



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 269 416**

51 Int. Cl.:
C07D 403/06 (2006.01)
A61K 31/404 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C07D 403/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01939357 .8**
86 Fecha de presentación : **24.05.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1301507**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2003**

54 Título: **Profármacos de base de Mannich de derivados de 3-(pirrol-2-ilmetilideno)-2-indolinona y su utilización como moduladores de proteína-quinasas.**

30 Prioridad: **24.05.2000 US 207000 P**
11.08.2000 US 225045 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

73 Titular/es: **Sugen, Inc.**
230 East Grand Avenue
South San Francisco, California 94080-4811, US
Pharmacia & Upjohn Company L.L.C.

72 Inventor/es: **Moon, Malcolm, Wilson;**
Morozowich, Walter;
Gao, Ping y
Tang, Peng, Cho

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 269 416 T3

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

DESCRIPCIÓN

Profármacos de base de Mannich de derivados de 3-(pirrol-2-ilmetilideno)-2-indolinona y su utilización como moduladores de proteína-quinasas.

5

Antecedentes de la invención**Ámbito de la invención**

10 La presente invención se refiere a profármacos de base de Mannich de ciertos derivados de 3-(pirrol-2-ilmetilideno)-2-indolinona que modulan la actividad de proteína-quinasas (PK). Se describen también composiciones farmacéuticas que contienen estos compuestos, métodos para tratar enfermedades relacionadas con una actividad anormal de las PK utilizando composiciones farmacéuticas que contienen estos compuestos y métodos para la obtención de los mismos.

15

Estado de la técnica

Las proteína-quinasas (PK) son enzimas que catalizan la fosforilación de los grupos hidroxilo de los restos tirosina, serina y treonina de las proteínas. Las PK pueden subdividirse de modo conveniente en dos grupos, las proteína-tirosina-quinasas (PTK) y las serina-treonina-quinasas (STK). Uno de los principales aspectos de la actividad de las PK es su implicación en los receptores de factor de crecimiento. Los receptores de factor de crecimiento son proteínas de superficie celular. Cuando se fijan a un ligando de factor de crecimiento, los receptores de factor de crecimiento se convierten en la forma activa que interacciona con proteínas de la superficie interna de una membrana celular. Esto conduce a la fosforilación de los restos tirosina del receptor así como de otras proteínas y, dentro de la célula, a la formación de complejo con una gran variedad de moléculas de señalización citoplásmica. Estos complejos afectan, a su vez, a numerosas respuestas celulares, por ejemplo la división (proliferación) celular, la diferenciación celular, el crecimiento celular, la expresión de efectos metabólicos en el microentorno extracelular, etc. Para una descripción más completa, véase Schlessinger y Ullrich en *Neuron* 9, 303-391, 1992.

30 Los receptores de factor de crecimiento que tienen actividad de PTK se conocen como tirosina-quinasas de receptor (RTK). Forman un amplio grupo de receptores transmembrana con actividades biológicas diversas. Hasta el presente se han identificado por lo menos diecinueve (19) subgrupos distintos de RTK. Un ejemplo de ellos es el subgrupo llamado RTK "HER", que incluye al EGFR (receptor de factor de crecimiento epitelial), HER2, HER3 y HER4.

35 Otro subgrupo de RTK abarca al receptor de la insulina (IR), el receptor de factor de crecimiento I similar a la insulina (IGF-1R) y un receptor afín al receptor de la insulina (IRR). El IR y el IRR interactúan con la insulina, el IGF-I y el IGF-II, para formar un heterotetramero compuesto por dos subunidades α glucosiladas totalmente extracelulares y dos subunidades β , que atraviesan la membrana celular y que contienen el dominio tirosina-quinasa.

40 Un tercer subgrupo de RTK se denomina grupo de receptor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) e incluye al PDGFR α , PDGFR β , CSF1R, c-kit y c-fms. Otro grupo es el subgrupo de receptor de quinasa de hígado fetal (flk). Se cree que este grupo se compone de un receptor de dominio de inserción de quinasa y una quinasa de hígado fetal 1 (KDR/FLK-1), flk-1R, flk-4 y tirosina-quinasa similar a fms (flt-1).

45 Otro componente del grupo de receptores de factores de crecimiento de tirosina-quinasa es el grupo de receptores de factor de crecimiento de fibroblasto (FGF). Este grupo consta de cuatro receptores, FGFR1-4, y siete ligandos, FGF1-7. Aunque todavía no se han caracterizado bien, parece que los receptores constan además de un dominio extracelular glucosilado que contiene un número variable de bucles de tipo inmunoglobulina y un dominio intracelular, en el que la secuencia PTK está interrumpida por regiones de secuencias de aminoácidos no afines.

50 Otro componente del grupo de receptores de factor de crecimiento de tirosina-quinasas es el subgrupo de los receptores de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). El VEGF es una glucoproteína dímera, similar al PDGF, pero tiene diferentes funciones biológicas y diferente especificidad "*in vivo*" para las células diana. Actualmente se cree en particular que el VEGF desempeña un papel esencial en la vasculogénesis y la angiogénesis.

55 Un listado más completo de los subgrupos RTK conocidos se describe en Plowman y col., *DN&P* 7(6), 334-339, 1994.

60 Además de las RTK existe también un grupo de PTK completamente intracelulares, llamadas "tirosina-quinasas de no receptor" o "tirosina-quinasas celulares". Este último nombre, abreviado por CTK, es el que se empleará aquí. Las CTK no contienen dominios extracelulares ni transmembrana. Hasta el presente se han identificado más de 24 CTK en 11 subgrupos (Src, Frk, Btk, Csk, Abl, Zap70, Fes, Fps, Fak, Jak y Ack). El grupo Src parece ser el más amplio entre las CTK e incluye el Src, Yes, Fyn, Lyn, Lck, Blk, Hck, Fgr e Yrk. Para una descripción más detallada de las CTK véase Bolen, *Oncogene* 8, 2025-2031, 1993.

65 Al igual que las CTK, las serina-treonina-quinasas o STK son predominantemente intracelulares, a pesar de haber pocas quinastas receptoras del tipo STK. Las STK son las quinastas citosólicas más frecuentes; es decir, quinastas que realizan su función en aquella parte del citoplasma que es distinta de los orgánulos citoplasmáticos y del citoesqueleto.

ES 2 269 416 T3

en la que:

R^3 , R^5 y R^6 se elige con independencia entre sí entre el grupo formado por hidrógeno, alquilo C_1-C_{10} , trihaloalquilo C_1-C_{10} , cicloalquilo C_3-C_6 , alqueno C_2-C_{10} , alquino C_2-C_{10} , arilo C_6-C_{12} , un heteroarilo de 5 a 9 eslabones que tiene de 1 a 4 átomos del anillo elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre; un grupo heteroalíclico de 4 a 9 eslabones que tiene de 1 a 3 heteroátomos elegidos entre nitrógeno, oxígeno y $-S(O)_n$, en el que n es un número de 0 a 2; hidroxilo, alcoxi C_1-C_{10} , O-arilo C_6-C_{12} , un O-heteroarilo de 5 a 9 eslabones que tiene de 1 a 4 átomos de anillo elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre; mercapto, S-alquilo C_1-C_{10} , S-cicloalquilo C_3-C_6 , S-arilo C_6-C_{12} , un S-heteroarilo de 5 a 9 eslabones que tiene de 1 a 4 átomos de anillo elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre; $-S(=O)-R''$, $-S(=O)_2R''$, $-S(=O)_2NR^{13}R^{14}$, $-NR^{13}S(=O)_2R^{14}$, $-NH-S(=O)_2CX_3$, en el que X es halógeno; $-C(=O)-R''$, $-C(=O)O-R''$, $-O(=O)R''$, $-C(=O)NR^{13}R^{14}$, $R^{14}C(=O)NR^{13}$, ciano, nitro, halógeno, $-OC(=O)NR^{13}R^{14}$, $R^{14}OC(=O)NR^{13}$, $-OC(=S)NR^{13}R^{14}$, $R^{14}OC(=S)NR^{13}$, amino y $-NR^{11}R^{12}$, en el que R^{11} y R^{12} se elige con independencia entre sí entre el grupo formado por hidrógeno, alquilo C_1-C_{10} , cicloalquilo C_3-C_6 , arilo C_6-C_{12} , $-C(=O)-R''$, $-C(=O)CH_3$, $-S(=O)_2R''$ y $CF_3CS(=O)_2$ o bien R^{11} y R^{12} junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo heteroalíclico de cinco o seis eslabones;

R^7 es hidrógeno;

R^4 es hidrógeno o halógeno;

$R^{1'}$ es hidrógeno o metilo;

R^8 y R^{10} con independencia entre sí son alquilo C_1-C_4 sin sustituir;

R^9 es hidrógeno, alquilo C_1-C_4 sustituido por $-C(=O)O-R''$ o $-C(=O)NHR^{12}$, en el que R^{12} es alquilo C_1-C_4 sustituido por amino o heteroalíclico, ya definido antes, y opcionalmente sustituido por hidroxilo;

$R^{3'}$ y $R^{4'}$ con alquilo C_1-C_4 opcionalmente sustituido por hidroxilo; o

$R^{3'}$ y $R^{4'}$ junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo elegido entre el grupo formado por el pirrolidin-1-ilo, 2-(S)-hidroximetilpirrolidin-1-ilo, 2-(S)-carboxi-pirrolidin-1-ilo, piperazin-1-ilo y 4-metilpiperazin-1-ilo; con la condición de que cuando $R^{1'}$ es hidrógeno, entonces $R^{3'}$ y $R^{4'}$ junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos no formen un anillo de pirrolidin-1-ilo; o bien

$R^{3'}$ y $R^{4'}$ junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo heteroarilo, elegido entre el grupo formado por el pirrol-1-ilo, piridin-1-ilo, oxazol-3-ilo, isoxazol-2-ilo, pirazin-1-ilo, piridazin-1-ilo, quinolin-1-ilo e imidazol-1-ilo; o

una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

y en la que:

alquilo C_1-C_{10} puede estar sustituido o sin sustituir, y cuando está sustituido el o los grupos sustituyentes son uno o varios grupos elegidos individualmente entre cicloalquilo C_3-C_6 , arilo C_6-C_{12} , un heteroarilo de 5 a 9 eslabones que tiene de 1 a 4 átomos de anillo elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre; un grupo heteroalíclico de 4 a 9 eslabones que tiene de 1 a 3 heteroátomos elegidos entre nitrógeno, oxígeno y $-S(O)_n$, en el que n es un número de 0 a 2; hidroxilo, alcoxi C_1-C_{10} , O-arilo C_6-C_{12} , un O-heteroarilo de 5 a 9 eslabones que tiene de 1 a 4 átomos de anillo elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre; mercapto, S-alquilo C_1-C_{10} , S-cicloalquilo C_3-C_6 , S-arilo C_6-C_{12} , un S-heteroarilo de 5 a 9 eslabones que tiene de 1 a 4 átomos de anillo elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre; ciano, halógeno, $-C(=O)-R''$, $-C(=S)-R''$, $-C(=O)NR^{13}R^{14}$, $R^{14}C(=O)NR^{13}$, $-OC(=S)NR^{13}R^{14}$, $R^{14}OC(=S)NR^{13}$, $-OC(=S)NR^{13}R^{14}$, $-C(=O)NR^{13}R^{14}$, $R^{14}OC(=O)NR^{13}$, $-C(=O)O-R''$, $-OC(=O)R''$, nitro, sililo, amino, $+NR^{15}R^{16}NR^{17}$ y $-NR^{13}R^{14}$;

cicloalquilo C_3-C_6 puede estar sustituido o sin sustituir, y cuando está sustituido el o los grupos sustituyentes son uno o varios grupos elegidos individualmente entre alquilo C_1-C_{10} , arilo C_6-C_{12} , un heteroarilo de 5 a 9 eslabones que tiene de 1 a 4 átomos de anillo elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre; un grupo heteroalíclico de 4 a 9 eslabones que tiene de 1 a 3 heteroátomos elegidos entre nitrógeno, oxígeno y $-S(O)_n$, en el que n es un número de 0 a 2; hidroxilo, alcoxi C_1-C_{10} , arilo C_6-C_{12} , mercapto, S-alquilo C_1-C_{10} , S-cicloalquilo C_3-C_6 , S-arilo C_6-C_{12} , un S-heteroarilo de 5 a 9 eslabones que tiene de 1 a 4 átomos de anillo elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre; ciano, halógeno, $-C(=O)-R''$, $-C(=S)-R''$, $-C(=O)O-R''$, $-OC(=O)R''$, $-C(=O)NR^{13}R^{14}$, $R^{14}OC(=O)NR^{13}$, $-C(=O)NR^{13}R^{14}$, $R^{14}OC(=O)NR^{13}$, nitro, amino y $-NR^{13}R^{14}$;

alqueno C_2-C_{10} está opcionalmente sustituido del modo indicado antes para el alquilo C_1-C_{10} ;

alquino C_2-C_{10} está opcionalmente sustituido del modo indicado antes para el alquilo C_1-C_{10} ;

arilo C_6-C_{12} puede estar sustituido o sin sustituir, y cuando está sustituido el o los grupos sustituyentes son uno o varios grupos elegidos individualmente entre halógeno, CX_3 , alquilo C_1-C_{10} , hidroxilo, alcoxi C_1-C_{10} , arilo C_6-C_{12} , mercapto, S-alquilo C_1-C_{10} , S-cicloalquilo C_3-C_6 , S-arilo C_6-C_{12} , un S-heteroarilo de 5 a 9 eslabones que tiene de 1

ES 2 269 416 T3

a 4 átomos de anillo elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre; ciano, nitro, $-C(=O)-R''$, $-C(=S)-R''$, $-C(=O)O-R''$, $-OC(=O)R''$, $-OC(=O)NR^{13}R^{14}$, $R^{14}OC(=O)NR^{13}$, $-OC(=S)NR^{13}R^{14}$, $R^{14}OC(=S)NR^{13}$, $-C(=O)NR^{13}R^{14}$, $R^{14}C(=O)NR^{13}$, $-S(=O)-R''$, $-S(=O)_2R''$, amino y $-NR^{13}R^{14}$;

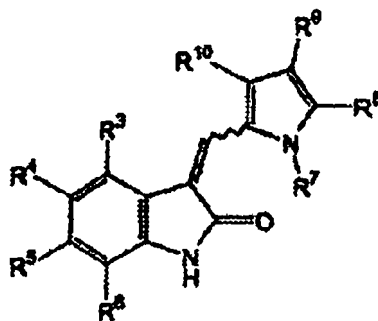
5 el heteroarilo puede estar sustituido o sin sustituir, y cuando está sustituido el o los grupos sustituyentes son uno o varios grupos elegidos individualmente entre alquilo C_1-C_{10} , cicloalquilo C_3-C_6 , halógeno, CX_3 , hidroxilo, alcoxi C_1-C_{10} , ariloxi C_6-C_{12} , mercapto, S-alquilo C_1-C_{10} , S-cicloalquilo C_3-C_6 , S-arilo C_6-C_{12} , un S-heteroarilo de 5 a 9 eslabones que tiene de 1 a 4 átomos de anillo elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre; ciano, nitro, $-C(=O)-R''$, $-C(=S)-R''$, $-S(=O)_2NR^{13}R^{14}$, $-C(=O)O-R''$, $-OC(=O)R''$, $-S(=O)-R''$, $-S(=O)_2R''$, $OC(=O)NR^{13}R^{14}$, $R^{14}OC(=O)NR^{13}$, $-OC(=S)NR^{13}R^{14}$, $R^{14}OC(=S)NR^{13}$, $-C(=O)NR^{13}R^{14}$, $R^{14}C(=O)NR^{13}$, amino y $-NR^{13}R^{14}$;

15 heterocíclico puede estar sustituido o sin sustituir, y cuando está sustituido el o los grupos sustituyentes son uno o varios grupos elegidos individualmente entre alquilo C_1-C_{10} , cicloalquilo C_3-C_6 , halógeno, CX_3 , hidroxilo, alcoxi C_1-C_{10} , ariloxi C_6-C_{12} , mercapto, S-alquilo C_1-C_{10} , S-cicloalquilo C_3-C_6 , S-arilo C_6-C_{12} , un S-heteroarilo de 5 a 9 eslabones que tiene de 1 a 4 átomos de anillo elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre; ciano, nitro, $-C(=O)-R''$, $-C(=S)-R''$, $-C(=O)O-R''$, $-OC(=O)R''$, $OC(=O)NR^{13}R^{14}$, $R^{14}OC(=O)NR^{13}$, $-OC(=S)NR^{13}R^{14}$, $R^{14}OC(=S)NR^{13}$, $-S(=O)-R''$, $-S(=O)_2R''$, $-C(=O)NR^{13}R^{14}$, $R^{14}C(=O)NR^{13}$, amino y $-NR^{13}R^{14}$;

20 R^{13} y R^{14} con independencia entre sí se eligen entre el grupo formado por hidrógeno, alquilo C_1-C_{10} , cicloalquilo C_3-C_6 , arilo C_6-C_{12} , $-C(=O)-R''$, $-C(=O)CH_3$, $-S(=O)_2R''$, NH_2 y $F_3C-S(=O)_2$; o bien R^{13} y R^{14} junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo heterocíclico de cinco o seis eslabones;

25 R'' se elige entre el grupo formado por hidrógeno, alquilo C_1-C_{10} , cicloalquilo C_3-C_6 , arilo C_6-C_{12} , heteroarilo (unido a través de un carbono del anillo) ya definido antes y heterocíclico (unido a través de un átomo de carbono del anillo), ya definido antes.

Específicamente, los compuestos de la presente invención se convierten “*in vivo*” en los compuestos de la fórmula (II):



(II)

45 que posee capacidad de modular las PK, en particular capacidad de inhibir las PK y, por ello, son útiles para tratar trastornos relacionados con una actividad anormal de las PK. Los compuestos activos (II) formados a partir de compuestos de la presente invención se describen en la patente US-5 792 783, la publicación de la solicitud PCT n° WO 99/61422 y en la solicitud de patente US que lleva el número de serie 09/783 264, depositada con fecha 15 de febrero de 2001 y titulada: “2-Indolinonas sustituidas por pirrol como inhibidores de proteína-quinasas”.

50 Los compuestos profármacos de la presente invención tienen con respecto a los compuestos de la fórmula (II) las ventajas de una mejor solubilidad acuosa y una mejor formulabilidad. Los solicitantes han descubierto, por ejemplo, que el profármaco N-pirrolidin-1-ilmetilo del compuesto (II), en el que R^3-R^7 y R^9 son hidrógeno y R^8 y R^{10} son metilo, proporciona una solubilidad acuosa inesperadamente mayor que la que tiene el compuesto original, por lo cual se convierte en particularmente idóneo para formulaciones i.v. Se contempla que otros compuestos reivindicados de la fórmula (I), que poseen un resto N-pirrolidin-1-ilmetilo u otros grupos $-CHR^1NR^3R^4$, que están dentro del alcance de la presente invención, tengan también una solubilidad mejorada similar. Una descripción general de las ventajas y usos de los profármacos como compuestos farmacéuticamente útiles se encontrará en el artículo de Waller y George publicado en Br. J. Clin. Pharmac., vol. 28, pp. 497-507, 1989.

65 En un segundo aspecto, esta invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene uno o varios compuestos de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En un tercer aspecto, esta invención se refiere al uso de un compuesto de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de enfermedades mediadas por

una actividad anormal de proteína-quinasas, en particular de tirosina-quinasas de receptor (RTK), de proteína-tirosina-quinasas no de receptor (CTK) y serina/treonina-proteína-quinasas (STK), en un organismo, en particular en humanos. Tales enfermedades incluyen a título de ejemplo, pero sin limitación: el cáncer, la diabetes, la cirrosis hepática, las enfermedades cardiovasculares, por ejemplo la aterosclerosis, la angiogénesis, las enfermedades inmunológicas, tales como el SIDA, el lupus y las enfermedades renales. Específicamente, las enfermedades mediadas por el EGF, HER2, HER3, HER4, IR, IGF-1R, IRR, PDGFR α , PDGFR β , CSFIR, C-Kit, C-fms, Flk-1R, Flk4, KDR/FLK-1, Flt-1, FGFR-1R, FGFR-2R, FGFR-3R, FGF-4R, Src, Frk, Btk, Csk, Abl, ZAP7, Fes, Fps, Fak, Jak, Ack, Yes, Fyn, Lyn, Lck, Blk, Hck, Fgr, Yrk, CDK2 y Raf.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere al uso de un compuesto de esta invención o de una composición farmacéutica que contenga un compuesto de esta invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable para modular la actividad catalítica (es decir, inhibir la actividad catalítica) de las PK, en particular de las tirosina-quinasas de receptor (RTK), de las proteína-tirosina-quinasas no de receptor (CTK) y las serina/treonina-proteína-quinasas (STK), tanto “*in vitro*” como “*in vivo*”. En particular, las proteína-quinasas de receptor, cuya actividad catalítica se modula con un compuesto de esta invención, se eligen entre el grupo formado por el EGF, HER2, HER3, HER4, IR, IGF-1R, IRR, PDGFR α , PDGFR β , CSFIR, C-Kit, C-fms, Flk-1R, Flk4, KDR/FLK-1, Flt-1, FGFR-1R, FGFR-2R, FGFR-3R y FGF-4R. Las tirosina-quinasas celulares, cuya actividad catalítica se modula con un compuesto de esta invención, se elige entre el grupo formado por el Src, Frk, Btk, Csk, Abl, ZAP7, Fes, Fps, Fak, Jak, Ack, Yes, Fyn, Lyn, Lck, Blk, Hck, Fgr e Yrk. Las serina-treonina-proteína-quinasas, cuya actividad se modula con un compuesto de esta invención, se eligen entre el grupo formado por la CDK2 y la Raf.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

“Alquilo” indica un hidrocarburo alifático saturado que incluye grupos de cadena lineal o de cadena ramificada. El grupo alquilo tiene con preferencia de 1 a 20 átomos de carbono (para cuando se indique un intervalo numérico; “1-20”, como en este caso, indica que el grupo, en este caso el grupo alquilo, puede contener 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3 átomos de carbono, etc. hasta 20 átomos de carbono inclusive). Con mayor preferencia es un alquilo de tamaño mediano, que tiene de 1 a 10 átomos de carbono. Con preferencia especial es un alquilo inferior que tiene de 1 a 4 átomos de carbono. El grupo alquilo puede estar sustituido o sin sustituir. Cuando está sustituido, el o los grupos sustituyentes son con preferencia uno o varios que se eligen individualmente entre cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heteroalíclicico, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, mercapto, alquiltio, ariltio, ciano, halógeno, carbonilo, tiocarbonilo, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, C-carboxi, O-carboxi, O-tiocarbamilo, nitro, sililo, amino, amonio y -NR¹³R¹⁴, en el que R¹³ y R¹⁴ con independencia entre sí se eligen entre el conjunto formado por hidrógeno, alquilo, alquilo sin sustituir, cicloalquilo, arilo, carbonilo, acetilo, sulfonilo, amino y trifluorometanosulfonilo, o bien R¹³ y R¹⁴ junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo heteroalíclicico de cinco o seis eslabones. Con mayor preferencia, el sustituyente es hidroxilo, amino o -NR¹³R¹⁴, en el que R¹³ y R¹⁴ con independencia entre sí se eligen entre el conjunto formado por alquilo inferior sin sustituir, alquilo inferior sustituido por amino o hidroxilo, o bien R¹³ y R¹⁴ junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo de pirrolidina, morfolina o piperazina.

Un grupo “cicloalquilo” indica un anillo monocíclico exclusivamente carbonado (es decir, anillos que comparten un par de átomos de carbono adyacentes) de 3 a 6 átomos en el anillo, en el que uno o varios de los anillos no tiene un sistema de electrones pi completamente conjugados, p.ej. el ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclobutenilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo y similares. Los ejemplos de grupos cicloalquilo son sin limitación: el ciclopropano, ciclobutano, ciclopentano, ciclopenteno, ciclohexano, adamantano, ciclohexadieno, cicloheptano y cicloheptatrieno. Un grupo cicloalquilo puede estar sustituido o sin sustituir. Si está sustituido, el o los grupos sustituyentes son uno o varios y se eligen individualmente entre alquilo, alquilo sin sustituir, arilo, heteroarilo, heteroalíclicico, heteroalíclicico sin sustituir, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, mercapto, alquiltio, ariltio, ciano, halógeno, carbonilo, tiocarbonilo, C-carboxi, O-carboxi, O-carbamilo, N-carbamilo, C-amido, N-amido, nitro, amino y -NR¹³R¹⁴, en el que R¹³ y R¹⁴ tienen los significados definidos anteriormente.

Un grupo “alqueno” indica un grupo alquilo, ya definido antes, que tiene por lo menos dos átomos de carbono y por lo menos un doble enlace carbono-carbono, p.ej. el etenilo, propenilo, butenilo o pentenilo y sus formas isómeras estructurales, p.ej. el 1- y el 2-propenilo, el 1-, el 2- o el 3-butenilo y similares.

Un grupo “alquino” significa un grupo alquilo, ya definido antes, que tiene por lo menos dos átomos de carbono y por lo menos un triple enlace carbono-carbono, p.ej. el acetileno (= etinilo), el propinilo, el butinilo o el pentinilo y sus formas isómeras estructurales, ya definidas antes.

Un grupo “arilo” indica un grupo exclusivamente carbonado, monocíclico o policíclico fusionado (es decir, anillos que comparten pares de átomos de carbono adyacentes), que tienen de 6 a 12 átomos de carbono y un sistema de electrones pi completamente conjugados. Los ejemplos sin limitación de grupos arilo son el fenilo, naftalenilo y antraceno. El grupo arilo puede estar sustituido o sin sustituir. Cuando está sustituido, el o los grupos sustituyentes son con preferencia uno o varios, elegidos entre halógeno, trihalometilo, alquilo, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, mercapto, alquiltio, ariltio, ciano, nitro, carbonilo, tiocarbonilo, C-carboxi, O-carboxi, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, sulfonilo, sulfonilo, amino y -NR¹³R¹⁴, en el que R¹³ y R¹⁴ tienen los significados

ES 2 269 416 T3

definidos anteriormente. Los sustituyentes preferidos se eligen con independencia entre sí entre cloro, flúor, bromo, metilo, etilo, propilo, incluidos todos sus isómeros, butilo, incluidos todos sus isómeros, hidroxilo, metoxi, fenoxi, tio, metiltio, feniltio, ciano, nitro, carboxi, metoxicarbonilo y amino.

5 Un grupo “heteroarilo” indica un anillo aromático monocíclico o fusionado (es decir, anillos que comparten un par de átomos adyacentes) de 5 a 9 átomos en el anillo, en el que uno, dos, tres o cuatro átomos del anillo se eligen entre el grupo formado por nitrógeno, oxígeno y azufre y los demás son átomos de carbono. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, sin limitación, a los siguientes: pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, pirazol, tetrazol, piridina, pirimidina, quinolina, isoquinolina, purina y carbazol. El grupo heteroarilo puede estar sustituido o sin sustituir. Cuando está sustituido, el o los sustituyentes son con preferencia uno o varios, con mayor preferencia uno o dos y se eligen con independencia entre sí entre el grupo formado por alquilo, cicloalquilo, halógeno, trihalometilo, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, mercapto, alquiltio, ariltio, ciano, nitro, carbonilo, tiocarbonilo, sulfonamido, C-carboxi, O-carboxi, sulfinilo, sulfonilo, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, amino y -NR¹³R¹⁴, en el que R¹³ y R¹⁴ tienen los significados definidos anteriormente. El o los sustituyentes se eligen con preferencia y con independencia entre sí entre el grupo formado por cloro, flúor, bromo, metilo, etilo, propilo, incluidos todos sus isómeros, butilo, incluidos todos sus isómeros, hidroxilo, metoxi, fenoxi, tio, metiltio, feniltio, ciano, nitro, carboxi, metoxicarbonilo y amino.

20 Un grupo “heteroalíclico” indica un grupo monocíclico o un anillo fusionado de 4 ó 9 eslabones, que tiene uno, dos o tres heteroátomos en el anillo, elegidos entre el grupo formado por nitrógeno, oxígeno y -S(O)_n, en el que n es un número de 0 a 2 y los demás átomos del anillo son átomos de carbono. Los anillos pueden tener uno o varios dobles enlaces. Sin embargo, los anillos no tienen un sistema de electrones pi completamente conjugados. Los ejemplos de restos heteroalíclicos son, sin limitación, los siguientes: pirrolidina, piperidina, piperazina, morfolina, imidazolina, tetrahidropiridazina, tetrahidrofurano, tiomorfolina, tetrahidropiridina y similares. El anillo heteroalíclico puede estar sustituido o sin sustituir. Si está sustituido, el o los grupos sustituyentes son con preferencia uno, dos o tres y se eligen con independencia entre sí entre el grupo formado por alquilo, cicloalquilo, halógeno, trihalometilo, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, mercapto, alquiltio, ariltio, ciano, nitro, carbonilo, tiocarbonilo, C-carboxi, O-carboxi, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, sulfinilo, sulfonilo, C-amido, N-amido, amino y -NR¹³R¹⁴, en el que R¹³ y R¹⁴ tienen los significados definidos anteriormente. El o los grupos se eligen con preferencia y con independencia entre sí entre el grupo formado por cloro, flúor, bromo, metilo, etilo, propilo, incluidos todos sus isómeros, butilo, incluidos todos sus isómeros, hidroxilo, metoxi, fenoxi, tio, metiltio, feniltio, ciano, nitro, carboxi, metoxicarbonilo y amino.

35 Un grupo “hidroxilo” indica un grupo -OH.

Un grupo “alcoxi” indica un resto -O-alquilo sin sustituir, -O-alquilo sustituido y -O-cicloalquilo sin sustituir, ya definidos antes. Los ejemplos incluyen pero no se limitan a: metoxi, etoxi, propoxi, butoxi, ciclopropiloxi y similares, con preferencia metoxi.

40 Un grupo “ariloxi” indica tanto los grupos -O-arilo como los grupos -O-heteroarilo, ya definidos antes. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: fenoxi, naftiloxi, piridiloxi, furaniloxi y similares.

Un resto “mercapto” indica un resto -SH.

45 Un resto “alquiltio” indica tanto grupos S-alquilo como -S-cicloalquilo, ya definidos. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: metiltio, etiltio y similares.

Un resto “ariltio” indica tanto un resto -S-arilo como un resto -S-heteroarilo, ya definidos antes. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: feniltio, naftiltio, piridiltio, furaniltio y similares.

50 Un resto “sulfinilo” indica un resto -S(=O)-R”, en el que, además de la definición que sigue, R” puede ser también un grupo hidroxilo, p.ej. metilsulfinilo, fenilsulfinilo y similares.

55 Un resto “sulfonilo” indica un resto -S(=O)₂R”, en el que, además de la definición que sigue, R” puede ser un grupo hidroxilo, p.ej. metilsulfonilo, etilsulfonilo, fenilsulfonilo y similares.

Un resto “trihalometilo” significa un resto -CX₃, en el que X es un grupo halógeno, ya definido antes, p.ej. trifluorometilo, triclorometilo, tribromometilo, diclorofluorometilo y similares.

60 Un resto “trihalometanosulfonilo” significa un grupo X₃CS(=O)₂- en el que X tiene el significado definido antes, p.ej. trifluorometilsulfonilo, triclorometilsulfonilo, tribromometilsulfonilo y similares.

Un resto “trihalometanosulfonilamido” significa un grupo -NH-S(=O)₂R, en el que R es trihalometilo, ya definido antes.

65 Un resto “carbonilo” o “acilo”, que se utilizan indistintamente, indica un resto -C(=O)-R”, en el que R” se elige entre el conjunto formado por hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo (unido a través de un carbono del anillo) y heteroalíclico (unido a través de un carbono del anillo), ya definidos antes. Los ejemplos representativos in-

ES 2 269 416 T3

cluyen, pero no se limitan a: acetilo, propionilo, benzofilo, formilo, ciclopropilcarbonilo, piridinilcarbonilo, pirrolidin-1-ilcarbonilo y similares.

Un grupo “aldehído” indica un resto carbonilo, en el que R” es hidrógeno.

Un resto “tiocarbonilo” indica un resto $-C(=S)-R$ ”, en el que R” tiene el significado definido antes.

Un resto “C-carboxi” indica un resto $-C(=O)O-R$ ”, en el que R” tiene el significado definido antes, p.ej. -COOH, metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, benciloxicarbonilo y similares.

Un resto “O-carboxi” indica un resto $-OC(=O)R$ ”, en el que R” tiene el significado definido antes, p.ej. metoxicarbonilo, fenilcarbonilo, bencilcarbonilo y similares.

Un grupo “éster” indica un resto $-C(=O)O-R$ ”, en el que R” tiene el significado definido antes, excepto que R” no puede ser hidrógeno, p.ej. metoxicarbonilo, benciloxicarbonilo y similares.

Un resto “acetilo” indica un grupo $-C(=O)CH_3$.

Un resto “ácido carboxílico” indica un resto C-carboxi, en el que R” es hidrógeno.

Un grupo “halógeno” indica flúor, cloro, bromo o yodo.

Un grupo “ciano” indica un grupo $-C\equiv N$.

Un grupo “nitro” indica un grupo $-NO_2$.

Un resto “metilenodioxi” indica un resto $-OCH_2O-$, en el que los dos átomos de oxígeno están unidos al mismo átomo de carbono.

Un resto “etilenodioxi” indica un resto $-OCH_2CH_2O-$, en el que los dos átomos de oxígeno están unidos a átomos de carbono adyacentes.

Un resto “S-sulfonamido” indica un resto $-S(=O)_2NR^{13}R^{14}$, en el que R^{13} y R^{14} tienen el significado ya definido. Los ejemplos representativos incluyen, pero no se limitan a: dimetilaminosulfonilo, aminosulfonilo, fenilmetilaminosulfonilo, fenilaminosulfonilo y similares.

Un resto “N-sulfonamido” indica un resto $-NR^{13}S(=O)_2R^{14}$, en el que R^{13} y R^{14} tienen el significado ya definido, p.ej. metilsulfonamino, etilsulfonilamino, fenilsulfonilamino, bencilsulfonilamino y similares.

Un resto “O-carbamilo” indica un resto $-OC(=O)NR^{13}R^{14}$, en el que R^{13} y R^{14} tienen el significado ya definido.

Un resto “N-carbamilo” indica un resto $R^{14}OC(=O)NR^{13}$, en el que R^{13} y R^{14} tienen el significado ya definido.

Un resto “O-tiocarbamilo” indica un resto $-OC(=S)NR^{13}R^{14}$, en el que R^{13} y R^{14} tienen el significado ya definido.

Un resto “N-tiocarbamilo” indica un resto $R^{14}OC(=S)NR^{13}$, en el que R^{13} y R^{14} tienen el significado ya definido.

Un resto “amino” indica un resto $-NR^{13}R^{14}$, en el que R^{13} y R^{14} con independencia entre sí son hidrógeno o alquilo inferior sin sustituir, p.ej. $-NH_2$, dimetilamino, dietilamino, etilamino, metilamino y similares.

Un resto “C-amido” indica un resto $-C(=O)NR^{13}R^{14}$, en el que R^{13} y R^{14} tienen el significado ya definido. R^{13} es con preferencia hidrógeno o alquilo inferior sin sustituir y R^{14} es hidrógeno, alquilo inferior opcionalmente sustituido por heterocíclico, hidroxilo o amino. $-C(=O)NR^{13}R^{14}$ puede ser por ejemplo aminocarbonilo, dimetilaminocarbonilo, dietilaminocarbonilo, dietilaminoetilaminocarbonilo, etilaminoetilaminocarbonilo, 2-morfolinoetilaminocarbonilo, 3-morfolinopropilaminocarbonilo, 3-morfolino-2-hidroxiopropilaminocarbonilo y similares.

Un resto “N-amido” indica un resto $R^{14}C(=O)NR^{13}$, en el que R^{13} y R^{14} tienen los significados ya definidos, p.ej. acetilamino y similares.

Un grupo “amonio” indica un grupo $-N^+R^{15}R^{16}R^{17}$, en el que R^{15} y R^{16} con independencia entre sí indican un resto elegido entre alquilo, cicloalquilo, arilo y heteroarilo y R^{17} se elige entre el conjunto formado por hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo y heteroarilo.

Un resto “amidino” indica un grupo $R^{15}R^{16}NC(=NR^{17})-$, en el que R^{15} , R^{16} y R^{17} tienen los significados ya definidos.

ES 2 269 416 T3

Un resto "morfolino" indica un resto que tiene la estructura química:

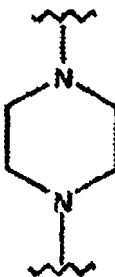
5



10

Un resto "piperazinilo" indica un resto que tiene la estructura química:

15

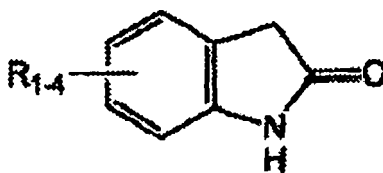


20

25

Los términos "indolinona", "2-indolinona" e "indolin-2-ona" se utilizan indistintamente e indican una molécula que tiene la estructura química:

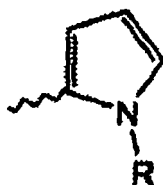
30



35

"Pirrol" indica una molécula que tiene la estructura química:

40

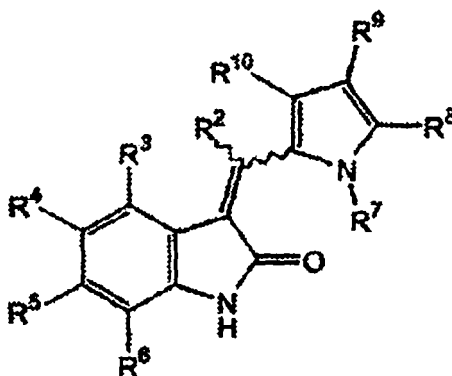


45

"2-indolinona sustituida por pirrol" y "3-pirrol-1-il-2-indolinona" se utilizan indistintamente e indican un compuesto químico que tiene la estructura general representada en la fórmula II.

50

55



60

65

II

Un “profármaco” (prodrug) indica un agente que se convierte “*in vivo*” en el fármaco original. Los profármacos se utilizan con frecuencia porque, en algunas situaciones, pueden resultar más fáciles de administrar que el fármaco original. Pueden ser por ejemplo biodisponibles por administración oral, mientras que el fármaco original no lo es. Los profármacos pueden tener además una mejor solubilidad en las composiciones farmacéuticas que el fármaco original.

5 Un profármaco puede convertirse en el fármaco original por diversos mecanismos, incluidos los procesos enzimáticos y la hidrólisis metabólica. Véase Harper, “Drug Latentiation”, en: Jucker, coord., *Progress in Drug Research* 4, 221-294, 1962; Morozowich y col., “Application of Physical Organic Principles to Prodrug Design”, en: E.B. Roche, coord., *Design of Biopharmaceutical Properties through Prodrugs and Analogs*, APHA Acad. Pharm. Sci., 1977; Bioreversible Carriers in Drug, en: *Drug Design, Theory and Application*, E.B. Roche, coord., APHA Acad. Pharm. Sci., 10 1987; *Design of Prodrugs*, H. Bundgaard, Elsevier, 1985; Wang y col., “Prodrug approaches to the improved delivery of peptide drug”, en: *Curr. Pharm. Design* 5(4), 265-287, 1999; Pauletti y col., *Improvement in peptide bioavailability: Peptidomimetics and Prodrugs Strategies*, en: *Adv. Drug Delivery Rev.* 27, 235-256, 1997; Mizen y col., “The Use of Esters as Prodrugs for Oral Delivery of β -Lactam antibiotics”, en: *Pharm. Biotech.* 11, 345-365, 1998; Gaignault y col., “Designing Prodrugs and Bioprecursors, I. Carrier Prodrugs”, en: *Pract. Med. Chem.* 671-696, 1996; Asgharnejad, “Improving Oral Drug Transport”, en: *Transport Processes in Pharmaceutical Systems*, G.L. Amidon, P.I. Lee y E.M. Topp, coordinadores, editorial Marcell Dekker, p. 185-218, 2000; Balant y col., “Prodrugs for the improvement of drug absorption via different routes of administration”, en: *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 15(2), 143-53, 1990; Balimane y Sinko, “Involvement of multiple transporters in the oral absorption of nucleoside analogues”, en: *Adv. Drug Delivery Rev.* 39(1-3), 183-209, 1999; Browne, “Fosphenytoin (Cerebyx)”, en: *Clin. Neuropharmacol.* 20(1), 1-12, 1997; Bundgaard, “Bioreversible derivatization of drugs - principle and applicability to improve the therapeutic effects of drugs”, *Arch. Pharm. Chemi* 86(1), 1-39, 1979; Bundgaard, H., “Improved drug delivery by the prodrug approach”, en: *Controlled Drug Delivery* 17, 179-96, 1987; Bundgaard, H., “Prodrugs as a means to improve the delivery of peptide drugs”, en: *Adv. Drug Delivery Rev.* 8(1), 1-38, 1992; Fleisher y col., “Improved oral drug delivery: solubility limitations overcome by the use of prodrugs”, en: *Adv. Drug Delivery Rev.* 19(2), 115-130, 1996; Fleisher y col., 25 “Design of prodrugs for improved gastrointestinal absorption by intestinal enzyme targeting”, en: *Methods Enzymol.* 112 (Drug Enzyme Targeting, pt. A): 360-81, 1985; Farquhar, D. y col., “Biologically Reversible Phosphate-Protective Groups”, en: *J. Pharm. Sci.* 72(3), 324-325, 1983; Freeman, S. y col., “Bioreversible Protection for the Phospho Group: Chemical Stability and Bioactivation of Di(4-acetoxy-benzyl) Methylphosphonate with Carboxyesterase”, en: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 875-877, 1991; Friis y Bundgaard, “Prodrugs of phosphates and phosphonates: Novel lipophilic alpha-acryloxyalkyl ester derivatives of phosphate- or phosphonate containing drugs masking the negative charges of these groups”, en: *Eur. J. Pharm. Sci.* 4, 49-59, 1996; Gangwar y col., “Pro-drug, molecular structure and percutaneous delivery”, en: *Des. Biopharm. Prop. Prodrugs Analogs*, [simposio] fecha de la convención 1976, 409-21 (1977); Nathwani y Wood, “Penicillins: a current review of their clinical pharmacology and therapeutic use”, en: *Drugs* 45(6), 866-94, 1993; Sinhababu y Thakker, “Prodrugs of anticancer agents”, en: *Adv. Drug Delivery Rev.* 19 30 (2), 241-273, 1996; Stella y col., “Prodrugs. Do they have advantages in clinical practice?”, en: *Drugs* 29(5), 455-73, 1985; Tan y col., “Development and optimization of anti-HIV nucleoside analogs and prodrugs: A review of their cellular pharmacology, structure-activity relationships and pharmacokinetics”, en: *Adv. Drug Delivery Rev.* 39(1-3), 117-151, 1999; Taylor, “Improved passive oral drug delivery via prodrugs”, en: *Adv. Drug Delivery Rev.* 19(2), 131-148, 1996; Valentino y Borchardt, “Prodrug strategies to enhance the intestinal absorption of peptides”, en: *Drug Discovery Today* 2(4), 148-155, 1997; Wiebe y Knaus, “Concepts for the design of anti-HIV nucleoside prodrugs for treating cephalic HIV infection”, en: *Adv. Drug Delivery Rev.* 39(1-3), 73-80, 1999; Waller y col., “Prodrugs”, en: *Br. J. Clin. Pharmacol.* 28, 497-507, 1989.

Los compuestos de esta invención pueden tener uno o varios centros quirales y, por ello, pueden obtenerse en forma de estereoisómeros individuales o en forma de mezclas de estereoisómeros, dependiendo de si se emplean los estereoisómeros individuales o las mezclas de estereoisómeros de los materiales de partida. A menos que se diga lo contrario, la descripción o la denominación de un compuesto o de un grupo de compuestos se supone que incluye tanto a los estereoisómeros individuales como las mezclas (racémicas o del tipo que sea) de los estereoisómeros. Los métodos para la determinación de la estereoquímica o para la separación de los estereoisómeros son bien conocidos de los expertos en la materia [véase la descripción del capítulo 4 de la obra de J. March: *Advanced Organic Chemistry*, 4ª ed., John Wiley and Sons, Nueva York, N.Y., 1992].

Las fórmulas químicas mencionadas en esta solicitud pueden presentar fenómenos de tautomería y de isomería estructural. Por ejemplo, los ejemplos descritos aquí pueden adoptar la configuración E (trans) o Z (cis) con respecto al doble enlace que conecta el resto 2-indolinona y el resto pirrol o pueden ser una mezcla de E y Z. Esta invención abarca cualquier forma tautómera o isómera estructural y las mezclas de las mismas.

El término “método” se refiere a las maneras, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea determinada, incluidas, pero sin limitarse a ellas, las maneras, medios, técnicas y procedimientos ya conocidas para ello, o bien las deducidas fácilmente por los expertos en la técnica química, farmacéutica, biológica, bioquímica y médica a partir de las maneras, medios, técnicas y procedimientos ya conocidos.

Tal como se emplea en la descripción, el término “modulación” o “modular” indica la alteración de la actividad catalítica de las RTK, CTK o STK. En particular, modular indica la activación de la actividad catalítica de las RTK, CTK y STK, con preferencia la activación o la inhibición de la actividad catalítica de las RTK, CTK o STK, dependiendo de la concentración del compuesto o de la sal a la que se exponen las RTK, las CTK o las STK, o con mayor preferencia, la inhibición de la actividad catalítica de las RTK, de las CTK o de las STK.

ES 2 269 416 T3

El término “actividad catalítica” empleado aquí indica la velocidad de fosforilación o la tirosina por la acción directa o indirecta de las RTK y/o de las CTK o de la fosforilación de la serina y de la treonina por acción directa o indirecta de las STK.

5 El término “poner en contacto” empleado aquí indica la colocación de un compuesto de esta invención y de una PK diana en contacto directo, de tal manera que el compuesto pueda afectar la actividad catalítica de la PK, ya sea directamente, es decir, interactuando con la quinasa propiamente dicha, ya sea indirectamente, es decir, interactuando con otra molécula, de la que depende la actividad catalítica de la quinasa. Dicha “puesta en contacto” puede efectuarse “*in vitro*”, es decir en un tubo de ensayo, una cápsula petri o similares. En un tubo de ensayo, el contacto
10 puede afectar únicamente a un compuesto y una PK de interés o puede afectar a células enteras. Las células pueden mantenerse también o cultivarse en platos de cultivo celular y ponerse en contacto con un compuesto en este entorno. En este contexto, la capacidad de un compuesto concreto de afectar a un trastorno mediado por una PK, es decir, la IC₅₀ del compuesto, definida a continuación, puede determinarse antes de efectuar el uso de los compuestos “*in vivo*” con organismos vivos complejos. Para las células situadas fuera del organismo existen múltiples métodos que son bien
15 conocidos de los expertos en la materia para poner las PK en contacto con los compuestos, incluidos, pero sin limitarse a ellos, la microinyección celular directa y las numerosas técnicas de acarreo transmembrana.

“*In vitro*” indica los procedimientos realizados en un entorno artificial, p.ej. pero sin limitarse a ellos, en un tubo de ensayo o en un medio de cultivo. El experto en la materia comprenderá que, por ejemplo, una PK aislada puede
20 ponerse en contacto con un modulador en un entorno “*in vitro*”. Como alternativa, una célula aislada puede ponerse en contacto con un modulador en un entorno “*in vitro*”.

Tal como se emplea en esta solicitud, “*in vivo*” indica los procedimientos efectuados dentro de un organismo vivo, por ejemplo pero sin limitarse a ellos: un ratón, una rata, un conejo, un ungulado, un bovino, un equino, un porcino,
25 un canino, un felino, un primate o un humano.

Tal como se emplea aquí, “trastorno mediado por una PK”, “trastorno inducido por una PK” y “actividad anormal de una PK” indica cualquier estado patológico caracterizado por una actividad catalítica inadecuada, es decir inferior o, caso más frecuente, superior a la normal, en la que la PK concreta puede ser una RTK, una CTK o una STK. La
30 actividad catalítica inadecuada puede surgir como resultado de: (1) la expresión de la PK en las células, en las que normalmente no se expresan las PK, (2) una mayor expresión de la PK que conduce a una proliferación, diferenciación y/o crecimiento celular no deseado o (3) una menor expresión de la PK que conduce a reducciones no deseadas de la proliferación, diferenciación y/o crecimiento celular. La sobreactividad de una PK indica la amplificación del gen que codifica a una PK concreta o la producción de un nivel de actividad de la PK que puede guardar relación con
35 un trastorno de proliferación, diferenciación y/o crecimiento celular (es decir, a medida que aumenta el nivel de la PK, aumenta también la gravedad de uno o varios síntomas del trastorno celular). Infraactividad es, obviamente, lo contrario, en este caso la gravedad de uno o varios síntomas de un trastorno celular sufre un incremento cuando ha disminuido el nivel de la actividad de la PK.

40 El término “organismo” indica cualquier ser vivo que consta por lo menos de una célula. Un organismo vivo puede ser tan simple, por ejemplo, como una sola célula eucariótica o tan complejo como un mamífero, incluido un ser humano.

El término “cantidad terapéuticamente eficaz” empleado aquí indica que la cantidad administrada del compuesto aliviará de alguna forma uno o varios síntomas de trastorno tratado. En lo que respecta al tratamiento del cáncer,
45 una cantidad terapéuticamente eficaz indica una cantidad que producirá (1) una reducción del tamaño del tumor, (2) una inhibición (es decir, el frenado de alguna manera, con preferencia la interrupción) de las metástasis tumorales, (3) la inhibición de alguna manera (es decir, el frenado, con preferencia la interrupción) del crecimiento tumoral y/o (4) el alivio en algún grado (o con preferencia la eliminación) de uno o varios síntomas asociados con el
50 cáncer.

“Sal farmacéuticamente aceptable” indica aquellas sales que conservan la eficacia y las propiedades biológicas de las bases libres y que pueden obtenerse por reacción con un ácido inorgánico u orgánico, por ejemplo con el
55 ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico, ácido málico, ácido cítrico, ácido maleico, ácido succínico, ácido tartárico y similares.

Una “composición farmacéutica” indica una mezcla de uno o varios compuestos descritos en esta solicitud, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, con otros componentes químicos, por ejemplo con vehículos
60 y excipientes farmacéuticamente aceptables. La finalidad de una composición farmacéutica consiste en facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

Tal como se emplea aquí, un “vehículo farmacéuticamente aceptable” indica un vehículo o diluyente que no provoca irritación significativa a un organismo y no merma la actividad biológica ni las propiedades del compuesto
65 administrado.

Un “excipiente” indica una sustancia inerte añadida a la composición farmacéutica para facilitar todavía más la administración de un compuesto. Los ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen el carbonato cálcico, el

fosfato cálcico, diversos azúcares y tipos de almidón, los derivados de celulosa, la gelatina, los aceites vegetales y los polietilenglicoles.

“Tratar” o “tratamiento” de una enfermedad incluye la prevención de la aparición de la enfermedad en un animal que esté predispuesto a dicha enfermedad, pero que todavía no manifiesta ni presenta los síntomas de dicha enfermedad (tratamiento profiláctico); la inhibición de la enfermedad (frenar o interrumpir su desarrollo), la aportación de alivio de dicha enfermedad (incluido el tratamiento paliativo); y el alivio de una enfermedad (provocando la regresión de la misma). En lo que respecta al cáncer, estos términos indican simplemente que la esperanza de vida de un individuo afectado por el cáncer aumentará o que se reducirán uno o varios de los síntomas de la enfermedad.

Se entiende por “seguimiento” la observación o la detección de un efecto de la puesta en contacto de un compuesto con una célula que expresa una PK concreta. El efecto observado o detectado puede ser un cambio del fenotipo de la célula, de la actividad catalítica de una PK o un cambio de la interacción de una PK con un reactivo natural de fijación. Las técnicas para observar o detectar tales efectos son ya bien conocidas de los expertos en la materia. Por ejemplo, la actividad catalítica de una PK puede observarse determinando la velocidad o la cantidad de fosforilación en una molécula diana. El efecto recién mencionado se elige entre un cambio o una ausencia de cambio en un fenotipo celular, un cambio o una ausencia de cambio en la actividad catalítica de dicha proteína-quinasa o un cambio o una ausencia de cambio en la interacción de dicha proteína-quinasa con un reactivo natural de fijación en un aspecto final de esta invención.

“Fenotipo celular” indica el aspecto exterior de una célula o tejido o de la función biológica de la célula o del tejido. Los ejemplos, sin limitación, de un fenotipo celular incluyen el tamaño celular, el crecimiento celular, la proliferación celular, la diferenciación celular, la supervivencia celular, la apoptosis, la absorción de nutrientes y el uso. Dichas características del fenotipo son susceptibles de medición con técnicas ya conocidas de los expertos en la materia.

Un “reactivo natural de fijación” indica un polipéptido que se fija sobre una PK concreta de una célula. Los reactivos naturales de fijación pueden desempeñar un papel en la propagación de una señal en un proceso de transducción de señales mediado por las PK. Un cambio en la interacción del reactivo natural de fijación con la PK puede manifestarse en forma de concentración mayor o menor del complejo de la PK con el reactivo natural de fijación y, en consecuencia, en un cambio observable de la capacidad de la PK para mediar en la transducción de señales.

Compuestos actualmente preferidos

En el resumen de la invención se define la definición más amplia de la invención, pero actualmente se prefieren ciertos compuestos de esta invención.

Los compuestos actualmente preferidos de esta invención son los que se ajustan a la fórmula (I), en la que:

R^3 , R^5 y R^6 se elige con independencia entre sí entre el grupo formado por hidrógeno, alquilo C_1 - C_{10} , trihaloalquilo C_1 - C_{10} , cicloalquilo C_3 - C_6 , alqueno C_2 - C_{10} , alquino C_2 - C_{10} , arilo C_6 - C_{12} , un heteroarilo de 5 a 9 eslabones que tiene de 1 a 4 átomos del anillo elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre; un grupo heterocíclico de 4 a 9 eslabones que tiene de 1 a 3 heteroátomos elegidos entre nitrógeno, oxígeno y $-S(O)_n$, en el que n es un número de 0 a 2; hidroxilo, alcoxi C_1 - C_{10} , O-arilo C_6 - C_{12} , un O-heteroarilo de 5 a 9 eslabones que tiene de 1 a 4 átomos de anillo elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre; mercapto, S-alquilo C_1 - C_{10} , S-cicloalquilo C_3 - C_6 , S-arilo C_6 - C_{12} , un S-heteroarilo de 5 a 9 eslabones que tiene de 1 a 4 átomos de anillo elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre; $-S(=O)-R$ ”, $-S(=O)_2R$ ”, $-S(=O)_2NR^{13}R^{14}$, $-NR^{13}S(=O)_2R^{14}$, $-NH-S(=O)_2CX_3$, en el que X es halógeno; $-C(=O)-R$ ”, $-C(=O)O-R$ ”, $-O(=O)R$ ”, $-C(=O)NR^{13}R^{14}$, $R^{14}C(=O)NR^{13}$ -, ciano, nitro, halógeno, $-OC(=O)NR^{13}R^{14}$, $R^{14}OC(=O)NR^{13}$ -, $-OC(=S)NR^{13}R^{14}$, $R^{14}OC(=S)NR^{13}$ -, amino y $-NR^{11}R^{12}$, en el que R^{11} y R^{12} se elige con independencia entre sí entre el grupo formado por hidrógeno, alquilo C_1 - C_{10} , cicloalquilo C_3 - C_6 , arilo C_6 - C_{12} , $-C(=O)-R$ ”, $-C(=O)CH_3$, $-S(=O)_2R$ ” y $CF_3CS(=O)_2$ - o bien R^{11} y R^{12} junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo heterocíclico de cinco o seis eslabones; en especial, R^3 , R^5 y R^6 son hidrógeno;

R^7 es hidrógeno;

R^4 es hidrógeno o halógeno; en especial hidrógeno, flúor o cloro; sobre todo hidrógeno o flúor;

$R^{1'}$ es hidrógeno o metilo; en especial hidrógeno;

R^8 y R^{10} con independencia entre sí son alquilo C_1 - C_4 sin sustituir; en especial metilo;

R^9 es hidrógeno, alquilo C_1 - C_4 sustituido por $-C(=O)O-R$ ” o $-C(=O)NHR^{12}$, en el que R^{12} es alquilo C_1 - C_4 sustituido por amino o heterocíclico, ya definido antes, y opcionalmente sustituido por hidroxilo; R^9 es con preferencia especial hidrógeno, 3-carboxipropilo, (2-dietilaminoetil)-aminocarbonilo, (2-etilaminoetil)aminocarbonilo, 3-(morfolin-4-il)propil-aminocarbonilo, 3-(morfolin-4-il)-2-hidroxi-propilaminocarbonilo, en especial hidrógeno, 3-carboxipropilo, (2-dietilaminoetil)aminocarbonilo o (2-etilaminoetil)-aminocarbonilo; y

$R^{3'}$ y $R^{4'}$ con alquilo C_1 - C_4 opcionalmente sustituido por hidroxilo; en especial metilo, etilo, 2-hidroxietilo; o bien $R^{3'}$ y $R^{4'}$ junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo elegido entre el grupo formado por el

ES 2 269 416 T3

pirrolidin-1-ilo, 2-(S)-hidroximetilpirrolidin-1-ilo, 2-(S)-carboxi-pirrolidin-1-ilo, piperazin-1-ilo y 4-metilpiperazin-1-ilo; con la condición de que cuando R^{1'} es hidrógeno, entonces R^{3'} y R^{4'} junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos no formen un anillo de pirrolidin-1-ilo; o bien R^{3'} y R^{4'} junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo heteroarilo, elegido entre el grupo formado por el pirrol-1-ilo, piridin-1-ilo, oxazol-3-ilo, isoxazol-2-ilo, pirazin-1-ilo, piridazin-1-ilo, quinolin-1-ilo e imidazol-1-ilo; con mayor preferencia piridin-1-ilo.

En los párrafos anteriores se han presentado muchas preferencias y con arreglo a una cualquiera de estas preferencias se puede obtener un compuesto de esta invención que actualmente es más preferido que otro compuesto, en el que no se omite aquella preferencia particular. Sin embargo, estas preferencias son por lo general independientes (aunque algunas preferencias (alternativas) sean mutuamente excluyentes) y aditivas; y atendiendo a más de una de tales preferencias puede obtenerse un compuesto actualmente más preferido que otro, que atiende a un menor número de preferencias.

Los grupos de compuestos actualmente preferidos de esta invención son los siguientes:

(a) R^{1'}, R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ y R⁹ son hidrógeno; R⁸ y R¹⁰ son alquilo C₁-C₄ sin sustituir, en especial metilo; y R^{3'} y R^{4'} junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un resto 2-(S)-hidroximetilpirrolidin-1-ilo, 2-(S)-carboxipirrolidin-1-ilo, piperazin-1-ilo o 4-metilpiperazin-1-ilo;

(b) R^{1'}, R³, R⁴, R⁵, R⁶ y R⁷ son hidrógeno; R⁸ y R¹⁰ son alquilo C₁-C₄ sin sustituir, en especial metilo; R⁹ es alquilo C₁-C₄ sustituido por C-carboxi, en especial 3-carboxipropilo; y R^{3'} y R^{4'} junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un resto 2-(S)-hidroximetilpirrolidin-1-ilo, 2-(S)-carboxipirrolidin-1-ilo, piperazin-1-ilo o 4-metilpiperazin-1-ilo;

(c) R^{1'}, R³, R⁵, R⁶ y R⁷ son hidrógeno; R⁴ es halógeno, en especial flúor; R⁸ y R¹⁰ son alquilo C₁-C₄ sin sustituir, en especial metilo; R⁹ es -C(=O)NHR¹³, en el que R¹³ es alquilo C₁-C₄ sustituido por amino o heteroalíclico y opcionalmente sustituido hidroxilo; en especial (2-dietilaminoetil)-aminocarbonilo, (2-etilaminoetil)-aminocarbonilo, 3-(morfolin-4-il)propilaminocarbonilo, 3-(morfolin-4-il)-2-hidroxi-propilaminocarbonilo, en particular el (2-dietilaminoetil)aminocarbonilo o el (2-hidroxi-propilaminocarbonilo); y R^{3'} y R^{4'} junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un resto 2-(S)-hidroximetilpirrolidin-1-ilo, 2-(S)-carboxipirrolidin-1-ilo, piperazin-1-ilo o 4-metilpiperazin-1-ilo;

(d) R^{1'}, R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ y R⁹ son hidrógeno; R⁸ y R¹⁰ son alquilo C₁-C₄ sin sustituir, en especial metilo; R⁹ es alquilo C₁-C₄ sustituido por C-carboxi, en especial 3-carboxipropilo; y R^{3'} y R^{4'} junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo heteroarilo, con preferencia el pirrol-1-ilo, piridin-1-ilo, oxazol-3-ilo, isoxazol-2-ilo, pirazin-1-ilo, quinolin-1-ilo, imidazol-1-ilo; con mayor preferencia el piridin-1-ilo.

Los compuestos actualmente preferidos de esta invención incluyen:

(3Z)-3-[(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il)-metilideno]-1-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona;

(3Z)-3-[(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il)-metilideno]-1-[2(S)-hidroximetil-1-pirrolidinilmetil]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona;

(3Z)-3-[(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il)-metilideno]-1-[2(S)-carboxi-1-pirrolidinilmetil]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona;

(3Z)-3-[[3,5-dimetil-4-(2-dietilaminoetilaminocarbonil)-1H-pirrol-2-il]-metilideno]-1-(1-pirrolidinilmetil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona;

(3Z)-3-[[3,5-dimetil-4-(2-etilaminoetilaminocarbonil)-1H-pirrol-2-il]-metilideno]-1-(1-pirrolidinilmetil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona; y

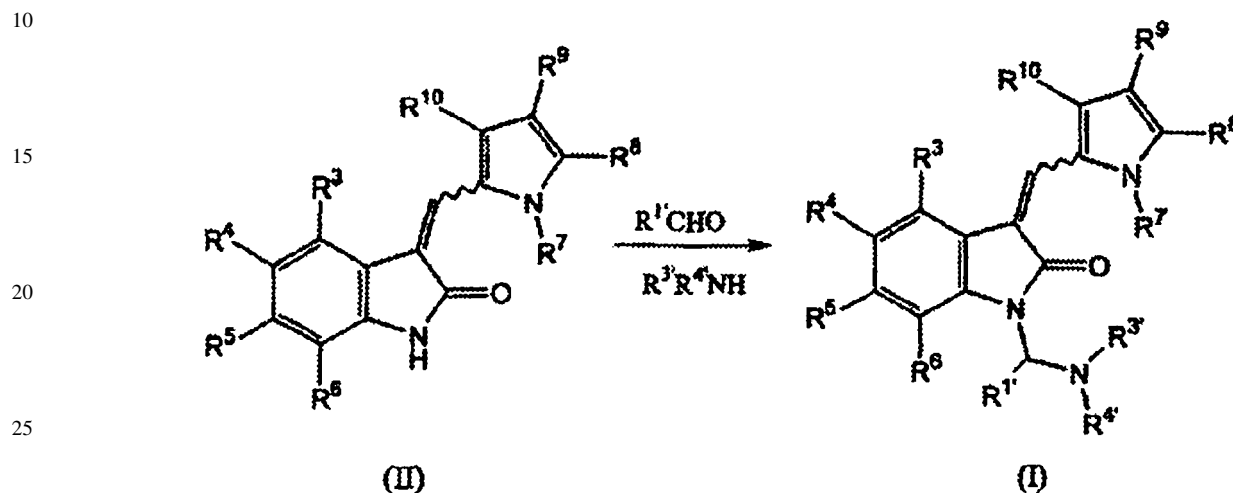
(3Z)-3-[[3,5-dimetil-4-(3-morfolin-4-il-2-hidroxi-propilaminocarbonil)-1H-pirrol-2-il]-metilideno]-1-(1-pirrolidinilmetil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona.

Esquema general de síntesis

Los materiales de partida y los reactivos empleados para la obtención de estos compuestos son productos comerciales suministrados por ejemplo por Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, Wis.), Bachem (Torrance, Calif.) o Sigma (St. Louis, Mo.) o bien son compuestos que pueden obtenerse por métodos que los expertos en la materia ya conocen, descritos por ejemplo en manuales tales como Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, volúmenes 1-17 (John Wiley and Sons, 1991); Rodd's Chemistry of Carbon Compounds, volúmenes 1-5 y suplementos (Elsevier Science Publishers, 1989); Organic Reactions, volúmenes 1-40 (John Wiley and Sons, 1991); March's Advanced Organic Chemistry (John Wiley and Sons, 4ª edición) y Larock's Comprehensive Organic Transformations (VCH Publishers Inc., 1989). Estos esquemas son meramente ilustrativos de algunos métodos, con los que pueden sintetizarse los compuestos de esta invención y se pueden introducir diversas modificaciones en estos esquemas y los expertos en la materia los comprenderán fácilmente a la vista de lo expuesto en esta publicación. Los materiales de partida y los productos intermedio de la reacción pueden aislarse y purificarse, si se desea, aplicando técnicas convencio-

nales, incluidas pero sin limitarse a ellas: la filtración, la destilación, la cristalización, la cromatografía y similares. Dichos materiales pueden caracterizarse utilizando medios convencionales, incluidas las constantes físicas y los datos espectrales. A menos que se especifique lo contrario, las reacciones descritas se realizan a presión atmosférica y en un intervalo de temperaturas comprendido entre -78°C y 150°C, con mayor preferencia entre 0°C y 125°C y con preferencia especial a temperatura ambiente, p.ej. en torno a 20°C.

Los compuestos de la fórmula (I), en la que R^{3'} y R^{4'} con independencia entre sí son alquilo o, juntos, forman un anillo heterocíclico, pueden obtenerse con arreglo al método ilustrado y descrito a continuación:



Un compuesto de la fórmula (I), en la que de R³ a R¹⁰ y R^{1'}, R^{3'} y R^{4'} tienen los significados definidos en el resumen de la invención, puede obtenerse por reacción de un compuesto de la fórmula (II) con un aldehído, por ejemplo el formaldehído, el acetaldehído y similares, y una amina adecuada.

El disolvente en el que se lleva a cabo la reacción puede ser un disolvente prótico o aprótico, con preferencia un disolvente prótico, por ejemplo un alcohol, p.ej. el metanol o el etanol, o un alcohol acuoso. La reacción se lleva a cabo a temperaturas superiores a la temperatura ambiente. La temperatura se sitúa en general entre aproximadamente 20 y aproximadamente 100°C, con preferencia entre aproximadamente 40 y aproximadamente 80°C. Con "aproximadamente" se indica que el intervalo de temperaturas se sitúa con preferencia dentro de los 10 grados centígrados en torno a la temperatura indicada, con mayor preferencia dentro de los 5 grados centígrados de la temperatura indicada y con preferencia especial dentro de los 2 grados centígrados de la temperatura indicada. Por ejemplo, con "aproximadamente 60°C" se indica 60°C ± 10°C, con preferencia 60°C ± 5°C y con preferencia especial 60°C ± 2°C.

Las aminas idóneas incluyen a las aminas secundarias alicíclicas y cíclicas. Estas aminas son productos comerciales suministrados por Aldrich, Sigma, etc. o bien compuestos que pueden obtenerse por métodos ya conocidos de la técnica. Los ejemplos de aminas secundarias son la dimetilamina, la dietilamina y la bis(2-hidroxiethyl)amina. Los ejemplos de aminas secundarias cíclicas incluyen a las N-alquil-piperazinas, pirrolidina, prolina, 2-hidroxiethylpirrolidina, 3,5-dimetilpiperazina, 2-metilpirrolidina y morfolina.

Los compuestos de la fórmula (I), en la que R^{3'} y R^{4'}, juntos, forman un anillo heteroarilo, pueden obtenerse por reacción de la 3-pirrolidinil-2-indolinona (II) original con un aldehído adecuado, formándose un compuesto intermedio, el derivado N-hidroxiálquilo del (II), y por reacción del compuesto intermedio con oxiclóruo de fósforo y una heteroarilo idóneo, por ejemplo la piridina, el pirrol, el oxazolilo, el imidazolilo y similares. La reacción puede llevarse a cabo a temperaturas más bajas que la temperatura ambiente. La temperatura se sitúa en general entre aproximadamente -20°C y aproximadamente 20°C, con preferencia entre aproximadamente -10°C y aproximadamente 10°C. Se entiende por "aproximadamente" que el intervalo de temperaturas se sitúa con preferencia dentro de 10 grados centígrados en torno a la temperatura indicada, con mayor preferencia dentro de 5 grados centígrados en torno a la temperatura indicada y con preferencia especial dentro de 2 grados centígrados en torno a la temperatura indicada. Por ejemplo, se entiende por "aproximadamente 0°C" una temperatura de 0°C ± 10°C, con preferencia 0°C ± 5°C y con preferencia especial 0°C ± 2°C.

Los compuestos de la fórmula (II) pueden obtenerse por métodos ya conocidos de la técnica. Por ejemplo, el compuesto (II), en el que de R³ a R⁶, R⁷ y R⁹ son hidrógeno y R⁸ y R¹⁰ son metilo, puede obtenerse con arreglo al procedimiento descrito en la patente US-5 792 783, columna 22, renglones 60-67, dicha publicación se incorpora a la presente como referencia. Otros compuestos de la fórmula (II) pueden obtenerse del modo descrito en la patente US-5 792 783, publicación de la solicitud PCT n° WO 99/61422 y en la solicitud de patente con número de serie US-09/783 264, depositada con fecha 15 de febrero de 2001 y titulada "2-INDOLINONAS SUSTITUIDAS POR PIRROL COMO INHIBIDORES DE PROTEÍNA-QUINASAS".

La obtención de los compuestos de la fórmula (I) puede incluir además el paso de eliminación del grupo protector. “Grupo protector” indica un grupo utilizado para hacer que un resto reactivo se mantenga inerte hasta la eliminación de dicho grupo protector. Los restos reactivos ya son conocidos de los expertos en la materia; los restos reactivos preferidos incluyen el nitrógeno, oxígeno, azufre y los grupos carboxilo y carbonilo reactivos. Los ejemplos de grupos protectores del nitrógeno incluyen, pero no se limitan a: grupos bencilo, benciloxicarbonilo, tert-butoxicarbonilo, sililo (p.ej. tert-butildimetilsililo), grupos 9-fluorenilmetoxicarbonilo, 9-fenil-9-fluorenilo y arilsulfonilo (p.ej. toluenosulfonilo). Los ejemplos de grupos protectores del oxígeno incluyen, pero no se limitan a: grupos aliloxicarbonilo, benzoílo, bencilo, tert-butilo, sililo (p.ej. tert-butildimetilsililo), 2-etoxietilo, p-metoxibencilo, metoximetilo, pivaloílo, tetrahidropiran-2-ilo y tritilo. Los ejemplos de grupos protectores del carboxilo incluyen, pero no se limitan a: grupos metilo, alilo, bencilo, sililo (p.ej. tert-butildimetilsililo) y p-nitrobencilo. Los ejemplos de grupos protectores del carbonilo incluyen, pero no se limitan a: grupos acetilo (p.ej. O,O-acetales).

Los grupos protectores pueden eliminarse utilizando métodos ya conocidos de la bibliografía técnica. Por ejemplo, para eliminar los grupos protectores del nitrógeno, véase Greene y col., *Protecting Groups in Organic Synthesis*, 2ª ed., John Wiley and Sons, Nueva York 1991, pp. 309-405; y Kocienski, *Protecting Groups*, editorial Thieme, Nueva York 1994, pp. 185-243. Los métodos para la eliminación de grupos protectores concretos se describen en los ejemplos.

Utilidad

Las PK, cuya actividad catalítica se modula con los compuestos de esta invención, incluyen las proteína-tirosina-quinasas, de las que existen dos tipos: las tirosina-quinasas de receptor (RTK) y las tirosina-quinasas celulares (CTK); y las serina-treonina-quinasas (STK). La transducción de señales mediada por las RTK se inicia con una interacción extracelular con un factor de crecimiento específico (ligando) y posterior dimerización del receptor, estimulación transitoria de la actividad intrínseca de la proteína-tirosina-quinasa y fosforilación. Los sitios de fijación se crean con ello para las moléculas de transducción de señales intracelulares y conducen a la formación de complejos con un espectro de moléculas de señalización citoplásmica que facilitan la respuesta celular apropiada (p.ej. la división celular, los efectos metabólicos en el microentorno extracelular, etc.), véase Schlessinger y Ullrich, *Neuron* 9, 303-391, 1992.

Se ha demostrado que los sitios de fosforilación de la tirosina de los receptores de factor de crecimiento actúan como sitios de fijación de alta afinidad con los dominios SH2 (homología src) de las moléculas señalizadoras, véase Fantl y col., *Cell* 69, 413-423, 1992; Songyang y col., *Mol. Cell. Biol.* 14, 2777-2785, 1994; Songyang y col., *Cell* 72, 767-778, 1993; y Koch y col., *Science* 252, 668-678, 1991. Se han identificado diversas proteínas de sustrato intracelular que están asociadas con las RTK. Pueden dividirse en dos grupos principales: (1) sustratos que tienen un dominio catalítico y (2) sustratos que carecen de tal dominio, pero que sirven de adaptadores y se asocian con moléculas catalíticamente activas, véase Songyang y col., *Cell* 72, 767-778, 1993. La especificidad de las interacciones entre los receptores y los dominios SH2 de sus sustratos viene determinada por los restos aminoácido que rodean estrechamente al resto tirosina fosforilado. Las diferencias entre las afinidades de fijación de los dominios SH2 y las secuencias de aminoácidos que rodean a los restos fosfotirosina de los receptores concretos son coherentes con las diferencias observadas en sus perfiles de fosforilación de sustrato, véase Songyang y col., *Cell* 72, 767-778, 1993. Estas observaciones sugieren que el funcionamiento de cada RTK viene determinado no solo por su modelo de expresión y la disponibilidad de ligando, sino también por el orden de las vías de transducción de señales descendentes que se activan por acción de un receptor concreto. Por lo tanto, la fosforilación proporciona un paso regulador importante que determina la selectividad de las vías de señalización reclutas por receptores de factores de crecimiento concretos, así como por receptores de factores de diferenciación.

Las STK, que son primariamente citosólicas, afectan la bioquímica interna de la célula, a menudo en forma de respuesta de línea descendente a un acontecimiento PTK. Las STK intervienen en el proceso de señalización que inicia la síntesis del DNA y la posterior mitosis que conduce a la proliferación celular.

Por lo tanto, la transducción de señales PK se traduce, entre otras respuestas, en la proliferación celular, diferenciación celular, crecimiento y metabolismo celular. Una proliferación celular anormal puede acarrear un amplio abanico de trastornos y enfermedades, incluido el desarrollo de neoplasias del tipo carcinoma, sarcoma, glioblastoma y hemangiona, trastornos del tipo leucemia, psoriasis, arteriosclerosis, artritis y retinopatía diabética y otros trastornos relacionados con la angiogénesis y/o vasculogénesis descontroladas.

En otro aspecto, la proteína-quinasa, cuya actividad catalítica se modula por el contacto con un compuesto de esta invención, es una proteína-tirosina-quinasa, más en concreto una proteína-tirosina-quinasa de receptor. Entre las proteína-tirosina-quinasas de receptor, cuya actividad catalítica puede modularse con un compuesto de esta invención o una sal del mismo, se cuentan, sin limitación, la EGF, HER2, HER3, HER4, IR, IGF-1R, IRR, PDGFR α , PDGFR β , CSFIR, C-Kit, C-fms, Flk-1R, Flk4, KDR/Flk-1, Flt-1, FGFR-1R, FGFR-2R y FGFR-4R.

Las proteína-tirosina-quinasas, cuya actividad catalítica se modula por contacto con un compuesto de esta invención o una sal del mismo, pueden ser también proteína-tirosina-quinasas de no receptor (CTK). Por lo tanto, la actividad catalítica de las CTK tales como, sin limitación, la Src, Frk, Btk, Csk, Abl, ZAP70, Fes, Fps, Fak, Jak, Ack, Yes, Fyn, Lyn, Lck, Blk, Hck, Fgr e Yrk, puede modularse con un compuesto o una sal de esta invención.

ES 2 269 416 T3

Otro grupo más de PK, cuya actividad catalítica puede modularse por contacto con un compuesto de esta invención, es el formado por las serina-treonina-proteína-quinasas, por ejemplo, pero sin limitación, la CDK2 y el Raf.

En otro aspecto, esta invención se refiere al uso de un compuesto de esta invención para la fabricación de un medicamento destinado a tratar o prevenir un trastorno relacionado con las PK mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de esta invención o una sal del mismo a un organismo.

Es también un aspecto de esta invención que se administre una composición farmacéutica que contiene un compuesto de esta invención o una sal del mismo a un organismo con el fin de prevenir o tratar un trastorno relacionado con las PK.

Esta invención está dirigida por tanto a compuestos que modulan la transducción de señales de las PK afectando a la actividad enzimática de las RTK, CTK y/o STK, con lo cual se interfiere en las señales transducidas por estas proteínas. Más en concreto, la presente invención se refiere a compuestos que modulan conductos de transducción de señales en los que median las RTK, CTK y/o STK como estrategia para curar muchos tipos de tumores sólidos, incluidos, pero sin limitarse a ellos: los carcinomas, los sarcomas, incluido el sarcoma de Kaposi, el eritroblastoma, el glioblastoma, el astrocitoma, el melanoma y el mioblastoma. El tratamiento o la prevención de cánceres de tumores no sólidos, por ejemplo la leucemia, están también contemplados por esta invención. Las indicaciones pueden ser, aunque no se limitan a ellas: los cánceres de cerebro, los cánceres de vejiga, los cánceres de ovarios, los cánceres gástricos, los cánceres pancreáticos, los cánceres de colon, los cánceres de sangre, los cánceres de pulmón y los cánceres de hueso.

Otros ejemplos, sin limitación, de tipos de trastornos relacionado con una actividad inadecuada de las PK, que los compuestos descritos aquí pueden ser útiles para tratar, prevenir y estudiar, son los trastornos celulares proliferantes, los trastornos fibróticos, los trastornos metabólicos y las enfermedades infecciosas.

Los trastornos de proliferación celular, que pueden prevenirse, tratarse o también estudiarse con la presente invención, incluyen el cáncer, los trastornos de proliferación de vasos sanguíneos y los trastornos de proliferación de células mesangiales.

Los trastornos de proliferación de vasos sanguíneos indican trastornos relacionados con una vasculogénesis (formación de vasos sanguíneos) anormal o una angiogénesis (extensión de vasos sanguíneos) anormal. La vasculogénesis y la angiogénesis desempeñan un papel importante en un gran número de procesos fisiológicos, por ejemplo el desarrollo del embrión, la formación del cuerpo lúteo, la curación de las heridas y la regeneración de los órganos y desempeñan también un papel crucial en el desarrollo del cáncer, en cuyo caso contribuyen a la formación de nuevos capilares, requeridos para mantener vivo un tumor. Otros ejemplos de trastornos de proliferación vascular incluyen la artritis, en la que los nuevos vasos sanguíneos capilares invaden la articulación y destruyen el cartílago, y las enfermedades oculares, por ejemplo la retinopatía diabética, en la que los nuevos capilares de la retina invaden el humor vítreo, sangran y provocan la ceguera.

Se han identificado dos RTK estructuralmente afines que fijan la VEGF con alta afinidad: el receptor de tirosina 1 similar al *fms* (*fit-1*) (ver Shibuya y col., *Oncogene* 5, 519-524, 1990; De Vries y col., *Science* 255, 989-991, 1992) y el receptor KDR/FLK-1, también conocido como VEGF-R2. Se ha publicado que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es un mitógeno específico de células endoteliales, que tiene actividad promotora del crecimiento de células endoteliales "*in vitro*", véase Ferrara & Henzel, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 161, 851-858, 1989; Vaisman y col., *J. Biol. Chem.* 265, 19461-19566, 1990. La información publicada en las solicitudes de patente norteamericana con los números de serie 08/193 829; 08/038 596 y 07/975 750; sugieren con fuerza que la VEGF no solamente causa la proliferación de las células endoteliales, sino que además es el regulador principal de las angiogénesis normal y patológica, véase Klagsburn & Soker, *Current Biology* 3(10), 699-702, 1993; Houck y col., *J. Biol. Chem.* 267, 26031-26037, 1992.

La vasculogénesis y la angiogénesis normales desempeñan papeles importantes en un gran número de procesos fisiológicos, por ejemplo el desarrollo del embrión, la curación de las heridas, la regeneración de los órganos y los procesos reproductivos femeninos, tales como el desarrollo del folículo del cuerpo lúteo durante la ovulación y el crecimiento de la placenta durante el embarazo, véase Folkman & Shing, *J. Biological Chem.* 267(16), 10931-34, 1992. La vasculogénesis y/o la angiogénesis descontroladas se han asociado con enfermedades, por ejemplo la diabetes, así como con tumores sólidos malignos, que necesitan la vascularización para crecer, véase Klagsburn & Soker, *Current Biology* 3(10), 699-702, 1993; Folkman, *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 4-6, 1991; Weidner y col., *New Engl. J. Med.* 324, 1-5, 1991.

Tal como se entiende actualmente, el rol de la VEGF en la proliferación y migración de células endoteliales durante la angiogénesis y la vasculogénesis indica que el receptor de KDR/FLK-1 tiene un rol importante en estos procesos. Las enfermedades del tipo diabetes mellitus (ver Folkman, 198, en: XI Congreso de Trombosis y Hemostasis (Vestraeta y col., coordinadores), pp. 583-596, Leuven University Press, Lovaina) y artritis así como el crecimiento de tumores malignos puede ser el resultado de una angiogénesis incontrolada, véase p.ej. Folkman, *N. Engl. J. Med.*, 285, 1182-1186, 1971. Los receptores, sobre los que la VEGF se fija específicamente, son una diana importante y terapéuticamente potente para regular y modular la vasculogénesis y/o la angiogénesis y un gran número de enfermedades graves, que implican un crecimiento celular anormal provocado por tales procesos, ver Plowman y col., *DN&P* 7(6), 334-339, 1994. Más en concreto, el rol altamente específico del receptor de KDR/FLK-1 en la neovascularización lo

convierte en la mejor diana para las estrategias terapéuticas del tratamiento del cáncer y de otras enfermedades, en las que interviene la formación incontrolada de vasos sanguíneos.

5 Por consiguiente, un aspecto de la presente invención se refiere a compuestos capaces de regular y/o modular la transducción de señales de tirosina-quinasas, incluida la transducción de señales del receptor de la KDR/FLK-1, con el fin de inhibir o promover la angiogénesis y/o la vasculogénesis, es decir, compuestos que inhiben, previenen o interfieren la señal transducida por la KDR/FLK-1, cuando se activan con ligandos del tipo VEGF. Aunque se cree que los compuestos de la presente invención actúan sobre un receptor u otro componente a lo largo del recorrido de la transducción de señales de la tirosina-quinasa, es también posible que actúen directamente sobre las células tumorales, 10 que resultan de una angiogénesis incontrolada.

Aunque la nomenclatura de los receptores "flk-I" genéricos humanos difiera de los homólogos murinos, en muchos aspectos son intercambiables. El receptor murino, Flk-1, y su homólogo humano, el KDR, tienen en común una homología de secuencia del 93,4% dentro del dominio intracelular. De igual manera, el FLK-1 murino fija la VEGF 15 humana con la misma afinidad que el la VEGF de ratón y, por consiguiente, se activa por acción del ligando derivado de otras especies, véase Millauer y col., Cell 72, 835-846, 1993; Quinn y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7533-7537, 1993. El FLK-1 se asocia también a sustratos de RTK humana, a los que seguidamente fosforila la tirosina (p.ej. PLC- γ o p85) cuando se co-expresan en células 293 (fibroblastos de riñón embrionario humano).

20 Por consiguiente, los modelos que se basan en el receptor FLK-1 pueden aplicarse directamente a la comprensión del receptor KDR. Por ejemplo, el uso del receptor FLK-1 murino en método para identificar compuestos que regulan el conducto de transducción de señales en ratones puede aplicarse directamente a la identificación de compuestos que pueden utilizarse para regular el conducto de transducción de señales en el hombre, es decir, que regulan la actividad relacionada con el receptor KDR. Por lo tanto, los compuestos químicos identificados como inhibidores del KDR/FLK-1 "in vitro" pueden confirmarse en modelos adecuados "in vivo". Tanto el modelo animal de ratón como de rata "in vivo" han demostrado ser de un valor extraordinario para el examen del potencial clínico de los agentes que actúan sobre el conducto de transducción de señales inducido por el KDR/FLK-1.

30 Por ello, en un aspecto, la invención se refiere a compuestos que regulan, modulan y/o inhiben la vasculogénesis y/o la angiogénesis incidiendo sobre la actividad enzimática del receptor KDR/FLK-1 e interfiriendo en las señales transducidas por el KDR/FLK-1. En otro aspecto, la presente invención se refiere a compuestos que regulan, modulan y/o inhiben el conducto de transducción de señales mediado por el KDR/FLK-1, como estrategia terapéutica de tratamiento de muchos tipos de tumores sólidos, incluidos, pero sin limitarse a ellos: el glioblastoma, el melanoma y el sarcoma de Kaposi y el carcinoma de ovarios, de pulmón, de mama, de próstata, de páncreas, de colon y de epidermis. 35 Los datos sugieren además la administración de compuestos, que inhiben el conducto de transducción de señales mediado por el KDR/Flk-1, pueden utilizarse también para el tratamiento del hemangioma, la restenosis y la retinopatía diabética.

Otro aspecto de esta invención se refiere a la inhibición de la vasculogénesis y de la angiogénesis por otros conductos mediados por el receptor, incluidos los conductos que comprenden el receptor flt-1.

40 La transducción de señales mediada por la tirosina-quinasa de receptor se inicia por la interacción extracelular con un factor de crecimiento específico (ligando) y posterior dimerización del receptor, estimulación transitoria de la actividad intrínseca de la proteína-tirosina-quinasa y autofosforilación. Para ello se crean sitios de fijación para las moléculas de transducción de señales intracelulares, que conduce a la formación de complejos con un espectro de moléculas de señalización citoplásmica que facilita la respuesta celular apropiada, p.ej. la división celular, y los efectos metabólicos en el microentorno extracelular, véase Schlessinger y Ullrich, Neuron 9, 1-20, 1992.

50 La estrecha homología de regiones intracelulares del KDR/FLK-1 con la del receptor PDGF- β (homología del 50,3%) y/o el receptor afín flt-1 indica que hay una inducción de conductor de transducción de señales que se solapan. Por ejemplo, para el receptor PDGF- β se ha observado que los miembros de la familia src (Twamley y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7696-7700, 1993), la fosfatidilinositol-3'-quinasa (Hu y col., Mol. Cell. Biol. 12, 981-990, 1992), la fosfolipasa γ (Kashishian & Cooper, Mol. Cell. Biol. 4, 49-51, 1993), la proteína que activa la ras-GTPasa (Kashishian y col., EMBO J. 11, 1373-1382, 1992), la PTP-ID/syp (Kaslauskas y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 10 90, 6939-6943, 1993), Grb2 (Arvidsson y col., Mol. Cell. Biol. 14, 6715-6726, 1994) y las moléculas adaptadoras Shc y Nck (Nishimura y col., Mol. Cell. Biol. 13, 6889-6896, 1993) se fijan sobre regiones que contienen diferentes sitios de autofosforilación, véase en general: Claesson-Welsh, Prog. Growth Factor Res. 5, 37-54, 1994. Por ello, es probable que los conductos de transducción de señales activados por el KDR/FLK-1 incluyen el conducto ras (Rozakis y col., Nature 360, 689-692, 1992), los conductos mediados por la quinasa PI-3', los mediados por la src y los mediados por la plcy. Cada uno de estos conductos puede desempeñar un papel crítico en el efecto angiogénico y/o vasculogénico del KDR/FLK-1 en las células endoteliales. Por consiguiente, otro aspecto más de esta invención se refiere al uso de los compuestos orgánicos descritos aquí para modular la angiogénesis y la vasculogénesis, dado que estos procesos están controlados por estos conductos.

65 A la inversa: los trastornos relacionados con el estrechamiento, la contracción o el cierre de vasos sanguíneos, como son la restenosis, intervienen también y pueden tratarse o prevenirse con los métodos de esta invención.

Los trastornos fibróticos se refieren a la formación anormal de matrices extracelulares. Los ejemplos de trastornos fibróticos incluyen la cirrosis hepática y los trastornos de proliferación de células mesangiales. La cirrosis hepática está caracterizada por el aumento de los constituyentes de la matriz extracelular que se traducen en la formación de una cicatriz hepática. Un aumento de la matriz extracelular, manifestada en una cicatriz hepática, puede ser también debido a una infección vírica, por ejemplo una hepatitis. Al parecer, los lipocitos desempeñan un papel destacado en la cirrosis hepática. Otro trastorno fibrótico contemplado es la aterosclerosis.

Los trastornos de proliferación de células mesangiales se refieren a los trastornos provocados por la proliferación anormal de células mesangiales. Los trastornos de proliferación mesangial incluyen diversas enfermedades renales humanas, como son la glomerulonefritis, la nefropatía diabética y la nefrosclerosis maligna, así como trastornos del tipo del síndrome de la microangiopatía trombótica, el rechazo de trasplante y las glomerulopatías. El RTK-PDGFR interviene también en el mantenimiento de la proliferación de las células mesangiales, véase Floege y col., *Kidney International* **43**, 47S-54S, 1993.

Muchos cánceres son trastornos de proliferación celular y, tal como se ha mencionado antes, las PK se han asociado con trastornos de proliferación celular. Por lo tanto, no es sorprendente que las PK, por ejemplo los miembros de la familia de las RTK, se hayan asociado con el desarrollo del cáncer. Algunos de estos receptores, por ejemplo el EGFR (Tuzi y col., *Br. J. Cancer* **63**, 227-233, 1991; Torp y col., *APMIS* **100**, 713-719, 1992), el HER2/neu (Slamon y col., *Science* **244**, 707-712, 1989) y el PDGF-R (Kumabe y col., *Oncogene* **7**, 627-633, 1992) se sobreexpresan en muchos tumores y/o se activan de modo persistente en bucles autocrinos. De hecho, en la mayoría de cánceres comunes y graves se han puesto de manifiesto estas sobreexpresiones de los receptores (Akbasak y Suner-Akbasak y col., *J. Neurol. Sci.* **111**, 119-133, 1992; Dickson y col., *Cancer Treatment Res.* **61**, 249-273, 1992; Korc y col., *J. Clin. Invest.* **90**, 1352-1360, 1992) y los bucles autocrinos (Lee y Donoghue, *J. Cell. Biol.* **118**, 1057-1070, 1992; Korc y col., ver más arriba; Akbasak y Suner-Akbasak y col., lugar citado). Por ejemplo, el EGFR se ha asociado con el carcinoma de células escamosas, el astrocitoma, el glioblastoma, el cáncer de cabeza y de cuello, el cáncer de pulmón y el cáncer de vejiga. El HER2 se ha asociado con el cáncer de mama, de ovarios, gástrico, de pulmón, de páncreas y de vejiga. El PDGFR se ha asociado con el glioblastoma y el melanoma así como con el cáncer de pulmón, de ovarios y de próstata. El RTK-c-met se ha asociado también con la formación de tumores malignos. Por ejemplo, el c-met se ha asociado, entre otros cánceres, con los carcinomas colorrectales, de tiroides, de páncreas, de estómago y de células hepáticas y con linfomas. Además, el c-met se ha asociado con la leucemia. La sobreexpresión del gen c-met se ha detectado también en pacientes que padecen la enfermedad de Hodgkin y la enfermedad de Burkitt.

El IGF-IR, además de estar implicado en el apoyo nutritivo y en la diabetes de tipo II, se ha asociado también con diversos tipos de cáncer. Por ejemplo, el IGF-I se considera implicado como estimulador de crecimiento autocrino en diversos tipos de tumores, p.ej. las células del carcinoma de mama humano (Arteaga y col., *J. Clin. Invest.* **84**, 1418-1423, 1989) y en células pequeñas de tumor de pulmón (Macauley y col., *Cancer Res.* **50**, 2511-2517, 1990). Además, el IGF-I, aparte de estar totalmente involucrado en el crecimiento y diferenciación normales del sistema nervioso, parece ser también un estimulador autocrino de gliomas humanos, ver Sandberg-Nordqvist y col., *Cancer Res.* **53**, 2475-2478, 1993. La importancia del IGF-IR y de sus ligandos en la proliferación celular se fundamenta además en el hecho de que el IGF-I estimula el crecimiento de muchos tipos de células en cultivo (fibroblastos, células epiteliales, células de músculo liso, linfocitos T, células mieloides, condrocitos y osteoblastos (las células germinales de la médula ósea)), ver Goldring y Goldring, *Eukaryotic Gene Expression* **1**, 301-326, 1991. En una serie de publicaciones recientes, Baserga sugiere que el IGF-IR desempeña un papel fundamental en el mecanismo de transformación y, como tal, podría ser una diana preferida de las intervenciones terapéuticas para un amplio espectro de enfermedades malignas humanas, véase Baserga, *Cancer Res.* **55**, 249-252, 1995; Baserga, *Cell* **79**, 927-930, 1994; Coppola y col., *Mol. Cell. Biol.* **14**, 4588-4595, 1994.

Se ha implicado a las STK en muchos tipos de cáncer, incluido sobre todo el cáncer de mama (Cance y col., *Int. J. Cancer* **54**, 571-77, 1993).

La asociación entre la actividad anormal de las PK y la enfermedad no se restringe al cáncer. Las RTK se han asociado por ejemplo con enfermedades tales como la psoriasis, la diabetes mellitus, la endometriosis, la angiogénesis, el desarrollo de placa ateromatosa, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de von Hippel-Lindau, la hiperproliferación epidérmica, las enfermedades neurodegenerativas, la degeneración macular relacionada con la vejez y los hemangiomas. Se ha indicado el EGFR por ejemplo en la curación de heridas de la córnea y de la piel. Las deficiencias de insulina-R y de IGF-1R se indican en la diabetes mellitus de tipo II. Una correlación más completa entre las RTK específicas y sus indicaciones terapéuticas se describen en Plowman y col., *DN&P* **7**, 334-339, 1994.

Tal como se ha mencionado anteriormente, no solo las RTK sino también las CTK incluyen, pero no se limitan a: src, abl, fps, yes, fyn, lyn, lck, blk, hck, fgr e yrk (véase una revisión en Bolen y col., *FASEB J.* **6**, 3403-3409, 1992), intervienen también en los conductos de transducción de señales proliferantes y metabólicas y, por ello, cabe esperar, y de ha demostrado, que participen en muchos trastornos mediados por las PTK, a los que se dirige la presente invención. Por ejemplo, la src mutada (v-src) se ha constatado que es una oncoproteína (pp60^{v-src}) del pollo. Además, su homólogo celular, el proto-oncogén pp60^{c-src} transmite señales oncogénicas de muchos receptores. La sobreexpresión del EGFR o del HER2/neu en tumores conduce a la activación constitutiva del pp60^{c-src}, que es característica de las células malignas, pero está ausente de células normales. Por otro lado, los ratones con expresión deficiente del c-src presentan un fenotipo osteopetrótico, que indica una participación clave de la c-src en la función osteoclastica y una posible participación en trastornos afines.

De forma similar se ha implicado el Zap 70 en la señalización de las células T, que puede tener relación con trastornos autoinmunes.

Las STK se han asociado con la inflamación, la enfermedad autoinmune, las respuestas inmunes y los trastornos de hiperproliferación, tales como la restenosis, la fibrosis, la psoriasis, la osteoartritis y la artritis reumatoide.

Se han implicado también las PK en la implantación del embrión. Por ello, los compuestos de esta invención pueden proporcionar un método eficaz de prevenir tal implantación del embrión y, en consecuencia, ser útiles como agentes para control de la natalidad.

En otro aspecto más, los compuestos de la presente invención pueden utilizarse también como agentes antiinfecciosos. Por ejemplo, se sabe que los compuestos de indolinona despliegan actividad antibacteriana y antifúngica, véase p.ej. Singh y Jha, "Indolinone derivatives as potential antimicrobial agents", Zentralbl. Mikrobiol. 144(2), 105-109, 1989. Se ha publicado también que los compuestos de indolinona despliegan una significativa actividad antivírica, véase p.ej. Maass y col., "Viral resistance to the thiazolo-iso-indolinones, a new class of nonnucleoside inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase", Antimicrob. Agents Chemother. 37(12), 2612-2617, 1993.

Finalmente, en la actualidad se sospecha que tanto las RTK como las CTK participan en los trastornos hiperinmunes.

Otro aspecto de la invención es un método de identificación de un compuesto químico que modula la actividad catalítica de una o varias proteína-quinasa descritas anteriormente. El método consiste en poner en contacto las células que expresan una proteína-quinasa de interés con un compuesto de la invención (o una sal del mismo) y en hacer el seguimiento de cualquiera de los efectos que el compuesto tiene sobre las células. El efecto puede ser observable ya sea a simple vista, ya sea mediante el uso de instrumentación, a través del cambio o ausencia de cambio en el fenotipo celular. El cambio o la ausencia de cambio en el fenotipo celular objeto del seguimiento puede ser, por ejemplo, sin limitación, un cambio o ausencia de cambio en la actividad catalítica de la proteína-quinasa de las células o un cambio o ausencia de cambio en la interacción de la proteína-quinasa con un reactivo natural de fijación.

Composiciones farmacéuticas y administración

Un compuesto de la presente invención o una sal fisiológicamente aceptable del mismo puede administrarse tal cual un paciente humano o puede administrarse en composiciones farmacéuticas, en las que los materiales anteriores se mezclan con vehículos o excipientes idóneos. Las técnicas de formulación y administración de fármacos se encontrarán en la última edición de "Remington's Pharmacological Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA.

Vías de administración

Tal como se emplea en esta solicitud, "administrar" o "administración" indican la entrega de un compuesto o sal de la presente invención o de una composición farmacéutica que contiene un compuesto o una sal de esta invención a un organismo con el fin de prevenir o tratar un trastorno relacionado con una PK.

Las vías idóneas para la administración pueden incluir, sin limitación, la administración oral, rectal, transmucosal o intestinal o las inyecciones intramuscular, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular directa, intravitreal, intraperitoneal, intranasal o intraocular. Las vías preferidas de administración son la oral y la parenteral.

Como alternativa se puede administrar un compuesto en un modo más local que sistémico, por ejemplo mediante la inyección del compuesto directamente a un tumor sólido, a menudo en una formulación "depot" o de liberación persistente.

Además se puede administrar el fármaco en un sistema de entrega dirigida, por ejemplo en un liposoma recubierto con un anticuerpo específico del tumor. Los liposomas se dirigirán y se absorberán específicamente en el tumor.

Composición/formulación

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden fabricarse por procesos ya conocidos de la técnica, p.ej. mediante procesos convencionales de mezclado, disolución, granulado, fabricación de grageas, levigación, emulsionado, encapsulado, oclusión, liofilización o por secado por atomización.

Las composiciones farmacéuticas para el uso con arreglo a la presente invención pueden formularse de manera convencional empleando uno o varios vehículos fisiológicamente aceptables, que contienen excipientes y auxiliares que facilitan el procesado de los compuestos activos dentro de las preparaciones que pueden utilizarse farmacéuticamente. La formulación correcta dependerá de la vía de administración elegida.

Para la inyección, los compuestos de la invención pueden formularse en soluciones acuosas, con preferencia en tampones fisiológicamente compatibles, por ejemplo tampones con o sin una concentración baja de un tensioactivo o codisolvente, o un tampón de solución salina fisiológica. Para la administración transmucosal se emplean en la formu-

ES 2 269 416 T3

lación penetrantes apropiados para la barrera que debe atravesarse. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

5 Para la administración oral, los compuestos pueden formularse combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables, ya conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten la formulación de los compuestos de la invención en forma de tabletas, pastillas, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas, sus-
10 pensiones y similares, para que el paciente pueda ingerirlas oralmente. Las preparaciones farmacéuticas para el uso oral pueden fabricarse empleando un excipiente sólido, moliendo opcionalmente la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después añadiendo otros auxiliares idóneos, si se desea, para obtener los núcleos de las tabletas o
15 grageas. Los excipientes útiles son, en concreto, cargas de relleno tales como azúcares, incluidas la lactosa, la sucrosa, la manita o la sorbita, preparados de celulosa, por ejemplo almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz y almidón de patata y otros materiales, por ejemplo gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes desintegrantes, por ejemplo la polivinilpirrolidona reticulada, goma agar o ácido algínico. Puede utilizarse también una sal del mismo, por ejemplo el alginato sódico.

20 Los núcleos de grageas se dotan de recubrimientos idóneos. A tal fin se pueden utilizar soluciones concentradas de azúcar, que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, geles Carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de barniz y disolventes orgánicos idóneos o mezclas de disolventes. Pueden añadirse colorantes o pigmentos a los recubrimientos de tableta o de gragea con fines de identificación o de caracterización de las diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

25 Las composiciones farmacéuticas que pueden utilizarse oralmente incluyen las cápsulas aptas para empuje, fabricadas con gelatina, así como las cápsulas selladas blandas, fabricadas con gelatina y un plastificante, por ejemplo la glicerina o la sorbita. Las cápsulas aptas para empuje pueden contener ingredientes activos mezclados con una carga de relleno, por ejemplo a lactosa, un aglutinante, por ejemplo almidón y/o un lubricante, por ejemplo talco o estearato magnésico y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos idóneos, por ejemplo aceites grasos, parafina líquida, polietilenglicoles líquidos, Cremophor, Capmul, mono-, di- o triglicéridos de cadena media o larga. Pueden añadirse también estabilizantes a estas formula-
30 ciones.

35 Para la administración por inhalación, los compuestos a utilizar con arreglo a la presente invención se entregan de modo conveniente en forma de un nebulizador aerosol, empleando un envase presurizado o un nebulizador y un propelente idóneo, p.ej., pero sin limitación, diclorodifluormetano, triclorofluormetano, diclorotetrafluoretano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede controlarse empleando una válvula que entregue una cantidad calibrada. Las cápsulas o cartuchos de por ejemplo gelatina a utilizar en un inhalador o insuflador pueden formularse de modo que contengan una mezcla de polvo del compuesto y un polvo base idóneo, por ejemplo lactosa o almidón.

40 Los compuestos pueden formularse para la administración parenteral, p.ej. por inyección de bolo o por infusión continua. Las formulaciones inyectables pueden presentarse en una forma de dosificación unitaria, p.ej. en viales o en contenedores multidosis, a los que se añade un conservante. Las composiciones pueden adoptar la forma de suspensión, solución o emulsión en vehículos aceitosos o acuosos y pueden contener materiales de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

45 Las composiciones farmacéuticas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas de una forma soluble en agua, por ejemplo, sin limitación, una sal del compuesto activo. Además, las suspensiones de los compuestos activos pueden fabricarse en un vehículo lipófilo. Los vehículos lipófilos idóneos incluyen los aceites grasos, por ejemplo el aceite de sésamo, los ésteres sintéticos de ácidos grasos, por ejemplo el oleato de etilo y los triglicéridos, o materiales del tipo liposomas. Las suspensiones inyectables acuosas pueden contener sustancias que aumenten la viscosidad de la suspensión, por ejemplo la carboximetilcelulosa sódica, la sorbita o el dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener también estabilizantes idóneos y/o agentes que aumenten la solubilidad de los compuestos para permitir la fabricación de soluciones muy concentradas.

55 Como alternativa, el ingrediente activo puede adoptar la forma de polvo para, antes del uso, constituirse con la adición de un vehículo idóneo, p.ej. agua estéril, libre de pirógenos, con o sin tensioactivos o codisolventes adicionales, por ejemplo el Polysorbate 80, Cremophor, éter de sulfobutilo de la ciclodextrina, el propilenglicol o el polietilenglicol, tales como el PEG-300 o el PEG-400.

60 Los compuestos pueden formularse también en composiciones para administración rectal, tales como supositorios o enemas de retención, utilizando p.ej. bases convencionales de supositorio, tales como la manteca de cacao u otros glicéridos.

65 Además de las formulaciones ya descritas previamente, los compuestos pueden formularse también como preparaciones "depot". Estas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Un compuesto de esta invención puede formularse para esta vía de administración con materiales poliméricos o hidrófobos idóneos (por ejemplo, en una emulsión con un

ES 2 269 416 T3

aceite farmacológicamente aceptable), con resinas de intercambio iónico o en forma de derivado difícilmente soluble, por ejemplo, sin limitación, una sal difícilmente soluble.

5 Un ejemplo no limitante de vehículo farmacéutico para los compuestos hidrófobos de la invención es un sistema de codisolvente que contenga alcohol bencílico, un tensioactivo no polar, un polímero orgánico miscible en agua y una fase acuosa, por ejemplo un sistema de codisolvente VPD. La VPD es una solución que contiene un 3% p/v de alcohol bencílico, un 8% p/v de un tensioactivo no polar, el Polysorbate™ 80 y un 65% p/v de polietilenglicol 300, completando el volumen con alcohol absoluto. El sistema codisolvente de VPD (el VPD:D5W) consta de la VPD diluida 1:1 con una solución de dextrosa al 5% en agua. Este sistema codisolvente disuelve bien los compuestos hidró-
10 fobos y por sí mismo produce una toxicidad baja cuando se administra sistémicamente. Naturalmente pueden variarse de modo considerable las proporciones de tal sistema de codisolventes sin destruir sus características de solubilidad ni de toxicidad. Además, la identidad de los componentes codisolventes pueden variar también: por ejemplo, en lugar del Polysorbate™ 80 pueden utilizarse otros tensioactivos no polares de baja toxicidad, puede variarse el tamaño de la fracción de polietilenglicol, el polietilenglicol puede reemplazarse por otros polímeros biocompatibles, p.ej. la
15 polivinilpirrolidona, y en lugar de la dextrosa pueden utilizarse otros azúcares o polisacáridos.

Como alternativa pueden emplearse otros sistemas de entrega de los compuestos farmacéuticos hidrófobos. Los liposomas y las emulsiones son ejemplos bien conocidos de vehículos o soportes para la entrega de fármacos hidrófobos. Además pueden emplearse también ciertos disolventes orgánicos, por ejemplo el sulfóxido de dimetilo, aunque a
20 menudo con el inconveniente de que tienen una toxicidad mayor.

Los compuestos pueden entregarse adicionalmente empleando un sistema de liberación persistente, por ejemplo matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el agente terapéutico. Se han consolidado diversos materiales de liberación sostenida y los expertos en la materia los conocen perfectamente. Las cápsulas de liberación persistente pueden liberar los compuestos, en función de su naturaleza química, durante un período comprendido entre unas pocas semanas y 100 días. En función de la naturaleza química y la estabilidad biológica del reactivo terapéutico pueden emplearse estrategias adicionales para estabilizar la proteína.

Las composiciones farmacéuticas presentes pueden contener también vehículos o excipientes sólidos o en fase gel. Los ejemplos de tales vehículos y excipientes incluyen, pero no se limitan a: carbonato cálcico, fosfato cálcico, varios azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros, por ejemplo polietilenglicoles.

Muchos de los compuestos moduladores de las PK de la invención pueden proporcionarse en forma de sales fisiológicamente aceptables, en las que el compuesto reivindicado puede formar la especie cargada negativamente o
35 positivamente. Los ejemplos de sales, en las que el compuesto forma un resto cargado positivamente incluyen, sin limitación, las sales de amonio cuaternario (definidas en esta descripción), por ejemplo el clorhidrato, el sulfato, el citrato, el mesilato, el lactato, el tartrato, el maleato, el succinato, en las que el átomo de nitrógeno del grupo amonio cuaternario es un nitrógeno del compuesto seleccionado de esta invención que ha reaccionado con un ácido apropiado. Las sales en las que un compuesto de esta invención forma la especie cargada negativamente incluyen, sin limitación,
40 las sales sódica, potásica, cálcica o magnésica, formadas por reacción con un grupo ácido carboxílico del compuesto con una base apropiada (p.ej. hidróxido sódico (NaOH), hidróxido potásico (KOH), hidróxido cálcico (Ca(OH)₂), etc.).

Dosificación

45 Las composiciones farmacéuticas idóneas para el uso en la presente invención incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad suficiente para lograr la finalidad buscada, es decir, la modulación de la actividad de la PK o el tratamiento o prevención de un trastorno relacionado con una PK.

50 Más en concreto, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de un compuesto que es eficaz para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de un enfermedad o prolongar la supervivencia del sujeto tratado. Las cantidades terapéuticamente eficaces de los compuestos de la fórmula I pueden situarse entre aproximadamente 10/m² a 400/m², con preferencia entre 50/m² y 300/m², con mayor preferencia 100/m² y 220/m², con preferencia especial en 195/m².

55 Para cualquier compuesto empleado en los métodos de la invención, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos con cultivos celulares. Entonces puede formularse la dosificación para el uso en modelos animales de modo que se logre un intervalo de concentraciones circulantes que incluya la IC₅₀ determinada en cultivo celular (es decir, la concentración del compuesto ensayado que logra la inhibición semimáxima de la actividad de la PK). Tal información puede utilizarse seguidamente para determinar de modo más cuidadoso las dosis útiles para los humanos.

65 La toxicidad y la eficacia terapéutica de los compuestos descritos en esta solicitud pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o en animales experimentales, p.ej. para determinar la IC₅₀ y la LD₅₀ (ambas se describen en esta solicitud) de un compuesto de interés. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos en cultivos celulares y estudios con animales pueden utilizarse para formular un intervalo de dosificación destinado a humanos. La dosificación puede variar en función de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración elegida. El facultativo concreto podrá elegir la formulación, vía de administración y dosificación exactas en función

ES 2 269 416 T3

del estado de salud del paciente (véase p.ej. Fingl y col., “The Pharmacological Basis of Therapeutics”, 1975, cap. 1, p. 1).

La cantidad y el intervalo de dosificación pueden ajustarse de forma individual para proporcionar niveles de la especie activa en el plasma que sean suficientes para mantener los efectos de modulación de la quinasa. Estos niveles en plasma se denominan concentraciones eficaces mínimas (MEC). La MEC variará para cada compuesto, pero puede estimarse a partir de los datos “*in vitro*”, p.ej. la concentración necesaria para lograr una inhibición del 50-90% de una quinasa podrá evaluarse utilizando los ensayos descritos en esta solicitud. Las dosificaciones necesarias para lograr la MEC dependerán con preferencia de las características individuales y de la vía de administración. Los ensayos de cromatografía HPLC y los bioensayos pueden utilizarse para determinar las concentraciones en el plasma.

Los intervalos de dosificación pueden determinarse también empleando el valor de la MEC. Los compuestos deberían administrarse siguiendo un régimen que mantenga niveles en plasma superiores a la MEC durante un 10-90% del tiempo, con preferencia durante un 30-90% del tiempo y con preferencia especial en un 50-90% del tiempo. En los casos de administración local o de absorción selectiva, la concentración eficaz local del fármaco puede que no guarde relación con la concentración en plasma y entonces se tendrá que recurrir a otros procedimientos ya conocidos de la técnica para determinar la cantidad y el intervalo de dosificación correctos.

La cantidad a administrar de una composición dependerá obviamente del sujeto a tratar, de la gravedad de la dolencia, del modo de administración, del criterio del facultativo que atiende al paciente, etc.

Envase

Si se desea, las composiciones pueden presentarse en un envase o en dispositivo dispensador, por ejemplo un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o varias formas de dosificación unitarias del ingrediente activo. El envase puede constar por ejemplo de una lámina metálica o plástica, por ejemplo un envase de tipo blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de las instrucciones de administración. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado además de un prospecto asociado al contenedor en una forma prescrita por la agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos, dicho prospecto deberá reflejar la aprobación de la agencia de la forma de las composiciones o de la administración humana o veterinaria. Dicho prospecto puede ser por ejemplo del modelo aprobado por la U.S. Food and Drug Administration para la prescripción de fármacos o de un inserto de producto aprobado. Las composiciones que contienen un compuesto de la invención formulado en un vehículo farmacéuticamente compatible pueden fabricarse también, colocarse en un envase apropiado y etiquetarse para el tratamiento del estado indicado. Los estados idóneos indicados en la etiqueta pueden incluir el tratamiento de un tumor, la inhibición de la angiogénesis, el tratamiento de la fibrosis, la diabetes y similares.

Es también un aspecto de esta invención que un compuesto descrito aquí o su sal pueda combinarse con otros agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de las enfermedades y trastornos mencionados anteriormente. Por ejemplo, un compuesto o una sal de esta invención puede combinarse con agentes alquilantes, tales como el fluoruracilo (5-FU) solo o en combinación con leucovorina; u otros agentes alquilantes, por ejemplo, sin limitación, otros análogos de pirimidina, tales como el UFT, la capecitabina, la gemcitabina y la citarabina, los sulfonatos de alquilo, p.ej. el busulfan (utilizado para el tratamiento de la leucemia granulocítica crónica), el improsulfan y el piposulfan; las aziridinas, p.ej. el benzodepa, el carboquone, el meturedepa y el uredepa; las etileniminas y las metilmelaminas, p.ej. la altretamina, la trietilenomelamina, la trietilenofosforamida, la trietilenotiofosforamida y la trimetilolmelamina; y las mostazas nitrogenadas, p.ej. el clorambucilo (empleado para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica, la macroglobulinemia primaria y el linfoma no de Hodgkin), las ciclofosfamidias (empleadas para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin, el mieloma múltiple, el neuroblastoma, el cáncer de mama, el cáncer de ovarios, el cáncer de pulmón, el tumor de Wilm y el rhabdomyosarcoma), la estramustina, la ifosfamida, la novembriquina, la prednimustina y la mostaza uracilo (empleados para el tratamiento de la trombocitosis primaria, el linfoma no de Hodgkin, la enfermedad de Hodgkin y el cáncer de ovarios); y las triazinas, p.ej. la dacarbazina (empleada para el tratamiento del sarcoma de tejidos blandos).

De igual manera puede esperarse que un compuesto o sal de esta invención tenga efectos beneficiosos en combinación con otros agentes quimioterapéuticos antimetabolitos, por ejemplo, sin limitación, los análogos del ácido fólico, p.ej. el metotrexato (empleado para el tratamiento de leucemia linfocítica aguda, el coriocarcinoma, la micosis fungoide, el cáncer de mama, el cáncer de cabeza y cuello y el sarcoma osteogénico) y la pteroperina; y los análogos de purina, tales como la mercaptopurina y la tioguanina, que se utilizan para el tratamiento de las leucemias granulocítica aguda, linfocítica aguda y granulocítica crónica.

Cabe esperar también que un compuesto o sal de esta invención sea eficaz en combinación con agentes quimioterapéuticos basados en productos naturales, por ejemplo, sin limitación, los alcaloides de la vinca, p.ej. la vinblastina (empleada para el tratamiento del cáncer de mama y de testículos), la vincristina y la vindesina; las epipodofilotoxinas, p.ej. el etopósido y el tenipósido, ambos son útiles para tratar el cáncer de testículos y el sarcoma de Kaposi; los agentes quimioterapéuticos antibióticos, p.ej., la daunorrubicina, la doxorubicina, la epirubicina, la mitomicina (empleada para tratar el cáncer de estómago, de cervix, de colon, de mama, de vejiga y de páncreas), la dactinomicina, la temozolomida, la plicamicina, la bliomicina (empleada para tratar el cáncer de piel, de esófago y del tracto génito-urinario); y los agentes quimioterapéuticos enzimáticos, por ejemplo la L-asparagina.

Además de los anteriores cabe esperar que un compuesto o sal de esta invención tenga un efecto beneficioso cuando se emplea en combinación con complejos de coordinación de platino (cisplatino, etc.); ureas sustituidas, por ejemplo la hidroxiiurea; derivados de metilhidrazina, p.ej. la procarbazona; los supresores adrenocorticoideos, p.ej. el mitotano, la aminoglutetimida; y las hormonas y antagonistas hormonales, por ejemplo los adrenocorticosteroides (p.ej. la prednisona), las progestinas (p.ej. el caproato de hidroxiprogesterona); los estrógenos (p.ej. el dietilestilbestero); los antiestrógenos, por ejemplo el tamoxifeno; los andrógenos, p.ej. el propionato de testosterona; y los inhibidores de aromatasas (por ejemplo el anastrozol).

Finalmente cabe esperar que la combinación de un compuesto de esta invención sea particularmente eficaz en combinación con el Camptosar™, Gleevec™, Herceptina™, Endostatina™, los inhibidores de Cox-2, Mitoxantrona™ o el Paclitaxel™ para el tratamiento de cánceres de tumores sólidos o de leucemias, por ejemplo pero sin limitación, la leucemia mielógena (no linfocítica) aguda.

Ejemplos

Las siguientes preparaciones y ejemplos se facilitan para permitir a los expertos en la materia una mejor comprensión y puesta en práctica de la presente invención. No deben considerarse como una limitación del alcance de la invención, sino únicamente como ilustrativos y representativos de la misma.

En general, los datos HPLC se obtienen en una columna Zorbax SB C18 (diámetro interior: 4,6 mm, longitud: 7,5 cm), una bomba de la serie 200 de Perkin Elmer programada para trabajar desde acetonitrilo al 10% en agua con un 0,1% de TFA (disolvente A) hasta acetonitrilo al 90% en agua (disolvente B), con un caudal de 1,5 ml/min. Después de 0,1 min con el disolvente A se pone en marcha un programa lineal de 5 min hasta el disolvente B, a continuación 3 min con el disolvente B, antes de inicial el ciclo con el disolvente A (2 min). La detección se realiza en un detector de diodos ordenados Perkin Elmer a 215 y 280 nm). Los espectros RMN se registran en un instrumento Bruker a 300 MHz.

Ejemplos de síntesis

Ejemplo 1

Síntesis de la (3Z)-3-[(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il)-metilideno]-1-[1-(4-metilpiperazinilmetil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona

Se añade la N-metilpiperazina (10 g, 100 mmoles) a una solución agitada de formaldehído acuoso (10 g de una solución al 38%, 100 mmoles) y 3-(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-ilmetilideno)-1,3-dihidro-indol-2-ona (patente US-5 792 783) (2,38 g, 10 mmoles) en metanol (100 ml). Se calienta la solución a 60°C durante 1 h, se concentra a un volumen bajo y se separa el precipitado por filtración, se lava con metano y se seca, obteniéndose 2,38 g del compuesto epigrafiado, p.f. = 160-164°C. HPLC, Rt = 4,72 min. RMN-¹H (CDCl₃) δ = 2,26 (s, 3H), 2,33 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 2,43 (ancha s, 4H), 2,70 (ancha s, 4H), 4,59 (s, 2H), 5,96 (d, 1H), 7,02-7,08 (m, 2H), 7,15 (dd, 1H), 7,38 (s, 1H), 7,48 (dd, 1H) y 13,0 (ancha s, 1H). Análisis elemental, calculado del C₂₁H₂₆N₄O: C 71,97; H 7,48; N 15,99; hallado: C 71,75; H 7,46; N 15,87.

Después se convierte la (3Z)-3-[(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il)-metilideno]-1-[1-(4-metilpiperazinilmetil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona en la sal clorhidrato.

Ejemplo 2

Síntesis de la (3Z)-3-[(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il)-metilideno]-1-(1-pirrolidinilmetil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona

Se añade la pirrolidina (450 mg, 6,3 mmoles) a una solución agitada de formaldehído acuoso (500 mg de una solución al 38%, 6,0 mmoles) y 3-(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-ilmetilideno)-1,3-dihidro-indol-2-ona (900 mg, 3,8 mmoles) en metanol (50 ml). Pasados 15 min se enfría la solución a 0°C y se separa el precipitado por filtración, se lava con agua y se seca, obteniéndose 1,08 g del compuesto epigrafiado, de p.f. = 129-132°C. HPLC, Rt = 4,87 min. RMN-¹H [(CD₃)₂SO] δ = 1,65 (m, 4H), 2,32 (s, 3H), 2,34 (s, 3H), 2,62 (m, 4H), 4,72 (s, 2H), 6,07 (d, 1H), 7,00 (m, 1H), 7,15 (m, 2H), 7,61 (s, 1H), 7,76 (d, 2H) y 13,1 (ancha s, 1H). Análisis elemental, calculado del C₂₀H₂₃N₃O: C 74,74; H 7,21; N 13,07; hallado: C 74,61; H 7,25; N 13,03.

Aplicando el procedimiento recién descrito, pero sustituyendo la pirrolidina por la 2-hidroximetilpirrolidina, la 2-metilpirrolidina, la 2-metoximetilpirrolidina, la prolina, la 3,5-dimetilpiperazina y la bis(2-metoxietil)amina se obtienen:

la (3Z)-3-[(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il)-metilideno]-1-(2-hidroxipirrolidin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona;

la (3Z)-3-[(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il)-metilideno]-1-(2-metilpirrolidin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona;

la (3Z)-3-[(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il)-metilideno]-1-(2-metoximetilpirrolidin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona;

ES 2 269 416 T3

la (3Z)-3-[(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il)-metilideno]-1-(2-carboxipirrolidin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona;

la (3Z)-3-[(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il)-metilideno]-1-(3,5-dimetilpiperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona;

y

la (3Z)-3-[(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il)-metilideno]-1-[bis(2-metoxietilaminometil)]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, respectivamente.

Ejemplo 3

Síntesis del cloruro del 1-((3Z)-3-[(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il)-metilideno]-2-oxo-1,3-dihidro-1H-indol-1-il)metil)piridinio

Se añade formaldehído acuoso (15,0 g de una solución al 38%, 190 mmoles) a una solución agitada de la 3(Z)-3-[(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il)-metilideno]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona (23,8 g, 100 mmoles) y trietilamina (15,0 g, 150 mmoles) en dimetilformamida (200 ml). Después de 1 h se diluye la solución con agua y se filtra el precipitado, se lava con agua y se seca, obteniéndose 2,64 g de la 3(Z)-3-[(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il)-metilideno]-1-(hidroximetil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, de p.f. 196-200°C. HPLC, Rt = 5,71 min. RMN-H¹ (CDCl₃) δ = 2,34 (s, 6H), 3,14 (t, 1H), 5,44 (d, 2H), 5,98 (d, 1H), 7,08 (m, 2H), 7,18 (m, 1H), 7,36 (s, 1H), 7,48 (dd, 1H) y 13,0 (ancha s, 1H). Análisis elemental, calculado del C₁₆H₁₆N₂O₂: C 71,62; H 6,01; N 10,44; hallado: C 71,33; H 6,09; N 10,43.

Se añade a 0°C el oxiclورو de fósforo (3,1 g, 10 mmoles) a una solución agitada de la 3(Z)-3-[(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il)-metilideno]-1-(hidroximetil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona (2,68 g, 10 mmoles) en piridina (20 ml). Después de 130 min se diluye lentamente la solución con agua (20 ml), se separa el precipitado por filtración, se lava con agua y se seca, obteniéndose 3,3 g del compuesto epigrafiado, de p.f. > 280°C. HPLC, Rt = 4,78 min. RMN-H¹ [CD₃OD] δ = 2,35 (s, 3H), 2,37 (s, 3H), 6,07 (d, 1H), 6,71 (s, 2H), 7,12-7,32 (m, 3H), 7,62 (s, 1H), 7,68 (dd, 1H), 8,17 (m, 2H), 8,67 (m, 1H), 9,3 (d, 1H) y 13,1 (ancha s, 1H). Análisis elemental, calculado del C₂₁H₂₀ClN₃O: C 68,94; H 5,51; Cl 9,69; N 11,48; hallado: C 68,63; H 5,53; Cl 9,53; N 11,45.

Otros compuestos de la fórmula (II), por ejemplo la (2-dietilamino-etil)-amida del ácido 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico, pueden obtenerse del modo siguiente:

Se calientan a 100°C el hidrato de hidrazina (al 55%, 3000 ml) y la 5-fluorissatina (300 g). Se añade más 5-fluorissatina (500 g) en porciones (100 g) con agitación durante 120 minutos. Se calienta la mezcla a 110°C y se agita durante 4 horas. Se enfría la mezcla a temperatura ambiente y se recogen los sólidos por filtración con vacío, obteniéndose la hidrazida del ácido (2-amino-5-fluor-fenil)-acético en bruto (748 g). Se suspende la hidrazida en agua (700 ml) y se ajusta el pH de la mezcla a un valor de pH < 3 con ácido clorhídrico 12 N. Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 12 horas. Se recogen los sólidos por filtración con vacío y se lavan dos veces con agua. Se seca el producto con vacío, obteniéndose la 5-fluor-1,3-dihidro-indol-2-ona (600 g, rendimiento: 73%), en forma de polvo marrón. RMN-H¹ (sulfóxido de dimetilo-d₆) δ = 3,46 (s, 2H, CH₂), 6,75, 6,95, 7,05 (3 x m, 3H, aromático), 10,35 (s, 1H, NH). EM m/z = 152 [M+1].

Se agitan virosamente el 3,5-dimetil-1H-pirrol-2,4-dicarboxilato de 2-tert-butilo y de 4-etilo (2600 g) y etanol (7800 ml) al tiempo que se les añade lentamente ácido clorhídrico 10N (3650 ml). La temperatura se eleva de 25°C a 35°C y empieza el desprendimiento de gas. Se calienta la mezcla a 54°C y se agita con calentamiento durante una hora, momento en el que la temperatura es de 67°C. Se enfría la mezcla a 5°C y se le añaden lentamente y con agitación 32 l de agua-hielo. Se recoge el sólido por filtración con vacío y se lava tres veces con agua. Se seca el sólido con aire hasta peso constante, obteniéndose el 2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxilato de etilo (1418 g, rendimiento: 87%) en forma de sólido rosado. RMN-H¹ (sulfóxido de dimetilo-d₆) δ = 2,10, 2,35 (2xs, 2x3H, 2xCH₃), 4,13 (q, 2H, CH₂), 6,37 (s, 1H, CH), 10,85 (s, 1H, NH). EM m/z = 167 [M+1].

En un baño de hielo se enfría la dimetilformamida (322 g) y el diclorometano (3700 ml) a 4°C y se les añade con agitación el oxiclورو de fósforo (684 g). Se añade lentamente durante 15 minutos el 2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxilato de etilo sólido (670 g) en partes alícuotas. La temperatura máxima que se alcanza es de 18°C. Se calienta la mezcla a reflujo durante una hora, se enfría a 10°C en un baño de hielo y se le añade rápidamente con agitación vigorosa 1,6 l de agua-hielo. La temperatura sube a 15°C. Se añade con agitación vigorosa el ácido clorhídrico 10 N (1,6 l). La temperatura sube a 22°C. Se deja la mezcla en reposo durante 30 minutos y se deja que las fases se separen. La temperatura alcanza un máximo de 40°C. Se ajusta la fase acuosa a pH 12-13 con hidróxido potásico 10 N (3,8 l) a una velocidad tal que la temperatura alcance y se mantenga en 55°C durante la adición. Una vez finalizada la adición se enfría la mezcla 10°C y se agita durante 1 hora. Se recoge el sólido por filtración con vacío y se lava cuatro veces con agua, obteniéndose el 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxilato de etilo (778 g, rendimiento: 100%) en forma de sólido amarillo. RMN-H¹ (DMSO-d₆) δ = 1,25 (t, 3H, CH₃), 2,44, 2,48 (2xs, 2x3H, 2xCH₃), 4,16 (q, 2H, CH₂), 9,59 (s, 1H, CHO), 12,15 (ancha s, 1H, NH). EM m/z = 195 [M+1].

Se mantiene en ebullición a reflujo con agitación durante dos horas el 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxilato de etilo (806 g), el hidróxido potásico (548 g), agua (2400 ml) y metanol (300 ml) y después se enfría a 8°C. Se extrae la mezcla dos veces con diclorometano. Se ajusta el pH de la fase acuosa a 4 con 1000 ml de ácido clorhídrico 10 N, manteniendo la temperatura por debajo de 15°C. Se añade agua para facilitar la agitación. Se recoge el sólido por

ES 2 269 416 T3

filtración con vacío, se lava tres veces con agua y se seca a 50°C con vacío, obteniéndose el ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (645 g, rendimiento: 93,5%) en forma de sólido amarillo. RMN-H¹ (DMSO-d₆) δ = 2,40, 2,43 (2xs, 2x3H, 2xCH₃), 9,57 (s, 1H, CHO), 12,07 (ancha s, 2H, NH-COOH). EM m/z = 168 [M+1].

5 Se agita a temperatura ambiente el ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (1204 g) y 6020 ml de dimetilformamida al tiempo que se le añaden el clorhidrato de la 1-(3-dimetil-aminopropil-3-etilcarbodiimida (2071 g), el hidroxibenzotriazol (1460 g), la trietilamina (2016 ml) y la dietiletilendiamina (1215 ml). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 20 horas. Se diluye la mezcla con 3000 ml de agua, 2000 ml de salmuera y 3000 ml de una solución saturada de bicarbonato sódico y se ajusta el pH a un valor superior a 10 con hidróxido sódico 10 N. Se extrae la mezcla dos veces con 5000 ml cada vez de metanol al 10% en diclorometano, se reúnen los extractos, se secan con sulfato magnético anhidro y se concentra a sequedad en un evaporador rotatorio. Entonces se diluye la mezcla con 1950 ml de tolueno y se concentra de nuevo en un evaporador rotatorio. Se tritura el residuo con una mezcla 3:1 de hexano:éter de dietilo (4000 ml). Se recogen los sólidos por filtración con vacío a 34°C durante 21 horas, obteniéndose la (2-dietilamino-etil)-amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (819 g, rendimiento: 43%) en forma de sólido ligeramente marrón. RMN-H¹ (sulfóxido de dimetilo-d₆) δ = 0,96 (t, 6H, 2xCH₃), 2,31, 2,38 (2xs, 2xCH₃), 2,51 (m, 6H 3xCH₂), 3,28 (m, 2H, CH₂), 7,34 (m 1H, amida NH), 9,56 (s, 1H, CHO), 11,86 (s, 1H, pirrol NH). EM m/z = 266 [M+1].

Se calientan a 78°C durante 3 horas la (2-dietilamino-etil)-amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (809 g), la 5-fluor-1,3-dihidro-indol-2-ona (438 g), el etanol (8000 ml) y la pirrolidina (13 ml). Se enfría la mezcla a temperatura ambiente y se recogen los sólidos por filtración con vacío y se lavan con etanol. Se agitan los sólidos con etanol (5900 ml) a 72°C durante 30 minutos. Se enfría la mezcla a temperatura ambiente. Se recogen los sólidos por filtración con vacío, se lavan con etanol y se secan a 54°C con vacío durante 130 horas, obteniéndose la (2-dietilamino-etil)-amida del ácido 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (1013 g, rendimiento: 88%), en forma de sólido anaranjado. RMN-H¹ (sulfóxido de dimetilo-d₆) δ = 0,98 (t, 6H, 2xCH₃), 2,43, 2,44 (2xs, 6H, 2xCH₃), 2,50 (m, 6H 3xCH₂), 3,28 (q, 2H, CH₂), 6,84, 6,92, 7,42, 7,71, 7,50 (5xm, 5H, aromático, vinilo, CONH), 10,88 (s, 1H, CONH), 13,68 (s, 1H, pirrol NH). EM m/z = 397 [M+1].

Otro compuesto más de la fórmula (II), como es la (3-dietilamino-2-hidroxi-propil)-amida del ácido 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilideno-metil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico puede obtenerse del modo siguiente:

Se añade al 2-clorometiloxirano (95 g, 1,03 moles) a 30°C una mezcla de agua (3,08 g, 0,17 moles) y dietilamina (106,2 ml, 1,03 moles). Entonces se agita la mezcla reaccionante a 28-35°C durante 6 horas y se enfría a 20-25°C, obteniéndose el 1-cloro-3-dietilamino-propan-2-ol.

Se añade una solución de hidróxido sódico (47,9 g, 1,2 moles) en 78 ml de agua al 1-cloro-3-dietilamino-propan-2-ol. Se agita la mezcla resultante a 20-25°C durante 1 hora, se diluye con 178 ml de agua y se extrae dos veces con éter. Se reúnen las soluciones etéreas, se secan con hidróxido potásico sólido y se concentran, obteniéndose 135 g de producto en bruto que se purifica por destilación fraccionada, obteniéndose la glicidildietilamina pura (98 g, 76%) en forma de aceite.

A una solución de hidróxido amónico (25 ml, 159 mmoles) del 25% (p/p) enfriada con hielo se le añade por goteo durante 10 minutos la glicidildietilamina (3,2 g, 24,8 mmoles). Se agita la mezcla reaccionante a 0-5°C durante 1 hora y después a temperatura ambiente durante 14 horas. Se concentra por evaporación la mezcla reaccionante resultante y se destila (84-90°C a 500-600 mT), obteniéndose el 1-amino-3-dietilamino-propan-2-ol (3,3 g, 92%). EM m/z = 147 ([M+1]⁺).

A la solución del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (100 mg, 0,43 mmoles), EDC (122,7 mg, 0,64 mmoles) y HOBt (86,5 mg, 0,64 mmoles) en 1,0 ml de DMF se le añade el 1-amino-3-dietilamino-propan-2-ol (93,2 mg, 0,64 mmoles). Se agita la mezcla reaccionante resultante a temperatura ambiente durante una noche y se concentra. Se suspende el residuo en 10 ml de agua y se filtra. Se lava el sólido con una solución saturada de bicarbonato sódico y agua y se seca en una estufa de alto vacío durante una noche, obteniéndose el producto en bruto que se purifica por cromatografía de columna, eluyendo con metanol al 6% en diclorometano que contiene trietilamina (2 gotas/100 ml de metanol al 6% en diclorometano), obteniéndose la (3-dietilamino-2-hidroxi-propil)-amida del ácido 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (62 mg, 34 %), en forma de sólido amarillo. RMN-H¹ (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 13,70 (s, 1H, NH-1'), 10,90 (s, 1H, NH-1), 7,76 (dd, J = 2,38, 9,33 Hz, 1H, H-4), 7,72 (s, 1H, vinilo-H), 7,60 (m, ancha, 1H, CONHCH₂CH(OH)-CH₂N(C₂H₅)₂-4'), 6,93 (dt, J = 2,38, 8,99 Hz, 1H, H-5), 6,85 (dd, J = 4,44, 8,99 Hz, 1H, H-6), 3,83 (m, ancha, 1H, OH), 3,33 (m, 4H), 2,67 (m, ancha, 5H), 2,46 (s, 3H, CH₃), 2,44 (s, 3H, CH₃), 10,4 (m, ancha, 6H, CH₃x2). EM m/z (intensidad relativa, en%) = 427 ([M+1]⁺, 100).

Los anteriores compuestos de la fórmula (II) puede convertirse en un compuesto de la fórmula (I), en la que R¹ es hidrógeno, R^{3'} y R^{4'} son metilo o, juntos, forman un anillo de pirrolidina mediante el procedimiento descrito en los anteriores ejemplos 1 y 2, pero sustituyendo la 3-(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-ilmetilideno)-1,3-dihidro-indol-2-ona por la (3-dietilamino-2-hidroxi-propil)-amida del ácido 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico o por la (2-dietilamino-etil)-amida del ácido 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico.

ES 2 269 416 T3

Otro compuesto de la fórmula (II) que puede obtenerse del modo descrito por los solicitantes de la solicitud de patente US que lleva el número de serie 60/268 683, depositada con fecha 15 de febrero de 2001 y titulada "DERIVADOS DE 3-(4-AMIDOPIRROL-2-ILMETILIDENO)-2-INDOLINONA COMO INHIBIDORES DE PROTEÍNA-QUINASAS", depositada con fecha 15 de febrero de 2001 y la solicitud de patente US que lleva el número de serie 09/783 264, depositada con fecha 15 de febrero de 2001 y se titula: "2-INDOLINONAS SUSTITUIDAS POR PIRROL COMO INHIBIDORES DE PROTEÍNA-QUINASAS".

Evaluación biológica

Se apreciará que, en cualquier serie de compuestos, se observa una distribución de actividades biológicas. En las formas preferidas de ejecución actuales, esta invención se refiere a nuevas 3-pirrolidinil-2-indolinonas sustituidas en posición 1, capaces de generar "*in vivo*" las 3-pirrolidinil-2-indolinonas capaces de modular, regular y/o inhibir la actividad de las proteína-quinasa.

Los siguientes ensayos pueden emplearse para seleccionar aquellos compuestos que demuestran tener un grado óptimo de la actividad deseada.

Procedimientos de ensayo

Los siguientes ensayos "*in vitro*" pueden utilizarse para determinar el nivel de actividad y el efecto de los diferentes compuestos de la presente invención en una o en varias PK. Pueden diseñarse ensayos parecidos para las mismas líneas de cualquier PK aplicando técnicas ya conocidas de los expertos en la materia.

Diversos ensayos descritos en esta solicitud se llevan a cabo en un formato ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Sandwich Assay) (Voller y col., "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay", Manual of Clinical Immunology, 2ª ed., Rose y Friedman, Am. Soc. of Microbiology, Washington, D.C. 1980, pp. 359-371). El procedimiento general es el siguiente: se pone el compuesto en contacto con las células que expresan la quinasa a ensayar, ya sea de forma natural, ya sea de forma recombinante, durante un período de tiempo seleccionado, después del cual, si la quinasa ensayada es un receptor, se añade un ligando del que se sabe que activa al receptor. Se lisan las células y se transfiere el lisado a los hoyos de una placa ELISA recubiertos previamente con un anticuerpo específico que reconoce el sustrato de la reacción de fosforilación enzimática. Los componentes no sustratos del lisado celular se eliminan por lavado y se detecta la cantidad de fosforilación en el sustrato con un anticuerpo que reconoce específicamente la fosfotirosina y se compara con las células de control, que no se han puesto en contacto con el compuesto a ensayar.

A continuación se describen los protocolos actualmente preferidos para llevar a cabo los ensayos ELISA para PK específicas. Sin embargo, la adaptación de estos métodos para determinar la actividad de los compuestos frente a otras RTK, así como a las CTK y las STK está contemplada dentro del alcance de los conocimientos de los expertos en la materia. Otros ensayos descritos en esta solicitud permiten medir la cantidad de DNA obtenida como respuesta a la activación de una quinasa ensayada, que es un índice general de la respuesta proliferante. El procedimiento general de este ensayo es el siguiente: se pone un compuesto en contacto con las células que expresan la quinasa a ensayar, ya sea de modo natural, ya sea de modo recombinante, durante un período seleccionado de tiempo, después del cual, si la quinasa ensayada es un receptor, se añade un ligando del que se sabe que activa al receptor. Después de la incubación por lo menos durante una noche se añade un reactivo de marcado del DNA, por ejemplo la 5-bromodesoxiuridina (BrdU) o la timidina- H^3 . Se detecta la cantidad de DNA marcado ya sea con un anticuerpo anti-BrdU, ya sea midiendo la radiactividad y se compara con las células de control, que no se han puesto en contacto con el compuesto ensayado.

Bioensayo GST-FLK-1

En este ensayo se analiza la actividad de tirosina-quinasa de la GST-Flk-1 en péptidos poli(glu-tyr).

Materiales y reactivos

1. Placas Corning de 96 hoyos para ELISA (Corning, nº de catálogo: 25805-96).

2. Liofilizado de poli(glu-tyr) 4:1 (Sigma, nº de catálogo: P0275), 1 mg/ml en PBS estéril.

3. Tampón PBS: para 1 l, se mezclan 0,2 g de KH_2PO_4 , 1,15 g de Na_2HPO_4 , 0,2 g de KCl y 8 g de NaCl en aprox. 900 ml de agua dH_2O . Una vez se han disuelto todos los reactivos se ajusta el pH a 7,2 con HCl. Se ajusta el volumen total a 1 l añadiendo dH_2O .

4. Tampón PBST: a 1 l de tampón PBS se le añade 1,0 ml de Tween-20.

5. Tampón de bloqueo TBB: para 1 l, se mezclan 1,21 g de TRIS, 8,77 g de NaCl, 1 ml de TWEEN-20 con aproximadamente 900 ml de dH_2O . Se ajusta el pH a 7,2 con HCl. Se añaden 10 g de BSA, se agita para que se disuelvan. Se completa el volumen total hasta 1 l con dH_2O . Se filtra para separar el material en forma de partículas.

6. BSA al 1% en PBS: se añaden 10 g de BSA a aprox. 990 ml de tampón PBS, se agita para disolverlos. Se ajusta el volumen total a 1 l con tampón PBS, se filtra para separar el material en forma de partículas.

ES 2 269 416 T3

7. Hepes 50 mM, pH 7,5.
8. GST-Flk-1 cd purificado a partir de transformación de baculovirus recombinantes sf9 (SUGEN, Inc.).
- 5 9. DMSO al 4% en dH₂O.
10. ATP 10 mM en dH₂O.
11. MnCl₂ 40 mM.
- 10 12. Tampón de dilución de quinasa (KDB): se mezclan 10 ml de Hepes (pH 7,5), 1 ml de NaCl 5M, 40 μ l de una solución 100 mM de ortovanadato sódico y 0,4 ml de BSA al 5% en dH₂O con 88,56 ml de dH₂O.
13. Placas de polipropileno NUNC de 96 hoyos de fondo en V, Applied Scientific, n° de catálogo: AS-72092.
- 15 14. EDTA: se mezclan 14,12 g de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) con aprox. 70 ml de dH₂O. Se añade NaOH 10 N hasta que se disuelva el EDTA. Se ajusta el pH a 8,0. Se ajusta el volumen total a 100 ml con dH₂O.
- 20 15. Tampón de dilución de anticuerpos 1° y 2°: se mezclan 10 ml de BSA al 5% en tampón PBS con 89,5 ml de TBST.
16. Antisuero policlonal de conejo anti-fosfotirosina (SUGEN, Inc.).
17. Conjugado de cabra anti-conejo con HRP.
- 25 18. Solución de ABTS: a aprox. 900 ml de dH₂O se le añaden 19,21 g de ácido cítrico y 35,49 g de Na₂HPO₄. Se ajusta el pH a 4,0 con ácido fosfórico. Se añade el ácido 2,2'-azinobis(3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS, Sigma, n° de catálogo: A-1888), se deja en reposo durante aprox. 1/2 hora y se filtra.
- 30 19. Peróxido de hidrógeno del 30%.
20. ABTS/H₂O₂: se añaden 3 μ l de H₂O₂ a 15 ml de la solución de ABTS.
21. HCl 0,2 M.

35 Procedimiento

1. Se recubren las capas Corning de 96 hoyos para ELISA con 2 μ g de poliEY en 100 μ l de PBS por hoyo, se mantiene a temperatura ambiente durante 2 horas y a 4°C durante una noche. Se tapan las placas para evitar la evaporación.
- 40 2. Se quita el líquido no fijado de los hoyos invirtiendo la placa. Se lava una vez con TBST. Se golpea la placa suavemente sobre una toalla de papel para eliminar el exceso de líquido.
- 45 3. Se añaden 100 μ l de BSA al 1% en PBS a cada hoyo. Se incuba, con agitación, a temperatura ambiente durante 1 h.
4. Se repite el paso 2.
- 50 5. Se impregnan los hoyos con HEPES 50 mM (pH 7,5, 150 μ l/hoyo).
6. Se diluye el compuesto a ensayar con dH₂O/DMSO del 4% hasta 4 veces para llegar a la concentración final deseada para el ensayo en las placas de polipropileno de 96 hoyos.
- 55 7. Se añaden 25 μ l de compuesto de ensayo diluido a cada uno de los hoyos de la placa ELISA. En los hoyos de control se introducen 25 μ l de dH₂O/DMSO del 4%.
8. Se diluyen 0,005 μ g (5 ng) del GST-Flk-1/hoyo en KDB.
- 60 9. Se añaden a cada hoyo 50 μ l de enzima diluida.
10. Se añaden a los hoyos de control negativo 25 μ l de EDTA 0,5 M.
11. Se añaden 25 μ l de MnCl₂ 40 mM y 4 veces ATP (2 μ M) a todos los hoyos (volumen final: 100 μ l, concentración final de ATP: 0,5 μ M en cada hoyo).
- 65 12. Se incuba, con agitación, a temperatura ambiente durante 15 minutos.

ES 2 269 416 T3

13. Se interrumpe la reacción añadiendo 25 μ l de EDTA 500 mM a cada hoyo.

14. Se lava 3 veces con TBST y se golpea la placa suavemente sobre una toalla de papel para eliminar el exceso de líquido.

15. Se añaden 100 μ l de antisuero anti-fosfotirosina por hoyo, dilución 1:10.000 en tampón de dilución de anticuerpos. Se incuba, con agitación, a temperatura ambiente durante 90 min.

16. Se lava como en el paso 14.

17. Se añaden 100 μ l/hoyo de conjugado de cabra anti-conejo con HRP (1:6.000 en tampón de dilución de anticuerpos). Se incuba, con agitación a temperatura ambiente durante 90 min.

18. Se lava con en el paso 14.

19. Se añaden a temperatura ambiente 100 μ l de la solución de ABTS/H₂O₂ a cada hoyo.

20. Se incuba, con agitación, a temperatura ambiente durante 15-30 minutos.

21. Si fuera necesario, se interrumpe la reacción añadiendo 100 μ l de HCl 0,2 M a cada hoyo.

22. Se leen los resultados en el lector de ELISA Dynatech MR 7000, con filtro de ensayo a 410 nm y con filtro de referencia a 630 nm.

25 *Bioensayo de la PYK2*

Se realiza este ensayo para medir la actividad de quinasa “*in vitro*” de la pyk2 de longitud completa marcada con el epítoto HA (FL.pyk2-HA) en un ensayo ELISA.

30 *Materiales y reactivos*

1. Placas Corning de 96 hoyos para ELISA

2. Anticuerpo monoclonal 12CA5 anti-HA (SUGEN, Inc.)

3. PBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline; Gibco, nº de catálogo: 450-1300EB)

4. Tampón TBST: para 1 l, se mezclan 8,766 g de NaCl, 6,057 g de TRIS y 1 ml de Triton X-100 al 0,1% en aprox. 900 ml de dH₂O. Se ajusta el pH a 7,2 y se ajusta el volumen a 1 litro.

5. Tampón de bloqueo: para 1 l, se mezclan 100 g de BSA del 10%, 12,1 g de TRIS 100 mM, 58,44 g de NaCl 1M y 10 ml de TWEEN-20 del 1%.

6. FL-pyk2-HA de lisados de células sf9 (SUGEN, Inc.).

7. DMSO al 4% en H₂O purificada por MilliQue.

8. ATP 10 mM en dH₂O.

9. MnCl₂ 1M.

10. MgCl₂ 1M.

11. Ditiotreititol 1M (DTT).

12. Tampón de fosforilación de quinasa 10X: se mezclan 5,0 ml de Hepes 1M (pH 7,5), 0,2 ml de MnCl₂ 1M, 1,0 ml de MgCl₂ 1 M, 1,0 ml de Triton X-100 al 10% en 2,8 ml de dH₂O. Inmediatamente antes del uso se añade 0,1 ml de DTT 1M.

13. Placas de polipropileno NUNC de 96 hoyos de fondo en V.

14. EDTA 500 mM en dH₂O.

15. Tampón de dilución de anticuerpo: para 100 ml, 1 ml de BSA al 5% en PBS y 1 ml de Tween-20 al 10% en 88 ml de TBS.

16. Anti-Ptyr conjugado con HRP (PY99, Santa Cruz Biotech., nº de catálogo: SC-7020).

ES 2 269 416 T3

17. ABTS, Moss, nº de catálogo: ABTS-2000.

18. SDS del 10%.

5 *Procedimiento*

1. Se recubren las placas Corning de 96 hoyos para ELISA con 0,5 μg por hoyo de anticuerpo 12CA5 anti-HA en 100 μl de PBS. Se almacena a 4°C durante una noche.

10 2. Se quita el anticuerpo anti-HA no fijado de los hoyos por inversión de la placa. Se lava la placa con dH_2O . Se golpea suavemente la placa sobre una toalla de papel para eliminar el exceso de líquido.

15 3. Se añaden 150 μl de tampón de bloqueo a cada hoyo. Se incuba, con agitación, a temperatura ambiente durante 30 min.

4. Se lava la placa 4x con TBS-T.

5. Se diluyen los lisados en PBS (1,5 μg de lisado/100 μl de PBS).

20 6. Se añaden 100 μl de lisado diluido a cada hoyo. Se agita a temperatura ambiente durante 1 h.

7. Se lava como en el paso 4.

8. Se añaden 50 μl de tampón de quinasa 2X a la placa ELISA que contiene el pyk2-HA capturado.

25 9. Se añaden 25 μl del compuesto de ensayo 400 μM en DMSO del 4% a cada hoyo. En los hoyos de control se introduce únicamente el DMSO del 4%.

10. Se añaden 25 μl de EDTA 0,5 M a los hoyos de control negativo.

30 11. Se añaden 25 μl de ATP 20 μM a todos los hoyos. Se incuba, con agitación, durante 10 minutos.

12. Se interrumpe la reacción añadiendo 25 μl de EDTA 500 mM (pH 8,0) a todos los hoyos.

35 13. Se lava como en el paso 4.

14. Se añaden a cada hoyo 100 μl de anti-Ptyr conjugado con HRP diluido 1:6000 en tampón de dilución de anticuerpos. Se incuba, con agitación, a temperatura ambiente durante 1 h.

40 15. Se lava la placa 3X con TSBT y 1X con PBS.

16. Se añaden 100 μl de solución de ABTS a cada hoyo.

45 17. Si fuera necesario, se interrumpe la reacción de revelado añadiendo 20 μl de SDS del 10% a cada hoyo.

18. Se lee la placa con un lector de ELISA, con filtro de ensayo a 410 nm y filtro de referencia a 630 nm.

Bioensayo del GFFR1

50 En este ensayo se mide la actividad de quinasa “*in vitro*” del GFF1-R en un ensayo ELISA.

Materiales y reactivos

55 1. Placas Costar de 96 hoyos para ELISA (Corning, nº de catálogo: 3369).

2. Poly(Glu-Tyr) (Sigma, nº de catálogo: PO275).

3. PBS (Gibco, nº de catálogo: 450-1300EB).

60 4. Solución tampón Hepes 50 mM.

5. Tampón de bloqueo (BSA al 5% en PBS).

6. GST-FGFR1 purificado (SUGEN, Inc.).

65 7. Tampón de dilución de quinasa:

ES 2 269 416 T3

Se mezclan 500 μ l de Hepes 1M (GIBCO), 20 μ l de BSA al 5% en PBS, 10 μ l de ortovanadato sódico 100 mM y 50 μ l de NaCl 5M.

8. ATP 10 mM.

9. Mezcla de fosforilación ATP/MnCl₂: se mezclan 20 μ l de ATP, 400 μ l de MnCl₂ 1M y 9,56 ml de dH₂O.

10. Placas de polipropileno NUN de 96 hoyos de fondo en V (Applied Scientific, n° de catálogo: AS-72092).

11. EDTA 0,5M.

12. TBST del 0,05%.

Se añaden 500 μ l de TWEEN a 1 litro de TBS.

13. Suero policlonal de conejo anti-fosfotirosina (SUGEN, Inc.).

14. Conjugado de IgG de cabra anti-conejo y peroxidasa (Biosource, n° de catálogo: ALI0404).

15. Solución de ABTS.

16. Solución de ABTS/H₂O₂

Procedimiento

1. Se recubren las placas Costar de 96 hoyos para ELISA con 1 μ g por hoyo de Poly(Glu-Tyr) en 100 μ l de PBS.

2. Se lavan las placas una vez con PBS.

3. Se añaden 150 μ l de BSA al 5% en tampón de bloqueo PBS a cada hoyo. Se incuba, con agitación, a temperatura ambiente durante 1 h.

4. Se lava la placa 2 x con PBS, después una vez con Hepes 50 mM. Se golpean las placas suavemente sobre una toalla de papel para quitar el exceso de líquido y las burbujas.

5. Se añaden 25 μ l del compuesto a ensayar 0,4 mM en DMSO del 4% a hoyos de ensayo o bien de solo de DMSO del 4% (a los hoyos de control).

6. Se diluye el GST-FGFR1 purificado con tampón de dilución de quinasa (5 ng de quinasa/50 μ l de KDB/hoyo).

7. Se añaden 50 μ l de quinasa diluida a cada hoyo.

8. Se inicia la reacción de la quinasa añadiendo 25 μ l/hoyo de ATP/Mn⁺⁺ recién preparado (0,4 ml de MnCl₂ 1M, 40 μ l de ATP 10 mM, 9,56 ml de dH₂O).

9. Se interrumpe la reacción con 25 μ l de EDTA 0,5 M.

10. Se lava la placa 4x con TBST fresco.

11. Se prepara el tampón de dilución de anticuerpos: para 50 ml, se mezclan 5 ml de BSA del 5%, 250 μ l de leche al 5% y 50 μ l de una solución 100 mM de vanadato sódico, se ajusta el volumen final con TBST del 0,05%.

12. Se añaden 100 μ l a cada hoyo del anti-fosfotirosina (dilución 1:10000 en ADB). Se incuba, con agitación, a temperatura ambiente durante 1 h.

13. Se lava como en el paso 10.

14. Se añaden 100 μ l a cada hoyo de IgG de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de Biosource (dilución 1:6000 en ADB). Se incuba, con agitación, a temperatura ambiente durante 1 h.

15. Se lava como en el paso 10 y después con PBS para eliminar las burbujas y el exceso de TWEEN.

16. Se añaden 100 μ l de solución de ABTS/H₂O₂ a cada hoyo.

17. Se incuba, con agitación, durante 10-20 minutos. Se eliminan las burbujas.

18. Se lee el resultado del ensayo en un lector Dynatech MR 7000 para ELISA: filtro de ensayo a 410 nm, filtro de referencia a 630 nm.

ES 2 269 416 T3

Bioensayo del EGFR

En este ensayo se mide la actividad de quinasa “*in vitro*” del EGFR en un ensayo ELISA.

5 *Materiales y reactivos*

1. Placas Corning de 96 hoyos para ELISA.
2. Anticuerpo monoclonal SUMO1 anti-EGFR (SUGEN, Inc.).
- 10 3. PBS.
4. Tampón TBST.
- 15 5. Tampón de bloqueo: para 100 ml, se mezclan 5,0 g de leche descremada instantánea Carnation® con 100 ml de PBS.
6. Lisado de células A431 (SUGEN, Inc.).
- 20 7. Tampón TBS.
8. TBS + DMSO del 10%: para 1 l, se mezclan 1,514 g de TRIS, 2,192 g de NaCl y 25 ml de DMSO; se ajusta el volumen total a 1 litro añadiendo dH₂O.
- 25 9. ATP (trifosfato de adenosina-5', de músculo equino, Sigma, n° de catálogo: A-5394), solución 1,0 mM en dH₂O. Este reactivo debería prepararse inmediatamente antes del uso y guardarse sobre hielo.
10. MnCl₂ 1,0 mM.
- 30 11. Mezcla de fosforilación ATP/MnCl₂: para 10 ml, se mezclan 300 µl de ATP 1 mM, 500 µl de MnCl₂ y 9,2 ml de dH₂O. Se prepara inmediatamente antes del uso, se guarda sobre hielo.
12. Placas de polipropileno NUNC de 96 hoyos de fondo en forma de V.
- 35 13. EDTA.
14. Suero policlonal de conejo anti-fosfotirosina (SUGEN, Inc.).
15. IgG de cabra anti-conejo conjugada con peroxidasa (Biosource, n° de catálogo: ALI0404).
- 40 16. ABTS.
17. Peróxido de hidrógeno del 30%.
- 45 18. ABTS/H₂O₂
19. HCl 0,2M.

Procedimiento

- 50 1. Se recubren placas Corning de 96 hoyos para ELISA con 0,5 µg de SUMO1 en 100 µl de PBS por hoyo, se mantiene a 4°C en reposo durante una noche.
2. Se quita el SUMO1 no fijado de los hoyos invirtiendo la placa para que salga el líquido. Se lava 1x con dH₂O. Se golpea suavemente la placa sobre una toalla de papel para quitar el líquido en exceso.
- 55 3. Se añaden 150 µl de tampón de bloqueo a cada hoyo. Se incuba, con agitación, a temperatura ambiente durante 30 min.
- 60 4. Se lava la placa 3x con agua desionizada, después una vez con TBST. Se golpea suavemente la placa sobre una toalla de papel para quitar el exceso de líquido y las burbujas.
5. Se diluye el lisado en PBS (7 µg de lisado/100 µl de PBS).
- 65 6. Se añaden 100 µl de lisado diluido a cada hoyo. Se agita a temperatura ambiente durante 1 h.
7. Se lavan las placas como en el anterior paso 4.

ES 2 269 416 T3

8. Se añaden 120 μl de TBS a la placa ELISA que contiene el EGFR capturado.
9. Se diluye el compuesto a ensayar 1:10 en TBS, para introducirlo en los hoyos.
- 5 10. Se añaden 13,5 μl de compuesto de ensayo diluido a la placa ELISA. A los hoyos de control se añaden 13,5 μl de TBS en DMSO del 10%.
11. Se incuba, con agitación, a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- 10 12. Se añaden 15 μl de mezcla de fosforilación a todos los hoyos, excepto los hoyos de control negativo. El volumen final de los hoyos debería ser aproximadamente de 150 μl y la concentración final de ATP debería ser de 3 μM y la del MnCl_2 de 5 mM en cada hoyo. Se incuba con agitación durante 5 minutos.
13. Se interrumpe la reacción añadiendo 16,5 μl de solución de EDTA con agitación. Se agita durante 1 min más.
- 15 14. Se lava 4x con agua desionizada, 2x con TBST.
15. Se añaden 100 μl de anti-fosfotirosina (dilución 1:3000 en TBST) por hoyo. Se incuba, con agitación, a temperatura ambiente durante 30-45 min.
- 20 16. Se lava como en el anterior paso 4.
17. Se añaden 100 μl de conjugado de IgG de cabra anti-conejo con peroxidasa de Biosource (diluido 1:2000 en TBST) a cada hoyo. Se incuba con agitación a temperatura ambiente durante 30 min.
- 25 18. Se lava como en el anterior paso 4.
19. Se añaden 100 μl de la solución de ABTS/ H_2O_2 a cada hoyo.
- 30 20. Se incuba con agitación durante 5-10 minutos. Se eliminan las burbujas.
21. Si fuera necesario, se interrumpe la reacción añadiendo 100 μl de HCl 0,2 M a cada hoyo.
22. Se leen los resultados del ensayo en un lector Dynatech MR7000 de ELISA; filtro de ensayo a 410 nm, filtro de referencia a 630 nm.
- 35

Bioensayo del PDGFR

Se utiliza este ensayo para medir la actividad de quinasa “*in vitro*” del PDGFR en un ensayo ELISA.

Materiales y reactivos

1. Placas Corning de 96 hoyos para ELISA.
- 45 2. Anticuerpo monoclonal 28D4C10 anti-PDGFR (SUGEN, Inc.).
3. PBS.
4. Tampón TBST.
- 50 5. Tampón de bloqueo (el mismo que en el bioensayo del EGFR).
6. Lisado de células NIH3T3 que expresan el PDGFR- β (SUGEN, Inc.).
- 55 7. Tampón TBS.
8. TBS + DMSO del 10%.
9. ATP.
- 60 10. MnCl_2
11. Mezcla de fosforilación en tampón de quinasa: para 10 ml, se mezclan 250 μl de TRIS 1M, 200 μl de NaCl 5M, 100 μl de MnCl_2 1M y 50 μl de Triton X-100 100 mM en dH_2O suficiente para completar 10 ml.
- 65 12. Placas de polipropileno NUNC de 96 hoyos de fondo en V.
13. EDTA.

ES 2 269 416 T3

14. Suero policlonal de conejo anti-fosfotirosina (SUGEN, Inc.).
15. Conjugado de IgG de cabra anti-conejo con peroxidasa (Biosource, n° de catálogo: ALI0404).
- 5 16. ABTS.
17. Peróxido de hidrógeno, solución al 30%.
18. ABTS/H₂O₂
- 10 19. HCl 0,2 M.

Procedimiento

- 15 1. Se recubren las placas Corning de 96 hoyos para ELISA con 0,5 μg de 28D4C10 en 100 μl de PBS por hoyo, se mantiene a 4°C durante una noche.
- 20 2. Se quita de los hoyos el 28D4C10 no fijado invirtiendo la placa para sacar el líquido. Se lava 1x con dH₂O. Se golpea suavemente la placa sobre una toalla de papel para quitar el exceso de líquido.
- 30 3. Se añaden 150 μl de tampón de bloqueo a cada hoyo. Se incuba con agitación a temperatura ambiente durante 30 min.
- 35 4. Se lava la placa 3x con agua desionizada, después una vez con TBST. Se golpea suavemente la placa sobre una toalla de papel para eliminar el exceso de líquido y las burbujas.
- 40 5. Se diluye el lisado en HNTG (10 μg de lisado/100 μl de HNTG).
- 45 6. Se añaden 100 μl de lisado diluido a cada hoyo. Se agita a temperatura ambiente durante 60 min.
- 50 7. Se lavan las placas del modo descrito en el paso 4.
- 55 8. Se añaden 80 μl de mezcla de tampón de quinasa de trabajo a la placa ELISA que contiene el PDGFR capturado.
- 60 9. Se diluye el compuesto a ensayar 1:10 en TBS en placas de polipropileno de 96 hoyos.
- 65 10. Se añaden 10 μl de compuesto de ensayo diluido a la placa ELISA. A los hoyos de control se añaden 10 μl de TBS + DMSO del 10%. Se incuba con agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- 70 11. Se añaden 10 μl de ATP directamente a todos los hoyos, excepto el hoyo de control negativo (el volumen final de los hoyos debería ser aproximadamente de 100 μl con ATP 20 μM en cada hoyo). Se incuba con agitación durante 30 minutos.
- 75 12. Se interrumpe la reacción añadiendo 10 μl de solución de EDTA a cada hoyo.
- 80 13. Se lava 4x con agua desionizada, dos veces con TBST.
- 85 14. Se añaden 100 μl de anti-fosfotirosina (solución 1:3000 en TBST) a cada hoyo. Se incuba con agitación a temperatura ambiente durante 30-45 min.
- 90 15. Se lava como en el paso 4.
- 95 16. Se añaden 100 μl de conjugado de peroxidasa e IgG de cabra anti-conejo de Biosource (dilución 1:2000 en TBST) a cada hoyo. Se incuba con agitación a temperatura ambiente durante 30 min.
- 100 17. Se lava como en el paso 4.
- 105 18. Se añaden 100 μl de solución de ABTS/H₂O₂ a cada hoyo.
- 110 19. Se incuba con agitación durante 10-30 minutos. Se eliminan las burbujas.
- 115 20. Si fuera necesario se interrumpe la reacción añadiendo 100 μl de HCl 0,2 M a cada hoyo.
- 120 21. Se leen los resultados del ensayo en un lector Dynatech MR 7000 para ELISA, con un filtro de ensayo de 410 nm y un filtro de referencia de 630 nm.

ES 2 269 416 T3

Ensayo de quinasa HER-2 celular

Se utiliza este ensayo para medir la actividad de la quinasa HER-2 en células enteras en un formato ELISA.

5 *Materiales y reactivos*

1. DMEM (GIBCO, n° de catálogo: 11965-092).

10 2. Suero fetal bovino (FBS, GIBCO, n° de catálogo: 16000-044), inactivado por calor en un baño de agua a 56°C durante 30 min.

3. Tripsina (GIBCO, n° de catálogo: 25200-056).

15 4. L-glutamina (GIBCO, n° de catálogo: 25030-081).

5. HEPES (GIBCO, n° de catálogo: 15630-080).

20 6. Medio de cultivo: se mezclan 500 ml de DMEM, 55 ml de FBS inactivado con calor, 10 ml de HEPES y 5,5 ml de L-glutamina.

7. Medio de desnutrición: se mezclan 500 ml de DMEM, 2,5 ml de FBS inactivado con calor, 10 ml de HEPES y 5,5 ml de L-glutamina.

8. PBS.

25 9. Placas de microvaloración de cultivo en tejido de 96 hoyos de fondo plano (Corning, n° de catálogo: 25860).

10. Platos de cultivo de tejido de 15 cm (Corning, n° de catálogo: 08757148).

30 11. Placas Corning de 96 hoyos para ELISA.

12. Placas de polipropileno NUNC de 96 hoyos en forma de V.

35 13. Cartuchos de transferencia Costar para el Transtar 96 (Costar, n° de catálogo: 7610).

14. SUMO 1: anticuerpo monoclonal anti-EGFR (SUGEN, Inc.).

15. Tampón TBST.

40 16. Tampón de bloqueo: leche instantánea Carnation® al 5% en PBS.

17. Ligando EGF: EGF-201, Shinko American, Japón. Se suspende el polvo en 100 µl de HCl 10 mM. Se añaden 100 µl de NaOH 10 mM. Se añaden 800 µl de PBS y se transfiere a un tubo Eppendorf, se almacena a -20°C hasta el momento del uso.

45 18. Tampón de lisis HNTG: para un patrón 5X de HNTG se mezclan 23,85 g de Hepes, 43,83 g de NaCl, 500 ml de glicerina y 100 ml de Triton X-100 y dH₂O suficiente para completar 1 l de solución final.

50 Para un patrón 1X de HNTG* se mezclan 2 ml de patrón 5X de HNTG, 100 µl de Na₃VO₄ 0,1M, 250 µl de Na₄P₂O₇ 0,2 M y 100 µl de EDTA.

19. EDTA.

55 20. Na₃VO₄: para preparar la solución patrón se mezclan 1,84 g de Na₃VO₄ con 90 ml de dH₂O. Se ajusta el pH a 10. Se hierva en microondas durante un minuto (la solución se vuelve transparente). Se enfría a temperatura ambiente. Se ajusta el pH a 10. Se repite el ciclo de calentamiento/enfriamiento hasta que el pH se mantenga en 10.

21. Na₄P₂O₇ 200 mM.

60 22. Antisuero policlonal de conejo específico de la fosfotirosina (anticuerpo anti-Ptyr; SUGEN, Inc.).

23. Antisuero purificado por afinidad, IgG de cabra anti-conejo, conjugado con peroxidasa (Biosource, n° de catálogo: ALI0404).

65 24. Solución de ABTS.

25. Solución de peróxido de hidrógeno al 30%.

ES 2 269 416 T3

26. ABTS/H₂O₂

27. HCl 0,2 M.

5 Procedimiento

1. Se recubren placas Corning de 96 hoyos para ELISA con SUMO1 a razón de 1,0 µg por hoyo en PBS, volumen final: 100 µl/hoyo. Se almacena a 4°C durante una noche.

10 2. En el día del uso se quita el tampón de recubrimiento y se lava la placa 3 veces con dH₂O y una vez con tampón TBST. Todos los lavados de este ensayo deberían realizarse de esta manera, a menos que se indique otra cosa.

15 3. Se añaden 100 µl de tampón de bloqueo a cada hoyo. Se incuba la placa, con agitación, a temperatura ambiente durante 30 min. Inmediatamente antes del uso se lava la placa.

4. Se usa para este ensayo la línea celular EGFr/HER-2 quimera/3T3-C7.

20 5. Se eligen los platos que tienen una confluencia del 80-90%. Se recogen las células por tripsinización y se centrifugan a 1000 rpm a temperatura ambiente durante 5 min.

25 6. Se suspenden de nuevo las células en medio de desnutrición y se cuentan con azul tripano. Se requiere una viabilidad superior al 90%. Se siembran las células en medio de desnutrición en una densidad de 2.500 células por hoyo, 90 µl por hoyo, en una placa de microvaloración de 96 hoyos. Se incuban las células sembradas a 37°C durante una noche con un 5% de CO₂.

7. Se inicia el ensayo dos días después de la siembra.

30 8. Se disuelven los compuestos a ensayar en DMSO del 4%. Después se disuelven las muestras todavía más, directamente en las placas, con DMEM de desnutrición. Esta dilución puede ser por ejemplo 1:10 o mayor. Después se transfieren todos los hoyos a la placa de las células en una dilución ulterior de 1:10 (10 µl de muestra y medio en 90 µl de medio de desnutrición). La concentración final del DMSO debería ser del 1% o inferior. Puede utilizarse también una serie de diluciones estándar.

35 9. Se incuba a 37°C durante 2 horas con un 5% de CO₂.

10. Se prepara el ligando EGF por dilución del patrón de EGF (16,5 µM) en DMEM caliente hasta 150 nM.

11. Se prepara HNTG* fresco suficiente para 100 µl por hoyo; se coloca sobre hielo.

40 12. Después de 2 horas de incubación con el compuesto ensayado se añade ligando EGF preparado a las células, 50 µl por hoyo, para lograr una concentración final de 50 nM. Los hoyos de control positivo reciben la misma cantidad de EGF. Los controles negativos no reciben EGF. Se incuba a 37°C durante 10 min.

45 13. Se retiran el compuesto ensayado, el EGF y el DMEM. Se lavan las células una vez con PBS.

14. Se transfiere el HNTG* a las células, 100 µl por hoyo. Se coloca sobre hielo durante 5 minutos. Durante este tiempo se quita el tampón de bloqueo de la placa ELISA y se lava.

50 15. Se raspan las células de la placa con un aparato de micropipeteo y se homogeneiza el material celular por aspiración repetida y dispensado del tampón de lisis HNTG*. Se transfiere el lisado a una placa ELISA recubierta, bloqueada y lavada.

16. Se incuba, con agitación, a temperatura ambiente durante 1 h.

55 17. Se retira el lisado y se lava. Se transfiere el anticuerpo anti-Ptyr recién diluido (1:3000 en TBST) a la placa ELISA, 100 µl por hoyo.

18. Se incuba, con agitación, a temperatura ambiente durante 30 min.

60 19. Se quita el anticuerpo anti-Ptyr, se lava. Se transfiere el anticuerpo de BIOSOURCE recién diluido a la placa ELISA (1:8000 en TBST, 100 µl por hoyo).

20. Se incuba, con agitación, a temperatura ambiente durante 30 min.

65 21. Se quita el anticuerpo de BIOSOURCE, se lava. Se transfiere la solución de ABTS/H₂O₂ recién preparada a la placa ELISA, 100 µl por hoyo.

22. Se incuba con agitación durante 5-10 minutos. Se eliminan todas las burbujas.

ES 2 269 416 T3

23. Se interrumpe la reacción añadiendo 100 μ l de HCl 0,2 M a cada hoyo.

24. Se leen los resultados del ensayo en un lector Dynatech MR7000 de ELISA con un conjunto de filtros para ensayo a 410 nm y un filtro de referencia a 630 nm.

5

Ensayo de la CDK2/ciclina A

Se realiza este ensayo para medir la actividad de la serina/treonina-quinasa “*in vitro*” de la cdk2 humana/ciclina A en un ensayo de centelleo de proximidad (SPA).

10

Materiales y reactivos

1. Placas (flexi) de poli(tereftalato de etileno) Wallac de 96 hoyos (Wallac, n° de catálogo: 1450-401).

15

2. Amersham Revidue ATP[γ P³³] (Amersham, n° de catálogo: AH 9968).

3. Esferillas de poliviniltolueno para SPA recubiertas con estreptavidina de Amersham (Amersham, n° de catálogo: RPNQ0007). Las esferillas deberían reconstituirse en PBS sin magnesio ni calcio, a 20 mg/ml.

20

4. Complejo de enzimas cdk2/ciclina A activado, purificado a partir de células Sf9 (SUGEN, Inc.).

5. Sustrato de péptido biotilado (Debtide). Se disuelve el péptido biotina-X-PKTPKKAKKL en dH₂O en una concentración de 5 mg/ml.

25

6. DMSO al 20% en dH₂O.

7. Tampón de quinasa: para 10 ml, se mezclan 9,1 ml de dH₂O, 0,5 ml de TRIS (pH 7,4), 0,2 ml de MgCl₂ 1M, 0,2 ml de NP40 del 10% y se les añaden 0,02 ml de DTT 1M inmediatamente antes del uso.

30

8. ATP 10 mM en dH₂O.

9. Tris 1M, pH ajustado a 7,4 con HCl.

10. MgCl₂ 1M.

35

11. DTT 1M.

12. PBS (Gibco, n° de catálogo: 14190-144).

40

13. EDTA 0,5 M.

14. Solución de paro: para 10 ml, se mezclan 9,25 ml de PBS, 0,05 ml de ATP 10 mM, 0,1 ml de EDTA 0,5 M, 0,1 ml de Triton X-100 del 10% y 1,5 ml de esferillas SPA de 50 mg/ml.

45

Procedimiento

1. Se preparan soluciones de los compuestos a ensayar a 4x la concentración final deseada en DMSO del 5%. Se añaden 10 μ l a cada hoyo. Para los controles positivos y negativos se utilizan únicamente 10 μ l de DMSO del 20%.

50

2. Se diluye el sustrato de péptido (Debtide) 1:250 con dH₂O para obtener una concentración final de 0,02 mg/ml.

3. Se mezclan 24 μ l de ATP 0,1 mM con 24 μ Ci de ATP- γ P³³ y dH₂O suficiente para llegar a 600 μ l.

55

4. Se mezclan las soluciones de péptido y de ATP 1:1 (600 μ l + 600 μ l por placa). Se añaden 10 μ l de esta solución a cada hoyo.

5. Se diluyen 5 μ l de la solución de cdk2/ciclina A en 2,1 ml de tampón de quinasa 2x (por placa). Se añaden 20 μ l de enzima a cada hoyo. Para los controles negativos se añaden 20 μ l de tampón de quinasa 2x sin la enzima.

60

6. Se mezcla brevemente en un agitador de placas; se incuba durante 60 minutos.

7. Se añaden 200 μ l de solución de paro a cada hoyo.

8. Se deja en reposo por lo menos durante 10 min.

65

9. Se centrifuga la placa a aprox. 2300 rpm durante 10-15 min.

10. Se efectúa el recuento de la placa en un lector Trilux.

ES 2 269 416 T3

Ensayo de transfosforilación de met

En este ensayo se miden los niveles de fosfotirosina en un sustrato poli(ácido glutámico:tirosina, 4:1) como medio para identificar agonistas/antagonistas de la transfosforilación de met en el sustrato.

5

Materiales y reactivos

1. placas Corning de 96 hoyos para ELISA (Corning, n° de catálogo: 25805-96).

10

2. Poly(glu-tyr), 4:1 (Sigma, n° de catálogo: P 0275).

3. PBS, Gibco, n° de catálogo: 450-1300EB.

15

4. HEPES 50 mM.

5. Tampón de bloqueo: se disuelven 25 g de albúmina de suero bovino, Sigma, n° de catálogo: A-7888, en 500 ml de PBS, se filtra a través de un filtro de 4 μ m.

20

6. Proteína de fusión de GST purificada, que contiene el dominio de quinasa met, SUGEN, Inc.

7. Tampón TBST.

8. DMSO al 10% en agua (H₂O purificada por MilliQue).

25

9. Trifosfato de adenosina-5' 10 mM en agua (dH₂O), Sigma, n° de catálogo: A-5394.

10. Tampón de dilución de quinasa 2X: para 100 ml, se mezclan 10 ml de HEPES 1M de pH 7,5, con 0,5 ml de BSA al 5% en PBS, 0,2 ml de ortovanadato sódico 0,1 M y 1 ml de cloruro sódico 5M en 88,4 ml de dH₂O.

30

11. Mezcla reaccionante ATP 4X: para 10 ml, se mezclan 0,4 ml de cloruro de manganeso 1M y 0,02 ml de ATP 0,1 M en 9,56 ml de dH₂O.

12. Mezcla de controles negativos 4X: para 10 ml, se mezclan 0,4 ml de cloruro de manganeso 1 M en 9,6 ml de dH₂O.

35

13. Placas de polipropileno NUNC de 96 hoyos de fondo en V, Applied Scientific, n° de catálogo: S-72092.

14. EDTA 500 mM.

40

15. Tampón de dilución de anticuerpos: para 100 ml, se mezclan 10 ml de BSA al 5% en PBS, 0,5 ml de leche instantánea Carnation® al 5% en PBS y 0,1 ml de ortovanadato sódico 0,1 M en 88,4 ml de TBST.

16. Anticuerpo policlonal de conejo antifosfotirosina, SUGEN, Inc.

45

17. Anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano rústico, Biosource, Inc.

18. Solución de ABTS: para 1 l, se mezclan 19,21 g de ácido cítrico, 35,49 g de Na₂HPO₄ y 500 mg de ABTS con dH₂O suficiente para completar 1 l.

50

19. ABTS/H₂O₂: se mezclan 15 ml de solución de ABTS con 2 μ l de H₂O₂ cinco minutos antes del uso.

20. HCl 0,2 M.

Procedimiento

55

1. Se recubren las placas ELISA con 2 μ g de Poly(Glu-Tyr) en 100 μ l de PBS, se mantiene a 4°C durante una noche.

60

2. Se bloquea la placa con 150 μ l de BSA al 5% en PBS durante 60 min.

3. Se lava la placa dos veces con PBS, después una vez con tampón Hepes 50 mM, pH 7,4.

4. Se añaden 50 μ l de quinasa diluida a todos los hoyos. (Se diluye la quinasa purificada con tampón de dilución de quinasa. La concentración final debería ser de 10 ng/hoyo.)

65

5. Se añaden 25 μ l del compuesto a ensayar (en DMSO del 4%) o bien DMSO solo (al 4% en dH₂O) a los hoyos de control de la placa.

ES 2 269 416 T3

6. Se incuba la mezcla quinasa/compuesto durante 15 minutos.
7. Se añaden 25 μ l de $MnCl_2$ 40 mM a los hoyos de control negativo.
- 5 8. Se añaden 25 μ l de mezcla de ATP/ $MnCl_2$ a los demás hoyos (excepto los controles negativos). Se incuba durante 5 min.
9. Se añaden 25 μ l de EDTA 500 mM para interrumpir la reacción.
- 10 10. Se lava la placa 3x con TBST.
11. Se añaden 100 μ l de anticuerpo policlonal de conejo anti-Ptyr, diluido 1:10.000 en el tampón de dilución de anticuerpos, a cada hoyo. Se incuba, con agitación, a temperatura ambiente durante una hora.
- 15 12. Se lava la placa 3x con TBST.
13. Se diluye el anticuerpo anti-conejo conjugado con HRP de Biosource 1:6.000 en tampón de dilución de anticuerpos. Se añaden 100 μ l por hoyo y se incuba a temperatura ambiente, con agitación, durante una hora.
- 20 14. Se lava la placa 1X con PBS.
15. Se añaden 100 μ l de la solución ABTS/ H_2O_2 a cada hoyo.
16. Si fuera necesario se interrumpe la reacción con la adición de 100 μ l de HCl 0,2 M a cada hoyo.
- 25 17. Se lee la placa en un lector Dynatech MR7000 para ELISA, con un filtro de ensayo a 410 nm y un filtro de referencia a 630 nm.

Ensayo de transfosforilación de IGF-1

- 30 En este ensayo se mide el nivel de fosfotirosina en poli(ácido glutámico:tirosina, 4:1) para identificar los agonistas/antagonistas de la transfosforilación de *gst*-IGF-1 de un sustrato.

Materiales y reactivos

- 35 1. Placas Corning de 96 hoyos para ELISA.
2. Poly(Glu-Tyr), 4:1, Sigma, n° de catálogo: P 0275.
- 40 3. PBS, Gibco, n° de catálogo: 450-1300EB.
4. HEPES 50 mM.
5. Tampón de bloqueo TBB: para 1 l, se mezclan 100 g de BSA, 12,1 g de TRIS (pH 7,5), 58,44 g de cloruro sódico y 10 ml de TWEEN-20 del 1%.
- 45 6. Proteína de fusión GST purificada, que contiene el dominio IGF-1-quinasa (SUGEN, Inc.).
7. Tampón TBST: para 1 l, se mezclan 6,057 g de Tris, 8,766 g de cloruro sódico y 0,5 ml de TWEEN-20 con dH_2O suficiente para completar 1 litro.
- 50 8. DMSO al 4% en H_2O purificada por Milli-Q.
9. ATP 10 mM en dH_2O .
- 55 10. Tampón de dilución de quinasa 2X: para 100 ml, se mezclan 10 ml de HEPES 1M (pH 7,5), 0,4 ml de BSA al 5% en dH_2O , 0,2 ml de ortovanadato sódico 0,1 M y 1 ml de cloruro sódico 5M con dH_2O suficiente para completar 100 ml.
- 60 11. Mezcla reaccionante ATP 4X: para 10 ml, se mezclan 0,4 ml de $MnCl_2$ 1 M y 0,008 ml de ATP 0,01 M y 9,56 ml de dH_2O .
12. Mezcla de controles negativos 4X: se mezclan 0,4 ml de $MnCl_2$ 1 M y 9,60 ml de dH_2O .
- 65 13. Placas de polipropileno NUNC de 96 hoyos de fondo en V.
14. EDTA 500 mM en dH_2O .

ES 2 269 416 T3

15. Tampón de dilución de anticuerpo: para 100 ml, se mezclan 10 ml de BSA al 5% en PBS, 0,5 ml de leche desnatada instantánea Carnation al 5% en PBS y 0,1 ml de ortovanadato sódico 0,1 M en 88,4 ml de TBST.

16. Anticuerpo policlonal de conejo antifosfotirosina, SUGEN, Inc.

17. Anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con HRP, Biosource.

18. Solución de ABTS.

20. ABTS/H₂O₂: se mezclan 15 ml de ABTS con 2 μ l de H₂O₂ 5 minutos antes del uso.

21. HCl 0,2 M en dH₂O.

Procedimiento

1. Se recubre la placa ELISA con 2,0 μ g de Poly(Glu-Tyr), 4:1 (Sigma, P0275) en 100 μ l de PBS por hoyo. Se guarda la placa a 4°C durante una noche.

2. Se lava la placa una vez con PBS.

3. Se añaden 100 μ l de tampón de bloqueo TBB a cada hoyo. Se incuba la placa a temperatura ambiente con agitación durante 1 hora.

4. Se lava la placa una vez con PBS, dos veces con tampón Hepes 50 mM, de pH 7,5.

5. Se añaden 25 μ l de compuesto de ensayo a DMSO del 4% (obtenido por dilución de una solución patrón 10 mM del compuesto de ensayo en DMSO del 100% con dH₂O) a la placa.

6. Se añaden 10,0 ng de la quinasa de *gst-IGF-1* en 50 μ l de tampón de dilución de quinasa a todos los hoyos.

7. Se inicia la reacción de la quinasa añadiendo 25 μ l de mezcla reaccionante ATP 4X a todos los hoyos de ensayo y a los hoyos de control positivo. Se añaden 25 μ l de mezcla de controles negativos 4X a todos los hoyos de control negativo. Se incuba a temperatura ambiente, con agitación, durante 10 minutos.

8. Se añaden 25 μ l de EDTA 0,5 M (pH 8,0) a todos los hoyos.

9. Se lava la placa 4x con tampón TBST.

10. Se añaden antiseros policlonales de conejo anti-fosfotirosina en una dilución 1:10.000 en 100 μ l de tampón de dilución de anticuerpos a todos los hoyos. Se incuba a temperatura ambiente, con agitación, durante 1 hora.

11. Se lava la placa como en el paso 9.

12. Se añaden 100 μ l de anticuerpo anti-conejo conjugado con HRP de Biosource en una dilución de 1:10.000 en el tampón de dilución de anticuerpos a todos los hoyos. Se incuba a temperatura ambiente, con agitación, durante 1 hora.

13. Se lava la placa como en el paso 9, después se lava una vez con PBS para eliminar las burbujas y el exceso de Tween-20.

14. Se revela añadiendo 100 μ l de ABTS/H₂O₂ a cada hoyo.

15. Después de unos 5 minutos se leen los resultados en un lector ELISA con filtro de ensayo a 410 nm y filtro de referencia a 630 nm.

Ensayos de incorporación de BrdU

En los ensayos que siguen se utilizan células diseñadas para expresarse en un receptor seleccionado y después evaluar el efecto de un compuesto de interés en la actividad de la síntesis de DNA inducida por el ligando mediante la determinación de la incorporación de la BrdU al DNA.

Los materiales, reactivos y procedimientos que siguen son generales para cada uno de los siguientes ensayos de incorporación de BrdU. En los ensayos concretos se destacan las variaciones.

ES 2 269 416 T3

Materiales y reactivos generales

1. El ligando apropiado.

2. Las células diseñadas apropiadas.

3. Reactivo de marcado BrdU: 10 mM en PBS, pH 7,4 (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN).

4. FixDenat: solución de fijación (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN).

5. Anti-BrdU-POD: anticuerpo monoclonal de ratón conjugado con peroxidasa (Chemicon, Temecula, CA).

6. Solución de sustrato TMB: tetrametilbencidina (TMB, lista para el uso, Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN).

7. Solución de lavado PBS: PBS 1X, pH 7,4.

8. Albúmina bovina (BSA), fracción V de polvo (Sigma Chemical Co., EE.UU.).

Procedimiento general

1. Se siembran las células a razón de 8000 células/hoyo en CS del 10%, Gln 2 mM en DMEM, en una placa de 96 hoyos. Se incuban las células a 37°C durante una noche con un 5% de CO₂.

2. Pasadas 24 horas se lavan las células con PBS y después se mantienen en desnutrición de suero en un medio exento de suero (CS al 0% en DMEM con un 0,1% de BSA) durante 24 horas.

3. En el día 3 se añaden simultáneamente a las células el ligando apropiado y el compuesto a ensayar. Los hoyos de control negativo reciben solamente DMEM exento de suero con un 0,1% de BSA; las células de control positivo reciben el ligando pero no el compuesto. Se preparan los compuestos a ensayar en DMEM exento de suero con ligando en una placa de 96 hoyos y se diluyen en series de 7 concentraciones de ensayo.

4. Después de 18 horas de la activación del ligando se añade el reactivo diluido de marcado de la BrdU (1:100 en DMEM, 0,1% de BSA) y se incuban las células con la BrdU (la concentración final es 10 µM) durante 1,5 horas.

5. Después de la incubación con el reactivo marcador se separa el medio por decantación y suave golpeo de la placa invertida sobre una toalla de papel. Se añade la solución de FixDenat (50 µl/hoyo) y se incuba la placa a temperatura ambiente durante 45 minutos en el agitador de placas.

6. Se retira la solución FixDenat por decantación y suave golpeo de la placa invertida sobre una toalla de papel. Se añade leche (leche deshidratada al 5% en PBS, 200 µl/hoyo) como solución de bloqueo y se incuba la placa a temperatura ambiente durante 30 minutos en el agitador de placas.

7. Se quita la solución de bloqueo por decantación y se lavan los hoyos una vez con PBS. Se añade solución anti-BrdU-POD (dilución 1:200 en PBS, 1% de BSA, 50 µl/hoyo) y se incuba la placa a temperatura ambiente durante 90 minutos en el agitador de placas.

8. Se retira el conjugado de anticuerpo por decantación y enjuague de los hoyos 5 veces con PBS y se seca la placa por decantación y suave golpeo sobre una toalla de papel.

9. Se añade la solución de sustrato TMB (100 µl/hoyo) y se incuba a temperatura ambiente durante 20 minutos en el agitador de placas hasta que el color desarrollado sea suficiente para la detección fotométrica.

10. Se mide la absorbancia de las muestras a 410 nm (en modo "longitud de onda dual" con un filtro que lee a 490 nm, como longitud de onda de referencia) en un lector de placas Dynatech ELISA.

Ensayo de incorporación de BrdU inducida por EGF

Materiales y reactivos

1. EGF de ratón, 201 (Toyobo Co., Ltd., Japón).

2. 3T3/EGFRc7.

Los demás materiales, reactivos y procedimiento, como antes.

ES 2 269 416 T3

Ensayo de incorporación de BrdU inducida por EGF realizada en Her-2

Materiales y reactivos

- 5 1. EGF de ratón, 201 (Toyobo Co., Ltd., Japón).
2. 3T3/EGFr/Her2/EGFr (EGFr con dominio de quinasa Her-2).

Los demás materiales, reactivos y procedimiento, como antes.

10

Ensayo de incorporación de BrdU inducida por EGF realizada en Her-4

Materiales y reactivos

- 15 1. EGF de ratón, 201 (Toyobo Co., Ltd., Japón).
2. 3T3/EGFr/Her2/EGFr (EGFr con dominio de quinasa Her-4).

Los demás materiales, reactivos y procedimiento, como antes.

20

Ensayo de incorporación de BrdU inducida por PDGF

Materiales y reactivos

- 25 1. PDGF B/B humano (Boehringer Mannheim, Alemania).
2. 3T3/EGFRc7.

Los demás materiales, reactivos y procedimiento, como antes.

30

Ensayo de incorporación de BrdU inducida por FGF

Materiales y reactivos

- 35 1. FGF2/bFGF humano (Gibco BRL, EE.UU.).
2. 3T3c7/EGFr.

Los demás materiales, reactivos y procedimiento, como antes.

40

Ensayo de incorporación de BrdU inducida por IGF1

Materiales y reactivos

- 45 1. Humano, recombinante (G511, Promega Corp., EE.UU.).
2. 3T3/IGF1r.

Los demás materiales, reactivos y procedimiento, como antes.

50

Ensayo de incorporación de BrdU inducida por insulina

Materiales y reactivos

- 55 1. Insulina cristalina bovina, cinc (13007, Gibco BRL, EE.UU.).
2. 3T3/H25.

Los demás materiales, reactivos y procedimiento, como antes.

60

Ensayo de incorporación de BrdU inducida por HGF

Materiales y reactivos

- 65 1. HGF recombinante humano (R&D Systems, Inc., EE.UU., nº de catálogo: 249-HG).
2. Células BxPC-3 (ATCC CRL-1687).

ES 2 269 416 T3

Los demás materiales y reactivos como antes.

Procedimiento

5 1. Se siembran las células a razón de 9000 células/hoyo en RPMI al 10% en FBS en una placa de 96 hoyos. Se incuban las células a 37°C durante una noche con un 5% de CO₂.

10 2. Después de 24 horas se lavan las células con PBS y después se desnuten de suero en 100 µl de un medio exento de suero (RPMI con 0,1% de BSA) durante 24 horas.

15 3. En el día 3 se añaden a las células 25 µl que contienen el ligando (preparados a razón de 1 µg/ml en RPMI con 0,1% de BSA; la concentración final de HGF es de 200 ng/ml) y un compuesto a ensayar. Los hoyos de control negativo reciben únicamente 25 µl de RPMI exento de suero con un 0,1% de BSA; las células de control positivo reciben el ligando (HGF) pero no el compuesto a ensayar. Los compuestos a ensayar se preparan en una concentración 5 veces mayor que la final en un RPMI exento de suero, con ligando, en una placa de 96 hoyos y se diluyen en series de 7 concentraciones a ensayar. Por ejemplo, la concentración más elevada del compuesto a ensayar es 100 µM y se realizan diluciones 1:3 (es decir, el intervalo de concentraciones finales de compuesto a ensayar se sitúa entre 0,137 y 100 µM).

20 4. Después de 18 horas de la activación del ligando se añaden 12,5 µl del reactivo de marcado BrdU diluido (1:100 en RPMI, 0,1% de BSA) a cada hoyo y se incuban las células con la BrdU (la concentración final es 10 µM) durante 1 hora.

25 5. Igual que en el procedimiento general.

6. Igual que en el procedimiento general.

30 7. Se retira la solución de bloqueo por decantación y se lavan los hoyos una vez con PBS. Se añade la solución anti-BrdU-POD (dilución 1:100 en PBS, 1% de BSA) (100 µl/hoyo) y se incuba la placa a temperatura ambiente durante 90 minutos en el agitador de placas.

8. Igual que en el procedimiento general.

35 9. Igual que en el procedimiento general.

10. Igual que en el procedimiento general.

Ensayo de incorporación exponencial de la BrdU

40 En este ensayo se mide la proliferación (síntesis de DNA) de células A431 que se multiplican exponencialmente. Con este ensayo se exploran los compuestos que inhiben la progresión del ciclo celular.

Materiales y reactivos

45 Células A431 de crecimiento sano. Los restantes materiales y reactivos son los mismos que figuran en la sección del método general.

Procedimiento

50 1. Se siembran células A431 a 8000 células/hoyo en FBS del 10%, Gln 2 mM en DMEM, en una placa de 96 hoyos. Se incuban las células a 37°C durante una noche con un 5% de CO₂.

55 2. En el día 2 se diluyen los compuestos a ensayar en 7 concentraciones en el mismo medio de cultivo en una placa de 96 hoyos y después se añaden a las células en una placa de cultivo de tejido de 96 hoyos.

3. Después de 20-24 horas de incubación se añade el reactivo de marcado con BrdU diluido (1:100 en DMEM, 0,1% de BSA) y se incuban las células con la BrdU (la concentración final es 10 µM) durante 2 horas.

60 Para completar el ensayo se efectúan los pasos 5-10 del procedimiento general.

Ensayo ZenSrc

Este ensayo se utiliza para explorar los inhibidores de la tirosina-quinasa Src.

Materiales y reactivos

65 1. Tampón de recubrimiento: PBS que contiene azida sódica (0,2 mg/ml).

ES 2 269 416 T3

2. BSA al 1% p/v en PBS.

3. Tampón de lavado: PBS que contiene un 0,05% v/v de Tween 20 (PBS-TWEEN).

5 4. HEPES 500 mM, pH 7,4.

5. ATP (4 μ M) + MgCl₂ (80 mM) en agua destilada.

10 6. MgCl₂ (80 mM) en agua destilada (para los blancos sin ATP).

7. Compuestos a ensayar, 10 mM en DMSO.

15 8. Tampón de ensayo: HEPES 100 mM, pH 7,4, que contiene DTT 2 mM, ortovanadato sódico 0,2 mM y 0,2 mg/ml de BSA.

9. Src recombinante humana parcialmente purificada (UBI, 14-117).

10. Anti-fosfotirosina (SUGEN, policlonal de conejo anti-PY).

20 11. Ig de cabra anti-conejo fijado sobre HRP (Biosource International, n° de catálogo: 6430).

12. Sustrato ABTS con HRP o sustrato de peroxidasa Pierce.

13. Placas Corning para ELISA.

25 *Procedimiento*

1. Se recubren las placas con 100 μ l de Poly(Glu-Tyr) (Sigma, n° de catálogo: P0275) de 20 μ g/ml, que contienen un 0,01% de azida sódica. Se mantiene a 4°C durante una noche.

30 2. Se bloquea con BSA del 1% a razón de 100 μ l/hoyo a temperatura ambiente durante una hora.

3. Se introducen los compuestos a ensayar (10 mM en DMSO) en una placa Costar a razón de 2 μ l/hoyo, listos para la dilución con dH₂O y se traspasan a las placas de reacción.

35 4. Se diluye la quinasa Src 1:10.000 con el tampón de reacción, para 5 placas se preparan 25 ml del modo siguiente: 2,5 ml de HEPES 1M, pH 7,4 (almacenado a 4°C en condiciones estériles), 21,85 ml de agua destilada, 0,1 ml de BSA del 5%, 0,5 ml de ortovanadato sódico 10 mM (almacenado a 4°C en condiciones estériles), 50 μ l de DTT 1,0 M (almacenado congelado a -20°C) y 2,5 ml de la quinasa Src (almacenada congelada a -80°C).

40 5. Se añaden 48 μ l de agua destilada a los 2 μ l de cada compuesto en la placa de dilución, después se añaden 25 μ l/hoyo de esta a la placa de reacción.

45 6. Se añaden 50 μ l de HRP a cada hoyo de tampón de reacción y después 25 μ l de ATP-MgCl₂/hoyo (MgCl₂ solamente a los blancos sin ATP). Se incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos en el agitador de placas. Se interrumpe la reacción añadiendo 25 μ l de EDTA 0,5 M a cada hoyo.

7. Se lava 4X con PBS-TWEEN.

50 8. Se añaden 100 μ l del anti-fosfotirosina (1:10.000 de suero anti-pTyr o 1:3.000 de anticuerpo purificado por afinidad PA y diluido en glicerina del 10%) en PBS-TWEEN que contiene un 0,5% de BSA, un 0,025% de leche en polvo desnatada y ortovanadato sódico 10 μ M. Se incuba a temperatura ambiente con agitación continua durante una hora.

55 9. Se lavan las placas 4X con PBS-TWEEN.

10. Se añade 100 μ l de Ig fijada sobre HRP (1:5.000) en PBS-TWEEN que contiene un 0,5% de BSA, un 0,025% de leche desnatada en polvo, ortovanadato sódico 100 μ M. Se incuba a temperatura ambiente con agitación durante una hora.

60 11. Se lavan las placas 4X con PBS-TWEEN y después una vez con PBS.

12. Se revela la placa empleando ABTS u otro sustrato de peroxidasa.

65 *Análisis del ciclo celular*

Se exponen las células A431 en medio de cultivo estándar a la concentración deseada de un compuesto a ensayar a 37°C durante 20-24 horas. Después se recogen las células, se suspenden en PBS, se fijan con metanol del 70%

ES 2 269 416 T3

enfriado con hielo y se tiñen con yoduro de propidio. A continuación se determina el contenido de DNA empleando un citómetro de flujo FACScan. Entonces puede estimarse la distribución de la fase del ciclo celular empleando los programas informáticos CellFIT (Becton-Dickinson).

5 Ensayo HUV-EC-C

Se emplea este ensayo para medir la actividad de un compuesto contra el PDGF-R, FGF-R, VEGF, aFGF o Flk-1/KDR, todos ellos se expresan de forma natural por parte de las células HUV-EC.

10 *Día 0*

1. Se lavan y se tripsinizan las células HUV-EC (células endoteliales de la vena umbilical humana, American Type Culture Collection, nº de catálogo: 1730 CRL). Se lavan 2 veces con solución salina tamponada con fosfato Dulbecco's (D-PBS, obtenida de Gibco BRL, nº de catálogo: 14190-029) a razón de 1 ml/10 cm² del frasco de cultivo de tejido. Se tripsiniza con un 0,05% de tripsina-EDTA en una solución de disociación celular no enzimática (Sigma Chemical Company, nº de catálogo: C-1544). El 0,05% de tripsina se consigue diluyendo la tripsina del 0,25%/EDTA 1 mM (Gibco, nº de catálogo: 25200-049) en la solución de disociación celular. Se tripsiniza con aprox. 1 ml/25-30 cm² del frasco de cultivo de tejido a 37°C durante unos 5 minutos. Después de despegadas las células del frasco se añade un volumen igual de medio de ensayo y se transfieren a un tubo de centrifuga estéril de 50 ml (Fisher Scientific, nº de catálogo: 05-539-6).

2. Se lavan las células con unos 35 ml de medio de ensayo en el tubo de centrifuga estéril de 50 ml añadiendo medio de ensayo, se centrifuga a aproximadamente 200 rpm durante 10 minutos, se aspira el líquido sobrenadante y se suspende de nuevo en 35 ml de D-PBS. Se repite el lavado dos veces más con D-PBS, se suspenden de nuevo las células en aprox. 1 ml de medio de ensayo/15 cm² del frasco de cultivo de tejido. El medio de ensayo es medio F12K (Gibco BRL, nº de catálogo: 21127-014) y suero fetal bovino inactivado con calor al 0,5%. Se cuentan las células con un contador Coulter® (Coulter Electronics, Inc.) y se añade medio de ensayo a las células para obtener una concentración de 0,8-1,0 x 10⁵ células/ml.

3. Se añaden las células a las placas de 96 hoyos de fondo plano a razón de 100 µl/hoyo o 0,8-1,0 x 10⁴ células/hoyo, se incuba a 37°C durante ≈ 24 h con un 5% de CO₂.

Día 1

1. Se prepara por duplicado las concentraciones de los compuestos de ensayo en placas separadas de 96 hoyos, en general desde 50 µM hasta 0 µM. Se utiliza el mismo medio de ensayo mencionado en el anterior día 0, paso 2. Las valoraciones se obtienen añadiendo 90 µl/hoyo del compuesto a ensayar de 200 µM (4X la concentración final del hoyo) al hoyo superior de una columna concreta de la placa. Dado que la concentración patrón de los compuestos a ensayar es normalmente 20 mM en DMSO, la concentración de fármaco 200 µM contendrá un 2% de DMSO.

Como diluyente para las concentraciones del compuesto a ensayar se emplea un diluyente que consta de DMSO al 2% en el medio de ensayo (F12K + 0,5% de suero fetal bovino), con el fin de diluir los compuestos de ensayo pero manteniendo constante la concentración de DMSO. Se añade este diluyente a los demás hoyos de la columna a razón de 60 µl/hoyo. Se toman 60 µl de los 120 µ de la dilución 200 µM del compuesto a ensayar del hoyo superior de la columna y se mezclan con los 60 µ del segundo hoyo de la columna. Se toman 60 µl de este hoyo y se mezclan con los 60 µ del tercer hoyo de la columna, y así sucesivamente hasta completar las valoraciones por duplicado. Después de mezclar el penúltimo hoyo se toman 60 µl de los 120 µl de este hoyo y se desechan. Se deja el último hoyo con 60 µl de DMSO/medio diluyente en calidad de control que no contiene compuesto a ensayar. Se forman 9 columnas del compuesto a ensayar de concentración conocida, suficientes para hoyos triplicados, para cada uno de los siguientes: (1) VEGF (obtenido de Pepro Tech Inc., nº de catálogo: 100-200); (2) factor de crecimiento de células endoteliales (ECGF) (también conocido como factor de crecimiento de fibroblasto ácido, o aFGF) (obtenido de Boehringer Mannheim Biochemica, nº de catálogo: 1439 600); o (3) PDGF B/B humano (Boehringer Mannheim, Alemania, nº de catálogo: 1276-956) y controles con medio de ensayo. El ECGF se presenta como preparación con heparina sódica.

2. Se transfieren 50 µl/hoyo de las diluciones de los compuestos a ensayar a las placas de ensayo de 96 hoyos que contienen 0,8-1,0 x 10⁴ células/100 µl/hoyo de las células HUV-EC-C del día 0 y se incuban a 37°C durante ≈ 2 h con un 5% de CO₂.

3. Se añaden por triplicado 50 µl/hoyo de VEGF 80 µg/ml, de ECGF de 20 ng/ml o de medio de control a cada concentración de compuesto de ensayo. Al igual que con los compuestos a ensayar, las concentraciones del factor de crecimiento son 4X la concentración final deseada. Se utiliza el medio de ensayo del paso 2 del día 0 para obtener las concentraciones de los factores de crecimiento. Se incuban a 37°C durante aproximadamente 24 horas, con un 5% de CO₂. Cada hoyo tendrá 50 µl de la dilución del compuesto a ensayar, 50 µl del factor de crecimiento o del medio y 100 µl de células, que se calcula hasta 200 µl/hoyo en total. De este modo, las concentraciones 4X del compuesto a ensayar y del factor de crecimiento se convierten en 1X después de que cada uno de ellos se haya añadido a los hoyos.

ES 2 269 416 T3

Día 2

1. Se añade timidina- H^3 (Amersham, nº de catálogo: TRK-686) a razón de 1 $\mu\text{Ci/hoyo}$ (10 $\mu\text{l/hoyo}$ de la solución de 100 $\mu\text{Ci/ml}$ preparada en medio RPMI + 10% de suero fetal bovino inactivado con calor) y se incuba a 37°C durante ≈ 24 h con un 5% de CO_2 . El RPMI se obtiene de Gibco BRL, nº de catálogo: 11875-051.

Día 3

1. Se congelan las placas a -20°C durante una noche.

Día 4

Se descongelan las placas y se recolectan en el recolector de placas de 96 hoyos (Tomtec Harvester® 96) sobre esteras de filtro (Wallac, nº de catálogo: 1205-401), se leen las cuentas en un contador de centelleo líquido Wallac Betaplate™.

Ensayo de permeabilidad vascular

La mayor permeabilidad vascular en caso de angiogénesis dependiente de tumor se debe a un aflojamiento de las juntas de fisuras como respuesta al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). En ensayo Miles de la permeabilidad vascular (Miles y Miles, J. Physiol. 118, 228-257, 1952) se ha adaptado a ratones atímicos con el fin de evaluar la capacidad de los compuestos de la presente invención para inhibir la permeabilidad vascular “*in vivo*” inducida por el VEGF.

Procedimiento general

Se administra el compuesto a ensayar o el vehículo antes (lo normal es 4 horas antes) de efectuar la inyección del VEGF. Se inyectan por vía intravenosa 100 μl de colorante azul de Evan al 0,5% en PBS realizando la inyección en la vena caudal derecha con una jeringuilla de calibre 27. Pasados sesenta minutos se anestesian los animales empleando el nebulizador isoflurano. Después de la anestesia se inyecta por vía intradérmica el VEGF (100 ng de VEGF en 20 μl de PBS) en dos puntos y se inyecta el PBS (20 μl) en dos puntos de una plantilla reticular del lomo de cada animal. En el momento previsto de hasta 1 hora después de la inyección del VEGF se sacrifican los animales por eutanasia con CO_2 , se diseccionan los parches dérmicos y se fotografían. Basándose en los artículos publicados (Alicieri y col., Mol. Cell 4, 915-941, 1999), la evaluación cuantitativa del derrame de colorante dependiente del VEGF dentro de la piel del ratón puede lograrse después de eluir el colorante de los parches dérmicos.

Modelos “*in vivo*” en animales

Modelos de heterotrasplante en animales

La capacidad de los tumores humanos de crecer en forma de heterotrasplantes en ratones atímicos (p.ej. Balb/c, nu/nu) proporciona un modelo “*in vivo*” útil para estudiar la respuesta biológica a las terapias de los tumores humanos. Después del primer heterotrasplante de tumores humanos a ratones atímicos realizado con éxito (Rygaard y Povlsen, Acta Pathol. Microbiol. Scand. 77, 758-760, 1969), se han trasplantado y cultivado con éxito muchas líneas celulares diferentes de tumores humanos (p.ej. mama, pulmón, genitourinario, gastrointestinal, cuello y cabeza, glioblastoma, hueso y melanomas malignos) en ratones desnudos (sin pelo). Se utilizan los siguientes ensayos para determinar el nivel de actividad, la especificidad y el efecto de los diferentes compuestos de la presente invención. Son útiles tres tipos generales de ensayos para evaluar los compuestos: celular/catalítico, celular/biológico e “*in vivo*”. El objeto de los ensayos celulares/catalíticos es determinar el efecto de un compuesto en la capacidad de una TK de fosforilar tirosinas de un sustrato conocido de una célula. El objeto de los ensayos celulares/biológicos consiste en determinar el efecto de un compuesto en la respuesta biológica estimulada por una TK en una célula. El objeto de los ensayos “*in vivo*” es determinar el efecto de un compuesto en un modelo animal de un trastorno particular, por ejemplo el cáncer.

Las líneas celulares idóneas para los ensayos de heterotrasplante subcutáneo incluyen las células C6 (glioma, ATCC nº CCL 107), las células A375 (melanoma, ATCC nº CRL 1619), las células A431 (carcinoma epidermoide, ATCC nº CRL 1555), células Calu 6 (pulmón, ATCC nº HTB 56), células PC3 (próstata, ATCC nº CRL 1435), células SKOV3TP5 y fibroblastos NIH 3T3 diseñados genéticamente para sobreexpresar el EGFR, el PDGFR, el EGF-1R o cualquier otra quinasa a estudiar. Puede utilizarse el protocolo siguiente para realizar los ensayos de heterotrasplante.

Se obtienen los ratones atímicos hembras (BALB/c, nu/nu) de los Simonsen Laboratories (Gilroy, CA). Se mantienen todos los animales en condiciones de recinto limpio en jaulas micro-aislantes con cama del tipo Alpha-dri. Reciben pienso estéril para roedores y agua a discreción.

Se cultivan las líneas celulares en un medio apropiado (por ejemplo: MEM, DMEM, Ham's F10 o Ham's F12 más 5% - 10% de suero fetal bovino (FBS) y glutamina 2 mM ((GLN)). Todos los medios de cultivo celular, la glutamina y el suero fetal bovino se adquieren a Gibco Life Technologies (Grand Island, NY), a menos que se indique lo contrario. Se cultivan las células a 37°C en atmósfera húmeda con un 90-95% de aire y un 5-10% de CO_2 . Todas las líneas

ES 2 269 416 T3

celulares se subcultivan de forma rutinaria dos veces por semana y son negativas en cuanto a micoplasma, según se determina por el método Mycotect (Gibco).

5 Se recolectan las células en o casi en confluencia con un 0,05% de tripsina-EDTA y se centrifugan a 450 rpm durante 10 min. Se suspenden de nuevo los culotes en PBS estéril o en medio (sin FBS) hasta una concentración concreta y se implantan las células en la ijada trasera de los ratones (8-10 ratones por grupo, 2-10 x 10⁶ células/animal). Se mide el crecimiento tumoral durante 3-6 semanas empleando un calibre Venier. Se calculan los volúmenes de los tumores como el producto de la longitud x la anchura x la altura, a menos que se diga lo contrario. Los valores P se calculan empleando el test t de Student. Los compuestos a ensayar en 50 - 100 µl de excipiente (DMSO o VPD:D5W) pueden entregarse por inyección i.p. en diferentes concentraciones, empezando por lo general en el día uno después de la implantación.

Modelo de invasión tumoral

15 Se ha desarrollado el siguiente modelo de invasión tumoral, que puede utilizarse para evaluar el valor terapéutico y la eficacia de los compuestos identificados como inhibidores selectivos del receptor KDR-FLK-1.

Procedimiento

20 Como animales experimentales se emplean ratones desnudos (= sin pelo) hembras de 8 semanas de edad (Simonsen Inc.). La implantación de células tumorales puede realizarse en una campana de flujo laminar. Para la anestesia se administra por vía intraperitoneal un cóctel de xilazina-cetamina (100 mg/kg de cetamina y 5 mg/kg de xilazina). Se realiza una incisión central para exponer la cavidad abdominal (longitud aproximada: 1,5 cm) para inyectar 10⁷ células tumorales en un volumen de 100 µl de medio. Se inyectan las células en el lóbulo duodenal del páncreas o debajo de la serosa del colon. Se cierran el peritoneo y los músculos con sutura continua de seda 6-0 y se cierra la cicatriz de la piel empleando grapas. Se observan los animales a diario.

Análisis

30 Después de 2-6 semanas, en función de las observaciones a simple vista de los animales, se sacrifican los ratones y se extirpan las metástasis tumorales locales de varios órganos (pulmón, hígado, cerebro, estómago, bazo, corazón, músculos) y se analizan (medición del tamaño del tumor, grado de invasión, inmunoquímica, determinación de la hibridación "in situ", etc.).

Ensayos adicionales

40 Los ensayos adicionales que pueden aplicarse para evaluar los compuestos de esta invención incluyen, sin limitación, un bioensayo de flk-1, un ensayo de receptor EGF-receptor quimérico HER2 en células enteras, un bioensayo de src, un bioensayo de lck y un ensayo que mida la función de fosforilación del raf. Los protocolos para cada uno de estos ensayos pueden encontrarse en la solicitud de patente norteamericana de n° de serie 09/099 842, que se incorpora como referencia, incluidas las figuras que contiene. Se incorporan también como referencias en su totalidad la patente US-5 792 783, depositada con fecha 5 de junio de 1996 y la solicitud de patente norteamericana con n° de serie 09/322 297, depositada con fecha 28 de mayo de 1999.

Medición de la toxicidad celular

45 Los compuestos terapéuticos deberían ser más potentes desplegando una actividad sobre la tirosina-quinasa de receptor que ejerciendo un efecto citotóxico. Una medida de la eficacia y de la toxicidad celular de un compuesto puede obtenerse determinando el índice terapéutico, es decir, la ID₅₀/LD₅₀. La IC₅₀ es la dosis que se requiere para lograr una inhibición del 50% y puede medirse aplicando técnicas estándar, por ejemplo las descritas en esta solicitud. La LD₅₀ es la dosis que produce una toxicidad del 50% y puede medirse también por técnicas estándar (Mossman, J. Immunol. Methods 65, 55-63, 1983), midiendo la cantidad de LDH liberada (Korzeniewski y Callenwaert, J. Immunol. Methods 64, 313, 1983; Decker y Lohmann-Matthes, J. Immunol. Methods 115, 61, 1988) o midiendo la dosis letal en modelos animales. Son preferidos los compuestos que tienen un índice terapéutico elevado. El índice terapéutico debería ser mayor que 2, con preferencia por lo menos 10, con preferencia especial por lo menos 50.

Ensayo de estabilidad de plasma

60 Se administra a perros por vía i.v. el profármaco (3Z)-3-[(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il)-metilideno]-1-(1-pirrolidinilmetil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona a razón de 2 mg/ml. Se hace un seguimiento de los niveles tanto del profármaco como del fármaco (3(Z)-3-[(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il)-metilideno]-1-(1-pirrolidinilmetil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona) por cromatografía HPLC del plasma sanguíneo durante 4 horas después de la administración de la dosis. Este estudio indica que la vida media para la conversión del profármaco en fármaco es de 7,3 min. A partir del gráfico de la concentración de fármaco frente al tiempo, el área contenida debajo de la curva indica que el 80% del profármaco se ha convertido en fármaco.

ES 2 269 416 T3

Ejemplos de formulación

En las tablas 1 y 2 se recogen formulaciones evaluadas y que se describen a continuación.

5 [A] *Formulaciones sólidas que se reconstituyen para obtener un material infusible estable (tabla 1)*

(1) *Formulación liofilizada*

10 (a) *Basada en Captisol*: en esta formulación se utiliza el Captisol y un agente ácido para formar una sal “*in situ*” a pH entre 1,5 y 2,0 para formular y liofilizar soluciones de fármaco en concentraciones de 20,0 a 25,0 mg/ml. Se reconstituye la torta liofilizada con un líquido de administración i.v. para obtener un material infusible estable de 2 mg/ml o más, a pH 3.

15 (b) *No basada en Captisol*: en esta formulación se emplean cantidades pequeñas de un tensioactivo, por ejemplo el Polysorbate 80 o el Cremophor EL y un agente ácido para formar “*in situ*” una sal a un pH entre 1,5 y 2,0 para formular y liofilizar soluciones del fármaco en concentraciones de 20,0 a 25,0 mg/ml. Se reconstituye la torta liofilizada con un diluyente acuoso de base tensioactivo-codisolvente, por ejemplo el PEG-300/Polysorbate-80 o el PEG-300/Cremophor EL, para obtener un material infusible estable de 2 mg/ml o más, a pH 3.

20 (2) *Relleno API estéril*

Se envasa el fármaco en forma de relleno de polvo estéril en un envase y podrá reconstituirse con un diluyente acuoso basado en un co-disolvente-tensioactivo específico para obtener un material infusible estable de 2 mg/ml o más del fármaco, a pH 3.

25 [B] *Solución concentrada para diluirse en forma de material infusible estable (tabla 2)*

30 Se solubiliza el fármaco en una mezcla no acuosa de co-disolventes y tensioactivos en una concentración elevada, de modo que pueda diluirse con diluyentes acuosos para obtener un material infusible estable. La concentración del fármaco en el material infusible tiene una concentración de 2 mg/ml o mayor, a pH 3. Los niveles totales de co-disolvente son inferiores al 15% y los niveles de tensioactivo son inferiores al 0,5%.

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

Tabla 1: (1) Formulaciones sólidas

Atributos	liofilizadas, basadas en Captisol	liofilizadas, no basadas en Captisol	relleno API estéril
dosis/vial 50 cc (mg)	200-300	200-300	300-400
relleno API estéril en vial	NA	NA	300-400 mg
composición: torta liofilizada	fármaco (mg) 200-300 ácido (M) 1,4 antioxidante (mg) 0-10 Captisol (mg) 2000-3000	fármaco (mg) 200-300 ácido (M) 1,4 antioxidante (mg) 0,10 relleno (mg) 200-300 Polysorbate-80 (mg) 0-50	NA
composición: líquido de reconstitución	NaCl del 0,9 %, D5W	PEG-300 (% p/v) 5-20 Polysorbate-80 (% p/v) 0-1,0 tampón citrato 0,1 M pH 3,0 (% p/v) 30-40 agua (volumen sufici.)	PEG-300 (% p/v) 5-20 Polysorbate-80 (% p/v) 0-1,0 tampón citrato 0,1 M pH 3,0 (% p/v) 30-40 agua (volumen sufici.)

Atributos	lío­filiza­das, basadas en Captisol	lío­filiza­das, no basadas en Captisol	relleno API esté­ril
composición: material infu­sionable reconstituido (adminis­trado al paciente)	fármaco (mg/ml) 2-3 ácido (molar) 1,4 antioxi­dante (mg/ml) 0-1,0 Captisol (mg/ml) 20-30 líqui­do i.v. (volumen suf.) pH 3,0	fármaco (mg/ml) 2-3 ácido (molar) 1,4 antioxi­dante (mg/ml) 0-1,0 relleno (mg/ml) 2-3 PEG-300 (mg/ml) 50-200 Polysorbate-80 (mg/ml) 0-10 tam­pón citrato 0,1 M pH 3,0 (ml) agua (volumen sufic.) pH 3,0	fármaco (mg/ml) 2-3 ácido (molar) 1,4 antioxi­dante (mg/ml) 0-1,0 relleno (mg/ml) 2-3 PEG-300 (mg/ml) 50-200 Polysorbate-80 (mg/ml) 0-10 tam­pón citrato 0,1 M pH 3,0 (ml) agua (volumen sufic.) pH 3,0
composición: pre­lío­filizado	fármaco (mg/ml) 20-30 ácido (molar) 1,4 antioxi­dante (mg/ml) 0-10 Captisol (mg/ml) 200-300 agua para inyección, hasta 1,0 ml pH 1,5-2,0	fármaco (mg/ml) 20-30 ácido (molar) 1,4 antioxi­dante (mg/ml) 0-10 relleno (mg/ml) 20-30 Polysorbate 80 (mg) 0-50 agua para inyección, hasta 1,0 ml pH 1,5-2,0	NA

NA = no aplicable; ácido utilizado: ácido metanosulfónico, tartárico, cítrico, succínico; que se emplea en una proporción molar 1:1,4 para la formación de sal "in situ"; codisolventes: PEG-300, PEG-400, tensioactivos: Polysorbate-80, Cremophor EL Captisol®: sulfobutiléter de la ciclodextrina; fármaco: compuesto del ejemplo 2.

ES 2 269 416 T3

TABLA 2

Composición de formulación en solución

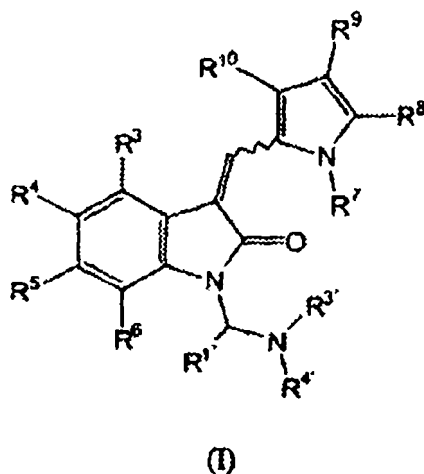
Ingredientes	Composición (% p/v o mg/ml)
fármaco	1,2-2,5 (12-25 mg/ml)
codisolvente: PEG-300, PEG-400	70-90
tensioactivo	0-10
dimetilacetamida	0-2
agente formador de sal (ácido metanosulfónico, tartárico, cítrico, succínico)	equivalente a una relación 1,4 M del API
alcohol	volumen suficiente

La formulación tiene que diluirse 10 veces con líquidos farmacéuticamente aceptables para la administración i.v.

El alcance de la presente invención no está limitado por las formas de ejecución ejemplificadas, cuya finalidad es meramente ilustrativa de algunos aspectos de la invención y todos los clones, DNA o secuencias de aminoácidos que sean funcionalmente equivalentes están contemplados en el alcance de la invención. Obviamente, los expertos en la materia pueden encontrar diversas modificaciones de la invención, además de las descritas en esta solicitud, a la vista de la descripción precedente y figuras que acompañan. Tales modificaciones están contempladas también dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula (I):



en la que:

R^3 , R^5 y R^6 se elige con independencia entre sí entre el grupo formado por hidrógeno, alquilo C_1-C_{10} , trihaloalquilo C_1-C_{10} , cicloalquilo C_3-C_6 , alqueno C_2-C_{10} , alquino C_2-C_{10} , arilo C_6-C_{12} , un heteroarilo de 5 a 9 eslabones que tiene de 1 a 4 átomos del anillo elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre; un grupo heterocíclico de 4 a 9 eslabones que tiene de 1 a 3 heteroátomos elegidos entre nitrógeno, oxígeno y $-S(O)_n$, en el que n es un número de 0 a 2; hidroxilo, alcoxi C_1-C_{10} , O-arilo C_6-C_{12} , un O-heteroarilo de 5 a 9 eslabones que tiene de 1 a 4 átomos de anillo elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre; mercapto, S-alquilo C_1-C_{10} , S-cicloalquilo C_3-C_6 , S-arilo C_6-C_{12} , un S-heteroarilo de 5 a 9 eslabones que tiene de 1 a 4 átomos de anillo elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre; $-S(=O)-R''$, $-S(=O)_2R''$, $-S(=O)_2NR^{13}R^{14}$, $-NR^{13}S(=O)_2R^{14}$, $-NH-S(=O)_2CX_3$, en el que X es halógeno; $-C(=O)-R''$, $-C(=O)O-R''$, $-O(=O)R''$, $-C(=O)NR^{13}R^{14}$, $R^{14}C(=O)NR^{13}$, ciano, nitro, halógeno, $-OC(=O)NR^{13}R^{14}$, $R^{14}OC(=O)NR^{13}$, $-OC(=S)NR^{13}R^{14}$, $R^{14}OC(=S)NR^{13}$, amino y $-NR^{11}R^{12}$, en el que R^{11} y R^{12} se elige con independencia entre sí entre el grupo formado por hidrógeno, alquilo C_1-C_{10} , cicloalquilo C_3-C_6 , arilo C_6-C_{12} , $-C(=O)-R''$, $-C(=O)CH_3$, $-S(=O)_2R''$ y $CF_3CS(=O)_2$ o bien R^{11} y R^{12} junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo heterocíclico de cinco o seis eslabones;

R^7 es hidrógeno;

R^4 es hidrógeno o halógeno;

$R^{1'}$ es hidrógeno o metilo;

R^8 y R^{10} con independencia entre sí son alquilo C_1-C_4 sin sustituir;

R^9 es hidrógeno, alquilo C_1-C_4 sustituido por $-C(=O)O-R''$ o $-C(=O)NHR^{12}$, en el que R^{12} es alquilo C_1-C_4 sustituido por amino o heterocíclico, ya definido antes, y opcionalmente sustituido por hidroxilo;

$R^{3'}$ y $R^{4'}$ con alquilo C_1-C_4 opcionalmente sustituido por hidroxilo; o

$R^{3'}$ y $R^{4'}$ junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo elegido entre el grupo formado por el pirrolidin-1-ilo, 2-(S)-hidroximetilpirrolidin-1-ilo, 2-(S)-carboxi-pirrolidin-1-ilo, piperazin-1-ilo y 4-metilpiperazin-1-ilo; con la condición de que cuando $R^{1'}$ es hidrógeno, entonces $R^{3'}$ y $R^{4'}$ junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos no formen un anillo de pirrolidin-1-ilo; o bien

$R^{3'}$ y $R^{4'}$ junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo heteroarilo, elegido entre el grupo formado por el pirrol-1-ilo, piridin-1-ilo, oxazol-3-ilo, isoxazol-2-ilo, pirazin-1-ilo, piridazin-1-ilo, quinolin-1-ilo e imidazol-1-ilo; o

una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

y en la que:

alquilo C_1-C_{10} puede estar sustituido o sin sustituir, y cuando está sustituido el o los grupos sustituyentes son uno o varios grupos elegidos individualmente entre cicloalquilo C_3-C_6 , arilo C_6-C_{12} , un heteroarilo de 5 a 9 eslabones que tiene de 1 a 4 átomos de anillo elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre; un grupo heterocíclico de 4 a 9 eslabones

ES 2 269 416 T3

que tiene de 1 a 3 heteroátomos elegidos entre nitrógeno, oxígeno y -S(O)_n, en el que n es un número de 0 a 2; hidroxilo, alcoxi C₁-C₁₀, O-arilo C₆-C₁₂, un O-heteroarilo de 5 a 9 eslabones que tiene de 1 a 4 átomos de anillo elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre; mercapto, S-alquilo C₁-C₁₀, S-cicloalquilo C₃-C₆, S-arilo C₆-C₁₂, un S-heteroarilo de 5 a 9 eslabones que tiene de 1 a 4 átomos de anillo elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre; ciano, halógeno, -C(=O)-R^{''},
 5 -C(=S)-R^{''}, -C(=O)NR¹³R¹⁴, R¹⁴C(=O)NR¹³-, -OC(=S)NR¹³R¹⁴, R¹⁴OC(=S)NR¹³-, -OC(=S)NR¹³R¹⁴, -C(=O)NR¹³R¹⁴,
 R¹⁴OC(=O)NR¹³-, -C(=O)O-R^{''}, -OC(=O)R^{''}, nitro, sililo, amino, ⁺NR¹⁵R¹⁶NR¹⁷ y -NR¹³R¹⁴;

cicloalquilo C₃-C₆ puede estar sustituido o sin sustituir, y cuando está sustituido el o los grupos sustituyentes son uno o varios grupos elegidos individualmente entre alquilo C₁-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, un heteroarilo de 5 a 9 eslabones que tiene de 1 a 4 átomos de anillo elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre; un grupo heteroalíclico de 4 a 9 eslabones
 10 que tiene de 1 a 3 heteroátomos elegidos entre nitrógeno, oxígeno y -S(O)_n, en el que n es un número de 0 a 2; hidroxilo, alcoxi C₁-C₁₀, ariloxi C₆-C₁₂, mercapto, S-alquilo C₁-C₁₀, S-cicloalquilo C₃-C₆, S-arilo C₆-C₁₂, un S-heteroarilo de 5 a 9 eslabones que tiene de 1 a 4 átomos de anillo elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre; ciano, halógeno, -C(=O)-R^{''},
 15 -C(=S)-R^{''}, -C(=O)O-R^{''}, -OC(=O)R^{''}, -C(=O)NR¹³R¹⁴, R¹⁴OC(=O)NR¹³-, -C(=O)NR¹³R¹⁴, R¹⁴OC(=O)NR¹³-, nitro, amino y -NR¹³R¹⁴;

alquenilo C₂-C₁₀ está opcionalmente sustituido del modo indicado antes para el alquilo C₁-C₁₀;

alquinilo C₂-C₁₀ está opcionalmente sustituido del modo indicado antes para el alquilo C₁-C₁₀;

arilo C₆-C₁₂ puede estar sustituido o sin sustituir, y cuando está sustituido el o los grupos sustituyentes son uno o varios grupos elegidos individualmente entre halógeno, CX₃, alquilo C₁-C₁₀, hidroxilo, alcoxi C₁-C₁₀, ariloxi C₆-C₁₂,
 20 mercapto, S-alquilo C₁-C₁₀, S-cicloalquilo C₃-C₆, S-arilo C₆-C₁₂, un S-heteroarilo de 5 a 9 eslabones que tiene de 1 a 4 átomos de anillo elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre; ciano, nitro, -C(=O)-R^{''}, -C(=S)-R^{''}, -C(=O)O-R^{''},
 25 -OC(=O)R^{''}, -OC(=O)NR¹³R¹⁴, R¹⁴OC(=O)NR¹³-, -OC(=S)NR¹³R¹⁴, R¹⁴OC(=S)NR¹³-, -C(=O)NR¹³R¹⁴, R¹⁴C(=O)NR¹³-,
 -S(=O)-R^{''}, -S(=O)₂R^{''}, amino y -NR¹³R¹⁴;

el heteroarilo puede estar sustituido o sin sustituir, y cuando está sustituido el o los grupos sustituyentes son uno o varios grupos elegidos individualmente entre alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₆, halógeno, CX₃, hidroxilo, alcoxi
 30 C₁-C₁₀, ariloxi C₆-C₁₂, mercapto, S-alquilo C₁-C₁₀, S-cicloalquilo C₃-C₆, S-arilo C₆-C₁₂, un S-heteroarilo de 5 a 9 eslabones que tiene de 1 a 4 átomos de anillo elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre; ciano, nitro, -C(=O)-R^{''},
 -C(=S)-R^{''}, -S(=O)₂NR¹³R¹⁴, -C(=O)O-R^{''}, -OC(=O)R^{''}, -S(=O)-R^{''}, -S(=O)₂R^{''}, OC(=O)NR¹³R¹⁴, R¹⁴OC(=O)NR¹³-,
 -OC(=S)NR¹³R¹⁴, R¹⁴OC(=S)NR¹³-, -C(=O)NR¹³R¹⁴, R¹⁴C(=O)NR¹³-, amino y -NR¹³R¹⁴;

heteroalíclico puede estar sustituido o sin sustituir, y cuando está sustituido el o los grupos sustituyentes son uno o varios grupos elegidos individualmente entre alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₆, halógeno, CX₃, hidroxilo, alcoxi C₁-C₁₀,
 35 ariloxi C₆-C₁₂, mercapto, S-alquilo C₁-C₁₀, S-cicloalquilo C₃-C₆, S-arilo C₆-C₁₂, un S-heteroarilo de 5 a 9 eslabones que tiene de 1 a 4 átomos de anillo elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre; ciano, nitro, -C(=O)-R^{''}, -C(=S)-
 R^{''}, -C(=O)O-R^{''}, -OC(=O)R^{''}, OC(=O)NR¹³R¹⁴, R¹⁴OC(=O)NR¹³-, -OC(=S)NR¹³R¹⁴, R¹⁴OC(=S)NR¹³-, -S(=O)-R^{''},
 40 -S(=O)₂R^{''}, -C(=O)NR¹³R¹⁴, R¹⁴C(=O)NR¹³-, amino y -NR¹³R¹⁴;

R¹³ y R¹⁴ con independencia entre sí se eligen entre el grupo formado por hidrógeno, alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₆, arilo C₆-C₁₂, -C(=O)-R^{''}, -C(=O)CH₃, -S(=O)₂R^{''}, NH₂ y F₃C-S(=O)₂-; o bien R¹³ y R¹⁴ junto con el átomo de
 45 nitrógeno al que están unidos forman un anillo heteroalíclico de cinco o seis eslabones;

R^{''} se elige entre el grupo formado por hidrógeno, alquilo C₁-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₆, arilo C₆-C₁₂, heteroarilo (unido a través de un carbono del anillo) ya definido antes y heteroalíclico (unido a través de un átomo de carbono del anillo), ya definido antes.

50 2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R³, R⁵ y R⁶ son hidrógeno.

3. El compuesto de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que R⁴ es hidrógeno o flúor.

4. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3, en el que R^{1'} es hidrógeno.

55 5. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 4, en el que R⁸ y R¹⁰ son en cada caso metilo.

6. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 5, en el que R⁹ es hidrógeno.

60 7. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 5, en el que R⁹ es 3-carboxipropilo.

8. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 5, en el que R⁹ es (2-dietilaminoetil)-aminocarbonilo, (2-etilaminoetil)aminocarbonilo, 3-(morfolin-4-il)propil-aminocarbonilo o 3-(morfolin-4-il)-2-hidroxi-propilaminocarbonilo.

65 9. El compuesto de la reivindicación 8, en el que R⁹ es (2-dietilaminoetil)aminocarbonilo o 3-(morfolin-4-il)-2-hidroxi-propilaminocarbonilo

ES 2 269 416 T3

10. Una composición farmacéutica que contiene un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptables y el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 9.

5 11. El uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 9 para la fabricación de un medicamento destinado a tratar una enfermedad susceptible de tratamiento mediante la administración de un inhibidor de proteína-quinasa.

10 12. El uso de la reivindicación 11, en el que la enfermedad se elige entre el grupo formado por el cáncer, los trastornos de proliferación de vasos sanguíneos, los trastornos fibróticos, los trastornos de proliferación de células mesangiales, los trastornos metabólicos y las enfermedades infecciosas.

13. El uso de la reivindicación 12, en el que el cáncer se elige entre el grupo formado por el cáncer colorrectal, el sarcoma de Kaposi y el cáncer de pulmón.

15 14. El uso de la reivindicación 12, en el que el trastorno de proliferación de vasos sanguíneos se elige entre el grupo formado por la artritis y la restenosis.

20 15. El uso de la reivindicación 12, en el que el trastorno fibrótico se elige entre el grupo formado por la cirrosis hepática y la aterosclerosis.

16. El uso de la reivindicación 12, en el que el trastorno de proliferación de células mesangiales se elige entre el grupo formado por la glomerulonefritis, la nefropatía diabética, la nefrosclerosis maligna, los síndromes de microangiopatía trombótica, el rechazo del trasplante y las glomerulopatías.

25 17. El uso de la reivindicación 12, en el que el trastorno metabólico se elige entre el grupo formado por la psoriasis, la diabetes mellitus, la curación de heridas, la inflamación y las enfermedades neurodegenerativas.

30

35

40

45

50

55

60

65