

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 384**

51 Int. Cl.:

C07C 311/08 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2009 E 09744082 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2012 EP 2346818**

54 Título: **Sulfonamido fenoxibenzamidas sustituidas**

30 Prioridad:

10.11.2008 EP 08168724

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

01.04.2013

73 Titular/es:

**BAYER SCHERING PHARMA AG (100.0%)
Alfred-Nobel-Strasse 10
40789 Monheim , DT**

72 Inventor/es:

**HARTUNG, INGO;
HITCHCOCK, MARION;
PÜHLER, FLORIAN;
SIEMEISTER, GERHARD y
NEUHAUS, ROLAND**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 399 384 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

Sulfonamido fenoxibenzamidas sustituidas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a compuestos de sulfonamido fenoxibenzamida sustituidos de fórmula general (I) como se describe y define aquí, a métodos para preparar dichos compuestos, a composiciones farmacéuticas y combinaciones que comprenden dichos compuestos, y al uso de dichos compuestos para fabricar una composición farmacéutica para el tratamiento o profilaxis de una enfermedad, en particular de un trastorno hiperproliferativo y/o de angiogénesis, como único agente o en combinación con otros ingredientes activos.

Antecedentes de la invención

10 El cáncer es una enfermedad que resulta de un crecimiento anormal de tejido. Ciertos cánceres tienen el potencial para invadir tejidos locales y metastatizarse también a distintos órganos. Esta enfermedad se puede desarrollar en una amplia variedad de diferentes órganos, tejidos, y tipos celulares. Por lo tanto, el término "cáncer" se refiere a una colección de alrededor un millar de enfermedades diferentes.

15 Alrededor de 4,4 millones de personas en el mundo han sido diagnosticadas con cáncer de mama, de colon, ovárico, de pulmón, o de próstata en 2002, y alrededor de 2,5 millones de personas murieron por estas enfermedades devastadoras (Informe Globocan 2002). Sólo en los Estados Unidos de América, en el año 2005 se predijeron alrededor de 1,25 millones de nuevos casos y alrededor de 500.000 muertes por cáncer. Se esperaba que la mayoría de estos nuevos casos fuesen cánceres de colon (~100.000), de pulmón (~170.000), de mama (~210.000) y de próstata (~230.000). Se predice que tanto la incidencia como la prevalencia de cáncer aumentará en
20 aproximadamente 15% a lo largo de los próximos diez años, reflejando una tasa media de crecimiento de 1,4% [1].

25 Las pruebas acumuladas sugieren que el cáncer se puede imaginar como una "enfermedad de señalización", en la que las alteraciones en el genoma celular que afectan a la expresión y/o función de oncogenes y genes supresores de tumores afectarían en última instancia a la transmisión de señales que normalmente regulan el crecimiento celular, la diferenciación y la muerte celular programada (apoptosis). El desenmarañamiento de las rutas de señalización que están desreguladas en cánceres humanos ha dado como resultado el diseño de un número creciente de agentes terapéuticos basados en mecanismos [2]. La inhibición de la transducción de señales como estrategia terapéutica para cánceres humanos ha encontrado recientemente un notable éxito, como se ejemplifica mediante el desarrollo de Gleevec para el tratamiento de leucemia mieloide crónica (CML) y tumores estrómicos gastrointestinales (GIST), presagiando una nueva era de terapias "dirigidas molecularmente" [3-5].

30 El módulo de proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) es un punto clave de integración a lo largo de la cascada de transducción de señales que enlaza diversos estímulos celulares a la proliferación, diferenciación y supervivencia. Los estudios científicos a lo largo de los últimos veinte años han conducido a una disección molecular bastante detallada de esta ruta, que ahora ha crecido para incluir cinco subfamilias de MAPK diferentes [cinasas extracelulares reguladas por señales ERK-1/2, cinasas c-Jun-N-terminales (JNKs), p38 cinasas, ERK-3/4, y ERK-5],
35 con distintos rasgos moleculares y funcionales [6-8]. Aunque ciertas subfamilias, tales como la familia p38, se están convirtiendo en dianas terapéuticas en enfermedades inflamatorias y degenerativas, la cascada de MAPK que transcurre de Ras a ERK-1/2 (la principal ruta mitogénica iniciada por factores de crecimiento de péptidos) está comenzando a surgir como una diana principal para la terapia molecular de diferentes tipos de cánceres humanos [9-11]. La ruta de MAPK es activada anormalmente en muchos tumores humanos como resultado de cambios genéticos y epigenéticos, dando como resultado una mayor proliferación y resistencia a estímulos apoptóticos. En particular, se encuentran formas oncogénicas mutadas de Ras en el 50% de los cánceres de colon y >90% de los cánceres pancreáticos [12]. Recientemente, se han encontrado mutaciones de BRAF en >60% de melanoma maligno [13]. Estas mutaciones dan como resultado una ruta de MAPK constitutivamente activada.

45 La naturaleza modular de la cascada de Raf/MEK/ERK se hace menos pleiotrópica en el punto de cruzamiento que está regulado por MEK [14]. No se han identificado sustratos para MEK distintos de ERK-1/2. ERK fosforilada es el producto de la actividad de MEK, y de este modo su detección en células cancerosas y en tejidos tumorales proporciona una medida directa de la inhibición de MEK. La selectividad de MEK por ERK1/2, acoplada con la disponibilidad de anticuerpos específicos para la forma dualmente fosforilada y activada de ERK, hace a MEK una diana atractiva para el desarrollo de fármacos contra el cáncer.

50 Los inhibidores de MEK de primera generación, PD98059 [15] y U0126 [16], no parecen competir con ATP, y de este modo es probable que tengan sitios de unión distintos en MEK; estos compuestos se han usado ampliamente en sistemas modelo in vitro e in vivo para atribuir actividades biológicas a ERK1/2. Un inhibidor de MEK1/2 de segunda generación, PD184352 (ahora denominado CI-1040), tiene una IC₅₀ en el intervalo nanomolar bajo, mejor biodisponibilidad, y parece que también funciona vía un mecanismo alostérico, no competitivo con ATP [17]. Se ha
55 demostrado que el tratamiento oral con CI-1040 inhibe el crecimiento de cáncer de colon in vivo en modelos de ratón [18], y este compuesto se evaluó en ensayos clínicos de fase I/II en seres humanos, en los que eventualmente fracasó debido a la eficacia insuficiente [19]. Los inhibidores de MEK alostéricos han entrado recientemente en la fase clínica, pero se encontró que tienen limitaciones tales como malos perfiles de exposición y/o problemas de

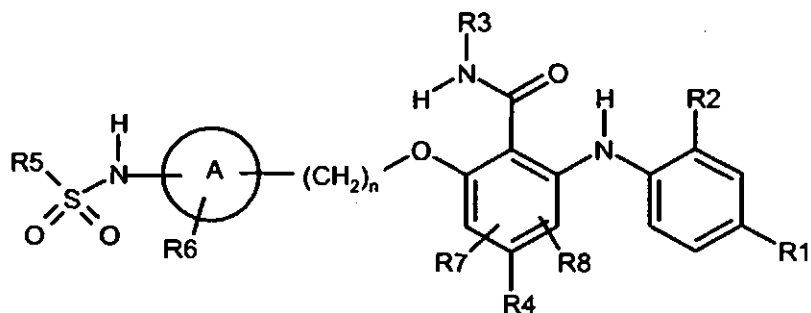
toxicidad. Se han descrito inhibidores de MEK de tipo pequeñas moléculas, incluyendo en las Publicaciones de Patentes US n^{os} 2003/0232869, 2004/0116710, 2003/0216420, y en las Solicitudes de Patentes US n^{os} 10/654.580 y 10/929.295. Ha aparecido un número de solicitudes de patentes adicionales en los últimos años recientes, incluyendo las patentes US 5.525.6625; WO 98/43960; WO 99/01421; WO 99/01426; WO 00/41505; WO 00/41994; WO 00/42002; WO 00/42003; WO 00/42022; WO 00/42029; WO 00/68201; WO 01 /68619; WO 02/06213; WO 03/077914; WO 03/077855; WO 04/083167; WO 05/0281126; WO 05/051301; WO 05/121142; WO 06/114466; WO 98/37881; WO 00/35435; WO 00/35436; WO 00/40235; WO 00/40237; WO 01/05390; WO 01/05391; WO 01/05392; WO 01/05393; WO 03/062189; WO 03/062191; WO 04/056789; WO 05/000818; WO 05/007616; WO 05/009975; WO 05/051300; WO05/051302; WO 05/028426; WO 06/056427; WO 03/035626; y WO 06/029862.

A pesar de los avances en la técnica, todavía existe la necesidad de tratamientos contra el cáncer y de compuestos contra el cáncer. Más específicamente, todavía existe la necesidad de inhibidores de MEK estructuralmente nuevos con un perfil equilibrado de potencia-propiedades. Sería especialmente deseable identificar nuevos inhibidores de MEK que incorporen motivos estructurales que no se han ejemplificado previamente como compatibles con la inhibición potente de MEK. Sería especialmente favorable si estos motivos estructurales permitiesen además la mejora de la potencia de MEK y/o la modulación de las propiedades de los compuestos (incluyendo propiedades fisicoquímicas, farmacodinámicas y farmacocinéticas).

Nada de lo descrito o citado de la técnica anterior *más arriba* describe los compuestos de amido fenoxibenzamida sustituidos de fórmula general (I) de la presente invención como se describen y definen aquí, y como se denominan en lo sucesivo como "compuestos de la presente invención", o su actividad farmacológica. Ahora se ha encontrado sorprendentemente, y esto constituye la base de la presente invención, que dichos compuestos de la presente invención, que poseen un resto amido fenoxibenzamida sustituido, tienen propiedades inesperadas y ventajosas; en particular, dichos compuestos son inhibidores potentes y selectivos de MEK. Dichos compuestos de la presente invención inhiben la activación de la ruta de MEK-ERK, y muestran actividad antiproliferativa frente a células cancerosas. Los compuestos y composiciones descritos aquí, incluyendo sales, metabolitos, solvatos, solvatos de sales, hidratos, profármacos tales como ésteres, polimorfos, y formas estereoisómeras de los mismos, muestran actividad antiproliferativa, y de este modo son útiles para prevenir o tratar las enfermedades o trastornos asociados con hiperproliferación como se describe aquí.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere así a compuestos de fórmula general (I):



(I)

en la que:

R_1 se selecciona del grupo que comprende, preferiblemente que consiste en, halógeno o $-C\equiv C-H$;

R_2 es hidrógeno, halógeno o alquilo;

en la que al menos uno de R_1 y R_2 es halógeno;

R_3 es hidrógeno o alquilo;

R_4 se selecciona del grupo que comprende, preferiblemente que consiste en, halógeno y ciano;

R_5 es alquilo de C2-C6;

R6 se selecciona del grupo que comprende, preferiblemente que consiste en, hidrógeno, halógeno, ciano, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino;

R7 y R8, independientemente entre sí, son hidrógeno, halógeno o alquilo;

A se selecciona del grupo que comprende, preferiblemente que consiste en, arilo y heteroarilo;

5 n es un número entero de 0 a 2.

Según una realización particular, la presente invención se refiere a compuestos de fórmula general (I), *más arriba*, en la que:

R1 es halógeno;

R2 es halógeno;

10 R3 es hidrógeno;

R4 se selecciona del grupo que comprende, preferiblemente que consiste en, halógeno y ciano;

R5 es alquilo de C2-C6;

R6 se selecciona del grupo que comprende, preferiblemente que consiste en, hidrógeno, halógeno, ciano, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino;

15 R7 y R8, independientemente entre sí, son hidrógeno o halógeno;

A se selecciona del grupo que comprende, preferiblemente que consiste en, arilo y heteroarilo;

n es un número entero de 0 a 1.

Según otra realización particular, la presente invención se refiere a compuestos de fórmula general (I), *más arriba*, en la que:

20 R1 es halógeno;

R2 es halógeno;

R3 es hidrógeno;

R4 es halógeno;

R5 es alquilo de C2-C6;

25 R6 es hidrógeno;

R7 y R8 son hidrógeno;

A es fenilo o piridilo;

n es un número entero de 0 a 1.

30 Todavía más particularmente, la presente invención abarca compuestos de fórmula general (I) que se describen en la sección de Ejemplos de este texto, *más abajo*.

Definiciones

El término "alcoxi" representa un grupo alquilo como se define aquí unido vía un enlace de oxígeno al resto de la molécula. Los ejemplos representativos de esos grupos son metoxi y etoxi.

35 El término "alquilo" se refiere a un radical de cadena hidrocarbonada lineal o ramificado que consiste solamente en átomos de carbono e hidrógeno, que contiene solamente átomos de carbono e hidrógeno, que no contiene insaturación, que tiene de uno a ocho átomos de carbono, y que está unido al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, tal como ilustrativamente metilo, etilo, n-propilo, 1-metiletilo (isopropilo), n-butilo, n-pentilo, y 1,1-dimetiletilo (t-butilo).

40 El término "alquilamino" se entiende que significa preferiblemente un grupo alquilamino, es decir, por ejemplo, metilamino, etilamino, propilamino, iso-propilamino, terc-butilamino.

El término "arilo" se refiere a radicales aromáticos que tienen en el intervalo de 6 hasta 14 átomos de carbono, tales como fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, bifenilo, siendo preferiblemente fenilo.

El término “cicloalquilo” representa un sistema anular no aromático mono- o multicíclico de alrededor de 3 a 12 átomos de carbono, tal como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, y ejemplos de grupos cicloalquilo multicíclicos incluyen grupos perhidronaftilo, adamantilo y norbornilo formando puente con un grupo cíclico o grupos espirobicíclicos, por ejemplo espiro (4,4) non-2-ilo.

5 El término “dialquilamino” se entiende que significa preferiblemente un grupo (alquil)₂amino, es decir, por ejemplo, dimetilamino, dietilamino, etilmetilamino, dietilamino.

El término “halógeno” se refiere a radicales de flúor, cloro, bromo y yodo.

10 Como se usa aquí, el término “heteroarilo” se entiende que significa un sistema anular aromático que comprende 5-14 átomos anulares, preferiblemente 5 ó 6 átomos, y que contiene al menos un heteroátomo que puede ser idéntico o diferente, siendo dicho heteroátomo tal como nitrógeno, NH, N-alquilo, oxígeno o azufre, y puede ser monocíclico o bicíclico. Preferiblemente, el heteroarilo se selecciona de tienilo, furanilo, pirrolilo, oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, isoxazolilo, isotiazolilo, oxadiazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, etc., y sus benzoderivados, tales como, por ejemplo, benzofuranilo, benzotienilo, benzoxazolilo, bencimidazolilo, benzotriazolilo, indazolilo, indolilo, isoindolilo, etc.; o piridilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo, etc., y sus benzoderivados, tales como, por ejemplo, quinolinilo, isoquinolinilo, etc.; siendo preferiblemente indazolilo y piridilo.

15 Como se usa aquí, el término “C₂-C₆” se entiende que significa un grupo alquilo que tiene un número finito de átomos de carbono de 2 a 6, es decir, 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono. Se ha de entender además que dicho término “C₂-C₆” se ha de interpretar como cualquier subintervalo comprendido en él, por ejemplo C₂-C₆, C₂-C₅, C₃-C₄, C₂-C₃; preferiblemente C₂-C₃, C₂-C₄, C₂-C₅, C₂-C₆; más preferiblemente C₂-C₄.

20 Cuando se usa la forma en plural de la palabra compuestos, sales, polimorfos, hidratos, solvatos y similares, se toma para significar también un único compuesto, sal, polimorfo, isómero, hidrato, solvato o similar.

25 Los compuestos de esta invención pueden contener uno o más centros asimétricos, dependiendo de la localización y naturaleza de los diversos sustituyentes deseados. Los átomos de carbono asimétricos pueden estar presentes en configuración (R) o (S), dando como resultado mezclas racémicas en el caso de un solo centro asimétrico, y mezclas diastereoméricas en el caso de múltiples centros asimétricos. En ciertos casos, también puede estar presente asimetría debido a la rotación limitada alrededor de un enlace dado, por ejemplo el enlace central que une dos anillos aromáticos sustituidos de los compuestos especificados. Los sustituyentes en un anillo también pueden estar presentes en forma cis o trans. Se pretende que todas dichas configuraciones (incluyendo enantiómeros y diastereómeros) estén incluidas en el alcance de la presente invención. Son compuestos preferidos aquellos que producen la actividad biológica más deseable. Los isómeros y estereoisómeros separados, puros o parcialmente purificados, o mezclas racémicas o diastereoméricas, de los compuestos de esta invención también están incluidos en el alcance de la presente invención. La purificación y la separación de tales materiales se puede lograr mediante técnica estándar conocidas en la técnica.

35 Los isómeros ópticos pueden obtenerse mediante la resolución de las mezclas racémicas según procedimientos convencionales, por ejemplo mediante la formación de sales diastereoisoméricas usando un ácido o base ópticamente activo, o la formación de diastereómeros covalentes. Son ejemplos de ácidos apropiados ácido tartárico, diacetiltartárico, ditoluitartárico y canfosulfónico. Las mezclas de diastereoisómeros pueden separarse en sus diastereómeros individuales basándose en sus diferencias físicas y/o químicas mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo mediante cromatografía o cristalización fraccionada. Las bases o ácidos ópticamente activos se liberan entonces de las sales diastereoméricas separadas. Un procedimiento diferente para la separación de isómeros ópticos implica el uso de cromatografía quiral (por ejemplo, columnas de HPLC quiral), con o sin derivatización convencional, elegidas óptimamente para maximizar la separación de los enantiómeros. Las columnas de HPLC quirales adecuadas se fabrican por Diacel, por ejemplo Chiracel OD y Chiracel OJ, entre muchas otras, todas seleccionables rutinariamente. Son también útiles las separaciones enzimáticas, con o sin derivatización. Los compuestos ópticamente activos de esta invención pueden obtenerse igualmente mediante síntesis quirales usando materiales de partida ópticamente activos.

40 La presente invención se refiere también a formas útiles de los compuestos como se dan a conocer en la presente memoria, tales como sales, coprecipitados, metabolitos, hidratos, solvatos y profármacos farmacéuticamente aceptables de todos los compuestos de los ejemplos. La expresión “sal farmacéuticamente aceptable” se refiere a una sal de adición de ácidos inorgánica u orgánica, relativamente no tóxica, de un compuesto de la presente invención. Por ejemplo, véase S. M. Berge, y col. “Pharmaceutical Salts”, J. Pharm. Sci. 1977, 66, 1-19. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas obtenidas haciendo reaccionar el compuesto principal, que funciona como base, con un ácido inorgánico u orgánico para formar una sal, por ejemplo sales de ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido canfosulfónico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido succínico y ácido cítrico. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen también aquellas en las que el compuesto principal funciona como un ácido y se hace reaccionar con una base apropiada para formar, por ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio y colina. Los expertos en la técnica reconocerán además que las sales de adición de ácidos de los compuestos reivindicados pueden prepararse mediante reacción de los compuestos con el ácido inorgánico u orgánico apropiado mediante cualquiera de una serie de procedimientos

conocidos. Como alternativa, las sales de metales alcalinos y alcalino-térreos de compuestos ácidos de la invención se preparan haciendo reaccionar los compuestos de la invención con la base apropiada mediante una variedad de procedimientos conocidos.

5 Las sales representativas de los compuestos de esta invención incluyen las sales no tóxicas convencionales y las sales de amonio cuaternario que se forman, por ejemplo, a partir de ácidos o bases inorgánicos u orgánicos por medios bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, dichas sales de adición de ácidos incluyen acetato, adipato, alginato, ascorbato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, canforato, canfosulfonato, cinamato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hidrocloreto, hidrobromuro, hidroyoduro, 2-hidroxietanosulfonato, itaconato, lactato, maleato, mandelato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, sulfonato, tartrato, tiocianato, tosilato, trifluorometanosulfonato y undecanoato.

15 Las sales de bases incluyen sales de metales alcalinos tales como sales de potasio y sodio, sales de metales alcalino-térreos tales como sales de calcio y magnesio, y sales de amonio con bases orgánicas tales como dicitohexilamina y N-metil-D-glucamina. Adicionalmente, los grupos que contienen nitrógeno básico pueden cuaternizarse con agentes tales como haluros de alquilo inferior tales como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dialquilo como sulfato de dimetilo, dietilo y dibutilo y sulfatos de diamilo, haluros de cadena larga tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo, haluros de aralquilo como bromuros de bencilo y fenetilo y otros.

20 Un solvato, para los fines de esta invención, es un complejo de un disolvente y un compuesto de la invención en estado sólido. Los solvatos ejemplares incluirían, pero no se limitan a, complejos de un compuesto de la invención con etanol o metanol. Los hidratos son una forma específica de solvato, en los que el disolvente es agua.

Composiciones farmacéuticas de los compuestos de esta invención

25 Esta invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen uno o más compuestos de la presente invención. Estas composiciones se pueden utilizar para lograr el efecto farmacológico deseado mediante la administración a un paciente que lo necesite. Para los fines de esta invención, un paciente es un mamífero, incluyendo un ser humano, que necesita tratamiento para la afección o enfermedad particular. Por lo tanto, la presente invención incluye composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto, o sal del mismo, de la presente invención. Un vehículo farmacéuticamente aceptable es preferiblemente un vehículo que es relativamente no tóxico e inofensivo para un paciente a concentraciones consistentes con la actividad eficaz del ingrediente activo, de forma que cualesquiera efectos secundarios atribuibles al vehículo no reduzcan los efectos beneficiosos del ingrediente activo. Una cantidad farmacéuticamente eficaz de compuesto es preferiblemente aquella cantidad que produce un resultado o ejerce una influencia sobre la afección particular que se esté tratando. Los compuestos de la presente invención se pueden administrar con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica, usando cualesquiera formas de dosificación unitaria convencionales eficaces, incluyendo preparaciones de liberación inmediata, lenta y prolongada, oralmente, parenteralmente, tópicamente, nasalmente, oftálmicamente, ópticamente, sublingualmente, rectalmente, vaginalmente, y similar.

40 Para la administración oral, los compuestos se pueden formular en preparaciones sólidas o líquidas tales como cápsulas, pastillas, comprimidos, trociscos, tabletas, fundidos, polvos, disoluciones, suspensiones, o emulsiones, y se pueden preparar según métodos conocidos en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas. Las formas de dosificación unitaria sólidas pueden ser una cápsula que puede ser de tipo gelatina de corteza dura o blanda normal que contiene, por ejemplo, tensioactivos, lubricantes, y cargas inertes tales como lactosa, sacarosa, fosfato de calcio, y almidón de maíz.

45 En otra realización, los compuestos de esta invención se pueden conformar en comprimidos con bases convencionales para comprimidos, tales como lactosa, sacarosa y almidón de maíz, en combinación con aglutinantes tales como goma arábiga, almidón de maíz o gelatina, agentes disgregantes destinados a ayudar a la ruptura y disolución del comprimido tras la administración, tales como almidón de patata, ácido algínico, almidón de maíz, y goma guar, goma de tragacanto, goma arábiga, lubricantes destinados a mejorar la fluidez de la granulación del comprimido y a prevenir la adhesión del material del comprimido a las superficies de las matrices y punzones formadores de los comprimidos, por ejemplo talco, ácido esteárico, o estearato de magnesio, calcio o cinc, tinturas, agentes colorantes, y agentes saborizantes tales como menta piperita, aceite de gaulteria, o sabor a cerezas, destinados a potenciar las cualidades estéticas de los comprimidos y hacerlos más aceptables al paciente. Los excipientes adecuados para uso en formas de dosificación líquida orales incluyen fosfato dicálcico, y diluyentes tales como agua y alcoholes, por ejemplo etanol, alcohol bencílico, y alcoholes polietilénicos, con o sin la adición de un tensioactivo, agente de suspensión o agente emulsionante, farmacéuticamente aceptable. Pueden estar presentes otros diversos materiales como revestimientos, o para modificar la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos, pastillas o cápsulas se pueden revestir con goma laca, azúcar, o ambos.

Los polvos y gránulos dispersables son adecuados para la preparación de una suspensión acuosa. Proporcionan el ingrediente activo en mezcla con un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión y uno o más conservantes. Los agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados están ejemplificados por los ya mencionados anteriormente. También pueden estar presentes excipientes adicionales, por ejemplo aquellos agentes edulcorantes, saborizantes y colorantes descritos anteriormente.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal tal como parafina líquida, o una mezcla de aceites vegetales. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser (1) gomas de origen natural tales como goma arábiga y goma de tragacanto, (2) fosfátidos de origen natural tales como haba de soja y lecitina, (3) ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de sorbitán, (4) productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo monooleato de polioxietilensorbitán. Las emulsiones también pueden contener agentes edulcorantes y saborizantes.

Las suspensiones oleosas se pueden formular suspendiendo el ingrediente activo en un aceite vegetal tal como, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante tal como, por ejemplo, cera de abejas, parafina dura, o alcohol cetílico. Las suspensiones también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo p-hidroxibenzoato de etilo o de n-propilo; uno o más agentes colorantes; uno o más agentes saborizantes; y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

Los jarabes y elixires se pueden formular con agentes edulcorantes tales como, por ejemplo, glicerol, propilenglicol, sorbitol o sacarosa. Tales formulaciones también pueden contener un emoliente, y un conservante, tal como metil y propilparabenos, y agentes saborizantes y colorantes.

Los compuestos de esta invención también se pueden administrar parenteralmente, esto es, subcutánea, intravenosa, intraocular, intrasinoval, intramuscular, o intraperitonealmente, como dosis inyectables del compuesto en preferiblemente un diluyente fisiológicamente aceptable con un vehículo farmacéutico que puede ser un líquido estéril o una mezcla de líquidos tal como agua, disolución salina, disoluciones acuosas de dextrosa y de azúcares relacionados, un alcohol tal como etanol, isopropanol, o alcohol hexadecílico, glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicol, glicerol cetales tales como 2,2-dimetil-1,1-dioxolan-4-metanol, éteres tales como poli(etilenglicol) 400, un aceite, un ácido graso, un éster de ácido graso o un glicérido de ácido graso, o un glicérido de ácido graso acetilado, con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable tal como un jabón o un detergente, agente de suspensión tal como pectina, carbómeros, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, o carboximetilcelulosa, o agente emulsionante y otros adyuvantes farmacéuticos.

Ilustrativo de aceites que se pueden usar en las formulaciones parenterales de esta invención son aquellos de origen del petróleo, animal, vegetal, o sintético, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de haba de soja, aceite de sésamo, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de oliva, vaselina y aceite mineral. Los ácidos grasos adecuados incluyen ácido oleico, ácido esteárico, ácido isoesteárico y ácido mirístico. Los ésteres de ácidos grasos adecuados son, por ejemplo, oleato de etilo y miristato de isopropilo. Los jabones adecuados incluyen sales de metales alcalinos, de amonio y de trietanolamina de ácidos grasos, y los detergentes adecuados incluyen detergentes catiónicos, por ejemplo haluros de dimetilalquilamonio, haluros de alquilpiridinio, y acetatos de alquilamina; detergentes aniónicos, por ejemplo alquil, aril, y olefinsulfonatos, alquilelefina, éter, y sulfatos de monoglicéridos, y sulfosuccinatos; detergentes no iónicos, por ejemplo óxidos grasos de amina, alcanolamidas de ácidos grasos, y copolímeros de poli(oxietileno-oxipropileno) u óxido de etileno u óxido de propileno; y detergentes anfóteros, por ejemplo alquil-beta-aminopropionatos, y sales de 2-alquilimidazolinamonio cuaternario, así como mezclas.

Las composiciones parenterales de esta invención contendrán típicamente de alrededor de 0,5% a alrededor de 25% en peso del ingrediente activo en disolución. También se pueden usar ventajosamente conservantes y tampones. A fin de minimizar o eliminar la irritación en el sitio de inyección, tales composiciones pueden contener un tensioactivo no iónico que tiene un balance hidrófilo-lipófilo (HLB) preferiblemente de alrededor de 12 a alrededor de 17. La cantidad de tensioactivo en tal formulación oscila preferiblemente desde alrededor de 5% hasta alrededor de 15% en peso. El tensioactivo puede ser un único componente que tiene el HLB anterior, o puede ser una mezcla de dos o más componentes que tienen el HLB deseado.

Ilustrativo de tensioactivos usados en formulaciones parenterales son la clase de ésteres de ácidos grasos con polietilensorbitán, por ejemplo monooleato de sorbitán, y los aductos de peso molecular elevado de óxido de etileno con una base hidrófoba, formada por la condensación de óxido de propileno con propilenglicol.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de suspensiones acuosas inyectables estériles. Tales suspensiones se pueden formular según métodos conocidos usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábiga; agentes dispersantes o humectantes que pueden ser un fosfátido de origen natural tal como lecitina, un producto de condensación de un óxido de alquileno con un ácido graso, por ejemplo estearato de polioxietileno, un producto de

condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoxicetanol, un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un hexitol tal como monooleato de polioxietilensorbitol, o un producto de condensación de un óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un anhídrido de hexitol, por ejemplo monooleato de polioxietilensorbitán.

5 La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico. Los diluyentes y disolventes que se pueden emplear son, por ejemplo, agua, disolución de Ringer, disoluciones isotónicas de cloruro sódico y disoluciones isotónicas de glucosa. Además, convencionalmente se emplean como disolventes o medios de suspensión aceites fijos estériles. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite fijo blando, incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, en la
10 preparación de inyectables se pueden usar ácidos grasos tales como ácido oleico.

Una composición de la invención también se puede administrar en forma de supositorios para la administración rectal del fármaco. Estas composiciones se pueden preparar mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperaturas normales pero líquido a la temperatura rectal y que, por lo tanto, se fundirá en el recto para liberar el fármaco. Tales materiales son, por ejemplo, manteca de cacao y polietilenglicol.

15 Otra formulación empleada en los métodos de la presente invención emplea dispositivos de suministro transdérmico ("parches"). Tales parches transdérmicos se pueden usar para proporcionar una infusión continua o discontinua de los compuestos de la presente invención en cantidades controladas. La construcción y uso de parches transdérmicos para el suministro de agentes farmacéuticos es bien conocida en la técnica (véase, por ejemplo, la patente US nº 5.023.252, presentada el 11 de junio de 1991, incorporada aquí como referencia). Tales parches se
20 pueden construir para el suministro continuo, pulsado o según demanda de agentes farmacéuticos.

Las formulaciones de liberación controlada para la administración parenteral incluyen formulaciones liposómicas, formulaciones de microesferas poliméricas y formulaciones de gel polimérico, que son conocidas en la técnica.

Puede ser deseable o necesario introducir la composición farmacéutica al paciente vía un dispositivo de suministro mecánico. La construcción y uso de dispositivos de suministro mecánico para el suministro de agentes farmacéuticos es bien conocida en la técnica. Las técnicas directas para, por ejemplo, administrar directamente un fármaco al cerebro implican habitualmente la colocación de un catéter para el suministro del fármaco en el sistema ventricular del paciente para atravesar la barrera hematoencefálica. En la patente US nº 5.011.472, presentada el 30 de abril de 1991, se describe uno de tales sistemas de suministro implantables, usado para el transporte de agentes a regiones anatómicas específicas del cuerpo.

30 Las composiciones de la invención también pueden contener otros ingredientes formadores de compuestos farmacéuticamente aceptables convencionales, generalmente denominados como vehículos o diluyentes, según se necesiten o se deseen. Se pueden utilizar procedimientos convencionales para preparar tales composiciones en formas de dosificación apropiadas. Tales ingredientes y procedimientos incluyen los descritos en las siguientes referencias, cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia: Powell, M.F. et al, "Compendium of
35 Excipients for Parenteral Formulations" PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 1998, 52(5), 238-311; Strickley, R.G "Parenteral Formulations of Small Molecule Therapeutics Marketed in the United States (1999)-Part-1" PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 1999, 53(6), 324-349; y Nema, S. et al, "Excipients and Their Use in Injectable Products" PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 1997, 51(4), 166-171.

40 Los ingredientes farmacéuticos usados habitualmente que se pueden usar como apropiados para formular la composición para su vía de administración pretendida incluyen:

agentes acidificantes (los ejemplos incluyen pero no se limitan a ácido acético, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido clorhídrico, ácido nítrico);

45 **agentes alcalinizantes** (los ejemplos incluyen pero no se limitan a disolución de amoníaco, carbonato de amonio, dietanolamina, monoetanolamina, hidróxido de potasio, borato de sodio, carbonato de sodio, hidróxido de sodio, trietanolamina, trolamina);

adsorbentes (los ejemplos incluyen pero no se limitan a celulosa en polvo y carbón activado);

propelentes en aerosol (los ejemplos incluyen pero no se limitan a dióxido de carbono, CCl₂F₂, F₂CIC-CCIF₂ y CClF₃);

agentes de desplazamiento del aire (los ejemplos incluyen pero no se limitan a nitrógeno y argón);

50 **conservantes antifúngicos** (los ejemplos incluyen pero no se limitan a ácido benzoico, butilparabeno, etilparabeno, metilparabeno, propilparabeno, benzoato de sodio);

conservantes antimicrobianos (los ejemplos incluyen pero no se limitan a cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol bencílico, cloruro de cetilpiridinio, clorobutanol, fenol, alcohol feniletílico, nitrato fenilmercúrico y timerosal);

- antioxidantes** (los ejemplos incluyen pero no se limitan a ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ácido hipofosforoso, monotioglicerol, galato de propilo, ascorbato de sodio, bisulfito de sodio, sulfoxilato de formaldehído sódico, metabisulfito sódico);
- 5 **materiales aglutinantes** (los ejemplos incluyen pero no se limitan a polímeros de bloques, caucho natural y sintético, poliacrilatos, poliuretanos, siliconas, polisiloxanos, y copolímeros de estireno-butadieno);
- agentes tamponantes** (los ejemplos incluyen pero no se limitan a metafosfato de potasio, fosfato de dipotasio, acetato de sodio, citrato de sodio anhidro y citrato de sodio dihidratado);
- 10 **agentes portadores** (los ejemplos incluyen pero no se limitan a jarabe de goma arábica, jarabe aromático, elixir aromático, jarabe de cereza, jarabe de cacao, jarabe de naranja, jarabe, aceite de maíz, aceite mineral, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, inyección bacteriostática de cloruro sódico y agua bacteriostática para inyección);
- agentes quelantes** (los ejemplos incluyen pero no se limitan a edetato disódico y ácido edético);
- colorantes** (los ejemplos incluyen pero no se limitan a Rojo FD&C nº 3, Rojo FD&C nº 20, Amarillo FD&C nº 6, Azul FD&C nº 2, Verde D&C nº 5, Naranja D&C nº 5, Rojo D&C nº 8, caramelo y rojo de óxido férrico);
- agentes aclaradores** (los ejemplos incluyen pero no se limitan a bentonita);
- 15 **agentes emulsionantes** (los ejemplos incluyen pero no se limitan a goma arábica, cetomacrogol, alcohol cetílico, monoestearato de glicerilo, lecitina, monooleato de sorbitán, monoestearato de polioxietilén 50);
- agentes encapsulantes** (los ejemplos incluyen pero no se limitan a gelatina y acetato-ftalato de celulosa);
- saborizantes** (los ejemplos incluyen pero no se limitan a aceite de anís, aceite de canela, cacao, mentol, aceite de naranja, aceite de menta piperita, y vainillina);
- 20 **humectantes** (los ejemplos incluyen pero no se limitan a glicerol, propilenglicol, y sorbitol);
- agentes levigantes** (los ejemplos incluyen pero no se limitan a aceite mineral y glicerina);
- aceites** (los ejemplos incluyen pero no se limitan a aceite de maní, aceite mineral, aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de sésamo y aceite vegetal);
- 25 **bases para ungüentos** (los ejemplos incluyen pero no se limitan a lanolina, ungüento hidrófilo, ungüento polietilenglicólico, vaselina, vaselina hidrófila, ungüento blanco, ungüento amarillo, y ungüento de agua de rosas);
- potenciadores de la penetración (suministro transdérmico)** (los ejemplos incluyen pero no se limitan a alcoholes monohidroxilados o polihidroxilados, alcoholes mono- o polivalentes, alcoholes grasos saturados o insaturados, ésteres grasos saturados o insaturados, ácidos dicarboxílicos saturados o insaturados, aceites esenciales, derivados fosfatidílicos, cefalina, terpenos, amidas, éteres, cetonas y ureas);
- 30 **plastificantes** (los ejemplos incluyen pero no se limitan a ftalato de dietilo y glicerol);
- disolventes** (los ejemplos incluyen pero no se limitan a etanol, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, glicerol, isopropanol, aceite mineral, ácido oleico, aceite de cacahuete, agua pura, agua para inyección, agua estéril para inyección, y agua estéril para irrigación);
- 35 **agentes que dan rigidez** (los ejemplos incluyen pero no se limitan a alcohol cetílico, cera de ésteres cetílicos, cera microcristalina, parafina, alcohol estearílico, cera blanca y cera amarilla);
- bases para supositorios** (los ejemplos incluyen pero no se limitan a manteca de cacao y polietilenglicoles (mezclas));
- tensioactivos** (los ejemplos incluyen pero no se limitan a cloruro de benzalconio, nonoxinol 10, oxtoxinol 9, polisorbato 80, laurilsulfato de sodio, y monopalmitato de sorbitán);
- 40 **agentes de suspensión** (los ejemplos incluyen pero no se limitan a agar, bentonita, carbómeros, carboximetilcelulosa sódica, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, caolín, metilcelulosa, tragacanto y Veegum);
- agentes edulcorantes** (los ejemplos incluyen pero no se limitan a aspartamo, dextrosa, glicerol, manitol, propilenglicol, sacarina sódica, sorbitol y sacarosa);
- 45 **antiadherentes de comprimidos** (los ejemplos incluyen pero no se limitan a estearato de magnesio y talco);

aglutinantes de comprimidos (los ejemplos incluyen pero no se limitan a goma arábica, ácido algínico, carboximetilcelulosa sódica, azúcar compresible, etilcelulosa, gelatina, glucosa líquida, metilcelulosa, polivinilpirrolidona no reticulada, y almidón pregelatinizado);

5 **diluyentes para comprimidos y cápsulas** (los ejemplos incluyen pero no se limitan a fosfato cálcico dibásico, caolín, lactosa, manitol, celulosa microcristalina, celulosa en polvo, carbonato de calcio precipitado, carbonato de sodio, fosfato de sodio, sorbitol y almidón);

agentes de revestimiento para comprimidos (los ejemplos incluyen pero no se limitan a glucosa líquida, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, acetato-ftalato de celulosa y goma laca);

10 **excipientes para la compresión directa de comprimidos** (los ejemplos incluyen pero no se limitan a fosfato cálcico dibásico);

disgregantes de comprimidos (los ejemplos incluyen pero no se limitan a ácido algínico, carboximetilcelulosa cálcica, celulosa microcristalina, poliacrilina potásica, polivinilpirrolidona reticulada, alginato sódico, glicolato de almidón sódico, y almidón);

15 **deslizantes para comprimidos** (los ejemplos incluyen pero no se limitan a sílice coloidal, almidón de maíz, y talco);

lubricantes para comprimidos (los ejemplos incluyen pero no se limitan a estearato de calcio, estearato de magnesio, aceite mineral, ácido esteárico, y estearato de cinc);

opacificantes de comprimidos/cápsulas (los ejemplos incluyen pero no se limitan a dióxido de titanio);

20 **agentes para dar brillo a los comprimidos** (los ejemplos incluyen pero no se limitan a cera de carnauba y cera blanca);

agentes espesantes (los ejemplos incluyen pero no se limitan a cera de abejas, alcohol cetílico, y parafina);

agentes tonificantes (los ejemplos incluyen pero no se limitan a dextrosa y cloruro de sodio);

25 **agentes que aumentan la viscosidad** (los ejemplos incluyen pero no se limitan a ácido algínico, bentonita, carbómeros, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, alginato de sodio y goma de tragacanto);
y

agentes humectantes (los ejemplos incluyen pero no se limitan a heptadecaetilenoxietanol, lecitinas, monooleato de sorbitol, monooleato de polioxietilensorbitol, y estearato de polioxietileno).

Las composiciones farmacéuticas según la presente invención se pueden ilustrar según lo siguiente:

30 **Disolución IV Estéril:** Una disolución de 5 mg/ml del compuesto deseado de esta invención se puede obtener usando agua inyectable estéril, y el pH se ajusta si es necesario. La disolución se diluye para administración a 1-2 mg/ml con dextrosa estéril al 5%, y se administra como una infusión IV durante alrededor de 60 minutos.

35 **Polvo liofilizado para administración IV:** Una preparación estéril se puede preparar con (i) 100-1000 mg del compuesto deseado de esta invención como un polvo liofilizado, (ii) 32-327 mg/ml de citrato de sodio, y (iii) 300-3000 mg de dextrano 40. La formulación se reconstituye con disolución salina o dextrosa estéril inyectable al 5% hasta una concentración de 10 a 20 mg/ml, que se diluye posteriormente con disolución salina o dextrosa al 5% hasta 0,2-0,4 mg/ml, y se administra como bolo IV o mediante infusión IV durante 15-60 minutos.

Suspensión intramuscular: Se puede preparar la siguiente disolución o suspensión, para inyección intramuscular:

50 mg/ml del compuesto deseado, insoluble en agua, de esta invención

5 mg/ml de carboximetilcelulosa sódica

40 4 mg/ml de TWEEN 80

9 mg/ml de cloruro de sodio

9 mg/ml de alcohol bencílico

45 **Cápsulas de Corteza Dura:** Un gran número de cápsulas unitarias se preparan llenando cápsulas de galantina duras de dos piezas estándar, cada una con 100 mg de ingrediente activo en polvo, 150 mg de lactosa, 50 mg de celulosa y 6 mg de estearato de magnesio.

Cápsulas de Gelatina Blandas: Se prepara una mezcla de ingrediente activo en un aceite digestible tal como aceite de haba de soja, aceite de semilla de algodón o aceite de oliva, y se inyecta por medio de una bomba de

desplazamiento positivo en gelatina fundida para formar cápsulas de gelatina blandas que contienen 100 mg de ingrediente activo. Las cápsulas se lavan y se secan. El ingrediente activo se puede disolver en una mezcla de polietilenglicol, glicerina y sorbitol, para preparar una mezcla medicinal miscible con el agua.

5 **Comprimidos:** Un gran número de comprimidos se preparan mediante procedimientos convencionales de manera que la dosis unitaria sea 100 mg de ingrediente activo, 0,2 mg de dióxido de silicio coloidal, 5 mg de estearato de magnesio, 275 mg de celulosa microcristalina, 11 mg de almidón, y 98,8 mg de lactosa. Para incrementar la palatabilidad, mejorar la elegancia y estabilidad, o retrasar la absorción, se pueden aplicar revestimientos acuosos y no acuosos apropiados.

10 **Comprimidos/Cápsulas de Liberación Inmediata:** Estos son formas de dosificación orales sólidas obtenidas mediante procedimientos convencionales y nuevos. Estas unidades se toman oralmente sin agua para disolución inmediata y suministro de la medicación. El ingrediente activo se mezcla en un líquido que contiene ingrediente tal como azúcar, gelatina, pectina y edulcorantes. Estos líquidos se solidifican en comprimidos o comprimidos oblongos sólidos mediante técnicas de liofilización y de extracción en estado sólido. Los compuestos farmacéuticos se pueden comprimir con azúcares y polímeros viscoelásticos y termoplásticos o con componentes efervescentes para producir matrices porosas destinadas a la liberación inmediata, sin la necesidad de agua.

Método para tratar trastornos hiperproliferativos

20 La presente invención se refiere a un método para usar los compuestos de la presente invención y sus composiciones para tratar trastornos hiperproliferativos en mamíferos. Los compuestos se pueden utilizar para inhibir, bloquear, reducir, disminuir, etc., la proliferación celular y/o la división celular, y/o producir apoptosis. Este método comprende administrar a un mamífero que lo necesite, incluyendo un ser humano, una cantidad de un compuesto de esta invención, o una sal farmacéuticamente aceptable, isómero, polimorfo, metabolito, hidrato, solvato o éster del mismo, etc., que es eficaz para tratar el trastorno. Los trastornos hiperproliferativos incluyen pero no se limitan a, por ejemplo, psoriasis, queloides, y otras hiperplasias que afectan a la piel, hiperplasia de próstata benigna (BPH), tumores sólidos, tales como cánceres de la mama, del aparato respiratorio, del cerebro, de los

25 órganos reproductivos, del tubo digestivo, del aparato urinario, del ojo, del hígado, de la piel, de cabeza y cuello, de la glándula tiroides, de la glándula paratiroides, y sus metástasis distantes. Esos trastornos también incluyen linfomas, sarcomas, y leucemias.

Los ejemplos de cáncer de mama incluyen, pero no se limitan a, carcinoma canalicular invasivo, carcinoma lobulillar invasivo, carcinoma canalicular in situ, y carcinoma lobulillar in situ.

30 Los ejemplos de cánceres del aparato respiratorio incluyen, pero no se limitan a, carcinoma pulmonar microcítico y no microcítico, así como adenoma bronquial y blastoma pleuropulmonar.

Los ejemplos de cánceres cerebrales incluyen, pero no se limitan a, glioma del tronco encefálico e hipofálmico, astrocitoma cerebeloso y cerebral, meduloblastoma, ependimoma, así como tumor neuroectodérmico y pineal.

35 Los tumores de los órganos reproductivos masculinos incluyen, pero no se limitan a, cáncer de próstata y testicular. Los tumores de los órganos reproductivos femeninos incluyen, pero no se limitan a, cáncer endometrial, de cuello uterino, ovárico, vaginal, y vulvar, así como sarcoma del útero.

Los tumores del tubo digestivo incluyen, pero no se limitan a, cánceres anal, de colon, colorrectal, esofágico, de la vesícula biliar, gástrico, pancreático, rectal, del intestino delgado, y de las glándulas salivares.

40 Los tumores del aparato urinario incluyen, pero no se limitan a, cánceres de vejiga, de pene, de riñón, de pelvis renal, de uréter, uretral y renal papilar humano.

Los cánceres oculares incluyen melanoma y retinoblastoma intraocular.

Los cánceres del ojo incluyen, pero no se limitan a, melanoma intraocular y retinoblastoma.

45 Los ejemplos de cánceres hepáticos incluyen, pero no se limitan a, carcinoma hepatocelular (carcinomas de hepatocitos con o sin variante fibrolaminar), colangiocarcinoma (carcinoma de vías biliares intrahepáticas), y colangiocarcinoma hepatocelular mixto.

Los cánceres de piel incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi, melanoma maligno, cáncer de piel de células de Merkel, y cáncer de piel no melanómico.

50 Los cánceres de cabeza y cuello incluyen, pero no se limitan a, cáncer laríngeo, hipofaríngeo, nasofaríngeo, orofaríngeo, cáncer de labios y de la cavidad oral, y célula escamosa. Los linfomas incluyen linfoma relacionado con SIDA, linfoma no de Hodgkin, linfoma de células T cutáneo, linfoma de Burkitt, enfermedad de Hodgkin, y linfoma del sistema nervioso central.

Los sarcomas incluyen, pero no se limitan a, sarcoma del tejido blando, osteosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, linfosarcoma, y rhabdomyosarcoma.

Las leucemias incluyen, pero no se limitan a, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielogenousa crónica, y leucemia de célula pilosa.

Estos trastornos se han caracterizado bien en seres humanos, pero también existen con una etiología similar en otros mamíferos, y se pueden tratar administrando composiciones farmacéuticas de la presente invención.

- 5 El término “tratar” o “tratamiento”, como se señala en este documento, se usa de forma convencional, por ejemplo el manejo y cuidado de un sujeto con el fin de combatir, aliviar, reducir, mitigar, mejorar el estado de, etc., de una enfermedad o trastorno, tal como un carcinoma.

Métodos para tratar trastornos de cinasas

- 10 La presente invención también proporciona métodos para el tratamiento de trastornos asociados con actividad de cinasa extracelular mitogénica aberrante, incluyendo, pero sin limitarse a, apoplejía, insuficiencia cardíaca, hepatomegalia, cardiomegalia, diabetes, enfermedad de Alzheimer, fibrosis cística, síntomas de rechazos de xenoinjertos, choque séptico o asma.

- 15 Se pueden usar cantidades eficaces de los compuestos de la presente invención para tratar tales trastornos, incluyendo aquellas enfermedades (por ejemplo, cáncer) mencionadas en la sección de Antecedentes anterior. No obstante, tales cánceres y otras enfermedades se pueden tratar con compuestos de la presente invención, independientemente del mecanismo de acción y/o la relación entre la cinasa y el trastorno.

- 20 La frase “actividad de cinasa aberrante” o “actividad de tirosina cinasa aberrante” incluye cualquier expresión o actividad anormal del gen que codifica la cinasa, o del polipéptido que codifica. Los ejemplos de tal actividad aberrante incluyen, pero no se limitan a, la sobreexpresión del gen o polipéptido; la amplificación génica; mutaciones que producen actividad de cinasa constitutivamente activa o hiperactiva; mutaciones, supresiones, sustituciones, adiciones génicas, etc.

- 25 La presente invención también proporciona métodos para inhibir una actividad de cinasa, especialmente de cinasa extracelular mitogénica, que comprenden administrar una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención, incluyendo sales, polimorfos, metabolitos, hidratos, solvatos, profármacos (por ejemplo, ésteres) del mismo, y sus formas diastereoisómeras. La actividad de cinasa se puede inhibir en células (por ejemplo, in vitro), o en las células de un sujeto mamífero, especialmente un paciente humano que necesite tratamiento.

Métodos para tratar trastornos angiogénicos

La presente invención también proporciona métodos para tratar trastornos y enfermedades asociados con angiogénesis excesiva y/o anormal.

- 30 La expresión inapropiada y ectópica de angiogénesis puede ser perjudicial para un organismo. Un número de patologías está asociado con el crecimiento de vasos sanguíneos extraños. Estas incluyen, por ejemplo, retinopatía diabética, oclusión isquémica de la vena retiniana, y retinopatía de la premadurez (Aiello et al. *New Engl. J. Med.* 1994, 331, 1480; Peer et al. *Lab. Invest.* 1995, 72, 638), degeneración macular relacionada con la edad (AMD; véase, Lopez et al. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1996, 37, 855), glaucoma neovascular, psoriasis, fibroplasias retrolenticulares, angiofibroma, inflamación, artritis reumatoide (RA), restenosis, restenosis en endoprótesis, restenosis de injerto vascular, etc. Además, el incremento del suministro sanguíneo asociado con tejido canceroso y neoplásico alienta el crecimiento, conduciendo a un agrandamiento rápido del tumor y a metástasis. Además, el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos y linfáticos en un tumor proporciona una ruta de escape para células renegadas, favoreciendo la metástasis y la extensión consiguiente del cáncer. De este modo, los compuestos de la presente invención se pueden utilizar para tratar y/o prevenir cualquiera de los trastornos angiogénicos mencionados anteriormente, por ejemplo inhibiendo y/o reduciendo la formación de vasos sanguíneos; inhibiendo, bloqueando, reduciendo, disminuyendo, etc., la proliferación de células endoteliales u otros tipos implicados en angiogénesis, así como provocando la muerte celular o apoptosis de tales tipos celulares.

Dosis y administración

- 45 Basándose en técnicas estándar de laboratorio conocidas para evaluar compuestos útiles para el tratamiento de trastornos hiperproliferativos y trastornos angiogénicos, mediante pruebas estándar de toxicidad y mediante ensayos farmacológicos estándar para la determinación de tratamiento de las afecciones identificadas anteriormente en mamíferos, y mediante comparación de estos resultados con los resultados de medicamentos conocidos que se usan para tratar estas afecciones, se puede determinar fácilmente la dosis eficaz de los compuestos de esta invención para el tratamiento de cada indicación deseada. La cantidad del ingrediente activo a administrar en el tratamiento de una de estas afecciones puede variar ampliamente según consideraciones tales como el compuesto particular y la unidad de dosificación empleada, el modo de administración, el período de tratamiento, la edad y sexo del paciente tratado, y la naturaleza y grado de la afección tratada.

- 55 La cantidad total del ingrediente activo a administrar oscilará generalmente desde alrededor de 0,001 mg/kg hasta alrededor de 200 mg/kg de peso corporal por día, y preferiblemente desde alrededor de 0,01 mg/kg hasta alrededor

de 20 mg/kg de peso corporal por día. Los calendarios de dosificación clínicamente útiles oscilarán desde una a tres veces una dosis diaria hasta una dosificación de una vez cada cuatro semanas. Además, “los descansos farmacéuticos”, en los que no se dosifica al paciente con un fármaco durante un cierto período de tiempo, pueden ser beneficiosos para el balance global entre el efecto farmacológico y la tolerabilidad. Una dosis unitaria puede contener de alrededor de 0,5 mg a alrededor de 1500 mg de ingrediente activo, y se puede administrar una o más veces por día, o menos de una vez al día. La dosis diaria media para la administración por inyección, incluyendo inyecciones intravenosas, intramusculares, subcutáneas y parenterales, y uso de técnicas de infusión será preferiblemente de 0,01 a 200 mg/kg de peso corporal total. El régimen de dosificación rectal diaria media será preferiblemente de 0,01 a 200 mg/kg de peso corporal total. El régimen de dosificación vaginal diaria media será preferiblemente de 0,01 a 200 mg/kg de peso corporal total. El régimen de dosificación tópica diaria media será preferiblemente de 0,1 a 200 mg/kg, administrada entre una y cuatro veces al día. La concentración transdérmica será preferiblemente aquella requerida para mantener una dosis diaria de 0,01 a 200 mg/kg. El régimen de dosificación por inhalación diaria media será preferiblemente de 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal total.

Por supuesto, el régimen de dosificación inicial y de continuación específico para cada paciente variará según la naturaleza y gravedad de la afección según se determina por el médico, la actividad del compuesto específico empleado, la edad y estado general del paciente, el tiempo de administración, la vía de administración, la velocidad de excreción del fármaco, las combinaciones farmacéuticas, y similares. El modo deseado de tratamiento y el número de dosis de un compuesto de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable o éster o composición del mismo, se pueden averiguar por las personas expertas en la técnica usando ensayos de tratamiento convencionales.

Terapias de combinación

Los compuestos de esta invención se pueden administrar como el único agente farmacéutico, o en combinación con uno o más agentes farmacéuticos adicionales, en el que la combinación no provoca efectos adversos inaceptables. Por ejemplo, los compuestos de esta invención se pueden combinar con agentes antihiperproliferativos conocidos u otros agentes para una indicación, y similares, así como con mezclas y combinaciones de los mismos. Otros agentes de indicación incluyen, pero no se limitan a, agentes antiangiogénicos, inhibidores mitóticos, agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos que intercalan el ADN, inhibidores de factores de crecimiento, inhibidores del ciclo celular, inhibidores de enzimas, inhibidores de topoisomerasas, modificadores de la respuesta biológica, o antihormonas.

El agente farmacéutico adicional puede ser aldesleucina, ácido alendrónico, alfaferona, alitretinoína, alopurinol, aloprim, aloxi, altretamina, aminoglutetimida, amifostina, amrubicina, amsacrina, anastrozol, anzmet, aranesp, arglabina, trióxido de arsénico, aromasina, 5-azacitidina, azatioprina, BCG o tice BCG, bestatina, acetato de betametasona, fosfato sódico de betametasona, bexaroteno, sulfato de bleomicina, broxuridina, bortezomib, busulfán, calcitonina, campath, capecitabina, carboplatino, casodex, cefesona, celmoleucina, cerubidina, clorambucilo, cisplatino, cladribina, cladribina, ácido clodróico, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, DaunoXome, decadron, fosfato de decadron, delestrogen, denileucin diftitox, depomedrol, desloreleina, dexrazoxano, dietilestilbestrol, diflucan, docetaxel, doxifluridina, doxorubicina, dronabinol, DW-166HC, eligard, elitek, ellence, emend, epirubicina, epoetina alfa, epogen, eptaplatino, ergamisol, estrace, estradiol, fosfato sódico de estramustina, etinil estradiol, etiol, ácido etidróico, etopofós, etopósido, fadrozol, farston, filgrastim, finasterida, fligrastim, floxuridina, fluconazol, fludarabina, monofosfato de 5-fluorodesoxiuridina, 5-fluorouracilo (5-FU), fluoximesterona, flutamida, formestano, fosteabina, fotemustina, fulvestrant, gammagard, gemcitabina, gemtuzumab, gleevec, gliadel, goserelina, granisetron HCl, histrelina, hycamtin, hidrocortona, eritro-hidroxiinoniladenina, hidroxiiurea, ibritumomab tiuxetan, idarrubicina, ifosfamida, interferón BETA, interferón-BETA 2, interferón alfa-2A, interferón alfa-2B, interferón alfa-n1, interferón alfa-n3, interferón beta, interferón gamma-1a, interleucina-2, intrón A, iressa, irinotecan, kytril, sulfato de lentinano, letrozol, leucovorina, leuprolida, acetato de leuprolida, levamisol, sal cálcica del ácido levofolínico, levothroid, levoxilo, lomustina, lonidamina, marinol, mecloretamina, mecobalamina, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol, melfalán, menest, 6-mercaptopurina, Mesna, metotrexato, metvix, miltefosina, minociclina, mitomicina C, mitotano, mitoxantrona, Modrenal, Myocet, nedaplatino, neulasta, neumega, neupogen, nilutamida, nolvadex, NSC-631570, OCT-43, octreotida, ondansetrón HCl, orapred, oxaliplatino, paclitaxel, pediapred, pegaspargasa, Pegasys, pentostatina, picibanilo, pilocarpina HCl, pirarrubicina, plicamicina, porfimer sodio, prednimustina, prednisolona, prednisona, premarina, procarbazona, procrit, raltitrexed, rebif, etidronato de renio-186, rituximab, roferon-A, romurtida, salagen, sandostatina, sargramostim, semustina, sizofiran, sobuzoxano, solumedrol, ácido esparfósico, terapia con células madre, estreptozocina, cloruro de estroncio-89, sintroid, tamoxifeno, tamsulosina, tasonermina, tastolactona, taxotere, teceleucina, temozolomida, tenipósido, propionato de testosterona, testred, tioguanina, tiotepa, tiotropina, ácido tiludróico, topotecán, toremifeno, tositumomab, trastuzumab, treosulfan, tretinoína, trexall, trimetilmelamina, trimetrexato, acetato de triptorelina, pamoato de triptorelina, UFT, uridina, valrubicina, vesnarinona, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, virulizina, zinocard, zinostatin stimalamer, zofran, ABI-007, acolbifeno, actimmune, affinitak, aminopterina, arzoxifeno, asoprisnilo, atamestano, atrasentan, sorafenib, avastina, CCI-779, CDC-501, celebex, cetuximab, crisnatol, acetato de ciproterona, decitabina, DN-101, doxorubicina-MTC, dSLIM, dutasterida, edotecarina, eflornitina, exatecan, fenretinida, dihidrocloruro de histamina, implante de hidrogel de histrelina, holmio-166 DOTMP, ácido ibandrónico, interferón gamma, intrón-PEG, ixabepilona, hemocianina de lapa californiana, L-651582, lanreotida, lasfoxifeno, libra, lonafarnib, miproxifeno, minodronato, MS-209, MTP-PE liposomal, MX-6,

5 nafarelina, nemorrubicina, neovastat, nolatrexed, oblimersen, onco-TCS, osidem, poliglutamato de paclitaxel, pamidronato disódico, PN-401, QS-21, quazepam, R-1549, raloxifeno, ranpirnasa, ácido 13-cis-retinoico, satraplatino, seocalcitol, T-138067, tarceva, taxoprexina, timosina alfa 1, tiazofurina, tipifarnib, tirapazamina, TLK-286, toremifeno, TransMID-107R, valsopodar, vaporeotida, vatalanib, verteporfina, vinflunina, Z-100, ácido zoledrónico, o sus combinaciones.

10 Agentes antihiperproliferativos opcionales que se pueden añadir a la composición incluyen pero no se limitan a, compuestos dados a conocer en los regímenes farmacéuticos para la quimioterapia contra el cáncer en la 11ª edición del *Índice Merck*, (1996), que se incorpora aquí como referencia, tal como asparaginasa, bleomicina, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, colaspasa, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina (adriamicina), epirubicina, etopósido, 5-fluorouracilo, hexametilmelamina, hidroxiurea, ifosfamida, irinotecán, leucovorina, lomustina, mecloretamina, 6-mercaptopurina, mesna, metotrexato, mitomicina C, mitoxantrona, prednisolona, prednisona, procarbazona, raloxifeno, estreptozaocina, tamoxifeno, tioguanina, topotecán, vinblastina, vincristina, y vindesina.

15 Otros agentes antihiperproliferativos adecuados para uso con la composición de la invención incluyen, pero no se limitan a, aquellos compuestos que se sabe que se usan en el tratamiento de enfermedades neoplásicas en Goodman y Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Novena Edición), editor Molinoff et al., publ. por McGraw-Hill, páginas 1225-1287, (1996), que se incorpora aquí como referencia, tales como aminoglutetimida, L-asparaginasa, azatioprina, 5-azacitidina, cladribina, busulfano, dietilestilbestrol, 2',2'-difluorodesoxicidina, docetaxel, eritrohidroxinonil adenina, etinilestradiol, 5-fluorodesoxiuridina, monofosfato de 5-fluorodesoxiuridina, fosfato de fludarabina, fluoximesterona, flutamida, caproato de hidroxiprogesterona, idarrubicina, interferón, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol, melfalán, mitotano, paclitaxel, pentostatina, N-fosfonoacetil-L-aspartato (PALA), plicamicina, semustina, tenipósido, propionato de testosterona, tiotepa, trimetilmelamina, uridina, y vinorelbina.

25 Otros agentes antihiperproliferativos adecuados para uso con la composición de la invención incluyen, pero no se limitan a, otros agentes contra el cáncer tales como epotilona y sus derivados, irinotecán, raloxifeno y topotecán.

30 Los compuestos de la invención también se pueden administrar en combinación con compuestos terapéuticos proteicos. Tales compuestos terapéuticos proteicos adecuados para el tratamiento de cáncer u otros trastornos angiogénicos, y para uso con las composiciones de la invención, incluyen, pero no se limitan a, un interferón (por ejemplo, alfa, beta, o gamma), anticuerpos monoclonales supraagonistas, Tuebingen, vacuna de proteína TRP-1, Colostrina, anticuerpo anti-FAP, YH-16, gemtuzumab, infliximab, cetuximab, trastuzumab, denileukin diftotox, rituximab, timosina alfa 1, bevacizumab, mecasermina, mecasermina rinfabato, oprelvekina, natalizumab, rhMBL, MFE-CP1 + ZD-2767-P, ABT-828, inmunotoxina específica de ErbB2, SGN-35, MT-103, rinfabato, AS-1402, B43-genisteína, compuestos radioinmunoterapéuticos a base de L-19, AC-9301, vacuna NY-ESO-1, IMC- 1C11, CT-322, rhCC10, r(m)CRP, MORAb-009, aviscumina, MDX-1307, vacuna Her-2, APC-8024, NGR-hTNF, rhH1.3, IGN-311, Endostatina, volociximab, PRO-1762, lexatumumab, SGN-40, pertuzumab, EMD-273063, proteína de fusión L19-IL-2, PRX-321, CNTO-328, MDX-214, tigapótido, CAT-3888, labetuzumab, lintuzumab unido a radioisótopo que emite partículas alfa, EM-1421, vacuna HyperAcute, tucotuzumab celmoleukina, galiximab, HPV-16-E7, Javelin – cáncer de próstata, Javelin - melanoma, vacuna NY-ESO-1, vacuna EGF, CYT-004-MelQbG10, péptido WT1, oregovomab, ofatumumab, zalutumumab, cintredekina besudotox, WX-G250, Albuferon, aflibercept, denosumab, vacuna, CTP-37, efungumab, o 131I-chTNT-1/B. Los anticuerpos monoclonales útiles como el compuesto terapéutico proteico incluyen, pero no se limitan a, muromonab-CD3, abciximab, edrecolomab, daclizumab, gentuzumab, alemtuzumab, ibritumomab, cetuximab, bevicizumab, efalizumab, adalimumab, omalizumab, muromomab-CD3, rituximab, daclizumab, trastuzumab, palivizumab, basiliximab, e infliximab.

45 Generalmente, el uso de agentes citotóxicos y/o citostáticos en combinación con un compuesto o composición de la presente invención servirá para:

- (1) producir una mejor eficacia en la reducción del crecimiento de un tumor, o incluso eliminar el tumor, en comparación con la administración de cualquier agente solo,
- (2) proporcionar la administración de menores cantidades de los agentes quimioterapéuticos administrados,
- 50 (3) proporcionar un tratamiento quimioterapéutico que es bien tolerado en el paciente con menores complicaciones farmacológicas nocivas que las observadas con quimioterapias con un solo agente y otras terapias combinadas,
- (4) proporcionar un tratamiento para un espectro más amplio de diferentes tipos de cáncer en mamíferos, especialmente seres humanos,
- (5) proporcionar una mayor tasa de respuesta entre pacientes tratados,
- 55 (6) proporcionar un tiempo de supervivencia más prolongado entre los pacientes tratados, en comparación con los tratamientos quimioterapéuticos estándar,

(7) proporcionar un tiempo más largo para la progresión tumoral, y/o

(8) producir resultados de eficacia y tolerabilidad al menos tan buenos como los de los agentes usados solos, en comparación con casos conocidos en los que otras combinaciones de agentes contra el cáncer producen efectos antagónicos.

5 Métodos para sensibilizar células a la radiación

En una realización distinta de la presente invención, un compuesto de la presente invención se puede usar para sensibilizar una célula a la radiación. Esto es, el tratamiento de una célula con un compuesto de la presente invención antes del tratamiento con radiación de la célula hace a la célula más susceptible al daño de ADN y a la muerte celular que si la célula estuviese en ausencia de cualquier tratamiento con un compuesto de la invención. En un aspecto, la célula se trata con al menos un compuesto de la invención.

De este modo, la presente invención también proporciona un método para matar una célula, en el que se administra a una célula uno o más compuestos de la invención en combinación con terapia de radiación convencional.

La presente invención también proporciona un método para hacer a una célula más susceptible a la muerte celular, en el que la célula es tratada con uno o más compuestos de la invención antes del tratamiento de la célula para provocar o inducir la muerte celular. En un aspecto, después de que la célula se trata con uno o más compuestos de la invención, la célula se trata con al menos un compuesto, o al menos un método, o una combinación de los mismos, a fin de provocar daño del ADN con el fin de inhibir la función de la célula normal, o matar la célula.

En una realización, una célula es exterminada tratando la célula con al menos un agente que daña el ADN. Esto es, después de tratar una célula con uno o más compuestos de la invención para sensibilizar la célula a la muerte celular, la célula se trata con al menos un agente que daña el ADN para matar la célula. Los agentes que dañan el ADN, útiles en la presente invención, incluyen, pero no se limitan a, agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, cisplatino), radiación ionizante (rayos X, radiación ultravioleta), agentes carcinogénicos, y agentes mutagénicos.

En otra realización, una célula es exterminada tratando la célula con al menos un método para provocar o inducir daño del ADN. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, la activación de una ruta de señalización celular que da como resultado el daño del ADN cuando se activa la ruta, la inhibición de una ruta de señalización celular que da como resultado el daño del ADN cuando la ruta es inhibida, y la inducción de un cambio bioquímico en una célula, en el que el cambio da como resultado daño del ADN. A título de ejemplo no limitante, se puede medir una ruta de reparación del ADN en una célula, evitando de ese modo la reparación del daño del ADN y dando como resultado una acumulación anormal de daño del ADN en una célula.

En un aspecto de la invención, un compuesto de la invención se administra a una célula antes de la radiación u otra inducción de daño del ADN en la célula. En otro aspecto de la invención, un compuesto de la invención se administra a una célula concomitantemente con la radiación u otra inducción de daño del ADN en la célula. En todavía otro aspecto de la invención, un compuesto de la invención se administra a una célula inmediatamente después de que ha comenzado la radiación u otra inducción de daño del ADN.

En otro aspecto, la célula está in vitro. En otra realización, la célula está in vivo.

Según otro aspecto, la presente invención cubre un método para preparar compuestos de la presente invención, comprendiendo el método las etapas como se describen aquí.

Método o métodos para obtener los compuestos de la invención

Métodos preparativos generales

El procedimiento particular a utilizar en la preparación de los compuestos usados en esta realización de la invención depende del compuesto específico deseado. Factores tales como la selección de los sustituyentes específicos desempeñan un papel en la ruta a seguir en la preparación de los compuestos específicos de esta invención. Esos factores son reconocidos fácilmente por una persona de pericia normal en la técnica.

Los compuestos de la invención se pueden preparar mediante uso de reacciones químicas y procedimientos conocidos. No obstante, los siguientes métodos preparativos generales se presentan para ayudar al lector a sintetizar los compuestos de la presente invención, presentándose más abajo ejemplos particulares más detallados en la sección experimental que describe los ejemplos de trabajo.

Los compuestos de la invención se pueden obtener según métodos químicos convencionales, y/o como se describen más abajo, a partir de materiales de partida que están comercialmente disponibles o producibles según métodos químicos habituales convencionales. Más abajo se dan métodos generales para la preparación de los compuestos, y la preparación de los ejemplos representativos se ilustra específicamente en los ejemplos.

Las transformaciones sintéticas que se pueden emplear en la síntesis de los compuestos de esta invención y en la síntesis de intermedios implicados en la síntesis de los compuestos de esta invención son conocidas por o son

accesibles para una persona experta en la técnica. Las colecciones de transformaciones sintéticas se pueden encontrar en compilaciones, tales como:

- J. March. *Advanced Organic Chemistry*, 4^a ed.; John Wiley: New York (1992)
- R.C. Larock. *Comprehensive Organic Transformations*, 2^a ed.; Wiley-VCH: New York (1999)
- 5 F.A. Carey; R.J. Sundberg. *Advanced Organic Chemistry*, 2^a ed.; Plenum Press: New York (1984)
- T.W. Greene; P.G.M. Wuts. *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3^a ed.; John Wiley: New York (1999)
- L.S. Hegedus. *Transition Metals in the Synthesis of Complex Organic Molecules*, 2^a ed.; University Science Books: Mill Valley, CA (1994)
- L.A. Paquette, Ed. *The Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*; John Wiley: New York (1994)
- 10 A.R. Katritzky; O. Meth-Cohn; C.W. Rees, Eds. *Comprehensive Organic Functional Group Transformations*; Pergamon Press: Oxford, UK (1995)
- G. Wilkinson; F.G. A. Stone; E.W. Abel, Eds. *Comprehensive Organometallic Chemistry*; Pergamon Press: Oxford, UK (1982)
- B.M. Trost; I. Fleming. *Comprehensive Organic Synthesis*; Pergamon Press: Oxford, UK (1991)
- 15 A.R. Katritzky; C.W. Rees Eds. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, Pergamon Press: Oxford, UK (1984)
- A.R. Katritzky; C.W. Rees; E.F.V. Scriven, Eds. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*; Pergamon Press: Oxford, UK (1996)
- C. Hansch; P.G. Sammes; J.B. Taylor, Eds. *Comprehensive Medicinal Chemistry*. Pergamon Press: Oxford, UK (1990).

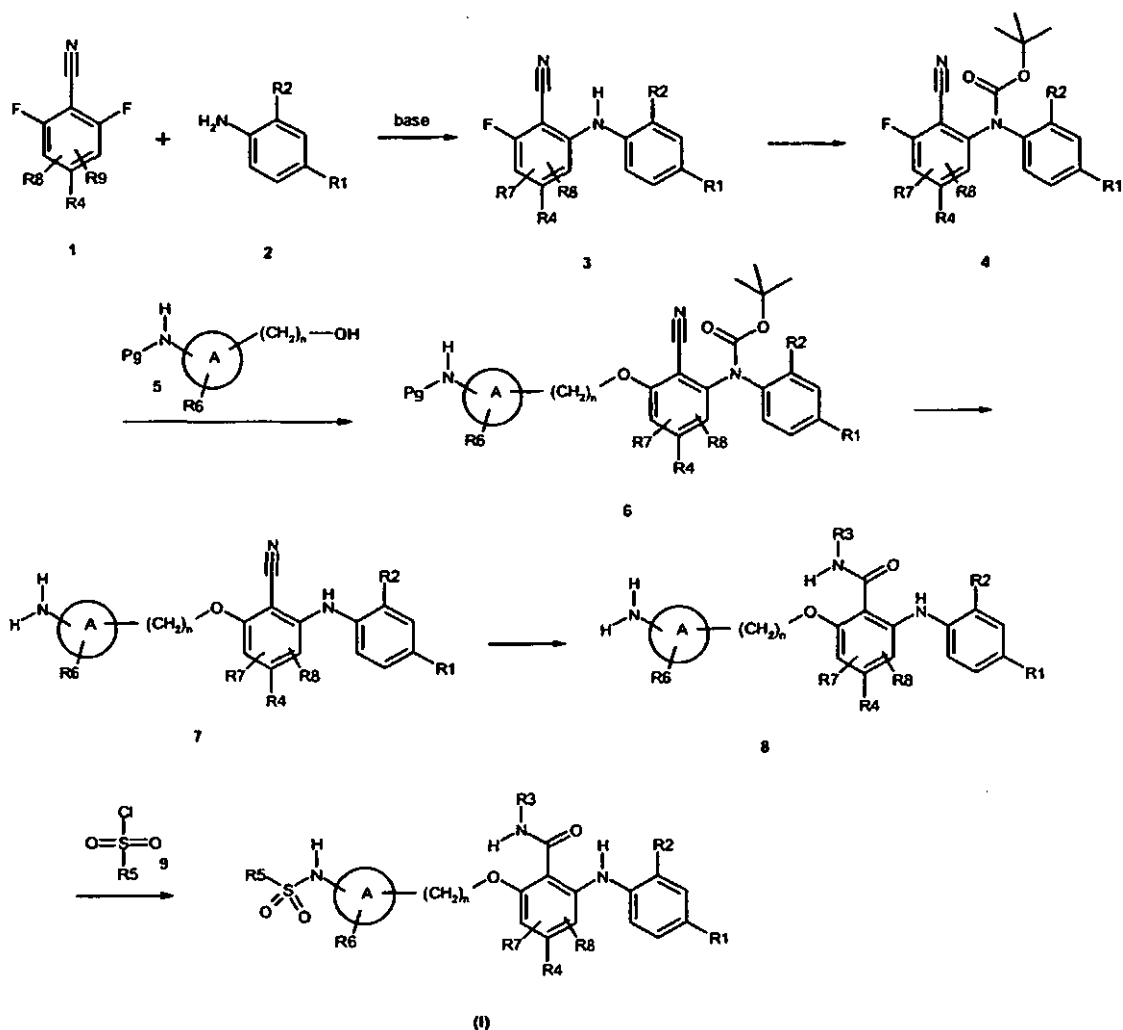
- 20 Además, los repasos recurrentes de metodología sintética y tópicos relacionados incluyen *Organic Reactions*; John Wiley: New York; *Organic Syntheses*; John Wiley: New York; *Reagents for Organic Synthesis*; John Wiley: New York; *The Total Synthesis of Natural Products*; John Wiley: New York; *The Organic Chemistry of Drug Synthesis*; John Wiley: New York; *Annual Reports in Organic Synthesis*; Academic Press: San Diego CA; y *Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl)*; Thieme: Stuttgart, Alemania. Adicionalmente, las bases de datos de las transformaciones sintéticas incluyen *Chemical Abstracts*, que se pueden buscar usando CAS OnLine o SciFinder,
- 25 *Handbuch der Organischen Chemie* (Beilstein) que se puede buscar usando SpotFire, y REACCS.

Esquemas de reacción:

- Los siguientes esquemas ilustran rutas sintéticas generales a los compuestos de fórmula general (I) de la invención, y no pretenden ser limitantes. Se necesita entender que las transformaciones descritas genéricamente en los siguientes párrafos se pueden llevar a cabo a diferentes temperaturas de reacción y en diferentes disolventes, dependiendo, por ejemplo, de la reactividad de los reactivos y sus características de solubilidad respectivas. Más específicamente, ciertas transformaciones pueden requerir el calentamiento en un disolvente de un punto de ebullición adecuado. En casos específicos, el calentamiento de las mezclas de reacción se puede lograr usando un horno de microondas. En ciertos casos, se pueden usar aditivos tales como, por ejemplo, bases, catalizadores de transferencia de fase o líquidos iónicos para modificar las condiciones de reacción para mejorar la conversión de la reacción o las características de calentamiento. Es obvio para la persona experta en la técnica que el orden de las transformaciones como se ejemplifican en los Esquemas 1 a 4 se puede modificar de diversas maneras. El orden de las transformaciones ejemplificadas en los Esquemas 1 a 4 no pretende por lo tanto ser limitante. Además, la interconversión de los sustituyentes, por ejemplo de los restos R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 o R8, se puede lograr antes y/o después de las transformaciones ejemplificadas. Estas modificaciones pueden ser tales como la introducción de grupos protectores, la escisión de grupos protectores, la reducción u oxidación de grupos funcionales, la halogenación, metalación, sustitución u otras reacciones conocidas por la persona experta en la técnica. Estas transformaciones incluyen aquellas que introducen una funcionalidad que permite la interconversión posterior de los sustituyentes. Los grupos protectores adecuados y su introducción y escisión son bien conocidos por la persona experta en la técnica (véase, por ejemplo, T.W. Greene y P.G.M. Wuts en *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3^a edición, Wiley 1999). Algunas transformaciones descritas más abajo pueden dar lugar a mezclas de regioisómeros, por ejemplo las transformaciones ilustradas en el Esquema 1 y 2. La separación de estos regioisómeros se puede lograr mediante diversos métodos, incluyendo, por ejemplo, cromatografía en columna, cristalización o HPLC preparativa.

- 50 El Esquema 1 de Reacción ilustra un método general para la preparación de los compuestos de la presente invención de Fórmula (I).

Esquema 1 de Reacción



Esquema 1 Procedimiento general para la preparación de compuestos de fórmula general (I), en la que R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, n y A son como se definen en la descripción y reivindicaciones de esta invención, y Pg representa un grupo protector adecuado como se describe en los párrafos subsiguientes, tal como, por ejemplo, un grupo terc-butoxicarbonilo.

Un 2,6-difluorobenzonitrilo de Fórmula 1 se hace reaccionar con una anilina de Fórmula 2 en presencia de una base adecuada, tal como, por ejemplo, terc-butóxido de potasio o hexametildisilazuro de litio (LiHMDS), para formar una amina de Fórmula 3. Esta amina se transforma entonces en su derivado terc-butoxicarbonílico (Boc) 4 mediante reacción con Boc₂O en presencia de una base adecuada. Como alternativa, otros grupos protectores adecuados son un grupo benciloxicarbonilo o sus derivados. Los reactivos de grupos protectores apropiados y su introducción son bien conocidos por la persona experta en la técnica (véase, por ejemplo, T.W. Greene y P.G.M. Wuts en *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3ª edición, Wiley 1999). Subsiguientemente, el intermedio 4 se hace reaccionar con un alcohol de Fórmula 5 (que comprende una funcionalidad amínica opcionalmente protegida de forma adecuada para tal transformación con un grupo protector Pg) en presencia de una base adecuada, tal como, por ejemplo, carbonato de cesio, hidruro de sodio o terc-butóxido de potasio, para formar un éter de Fórmula 6. Los grupos protectores adecuados (Pg) para el grupo amínico en los compuestos de Fórmula 5 son, por ejemplo, terc-butoxicarbonilo (Boc), benciloxicarbonilo, acetilo o pivaloilo. El grupo amina en los compuestos de Fórmula 5 se puede proteger como alternativa en forma de una imida ftálica, o en forma de una imina adecuada. Como alternativa, este grupo amina puede estar no protegido, o se puede sustituir por un grupo nitro para la reacción de sustitución, que subsiguientemente se puede reducir a la amina en condiciones de reducción estándar de nitro, tales como, por ejemplo, hidrogenación en presencia de un catalizador de metal de transición adecuado, o reacción con un agente reductor tal como, por ejemplo, SnCl₂, TiCl₃ o Fe.

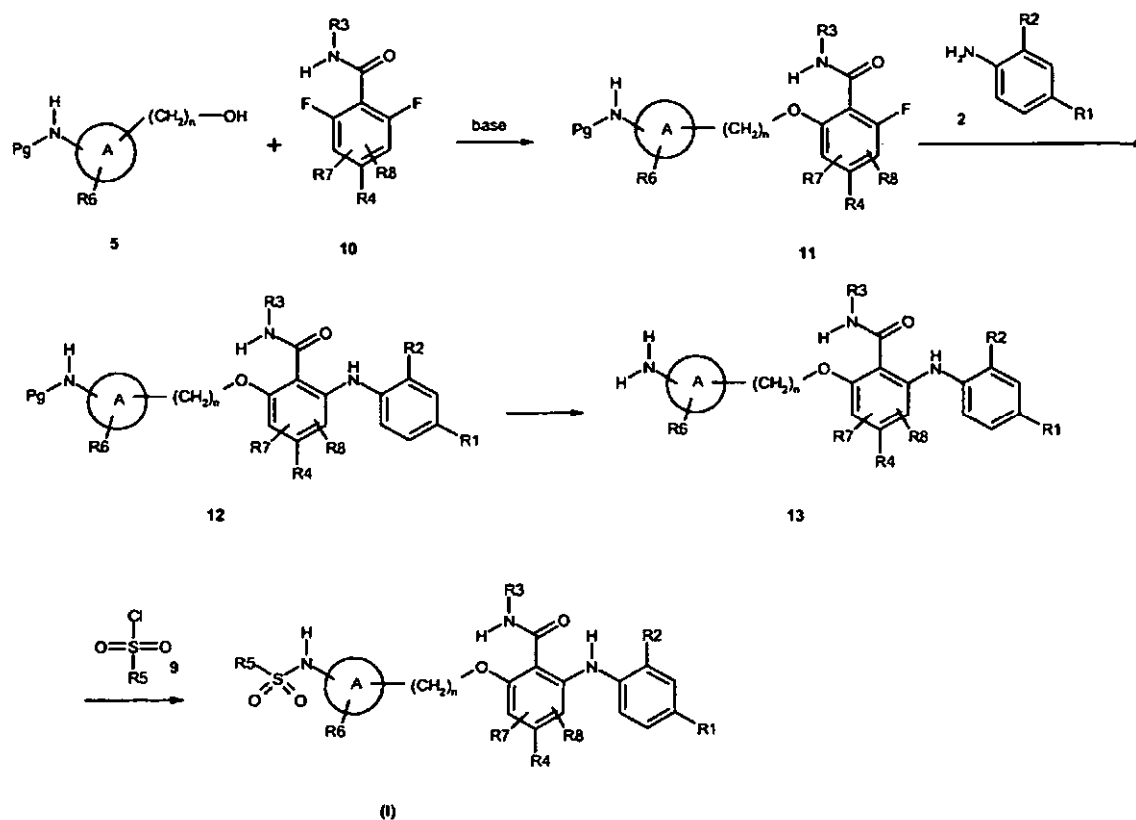
El compuesto 6 se libera entonces de sus grupos protectores de una manera concertada o por etapas usando condiciones estándar como es conocido por la persona experta en la técnica, para formar una amina de Fórmula 7. Estas condiciones estándar incluyen, pero no se limitan a, tratamiento con un ácido, tal como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido trifluoroacético, tratamiento con un ácido de Lewis, tal como, por ejemplo, AlCl₃, o tratamiento con una base, tal como, por ejemplo, hidróxido de sodio, etanolato de sodio, hidróxido de litio, hidrazina o metilhidrazina.

La reducción de un nitrilo de fórmula 7 mediante reacción con, por ejemplo, H_2O_2 en presencia de NaOH, da lugar a amidas de fórmula 8 ($R_3 = H$), que opcionalmente se alquilan subsiguientemente para dar amidas de fórmula 8 con $R_3 \neq H$. Finalmente, el acoplamiento con cloruros de alquilsulfonilo de Fórmula general 9 proporciona los compuestos de la presente invención de Fórmula (I).

5 En una ruta modificada hacia los compuestos de la presente invención, el material de partida 1 puede contener ya un grupo amida adecuado en lugar del grupo nitrilo, permitiendo de ese modo dispensar la etapa de reducción de nitrilo (7 ► 8 en el Esquema 1). Como alternativa adicional, la funcionalidad amídica en el material de partida 1 se puede sustituir por un grupo ácido carboxílico, el cual se transforma entonces en una amida en una transformación subsiguiente mediante reacción con, por ejemplo, amoníaco o una amina apropiadamente sustituida en presencia de agentes de acoplamiento tales como, por ejemplo, carbonildiimidazol (CDI) o T3P. Además, la protección de la posición biarilamínica con, por ejemplo, un grupo terc-butoxicarbonílico puede no ser necesaria, permitiendo de ese modo dispensar la etapa de protección (3 ► 4 en el Esquema 1) y la desprotección subsiguiente.

El Esquema 2 resume una ruta alternativa para la preparación de compuestos de la presente invención de Fórmula (I).

15 Esquema 2 de Reacción



Esquema 2 Procedimiento general adicional para la preparación de compuestos de la Fórmula general (I), en la que R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, n y A son como se definen en la descripción y reivindicaciones de esta invención, y Pg representa un grupo protector adecuado como se describe en los párrafos subsiguientes, tal como, por ejemplo, un grupo terc-butoxicarbonilo.

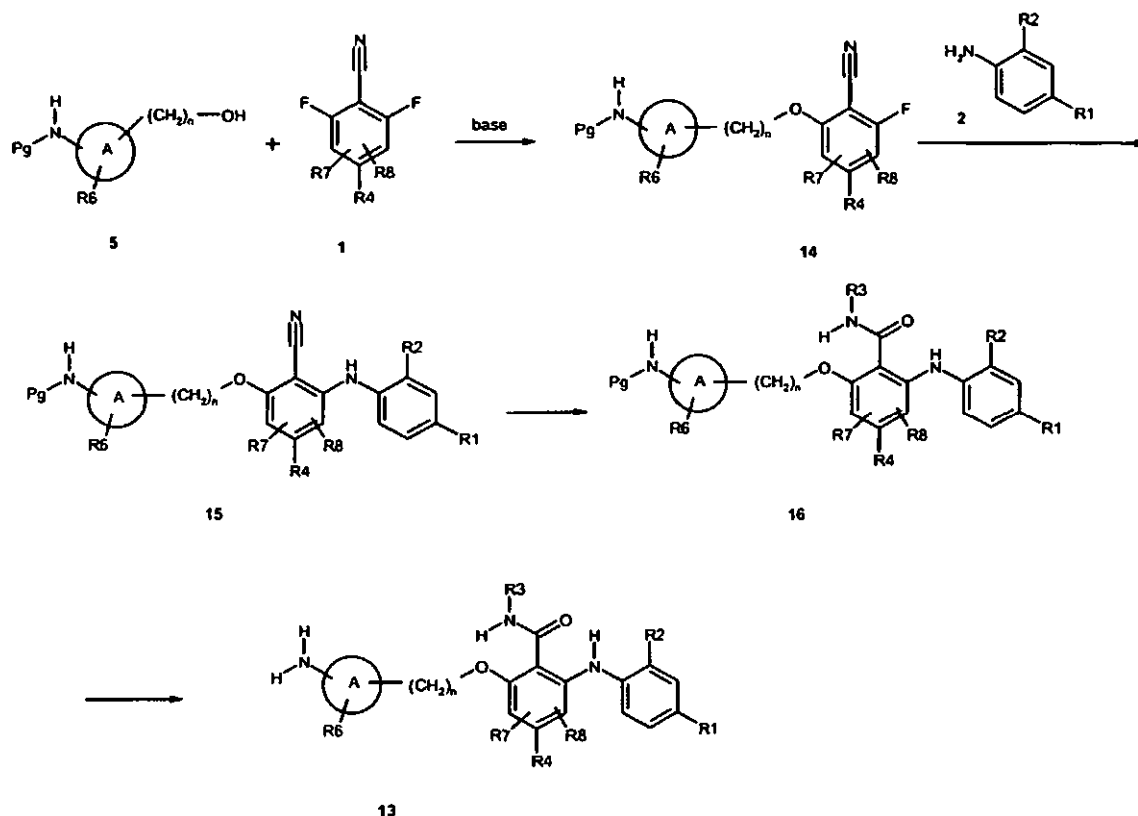
Un derivado 2,6-difluorofenílico de Fórmula 10 se hace reaccionar en presencia de una base adecuada, tal como, por ejemplo, hidruro de sodio, con un alcohol de fórmula 5 (que comprende una funcionalidad amínica adecuadamente protegida con un grupo Pg para tal transformación) para formar un éter de Fórmula 11. Los grupos protectores adecuados para el grupo amina en los compuestos de Fórmula 5 son, por ejemplo, terc-butoxicarbonilo (Boc), benciloxicarbonilo, acetilo o pivaloilo, o alternativas como se describen anteriormente. El éter de Fórmula 11 se hace reaccionar entonces con anilinas de Fórmula 2 en presencia de una base adecuada para dar aminas de fórmula general 12. Subsiguientemente, la eliminación del grupo Pg en condiciones como se describen anteriormente produce compuestos de Fórmula 13, que se transforman entonces en compuestos de la invención de Fórmula (I) como se describe anteriormente.

Como alternativa adicional, la funcionalidad amídica en el material de partida 10 se puede sustituir por un grupo ácido carboxílico, el cual se transforma entonces en una amida en una transformación subsiguiente mediante

reacción con, por ejemplo, amoníaco o una amina apropiadamente sustituida en presencia de agentes de acoplamiento tales como, por ejemplo, carbonildiimidazol (CDI) o T3P.

Como alternativa, la funcionalidad amídica en el material de partida 10 se puede sustituir por un nitrilo, que entonces se transforma en una amida en una transformación subsiguiente en condiciones como se describe anteriormente (véase el Esquema 3).

5



Esquema 3 Otro procedimiento general para la preparación de compuestos de la Fórmula general (I), en la que R1, R2, R3, R4, R5, R7, R8, R9, A y n son como se definen en la descripción y reivindicaciones de esta invención, y Pg representa un grupo protector adecuado como se describe en los párrafos subsiguientes, tal como, por ejemplo, un grupo terc-butoxicarbonilo.

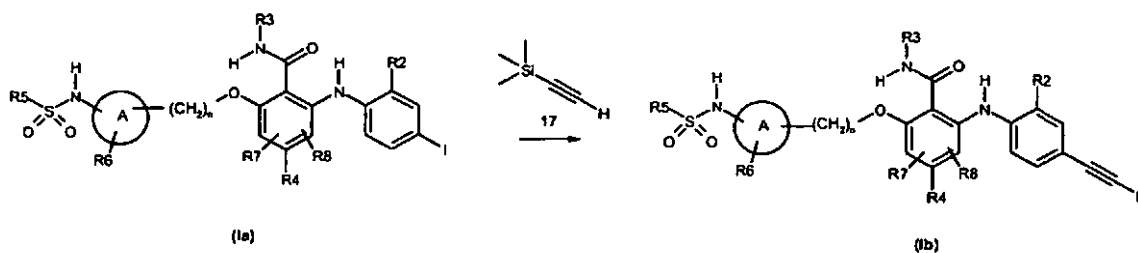
10

La reacción nucleófila de un benzonitrilo de Fórmula 1 con un fenol de fórmula 5 (que posee opcionalmente un grupo protector adecuado Pg como se describe anteriormente) proporciona éteres de fórmula 14. En las condiciones apropiadas, este grupo protector Pg se puede omitir. El desplazamiento nucleófilo subsiguiente con anilinas de Fórmula 2 a biarilaminas de Fórmula 15 es seguido de la hidrólisis del nitrilo a amidas de Fórmula 16 en condiciones como se describen anteriormente. La desprotección conduce a aminas de fórmula 13 que se transforman entonces en compuestos de la presente invención como se describe anteriormente.

15

El Esquema 4 de Reacción ilustra un método general más específico para la preparación de los compuestos de fórmula (Ib) [Fórmula (I) en la que R1 = etinilo]

Esquema 4 de Reacción



20

Esquema 4 Otro procedimiento general para la preparación de compuestos de la Fórmula general (Ib), en la que R2,

R3, R4, R5, R6, R7, R8, n y A son como se definen en la descripción y reivindicaciones de esta invención.

Un intermedio de Fórmula (Ia) [Fórmula (I) en la que R1 = yodo], preparado como se describe en los Esquemas 1 ó 2, se hace reaccionar con trimetilsililacetileno en una reacción de acoplamiento de tipo Sonogashira en presencia de cantidades catalíticas de un catalizador de Pd, tal como, por ejemplo, PdCl₂(PPh₃)₂, y cantidades catalíticas de yoduro de cobre, en presencia de una base adecuada, seguido de la escisión del grupo trimetilsililo mediante reacción con, por ejemplo, fluoruro de tetrabutilamonio o HCl o K₂CO₃/MeOH, para formar el derivado alquínico correspondiente de Fórmula Ib [Fórmula (I) en la que R1 = etinilo]. Como alternativa, usando fluoruro de tetrabutilamonio como base en el acoplamiento de tipo Sonogashira, se puede lograr el acoplamiento de TMS acetileno y la escisión del grupo TMS en una transformación en una cazuela. Los acoplamientos catalizados por metales de transición de haluros de (hetero)arilo con alquinos y trialquilsililalquinos son bien conocidos por la persona experta en la técnica (véanse, por ejemplo, (a) Chinchilla, R.; Najera, C. Chem. Rev. 2007, 107, 874; (b) Negishi, E.-i., Anastasia, L. Chem. Rev. 2003, 103, 1979; véanse también: (c) Eur. J. Org. Chem. 2005, 20, 4256; (d) J. Org. Chem. 2006, 71, 2535 y referencias allí; (e) Chem. Commun. 2004, 17, 1934). En la bibliografía científica se han publicado diversas combinaciones de catalizador de paladio/cocatalizador/ligando/base/disolvente que permiten un ajuste fino de las condiciones de reacción requeridas a fin de permitir un conjunto amplio de grupos funcionales adicionales en ambas parejas de acoplamiento (véanse las referencias en las revisiones citadas anteriormente). Adicionalmente, los procedimientos recientemente desarrollados que emplean, por ejemplo, acetiluros de cinc, sales de alquínil-magnesio o sales de trifluoroborato de alquínilo amplían adicionalmente el alcance de este procedimiento. En lugar del material de partida yodado (Ia), se pueden usar los derivados bromados o clorados correspondientes. La introducción de un grupo acetileno como grupo R1 partiendo del haluro correspondiente empleando las condiciones de Sonogashira descritas se puede lograr como alternativa en compuestos intermedios apropiados (véase el Esquema 1 o el Esquema 2, siendo R1 yodo o bromo para intermedios apropiados).

DETALLES EXPERIMENTALES Y PROCEDIMIENTOS GENERALES

Abreviaturas y acrónimos

En The ACS Style Guide (tercera edición) o en las Guidelines for Authors for the Journal of Organic Chemistry aparece una lista amplia de las abreviaturas usadas por químicos orgánicos de pericia normal en la técnica. Las abreviaturas contenidas en dichas listas, y todas las abreviaturas utilizadas por químicos orgánicos de pericia normal en la técnica, se incorporan aquí como referencia. Para los fines de esta invención, los elementos químicos se identifican según la Tabla Periódica de los Elementos, versión CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 67^a Ed., 1986-87.

Más específicamente, cuando se usan las siguientes abreviaturas en esta descripción, tienen los siguientes significados:

Ac ₂ O	anhídrido acético
ACN	acetonitrilo
AcO (o OAc)	acetato
anhid	anhidro
ac	acuoso
Ar	arilo
atm	atmósfera
ATP	trifosfato de adenosina
b.i.d.	dos veces al día
Biotage	sistema cromatográfico de gel de sílice, Biotage Inc.
Bn	bencilo
bp	punto de ebullición
Bz	benzoilo
BOC	terc-butoxicarbonilo
n-BuOH	n-butanol
t-BuOH	terc-butanol
t-BuOK	terc-butóxido de potasio
calcd	calculado
Cbz	carbobenciloxi
CDI	carbonildiimidazol
CD ₃ OD	metanol- <i>d</i> ₄
Celite [®]	agente filtrante de tierra de diatomeas, Celite Corp.
CI-MS	espectroscopía de masas mediante ionización química
RMN ¹³ C	resonancia magnética nuclear de carbono 13
conc	concentrado

DCC	diciclohexilcarbodiimida
DCE	dicloroetano
DCM	diclorometano
dec	descomposición
DIBAL	hidróxido de diisobutilaluminio
DMAP	4-(<i>N,N</i> -dimetilamino)piridina
DME	1,2-dimetoxietano
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DTT	ditiotreitól
E	entgegen (configuración)
e.g.	por ejemplo
EI	impacto electrónico
ELSD	detector de dispersión de la luz evaporativo
eq	equivalente
ERK	cinasa regulada por señales extracelulares
ESI	ionización mediante electropulverización
ES-MS	espectroscopía de masas mediante electropulverización
et al.	y otros
EtOAc	acetato de etilo
EtOH	etanol (100%)
EtSH	etanotiol
Et ₂ O	éter dietílico
Et ₃ N	triethylamina
GC	cromatografía de gases
GC-MS	cromatografía de gases-espectroscopía de masas
h	hora, horas
RMN ¹ H	resonancia magnética nuclear de protón
HCl	ácido clorhídrico
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etanosulfónico
Hex	hexano
HMPA	hexametilfosforamida
HMPT	triamida hexametilfosfórica
HPLC	cromatografía de líquidos de alto rendimiento
IC ₅₀	concentración de fármaco requerida para la inhibición del 50%
i.e.	es decir
insol	insoluble
IPA	isopropilamina
IR	infrarrojo
J	constante de acoplamiento (espectroscopía de RMN)
LAH	hidruro de litio y aluminio
LC	cromatografía de líquidos
LC-MS	cromatografía de líquidos-espectrometría de masas
LDA	diisopropilamiduro de litio
MAPK	proteína cinasa activada por mitógenos
MeCN	acetonitrilo
MEK	MAPK/ERK cinasa
MHz	megahercios
min	minuto, minutos
μl	microlitro
ml	mililitro
μM	micromolar
mp	punto de fusión
MS	espectro de masas, espectrometría de masas
Ms	metanosulfonilo
<i>m/z</i>	relación masa a carga
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimida
nM	nanomolar

NMM	4-metilmorfolina
obsd	observado
p	página
PBS	disolución salina tamponada con fosfato
pp	páginas
PdCl ₂ dppf	[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio(II)
Pd(OAc) ₂	acetato de paladio
pH	logaritmo negativo de la concentración del ion hidrógeno
pK	logaritmo negativo de la constante de equilibrio
pK _a	logaritmo negativo de la constante de equilibrio para la asociación
PS-DIEA	diisopropiletilamina unidad a poliestireno
q	cuartete (rmn)
qt	quintete (rmn)
R _f	factor de retención (TLC)
RT	tiempo de retención (HPLC)
rt	temperatura ambiente
TBAF	fluoruro de tetra-n-butilamonio
TBST	disolución salina tamponada con tris con tween
TEA	trietilamina
THF	tetrahidrofurano
TFA	ácido trifluoroacético
TFFH	hexafluorofosfato de fluoro- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametilformamidinio
TLC	cromatografía de capa fina
TMAD	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletildiamina
TMSCI	cloruro de trimetilsililo
Ts	p-toluenosulfonilo
v/v	volumen por volumen
p/v	peso por volumen
p/p	peso por peso
Z	zusammen (configuración)

Las formas de los picos de RMN en la siguiente sección experimental se señalan según aparecen en los espectros, y no se han considerado posibles efectos de órdenes superiores. Los nombres químicos se generaron usando AutoNom2000 según se implementa en MDL ISIS Draw. En algunos casos, se usaron los nombres generalmente aceptados de reactivos comercialmente disponibles en lugar de los nombres generados por AutoNom2000. Las reacciones que emplean irradiación de microondas se pueden llevar a cabo con un horno de microondas Biotage Initiator® equipado opcionalmente con una unidad robótica. Se entiende que los tiempos de reacción dados a conocer empleando calentamiento de microondas son tiempos de reacción fijos después de alcanzar la temperatura de reacción indicada. Los compuestos e intermedios producidos según los métodos de la invención pueden requerir purificación. La purificación de compuestos orgánicos es bien conocida para la persona experta en la técnica, y hay varias formas de purificar el mismo compuesto. En algunos casos, puede no ser necesaria ninguna purificación. En algunos casos, los compuestos se pueden purificar mediante cristalización. En algunos casos, las impurezas se pueden agitar usando un disolvente adecuado. En algunos casos, los compuestos se pueden purificar mediante cromatografía, particularmente cromatografía en columna ultrarrápida, usando por ejemplo cartuchos de gel de sílice preempaquetados, por ejemplo de Separtis, tal como gel de sílice Isolute® Flash o gel de sílice Isolute® Flash NH₂, en combinación con un autopurificación Flashmaster II (Argonaut/Biotage) y eluyentes tales como gradientes de hexano/acetato de etilo o DCM/etanol. En algunos casos, los compuestos se pueden purificar mediante HPLC preparativa usando, por ejemplo, un autopurificador Waters equipado con un detector de conjunto de diodos y/o espectrómetro de masas de ionización mediante electropulverización en línea en combinación con una columna de fase inversa preempaquetada adecuada y eluyentes tales como gradientes de agua y acetonitrilo que pueden contener aditivos tales como ácido trifluoroacético o amoniaco acuoso. En algunos casos, los métodos de purificación como se describen anteriormente pueden proporcionar esos compuestos de la presente invención que poseen una funcionalidad suficientemente básica o ácida en forma de una sal, tal como, en el caso de un compuesto de la presente invención que es suficientemente básico, una sal de trifluoroacetato o formiato por ejemplo, o, en el caso de un compuesto de la presente invención que es suficientemente ácido, una sal de amonio por ejemplo. Una sal de este tipo se puede transformar en su forma de base libre o de ácido libre, respectivamente, mediante diversos métodos conocidos por la persona experta en la técnica, o se pueden usar como sales en ensayos biológicos subsiguientes. Se ha de entender que la forma específica (por ejemplo sal, base libre, etc.) de un compuesto de la presente invención según se aísla como se describe aquí no es necesariamente la única forma en la que dicho compuesto se puede aplicar a un ensayo biológico a fin de cuantificar la actividad biológica específica.

Los porcentajes de rendimientos dados en los siguientes ejemplos se basan en el componente de partida que se usó en la cantidad molar más baja. Los líquidos y disoluciones sensibles al aire y a la humedad se transfirieron vía una jeringuilla o cánula, y se introdujeron en las vasijas de reacción a través de un tabique de caucho. Se usaron reactivos y disolventes de grado comercial sin purificación adicional. La expresión "concentrado a presión reducida" se refiere al uso de un evaporador giratorio de Buchi, a una presión mínima de aproximadamente 15 mm de Hg. Todas las temperaturas se dan sin corregir en grados Celsius (°C).

A fin de que esta invención se comprenda mejor, se dan los siguientes ejemplos.

PROCEDIMIENTOS GENERALES

En los párrafos subsiguientes se describen procedimientos generales detallados para la síntesis de intermedios clavos y compuestos de la presente invención.

Procedimiento General 1 (GP 1): Introducción de la cadena lateral C2

Se disolvió en THF seco 1 eq. del sustrato de 2-fluorofenilo y 1,5 eq. de la bencenamina 2,4-disustituída. Después de enfriar hasta -60°C, se añadieron 2-3 eq. de terc-butóxido de potasio, y la mezcla se agitó durante 30 min. a esta temperatura. La mezcla se dejó calentar hasta rt y se agitó hasta la consumición completa del material de partida. La mezcla se concentró entonces para producir el producto bruto, que se purificó adicionalmente de manera opcional mediante cromatografía en columna ultrarrápida, trituración o purificación mediante HPLC preparativa.

Procedimiento General 2 (GP 2): protección con BOC de la difenilamina

El derivado de difenilamina (1 eq.) se disolvió en THF en argón y se añadieron DMAP (0,28 eq.) así como dicarbonato de di-terc-butilo (1,56 eq.). La mezcla se agitó a rt hasta que el análisis mediante TLC o LCMS mostró la conversión final. La mezcla se concentró para producir el compuesto diana bruto, que se purificó adicionalmente de manera opcional mediante cromatografía en columna ultrarrápida, trituración o purificación mediante HPLC preparativa.

Procedimiento General 3a (GP 3a): Introducción de la cadena lateral C6 (Condiciones A)

El 6-fluorobenceno respectivo se disolvió en THF, y se añadió un alcohol. La mezcla se trató con hidruro de sodio (2,01 eq.) y se agitó a rt durante 48 h. La mezcla de reacción se vertió en agua con hielo y se extrajo tres veces con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron una vez con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se separaron por filtración, y se concentraron para producir el producto bruto que se purificó adicionalmente de manera opcional mediante cromatografía en columna ultrarrápida, trituración o purificación mediante HPLC preparativa.

Procedimiento General 3b (GP 3b): Introducción de la cadena lateral C6 (Condiciones B)

El 6-fluorobenceno respectivo se disolvió en DMF, se añadió carbonato de cesio (1-4 eq.), y la mezcla se dejó agitar a RT durante 30 min. Después se añadió un alcohol en DMF. La mezcla se agitó durante 2 – 48 h en un tubo de presión herméticamente cerrado. El tratamiento de extracción, la combinación de las capas orgánicas y la concentración a vacío produjeron el producto bruto que se purificó adicionalmente de manera opcional mediante cromatografía en columna ultrarrápida, trituración o purificación mediante HPLC preparativa.

Procedimiento General 3c (GP 3c): Introducción de la cadena lateral C6 (Condiciones C)

El 6-fluorobenceno respectivo se disolvió en THF, se añadió KtOBu (1-2 eq.), y la mezcla se dejó agitar a RT durante 30 min. Después se añadió una disolución de un alcohol en DMF. La mezcla se agitó a 70°C durante 1 – 24 h. La mezcla se repartió entre salmuera semiconcentrada y acetato de etilo, y se extrajo dos veces con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se separaron por filtración y se concentraron para producir el producto bruto, que se purificó adicionalmente de manera opcional mediante cromatografía en columna ultrarrápida, trituración o purificación mediante HPLC preparativa.

Procedimiento General 4 (GP 4): Escisión de grupo o grupos protectores Boc

Se suspendió en diclorometano 1 eq. del sustrato protegido con Boc, y se trató con TFA en exceso (5-20 eq.). La mezcla se agitó subsiguientemente a rt hasta la consumición completa del material de partida. La mezcla de reacción se concentró, se volvió a disolver en diclorometano, y se añadió disolución de hidróxido de sodio (1M, ac.). Tras la separación de fases, la fase orgánica se concentró para producir el producto bruto, que se purificó adicionalmente de manera opcional mediante cromatografía en columna ultrarrápida, trituración o purificación mediante HPLC preparativa.

Procedimiento General 5 (GP 5): Hidrólisis del benzonitrilo

El benzonitrilo se disolvió en DMSO y se añadió disolución 3 M ac. de hidróxido de sodio (1,1 eq.). La mezcla se calentó hasta 60-65°C, y se añadió lentamente disolución de peróxido de hidrógeno (ac., 30%, 10-80 eq.). La mezcla

se agitó durante otras 2 h a 65°C (temperatura del baño.), y después a rt hasta que el análisis mediante TLC o LCMS no mostró más conversión. La mezcla de reacción se vertió en agua con hielo y se extrajo tres veces con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó una vez con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se separó por filtración y se concentró para producir el producto bruto que se purificó adicionalmente de manera opcional mediante cromatografía en columna ultrarrápida, trituración o purificación mediante HPLC preparativa.

Procedimiento General 6a (GP 6a): Preparación de sulfonamidas (Condiciones A)

La amina respectiva (1 eq.) se disolvió en THF y se trató con trietilamina (1,5 eq.) y el cloruro de sulfonilo respectivo (1,5 eq.). La mezcla de reacción se agitó a rt toda la noche, se diluyó con acetato de etilo, se lavó con disolución saturada de NaHCO₃, se secó y se concentró a vacío. La purificación mediante HPLC del residuo proporcionó el compuesto deseado.

Procedimiento General 6b (GP 6b): Preparación de sulfonamidas (Condiciones B)

El compuesto amínico respectivo (1 eq.) se disolvió en piridina y se trató con el cloruro de sulfonilo respectivo (1,2 eq., disuelto en piridina). La mezcla de reacción se agitó a rt toda la noche. En caso de conversión incompleta (basada en análisis mediante TLC o LCMS), la mezcla se trató con cloruro de sulfonilo adicional (en piridina) y se continuó la agitación a rt. Tras la conversión final, la mezcla se diluyó con acetato de etilo, se lavó con agua y las capas orgánicas se secaron. La concentración a vacío, seguida de cromatografía en columna ultrarrápida o purificación mediante HPLC, proporcionó el compuesto diana.

Procedimiento General 7a (GP 7a): Acoplamiento de Sonogashira (Condiciones A)

El intermedio yodo-anilínico respectivo (1 eq.), bis[(1,2,4,5-eta)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona]-paladio (0,004 eq.), yoduro de cobre(I) (0,004 eq.) y trifetilfosfina (0,2 eq.) se pesaron en un tubo de presión, y se añadió trietilamina. Después de inundar tres veces con N₂, se añadió trimetilsililacetileno (6 eq.), el tubo de presión se cerró herméticamente, y la suspensión resultante se agitó vigorosamente a 60°C durante 3 h. La mezcla se concentró, se volvió a disolver en hexano/acetato de etilo 1:1 y se filtró en una columna de NH₂ (hexano/acetato de etilo 50:50 hasta 0:100 hasta metanol puro). El filtrado se concentró para producir el compuesto etilílico sililado, que se desililó después aplicando el procedimiento general 8.

Procedimiento General 7b (GP 7b): Acoplamiento de Sonogashira (Condiciones B)

El intermedio yodo-anilínico respectivo (1 eq.) se disolvió en THF, junto con el alquino respectivo (1,5 eq.), seguido de diclorobis(trifenilfosfina)paladio (II) (Pd(PPh₃)₂Cl₂) (0,5 eq.) y una disolución 1M de fluoruro de tetra-N-butilamonio en THF (5 eq.). La mezcla se dejó entonces reaccionar durante 40 min. a 110°C en un horno de microondas (600W; max. 6 bares). La mezcla de reacción bruta se sometió directamente a HPLC preparativa para producir el compuesto diana puro.

Procedimiento General 8 (GP 8): Desililación de trimetilsilil alquinos

A una disolución del (trimetilsilil)alquino respectivo en THF (aprox. 10 ml por g de alquino) se añadió una disolución 1M de fluoruro de tetra-N-butilamonio en THF (1 eq.), y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente hasta que la reacción estuvo terminada (típicamente después de aprox. 3 h). El producto se aisló mediante dilución con agua, se extrajo con, por ejemplo, acetato de etilo, y se purificó mediante cromatografía en columna (si se requirió).

Condiciones ejemplares de HPLC: ("condiciones A de HPLC")

Equipo: Sistema analítico Acquity de UPLC de Waters con un detector de MS de un solo quad. de Waters ZQ 2000.

Columna: Aquity BEH C18 2,1 x 50 1,7 μm.

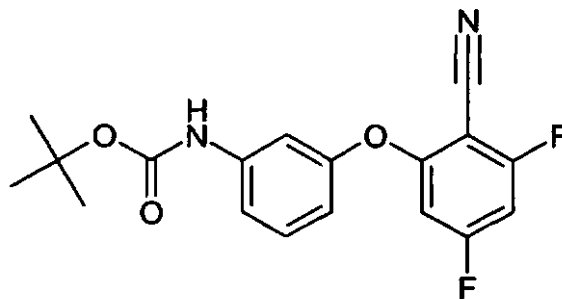
Condiciones: temperatura 60°C; longitud de onda de detección 214 nm; caudal 0,8 ml/min.;

eluyentes A: 0,1% de ácido fórmico en agua, B: 0,1% de ácido fórmico en ACN; gradiente en cada caso basado en B: 1% hasta 99% (1,6') hasta 99% (0,4') hasta 1% (0,1')

Los datos de LCMS dados en las condiciones experimentales específicas subsiguientes se refieren a condiciones A de HPLC, excepto que se señale de otro modo.

Intermedio 1.1

Preparación de éster terc-butílico del ácido [3-(2-ciano-3,5-difluoro-fenoxi)-fenil]-acético



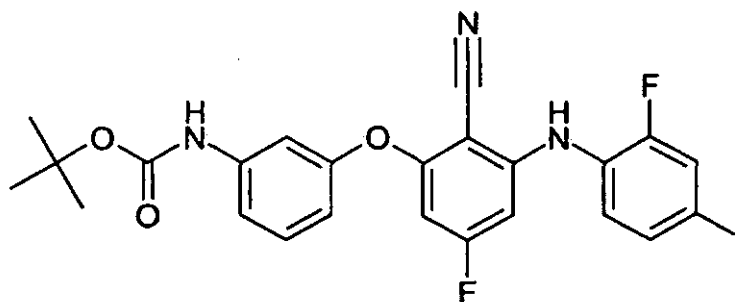
De manera análoga a GP 3a, se disolvieron 3,7 g de 2,4,6-trifluorobenzonitrilo (23,6 mmoles, 1 eq.; comercialmente disponible) y 5 g de éster terc-butílico del ácido (3-hidroxi-fenil)-carbámico (23,9 mmoles, 1,01 eq.; comercialmente disponible) en 63 ml de THF, se enfriaron hasta 0°C y se trataron con 2,08 g de hidruro de sodio (47,56 mmoles, 2,02 eq.) y se agitaron a rt durante 17 h. La mezcla de reacción se vertió en 40 ml de agua con hielo y se extrajo tres veces con 100 ml de acetato de etilo cada vez. La capa orgánica se lavó una vez con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se separó por filtración y se concentró para producir 9,6 g de producto bruto. El concentrado se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (usando hexano/acetato de etilo 99/1 - 50/50) para producir 5,72 g (70% de rendimiento, 16,5 mmoles) del producto deseado.

RMN ¹H (DMSO d₆; 300 MHz): 9,57 (s, 1 H); 7,39 - 7,28 (m, 4 H); 6,80 (ddd, 1 H); 6,62 (ddd, 1 H); 1,43 (s, 9H).

MS (ESI): [M+H]⁺ = 347.

Intermedio 1.2

Preparación de éster terc-butílico del ácido {3-[2-ciano-5-fluoro-3-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-fenoxi]-fenil}-carbámico



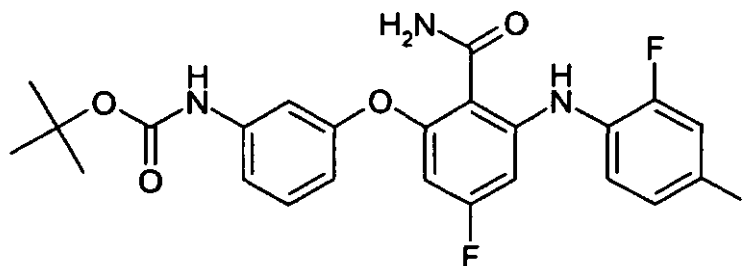
De manera análoga a GP 1, se disolvieron 500 mg de éster terc-butílico del ácido [3-(2-ciano-3,5-difluoro-fenoxi)-fenil]-acético (1,44 mmoles, 1 eq.) y 513 mg de 2-fluoro-4-yodo-bencenammina (2,17 mmoles, 1,5 eq.; comercialmente disponible) en 13 ml de THF. Después de enfriar hasta 3°C, se añadieron 486 mg (4,33 mmoles, 3 eq.) de terc-butóxido de potasio, y la mezcla se agitó durante 30 min. a esta temperatura. La mezcla se dejó llegar a rt lentamente y se agitó durante otras 20 h a rt. Tras la adición de 162 mg (1,44 mmoles, 1 eq.) de terc-butóxido de potasio, la mezcla se agitó a rt durante otras 2 h. La mezcla de reacción se vertió en 30 ml de agua con hielo, y se añadieron 30 ml de acetato de etilo. La fase acuosa se extrajo tres veces con 40 ml de acetato de etilo cada vez. Las capas orgánicas combinadas se lavaron una vez con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se separaron por filtración y se concentraron para producir 750 mg de producto bruto. El concentrado se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (hexano/acetato de etilo 99/1 - 60/40) para producir 406 g (50% de rendimiento, 0,72 mmoles) del producto deseado.

RMN ¹H (DMSO d₆; 300 MHz): 9,54 (s, 1 H); 8,77 (s, 1 H); 7,69 (dd, 1 H); 7,53 (dbr, 1 H); 7,34 - 7,24 (m, 3 H); 7,11 (dd, 1 H); 6,75 (ddd, 1 H); 6,21 (ddd, 1 H); 6,07 (dd, 1 H); 1,43 (s, 9H).

MS (ESI): [M+H]⁺ = 564.

Intermedio 1.3

Preparación de éster terc-butílico del ácido {3-[2-carbamoil-5-fluoro-3-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-fenoxi]-fenil}-carbámico



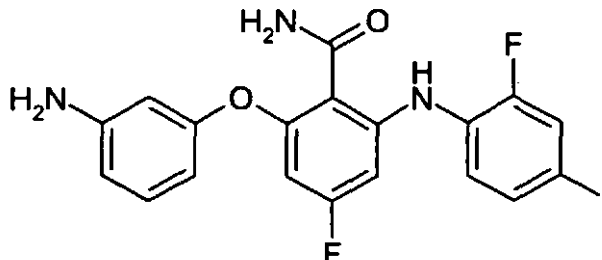
De manera análoga a GP 5, se disolvieron 386 mg de éster terc-butílico del ácido {3-[2-ciano-5-fluoro-3-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-fenoxi]-fenil}-carbámico (0,69 mmoles, 1 eq.) en 4,8 ml de DMSO y se añadieron 0,24 ml de disolución ac. 3 M de hidróxido de sodio (0,72 mmoles, 10-80 eq.). La mezcla se calentó hasta 63°C, y se añadieron 1,85 ml de disolución de peróxido de hidrógeno (ac., 30%) durante el transcurso de 20 min. La mezcla se agitó durante otras 2 h a 65°C (temperatura del baño.). La mezcla de reacción se vertió en 175 ml de agua con hielo. Se añadieron 300 ml de acetato de etilo, y las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo una vez más con 150 ml de acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron una vez con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se separaron por filtración y se concentraron. El concentrado se purificó (cromatografía en columna FlashMaster, hexano/acetato de etilo 99/1 - 60/40) para producir 169 mg (42% de rendimiento, 0,29 mmoles) del producto deseado.

RMN ¹H (DMSO d₆; 300 MHz): 9,46 (s, 1 H); 9,12 (s, 1 H); 7,83 (sbr, 2 H); 7,66 (dd, 1 H); 7,47 (dbr, 1 H); 7,30 - 7,17 (m, 4 H); 6,65 (ddd, 1 H); 6,54 (dbr, 1 H); 6,06 (dd, 1 H); 1,42 (s, 9H).

MS (ESI): [M+H]⁺ = 582.

15 Intermedio 1.4

Preparación de 2-(3-Amino-fenoxi)-4-fluoro-6-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-benzamida



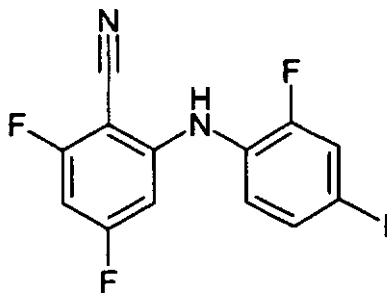
De manera análoga a GP 4, se suspendieron 163 mg de éster terc-butílico del ácido {3-[2-carbamoil-5-fluoro-3-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-fenoxi]-fenil}-carbámico (0,28 mmoles) en diclorometano, se añadieron 0,29 ml de TFA (3,78 mmoles, 13 eq.), y la mezcla se agitó a rt durante 4 h. La mezcla de reacción se concentró, se volvió a disolver en diclorometano, y se añadió disolución de hidróxido de sodio (1M, ac.). Tras la separación de fases, la fase orgánica se concentró para producir 129 mg (96%, 0,27 mmoles) del producto deseado, que no requirió purificación adicional.

RMN ¹H (DMSO d₆; 300 MHz): 9,23 (s, 1 H); 7,84 (sbr, 1 H); 7,77 (sbr, 1 H); 7,66 (dd, 1 H); 7,47 (dbr, 1 H); 7,21 (dd, 1 H); 7,04 (dd, 1 H); 6,53 (dbr, 1 H); 6,42 (dbr, 1 H); 6,31 - 6,26 (m, 2 H); 6,07 (dd, 1 H).

MS (ESI): [M+H]⁺ = 482.

La transformación del Intermedio 1.4 en compuestos ejemplares de la presente invención se logró como se describe a continuación. En los siguientes párrafos se describe una secuencia sintética alternativa para el Intermedio 1.4.

Intermedio 2.1 Preparación de 2,4-difluoro-6-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-benzonitrilo



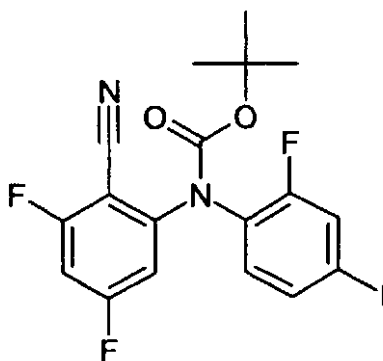
De manera análoga a GP 1, se disolvieron 1 g de 2,4,6-trifluoro-benzonitrilo (6,37 mmoles; 1 eq.; comercialmente disponible) y 2,26 g de 2-fluoro-4-yodo-bencenamina (9,55 mmoles, 1,5 eq.; comercialmente disponible) en 100 ml de THF. La mezcla se enfrió hasta -65°C; se añadieron 2,14 g de terc-butóxido de potasio (19,1 mmoles, 3 eq.; comercialmente disponible). La mezcla se agitó durante 35 min. a esta temperatura y otras 21 h a RT. La mezcla se agitó en 120 ml de agua con hielo, y se extrajo tres veces con acetato de etilo (100 ml cada vez). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron para producir 4,137 g de producto bruto. La purificación se logró mediante cromatografía ultrarrápida (hexano/acetato de etilo) para producir 646 mg (27,13% de rendimiento; 1,73 mmoles) del compuesto diana.

RMN ¹H (DMSO d₆; 300 MHz): 9,02 (s, 1 H); 7,75 (dd, 1 H); 7,58 (dd, 1 H); 7,14 (t, 1 H); 6,95 (td, 1 H); 6,40 (br. d, 1 H).

MS (ESI): [M+H]⁺ = 375.

Intermedio 2.2

Preparación de éster terc-butílico del ácido 2-(2-ciano-3,5-difluoro-fenil)-(2-fluoro-4-yodo-fenil)-carbámico



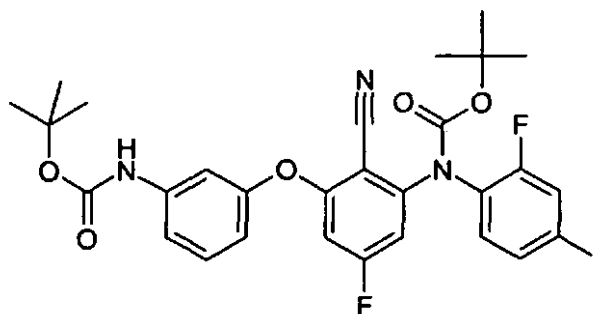
De manera análoga a GP 9, se disolvieron 205 mg de 2,4-difluoro-6-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-benzonitrilo (0,55 mmoles; 1 eq.) en THF en argón, y se añadieron 19 mg de DMAP (0,16 mmoles; 0,28 eq.) así como 186 mg de dicarbonato de di-terc-butilo (0,85 mmoles; 1,56 eq.). La mezcla se agitó a RT durante 20 h. La mezcla se concentró y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (5 g de columna de Si, usando hexano/acetato de etilo 100/0 - 70/30) para producir 253 mg (97% de rendimiento, 0,53 mmoles) del producto deseado.

RMN ¹H (DMSO d₆; 300 MHz): 7,77 (br. d, 1 H); 7,56 - 7,66 (m, 2 H); 7,25 (br. d, 1 H); 7,17 (t, 1 H); 1,36 (s, 9 H).

MS (ESI): [M+H]⁺ = 475.

Intermedio 2.3:

Preparación de éster terc-butílico del ácido [3-(3-terc-butoxicarbonilamino-fenoxi)-2-ciano-5-fluoro-fenil]-(2-fluoro-4-yodo-fenil)-carbámico



5

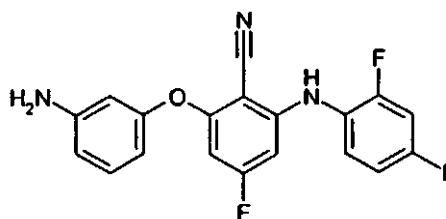
Se disolvieron 500 mg de éster terc-butílico del ácido 2-(2-ciano-3,5-difluoro-fenil)-(2-fluoro-4-yodo-fenil)-carbámico (1,05 mmoles, 1 eq.) y 412 mg de Cs_2CO_3 (1,27 mmoles, 1,2 eq) en 5,5 ml DMF y se trataron con 265 mg de éster terc-butílico del ácido (3-hidroxi-fenil)-carbámico (1,27 mmoles, 1,2 eq.) disueltos en 5,5 ml de DMF. La mezcla resultante se agitó a 50°C durante 16 h. El tratamiento de extracción proporcionó un producto bruto que contiene el compuesto diana deseado como una mezcla de regioisómeros junto con una fracción más pequeña del producto de doble sustitución. Esta mezcla se avanzó sin purificación adicional.

MS (LC-MS): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 664$.

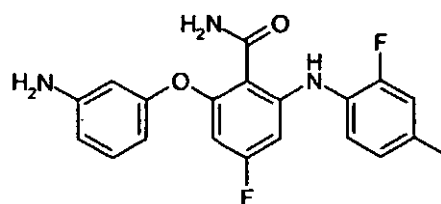
Intermedio 2.4 y 2.5 (= siendo idénticos al Intermedio 1.4):

10

Preparación de 2-(3-amino-fenoxi)-4-fluoro-6-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-benzonitrilo y 2-(3-amino-fenoxi)-4-fluoro-6-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-benzamida



Intermedio 2.4



Intermedio 2.5

15

Se disolvieron 200 mg de la mezcla de reacción bruta procedente de la preparación del Intermedio 2.3 en 2 ml de dioxano y se trataron con 2,5 ml de HCl 4 N (en dioxano). La mezcla resultante se agitó a rt toda la noche. El análisis mediante LCMS mostró la eliminación completa tanto de los grupos Boc como la hidrólisis parcial del grupo nitrilo a la amida. El tratamiento de extracción, la concentración y la cromatografía del residuo dio lugar al Intermedio 2.4 (28% de rendimiento) como una mezcla de regioisómeros y al Intermedio 2.5 (37% de rendimiento) como una mezcla de regioisómeros.

20

Se disolvieron 29 mg del Intermedio 2.4 aislado (0,063 mmoles, 1 eq.) en 0,75 ml de DMSO y se trataron con 22 μl de disolución 3N de NaOH y 0,52 ml de disolución de H_2O_2 , y se agitaron a 65°C durante 2 h. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano, y se lavó con agua. La capa orgánica se secó y se concentró a vacío para dar 19 mg de Intermedio 2.5 (mezcla regioisomérica 1,5:1,0). Los regioisómeros se separaron en esta etapa mediante HPLC o tras transformaciones posteriores.

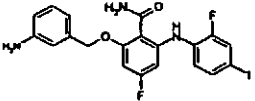
25

MS (LC-MS) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 482$.

En los siguientes párrafos se describe una ruta sintética alternativa adicional para el Intermedio 1.3:

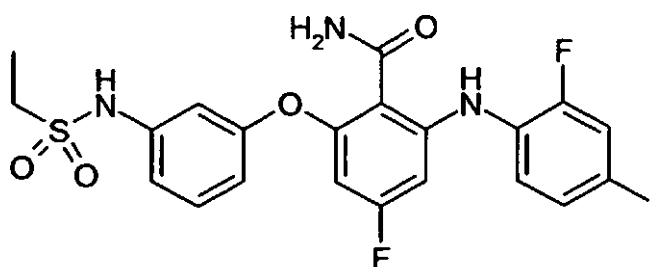
Los siguientes intermedios 3.1 y 3.2 se prepararon de manera análoga a los procedimientos generales descritos anteriormente, usando 5-amino-piridin-3-ol como material de partida nucleófilo.

Intermedio	Estructura	Nombre	Datos analíticos
3.1		2-(5-Amino-piridin-3-iloxi)-4-fluoro-6-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-benzamida	RMN ^1H (d_6 -DMSO; 300 MHz): 9,03 (s, 1H); 7,84 (sbr, 2H); 7,71 (d, 1H); 7,66 (dd, 1H); 7,55 (d, 1H); 7,47 (dbr, 1H); 7,20 (dd, 1H); 6,56 (dbr, 1H); 6,53 (dd, 1H); 6,19 (dd, 1H); 5,52 (s, 2 H), MS (LC-MS): $[\text{M}+\text{H}]^+ =$

Intermedio	Estructura	Nombre	Datos analíticos
			483.
3.2		2-(3-Amino-beniloxy)-4-fluoro-6-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-benzamida	RMN ¹ H (d ₆ -DMSO; 300 MHz): 9,84 (s, 1H); 7,73 (sbr, 1H); 7,72 (sbr, 1H); 7,64 (dd, 1H); 7,45 (dbr, 1H); 7,18 (dd, 1H); 6,99 (dd, 1H); 6,61-6,46 (m, 4H); 6,40 (dbr, 1H); 5,10 (s, 2H); 5,01 (s, 2H), MS (LC-MS): [M+H] ⁺ = 496.

Compuesto 1.1 Ejemplar

Preparación de 2-(3-etanosulfonilamino-fenoxi)-4-fluoro-6-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-benzamida



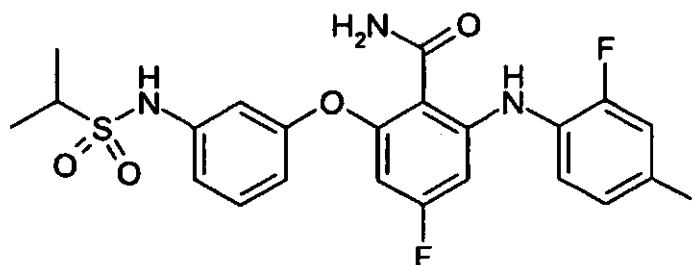
5 De manera análoga a GP 6a, se disolvieron 240 mg de 2-(3-amino-fenoxi)-4-fluoro-6-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-benzamida (Intermedio 1.4; 0,5 mmoles, 1 eq.) en 8 ml de THF y se trataron con 0,1 ml de trietilamina (0,75 mmoles, 1,5 eq.) y 71 μl de cloruro de etilsulfonilo (0,75 mmoles, 1,5 eq.). La mezcla de reacción se agitó a rt toda la noche, se diluyó con acetato de etilo, se lavó con disolución saturada de NaHCO₃, se secó y se concentró a vacío. La purificación mediante HPLC del residuo proporcionó 123 mg (0,22 mmoles, 48% de rendimiento) del compuesto deseado.

10 RMN ¹H (DMSO d₆; 300 MHz): 9,92 (s, 1 H); 9,03 (s, 1 H); 7,87 (br. s, 1 H); 7,83 (br. s, 1 H); 7,66 (dd, 1 H); 7,47 (br. d, 1 H); 7,31 (t, 1 H); 7,20 (t, 1 H); 6,98 (d, 1 H); 6,94 (t, 1 H); 6,74 (ddd, 1 H); 6,57 (ddd, 1 H); 6,15 (dd, 1 H); 3,10 (q, 2 H); 1,15 (t, 3 H).

MS (LC-MS): [M+H]⁺ = 574.

15 Compuesto 1.2 Ejemplar

Preparación de 4-fluoro-2-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6-[3-(propano-2-sulfonilamino)-fenoxi]-benzamida



20 De manera análoga a GP 6b, se disolvieron 144 mg de 2-(3-amino-fenoxi)-4-fluoro-6-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-benzamida (Intermedio 1.4; 0,3 mmoles, 1 eq.) en 1,5 ml de piridina y se trataron con 51 mg de cloruro de isopropilsulfonilo (0,36 mmoles, 1,2 eq., disuelto en 0,5 ml de piridina). La mezcla de reacción se agitó a rt toda la noche, se trató con otros 0,5 eq. de cloruro de sulfonilo (en 0,2 ml de piridina) y se continuó la agitación a rt toda la noche. Tras la adición de 0,5 eq. adicionales de cloruro de sulfonilo (en 0,2 ml de piridina) y agitación adicional a rt toda la noche, la mezcla resultante se diluyó con acetato de etilo, se lavó con agua, y las capas orgánicas se secaron. La concentración a vacío seguido de purificación mediante HPLC proporcionó 82 mg (46% de rendimiento) del compuesto deseado, que incluye cantidades subestequiométricas de ácido fórmico.

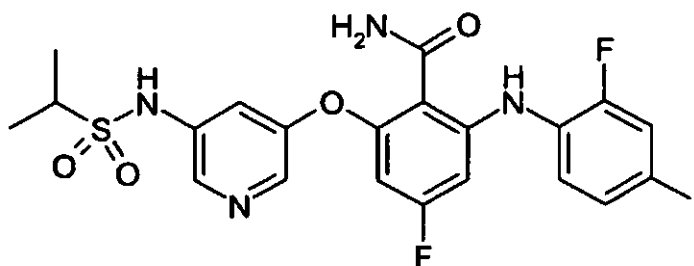
25

RMN ¹H (DMSO d₆; 300 MHz): 9,02 (s, 1 H); 7,88 (br. s, 1 H); 7,84 (br. s, 1 H); 7,65 (dd, 1 H); 7,47 (br. d, 1 H); 7,30 (t, 1 H); 7,21 (t, 1 H); 6,99 (d, 1 H); 6,96 (t, 1 H); 6,73 (ddd, 1 H); 6,57 (ddd, 1 H); 6,13 (dd, 1 H); 3,26 (pent., 1 H); 1,20 (t, 3 H).

MS (LC-MS): [M+H]⁺ = 588.

5 Compuesto 2.1 Ejemplar

Preparación de 4-fluoro-2-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6-[5-(propano-2-sulfonilamino)-piridin-3-iloxi]-benzamida



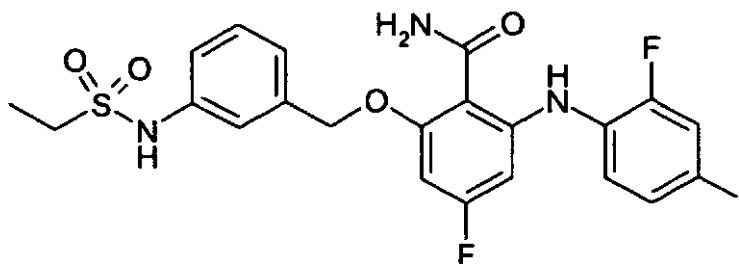
De manera análoga a GP 6b, se disolvieron 100 mg de 2-(5-amino-piridin-3-iloxi)-4-fluoro-6-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-benzamida (Intermedio 3.1; 0,21 mmoles, 1 eq.) en 1,5 ml de piridina y se trataron con 37 mg cloruro de iso-propilsulfonilo (0,26 mmoles, 1,25 eq., disuelto en 0,5 ml de piridina). La mezcla de reacción se agitó a rt toda la noche, se trató con otros 1,25 eq. de cloruro de sulfonilo (en 0,2 ml de piridina), y se continuó la agitación a rt toda la noche. Tras la adición de 1,25 eq. adicionales de cloruro de sulfonilo (en 0,2 ml de piridina) y agitación adicional a rt durante 3 días, la mezcla resultante se diluyó con acetato de etilo, se lavó con agua y las capas orgánicas se secaron. La concentración a vacío fue seguida de prepurificación mediante cromatografía y purificación subsiguiente mediante HPLC para proporcionar el compuesto deseado.

RMN ¹H (DMSO d₆; 300 MHz): 8,87 (s, 1 H); 8,21 (s, 1 H); 8,07 (s, 1 H); 7,96 (s, 1 H); 7,85 (s, 1 H); 7,66 (dd, 1 H); 7,47 (d, 1 H); 7,34 (s, 1 H); 7,20 (t, 1 H); 6,59 (d, 1 H); 6,29 (d, 1 H); 1,21 (d, 6 H) [CH iso-propílico oscurecido por señal de disolvente].

MS (LC-MS): [M+H]⁺ = 589.

20 Compuesto 3.1 Ejemplar

Preparación de 2-(3-etanosulfonilamino-benciloxi)-4-fluoro-6-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-benzamida



De manera análoga a GP 6b, se disolvieron 89 mg de 2-(3-amino-benciloxi)-4-fluoro-6-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-benzamida (Intermedio 3.2; 0,18 mmoles, 1 eq.) en 0,75 ml de piridina, se trataron con 34 μl de cloruro de etilsulfonilo (0,36 mmoles, 2 eq.), y se agitaron a rt durante dos días. La mezcla resultante se diluyó con acetato de etilo, se lavó con agua, y las capas orgánicas se secaron. La concentración a vacío fue seguida de trituración para proporcionar 84 mg del compuesto deseado (80% de rendimiento) con un punto de fusión de 170°C.

RMN ¹H (DMSO d₆; 400 MHz): 9,85 (br. s, 1 H); 9,57 (s, 1 H); 7,72 (br. s, 2 H); 7,64 (dd, 1 H); 7,45 (d, 1 H); 7,31 (t, 1 H); 7,26 (s, 1 H); 7,12 - 7,20 (m, 3 H); 6,56 (dd, 1 H); 6,42 (dd, 1 H); 5,13 (s, 2 H); 3,05 (q, 2 H); 1,14 (t, 3 H).

30 MS (LC-MS): [M+H]⁺ = 588.

EVALUACIÓN BIOLÓGICA

La utilidad de los compuestos de la presente invención se puede ilustrar, por ejemplo, por su actividad in vitro en el ensayo de proliferación de células tumorales in vitro descrito más abajo. La relación entre actividad en ensayos de proliferación de células tumorales in vitro y la actividad antitumoral en el marco clínico ha sido demostrada muy bien

en la técnica. Por ejemplo, la utilidad terapéutica de taxol (Silvestrini et al. Stem Cells 1993, 11 (6), 528-35), taxotere (Bissery et al. Anti Cancer Drugs 1995, 6(3), 339), e inhibidores de topoisomerasa (Edelman et al. Cancer Chemother. Pharmacol. 1996, 37(5), 385-93) se demostró con el uso de ensayos de proliferación tumoral in vitro.

5 La demostración de la actividad de los compuestos de la presente invención se puede lograr a través de ensayos in vitro, ex vivo e in vivo que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, para demostrar la actividad de los compuestos de la presente invención, se pueden usar los siguientes ensayos.

ENSAYOS BIOLÓGICOS

Ensayo 1

Ensayo de cinasa de activación de MEK1

10 La cinasa Cot1 activa MEK1 fosforilando su bucle de activación. La actividad inhibidora de compuestos de la presente invención sobre esta activación de MEK1 se cuantificó empleando el ensayo de HTRF descrito en los siguientes párrafos.

15 Se usó como cinasa el dominio de cinasa recombinante marcado con His6 N-terminalmente de la Cot1 humana (aminoácidos 30-397, adquirida de Millipore, nº de catálogo 14-703) expresada en células de insecto (SF21) y purificada mediante cromatografía de afinidad de Ni-NTA. Como sustrato para la reacción de cinasa, se usó la proteína de fusión GST-MEK1 marcada con His6 C-terminalmente inactiva (nº de catálogo de Millipore 14-420).

20 Para el ensayo, se pipetearon 50 nl de una disolución concentrada 100 veces del compuesto de ensayo en DMSO en una placa de microtitulación de 384 pocillos negra de poco volumen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania), se añadieron 3 µl de una disolución de 24 nM de GST-MEK1 y 166,7 µM de trifosfato de adenosina (ATP) en tampón de ensayo [50 mM de Tris/HCl pH 7,5, 10 mM de MgCl₂, 2 mM de ditioneitol, 0,01% (v/v) de Igepal CA 630 (Sigma), 5 mM β-fosfoglicerol], y la mezcla se incubó durante 10 min. a 22°C para permitir la unión previa de los compuestos de ensayo a la GST-MEK1 antes del comienzo de la reacción de cinasa. Después, la reacción de cinasa se inició mediante la adición de 2 µl de una disolución de Cot1 en tampón de ensayo, y la mezcla resultante se incubó durante un tiempo de reacción de 20 min. a 22°C. La concentración de Cot1 en el ensayo se ajustó dependiendo de la actividad del lote enzimático, y se escogió que era apropiado tener el ensayo en el intervalo lineal, las concentraciones típicas de enzima estaban en el intervalo de alrededor de 2 ng/µl (conc. final en el volumen de ensayo de 5 µl). La reacción se detuvo mediante adición de 5 µl de una disolución de reactivos de detección de HTRF (13 nM DE anti GST-XL665 [# 61GSTXLB, Fa. Cis Biointernational, Marcoule, Francia], 1 nM de anti-fosfo-MEK 1/2 (Ser217/221) marcado con criptato de Eu [#61P17KAZ, Fa. Cis Biointernational]) en una disolución acuosa de EDTA (100 mM de EDTA, 500 mM de KF, 0,2% (p/v) de seroalbúmina bovina en 100 mM de HEPES/NaOH pH 7,5).

35 La mezcla resultante se incubó 2 h a 22°C para permitir la unión de la GST-MEK1 fosforilada al anti-GST-XL665 y el anticuerpo anti-fosfo-MEK 1/2 marcado con criptato de Eu. Subsiguientemente, se evaluó la cantidad de sustrato fosforilado de Ser217/Ser221 por medición de la transferencia de energía de resonancia desde el anticuerpo anti-fosfo-MEK marcado con criptato de Eu al anti-GST-XL665. Por lo tanto, las emisiones de fluorescencia a 620 nm y 665 nm tras la excitación a 350 nm se midió en un lector de HTRF, por ejemplo un Rubystar (BMG Labtechnologies, Offenburg, Alemania) o un Viewlux (Perkin-Elmer). La relación de las emisiones a 665 nm y a 622 nm se tomó como la medida para la cantidad de sustrato fosforilado. Los datos se normalizaron (reacción enzimática sin inhibidor = 0% de inhibición, todos los otros componentes del ensayo pero sin enzima = 100% de inhibición). Normalmente, los compuestos de ensayo se ensayaron en la misma placa de microtitulación a 10 diferentes concentraciones en el intervalo de 20 mM a 1 nM (20 mM, 6,7 mM, 2,2 mM, 0,74 mM, 0,25 mM, 82 nM, 27 nM, 9,2 nM, 3,1 nM y 1 nM, series de diluciones preparadas antes del ensayo a nivel de las disoluciones madre de conc. de 100 veces mediante diluciones 1:3 en serie) en valores por duplicado para cada concentración, y se calcularon los valores de IC₅₀ mediante un ajuste de 4 parámetros usando un software propio de nuestro laboratorio.

45 Se encontró que los compuestos de la presente invención son inhibidores potentes de MEK. Los compuestos ejemplares descritos anteriormente 1.1, 1.2, 2.1 y 3.1 muestran una IC₅₀ por debajo de 300 nM en este ensayo.

Ensayo 2

Ensayo mecanístico de fosfo-ERK

50 Se cultivaron en placas células A375 y Colo205 en medio de crecimiento RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS a 25.000 células por pocillo en placas de cultivo tisular de 96 pocillos. Las células se incubaron toda la noche en una incubadora humidificada que contiene 5% de CO₂ a 37°C. Al siguiente día, para preparar las placas de ensayo, se bloquearon placas anti-conejo Meso-Scale Discovery (MSD) (número de catálogo L41 RA-1, Meso-Scale Discovery, Gaithersburg, MD) con 100 µl de tampón de bloqueo MSD al 5% durante 1 h a temperatura ambiente, después de lo cual se lavaron tres veces con 200 µl de tampón TBST. Se añadió (25 µl) a cada pocillo el anticuerpo de conejo anti-fosfo-ERK (número de catálogo 9101, Cell Signaling Technologies, Danvers, MA) diluido a 1:200 en 2,5% de MSD Blocker A-TBST, y la placa se incubó entonces 1 h a temperatura ambiente con agitación. Las placas se lavaron

entonces una vez con disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y estaban listas para recibir los lisados celulares. Aunque la preparación de las placas de ensayo fue continua, los compuestos de ensayo se añadieron a los pocillos de placas que contienen células del día anterior, diluidos en serie en medio RPMI 1640 que contiene 10% de FBS, 0,1% de seroalbúmina bovina (BSA) y 0,03% de DMSO, y las placas se incubaron durante 1,5 h a 37°C. Después de esta incubación, las placas tratadas con compuestos se lavaron tres veces con PBS, se lisaron en 30 µl de tampón de lisis Bio-Rad (número de catálogo 98601, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), y después se dejaron agitar en hielo durante 30 min. Los lisados se cargaron entonces en las placas MSD revestidas con fosfo-ERK, y las placas se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las placas se lavaron tres veces con TBST, y se añadieron 25 µl de anticuerpo monoclonal anti-ERK total diluido 1:3000 (número de catálogo 610123, BD Biosciences, San Diego, CA) a las placas, que entonces se incubaron 1 h a temperatura ambiente con agitación. Tras la incubación, las placas se lavaron tres veces con TBST como se describe previamente, y en cada pocillo se añadieron 25 µl de anticuerpo anti-ratón marcado con MSD sulfo (número de catálogo R32AC-5) diluido 1:1000. Las placas se incubaron 1 h a temperatura ambiente con agitación, después se lavaron cuatro veces con TBST. Justo antes de leer las placas, se añadieron 150 µl de tampón de lectura MSD T, y las placas se leyeron inmediatamente en el instrumento de MSD. El análisis de los datos se llevó a cabo usando el software Analyze5 para el análisis de IC₅₀.

Ensayo 3

Condiciones alternativas para el ensayo mecanístico de pERK

Para la medida de la fosforilación de ERK1/2 en estirpes celulares tumorales, se usó un ensayo Mesoscale Discovery (MSD) singleplex. Este ensayo se construyó como un inmunoensayo de sándwich. Los lisados celulares generados a partir de diferentes estirpes celulares tumorales tratadas con compuestos inhibidores de MEK diluidos en serie se cargaron en las placas de MSD. ERK1/2 fosforilada, presente en las muestras, se une al anticuerpo de captura inmovilizado sobre la superficie del electrodo de trabajo. El sándwich se completa mediante la unión de un anticuerpo de detección a la fosfo-ERK1/2 inmovilizada. Este anticuerpo de detección está marcado con un compuesto electroquimioluminiscente. La aplicación de voltaje a los electrodos de la placa provoca que los marcadores, unidos a la superficie de los electrodos vía el complejo de sándwich anticuerpo-fosfo ERK1/2, emita luz. La medida de la luz emitida permite una determinación cuantitativa de la cantidad de ERK1/2 fosforilada presente en la muestra. En detalle, se debe determinar un intervalo lineal para la medida de las señales de fosfoERK para cada estirpe celular usada en el ensayo valorando diferentes números de células. Para el ensayo final, el número de células previamente determinado se siembra en placas de 96 pocillos. Tras 24 h de siembra, las células se trataron durante 1,5 h con compuestos inhibidores de MEK alostéricos diluidos en serie antes de que las células se lisaran, y los lisados se transfirieron a la placa de ensayo de MSD. El protocolo del fabricante se cambió, por cuanto la etapa de unión de la ERK fosforilada al anticuerpo de captura se llevó a cabo toda la noche a 4°C en lugar de 3 h a temperatura ambiente, conduciendo a una mejor fuerza de la señal.

Se cultivaron en placas células A375 o Colo205 en 50 µl de medio de crecimiento DMEM (Biochrom FG 0435) suplementado con 10% de FBS (Biochrom #S0410) (A375), respectivamente en medio de crecimiento RPMI (Biochrom FG1215) suplementado con 10% de FBS (Biochrom #S0410), 10 mM de HEPES (Biochrom L1613), 4,5 g/l de glucosa y 1 mM de piruvato de sodio (Biochrom L0473) (Colo-205) a 45000 células por pocillo en placas de cultivo tisular de 96 pocillos. Las células se incubaron toda la noche en una incubadora humidificada que contiene 5% de CO₂ a 37°C.

En ensayo de fosfo-ERK por Mesoscale Discovery (MSD) (# K111 DWD) se llevó a cabo según las recomendaciones del fabricante. De forma breve, el protocolo fue:

El día después de la siembra de las células, para preparar las placas de ensayo, se bloquearon MSD con 150 µl de tampón de bloqueo de MSD durante 1 h a temperatura ambiente, después de lo cual se lavaron cuatro veces con 150 µl de tampón de lavado de Tris. Aunque la preparación de las placas de ensayo fue continua, los compuestos de ensayo se añadieron a los pocillos de placas que contienen células del día previo, diluidos en serie en medio de crecimiento respectivo que contiene 10% de FBS y 0,1% de DMSO, y las placas se incubaron durante 1,5-2 h a 37°C. Después de esta incubación, el medio se aspiró, las células se lisaron en 50 µl de tampón de lisis, y después se dejaron agitar durante 30 min. a 4°C. Después se cargaron 25 µl de los lisados en las placas de MSD bloqueadas, y las placas se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las placas se lavaron cuatro veces con tampón de lavado de Tris, y se añadieron a las placas 25 µl de disolución de anticuerpo de detección, las cuales se incubaron entonces 1 h a temperatura ambiente con agitación. Después de la incubación, las placas se lavaron cuatro veces con tampón de lavado de Tris, se añadieron 150 µl de tampón de lectura de MSD T, y las placas se leyeron inmediatamente en el instrumento de MSD. El análisis de los datos se llevó a cabo usando software propio de nuestro laboratorio para el análisis de IC₅₀.

Ensayo 4

Ensayo de proliferación de células tumorales *in vitro*

El ensayo de proliferación de células tumorales adherentes usado para ensayar los compuestos de la presente invención implica una lectura denominada Cell Titre-Glo desarrollado por Promega (Cunningham, BA "A Growing Issue: Cell Proliferation Assays. Modern kits ease quantification of cell growth" The Scientist 2001, 15(13), 26, y Crouch, SP et al., "The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity" Journal of Immunological Methods 1993, 160, 81-88).

Se cultivaron en placas células A375 y Colo205 en medio de crecimiento RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS a 3.000 células por pocillo en placas de cultivo tisular de 96 pocillos. Las células se incubaron toda la noche en una incubadora humidificada que contiene 5% de CO₂ a 37°C. Al día siguiente, se añadieron los compuestos de ensayo a los pocillos, diluidos en serie en medio RPMI 1640 que contiene 10% de FBS y 0,03% de DMSO, y las placas se incubaron durante 72 h a 37°C. La evaluación de la densidad celular se realizó a diferentes puntos de tiempo (0 y 72 h post-dosificación) añadiendo a cada pocillo 150 µl de reactivo Cell Titer Glo (número de catálogo G7572, Promega, Madison WI) seguido de la incubación de las placas en un aparato giratorio durante 10 min. a temperatura ambiente y leyendo entonces la luminiscencia en un instrumento Victor3. El análisis de los datos se llevó a cabo usando el software Analyze5 para el análisis de IC₅₀.

Ensayo 5

Ensayo de proliferación de células tumorales in vitro en células A375 (ensayo de cell titer glow [CTG])

Se sembraron en placas células A375 [células de melanoma maligno humanas, ATCC # CRL-1619, que expresan BRAF V600E mutante] a una densidad de 3000 células/pocillo en placas de cultivo tisular de fondo transparente y negro de 96 pocillos (Costar 3603 de fondo negro/transparente) en 100 µl/pocillo de medio DMEM (Biochrom; FG0435; +3,7 g/l de bicarbonato de sodio; + 4,5 g/l de D-glucosa) con 10% de suero fetal bovino (FBS), y se incubaron con glutamina estable a 37°C. Se cultivaron pocillos hermanos en placa separada para la determinación de tiempo cero. Se incubaron todas las placas toda la noche a 37°C. Se tomó la placa de tiempo cero: se añadió disolución de CTG de 67 µl/pocillo (disolución de Promega Cell Titer Glo) a pocillos de tiempo cero en la placa hermana; las placas se mezclaron durante 2 min. en un agitador orbital para asegurar la lisis celular, se incubaron 10 minutos, y se leyó la luminiscencia en VICTOR 3 (Perkin Elmer). Veinticuatro horas después de la siembra de las células, se añaden los compuestos de ensayo diluidos en 50 µl de medio a un intervalo de concentración final desde tan alto como 10 µM hasta tan bajo como 300 pM, dependiendo de las actividades de los compuestos de ensayo en diluciones en serie a una concentración final de DMSO de 0,4%. Las células se incubaron durante 72 horas a 37°C tras la adición del compuesto de ensayo. Después, usando el kit de ensayo de Promega Cell Titer Glo Luminescent®, se añadieron 100 microlitros de tampón de lisis que contiene la enzima luciferasa y su sustrato, mezcla de luciferina, a cada pocillo, y se incubó durante 10 min. a temperatura ambiente en la oscuridad para estabilizar la señal de luminiscencia. Las muestras se leyeron en VICTOR 3 (Perkin Elmer) usando el protocolo de luminiscencia. El porcentaje de cambio en el crecimiento celular se calculó normalizando las medidas a las extinciones de la placa de punto cero (= 0%) y la extinción de las células no tratadas (0 µM) (= 100%). Los valores de IC₅₀ se determinaron por medio de un ajuste de 4 parámetros usando el software de la propia compañía.

Como alternativa, la proliferación celular se midió mediante tinción con violeta de cristal (CV):

Ensayo 6

Células A375 humanas cultivadas se colocaron en placas en una densidad de 1500 células/punto de medida en 200 µl de medio de crecimiento (DMEM/HAMS F12 (Biochrom; FG4815) con 10% de FBS y 2 mM de glutamina) en una placa de multititulación de 96 pocillos. Después de 24 horas, las células de una placa (placa cero) se tiñeron con violeta de cristal (véase más abajo), mientras que el medio en las otras placas se sustituyó por medio de cultivo reciente (200 µl) al que se habían añadido sustancias de ensayo en diversas concentraciones (0 µM, y en el intervalo 0,3 nM-30 µM; la concentración final del disolvente dimetilsulfóxido fue 0,5%). Las células se incubaron en presencia de las sustancias de ensayo durante 4 días. La proliferación celular se determinó tiñendo las células con violeta de cristal: las células se fijaron añadiendo 20 µl/punto de medida de una disolución de glutaraldehído al 11% a temperatura ambiente durante 15 min. Después de que las células fijas se hubieran lavado tres veces con agua, las placas se secaron a temperatura ambiente. Las células se tiñeron añadiendo 100 µl/punto de medida de una disolución de violeta de cristal al 0,1% (pH ajustado a pH 3 añadiendo ácido acético). Después de que las células teñidas se hubieran lavado tres veces con agua, las placas se secaron a temperatura ambiente. El colorante se disolvió añadiendo 100 µl/punto de medida de una disolución de ácido acético al 10%, y la extinción se determinó mediante fotometría a una longitud de onda de 595 nm. El porcentaje de cambio en el crecimiento celular se calculó normalizando las medidas a las extinciones de la placa de punto cero (= 0%) y la extinción de las células no tratadas (0 µM) (= 100%). Los valores de IC₅₀ se determinaron por medio de un ajuste de 4 parámetros usando el software de la propia compañía.

Se encontró que los compuestos de la presente invención son potentes inhibidores de la proliferación celular. Los siguientes compuestos ejemplares representativos muestran una IC₅₀ por debajo de 100 nM en el ensayo de CV de proliferación de A375: Ejemplos 1.1 y 1.2.

La inhibición in vitro de proliferación de otras estirpes celulares cancerosas se pueden medir análogamente a los

procedimientos descritos anteriormente. A continuación se dan detalles para estirpes celulares tumorales adicionales ejemplares:

Células	Indicación (todas humanas)	Mutación Ras o Raf	Método	Número de células por pocillo	medio
A-431	cáncer epidermoide		CTG	3000	DMEM / HAMS F12 (Biochrom; FG4815) + 10% de FBS y Glutamina estable
A-431 no adherente	cáncer epidermoide		CTG	3000	DMEM / HAMS F12 (Biochrom; FG4815) + 10% de FBS y Glutamina estable (Las placas se revistieron con polimetacrilato de 2-hidroxietilo antes de la siembra de las células)
A549	carcinoma de pulmón	KRAS G12S	CTG	2000	DMEM / HAMS F12 (Biochrom; FG4815) + 10% de FBS y Glutamina estable
Colo-205	carcinoma de colon	BRAF V600E	CTG	3000	RPMI1640 (Biochrom; FG1215) + 10% de FBS inactivado por calor y glutamina estable + 1x aminoácido no esencial + 1 mM de piruvato de sodio + 100 mM de hepes
HCT-116	cáncer de colon	KRAS G13D	CTG	3000	DMEM / HAMS F12 (Biochrom; FG4815) + 10% de FBS y Glutamina estable
HT-29	cáncer de colon	BRAF V600E	CTG	2000	DMEM / HAMS F12 (Biochrom; FG4815) + 10% de FBS y Glutamina estable
Lox	melanoma	BRAF V600E	CTG	2000	RPMI1640 (Biochrom; FG1215) + 10% de FBS inactivado por calor y glutamina estable + 1x aminoácido no esencial + 1 mM de piruvato de sodio
MCF-7	cáncer de mama		CTG	5000	RPMI1640 (F1275; sin rojo fenol) + 10% de FBS + 2 mM de Glutamina + 2 mU/ml de Insulina + 1 E-10 M de estradiol

Ensayo 7

5 Estudios de eficacia *in vivo*: Modelos de xenoinjertos humanos representados

La actividad antitumoral *in vivo* de compuestos protagonistas se evaluó en ratones usando modelos de xenoinjerto de melanoma mutante BRAF humano y carcinomas de colon. A ratones atímicos NCR hembras se les implantó subcutáneamente una línea de melanoma humano (LOX) o una línea de carcinoma de colon humano (Colo205) adquirida de la American Type Culture Collection (ATCC, Maryland). El tratamiento se inició cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 100 mg de tamaño. Los compuestos se administraron oralmente y se prepararon de forma reciente en PEG/agua (80%/20% respectivamente). La salud general de los ratones se monitorizó, y la mortalidad se registró diariamente. Las dimensiones tumorales y los pesos corporales se registraron dos veces a la semana partiendo del primer día de tratamiento. Los animales se eutanasiaron según las directrices de Bayer IACUC. Los tratamientos que producen más de 20% de letalidad y/o 20% de pérdida neta de peso corporal fueron considerados "tóxicos".

El crecimiento tumoral se midió con calibres electrónicos tres veces a la semana, y el peso tumoral (mg) se calculó según la siguiente fórmula: $[\text{longitud (mm)} \times \text{anchura (mm)}]^2 / 2$. La eficacia antitumoral se determinó como función de la inhibición del crecimiento tumoral (%TGI). La TGI se calcula en los días de medida usando la siguiente fórmula: $(100 - \text{valor tumoral medio de tratados (T)} / \text{tumor medio de valor de control (C)} \times 100) = \%T/C$. El control usado en los cálculos es el "control no tratado" o "vehículo", el que proporcione la representación más conservadora de los datos. Un compuesto que demuestra una TGI mayor o igual a 50% se considera activo. La significancia estadística se determina usando la prueba de la t de Student de una cola o de dos colas. Los compuestos que se ensayaron

mostraron una inhibición del crecimiento tumoral significativa dependiente de la dosis en ambos modelos de LOX y Colo205.

Los compuestos de la invención se ensayaron para determinar la actividad usando uno o más de los procedimientos de ensayo presentados anteriormente.

5 REFERENCIAS

[1] American Cancer Society, Cancer Facts and Figures 2005.

[2] Sausville EA, El Sayed Y, Monga M, Kim G. Signal Transduction Directed Cancer Treatments. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002; 43:199-231.

[3] O'Dwyer ME, Mauro MJ, Druker BJ. STI571 as a targeted therapy for CML. *Cancer Invest* 2003; 21:429-438.

10 [4] de Jong FA, Verweij J. Role of imatinib mesylate (Gleevec/Glivec) in gastrointestinal stromal tumors. *Expert Rev Anticancer Ther* 2003; 3:757-766.

[4] Becker J. Signal transduction inhibitors - a work in progress. *Nature Biotech* 2004; 22:15-18.

[5] Cobb MH. MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol* 1999; 71:479-500.

15 [6] Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 1998; 74:49-139.

[7] English JM, Cobb MH. Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23:40-45.

[8] Duesbery NS, Webb CP, Vande Woude GF. MEK wars, a new front in the battle against cancer. *Nat Med* 1999; 5:736-737.

20 [9] Sebolt-Leopold JS. Development of anticancer drugs targeting the MAP kinase pathway. *Oncogene* 2000; 19:6594-6599.

[10] Milella M, Precupanu CM, Gregorj C, Ricciardi MR, Petrucci MT, Kornblau SM, Tafuri A, Andreeff M. Beyond single pathway inhibition: MEK inhibitors as a platform for the development of pharmacological combinations with synergistic anti-leukemic effects. *Curr Pharm Des.* 2005; 11(21):2779-95.

25 [11] Hancock CN, Macias AT, Mackerell AD Jr, Shapiro P. Mitogen activated protein (MAP) kinases: development of ATP and non-ATP dependent inhibitors. *Med Chem.* Marzo de 2006; 2(2):213-22.

[12] Deramaudt T, Rustgi AK. Mutant KRAS in the initiation of pancreatic cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1756(2):97-101.

30 [13] Libra M, Malaponte G, Navolanic PM, Gangemi P, Bevelacqua V, Proietti L, Bruni B, Stivala F, Mazzarino MC, Travali S, McCubrey JA. Analysis of BRAF mutation in primary and metastatic melanoma. *Cell Cycle.* Oct. de 2005; 4(10):1382-4.

[14] Herrera R, Sebolt-Leopold JS. Unraveling the complexities of the Raf/MAP kinase pathway for pharmacological intervention. *Trends Mol Med* 2002; 8:S27-S31.

[15] Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogenactivated protein kinase kinase *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* 1995; 270:27489-27494.

35 [16] Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, *et al.* Identification of a novel inhibitor of mitogenactivated protein kinase kinase. *J Biol Chem* 1998; 273:18623-18632.

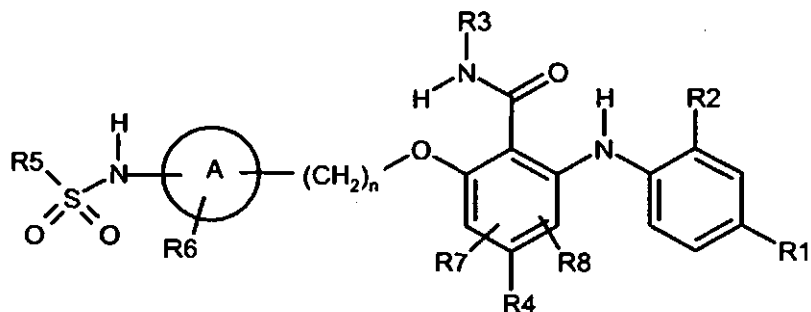
[17] Allen LF, Sebolt-Leopold J, Meyer MB. CI-1040 (PD184352), a targeted signal transduction inhibitor of MEK (MAPKK). *Semin Oncol* 2003; 30:105-116.

40 [18] Sebolt-Leopold JS, Dudley DT, Herrera R, Van Becelaere K, Wiland A, Gowan RC, *et al.* Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors *in vivo*. *Nat Med* 1999; 5:810-816

[19] Waterhouse D, Rinehart J, Adjei A, Hecht J, Natale R, LoRusso P, *et al.* A phase 2 study of an oral MEK inhibitor, CI-1040, in patients with advanced non small-cell lung, breast, colon, or pancreatic cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003; 22:204a (abstr).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula general (I):



(I)

en la que:

- 5 R1 se selecciona del grupo que comprende, preferiblemente que consiste en, halógeno o -C=C-H;
 R2 es hidrógeno, halógeno o alquilo;
 en la que al menos uno de R1 y R2 es halógeno;
 R3 es hidrógeno o alquilo;
 R4 se selecciona del grupo que comprende, preferiblemente que consiste en, halógeno y ciano;
- 10 R5 es alquilo de C2-C6;
 R6 se selecciona del grupo que comprende, preferiblemente que consiste en, hidrógeno, halógeno, ciano, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino;
 R7 y R8, independientemente entre sí, son hidrógeno, halógeno o alquilo;
 A se selecciona del grupo que comprende, preferiblemente que consiste en, arilo y heteroarilo;
- 15 n es un número entero de 0 a 2.
2. El compuesto según la reivindicación 1, en el que:
- R1 es halógeno;
 R2 es halógeno;
 R3 es hidrógeno;
- 20 R4 se selecciona del grupo que comprende, preferiblemente que consiste en, halógeno y ciano;
 R5 es alquilo de C2-C6;
 R6 se selecciona del grupo que comprende, preferiblemente que consiste en, hidrógeno, halógeno, ciano, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino;
 R7 y R8, independientemente entre sí, son hidrógeno o halógeno;
- 25 A se selecciona del grupo que comprende, preferiblemente que consiste en, arilo y heteroarilo;
 n es un número entero de 0 a 1.
3. El compuesto según la reivindicación 1 y 2, en el que:
- R1 es halógeno;
 R2 es halógeno;

R3 es hidrógeno;

R4 es halógeno;

R5 es alquilo de C2-C6;

R6 es hidrógeno;

5 R7 y R8 son hidrógeno;

A es fenilo o piridilo;

n es un número entero de 0 a 1.

4. El compuesto según la reivindicación 1 a 3, que se selecciona del grupo que consiste en:

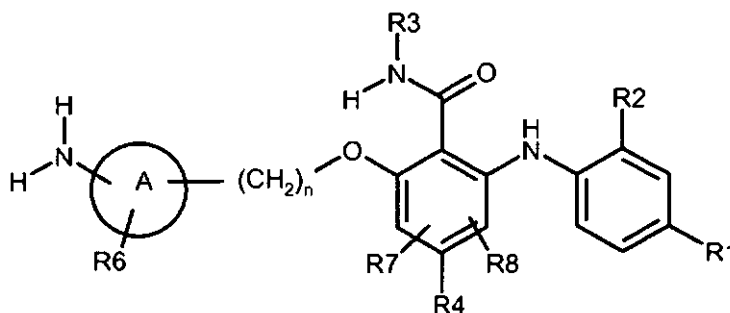
2-(3-etanosulfonilamino-fenoxi)-4-fluoro-6-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-benzamida;

10 4-fluoro-2-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6-[3-(propano-2-sulfonilamino)-fenoxi]-benzamida;

4-fluoro-2-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-6-[5-(propano-2-sulfonilamino)-piridin-3-iloxi]-benzamida; y

2-(3-etanosulfonilamino-benciloxi)-4-fluoro-6-(2-fluoro-4-yodo-fenilamino)-benzamida.

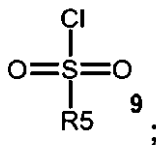
5. Un método para preparar un compuesto de fórmula general (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, comprendiendo dicho método la etapa de permitir que un compuesto intermedio de fórmula general 8:



8

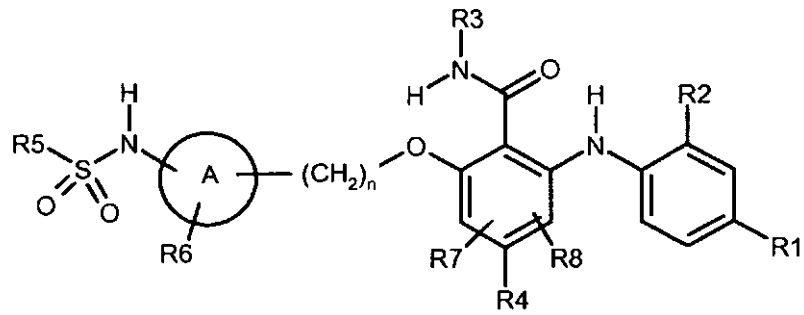
15

en la que R1, R2, R3, R4, R5, R7, R8, A y n son como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, reaccione en presencia de una base con un cloruro de sulfonilo de fórmula 9:



20

en la que R5 es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; para producir un compuesto de fórmula general (I):

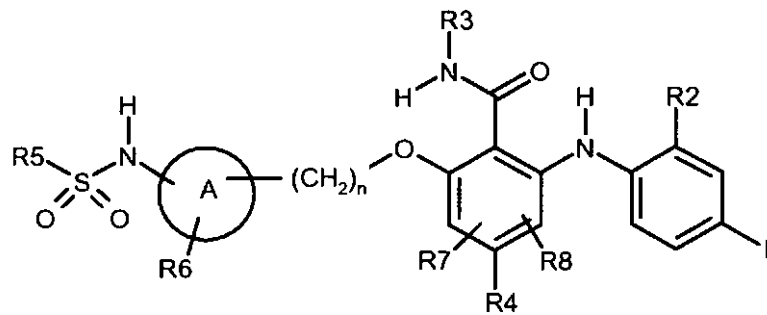


(I)

;

en la que R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, A y n son como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

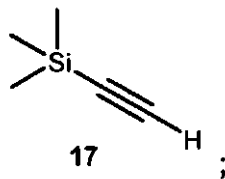
5 6. Un método para preparar un compuesto de fórmula general (Ib) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, comprendiendo dicho método la etapa de permitir que un compuesto intermedio de fórmula general (Ia):



(Ia)

;

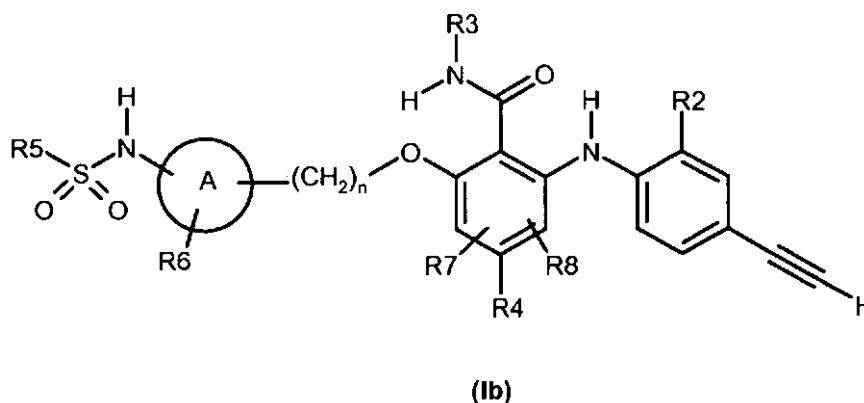
en la que R2, R3, R4, R5, R7, R8, A y n son como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, reaccione con un alquino de fórmula 17:



17

;

10 en presencia de un catalizador de Pd, yoduro de cobre y una base, opcionalmente seguido de la desililación para producir un compuesto de fórmula general (Ib):



en la que R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, A y n son como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

7. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un tautómero, estereoisómero, sal fisiológicamente aceptable, hidrato, solvato, metabolito, o profármaco del mismo, y un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. La composición farmacéutica según la reivindicación 7, en la que dicho compuesto está presente en una cantidad terapéuticamente eficaz.
9. La composición farmacéutica según la reivindicación 8, que comprende además al menos un compuesto activo adicional, en particular un agente antihiperproliferativo, un agente antiangiogénico, un inhibidor mitótico, un agente alquilante, un antimetabolito, un antibiótico intercalante de ADN, un inhibidor de factor de crecimiento, un inhibidor del ciclo celular, un inhibidor de enzima, un inhibidor de topoisomerasa, un modificador de la respuesta biológica, o una antihormona.
10. Uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la preparación de un medicamento para tratar un trastorno hiperproliferativo o crecimiento celular anormal en un mamífero.
11. El uso según la reivindicación 10, en el que dicho trastorno hiperproliferativo es cáncer, particularmente un cáncer de mama, del aparato respiratorio, del cerebro, de los órganos reproductivos, del aparato digestivo, del aparato urinario, del ojo, del hígado, de la piel, de cabeza y cuello, del sistema endocrino, o una metástasis distante de un tumor sólido.
12. El uso según la reivindicación 11, en el que dicho cáncer es un sarcoma, un melanoma o un cáncer hematológico, particularmente un cáncer hematológico que es linfoma, leucemia o mieloma múltiple.
13. Uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la preparación de un medicamento para tratar un trastorno angiogénico en un mamífero.
14. El uso según la reivindicación 10, en el que dicho trastorno hiperproliferativo es psoriasis, restenosis, enfermedad autoinmunitaria, aterosclerosis, artritis reumatoide, dolor crónico, dolor neuropático, osteoartritis, hiperplasia de próstata benigna, enfermedad hiperproliferativa del ojo.
15. El uso según la reivindicación 14, en el que dicha enfermedad hiperproliferativa del ojo es catarata, hipermitosis de células epiteliales conjuntivales o hiperplasia de células caliciformes.