociados con neovascularización y/o permeabilidad vascular, como trastornos proliferativos de vasos sanguíneos como artritis y restenosis; trastornos fibróticos como cirrosis hepática y ateroesclerosis; trastornos proliferativos de células mesangiales como glomerulonefritis, nefropatía diabética, nefroesclerosis maligna, síndromes de microangiopatía
25 trombótica, rechazo de trasplante de órgano y glomerulopatías y trastornos metabólicos como psoriasis, diabetes mellitus, curación de heridas crónicas, inflamación y enfermedades neurodegenerativas.

30 El proceso de angiogénesis es el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, generalmente capilares, a partir de la vasculatura preexistente. La angiogénesis implica (i) activación de células endoteliales; (ii) aumento de la permeabilidad vascular; (iii) posterior disolución de la membrana basal y extra-

vasación de componentes plasmáticos que conducen a la formación de una matriz extracelular provisional de gel de fibrina; (iv) proliferación y movilización de células endoteliales; (v) reorganización de las células endoteliales movilizadas para formar capilares funcionales, (iv) formación de asas capilares y (vii) depósito de membrana basal y reclutamiento de células perivasculares hacia los vasos recién formados. La angiogénesis normal se activa durante el crecimiento tisular, desde el desarrollo embrionario hasta la madurez, y luego entra en un periodo de relativa quiescencia durante la edad adulta.

10

La angiogénesis normal también se activa durante la curación de heridas y en determinados estadios del ciclo reproductor femenino. La angiogénesis inapropiada o patológica se ha asociado con varios estados patológicos como diversas retinopatías, enfermedad isquémica, aterosclerosis, trastornos inflamatorios crónicos, artritis reumatoide y cáncer. El papel de la angiogénesis en estados patológicos se discute, por ejemplo, en Fan y col., *Trends in Pharmacol. Sci.* 16:54-66; Shawver y col., *DOT Vol. 2*, Nº 2 febrero 1997; Folkman, 1995, *Nature Medicine* 1:27-31.

15

En el caso del cáncer se ha demostrado que el crecimiento de tumores sólidos depende de la angiogénesis (véase Folkman, J., *J. Natl. Cancer Inst.*, 1990, 82, 4-6). En consecuencia, marcar como objetivo las rutas proangiogénicas es una estrategia ampliamente perseguida para proporcionar nuevos agentes terapéuticos en estas áreas de enormes necesidades médicas incumplidas.

20

En el proceso de angiogénesis están implicadas varias proteínas cinasas. Los factores de crecimiento endotelial (p. ej., el factor de crecimiento endotelial vascular, VEGF) activan tirosina cinasas de tipo receptor (p. ej., VEGFR-2) y envían señales a través de la cascada de cinasas Ras/Raf/Mek/Erk. La activación de VEGFR-2 por VEGF es un paso crítico en la ruta de transducción de señales que inicia la angiogénesis de tumores. La expresión de VEGF

25

30

puede ser constitutiva para las células tumorales y también puede regularse por incremento en respuesta a ciertos estímulos. Uno de dichos estímulos es la hipoxia, donde la expresión de VEGF está regulada por incremento tanto en el tumor como en los tejidos asociados del hospedador. El ligando de VEGF activa VEGFR-2 mediante la unión con su sitio de unión a VEGF extracelular. Esto conduce a la dimerización del receptor de VEGFR y a la autofosforilación de restos tirosina en el dominio cinasa intracelular de VEGFR-2. El dominio cinasa funciona transfiriendo un fosfato desde ATP a los restos tirosina, proporcionando así sitios de unión para la señalización de proteínas posteriores en la cascada a VEGFR-2, dando lugar finalmente al inicio de la angiogénesis (McMahon, G., *The Oncologist*, Vol. 5, No. 90001, 3-10, abril 2000).

Los ratones con una alteración dirigida en el gen B-Raf mueren por defectos vasculares durante el desarrollo (Wojnowski, L., y col. 1997, *Nature genetics* 16, páginas 293-296). Estos ratones muestran defectos en la formación del sistema vascular y en la angiogénesis, por ejemplo, vasos sanguíneos dilatados y aumento de muerte apoptótica de células endoteliales diferenciadas.

Las enfermedades en las que existe hiperproliferación y remodelación o reparación tisular o tejido reproductivo, por ejemplo, carcinoma uterino, testicular o de ovario, endometriosis, carcinoma espinocelular o carcinoma epitelial glandular de cuello del útero, etc., se reducen en número de células mediante la administración de los compuestos en cuestión. El crecimiento y la proliferación de células neurales también es de interés.

Las células tumorales se caracterizan por el crecimiento descontrolado, invasión de tejidos circundantes y diseminación metastásica a sitios distantes. El crecimiento y la expansión requieren la capacidad, no solo de proliferar, sino también de modular por disminución la muerte celular (apoptosis) y activar la angiogénesis para producir una neovascularización tumoral.

Una realización preferida de la presente invención es el uso de un compuesto de fórmula I para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de trastornos, caracterizada porque el trastorno es cáncer, ya sea sólido o hematopoyético.

5

Por tanto, una realización preferida de la presente invención es el uso de un compuesto de fórmula general I para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de trastornos, caracterizada porque los trastornos se seleccionan entre el grupo compuesto por carcinomas, por ejemplo, melanoma, cáncer cerebral, cáncer de pulmón, carcinoma no microcítico de pulmón, carcinoma transicional o espinocelular del tracto urinario, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de colon, cáncer de duodeno, cáncer ductal, cáncer de endometrio, cáncer de estómago, cáncer colorrectal, cáncer hepático, cáncer renal, cáncer de mama, cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer esofágico, cáncer ginecológico, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, mucosa bucal displásica, poliposis, cáncer bucal invasivo, etc.; neoplasias malignas neurológicas, por ejemplo, neuroblastoma, gliomas, etc.; neoplasias malignas hematológicas, por ejemplo, leucemia aguda infantil, linfomas no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, células T cutáneas malignas, micosis fungoide, linfoma cutáneo de células T no MF, papulosis linfomatoide, hiperplasia linfoide cutánea rica en células T, pénfigo vesicular, lupus eritematoso discoide, liquen plano, etc. y similares.

15

20

25

30

Los tumores de tejido neural son de particular interés, por ejemplo, gliomas, neuromas, etc. Algunos cánceres de particular interés son los cánceres de mama, que son principalmente de los subtipos adenocarcinoma. El carcinoma ductal *in situ* es el tipo más frecuente de cáncer de mama no invasivo. En el carcinoma ductal *in situ*, las células malignas no metastatizan a través de las paredes de los conductos dentro del tejido adiposo de la mama. El carcinoma ductal infiltrante (o invasivo) (CDI) metastatiza a través de la pared del conducto e invade el tejido adiposo de la mama. El carcinoma

lobular infiltrante (o invasivo) (CLI) es similar al CDI en que tiene la posibilidad de metastatizar en cualquier sitio del organismo. Aproximadamente del 10 al 15% de los cánceres de mama invasivos son carcinomas lobulares invasivos.

5

También es de interés el carcinoma de pulmón no microcítico. El cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) está constituido por tres subtipos generales de cáncer de pulmón. El carcinoma epidermoide normalmente se inicia en uno de los conductos bronquiales más grandes y crece de forma relativamente lenta. El tamaño de estos tumores puede oscilar desde muy pequeño a bastante grande. El adenocarcinoma empieza creciendo cerca de la superficie externa del pulmón y puede variar en cuanto a tamaño y velocidad de crecimiento. Algunos de los adenocarcinomas que crecen lentamente se describen como cánceres de células alveolares. El carcinoma de células grandes se inicia cerca de la superficie del pulmón, crece rápidamente y, por lo general, ha crecido bastante cuando se diagnostica. Otras formas menos frecuentes de cáncer de pulmón son carcinoide, cilindroma, mucoepidermoide y mesioteloma maligno.

10

15

20

25

30

El melanoma es un tumor maligno de melanocitos. Aunque la mayoría de los melanomas surge en la piel, también pueden originarse a partir de superficies mucosas o en otros sitios a los que las células de la cresta neural migran. Los melanomas se producen predominantemente en adultos y más de la mitad de los casos se originan en áreas aparentemente normales de la piel. El pronóstico se ve afectado por factores clínicos e histológicos, así como por la localización anatómica de la lesión. El grosor y/o nivel de invasión del melanoma, el índice mitótico, los linfocitos infiltrantes del tumor y la ulceración o hemorragia en el sitio primario también afectan al pronóstico. La estadificación clínica se basa en si el tumor se ha diseminado a los ganglios linfáticos regionales o a sitios distantes. En el caso de enfermedades clínicamente confinadas al sitio primario, cuanto mayor es el grosor y la profundidad de la invasión local del melanoma, mayor es la posibilidad de metástasis.

sis de ganglios linfáticos y peor es el pronóstico. El melanoma puede diseminarse por extensión local (a través de los vasos linfáticos) y/o por rutas hematógenas a sitios distantes. Cualquier órgano puede estar afectado por metástasis, aunque los pulmones y el hígado son los sitios más frecuentes.

Otras enfermedades hiperproliferativas de interés se refieren a la hiperproliferación epidérmica, remodelación y reparación tisular. Por ejemplo, la inflamación cutánea crónica en la psoriasis se asocia con queratinocitos epidérmicos hiperplásicos, así como con células mononucleares infiltrantes, como células T CD4+ de memoria, neutrófilos y macrófagos.

La proliferación de células inmunes se asocia con varios trastornos autoinmunes y linfoproliferativos. Son enfermedades de interés la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide y la diabetes mellitus dependiente de insulina. Las pruebas sugieren que las anomalías en la apoptosis intervienen en la patogénesis del lupus eritematoso sistémico (LES). Otras afecciones linfoproliferativas son el trastorno hereditario de apoptosis de linfocitos, que es un síndrome linfoproliferativo autoinmune, así como diversas leucemias y linfomas. Los síntomas de alergias a agentes medioambientales y alimentarios, así como la enfermedad inflamatoria intestinal, también puede aliviarse por los compuestos de la invención.

Para el uso en los métodos en cuestión, los compuestos en cuestión se pueden formular con agentes farmacéuticamente activos diferentes a los compuestos según la invención, especialmente otros fármacos antimetastásicos, antineoplásicos o antiangiogénicos. Entre los compuestos angiostáticos de interés se incluyen angiostatina, endostatina, péptidos carboxilo terminales del colágeno alfa (XV), etc. Los agentes citotóxicos y citostáticos de interés incluyen adriamicina, aleran, Ara-C, BICNU, busulfán, CNNU, cisplatino, citoxán, daunorrubicina, DTIC, 5-FU, hidrea, ifosfamida, metotrexato, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, mostaza nitrogenada, velban, vincristina,

vinblastina, VP-16, carboplatino, fludarabina, gemcitabina, idarrubicina, irinotecán, leustatina, navelbina, taxol, taxotere, topotecán, etc. Por ejemplo, en el caso de afecciones óseas, las combinaciones que podrían ser favorables incluyen aquellas con bifosfonatos antirresorción, como alendronato y risedronato; bloqueantes de integrinas (como se define adicionalmente más adelante), como antagonistas de $\alpha_v\beta_3$; estrógenos conjugados usados en terapia hormonal de sustitución, como PREMPRO[®], PREMARIN[®] y ENDOMETRION[®]; moduladores selectivos de receptores de estrógenos (MSRE), como raloxifeno, droloxifeno, CP-336,156 (Pfizer) y lasofoxifeno; inhibidores de la catepsina K; e inhibidores de la bomba de protones dependiente de ATP.

Los presentes compuestos también son idóneos para la combinación con fármacos antineoplásicos conocidos. Estos fármacos antineoplásicos conocidos incluyen los siguientes: moduladores de receptores de estrógenos, moduladores de receptores de andrógenos, moduladores de receptores retinoides, agentes citotóxicos, agentes antiproliferativos, inhibidores de la prenil-proteína transferasa, inhibidores de HMG-CoA reductasa, inhibidores de la proteasas de VIH, inhibidores de la transcriptasa inversa y otros inhibidores de la angiogénesis. Los presentes compuestos son particularmente idóneos para su administración al mismo tiempo que la radioterapia. Se han descrito en la técnica los efectos sinérgicos de la inhibición de VEGF en combinación con la radioterapia (véase WO00/61186).

Por tanto, una realización preferida de la presente invención es el uso de un compuesto de fórmula general I para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de trastornos, caracterizada porque una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos según la presente invención se administra en combinación con un compuesto seleccionado entre el grupo compuesto por moduladores de receptores de estrógenos, moduladores de receptores de andrógenos, moduladores de receptores retinoides, agentes citotóxicos, agentes antiproliferativos, inhibidores de prenil-

proteína proteasa, inhibidores de HMG-CoA reductasa, inhibidores de la proteasa del VIH, inhibidores de la transcriptasa inversa y otros inhibidores de la angiogénesis. Los presentes compuestos son particularmente idóneos para su administración al mismo tiempo que la radioterapia. Se ha descrito en la técnica el efecto sinérgico de la inhibición de VEGF en combinación con la radioterapia (véase el documento WO00/61186).

Por tanto, una realización preferida de la presente invención es el uso de un compuesto de fórmula general I para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de trastornos, caracterizada porque una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos según la presente invención se administra en combinación con un compuesto seleccionado entre el grupo compuesto por moduladores de receptores de estrógenos, moduladores de receptores de andrógenos, moduladores de receptores retinoides, agentes citotóxicos, agentes antiproliferativos, inhibidores de prenil-proteína proteasa, inhibidores de HMG-CoA reductasa, inhibidores de la proteasa de VIH, inhibidores de la transcriptasa inversa, inhibidores de receptores de factores de crecimiento e inhibidores de la angiogénesis.

Adicionalmente, una realización preferida de la presente invención es el uso de un compuesto de fórmula general I para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de trastornos, caracterizada porque una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos según la presente invención se administra en combinación con radioterapia y con un compuesto seleccionado entre el grupo formado por moduladores de receptores de estrógenos, moduladores de receptores de andrógenos, moduladores de receptores retinoides, agentes citotóxicos, agentes antiproliferativos, inhibidores de prenil-proteína proteasa, inhibidores de HMG-CoA reductasa, inhibidores de la proteasa del VIH, inhibidores de la transcriptasa inversa, inhibidores de receptores de factores de crecimiento e inhibidores de la angiogénesis.

«Moduladores de receptores de estrógenos» se refiere a compuestos que interfieren o inhiben la unión de estrógenos al receptor, independientemente del mecanismo. Entre los ejemplos de moduladores de receptores de estrógenos se incluyen tamoxifeno, raloxifeno, idoxifeno, LY353381, LY117081, toremifeno, fulvestrant, 4-[7-(2,2-dimetil-1-oxopropoxi-4-metil-2-[4-[2-(1-piperidinil)etoxi]fenil]-2H-1-benzopiran-3-il]fenil-2,2-dimetilpropanoato, 4,4'-dihidroxibenzofenona-2,4-dinitrofenilhidrazona y SH646. «Moduladores de receptores de andrógenos» se refiere a compuestos que interfieren o inhiben la unión de andrógenos al receptor, independientemente del mecanismo. Entre los ejemplos de moduladores de receptores de andrógenos se incluyen finasterida y otros inhibidores de la 5 α -reductasa, nilutamida, flutamida, bicalutamida, liarozol y acetato de abiraterona.

«Moduladores de receptores retinoides» se refiere a compuestos que interfieren o inhiben la unión de retinoides al receptor, independientemente del mecanismo. Entre los ejemplos de tales moduladores de receptores retinoides se incluyen bexaroteno, tretinoína, ácido 13-cis-retinoico, ácido 9-cis-retinoico, α -difluorometilornitina, ILX23-7553, trans-N-(4'-hidroxifenil)retinamida y N-4-carboxifenil retinamida.

«Agentes citotóxicos» se refiere a compuestos que dan lugar a la muerte celular, principalmente a través de la acción directa sobre la función celular, o inhibiendo o interfiriendo con la mitosis celular, y que incluyen agentes alquilantes, factores de necrosis tumoral, intercalantes, inhibidores de microtubulina e inhibidores de la topoisomerasa. Entre los ejemplos de agentes citotóxicos se incluyen, aunque sin limitaciones, tirapazimina, sertenef, caquectina, ifosfamida, tasonermina, lonidamina, carboplatino, altretamina, prednimustina, dibromodulcitol, ranimustina, fotemustina, nedaplatino, oxaliplatino, temozolomida, heptaplatino, estramustina, tosionato de impropil sulfano, trofosfamida, nimustina, cloruro de dibrospidio, pumitepa, loba-platino, satraplatino, profiromicina, cisplatino, irofulveno, dexifosfamida, cis-aminodicloro(2-metilpiridina) platino, bencilguanina, glufosfamida, GPX100,

tetracloruro de (trans,trans,trans)-bis-mu-(hexano-1,6-diamina)-mu-[diamina-platino(II)]bis[diamina(cloro)platino (II)], diarizidinil-espermina, trióxido de arsénico, 1-(11-dodecilamino-10-hidroxiundecil)-3,7-dimetilxantina, zorrubicina, idarrubicina, daunorrubicina, bisantreno, mitoxantrona, pirarubicina, pinafida, valrubicina, amrubicina, antineoplastona, 3'-deamino-3'-morfolino-13-deoxo-10-hidroxicarminomicina, anamicina, galarrubicina, elinafida, MEN10755 y 4-demetoxi-3-deamino-3-aziridinil-4-metilsulfonildaunorrubicina (véase el documento WO 00/50032).

10 Entre los ejemplos de inhibidores de la microtubulina se incluyen paclitaxel, sulfato de vindesina, 3',4'-didehidro-4'-deoxi-8'-norvincaleucoblastina, docetaxol, rizoxina, dolastatina, isetionato de mivobulina, auristatina, cemadotina, RPR109881, BMS184476, vinflunina, criptoficina, 2,3,4,5,6-pentafluoro-N-(3-fluoro-4-5 metoxifenil)bencenosulfonamida, anhidrovinblastina, N,N-dimetil-L-valil-L-valil-N-metil-L-valil-L-prolil-L-prolina-t-butilamida, TDX258 y
15 BMS188797.

Algunos ejemplos de inhibidores de la topoisomerasa son topotecán, hicaftamina, irinotecán, rubitecán, 6-etoxipropionil-3',4'-O-exobencilideno-chartreusina, 9-metoxi-N,N-dimetil-5-nitropirazolo[3,4,5-kl]acridina-2-(6H)propanamina, 1-amino-9-etil-5-fluoro-2,3-dihidro-9-hidroxi-4-metil-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4': b,7]indolizino[1,2b]quinolina-10,13(9H,15H)diona, lurtotecán, 7-[2-(N-isopropilamino)etil]-(20S)-camptotecina, BNP1350, BNPI1100, BN80915, BN80942, fosfato de etopósido, tenipósido, sobuzoxano, 2'-
25 dimetilamino-2'-deoxietopósido, GL331, N-[2-(dimetilamino)etil]-9-hidroxi-5,6-dimetil-6H-pirido[4,3-b]carbazol-1-carboxamida, asulacrina, (5a,5aB,8aa,9b)-9-[2-[N-[2-(dimetilamino)etil]-N-metilamino]etil]-5-[4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil]-5,5a,6,8,8a,9-hexohidrofuro(3',4':6,7)nafto(2,3-d)-1,3-dioxol-6-ona, 2,3-(metilendioxi)-5-metil-7-hidroxi-8-metoxibenzo[c]fen-antridinio, 6,9-bis[(2-aminoetil)amino]benzo[g]isoquinolina-5,10-diona, 5-(3-aminopropilamino)-
30 7,10-dihidroxi-2-(2-hidroxi-etilaminometil)-6H-pirazolo[4,5,1-de]acridin-6-ona, N-[1-[2(dietilamino)etilamino]-7-metoxi-9-oxo-9H-tioxanten-4-ilmetil]form-

- amida, N-(2-(dimetilamino)etil) acridina-4-carboxamida, 6-[[2-(dimetilamino)-etil]-amino]-3-hidroxi-7H-indeno[2,1-c]quinolina-7-ona y dimesna. Entre los «agentes antiproliferativos» se incluyen oligonucleótidos complementarios de ARN y ADN, como G3139, ODN698, RVASKRAS, GEM231 e INX3001 y
- 5 antimetabolitos como enocitabina, carmofur, tegafur, pentostatina, doxi-
fluridina, trimetrexato, fludarabina, capecitabina, galocitabina, ocfosfato de
citarabina, hidrato sódico de fosteabina, raltitrexed, paltitrexid, emitfur,
tiazofurina, decitabina, nolatrexed, pemetrexed, neizarabina, 2'-deoxi-2'-
metilidenecitidina, 2'-fluorometileno-2'-deoxicidina, N-[5-(2,3-dihidrobenczo-
10 furil)sulfonil]-N'-(3,4-diclorofenil)urea, N6-[4-deoxi-4-[N2-[2(E),4(E)-tetradeca-
dienoil]glicilamino]-L-glicero-B-L-mano-heptopiranosil]adenina, aplidina,
ecteinascidina, troxacitabina, ácido 4-[2-amino-4-oxo-4,6,7,8-tetrahidro-3H-
pirimidino[5,4-b][1,4]tiazin-6-il-(S)-etil]-2,5-tienoil-L-glutámico, aminopterina,
15 5-fluorouracilo, alanosina, éster del ácido 11-acetil-8-(carbamoiloximetil)-4-
formil-6-metoxi-14-oxa-1,11-díaza-tetraciclo(7.4.1.0.0)tetradeca-2,4,6-trien-9-
ilacético, swainsonina, lometrexol, dexrazoxano, metioninasa, 2'-ciano-2'-
deoxi-N4-palmitoil-1-B-D-arabinofuranosil citosina y 3-aminopiridina-2-car-
boxaldehído de tiosemicarbazona. «Los agentes antiproliferativos» también
incluyen anticuerpos monoclonales frente a factores de crecimiento, aparte
20 de los enumerados entre los «inhibidores de la angiogénesis», como trastu-
zumab y genes supresores tumorales, como p53, que se puede administrar
a través de transferencia génica mediada por virus recombinantes (véase la
patente de EE. UU. N° 6.069.134, por ejemplo).
- 25 Como se establece anteriormente, los compuestos según la fórmula I son
moduladores eficaces (activadores o inhibidores) de una o más proteína
quinasas seleccionadas entre el grupo compuesto por Raf, Mek, PKB, Tie2,
PDGFR y VEGFR.
- 30 Por tanto, una realización preferida de la presente invención son compuestos
de fórmula I como activadores o inhibidores de proteína cinasas.

Una realización particularmente preferida de la presente invención son compuestos de formula I como activadores o inhibidores de proteína cinasas, caracterizada porque la proteína cinasa es MEK1 o MEK2.

- 5 De este modo, los compuestos de la invención también pueden ser útiles como reactivos para el estudio de la transducción de señales, proteína cinasas o cualquiera de los trastornos enumerados a lo largo de esta solicitud.

- 10 Para la identificación de una ruta de transducción de señales y la detección de interferencias con otras rutas de señalización, varios científicos han generado modelos o sistemas de modelos adecuados, por ejemplo, modelos de cultivos celulares (p. ej., Khwaja y col., EMBO, 1997, 16, 2783-93) y modelos de animales transgénicos (p. ej., White y col., Oncogene, 2001, 20, 7064-7072). Para el estudio de etapas en particular de la cascada de transducción de señales, se pueden usar compuestos de interferencia para la modulación de la señal (p. ej., Stephens y col., Biochemical J., 2000, 351, 95-105). Los compuestos según la invención también pueden ser útiles como reactivos para el estudio de rutas de transcripción de señales dependientes de cinasas en animales y/o cultivos celulares o cualquiera de los trastornos clínicos
- 15
- 20 enumerados a lo largo de esta solicitud.

- La determinación de la actividad cinasa es una técnica bien conocida factible para cualquier experto en la materia. Los sistemas genéricos de análisis para la detección de la actividad cinasa con sustratos, por ejemplo, histona
- 25 (p. ej., Alessi y col., FEBS Lett. 1996, 399, 3, páginas 333-8) o proteína básica de la mielina están bien descritos en la literatura (p. ej., Campos-González, R. y Glenney, Jr., J.R. 1992 J. Biol. Chem. 267, páginas 14535).

- Para la identificación de inhibidores de cinasas, se dispone de diversos sistemas de ensayo (véase, por ejemplo, Walters y col., Nature Drug Discovery 2003, 2; páginas 259-266). Por ejemplo, en ensayos de centelleo por proximidad (p. ej., Sorg y col., J. of Biomolecular Screening, 2002, 7, 11-19) o
- 30

ensayos en FlashPlate, se puede medir la fosforilación de una proteína o de un péptido como sustrato con γ ATP. En presencia de un compuesto inhibidor no hay señal o se detecta una señal radioactiva reducida. Además, las tecnologías de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia resuelta en tiempo homogénea (HTR-FRET) y polarización por fluorescencia (FP) son útiles como métodos de ensayo (por ejemplo, Sills y col., J. of Biomolecular Screening, 2002: 191-214).

Otros métodos de ensayo no reactivos basados en la técnica de ELISA utilizan fosfo-anticuerpos (fosfo-Ac) específicos. Los fosfo-Ac se unen solo al sustrato fosforilado.

Esta unión se puede detectar con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa y medir, por ejemplo, mediante quimiofluorescencia (p. ej., Ross y col., Biochem. J., 2002, 366: 977-981).

Se conocen otros ensayos de la literatura que podrían ser realizados fácilmente por expertos en la materia (véase, por ejemplo, Dhanabal y col., Cancer Res. 59:189-197; Xin y col., J. Biol. Chem. 274:9116-9121; Sheu y col., Anticancer Res. 18:4435-4441; Ausprunk y col., Dev. Biol. 38:237-248; Gimbrone y col., J. Natl. Cancer Inst. 52:413-427; Nicosia y col., In Vitro 18:538-549).

Una realización preferida adicional de la presente invención es una composición farmacéutica, caracterizada porque contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos según la invención.

Una realización adicional de la presente invención es una composición farmacéutica, caracterizada porque además contiene uno o más compuestos adicionales, seleccionados entre el grupo compuesto por agentes excipientes, auxiliares, adyuvantes, diluyentes, vehículos fisiológicamente aceptables

y principios farmacéuticamente activos distintos a los compuestos según la invención.

- 5 Una realización adicional preferida de la presente invención es un juego (kit) compuesto de envases separados con
- a) una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos según la invención y
 - b) una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más principios farmacéuticamente activos distintos a los compuestos según la invención.

- 10 Una realización adicional de la presente invención es un proceso para la fabricación de dichas composiciones farmacéuticas, caracterizado porque uno o más compuestos según la invención y uno o más compuestos seleccionados entre el grupo compuesto por excipientes sólidos, líquidos o semi-
- 15 líquidos, auxiliares, adyuvantes, diluyentes, vehículos y principios farmacéuticamente activos distintos a los compuestos según la invención, se convierten en una forma de dosificación adecuada.

- 20 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse por cualquier medio que logre la finalidad pretendida. Por ejemplo, la administración puede ser por vía oral, parenteral, tópica, enteral, intravenosa, intramuscular, inhalada, nasal, intraarticular, intraespinal, transtraqueal, transocular, subcutánea, intraperitoneal, transdérmica o bucal. Alternativamente, o de forma concurrente, la administración puede ser por vía
- 25 oral. La dosis administrada dependerá de la edad, el estado de salud y el peso del receptor, el tipo de tratamiento concurrente, si lo hubiera, frecuencia de tratamiento y la naturaleza del efecto deseado. Se prefiere la administración parenteral. Es especialmente preferida la administración oral.

- 30 Entre las formas de administración idóneas se incluyen, aunque sin limitaciones, cápsulas, comprimidos, pellas, grageas, semisólidos, polvos, granulados, supositorios, pomadas, cremas, lociones, inhaladores, inyecciones,

cataplasmas, geles, parches, colirios, solución, jarabes, aerosoles, suspensión o emulsión, que pueden producirse según métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe a continuación:

5 comprimidos:

mezcla del principio o principios activos y los compuestos auxiliares, compresión de dicha mezcla en los comprimidos (compresión directa), granulación opcional de parte de la mezcla antes de la compresión.

10 cápsulas:

mezcla del principio o principios activos y los compuestos auxiliares para obtener un polvo fluido, opcionalmente, granulación del polvo, relleno de las cápsulas abiertas con el polvo/granulado, cierre de las cápsulas.

15 semisólidos (pomadas, geles y cremas):

disolución/dispersión del principio o principios activos en un vehículo acuoso u oleoso; mezcla posterior de la fase acuosa/oleosa con la fase oleosa/acuosa complementaria y homogeneización (sólo las cremas).

20 supositorios (por vía rectal y vaginal):

disolución/dispersión del principio o principios activos en el material vehículo capaz de licuarse mediante calor (vía rectal: el material vehículo normalmente es una cera; vía vaginal: el vehículo normalmente es una solución calentada de un agente gelificante), vaciado de dicha mezcla dentro de los
25 moldes de supositorio, endurecimiento por calor y extracción de los supositorios de los moldes.

aerosoles:

dispersión/disolución del principio o principios activos en un propulsor, embotellado de dicha mezcla en un nebulizador.
30

En general, las vías no químicas para la producción de composiciones farmacéuticas y/o preparaciones farmacéuticas comprenden las etapas de procesamiento con medios mecánicos adecuados conocidos en la técnica que transfieren uno o más compuestos según la invención a una forma de dosificación adecuada para su administración a un paciente que necesita dicho tratamiento. Normalmente, la transferencia de uno o más compuestos según la invención a esta forma de dosificación comprende la adición de uno o más compuestos, seleccionados entre el grupo compuesto por vehículos, excipientes, compuestos auxiliares y farmacéuticamente activos distintos a los compuestos según la invención. Entre las etapas de procesamiento idóneas se incluyen, pero sin limitaciones, combinar, moler, mezclar, granular, disolver, dispersar, homogeneizar, vaciar y/o comprimir los respectivos principios activos y no activos. Los sistemas mecánicos para realizar dichos pasos de procesamiento son conocidos en la técnica a partir, por ejemplo, de Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5ª Edición. A este respecto, los principios activos son, preferiblemente, al menos un compuesto según esta invención y uno o más compuestos adicionales distintos a los compuestos según la invención, que muestran propiedades farmacéuticas valiosas, preferiblemente aquellos principios farmacéuticamente activos distintos a los compuestos según la invención, que se describen en este documento.

Especialmente idóneos para su uso oral son los comprimidos, píldoras, comprimidos recubiertos, cápsulas, polvos, granulados, jarabes, zumos o gotas, idóneos para el uso rectal son los supositorios, idóneos para su uso parenteral son las soluciones, especialmente soluciones a base de aceite o acuosas, además de suspensiones, emulsiones o implantes, e idóneas para su uso tópico son las pomadas, cremas o polvos. Los nuevos compuestos también pueden liofilizarse y los liofilizados resultantes pueden utilizarse, por ejemplo, para la preparación de preparaciones para inyección. Las preparaciones indicadas pueden ser esterilizadas y/o contener agentes auxiliares como lubricantes, conservantes, estabilizantes y/o humectantes, emulsionantes, sales para modificar la presión osmótica, sustancias tamponadoras,

colorantes, saborizantes y/o una diversidad de otros principios activos, por ejemplo, una o más vitaminas.

5 Son excipientes idóneos las sustancias orgánicas o inorgánicas, que son adecuadas para la administración enteral (por ejemplo, oral), parenteral o tópica y no reaccionan con los compuestos nuevos, por ejemplo, agua, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, glicoles de alquileo, glicoles de polietileno, triacetato de glicerol, gelatina, hidratos de carbono, como lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol o almidón (almidón de maíz, almidón de trigo, 10 almidón de arroz o almidón de patata), preparaciones de celulosa y/o fosfatos cálcicos, por ejemplo, fosfato tricálcico o fosfato cálcico de hidrógeno, estearato de magnesio, talco, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, polivinilpirrolidona y/o vaselina.

15 Si se desea, pueden añadirse agentes de desintegración, como los almidones mencionados anteriormente y, también, almidón carboximetilo, polivinilpirrolidona entrecruzada, agar, ácido algínico o una sal del mismo, como alginato sódico. Entre los compuestos auxiliares se incluyen, sin limitaciones, 20 agentes de regulación del flujo y lubricantes, por ejemplo, sílice, talco, ácido esteárico o sales del mismo, como estearato de magnesio o estearato cálcico y/o polietilenglicol. Se proporcionan núcleos de grageas con recubrimientos adecuados, que, si se desea, son resistentes a los jugos gástricos. Con este fin, pueden utilizarse soluciones concentradas de sacáridos, que 25 opcionalmente pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, lacas en solución y solventes orgánicos adecuados o mezclas de solventes. Para producir recubrimientos resistentes a los jugos gástricos o proporcionar una forma de administración que ofrezca la ventaja de una acción prolongada, el comprimido, gragea o píldora puede 30 comprender un componente de dosificación interno y un componente de dosificación externo posterior que esté en forma de un envoltorio sobre el anterior. Los dos componentes pueden estar separados por una capa enté-

rica, que sirve como resistencia a la desintegración en el estómago y permite que el componente interno pase intacto al duodeno o que se retrase su liberación. Pueden usarse diversos materiales para estas capas o revestimientos entéricos, entre estos materiales se incluyen varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales como goma laca shellac, alcohol acetilo, soluciones de preparaciones adecuadas de celulosa, como ftalato de acetilcelulosa, acetato de celulosa o ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa. Pueden añadirse soluciones colorantes o pigmentos a los comprimidos o a las grageas recubiertas para su identificación o para caracterizar combinaciones de dosis de compuestos activos.

Las sustancias vehículo idóneas son sustancias orgánicas o inorgánicas que son idóneas para la administración enteral (p. ej., oral), parenteral o para la aplicación tópica y no reaccionan con los compuestos nuevos como, por ejemplo, agua, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, polietilenglicoles, gelatina, hidratos de carbono, como lactosa o almidón, estearato de magnesio, talco y vaselina. En particular, se usan para administración enteral comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas, jarabes, suspensiones, gotas o supositorios; además se usan para administración parenteral suspensiones, emulsiones o implantes y se usan para aplicación tópica pomadas, cremas o polvos. Los nuevos compuestos también pueden liofilizarse y los liofilizados obtenidos pueden usarse, por ejemplo, para la producción de preparaciones para inyección.

Las preparaciones indicadas pueden esterilizarse y/o pueden contener excipientes, como compuestos lubricantes, conservantes, esterilizantes y/o humectantes, emulsionantes, sales que afectan a la presión osmótica, sustancias tamponadoras, colorantes, saborizantes y/o aromatizantes. También pueden contener, si se desea, uno o más compuestos activos adicionales, por ejemplo, una o más vitaminas.

Entre otras preparaciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral, se incluyen cápsulas duras de gelatina, así como cápsulas blandas selladas de gelatina y un plastificador, como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los compuestos activos en forma de gránulos que pueden
5 mezclarse con cargas como lactosa, aglutinantes como almidones y/o lubricantes, como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos preferiblemente se disuelven o resuspenden en líquidos adecuados, como aceites grasos o parafina líquida. Además, pueden añadirse estabilizantes.

10

Las formas líquidas en las que las composiciones nuevas de la presente invención pueden incorporarse para su administración por vía oral incluyen soluciones acuosas, jarabes con el sabor adecuado, suspensiones acuosas u oleosas y emulsiones con sabores de aceites comestibles, como aceite de
15 semillas de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco o aceite de cacahuete, así como elixires y vehículos farmacéuticos similares. Entre los agentes dispersantes o de suspensión para suspensiones acuosas se incluyen gomas sintéticas y naturales como goma de tragacanto, de acacia, alginato, dextrano, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, polivinilpirrolidona o gelatina.
20

Entre las formulaciones idóneas para la administración parenteral se incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en una forma soluble en agua, por ejemplo, sales solubles en agua y soluciones alcalinas. Además,
25 pueden administrarse suspensiones de los compuestos activos como suspensiones oleosas apropiadas para inyección. Entre los solventes o vehículos lipófilos adecuados se incluyen ácidos grasos, por ejemplo, el aceite de sésamo, o ésteres sintéticos de ácidos grasos, por ejemplo, oleato de etilo, triglicéridos o polietilenglicol-400 (los compuestos son solubles en PEG-400).

30

Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumenten la viscosidad de la suspensión como, por ejemplo, carboximetil-

celulosa sódica, sorbitol y/o dextrano, opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes.

5 Para su administración mediante inhalación, es posible utilizar aerosoles en los cuales el principio activo se disuelve o resuspende en un gas propulsor o en una mezcla de gas propulsor (por ejemplo, CO₂ o clorofluorocarbonos). El principio activo se utiliza de forma ventajosa aquí en forma micronizada, en cuyo caso, pueden estar presentes uno o más solventes adicionales fisiológicamente aceptables como, por ejemplo, etanol. Pueden administrarse
10 soluciones para inhalación con la ayuda de inhaladores convencionales.

Entre las preparaciones farmacéuticas posibles que pueden usarse por vía rectal se incluyen, por ejemplo, supositorios, que están compuestos de una combinación de uno o más compuestos activos con una base para suposito-
15 rios. Las bases para supositorios idóneas son, por ejemplo, triglicéridos naturales o sintéticos, o hidrocarburos parafínicos. Además, también es posible usar cápsulas rectales de gelatina que están compuestas por una combinación de los compuestos activos con una base. Entre los posibles materiales base se incluyen, por ejemplo, triglicéridos líquidos, polietilenglicoles o hidro-
20 carburos parafinados.

Para su uso en medicina, los compuestos de la presente invención estarán en forma de sales farmacéuticamente aceptables. Sin embargo, pueden ser útiles otras sales en la preparación de los compuestos según la invención o
25 de sus sales farmacéuticamente aceptables. Entre las sales idóneas farmacéuticamente aceptables de los compuestos de esta invención se incluyen sales de adición de ácido que pueden, por ejemplo, estar formadas por la mezcla de una solución del compuesto según la invención con una solución de un ácido farmacéuticamente aceptable, como ácido clorhídrico, ácido
30 sulfúrico, ácido metanosulfónico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido acético, ácido benzoico, ácido oxálico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido carbónico o ácido fosfórico. Adicionalmente, cuando los com-

5 puestos de la invención llevan un resto ácido, las sales idóneas farmacéu-
ticamente aceptables de los mismos pueden incluir sales de metales alcali-
nos, p. ej., sales sódicas o de potasio; sales de metales alcalinotérreos, p.
ej., sales de calcio o magnesio, y sales formadas con bases orgánicas idó-
neas, p. ej., sales de amonio cuaternario.

10 La presente invención incluye dentro de su objetivos profármacos de los
compuestos de la presente invención mencionados anteriormente. En gene-
ral, estos profármacos serán derivados funcionales de los compuestos de la
presente invención, que se convierten fácilmente *in vivo* en el compuesto
requerido de la presente invención. Los procedimientos convencionales para
la selección y preparación de derivados profármaco adecuados se descri-
ben, por ejemplo, en Design of Prodrugs, ed., H. Bundgaard, Elsevier, 1985.

15 Las preparaciones farmacéuticas pueden emplearse como medicamentos en
medicina humana y veterinaria. Según se usa en este documento, el término
«cantidad eficaz» significa la cantidad de un fármaco o agente farmacéutico
que inducirá la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o
humano que, por ejemplo, un investigador o un médico está buscando. Adi-
20 cionalmente, el término «cantidad terapéuticamente eficaz» significa cual-
quier cantidad que, en comparación con un sujeto correspondiente que no
ha recibido dicha cantidad, produce una mejora del tratamiento, curación,
prevención o mejoría de una enfermedad, trastorno o efecto adverso, o una
disminución de la velocidad de avance de una enfermedad o trastorno. El
25 término también incluye dentro de su alcance cantidades eficaces para
potenciar una función fisiológica normal. Dicha cantidad terapéuticamente
eficaz de uno o más de los compuestos según la invención es conocida para
el experto en la materia o puede determinarse fácilmente mediante métodos
conocidos en la técnica.

30 Las sustancias según la invención se administran generalmente de forma
análoga a las preparaciones comerciales. Normalmente, las dosis idóneas

que son terapéuticamente eficaces están dentro del intervalo entre 0,0005 mg y 1.000 mg, preferiblemente entre 0,005 mg y 500 mg y, especialmente, entre 0,5 y 100 mg por unidad de dosis. La dosis diaria está, preferiblemente, entre aproximadamente 0,001 y 10 mg/kg de peso corporal.

5

Los expertos en la materia apreciarán fácilmente que los niveles de dosis pueden variar en función del compuesto específico, la gravedad de los síntomas y la susceptibilidad del sujeto a los efectos adversos. Algunos de los compuestos específicos son más potentes que otros. Los expertos en la técnica determinan fácilmente las dosis preferidas de un compuesto dado mediante una diversidad de medios. Un medio preferido es medir la potencia fisiológica de un compuesto determinado.

10

El hospedador, o paciente, puede pertenecer a cualquier especie de mamíferos, p. ej., primate sp; especialmente humano; roedores, como ratones, ratas y hámsters; conejos, équidos, bóvidos, cánidos, félidos, etc. Los modelos animales son interesantes para las investigaciones experimentales, proporcionando un modelo para el tratamiento de una enfermedad humana.

15

La dosis específica para el paciente individual depende, sin embargo, de una multitud de factores, por ejemplo, de la eficacia de los compuestos específicos empleados, edad, peso corporal, estado de salud general, sexo, tipo de dieta, tiempo y vía de administración, tasa de excreción, tipo de administración y forma de dosificación que se va a administrar, la combinación farmacéutica y la gravedad del trastorno en particular al que se refiere el tratamiento. La dosis eficaz terapéutica específica para el paciente individual puede determinarse fácilmente mediante experimentación de rutina, por ejemplo, por el doctor o el médico, que aconseja o atiende al tratamiento terapéutico.

20

25

30

En el caso de trastornos hiperproliferativos, la susceptibilidad de una célula en particular al tratamiento con los compuestos en cuestión puede ser deter-

minada mediante pruebas *in vitro*. Normalmente, se combina un cultivo de las células con el compuesto en cuestión a diversas concentraciones durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que los principios activos induzcan la muerte celular o inhiban la migración, normalmente entre aproximadamente una hora y una semana. Para la prueba *in vitro*, pueden usarse cultivos celulares de una muestra de biopsia. A continuación, se hace un recuento de las células viables que quedan después del tratamiento.

La dosis variará dependiendo del compuesto específico utilizado, del trastorno específico, del estado del paciente, etc. Normalmente, una dosis terapéutica será suficiente para reducir sustancialmente la población celular no deseada en el tejido diana, al tiempo que se mantiene la viabilidad del paciente. El tratamiento generalmente continuará hasta que exista una reducción sustancial, por ejemplo, al menos aproximadamente el 50%, una reducción de la carga celular, y puede continuarse hasta que no exista esencialmente ninguna célula no deseada detectada en el organismo.

Incluso sin más detalles, cabe suponer que una persona experta en la materia podrá utilizar la descripción anterior en su sentido más amplio. Por ello, las realizaciones preferidas deben considerarse meras descripciones y en modo alguno restrictivas.

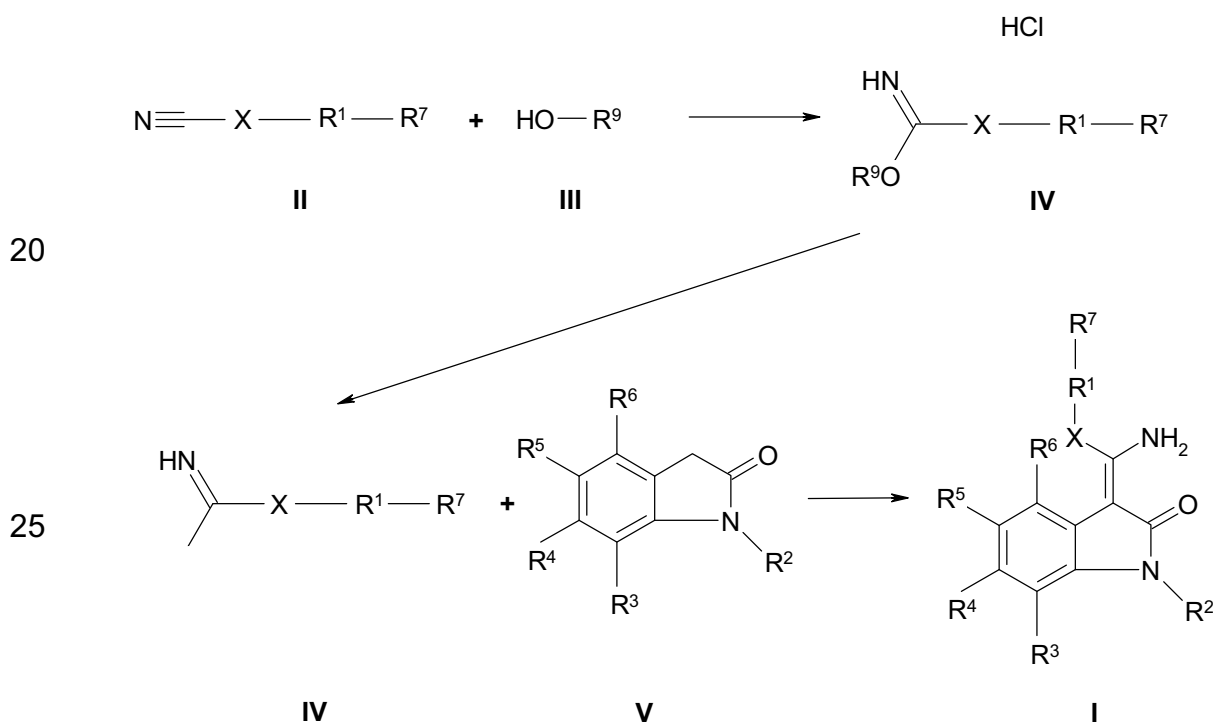
Anteriormente y a partir de ahora, todas las temperaturas se indican en °C. En los ejemplos siguientes, «trabajo convencional» significa que, si es necesario, se elimina el solvente, si es necesario, se añade agua y, si es necesario se ajusta el pH entre 2 y 10; dependiendo de la constitución del producto final, la mezcla se extrae con acetato de etilo o diclorometano, las fases se separan, la fase orgánica se lava con una solución de NaHCO₃ saturado, si se desea con agua y solución de NaCl saturado, se seca sobre sulfato sódico, se filtra y evapora, y el producto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice, mediante HPLC preparativa y/o cristalización. Si se desea, los compuestos purificados se liofilizan.

Espectrometría de masas (EM): ESI (ionización por electropulverización) (M+H)⁺

Lista de abreviaturas y acrónimos:

- 5 AcOH: ácido acético; anh: anhídrido, atm: atmósfera(s), BOC: tert-butoxi-carbonilo; CDI: 1,1'-carbonildiimidazol, conc: concentrado, d: día(s), desc: descomposición; DMAC: NN-dimetilacetamida, DMPU: 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinona; DMF: NN-dimetilformamida, DMSO: dimetil-sulfóxido; DPPA: difenilfosforilazida; EDCI: 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etil-carbodiimida; EtOAc: acetato de etilo; EtOH: etanol (100%), Et₂O: éter dietílico; Et₃H: trietilamina; h: hora(s); MeOH: metanol, éter pet.: éter de petróleo (intervalo de ebullición 30-60°C); temp.: temperatura; THF: tetra-hidrofurano; TFA: trifluoro AcOH; Tf: trifluorometanosulfonilo.
- 10

15 Ejemplo 1: Preparación de amino-oxindoles



- 30 Se disuelve 1 equivalente de un nitrilo sustituido aromático o heteroaromático (aquí un compuesto de fórmula II, donde R¹ es fenilo, R⁷ es I, X es (CH₂)_p y p = 0) en 1,4-dioxano. Tras la adición de 1,3 equivalentes de un

alcohol de cadena lineal o ramificada de fórmula III (donde R^9 es $(CH_2)_q$ y q es 1 – 10), se introduce gas HCl a 10°C durante 6 h. El sedimento resultante (compuesto de fórmula IV) se filtra, se lava con dioxano y se seca al vacío.

5 IVa) clorhidrato del éster etilo del ácido 3-yodo-bencimídico: 6,05 g (81%), polvo incoloro; HPLC: 2,11 min; CL-EM: 262,0 m/z.

IVb) clorhidrato del éster etilo del ácido 4-yodo-bencimídico: 4,80 g (62%), cristal beige; HPLC: 2,00 min; CL-EM: 262,0 m/z.

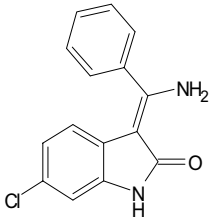
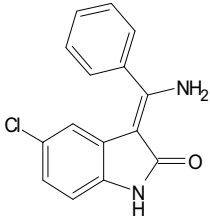
10 Se disuelve trietilamina (3 eq.), el compuesto de fórmula IV (2 eq.) y el compuesto de fórmula V (1 eq.) en 1-butanol (7 eq.) y se irradia durante 70 min a 200°C en un microondas. El producto resultante (compuesto respectivo de fórmula 1, véase la siguiente tabla) se purifica mediante columna de cromatografía.

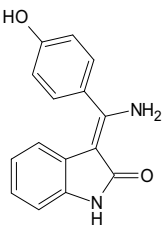
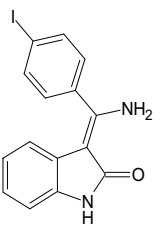
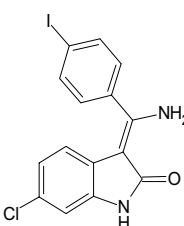
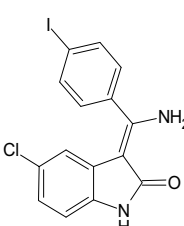
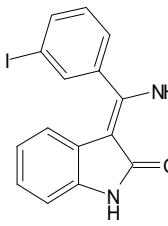
15

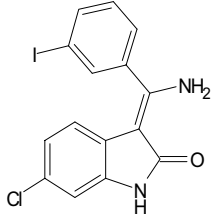
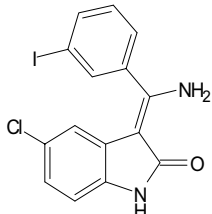
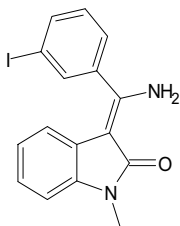
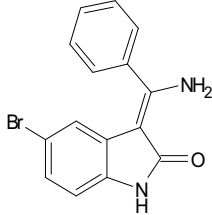
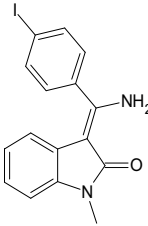
20

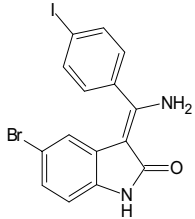
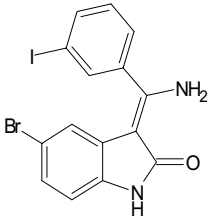
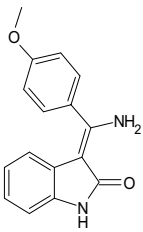
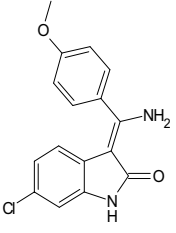
25

30

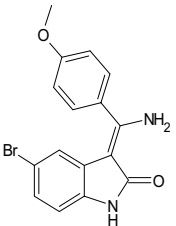
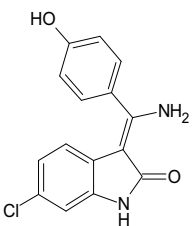
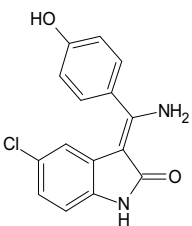
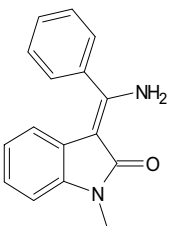
Nº	Estructura	Cantidad / mg	Rendi- miento / %	Tiempo de retención en HPLC / min	CL-EM / mz-1	IC ₅₀
a	 3-[amino-fenil-metilen]-6-cloro- 1,3-dihidro-indol-2-ona	37	22	2,77	271,0	1,10E-06
b	 3-[amino-fenil-metilen]-5-cloro- 1,3-dihidro-indol-2-ona	47	29	2,75	271,0	2,60E-07

5	c	 3-[amino-(4-hidroxi-fenil)-metilen]- 1,3-dihidro-indol-2-ona	14	7	2,33	253,0	9,40E-07
10	d	 3-[amino-(4-yodo-fenil)-metilen]- 1,3-dihidro-indol-2-ona	16	6	2,83	363,0	2,70E-06
15	e	 3-[amino-(4-yodo-fenil)-metilen]- 6-cloro-1,3-dihidro-indol-2-ona	37	15	3,00	397,0	4,10E-06
20	f	 3-[amino-(4-yodo-fenil)-metilen]- 5-cloro-1,3-dihidro-indol-2-ona	19	8	2,95	397,0	1,10E-06
25							
30	g	 3-[amino-(3-yodo-fenil)-metilen]- 1,3-dihidro-indol-2-ona	44	16	2,79	363,0	n.d.

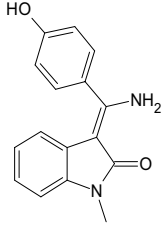
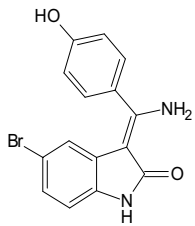
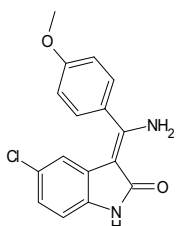
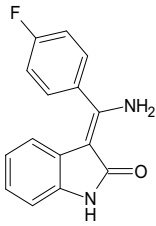
5	h	 3-[amino-(3-yodo-fenil)-metilen]- 6-cloro-1,3-dihidro-indol-2-ona	30	13	2,95	397,0	n.d.
10	i	 3-[amino-(3-yodo-fenil)-metilen]- 5-cloro-1,3-dihidro-indol-2-ona	44	19	2,91	397,0	n.d.
15	j	 3-[amino-(3-yodo-fenil)-metilen]- 1-metil-1,3-dihidro-indol-2-ona	43	17	2,97	377,0	n.d.
20	k	 3-[amino-fenil-metilen]-5-bromo- 1,3-dihidro-indol-2-ona	33	22	2,77	316,0	6,60E-07
25	l	 3-[amino-(4-yodo-fenil)-metilen]- 1-metil-1,3-dihidro-indol-2-ona	25	10	2,95	377,0	n.d.
30							

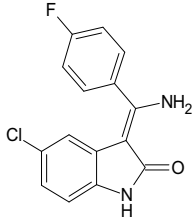
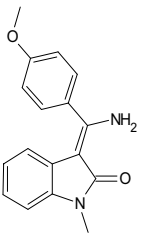
5	m	 3-[amino-(4-yodo-fenil)-metilen]- 5-bromo-1,3-dihidro-indol-2-ona	24	11	2,95	440,9	n.d.
10	n	 3-[amino-(3-yodo-fenil)-metilen]- 5-bromo-1,3-dihidro-indol-2-ona	20	10	2,95	440,8	3,40E-06
15	o	 3-[amino-(4-metoxi-fenil)-metilen]- 1,3-dihidro-indol-2-ona	21	10	2,59	267,2	3,10E-06
20	p	 3-[amino-(4-metoxi-fenil)- metilen]-6-cloro-1,3-dihidro-indol- 2-ona	37	20	2,72	301,0	8,70E-06
25							

5

q	 3-[amino-(4-metoxi-fenil)-metilen]-5-bromo-1,3-dihidro-indol-2-ona	25	15	2,73	345,0	n.d.
r	 3-[amino-(4-hidroxi-fenil)-metilen]-6-cloro-1,3-dihidro-indol-2-ona	98	19	2,49	287,0	n.d.
s	 3-[amino-(4-hidroxi-fenil)-metilen]-5-cloro-1,3-dihidro-indol-2-ona	260	51	2,47	287,0	n.d.
t	 3-[amino-fenil-metilen]-1-metil-1,3-dihidro-indol-2-ona	59	12	2,71	251,2	n.d.

30

5	u	 3-[amino-(4-hidroxi-fenil)-metilen]-1-metil-1,3-dihidro-indol-2-ona	70	13	2,48	267,2	n.d.
10	v	 3-[amino-(4-hidroxi-fenil)-metilen]-5-bromo-1,3-dihidro-indol-2-ona	64	14	2,52	331,0	n.d.
15	w	 3-[amino-(4-metoxi-fenil)-metilen]-5-cloro-1,3-dihidro-indol-2-ona	97	18	2,67	301,0	n.d.
20	x	 3-[amino-(4-fluoro-fenil)-metilen]-1,3-dihidro-indol-2-ona	47	12	2,6	255,2	n.d.

5	y	 3-[amino-(4-fluoro-fenil)-metilen]-5-cloro-1,3-dihidro-indol-2-ona	51	15	2,73	289,0	n.d.
10	z	 3-[amino-(4-metoxi-fenil)-metilen]-1-metil-1,3-dihidro-indol-2-ona	31	8	2,67	281,2	n.d.

15

Ejemplo 2: Ensayo celular para la determinación de la inhibición de MEK

Se evalúan los inhibidores de MEK determinando su capacidad para inhibir la fosforilación de la MAP cinasa (ERK) en células del carcinoma de colon 26 (C26) murino. Puesto que ERK1 y ERK2 representan los únicos sustratos conocidos de MEK1 y MEK2, la medición de la inhibición de la fosforilación de ERK en células proporciona una lectura directa de la inhibición celular de MEK por los compuestos de la invención. La detección de la fosforilación de ERK se realiza por inmunotransferencia o en formato ELISA. Brevemente, los ensayos implican el tratamiento de células C26 en crecimiento exponencial con concentraciones variables del compuesto de prueba (o vehículo control) durante una hora a 37°C. Para el ensayo de inmunotransferencia, se lavó el compuesto/vehículo de las células y estas se lisaron en una solución que contenía NaCl 70 mM, glicerol fosfato 50 mM, HEPES 10 mM, pH 7,4, Tritón X-100 al 1%, Na₃VO₄ 1 mM, PMSF 100 µM, leupeptina 10 µM y pepstatina 10 µM. A continuación, los sobrenadantes se sometieron a electroforesis en gel y se hibridaron con un anticuerpo primario que reconocía

doblemente ERK1 y ERK2 fosforiladas. Para evaluar los niveles totales de MAPK, se eliminaron los anticuerpos (stripping) de las transferencias y se volvieron a incubar con una mezcla 1:1 de anticuerpos policlonales que reconocían ERK1 y ERK2 sin fosforilar. Para el ensayo de ELISA de pERK, se adquirieron kits pERK TiterZyme Enzyme immunoassay de Assay Designs, Inc. (Ann Arbor, MI). Brevemente, las células se recogieron en solución de lisis que contenía B-glicerofosfato 50 mM, HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 70 mM, EDTA 2 mM y SDS al 1% y los lisados de proteínas se diluyeron 1:15 con el tampón de Assay suministrado antes de realizar el ensayo. Los pasos posteriores se realizaron esencialmente según las recomendaciones del fabricante.

Ejemplo 3: Ensayo de actividad cinasa del receptor de VEGF

La actividad cinasa del receptor de VEGF se mide mediante la incorporación de fosfato marcado radiactivamente al sustrato ácido poliglutámico/tirosina, 4:1 (pEY). El producto pEY fosforilado queda atrapado en una membrana de filtración y la incorporación del fosfato marcado radiactivamente se cuantifica mediante recuento de centelleo.

Material

Actividad cinasa del receptor de VEGF: los dominios tirosina cinasa intracelulares de KDR humano (Terman, B. I. y col. *Oncogene* (1991) Vol. 6, pág. 1677-1683.) y Flt-1 (Shibuya, M. y col. *Oncogene* (1990) Vol. 5, pág. 519-524) se clonaron como proteínas de fusión con el gen de glutatión S-transferasa (GST). Esto se realizó mediante la clonación del dominio citoplásmico de la cinasa KDR como una fusión en marco en el extremo carboxilo terminal del gen de GST. Las proteínas de fusión recombinantes GST-dominio cinasa solubles se expresan en células de insectos *Spodoptera frugiperda* (Sf21) (Invitrogen) usando un vector de expresión de baculovirus (pAcG2T, Pharmingen).

- Tampón de lisis: Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 0,5 M, DTT 5 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 al 0,5%, glicerol al 10%, leupeptina, pepstatina y aprotinina a 10 mg/ml cada una y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM (todos de Sigma).
- Tampón de lavado: Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 0,5 M, DTT 5 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 al 0,05%, glicerol al 10%, leupeptina, pepstatina y aprotinina a 10 mg/ml cada una y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM.
- Tampón de diálisis: Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 0,5 M, DTT 5 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 al 0,05%, glicerol al 50%, leupeptina, pepstatina y aprotinina a 10 mg/ml cada una y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM.
- Tampón de reacción 10x: Tris 200 mM, pH 7,4, NaCl 1,0 M, MnCl_2 50 mM, DTT 10 mM y albúmina sérica bovina [BSA] a 5 mg/ml (Sigma).
- Tampón de dilución de enzima: Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 0,1 M, DTT 1 mM, glicerol al 10% y BSA a 100 mg/ml.
- Sustrato 10x: 750 $\mu\text{g/ml}$ de poli(ácido glutámico/tirosina; 4:1) (Sigma).
- Solución de parada: ácido tricloroacético al 30%, fosfato sódico 0,2 M (ambos de Fisher).
- Solución de lavado: ácido tricloroacético al 15%, fosfato sódico 0,2 M.
- Placas de filtración
- Placa de 96 pocillos de fibra de vidrio MAFC NOB, GF/C de Millipore.

20

Método A: purificación de proteínas

1. Las células Sf21 se infectan con virus recombinantes con una multiplicidad de infección de 5 partículas de virus/célula y se cultivan a 27°C durante 48 horas.
2. Todas las etapas se realizan a 4°C. Las células infectadas se recogen mediante centrifugación a 1.000xg y se lisan a 4°C durante 30 minutos con 1/10 de volumen de tampón de lisis seguido de la centrifugación a 100.000xg durante 1 hora. A continuación, el sobrenadante se pasa a través de una columna de glutatión-Sepharosa (Pharmacia) equilibrada con tampón de lisis y se lava con 5 volúmenes del mismo tampón seguido de 5 volúmenes de tampón de lavado. La proteína GST-KDR recombinante se eluye con tampón

30

de lavado/glutación reducido 10 mM (Sigma) y se dializa frente al tampón de diálisis.

Método B: ensayo de la actividad cinasa del receptor de VEGF

- 5 1. Añadir 5 µl de inhibidor o control al ensayo en DMSO al 50%.
2. Añadir 35 µl de una mezcla de reacción que contenga 5 µl de tampón de reacción 10x, 5 µl de ATP 25 mM/10 µCi [³³P]ATP (Amersham) y 5 µl de sustrato 10x.
3. Iniciar la reacción mediante la adición de 10 µl de KDR (25 nM) en tampón de dilución de enzima.
- 10 4. Mezclar e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
5. Detener la reacción mediante la adición de 50 µl de solución de parada.
6. Incubar durante 15 minutos a 4°C.
7. Transferir una alícuota de 90 µl a una placa de filtración.
- 15 8. Aspirar y lavar 3 veces con solución de lavado.
9. Añadir 30 µl de líquido de centelleo, sellar la placa y contar en un contador de centelleo Microbeta de Wallace.

Ensayo de mitogénesis en células endoteliales de vena de cordón umbilical

- 20 La expresión de receptores de VEGF que median en las respuestas mitogénicas al factor de crecimiento se limita en gran medida a las células endoteliales vasculares. Las células endoteliales de vena de cordón umbilical (HUVEC) en cultivo proliferan en respuesta al tratamiento con VEGF y se
- 25 pueden utilizar como sistema de ensayo para cuantificar los efectos de los inhibidores de la cinasa KDR sobre la estimulación de VEGF. En el ensayo descrito, se tratan monocapas quiescentes de HUVEC con el vehículo o con el compuesto de prueba 2 horas antes de la adición de VEGF o factor de crecimiento de fibroblastos básico (BFGF). La respuesta mitogénica a VEGF
- 30 o BFGF se determina midiendo la incorporación de [³H]-timidina en el ADN celular.

Material

HUVEC: las células HUVEC congeladas como cultivo primario aislado se obtiene de Clonetics Corp. Las células se mantienen en medio de crecimiento endotelial (EGM; Clonetics) y se usan para los ensayos mitogénicos en los pases 3 a 7.

Placas de cultivo: placas de cultivo tisular de poliestireno de 96 pocillos NUNC LON (NUNC N.º de catálogo 167008).

Medio de ensayo: medio Eagle modificado de Dulbecco con 1 g/ml de glucosa (DMEM bajo en glucosa; Mediatech) más 10% (v/v) de suero bovino fetal (Clonetics).

Compuestos de prueba: las soluciones madre de trabajo de los compuestos de prueba se diluyen en serie en dimetilsulfóxido (DMSO) al 100% hasta 400 veces más que sus concentraciones finales deseadas. Las diluciones finales a una concentración 1x se hacen directamente en el medio de ensayo inmediatamente antes de la adición de las células.

Factores de crecimiento 10x: las soluciones de VEGF 165 humano (500 ng/ml; R&D Systems) y de BFGF (10 ng/ml; R&D Systems) se preparan en medio de ensayo.

[³H]-timidina 10x: la [metil-³H]-timidina (20 Ci/mmol; Dupont-NEN) se diluyó a 80 µCi/ml en DMEM bajo en glucosa.

Medio de lavado de células: solución salina equilibrada de Hank (Mediatech) con 1 mg/ml de albúmina sérica bovina (Boehringer-Mannheim).

Solución de lisis celular: NaOH 1 N, Na₂CO₃ al 2% (p/v).

Método 1

Las monocapas de células HUVEC mantenidas en EGM se recogen mediante tripsinización y se disponen en placas a una densidad de 4.000 células por cada 100 µl de medio de ensayo por pocillo en placas de 96 pocillos. El crecimiento celular se detiene durante 24 horas a 37°C en una atmósfera humidificada que contiene CO₂ al 5%.

Método 2

Se sustituye el medio de parada del crecimiento por 100 µl de medio de ensayo con vehículo (DMSO al 0,25% [v/v]) o la concentración final deseada de compuesto de prueba. Todas las determinaciones se realizan por triplicado. A continuación las células se incuban a 37°C/CO₂ al 5% durante 2 horas para permitir que los compuestos de prueba entren en las mismas.

Método 3

Después de un periodo de pretratamiento de 2 horas, las células se estimulan mediante la adición de 10 µl/pocillo de medio de ensayo, solución VEGF 10x o solución BFGF 10x. Las células se incuban, a continuación, a 37°C/CO₂ al 5%.

Método 4

Después de 24 horas en presencia de factores de crecimiento, se añade [³H]-timidina 10x (10 µl/pocillo).

Método 5

Tres días después de la adición de [³H]-timidina, se retira el medio por aspiración y se lavan las células dos veces con medio de lavado de células (400 µl/pocillo seguido por 200 µl/pocillo). Las células adherentes lavadas se solubilizan a continuación mediante la adición de solución de lisis celular (100 µl/pocillo) y calentamiento a 37°C durante 30 minutos. Los lisados celulares se transfieren a viales de centelleo de vidrio de 7 ml que contienen 150 µl de agua. Se añade el líquido de centelleo (5 ml/vial) y se determina la radioactividad asociada a las células mediante espectroscopía de centelleo líquido. Según estos ensayos, los compuestos de fórmula I son inhibidores de VEGF y son, por ello, idóneos para la inhibición de la angiogénesis, como en el tratamiento de enfermedades oculares, por ejemplo, retinopatía diabética, y para el tratamiento de carcinomas, por ejemplo, tumores sólidos. Los presentes compuestos inhiben la mitogénesis estimulada por VEGF de células endoteliales vasculares humanas en cultivo con valores de IC₅₀ de

0,01-5,0 μ M. Estos compuestos también muestran selectividad sobre tirosina cinasas relacionadas (p. ej., FGFR1 y la familia Src; para la relación entre cinasas Src y cinasas VEGFR, véase Eliceiri y col., Molecular Cell, Vol. 4, páginas 915-924, diciembre 1999).

5

Ejemplo 4: viales de inyección

Se ajusta a pH 6,5 una solución de 100 g de un compuesto activo de la presente invención y 5 g de hidrogenofosfato disódico en 3 l de agua bidestilada usando ácido clorhídrico 2 N, la solución se esteriliza por filtración, se coloca en viales de inyección que se liofilizan en condiciones estériles y se sellan asépticamente. Cada vial para inyección contiene 5 mg del compuesto activo.

15

Ejemplo 5: supositorios

Una mezcla de 20 g de un compuesto activo de la presente invención se combina con 100 g de lecitina de soja y 1.400 g de manteca de cacao, se vierte en los moldes y se deja enfriar. Cada supositorio contiene 20 mg del compuesto activo.

20

Ejemplo 6: solución

Se prepara una solución de 1 g de un compuesto activo de la presente invención, 9,38 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 28,48 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ y 0,1 g de cloruro de benzalconio en 940 ml de agua bidestilada. Se ajusta a pH 6,8, se completa hasta 1 l y se esteriliza por radiación. Esta solución puede usarse en forma de colirio.

30

Ejemplo 7: pomada

Se mezclan 500 mg de un compuesto activo de la presente invención con

99,5 g de vaselina en condiciones asépticas.

Ejemplo 8: comprimidos:

- 5 Se comprime una mezcla de 1 kg de un compuesto activo de la presente invención, 4 kg de lactosa, 1,2 kg de almidón de patata, 0,2 kg de talco y 0,1 kg de estearato de magnesio para obtener comprimidos de forma habitual, de manera que cada comprimido contiene 10 mg de compuesto activo.

10

Ejemplo 9: comprimidos recubiertos

- De forma análoga al ejemplo E, se prensan los comprimidos y, a continuación, se recubren de forma habitual usando un recubrimiento de sacarosa, almidón de patata, talco, goma de tragacanto y colorante.
- 15

Ejemplo 10: cápsulas

- Se colocan 2 kg de un compuesto activo de la presente invención dentro de cápsulas duras de gelatina de forma habitual, de modo que cada cápsula contiene 20 mg del compuesto activo.
- 20

25

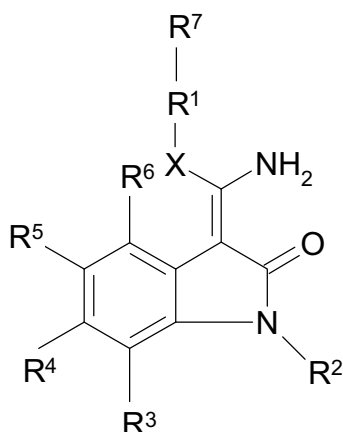
30

Reivindicaciones

1. Compuesto de fórmula I,

5

10



I

donde

15

X es $(CH_2)_p$,

p es 0 – 5,

R^1 es Ar o Het,

R^2, R^3, R^4, R^6, R^7 son H,

R^5 es Hal,

Ar es arilo,

20

Het es heteroarilo,

y las sales, solvatos y estereoisómeros de los mismos fisiológicamente aceptables, incluyendo mezclas de los mismos en todas las proporciones.

25

2. Compuesto según la reivindicación 1, seleccionado entre el grupo compuesto por

a) 3-(amino-fenil-metilen)-5-cloro-1,3-dihidro-indol-2-ona,

b) 3-(amino-fenil-metilen)-5-bromo-1,3-dihidro-indol-2-ona

y las sales, solvatos y estereoisómeros de los mismos fisiológicamente aceptables, incluyendo mezclas de los mismos en todas las proporciones.

30

3. Método para la fabricación de un compuesto según la fórmula I, caracterizado porque,

a) un nitrilo aromático o heteroaromático según la fórmula II,

5



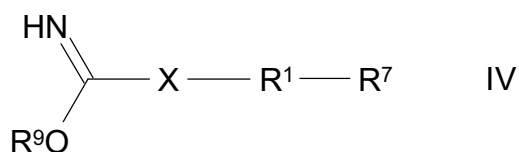
donde R^1 , R^7 y X son como se define en la reivindicación 1, reacciona con un alcohol de cadena lineal o ramificada según la fórmula III,

10



donde R^9 es $(\text{CH}_2)_q$ y q es 1 – 10,
y que el producto según la fórmula IV,

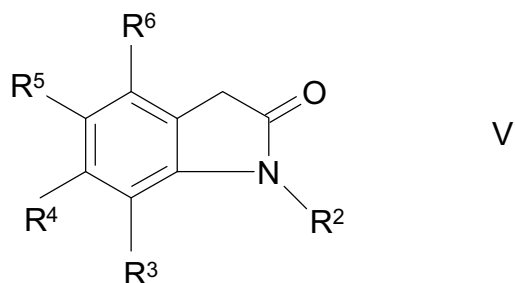
15



20

donde R^1 , R^7 , R^9 y X son como se define en la reivindicación 1, reacciona a continuación con un compuesto según la fórmula V,

25



30

donde R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 son como se define en la reivindicación 1,
o

- b) un compuesto de formula I se aísla y/o trata con un ácido o una base, para obtener la sal del mismo.
- 5 4. Compuesto según una de las reivindicaciones 1 o 2 como activador o inhibidor de proteína cinasas.
5. Compuesto según la reivindicación 4, caracterizado porque la proteína cinasa es MEK1 o MEK2.
- 10 6. Uso de un compuesto según una de las reivindicaciones 1 o 2 para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de trastornos.
- 15 7. Uso según la reivindicación 6, caracterizado porque los trastornos son causados, mediados y/o propagados por proteína cinasas.
8. Uso según la reivindicación 7, caracterizado porque las proteína cinasas son MEK1 o MEK2.
- 20 9. Uso según una de las reivindicaciones 6, 7 u 8, caracterizado porque los trastornos se seleccionan entre el grupo compuesto por trastornos hiperproliferativos y no hiperproliferativos.
- 25 10. Uso según una de las reivindicaciones 6, 7, 8 o 9, caracterizado porque el trastorno es no canceroso.
- 30 11. Uso según una de las reivindicaciones 6, 7, 8, 9 o 10, caracterizada porque los trastornos se seleccionan entre el grupo compuesto por psoriasis, artritis, artritis reumatoide, inflamación, endometriosis, deformidad cicatricial, infección o enfermedades infecciosas, por ejemplo, infección por *Helicobacter pylori*, infección por el virus Influenza A, hiperplasia prostática benigna, inmunodeficiencias, enfermedad autoimmune,

- enfermedades inmunológicas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, enfermedad inflamatoria intestinal, fibrosis, aterosclerosis, restenosis, enfermedad vascular, enfermedad cardiovascular, enfermedad renal y trastornos de la angiogénesis, trastornos proliferativos de células mesangiales, nefropatía diabética, retinopatía diabética, nefroesclerosis maligna, síndromes de microangiopatía trombótica, rechazo de trasplante de órganos, glomerulopatías, trastornos metabólicos y enfermedades neurodegenerativas.
- 5
- 10 12. Uso según una de las reivindicaciones 6, 7, 8 o 9, caracterizado porque el trastorno es cáncer.
13. Uso según una de las reivindicaciones 6, 7, 8, 9 o 12, caracterizado por-
que los trastornos se seleccionan entre el grupo compuesto por mela-
noma, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, carcinoma de pulmón no
15 microcítico, cáncer espinocelular, cáncer de colon, cáncer de duodeno, cáncer ductal, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de estómago, cáncer pancreático, cáncer hepático, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de
20 próstata, cáncer de mama, cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer de esófago, cáncer ginecológico, mucosa bucal displásica, poliposis, cáncer bucal invasivo, cáncer de tiroides, linfoma, leucemia crónica y leucemia aguda.
- 25 14. Uso según una de las reivindicaciones 6 a 13, caracterizado porque una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos según una de las reivindicaciones 1 o 2 se administra en combinación con un com-
puesto seleccionado entre el grupo formado por moduladores de recep-
tores de estrógenos, moduladores de receptores de andrógenos, modu-
30 ladores de receptores retinoides, agentes citotóxicos, agentes antiprolife-
rativos, inhibidores de prenil-proteína proteasa, inhibidores de HMG-CoA reductasa, inhibidores de la proteasa del VIH, inhibidores de la trans-

criptasa inversa, inhibidores de receptores de factores de crecimiento e inhibidores de la angiogénesis.

- 5 15. Uso según una de las reivindicaciones 6 a 13, caracterizado porque una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos según una de las reivindicaciones 1 o 2 se administra en combinación con radio-terapia y con un compuesto seleccionado entre el grupo formado por moduladores de receptores de estrógenos, moduladores de receptores de andrógenos, moduladores de receptores retinoides, agentes citotóxicos, agentes antiproliferativos, inhibidores de prenil-proteína proteasa, 10 inhibidores de HMG-CoA reductasa, inhibidores de la proteasa del VIH, inhibidores de la transcriptasa inversa, inhibidores de receptores de factores de crecimiento e inhibidores de la angiogénesis.
- 15 16. Composición farmacéutica, caracterizada porque contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos según una de las reivindicaciones 1 o 2.
- 20 17. Composición farmacéutica según la reivindicación 16, caracterizada porque contiene uno o más compuestos adicionales, seleccionados entre el grupo compuesto por excipientes, auxiliares, adyuvantes, diluyentes, vehículos fisiológicamente aceptables y principios activos farmacéuticamente aceptables distintos a los compuestos según una de las reivindicaciones 1 o 2.
- 25 18. Juego (kit) compuesto de envases separados de
- a) una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos según una de las reivindicaciones 1 o 2, y
- b) una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más principios farmacéuticamente activos adicionales distintos a los compuestos según 30 una de la reivindicaciones 1 o 2.

19. Proceso para la fabricación de una composición farmacéutica, caracterizado porque uno o más compuestos según una de las reivindicaciones 1 o 2 y uno o más compuestos seleccionados entre el grupo compuesto por excipientes sólidos, líquidos o semilíquidos, auxiliares, adyuvantes, diluyentes, vehículos y principios farmacéuticamente activos distintos a los compuestos según una de las reivindicaciones 1 o 2, se convierten en una forma de dosificación adecuada.

5
10

15

20

25

30