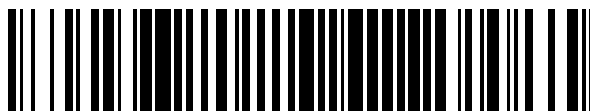


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 502 917**

51 Int. Cl.:

C07D 471/06 (2006.01)

C12R 1/04 (2006.01)

A61K 31/437 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12P 17/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2009 E 09791426 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014 EP 2340251**

54 Título: **Compuestos de pirrol[4,3,2-de]quinolin-8-amina y procedimientos de preparación y uso de los mismos**

30 Prioridad:

12.08.2008 US 88192 P
15.12.2008 US 122449 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.10.2014

73 Titular/es:

WYETH LLC (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017-5755, US

72 Inventor/es:

HE, MIN;
JANSO, JEFFREY EDWIN;
YU, KER;
MCDONALD, LEONARD ALEXANDER;
BARBIERI, LAUREL RITA y
GOPALSAMY, ARIAMALA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 502 917 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

Compuestos de pirrol[4,3,2-de]quinolin-8-amina y procedimientos de preparación y uso de los mismos.

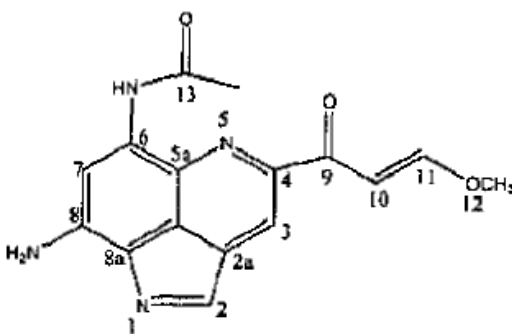
Campo de la invención

- La presente invención se refiere a compuestos de pirrol[4,3,2-de]quinolin-8-amina y a procedimientos de su uso y preparación. La invención también se refiere a especies de actinomicetos capaces de producir compuestos de pirrol[4,3,2-de]quinolin-8-amina.

Antecedentes de la invención

- Alcaloides aromáticos policíclicos derivados de plantas y animales marinos han mostrado que presentan una variedad de actividades biológicas. Por ejemplo, plaquinidinas, que son compuestos de pirroloacridina pentacíclicos, se derivan de esponja roja de Vanuatuán, Plakortis, y se ha mostrado que tienen actividad antihelmíntica en animales (patente de Estados Unidos nº 4.959.370).

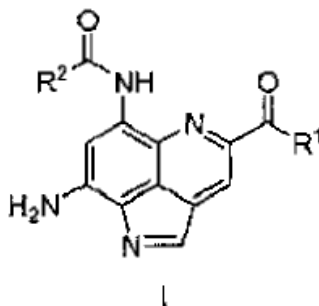
Limfostina es una pirrol[4,3,2-de]quinolin-8-amina producida por una bacteria del suelo que pertenece al género *Streptomyces* y se sugiere que tiene actividad inmunosupresora (patentes de Estados Unidos 5.843.955 y 6.815.449). La limfostina presenta la siguiente estructura:



- La patente de Estados Unidos 6.815.449 describe análogos sintéticos derivados de limfostina, la mayor parte de los cuales están modificados en la posición 4 de la molécula. La única variación en la posición 6 de limfostina dio lugar a reducción de casi diez veces en actividad inhibitoria de linfocitos (comparando el compuesto 1 con el 27 en la tabla 3 de la patente de Estados Unidos 6.815.449).
- Los solicitantes han desarrollado nuevos compuestos de pirrol[4,3,2-de]quinolin-8-amina que muestran de forma sorprendente potente actividad inhibitoria de mTOR, un serina/treonina quinasa que regula el crecimiento celular, la proliferación celular, motilidad celular, supervivencia celular, síntesis de proteínas y transcripción y de este modo está implicado en diversas rutas de cáncer.

Sumario de la invención

- La presente invención proporciona el compuesto (E)-N-(8-amino-4-(3-metoxiacrilóil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)isobutiramida; o un tautómero del mismo; o un estereoisómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto, estereoisómero o tautómero; composiciones de las mismas; procedimientos para la preparación de las mismas; y el compuesto, estereoisómero, tautómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en el tratamiento de cáncer.
- También se divulga el compuesto pirrol[4,3,2-de]quinolin-8-amina de fórmula I:



en la que,

R¹ es CH=CH-OCH₃ o (CH₂)₂OH; y

R² es alquilo C₁-C₄; o

un tautómero del mismo; un estereoisómero del mismo; o una sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto, estereoisómero o tautómero; a condición de que si R² es metilo, entonces R¹ es (CH₂)₂OH.

- 5 También se divulga una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula I, o un tautómero del mismo; un estereoisómero o sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto estereoisómero o tautómero y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se divulga una composición que comprende un compuesto aislado de fórmula I, o un tautómero del mismo; un estereoisómero del mismo; o una sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto, estereoisómero o tautómero.

10

También se divulga una cepa de actinomiceto aislada con el número de depósito NRRL 50168 o NRRL 50167.

También se divulga un compuesto de pirrol[4,3,2-de]quinolin-8-amina aislado, un tautómero del compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto o tautómero, en el que el compuesto se produce con una cepa de actinomicetes que presenta el número de depósito NRRL 50168 o NRRL 50167; a condición de que el compuesto no se limfostina.

15

También se divulga (a) un procedimiento para la preparación de un compuesto de pirrol[4,3,2-de]quinolin-8-amina, o (b) un compuesto de pirrol[4,3,2-de]quinolin-8-amina o un tautómero, estereoisómero o sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto, estereoisómero o tautómero, a condición de que el compuesto no sea limfostina, preparado mediante un procedimiento, que comprende

- 20 la fermentación de una cepa de actinomicetos que presenta el número de depósito NRRL 50168 o NRRL 50167 en un medio de cultivo que comprende una sal para formar una solución fermentada, en la que se forma el compuesto de pirrol[4,3,2-de]quinolin-8-amina en la solución fermentada, y

de forma opcional purificación del compuesto de pirrol[4,3,2-de]quinolin-8-amina.

- 25 También se divulga un compuesto seleccionado del grupo que consiste en (E)-N-(8-amino-4-(3-metoxiacrililoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)-propionamida; (E)-N-(8-amino-4-(3-metoxiacrililoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)-3-metilbutanamida; (E)-N-(8-amino-4-(3-metoxiacrililoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)-2-metilbutanamida; N-(8-amino-4-(3-hidroxiopropanoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)propionamida; N-(8-amino-4-(3-hidroxiopropanoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)isobutiramida; N-(8-amino-4-(3-hidroxiopropanoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)-3-metilbutanamida; N-(8-amino-4-(3-hidroxiopropanoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)-2-metilbutanamida; N-(8-amino-4-(3-hidroxiopropanoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)acetamida; o un tautómero del mismo; un estereoisómero del mismo; o una sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto estereoisómero o tautómero.

30

También se divulga un procedimiento de inhibición o tratamiento de un paciente que sufre de una enfermedad asociada con mTOR, en particular cáncer.

- 35 También se divulga una cepa de actinomicetos aislada que presenta el número de depósito NRRL 50168 o NRRL 50167. La invención también proporciona compuestos y composiciones producidas por dichas cepas y procedimientos para la preparación de los compuestos de fórmula I.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de las figuras

- 40 **Fig. 1A** representa la secuencia de ADN polinucleótida casi completa para el gen de ARNr 16S de la cepa actinomiceto DPJ-0019 (nº de depósito NRRL 50168) (ID SEC Nº 1).

Fig. 1B representa la secuencia de ADN polinucleótida casi completa para el gen de ARNr 16S de DPJ-0024 (nº de depósito NRRL 50167) (ID SEC Nº 2)

- 45 **Fig. 1C** representa una secuencia de ADN conservada en el gen de ARNr 16S de DPJ-0024 (ID SEC Nº 3), que no está presente en secuencias de gen de ARNr 16S de ARNr de *Salinispora arenicola* o *Salinispora tropica*.

Fig. 2 ilustra las relaciones filogenéticas de DPJ-0019 y DPJ-0024 con cepas de los dos *Salinispora spp*, *Salinispora arenicola* y *Salinispora tropica* actualmente aceptados. Se generó el árbol filogenético con secuencias de ADN de espaciador intergénico de 16S-23S completas. Se usó un procedimiento de unión por proximidad para calcular valores de distancias Bootstrap con 1000 réplicas y se muestran en sus nodos respectivos si el valor es mayor que o igual a 50%. Se usó *Actinomadura madurae* como un grupo saliente.

50

Fig. 3 es un alineamiento que compara las secuencias de ADN de polinucleótidos de genes de ARNr 16S de *Salinispora spp S arenicola* (ID SEC N° 6) y *S tropica* (ID SEC N° 7) con DPJ-0024 (ID SEC N° 2) y DPJ-0019 (ID SEC N° 1).

Descripción detallada

5 Definiciones:

"Alquilo" se refiere a grupos hidrocarbilo alifáticos saturados monovalentes que presentan de 1 a 6 átomos de carbono (alquilo C₁-C₆), y preferiblemente de 1 a 4 átomos de carbono (alquilo C₁-C₄). Este término incluye, a modo de grupos hidrocarbilo lineales y ramificados ejemplo tales como metilo (CH₃-), etilo (CH₃CH₂-), n-propilo (CH₃CH₂CH₂-), isopropilo ((CH₃)₂CH-), n-butilo (CH₃CH₂CH₂CH₂-), isobutilo ((CH₃)₂CHCH₂-), sec-butilo ((CH₃)(CH₃CH₂)CH-), y t-butilo ((CH₃)₃C-).

"Hidroxil" se refiere al grupo -OH.

"Metoxil" se refiere al grupo -OCH₃.

"Estereoisómero" se refiere a compuestos que difieren en la quiralidad o conectividad atómica en uno o más estereocentros. Estereoisómeros incluyen enantiómeros, diastereómeros así como también isomerismo cis-trans (E/Z).

En diversos sitios en la presente memoria descriptiva se divulgan sustituyentes de compuestos en grupos o en intervalos. Se pretende de forma específica que la descripción incluya cada una de las sub-combinaciones individuales de los miembros de tales grupos e intervalos. Por ejemplo, el término "alquilo C₁₋₄" se pretende específicamente que describa individualmente C₁, C₂, C₃, C₄, C₁-C₄, C₁-C₃, C₁-C₂, C₂-C₄, C₂-C₃ y C₃-C₄.

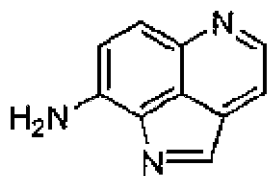
"Tautómero" se refiere a formas alternativas de un compuesto que difieren en la posición de un protón, tal como enol-ceto y tautómeros de imina-enamina, o las formas tautoméricas de grupos heteroarilo que contienen un átomo de anillo unido tanto a un resto -NH- del anillo como a un resto =N- del anillo tal como imidazoles, bencimidazoles, triazoles y tetrazoles.

"Paciente" o "sujeto" se refiere a mamíferos e incluye humanos y mamíferos no humanos tales como perros, gatos, ratones, ratas, vacas, conejos y monos, preferiblemente humanos.

Tal como se usa en esta invención, un compuesto "aislado" es un compuesto que está: bien en forma sustancialmente pura, por ejemplo, en más de aproximadamente 95% de pureza; o no en la presencia de o en contacto con una cepa de actinomicetos de tipo salvaje. Una cepa "aislada" indica una cepa que se recoge de su ambiente natural y/o en un medio de cultivo para fermentación.

Tal como se usa en esta invención, el término "fermentar" o "fermentación" de una cepa bacteriana se refiere al cultivo de esa cepa y/o facilitación de producción biosintética de compuestos, tales como producción de actinomicetos de compuestos de pirrol[4,3,2-de]quinolin-8-amina.

Un compuesto de "pirrol[4,3,2-de]quinolin-8-amina" presenta la siguiente estructura del núcleo:



"Sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales farmacéuticamente aceptables de un compuesto, cuyas sales se derivan de una variedad de contraiones orgánicos e inorgánicos bien conocidos en la técnica e incluye, a modo de ejemplo únicamente, sodio, aluminio, litio, cinc, sales de dietanolamina, potasio, calcio, magnesio, amonio, y tetraalquilamonio, y cuando la molécula contiene una funcionalidad básica, sales de ácidos orgánicos o inorgánicos tales como, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, nitrato, sulfato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, acetato, lactato, salicilato, citrato, tartrato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucaronato, sacarato, formato, benzoato, besilato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y pamoato (es decir, sales de 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Ciertos compuestos de la invención pueden formar sales farmacéuticamente aceptables con diversos aminoácidos también. Para una revisión de sales farmacéuticamente aceptables véase BERGE Y COL, 66 J PHARM SCI 1-19 (1977).

Las sales farmacéuticamente aceptables se preparan mediante la puesta en contacto de un compuesto tal como el compuesto de fórmula (I) con un ácido o sal tal como, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido bórico, ácido perclórico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido metanosulfónico, ácido ascórbico, yoduro de sodio y similares. Un disolvente usado se puede seleccionar de cetonas tales como acetona,

dietilcetona, metiletilcetona o sus mezclas, metanol, etanol, n-hexano, etilacetato, benceno, dietilamina, formaldehído, cloroformo, diclorometano o mezcla de los mismos.

“Tratar” o “tratamiento” de una enfermedad en un sujeto se refiere a: inhibición de la enfermedad o restricción de su desarrollo, mejora de un síntoma de la enfermedad, o provocar la regresión de la enfermedad. De acuerdo con lo anterior, “tratamiento de cáncer” tal como se usa en esta invención comprende mejora de síntomas asociados con el cáncer.

“Modular la actividad de mTOR” se refiere a afectar (es decir, inhibición o estimulación) proceso o eventos de señalización asociados con la quinasa mTOR.

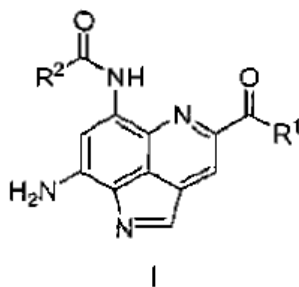
La referencia a la “ausencia de sodio” indica la ausencia de metal sodio tal cual o cualquier compuesto que contenga sodio (por ejemplo, cloruro de sodio).

Tal como se usa en esta invención el término “vehículo farmacéuticamente aceptable” significa una carga no tóxica, sólida inerte, semisólida o líquida, diluyente, material de encapsulamiento o formulación auxiliar de cualquier tipo. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables son azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa, almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata, celulosa y sus derivados tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa, tragacanto en polvo, malta, gelatina, excipientes de talco tales como manteca cacao y ceras para supositorios, aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de haba de soja, glicoles, tal como un propilenglicol, ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo, agar, agentes tamponantes tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio, ácido algínico, agua sin pirógenos, solución salina isotónica, alcohol etílico y soluciones de tampón fosfato, así como también otros lubricantes compatibles no tóxicos tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como también agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes y agentes perfumantes, pueden estar también presentes en la composición conservantes y antioxidantes, a juicio del formulador. Se divulgan otros excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados en “Remington's Pharmaceutical Sciences,” Mack Pub Co, Nueva Jersey, 1991.

A la cepa “DPJ-0019” se ha asignado el número de acceso de Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL) NRRL 50168. A la cepa “DPJ-0024” se ha asignado el número de acceso de Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL) NRRL 50167.

La invención se refiere al compuesto (E)-N-(8-amino-4-(3-metoxiacrililo)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)isobutiramida; o un tautómero del mismo; o un estereoisómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto, estereoisómero o tautómero.

También se divulga un compuesto de fórmula I



en la que,

R^1 es $\text{CH}=\text{CH}-\text{OCH}_3$ o $(\text{CH}_2)_2\text{OH}$; y

R^2 es alquilo C_1-C_4 o

o un tautómero del mismo; un estereoisómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto, estereoisómero o tautómero, a condición de que si R^2 es metilo, entonces R^1 sea $(\text{CH}_2)_2\text{OH}$.

Se divulga una realización donde R^1 es $\text{CH}=\text{CH}-\text{OCH}_3$. Se divulga una realización donde R^1 es $\text{CH}=\text{CH}-\text{OCH}_3$ y R^2 es etilo, isopropilo, isobutilo y sec-butilo. Se divulga una realización donde R^2 alquilo C_2-C_4 . Se divulga una realización donde R^1 es $(\text{CH}_2)_2\text{OH}$. Se divulga una realización donde R^1 es $(\text{CH}_2)_2\text{OH}$ y R^2 es metilo. Se divulga una realización donde R^1 es $(\text{CH}_2)_2\text{OH}$ y R^2 se selecciona del grupo que consiste en metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, isobutilo y sec-butilo. Se divulga una realización donde R^2 es isopropilo. Se divulga una realización donde R^1 es $\text{CH}=\text{CH}-\text{OCH}_3$ y R^2 es etilo o isopropilo. Se divulga una realización donde R^1 es $(\text{CH}_2)_2\text{OH}$ y R^2 es metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, isobutilo o sec-butilo.

- También se divulga un compuesto seleccionado del grupo que consiste en (E)-N-(8-amino-4-(3-metoxiacrililoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)-propionamida; (E)-N-(8-amino-4-(3-metoxiacrililoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)-3-metilbutanamida; (E)-N-(8-amino-4-(3-metoxiacrililoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)-2-metilbutanamida; N-(8-amino-4-(3-hidroxiopropanoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)propionamida; N-(8-amino-4-(3-hidroxiopropanoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)isobutiramida; N-(8-amino-4-(3-hidroxiopropanoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)-3-metilbutanamida; N-(8-amino-4-(3-hidroxiopropanoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)-2-metilbutanamida; N-(8-amino-4-(3-hidroxiopropanoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)acetamida; o un tautómero del mismo; un estereoisómero del mismo; o una sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto, estereoisómero o tautómero.
- 10 También se divulga una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un compuesto de fórmula I como se divulga en esta invención, o un tautómero del mismo; un estereoisómero del mismo; o una sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto, estereoisómero o tautómero.
- Otra realización de la invención proporciona una composición que comprende (E)-N-(8-amino-4-(3-metoxiacrililoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)isobutiramida; o un tautómero del mismo; un estereoisómero del mismo; o una sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto, estereoisómero o tautómero.
- 15 También se divulga una cepa de actinomicetos aislada caracterizada por una secuencia de gen 16S de ARNr que comprende al menos 99,9% de homología con la ID SEC Nº 1 y
- en la que dicha cepa de actinomicetos es capaz de crecer en ausencia de sodio. También se divulga un actinomiceto aislado que presenta el número de acceso de Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL) NRRL 50168
- 20 Otra realización de la invención proporciona un compuesto de fórmula I como se describe en esta invención, un tautómero del compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto o tautómero, en la que el compuesto es producido por una cepa de actinomicetos que presenta el número de acceso de Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL) NRRL 50168, siendo el compuesto de fórmula I: (E)-N-(8-amino-4-(3-metoxiacrililoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)isobutiramida; o un tautómero del mismo; un estereoisómero del mismo; o una sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto, estereoisómero o tautómero.
- 25 También se divulga una cepa de actinomicetos aislada caracterizada por una secuencia de gen 16S de ARNr que comprende al menos 99,9% de homología con la ID SEC Nº 2; a condición de que la secuencia de gen 16S de ARNr comprende ID SEC Nº 3.
- También se divulga una cepa de actinomicetos aislada que presenta el número de acceso de Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL) NRRL 50167.
- 30 Otra realización de la invención proporciona (E)-N-(8-amino-4-(3-metoxiacrililoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)isobutiramida, un tautómero del compuesto; o una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto o tautómero, en la que el compuesto es producido por una cepa de actinomicetos que presenta el número de acceso de Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL) NRRL 50167.
- 35 También se divulga un compuesto aislado de fórmula I como se divulga en esta invención, un tautómero del compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto o tautómero, en la que el compuesto es producido por una cepa de actinomicetos descrita en esta invención. En una realización descrita, el compuesto de fórmula I se selecciona del grupo que consiste en:
- (E)-N-(8-amino-4-(3-metoxiacrililoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)-propionamida;
- 40 (E)-N-(8-amino-4-(3-metoxiacrililoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)-3-metilbutanamida;
- (E)-N-(8-amino-4-(3-metoxiacrililoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)-2-metilbutanamida;
- N-(8-amino-4-(3-hidroxiopropanoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)propionamida;
- N-(8-amino-4-(3-hidroxiopropanoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)isobutiramida;
- N-(8-amino-4-(3-hidroxiopropanoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)-3-metilbutanamida;
- 45 N-(8-amino-4-(3-hidroxiopropanoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)-2-metilbutanamida; y
- N-(8-amino-4-(3-hidroxiopropanoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)acetamida; o
- un tautómero del mismo; o un estereoisómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto, estereoisómero o tautómero.
- Otra realización de la invención proporciona (E)-N-(8-amino-4-(3-metoxiacrililoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)isobutiramida; o
- 50

un tautómero del mismo; un estereoisómero del mismo; o una sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto, estereoisómero o tautómero para uso en el tratamiento de cáncer.

En otra realización, el paciente sufre de cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer gástrico, carcinoma de tiroides, carcinoma de células renales, cáncer de lengua, carcinoma de vejiga, carcinoma de cilio, hepatoma, cáncer de próstata, carcinoma de útero, cáncer de faringe, cáncer de pulmón, cáncer de mama, melanoma maligno, granuloma, sarcoma de Kaposi, cáncer de cerebro, neuroblastoma, cáncer de ovarios, cáncer de testículos, cáncer de páncreas, hipernefoma, hemangioendotelioma, leucemia de células T adultas (ATL), leucemia mielogenosa crónica (CML), leucemia mielogenosa aguda (AML) o mieloma múltiple.

También se divulga un procedimiento de inhibición de mTOR que comprende poner en contacto una célula con un compuesto de fórmula I como se divulga en esta invención, un tautómero del mismo; un estereoisómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto, estereoisómero o tautómero.

También se divulga un procedimiento de tratamiento de un paciente que sufre de una afección mediada por mTOR que comprende la administración de un compuesto de fórmula I como se divulga en esta invención, un tautómero del mismo; un estereoisómero del mismo; o una sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto, estereoisómero o tautómero.

Otro aspecto de la invención proporciona un procedimiento para la preparación de (E)-N-(8-amino-4-(3-metoxiacrililoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)isobutiramida, que comprende:

fermentación de una cepa de actinomicetos que presenta el número de acceso de Agricultural Research Service Culture Collection nº NRRL 50168 en un medio de cultivo que comprende una sal para formar una solución fermentada, en la que el compuesto se forma en la solución fermentada; y

de forma opcional purificación del compuesto.

De forma más particular, el procedimiento comprende la extracción del compuesto de la solución contactada. Más particularmente aún, el procedimiento comprende adicionalmente:

centrifugación de la solución fermentada para formar un sobrenadante y un sedimento;

separación del agregado del sobrenadante; y

extracción del compuesto en el sedimento.

En otro aspecto del procedimiento, la sal no es cloruro de sodio (NaCl). De forma más particular la sal es cloruro de potasio (KCl). En otra realización, la sal es cloruro de sodio (NaCl). En otra realización, el procedimiento comprende además la homogenización de una muestra de tejido que comprende células de la cepa actinomicetos, antes de la etapa de puesta en contacto. En otra realización, el procedimiento comprende además una etapa de lisado de las células directamente tras la etapa de separación. En otra realización, el procedimiento comprende además el lavado del agregado con una solución acuosa antes de la etapa de extracción. En otra realización la etapa de extracción comprende poner en contacto el agregado con una solución orgánica. En otra realización, la solución orgánica comprende acetato de etilo.

Una realización más particular del procedimiento comprende la etapa de purificación, en la que la purificación comprende cromatografía líquida a alta presión (HPLC). De forma más particular, la etapa de purificación comprende HPLC de fase inversa. De forma alternativa o adicional, la etapa de purificación comprende HPLC de fase normal. Más particularmente, HPLC de fase normal se lleva a cabo en una columna Diol. Aún más particularmente, la fase normal comprende un sistema de gradiente de disolvente que comprende aproximadamente de 0% a aproximadamente 10% de isopropanol en una mezcla de tolueno / acetato de etilo. En otra realización, se lleva a cabo la HPLC de fase inversa en una columna ODS. De forma más particular, la fase inversa comprende acetonitrilo y agua.

En otra realización la etapa de purificación comprende HPLC de fase normal, llevada a cabo en una columna Diol.

En otra realización el medio de crecimiento comprende adicionalmente glucosa. En otra realización, el medio de cultivo comprende adicionalmente un precursor específico para (E)-N-(8-amino-4-(3-metoxiacrililoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)isobutiramida.

También se divulga un compuesto de pirrol[4,3,2-de]quinolin-8-amina preparado con el procedimiento descrito anteriormente, a condición de que el compuesto no sea limfostina. Se divulga una realización en la que el compuesto de pirrol[4,3,2-de]quinolin-8-amina se selecciona del grupo que consiste en:

(E)-N-(8-amino-4-(3-metoxiacrililoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)-propionamida;

(E)-N-(8-amino-4-(3-metoxiacrililoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)-3-metilbutanamida;

(E)-N-(8-amino-4-(3-metoxiacrilóil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)-2-metilbutanamida;

N-(8-amino-4-(3-hidroxipropanoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)propionamida;

N-(8-amino-4-(3-hidroxipropanoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)isobutiramida;

N-(8-amino-4-(3-hidroxipropanoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)-3-metilbutanamida;

5 N-(8-amino-4-(3-hidroxipropanoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)-2-metilbutanamida;

N-(8-amino-4-(3-hidroxipropanoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)acetamida; o

un tautómero del mismo; o un estereoisómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto, estereoisómero o tautómero.

10 También se divulga un procedimiento para la preparación de un compuesto de pirrol[4,3,2-de]quinolin-8-amina que comprende:

poner en contacto células de *Didemnum proliferum* ascidiáceo con un medio de cultivo que comprende una sal para formar una solución en contacto;

centrifugación de la solución en contacto para formar un sobrenadante y un agregado;

separación del agregado del sobrenadante; y

15 extracción del compuesto de pirrol[4,3,2-de]quinolin-8-amina en el agregado.

Más particularmente el procedimiento comprende además una etapa de purificación del compuesto de pirrol[4,3,2-de]quinolin-8-amina tras la etapa de extracción.

20 Los compuestos de la presente invención se pueden administrar a seres humanos y otros animales por vía oral, parenteral, sublingual, por aerosolización o aerosol para inhalación, por vía rectal, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, bucal, intravenosa, subcutánea, intratecal, o por vía tópica en formulaciones de unidad de dosificación que contienen vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales, adyuvantes, y vehículos según se desee. La administración por vía tópica puede también implicar el uso de administración por vía transdérmica tal como parches transdérmicos o dispositivos de ionoforesis. El término parenteral tal como se usa en esta invención incluye inyecciones por vía subcutánea, inyección por vía intravenosa, intramuscular, intrasternal, o técnicas de infusión.

25 Son bien conocidos en la técnica procedimientos de formulación y se divulgan, por ejemplo, en Remington The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 19ª edición (1995). Composiciones farmacéuticas para uso en la presente invención pueden ser en la forma de soluciones o suspensiones líquidas no pirogénicas estériles, cápsulas recubiertas, supositorios, polvos liofilizados, parches para vía transdérmica u otras formas conocidas en la técnica.

30 Se pueden formular preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles de acuerdo con la técnica conocida usando agentes de dispersión o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril puede ser también una solución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una solución en 1,3-propanodiol o 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden usar están agua, solución de Ringer, USP y solución de cloruro de sodio isotónica. Además aceites estériles fijados se usan convencionalmente como un disolvente o medio de suspensión. Para este fin se puede usar cualquier aceite fijado blando incluyendo mono- o di-glicéridos sintéticos. Además ácidos grasos tales como ácido oleico son de uso en la preparación de inyectables. Se pueden esterilizar formulaciones inyectables, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o mediante incorporación de agentes esterilizantes en la forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver o dispersar en agua estéril o cualquier otro medio inyectable antes del uso.

35 Con el fin de prolongar el efecto de un fármaco es frecuentemente deseable ralentizar la absorción del fármaco de inyección por vía subcutánea o intramuscular. Esto se puede conseguir con el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con solubilidad pobre en agua. La tasa de absorción del fármaco depende entonces de su tasa de disolución que, en cambio, puede depender del tamaño de cristal y de la forma cristalina. De forma alternativa la absorción retardada de una forma de fármaco administrado por vía parenteral se puede conseguir por disolución o suspensión del fármaco en un vehículo de aceite. Las formas de depósito inyectables se preparan formando matrices de microcápsula del fármaco en polímeros biodegradables tales como poliactida-poliglicolida. En función de la relación de fármaco a polímero y de la naturaleza del polímero particular usado, se puede controlar la

40

45

50

tasa de liberación de fármaco. Ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y

poli(anhídridos). Se pueden preparar también formulaciones inyectables de depósito atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones, que son compatibles con tejidos corporales.

Formas de dosificación sólidas para administración por vía oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En tales formas de dosificación sólidas, el compuesto activo se mezcla con al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable inerte tal como citrato de sodio o fosfato de dicalcio y/o a) cargas o extensores tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y ácido silícico, b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa, y goma arábiga, c) humectantes tales como glicerina, d) agentes disgregantes tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos, y carbonato de sodio, e) agentes que retardan la solución tales como parafina, f) aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario, g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol acetílico y monoestearato de glicerina, h) absorbentes tales como caolín y arcilla de bentonita, e i) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio, y mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosificación puede comprender también agentes tamponantes.

Se pueden usar también composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina blanda y dura rellenas usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche así como también polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, cápsulas, píldoras y gránulos se pueden preparar con recubrimientos y envolturas tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. Estas pueden contener opcionalmente agentes de opacidad y pueden ser también de una composición que liberen el(los) principio(s) activo(s) solamente, o preferencialmente, en una cierta parte del tracto intestinal, de forma opcional, de una forma retardada. Ejemplos de composiciones embebidas que se pueden usar incluyen sustancias poliméricas y ceras.

Los compuestos activos pueden estar también en forma micro-encapsulada con uno o varios excipientes como se observó anteriormente. Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, cápsulas, píldoras y gránulos se pueden preparar con recubrimientos y envolturas tales como recubrimientos entéricos, recubrimientos de control de la liberación y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. En tales formas de dosificación sólidas el compuesto activo se puede mezclar con al menos un diluyente inerte tal como sacarosa, lactosa o almidón. Tales formas de dosificación pueden comprender también, como es práctica normal, sustancias adicionales distintas de diluyentes inertes, por ejemplo, lubricantes para formación de comprimidos y otros adyuvantes de formación de comprimidos tales como estearato de magnesio y celulosa microcristalina. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas de dosificación pueden comprender también agentes tamponantes. Estos pueden contener de forma opcional agentes de opacidad y pueden ser también de una composición que liberen el(los) ingrediente(s) activo(s) solamente, o preferencialmente, en una cierta parte del tracto intestinal, de forma opcional, en una forma retardada. Ejemplos de composiciones para embebida que se pueden usar incluyen sustancias poliméricas y ceras.

Formas de dosificación líquidas para administración por vía oral incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes habitualmente usados en la técnica tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, EtOAc, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerina, alcohol tetrahidrofurfúrico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de los mismos. Además de diluyentes inertes, las composiciones para vía oral pueden incluir también adyuvantes como agentes humectantes, emulsionantes y de suspensión, edulcorantes y agentes perfumantes.

Formas de dosificación para administración por vía tópica o transdérmica de un compuesto de esta invención incluye ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones en polvo, aerosoles, inhalantes o parches. El componente activo se mezcla en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y cualquier conservante necesario o tampones según se requiera. Formulaciones oftálmicas, gotas para oídos y similares se contemplan también dentro del alcance de esta invención.

Se pueden formular también composiciones de la invención para liberación como un aerosol líquido o polvo seco inhalable. Las formulaciones en aerosol líquidas se pueden nebulizar de forma predominante en tamaños de partícula que se puedan liberar a los bronquiolos terminales y respiratorios.

Cantidades efectivas de los compuestos de la invención incluyen por lo general cualquier cantidad suficiente para modular de forma detectable la actividad de mTOR, o para alivio de síntomas de enfermedades asociadas con la actividad de mTOR o susceptible de modulación de la actividad de mTOR. Una dosis efectiva será por lo general una dosis diaria total administrada a un huésped en dosis única o dividida y puede estar en cantidades, por ejemplo, de 0,001 a 1000 mg/kg de peso corporal al día y más preferiblemente de 1,0 a 30 mg/kg de peso corporal al día. Las composiciones unitarias de dosificación pueden contener cantidades tales de submúltiplos de los mismos y cumplir

la dosis diaria. En general los regímenes de tratamiento de acuerdo con la presente invención comprenden la administración a un paciente en necesidad de tal tratamiento de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 2000 mg del (de los) compuesto(s) de esta invención al día en dosis única o múltiples.

- La cantidad de principio activo que se puede combinar con los materiales vehículo para producir una forma de dosificación única variará en función del huésped tratado y del modo particular de administración. Se entenderá, sin embargo, que el nivel de dosis específica para cualquier sujeto particular dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico usado, la edad, el peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, ruta de administración, tasa de excreción, combinación de fármaco, y la gravedad de la enfermedad particular que se somete a terapia. La cantidad terapéuticamente efectiva para una situación dada puede determinarse fácilmente por experimentación rutinaria y se encuentra dentro del juicio del facultativo ordinario.

También se describen kits que incluyen uno o más compuestos de la invención. Kits representativos incluyen un compuesto inhibidor de mTOR de la invención (por ejemplo, un compuesto de fórmula I) y un inserto de envase u otros etiquetados que incluyan directrices para el tratamiento de cáncer por administración de una cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención.

- Se entiende que la invención no está limitada a las realizaciones indicadas en la misma a título ilustrativo, sino que comprende todas las formas de la misma tal como vienen dentro del alcance de la anterior descripción.

Ejemplos

- Depósitos: se depositaron cepas de actinomicetos DPJ-0019 y DPJ-0024 el 14 de Agosto de 2008 con Agricultural Research Service (ARS) Culture Collection, alojado en la Microbial Genomics and Bioprocessing Research Unit del National Center for Agricultural Utilization Research (NCAUR), bajo las estipulaciones del Tratado de Budapest. La Dirección de NCAUR es 1815 N University Street, Peoria IL 61604. A la cepa DPJ-0019 le fue asignada el nº de depósito de patente NRRL 50168. A la cepa DPJ-0024 le fue asignada el nº de depósito de patente NRRL 50167.

Ejemplo 1: aislamiento e identificación de cepa de actinomicetos marinos DPJ-0024 y DPJ-0019

- Se aislaron cepas bacterianas DPJ-0024 y DPJ-0019 de *Didemnum proferum* Kott ascidiáceo recogido por SCUBA en Shishijima Island, Japón. Se maceraron a partir de una muestra congelada, 120 mg de tejido de núcleo interior en 1 ml de agua de mar estéril. Se dispuso la suspensión homogenizada resultante en dos medios selectivos. Las placas se examinaron periódicamente en relación a la presencia de colonias de actinomicetos. Se transfirieron aislados a medio de agar fresco.

- Se llevaron a cabo ensayos de cultivo dependientes de sal en medio M1 suplementado con diferentes sales, incluyendo sodio, potasio, cesio, rubidio, y litio. Para este ensayo se cultivaron cepas DPJ-0024 y DPJ-0019 en medio líquido que contiene sales de mar durante 4 días. Se cosecharon micelias de cada cepa, se lavaron tres veces con glucosa al 10,3% y se resuspendieron en la misma solución. Se diluyeron 10 µl de cada cepa en placas de agar M1 suplementadas con diferentes sales y se incubó a 28° C durante cuatro a ocho semanas. DPJ-0024 solo creció en M1 suplementado con NaCl 0,4 M o 0,45 M, lo que sugiere que es una cepa que requiere sodio de forma obligada. Se observó el crecimiento de DPJ-0019 en M1 suplementado con KCl 0,45 M, así como también en M1 suplementado con NaCl 0,4 M o 0,45 M. Subcultivos adicionales de colonias de DPJ-0019 de M1 agar con KCl 0,45 M confirmaron que el suplemento de KCl 0,45 M es suficiente para soportar el cultivo de DPJ-0019 en medio M1 sólido y líquido. Estos resultados indican que DPJ-0019 no es una cepa que requiera sodio de forma obligatoria.

- Se aisló el ADN cromosomal de un cultivo en agar de DPJ-0024 y DPJ-0019 usando lisozima, lisis de células SDS seguido de una precipitación en fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. El 16S ARNr casi completo se amplificó por PCR usando cebadores parciales de 8FPL y 1492RPL. La secuencia génica (ADNr) de 16S ARNr casi completa de la cepa DPJ-0024 compartía el 99,2% de identidad con la de *Salinispora arenicola* y 99,4% de identidad con la de *Salinispora tropica* en la base de datos GenBank (véase alineamiento en la FIG. 3). Sin embargo el ADNr de DPJ-0024 no presenta adenosina en la posición 198 (que corresponde a la posición 207 análoga de la secuencia 16S ARNr de *E. coli*), que es uno de los cuatro nucleótidos distintivos únicos que se conservaban en todas las cepas de *Salinispora* reportadas actualmente. La secuencia de 16S ADNr de DPJ-0019 comparte el 99,2% de identidad con la de *Salinispora arenicola* y 99,6% de identidad con la de *Salinispora tropica* en la base de datos GenBank, y tiene todos los cuatro nucleótidos distintivos de *Salinispora* (FIG. 3). La secuencia génica de ARNr de la región espaciadora intergénica de 16S-23S de DPJ-0019 y DPJ-0024 se amplificaron también usando cebadores 16S-1525F: GGTTGGATCCACCTCCTT (ID SEC Nº 4) y de 23S-40R: TCCCACGTCTTCAT CGG (ID SEC Nº 5). Se llevó a cabo un alineamiento de las secuencias de ADNr de la región espaciadora intergénica de 16S- 23S con ClustalX e incluía diversas secuencias de especies de *Salinispora*. A partir del alineamiento se construyó un filograma para demostrar las interrelaciones filogenéticas. Se encontró una distinción clara entre *Salinispora sp* y el grupo que consiste en DPJ-0019 y DPJ-0024 (FIG. 2).

- Los resultados del ensayo de cultivo fisiológico, comparación de secuencias génicas de 16S ARNr y secuencia génica de ARNr de espaciador intergénico de 16S-23S revelaron que DPJ-0024 y DPJ-0019 están relacionadas con *Salinispora spp*, un género publicado recientemente que muestra un requerimiento obligado de sodio para cultivo y

cuatro nucleótidos distintivos de 16S ARNr únicos. Sin embargo DPJ-0024 es claramente distinguible de las cepas de *Salinispora* descritas previamente en base al hecho de que no presenta uno de los cuatro nucleótidos distintivos de 16S ARNr únicos (A 207). DPJ-0019 presenta los cuatro nucleótidos distintivos de 16S ARNr únicos para *Salinispora* spp, aún no presentando un requerimiento obligado de sodio para cultivo. Además las secuencias espaciadoras transcritas internas de 16S-23S de DPJ-0019 y DPJ-0024 indican claramente que estas dos cepas forman un grupo único distinguible de la especie *Salinispora* descrita. Por tanto, DPJ-0019 y DPJ-0024 pertenecen a la familia *Micromonosporaceae*, estando clasificada taxonómicamente como un grupo que está estrechamente relacionado aun siendo distinguible de la otra *Salinispora* sp

Ejemplo 2: fermentación de las cepas DPJ-0024 y DPJ-0019

- 10 Cultivo de semilla: se usó un bucle de cultivo en agar o 20 µl de cultivo conservado criogénicamente para inocular 7 ml de medio WSB4YE1/2SS estéril y se propagó en un agitador rotatorio a 28° C y 200 rpm durante 72-96 h. El medio WSB4YE1/2SS consiste en 20 g/l de glucosa, 5 g/l de WGE80M (hidrolizado de trigo), 15 g/l de SE50MAF (hidrolizado de soja), 3 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de almidón soluble, a pH 7,0.

- 15 Fermentación: tras inoculación a partir de un cultivo de semilla de WSB4YE1/2SS, se propagó la cepa DPJ-0024 o DPJ-0019 en frascos Erlenmeyer de 250 ml que contienen 50 ml de medio de fermentación M48-9 y se cultivó en un agitador rotatorio a 28° C y 200 rpm durante 7 a 14 días. El medio M48-9 consiste en 30 g/l de almidón soluble, 20 g/l de molasa, 7,5 g/l de peptona de soja, 2,5 g/l de extracto de levadura, HP20 - 10% (p/v), a pH 7,0.

- 20 Procesamiento de muestra para análisis por CLEM: se centrifugó 2 ml de caldo de cultivo, se descargó el sobrenadante, y se extrajo el agregado (micelia + HP20) con acetato de etilo dos veces (2 ml cada vez, 4 ml en total). Se secaron los extractos resultantes a vacío, se redisolviaron en 200 µl de acetonitrilo y se transfirió a tubos de EP pequeños. Se centrifugó la mezcla a la mayor velocidad durante ~5 min para agregar cualquier precipitado – se transfirió 100 µl de extracto claro a un vial de vidrio pequeño con inserto para CL/EM.

Ejemplo 3: análisis por CLEM analítico de metabolitos alcaloides tricíclicos producidos por DPJ-0019 y DPJ-0024

- 25 Se analizaron muestras (2 µl) usando un modelo de cromatografía líquida HP1100 de Hewlett Packard con fotodiodo en tándem y detección por espectrometría de masas. Se resolvieron los compuestos en una columna de HPLC C18 YMC ODS- A 2,0 x 100 mm C18 usando gradiente lineal a partir de 10 a 50% de fase móvil B (0,05% de ácido fórmico en acetonitrilo) en fase móvil A (0,05% de ácido fórmico en agua) durante 15 minutos. El caudal era de 0,3 ml/min. Se registró un cromatograma UV de barrido total en un intervalo de barrido de 210 a 600 nanómetros. Se registraron espectros UV en todo el ensayo desde 210 a 600 nanómetros con etapa de barrido de 2 nanómetros. Tras emergencia desde la celda de flujo UV, la corriente de efluente entró en un espectrómetro de masas con trampa de iones Thermo Finnigan DECA. El espectrómetro de masas estaba equipado con una sonda de ionización por electropulverización (ESI) y era operado en modo de barrido completo de ion positivo e ion negativo alternativamente (150-1500 unidades de masa). El voltaje de la aguja de pulverización se fijó en 4,5 kV para positivo y 4,5 kV para negativo. Se fijaron los voltajes capilares en 24 v y -47 v para positivo y negativo, respectivamente. La temperatura del capilar se estableció en 275° C. Se usó nitrógeno como el gas de cubierta que se fijó en 40 unidades.

Ejemplo 4: esquema general para el aislamiento y purificación de alcaloides tricíclicos.

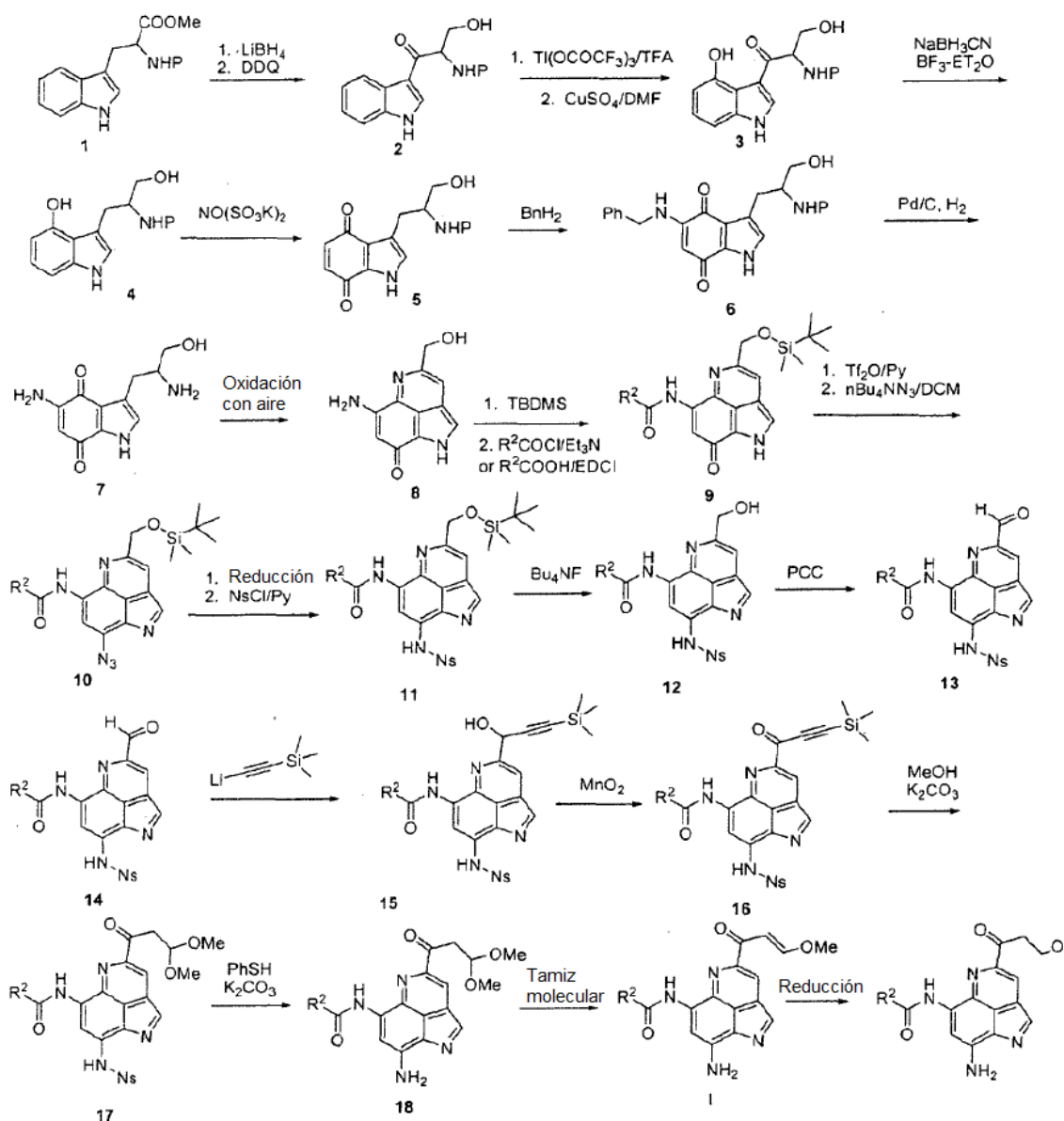
- 40 Se purificaron los compuestos números 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 enumerados en la tabla 1, así como también limfostina, a partir del caldo cultivado de DPJ-0019. Se centrifugó el cultivo de fermentación y se extrajeron los compuestos del agregado lavado con agua de los sólidos de fermentación usando acetato de etilo. Se secó el extracto a presión reducida para formar un residuo que se adsorbía en gel de sílice y se desorbía con lavados constituidos por isopropanol:tolueno:acetato de etilo, 5:32:63 y 10:30:60. Se secaron por separado las aguas de lavado para formar residuos de mezclas análogas concentradas al 5% y 10%.

- 45 El residuo de isopropanol al 5% estaba compuesto de compuestos números 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9 y limfostina. Cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (caudal 8 ml/min, detección a 254 nm) en una columna ODS (YMC-Pack ODS A 250X20mm S-5 µm 120A de YMC, Inc) usando acetonitrilo en gradiente de agua (20-50% y 10-40% de acetonitrilo en gradiente de agua) dio el compuesto 1 y 2 limpios y otras tres fracciones que contiene los compuestos números 3, 4, 5, 8 y 9. Una segunda ronda de cromatografía de fase inversa en una fracción dio una mezcla de compuestos números 4 y 5. Una HPLC de fase normal (caudal: 10 ml/min, detección a 460 nm) equipada con una columna Diol para HPLC (YMC-Diol-120-NP 250X20mm S-5 µm de YMC, Inc.) usando un gradiente de isopropanol en una mezcla 1:2 de tolueno:acetato de etilo (0-10% de isopropanol en tolueno:acetato de etilo 1:2) en las otras dos fracciones proporcionando compuestos puros números 3 y 9.

- 55 La fracción de 10% de isopropanol estaba constituida por compuestos números 6, 7, 8, 9 y limfostina también. Tras una HPLC de fase inversa inicial en una columna ODS usando gradiente de acetonitrilo en agua se generaron tres fracciones. Cada una de estas fracciones fue sometida a cromatografía en la columna Diol usando un gradiente de isopropanol en una mezcla 1:2 de tolueno : acetato de etilo para generar compuestos números 6, 7 y 8 puros.

Ejemplo 5: síntesis de compuestos

Esquema A



Con referencia al esquema A, la reducción del resto éster del compuesto de fórmula 1, en la que P es un grupo protector adecuado tal como benzoiloxicarbonilo (CBz) o t-butoxicarbonilo (BOC), seguido de oxidación del carbono bencílico da el alcohol ceto de fórmula 2. Esta reducción se puede llevar a cabo usando borohidruro de litio u otro agente reductor adecuado tal como hidróxido de litio y aluminio en un disolvente no prótico tal como éter, THF a una temperatura de aproximadamente 0°C a aproximadamente 60°C . La oxidación bencílica se puede llevar a cabo usando 2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona (DDQ). La oxidación aromática del alcohol ceto de fórmula 2, usando un agente oxidante tal como trifluoroacetato de talio, seguido de tratamiento con sulfato de cobre en un disolvente tal como DMF, generará el fenol de fórmula 3.

La reducción de la cetona de fórmula 3 para formar el compuesto de fórmula 4, seguido de oxidación del anillo benzo del compuesto de fórmula 4 da la quinona de fórmula 5. La reducción se puede conseguir usando cianoborohidruro de sodio u otro agente reductor adecuado tal como hidruro de litio y aluminio o borohidruro de sodio en un disolvente no prótico tal como THF o éter a una temperatura de aproximadamente 0°C a aproximadamente 60°C . La oxidación del compuesto de fórmula 4 se puede llevar a cabo usando $(\text{NO}(\text{SO}_3\text{K})_2)$ (nitrosodiosulfonato de potasio) en metanol acuoso o acetona en un pH de 6,4-7,0 a temperatura ambiente.

La introducción selectiva de una amina en el grupo aromático del compuesto de fórmula 5 para formar el compuesto de fórmula 6, y la desprotección subsiguiente de ambos grupos amino del compuesto resultante de fórmula 6 da la

diaminoquinina de fórmula 7. La introducción de la amina puede llevarse a cabo mediante la adición de bencilamina. Esta reacción se lleva a cabo de forma típica en un disolvente no prótico tal como THF, piridina a una temperatura de aproximadamente 0° C a aproximadamente 60° C. Los dos grupos amino protegidos del compuesto resultante de fórmula 6 pueden ser desprotegidos mediante reacción con gas hidrógeno en condiciones de deshidrogenación convencional que son bien conocidos por los especialistas en la técnica, por ejemplo, en presencia de paladio sobre carbono, a una presión de aproximadamente 1 a 3 atmósferas y a una temperatura de aproximadamente 20° C a aproximadamente 80° C. La diaminoquinina resultante de fórmula 7 se puede transformar en el alcohol tricíclico de fórmula 8 sometiéndolo a reacción con oxígeno o aire enriquecido con oxígeno a una temperatura de aproximadamente 0° C a aproximadamente 80° C.

- 10 El grupo alcohol primario del compuesto de fórmula 8 se puede proteger de forma selectiva usando un reactivo apropiado tal como terc-butildimetilclorosilano (TBDMSCl) o terc-butildimetilsililo (TBDMS), u otro agente de sililación adecuado, que haga el grupo amino libre disponible para la derivatización adicional. Esta reacción se puede llevar a cabo en un disolvente no acuoso tal como diclorometano o THF, a una temperatura de aproximadamente 0° C a aproximadamente 60° C. La acilación del grupo amino libre se puede llevar a cabo usando un reactivo de acilación tal como un ácido carboxílico o cloruro de ácido. Disolventes adecuados para esta reacción incluyen diclorometano o THF en el caso de cloruros de ácido y disolvente polar tal como DMF o NMP en el caso de reacciones de acoplamiento que usen ácidos. La temperatura puede variar de aproximadamente 0° C a aproximadamente 60° C. Un reactivo de acoplamiento apropiado tal como 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI) o diciohexildiimida (DCC) da un compuesto de fórmula 9, en la que R² es alquilo (C₁-C₄). El compuesto de fórmula 9 se puede transformar en la azida de fórmula 10 mediante reacción con anhídrido trifílico en piridina, seguido de reacción con azida de tetrabutilamonio (nBu₄NN₃) o azida sódica en disolventes tales como diclorometano o THF. La reducción de la azida de fórmula 10 para dar el compuesto amino correspondiente, seguido de protección del grupo amino con cualquiera de un número de grupos protectores tales como nosilo, Boc y tosilo, usando procedimientos bien conocidos por los especialistas en la técnica da el compuesto de fórmula 11 correspondiente.
- 25 La reducción de la azida se puede llevar a cabo usando hidruro de litio y aluminio u otro agente reductor adecuado bien conocido por los especialistas en la técnica, en un disolvente no acuoso tal como THF a una temperatura de aproximadamente 0° C a aproximadamente 60° C.

- El alcohol primario protegido de fórmula 11 se puede desproteger usando un reactivo que contenga una fuente de flúor tal como fluoruro de tetrabutilamonio o fluoruro de hidrógeno en un disolvente tal como THF o usando un ácido mineral tal como ácido clorhídrico a una temperatura de aproximadamente 0° C a aproximadamente 60° C, para producir el alcohol de fórmula 12. La oxidación del alcohol de fórmula 12, usando un reactivo tal como clorocromato de piridinio (PCC) o trióxido de cromo en un disolvente tal como diclorometano o piridina, a una temperatura de aproximadamente 0° C a aproximadamente 60° C, da el compuesto de fórmula 13 correspondiente.

- 35 La reacción del compuesto de fórmula 13 con un compuesto de litio etínico de forma apropiada en un disolvente no prótico tal como éter o THF, a una temperatura de aproximadamente -78° C a aproximadamente 60° C da el alcohol etínico correspondiente de fórmula 15, que se puede oxidar luego para formar la etínilcetona de fórmula 16. La oxidación se puede llevar a cabo usando dióxido de manganeso u otro agente oxidante adecuado tal como PCC en un disolvente tal como acetona o diclorometano, a una temperatura de aproximadamente 0° C a aproximadamente 60° C.

- 40 La etínilcetona de fórmula 16 se puede transformar en el compuesto de fórmula 17 correspondiente mediante reacción con metanol en condiciones básicas, por ejemplo en presencia de carbonato de potasio u otra base adecuada. Disolventes adecuados para esta reacción incluyen metanol. Temperaturas adecuadas varían de aproximadamente 0° C a aproximadamente 60° C. La desprotección del compuesto de fórmula 17 resultante, usando procedimientos bien conocidos por los especialistas en la técnica, darán el acetal de fórmula 18, que se puede transformar luego en el compuesto deseado de fórmula 1 sometiéndolo a un agente deshidratante tal como tamices moleculares.

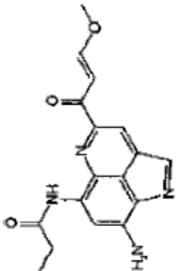
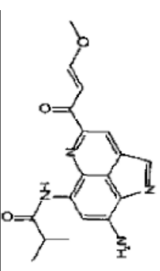
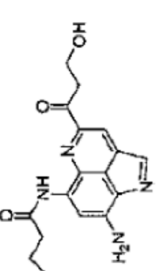
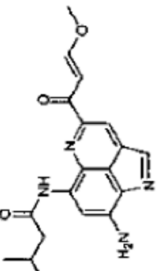
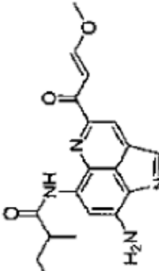
Se puede llevar a cabo reducción adicional de fórmula 1 usando hidrogenación catalítica usando un reactivo como Pd/C o Pt/C y gas hidrógeno en un disolvente tal como metanol o usando una fuente de hidruro tal como hidruro de litio y aluminio en un disolvente tal como THF o éter.

50 Ejemplo 6: Ensayo de quinasa mTOR

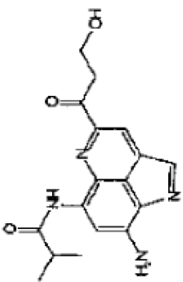
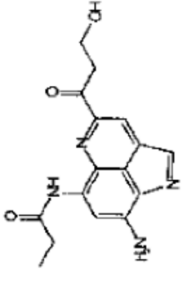
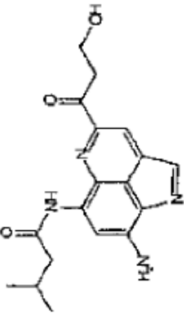
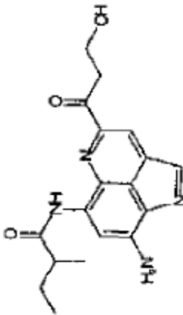
- Se llevaron a cabo los ensayos con TOR humana rutinarios con enzima purificada en placas de 96 pocillos con formato DELFIA como sigue. Se diluyeron en primer lugar enzimas en tampón de ensayo de quinasa (Hepes 10 mM (pH 7,4), NaCl 50 mM, β-glicerofosfato 50 mM, MnCl₂, 10 mM, DTT 0,5 mM, microcistina LR 0,25 μM, y BSA 100 μg/ml). Se mezclaron en cada pocillo 12 μl del enzima diluido brevemente con 0,5 μl de inhibidor de ensayo o vehículo de control dimetilsulfóxido (DMSO). Se inició la reacción de la quinasa con adición de 12,5 μl de tampón de ensayo de quinasa que contiene ATP y His6-S6K para dar un volumen de reacción final de 25 μl que contiene 800 ng/ml de FLAG-TOR, ATP 100 μM y His6-S6K 1,25 μM. Se incubó la placa de reacción durante 2 horas (lineal en 1-6 horas) a temperatura ambiente con agitación vigorosa y luego se terminó con adición de 25 μl de tampón de parada (Hepes 20 mM (pH 7,4), EDTA 20 mM, EGTA 20 mM). La detección por DELFIA del (Thr-389) His6-S6K fosforilado se llevó a cabo a temperatura ambiente usando un anticuerpo anti- P(T389)-p70S6K monoclonal (1A5,

señalización de célula) etiquetado con Europio -N1-ITC (Eu) (10,4 Eu por anticuerpo, PerkinElmer). El tampón de ensayo DELFIA y la solución de mejora se adquirieron en PerkinElmer. Se transfirieron 45 µl de la mezcla de reacción de quinasa terminada a un plato MaxiSorp (Nunc) que contiene 55 µl de PBS. Se dejó que el His6-S6K se uniese durante 2 horas después de lo cual se aspiraron los pocillos y se lavaron una vez con PBS. Se añadió 100 µl de tampón de ensayo DELFIA con 40 ng/ml de anticuerpo Eu-P(T389)-S6K. Continuó la unión del anticuerpo durante 1 hora con agitación vigorosa. Los pocillos se aspiraron luego y se lavaron 4 veces con PBS que contiene 0,05% de Tween-20 (PBST). Se añadió 100 µl de solución de mejora DELFIA a cada pocillo y se leyeron las placas en un lector de placas modelo Victor de PerkinElmer. Se usaron los datos obtenidos para calcular la actividad enzimática y la inhibición del enzima con inhibidores potenciales. Se proporcionan datos de CI_{50} para mTOR (reportados en µM) en la tabla 1.

TABLA 1

Comp. N°	Estructura	Nombre	Cl ₅₀ para mTOR (µm)	Cl ₅₀ para LNCap (µm)	Cl ₅₀ para MDA 468 (µm)	RT (min)	m + ion	m - ion
Compuesto de referencia 1		(E)-N-(8-amino-4-(3-methoxyacryloyl)pyrrolo[4,3,2-de]quinolin-6-yl)-3-propionamide	0,0015	0,048	0,085	11,60	325,1	323,3
2		(E)-N-(8-amino-4-(3-methoxyacryloyl)pyrrolo[4,3,2-de]quinolin-6-yl)-3-isobutiramida	0,0008	0,022	0,058	13,01	339,1	337,2
Compuesto de referencia 3		N-(8-amino-4-(3-hidroxiopropanoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)butiramida	> 4	> 12	> 12	9,27	327,1	325,2
Compuesto de referencia 4		(E)-N-(8-amino-4-(3-methoxyacryloyl)pyrrolo[4,3,2-de]quinolin-6-yl)-3-metilbutanamida	8 *	0,23 *	0,7 *	14,41 *	353,2 *	351,3 *
Compuesto de referencia 5		(E)-N-(8-amino-4-(3-methoxyacryloyl)pyrrolo[4,3,2-de]quinolin-5-yl)-2-metilbutanamida	0,0018 *	0,23 *	0,7 *	14,41 *	353,2 *	351,3 *

(continuación)

Compuesto de referencia 6		N-(8-amino-4-(3-hidroxiopropanoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)-isobutiramida	> 4	6,5	1,2	8,86	327,1	325,3
Compuesto de referencia 7		N-(8-amino-4-(3-hidroxiopropanoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)-propionamida	> 4	5	0,4	7,73	313,1	311,4
Compuesto de referencia 8		N-(8-amino-4-(3-hidroxiopropanoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-8-il)-3-metilbutanamida	1,5	2,9	3,5	10,10	341,1	339,4
Compuesto de referencia 9		N-(8-amino-4-(3-hidroxiopropanoil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)-2-metilbutanamida	3,2	10	7,6	10,38	341,2	339,3
* Compuestos 4 y 5 fueron seguidos como una mezcla en la misma solución								

Ejemplo 7: ensayo de cultivo de células in vitro

Se dispusieron células de líneas tumorales LNCap y MDA468 humanas en placas de cultivo de 96 pocillos a aproximadamente 3000 células por pocillo. Un día tras el emplazamiento se añadieron diversas dosis de inhibidores de mTOR a las células. Tres días después del tratamiento con fármaco se determinaron las densidades de células viables mediante conversión metabólica (con células viables) del tinte MTS, un ensayo de proliferación de células bien definido. Los ensayos se llevaron a cabo usando un kit de ensayo adquirido en Promega Corp (Madison, WI) siguiendo del protocolo suministrado con el kit. Los resultados del ensayo MTS fueron leídos en un lector de placa de 96 pocillos midiendo absorbancia 0 a 490 nm. El efecto de cada tratamiento se calculó como porcentaje de cultivo de control respecto al cultivo de células tratadas con vehículo en la misma placa de cultivo. La concentración de fármaco que confería el 50% de inhibición del cultivo se determinó como CI_{50} (μM). Se siguieron los compuestos de la tabla 1 y los compuestos 1, 2 y 4 mostraron CI_{50} para LNCap que varía de 20 a 300 nM.

Ejemplo 8: ensayo de inhibición de mTOR en células tumorales

Se dispusieron células de cáncer humanas (LNCap de próstata, U87MG glioma) en placas de 6 pocillos en medio de cultivo durante la noche. Se trataron las células con diversas dosis de inhibidores de mTOR durante 6 horas. Se prepararon los lisados celulares totales usando tampón de muestra de NuPAGE-LDS (Invitrogen), se sometió a ultrasonidos y luego se clarificó por centrifugación. Se sometieron iguales cantidades de proteínas a análisis inmunológico Western blot usando sistema de electroforesis NuPAGE y muestreado con anticuerpos fosfo-específicos frente a marcadores de ruta mTOR tales como AKT, S6K1, 4EBP1. Se siguieron los compuestos de la tabla 1 y los compuestos 1, 2 y 4 mostraron CI_{50} para MDA468 que varía de 50 a 800 nM.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> wyeth

<120> Compuestos de pirrol[4,3,2-de]quinolin-8-amina y procedimientos de preparación y uso

25 <130> AM103210

<150> 61/088192

<151> 2008-08-12

30 <150> 61/122449

<151> 2008-12-15

<160> 7

35 <170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 1449

<212> ADN

40 <213> Actinomiceto DPJ-0019

<400> 1

ES 2 502 917 T3

ctcaggacga acgctggcgg cgtgcttaac acatgcaagt cgagcggaaa ggccttcgg 60
 ggtactcgag cggcgaacgg gtgagtaaca cgtgagtaac ctgccctagg ctttgggata 120
 accccgggaa accgggggcta ataccgaata tgactggctg ccgcatgggtg gttgggtgaa 180
 agatttttcg gcttgggatg gactcgcggc ctatcagctt gttgggtggg taatggccta 240
 ccaaggcggc gacgggtagc cggcctgaga gggcgaccgg ccacactggg actgagacac 300
 ggcccagact cctacgggag gcagcagtgg ggaatcttgc acaatgggcg gaagcctgat 360
 gcagcgacgc cgcgtgaggg atgacggcct tcgggttgta aacctcttcc agcagggacg 420
 aagcgtttgt gacggtagct gcagaagaag cgccggccaa ctacgtgcca gcagccgagg 480
 taagacgtag ggcgcaagcg ttgtccgat ttattgggcg taaagagctc gtaggcggct 540
 tgcgcgctg actgtgaaaa cccgtggctc aactgcgggc ttgcagtcga tacgggcagg 600
 ctagagtctg gtaggggaga ctggaattcc tgggtgtagcg gtgaaatgcg cagatatcag 660
 gaggaacacc ggtggcgaag gcgggtctct gggccgatac tgacgctgag gagcgaaagc 720
 gtggggagcg aacaggatta gataccctgg tagtccacgc tgtaaactgt gggcgctagg 780
 tgtggggggc ctctccggtt ctctgtgccc cagctaacgc attaagcgcc ccgcctgggg 840
 agtacggccc caaggctaaa actcaaagga attgacgggg gcccgcaaa gcggcgagc 900
 atgcggatta attcgatgca acgcgaagaa ccttacctgg gtttgacatc gccggaaatc 960
 cttcagagat ggggggtcct tcggggccgg tgacagggtg tgcatggctg tcgtcagctc 1020
 gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccga acgagcgcaa cccttggtcg atgttgccag 1080

cgcgttatgg cggggactca tcgaagactg ccgggggtcaa ctcgaggaa ggtggggatg 1140
 acgtcaagtc atcatgccc ttatgtccag ggcttcacgc atgctacaat ggccggtaca 1200
 atgggctgag ataccgtgag gtggagcgaa tccccaaaag ccggtctcag ttccgatcgg 1260
 ggtctgcaac tcgacccgt gaagtcggag tcgctagtaa tcgcagatca gcaacgctgc 1320
 ggtgaatacg ttccggggcc ttgtacacac cggccgtcac gtcacgaaag tcggcaaac 1380
 ccgaagccgg tggcctaacc cttgtggggg gagccgtcga aggtgggggt gccgattggg 1440
 acgaagtcg 1449

<210> 2

<211> 1447

<212> ADN

5 <213> Actinomiceto DPJ-0024

<400> 2

ES 2 502 917 T3

gctcaggacg aacgctggcg gcgtgcttaa cacatgcaag tcgagcggaa aggcccttcg 60
gggtactcga gcggcgaacg ggtgagtaac acgtgagtaa cctgccccag gctttgggat 120
aaccgccgga aaccggggct aataccgaat attaccggct gccgcattggc ggttgggtga 180
aagtttttcg gcttgggatg gactcgcggc ctatcagctt gttggtgggg taatggccta 240
ccaaggcggc gacgggtagc cggcctgaga gggcgaccgg ccacactggg actgagacac 300
ggcccagact cctacgggag gcagcagtgg ggaatcttgc acaatgggcg gaagcctgat 360
gcagcgacgc cgcgtgaggg atgacggcct tcgggttgta aacctctttc agcagggacg 420
aagcgtttgt gacggtacct gcagaagaag cgcgggccaa ctacgtgcc a gcagccgcgg 480
taagacgtag ggcgcgagcg ttgtccggat ttattgggcg taaagagctc gtaggcggct 540
tgtcgcgtcg actgtgaaaa cccgtggctc aactgcgggc ttgcagtcga tacgggcagg 600
ctagagttcg gtaggggaga ctggaattcc tgggtgtagcg gtgaaatgcg cagatatcag 660
gaggaacacc ggtggcgaag gcgggtctct gggccgatac tgacgctgag gagcgaaagc 720
gtggggagcg aacaggatta gataccctgg tagtccacgc tgtaaactgt gggcgctagg 780
tgtggggggc ctctccgggt ctctgtgccg cagctaacgc attagcgcc ccgcctgggg 840
agtacggccg caaggctaaa actcaaagga attgacgggg gcccgacaaa gcggcggagc 900
atgcggatta attcgatgca acgcgaagaa ccttacctgg gtttgacatc gccggaaatc 960
cttcagagat ggggggtcct tcggggccgg tgacaggtgg tgcattgctg tcgtcagctc 1020
gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgca acgagcgcaa cccttgttcg atgttgccag 1080
cgcgttatgg cggggactca tcgaagactg cgggggtcaa ctcgaggaa ggtggggatg 1140
acgtcaagtc atcatgcccc ttatgtccag ggttcacgc atgtacaat ggccgggtaca 1200

atgggctgcg ataccgtgag gtggagcgaa tccaaaaag ccggtctcag ttcggatcgg 1260
ggtctgcaac tcgaccccg tgaagtcggag tcgctagtaa tcgcagatca gcaacgctgc 1320
ggtgaatacg ttcccgggct ttgtacacac cggccgtcac gtcacgaaag tcggcaacac 1380
ccgaagccgg tggcctaacc cttgtggggg gagccgtcga aggtggggct ggcgattggg 1440
acgaagt 1447

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

ES 2 502 917 T3

<223> Dominio conservado

<400> 3

cggttggtgg aaagttttc 20

5

<210> 4

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> cebador 16S-1525F

<400> 4

ggttgatcc acctcctt 18

15

<210> 5

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

20

<220>

<223> Cebador 23S-40R

<400> 5

tcccacgtcc ttcacgg 18

25

<210> 6

<211> 1479

<212> ADN

<213> *Streptomyces sp.*

<400> 6

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgagc 60

ggaaaggccc ttcggggtag tcgagcggcg aacgggtgag taacacgtga gtaacctgcc 120

ccaggccttg ggataacccc gggaaaccgg ggctaatacc ggatatgacc atctgtcgca 180

30

tggtgggtgg tggaaagatt ttttggcttg ggatgggctc gcggcctatc agcttggttg 240

ES 2 502 917 T3

tgggggtgatg gcctaccaag gcggcgacgg gtagccggcc tgagagggcg accggccaca 300
 ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc agtggggaat cttgcacaat 360
 gggcggaagc ctgatgcagc gacgccggt gagggatgac ggccttcggg ttgtaaacct 420
 ctttcagcag ggacgaagcg tttgtgacgg tacctgcaga agaagcgccg gccaaactacg 480
 tgccagcagc cgcggtgaaga cgtagggcgc aagcgttgtc cggtattatt gggcgtaaag 540
 agctcgtagg cggcttgtcg cgtcgactgt gaaaaccggt ggctcaactg cgggcttgca 600
 gtcgatacgg gcaggctaga gtccggtagg ggagactgga attcctggtg tagcggtgaa 660
 atgcgcagat atcaggagga acaccggtgg cgaaggcggg tctctgggcc gatactgacg 720
 ctgaggagcg aaagcgtggg gagcgaacag gattagatac cctggtagtc cacgctgtaa 780
 acgttggggc ctaggtgtgg ggggcctctc cggttctctg tgccgcagct aacgcattaa 840
 gcgccccgcc tggggagtac ggccgcaagg ctaaaactca aaggaattga cgggggcccc 900
 cacaagcggc ggagcatgcg gattaattcg atgcaacgcg aagaacctta cctgggtttg 960
 acatcgccgg aaatccttca gagatggggg gtccttcggg gccggtgaca ggtggtgcat 1020
 ggctgtcgtc agctcgtgtc gtgagatgtt ggggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctt 1080
 gtccgatgtt gccagcgcgt tatggcgggg actcatcgaa gactgccggg gtcaactcgg 1140
 aggaaggtgg ggatgacgtc aagtcacat gcccccttatg tccagggctt cacgcatgct 1200
 acaatggccg gtacagtggg ctgcgatacc gtgaggtgga gcgaatccca aaaagccggt 1260
 ctcagttcgg atcgggggtct gcaactcgac cccgtgaagt cggagtcgct agtaatcgca 1320
 gatcagcaac gctgcgggtga atacgttccc gggccttgta cacaccgcc gtcacgtcac 1380
 gaaagtcggc aacaccgaa gccggtggcc taacccttgt ggggggagcc gtcgaaggtg 1440
 gggctggcga ttgggacgaa gtcgtaacaa ggtagccgt 1479

<210> 7

<211> 1479

<212> ADN

5 <213> *Streptomyces* sp.

<400> 7

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgagc 60
 ggaaaggccc ttcgggttac tcgagcggcg aacgggtgag taacacgtga gtaacctgcc 120
 ccaggctttg ggataacccc gggaaaccgg ggctaatacc ggatatgact ggctgccgca 180
 tgggtggttg tgaaagatt ttttggttg ggatgggctc gcggcctatc agcttggttg 240
 tgggggtgatg gcctaccaag gcggcgacgg gtagccggcc tgagagggcg accggccaca 300
 ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc agtggggaat cttgcacaat 360

ES 2 502 917 T3

gggcggaagc ctgatgcagc gacgccgcgt gagggatgac ggccttcggg ttgtaaacct	420
ctttcagcag ggacgaagcg tttgtgacgg tacctgcaga agaagcgccg gccaaactacg	480
tgccagcagc cgcggtaaga cgtagggcgc aagcgttgtc cggatttatt gggcgtaaag	540
agctcgtagg cggcttgctg cgtcgactgt gaaaaccctg ggctcaactg cgggcttgca	600
gtcgatacgg gcaggctaga gttcggtagg ggagactgga attcctggtg tagcggtgaa	660
atgcgcagat atcaggagga acaccggtgg cgaaggcggg tctctgggcc gatactgacg	720
ctgaggagcg aaagcgtggg gagcgaaacag gattagatac cctggtagtc cacgctgtaa	780
acgttgggcg ctaggtgtgg ggagcctctc cggttctctg tgccgcagct aacgcattaa	840
gcgccccgcc tggggagtac ggccgcaagg ctaaaactca aaggaattga cggggggccc	900
cacaagcggc ggagcatgcg gattaattcg atgcaacgcg aagaacctta cctgggtttg	960
acatcgccgg aaatccttca gagatggggg gtccttcggg gccggtgaca ggtggtgcat	1020
ggctgtcgtc agctcgtgtc gtgagatgtt gggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctt	1080
gttcgatgtt gccagcgcgt tatggcgggg actcatcgaa gactgccggg gtcaactcgg	1140
aggaaggtgg ggatgacgtc aagtcatcat gccccttatg tccagggtt cacgcatgct	1200
acaatggccg gtacaatggg ctgcgatacc gtgaggtgga gcgaatccca aaaagccggt	1260
ctcagttcgg atcggggtct gcaactcgac cccgtgaagt cggagtcgct agtaatcgca	1320
gatcagcaac gctgcggtga atacgttccc gggccttgta cacaccgcc gtcacgtcac	1380
gaaagtcggc aacaccggaa gccggtggcc taacccttgt ggggggagcc gtcgaaggtg	1440
gggctggcga ttgggacgaa gtcgtaacaa ggtagccgt	1479

REIVINDICACIONES

1. El compuesto (E)-N-(8-amino-4-(3-metoxiacrilil)pirrol[4,3,2-de]quinolin-6-il)isobutiramida; o un tautómero del mismo; o un estereoisómero del mismo; o una sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto, estereoisómero o tautómero.
- 5 2. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la reivindicación 1; un tautómero del mismo; un estereoisómero del mismo; o una sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto, estereoisómero o tautómero del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
3. Un compuesto de la reivindicación 1; un tautómero del mismo; un estereoisómero del mismo; o una sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto, estereoisómero o tautómero del mismo; o una
10 composición de la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento del cáncer.
4. El compuesto; tautómero; estereoisómero; sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto, estereoisómero o tautómero; o una composición del mismo para su uso de acuerdo con la
15 reivindicación 3, en el que el cáncer es cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer gástrico, carcinoma de tiroides, carcinoma de células renales, cáncer de lengua, carcinoma de vejiga, carcinoma de cilio, hepatoma, cáncer de próstata, carcinoma de útero, cáncer de faringe, cáncer de pulmón, cáncer de mama, melanoma maligno, granuloma, sarcoma de Kaposi, cáncer de cerebro, neuroblastoma, cáncer de ovarios, cáncer de testículo, cáncer de páncreas, hipernefoma, hemangioendotelioma, leucemia de células T adultas (ATL), leucemia mielogenosa crónica (CML), leucemia mielogenosa aguda (AML) o mieloma múltiple.
- 20 5. Un procedimiento de preparación de un compuesto de la reivindicación 1, un tautómero del mismo, un estereoisómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable de tal compuesto, estereoisómero o tautómero del mismo, comprendiendo dicho procedimiento la fermentación de una cepa de actinomicetos que presenta el número de acceso a Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL) nº NRRL 50167 o NRRL 50168 en un medio de cultivo que comprende una sal para formar una solución
25 fermentada, en el que el compuesto de pirrol[4,3,2-de]quinolin-8-amina es formado en la solución fermentada.

FIG. 1A

CTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGCGGCGAACGG
 GTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTAGGCTTTGGGATAACCCCGGGAACCGGGGCTAATACCGAATATGACTGGCTG
 CCGCATGGTGGTTGGTGAAAGATTTTTCGGCTTGGGATGGACTCGCGGCCATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTA
 CCAAGCGCGCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAG
 GCAGCAGTGGGGAATCTTGACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTGA
 AACCTCTTTACGAGGGACGAAGCGTTTGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
 TAAGACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGCTCGACTGTGAAAA
 CCCGTGGCTCAACTGCGGGCTTGCACTGATACGGGCAGGCTAGAGTTCCGTTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCG
 GTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGCGGGTCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGC
 GTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGGCCTCTCCGGTT
 CTCTGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCGCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGG
 GCGCGCACAAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGGTTTGACATCGCCGGAAATC
 CTTACAGAGATGGGGGCTCCTTCGGGGCCGGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTCAGCTCGTGTGAGATGTGGGTT
 AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCGATGTTGCCAGCGCTTATGGCGGGGACTCATCGAAGACTGCCGGGGTCAA
 CTCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACA
 ATGGGCTGCGATACCGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGT
 GAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCCGTCAC
 GTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCTTGTGGGGGAGCCGTCGAAGGTGGGGCTGGCGATTGGG
 ACGAAGTCG (SEQ ID NO:1)

FIG. 1B

GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGCGGCGAAC
 GGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCGAGGCTTTGGGATAACCCCGGGAACCGGGGCTAATACCGAATATTACCGG
 CTGCCGATGGCGGTTGGTGAAAGATTTTTCGGCTTGGGATGGACTCGCGGCCATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGC
 CTACCAAGCGCGGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACG
 GGAGGCAGCATGGGGAATCTTGACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGG
 TTGTAAACCTCTTTACGAGGGACGAAGCGTTTGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGCCAACTACGTGCCAGCAG
 CCGCGGTAAGACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGCTCGACT
 GTGAAAACCCGTGGCTCAACTGCGGGCTTGCACTGATACGGGCAGGCTAGAGTTCCGTTAGGGGAGACTGGAATTCCTG
 GTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGCGGGTCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGG
 AGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGGC
 CTCTCCGGTTCTCTGTGCCGCAAGCTAACGCATTAAGCGCCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGG
 AATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGGTTTGACA
 TCGCCGGAATCCTTCAGAGATGGGGGCTCCTTCGGGGCCGGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGCTCAGCTCGTGTCTG
 GAGATGTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCGATGTTGCCAGCGCTTATGGCGGGGACTCATCGAAG
 ACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACGCATGCT
 ACAATGGCCGGTACAATGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGT
 TGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG
 TACACACCGCCCGTCACGTACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCTTGTGGGGGAGCCGTCGAAG
 GTGGGCTGGCGATTGGGACGAAGT (SEQ ID NO:2)

FIG. 1C

CGGTTGGTGAAAGTTTTTC (SEQ ID NO:3)

FIG. 2

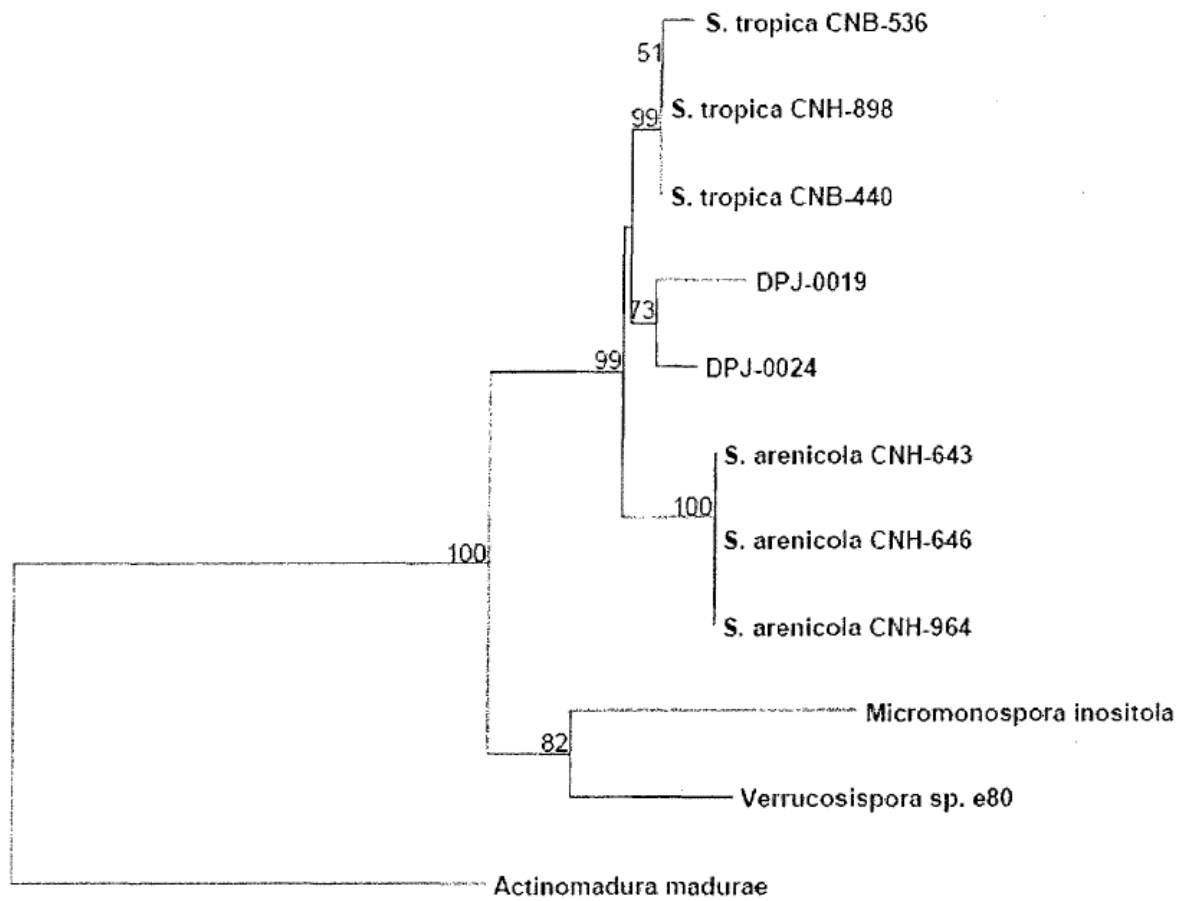


FIG. 3

	1					50
<i>S.arenicola</i>	AGAGTTTGAT	CCTGGCTCAG	GACGAACGCT	GGCGGCGTGC	TTAACACATG	
<i>S.tropica</i>	AGAGTTTGAT	CCTGGCTCAG	GACGAACGCT	GGCGGCGTGC	TTAACACATG	
DPJ-0019	AGAGTTTGAT	CCTGGCTCAG	GACGAACGCT	GGCGGCGTGC	TTAACACATG	
DPJ-0024	AGAGTTTGAT	CCTGGCTCAG	GACGAACGCT	GGCGGCGTGC	TTAACACATG	
	51					100
<i>S.arenicola</i>	CAAGTCGAGC	GGAAAGGCC	TTCGGGGTAC	TCGAGCGGCG	AACGGGTGAG	
<i>S.tropica</i>	CAAGTCGAGC	GGAAAGGCC	TTCGGGGTAC	TCGAGCGGCG	AACGGGTGAG	
DPJ-0019	CAAGTCGAGC	GGAAAGGCC	TTCGGGGTAC	TCGAGCGGCG	AACGGGTGAG	
DPJ-0024	CAAGTCGAGC	GGAAAGGCC	TTCGGGGTAC	TCGAGCGGCG	AACGGGTGAG	
	101					150
<i>S.arenicola</i>	TAACACGTGA	GTAACCTGCC	CCAGGCTTTG	GGATAACCCC	GGGAAACCGG	
<i>S.tropica</i>	TAACACGTGA	GTAACCTGCC	CCAGGCTTTG	GGATAACCCC	GGGAAACCGG	
DPJ-0019	TAACACGTGA	GTAACCTGCC	CTAGGCTTTG	GGATAACCCC	GGGAAACCGG	
DPJ-0024	TAACACGTGA	GTAACCTGCC	CCAGGCTTTG	GGATAACCCC	GGGAAACCGG	
	151					200
<i>S.arenicola</i>	GGCTAATACC	GGATATGACC	ATCTGTCGCA	TGGTGGGTGG	TGGAAAGCAT	
<i>S.tropica</i>	GGCTAATACC	GGATATGACT	GGCTGCCGCA	TGGTGGGTGG	TGGAAAGCAT	
DPJ-0019	GGCTAATACC	GAATATGACT	GGCTGCCGCA	TGGTGGGTGG	TGGAAAGCAT	
DPJ-0024	GGCTAATACC	GAATATTACC	GGCTGCCGCA	TGGCGGTTGG	TGGAAAGCAT	
	201					250
<i>S.arenicola</i>	TTTGGGCTTG	GGATGGGCTC	GCGGCCTATC	AGCTTGTTGG	TGGGGTGATG	
<i>S.tropica</i>	TTTGGGCTTG	GGATGGGCTC	GCGGCCTATC	AGCTTGTTGG	TGGGGTGATG	
DPJ-0019	TTTCGGCTTG	GGATGGACTC	GCGGCCTATC	AGCTTGTTGG	TGGGGTAATG	
DPJ-0024	TTTCGGCTTG	GGATGGACTC	GCGGCCTATC	AGCTTGTTGG	TGGGGTAATG	
	251					300
<i>S.arenicola</i>	GCCTACCAAG	GCGGCGACGG	GTAGCCGGCC	TGAGAGGGCG	ACCGGCCACA	
<i>S.tropica</i>	GCCTACCAAG	GCGGCGACGG	GTAGCCGGCC	TGAGAGGGCG	ACCGGCCACA	
DPJ-0019	GCCTACCAAG	GCGGCGACGG	GTAGCCGGCC	TGAGAGGGCG	ACCGGCCACA	
DPJ-0024	GCCTACCAAG	GCGGCGACGG	GTAGCCGGCC	TGAGAGGGCG	ACCGGCCACA	
	301					350
<i>S.arenicola</i>	CTGGGACTGA	GACACGGCCC	AGACTCCTAC	GGGAGGCAGC	AGTGGGGAAT	
<i>S.tropica</i>	CTGGGACTGA	GACACGGCCC	AGACTCCTAC	GGGAGGCAGC	AGTGGGGAAT	
DPJ-0019	CTGGGACTGA	GACACGGCCC	AGACTCCTAC	GGGAGGCAGC	AGTGGGGAAT	
DPJ-0024	CTGGGACTGA	GACACGGCCC	AGACTCCTAC	GGGAGGCAGC	AGTGGGGAAT	
	C351					400
<i>S.arenicola</i>	CTTGCACAAT	GGGCGGAAGC	CTGATGCAGC	GACGCCGCGT	GAGGGATGAC	
<i>S.tropica</i>	CTTGCACAAT	GGGCGGAAGC	CTGATGCAGC	GACGCCGCGT	GAGGGATGAC	
DPJ-0019	CTTGCACAAT	GGGCGGAAGC	CTGATGCAGC	GACGCCGCGT	GAGGGATGAC	
DPJ-0024	CTTGCACAAT	GGGCGGAAGC	CTGATGCAGC	GACGCCGCGT	GAGGGATGAC	
	401					450
<i>S.arenicola</i>	GGCCTTCGGG	TTGTAAACCT	CTTTCAGCAG	GGACGAAGCG	TTTGTGACGG	
<i>S.tropica</i>	GGCCTTCGGG	TTGTAAACCT	CTTTCAGCAG	GGACGAAGCG	TTTGTGACGG	
DPJ-0019	GGCCTTCGGG	TTGTAAACCT	CTTTCAGCAG	GGACGAAGCG	TTTGTGACGG	
DPJ-0024	GGCCTTCGGG	TTGTAAACCT	CTTTCAGCAG	GGACGAAGCG	TTTGTGACGG	

A198

T442

T443

	451				500
<i>S.arenicola</i>	TACCTGCAGA	AGAAGCGCCG	GCCAACTACG	TGCCAGCAGC	CGCGGTAAGA
<i>S.tropica</i>	TACCTGCAGA	AGAAGCGCCG	GCCAACTACG	TGCCAGCAGC	CGCGGTAAGA
DPJ-0019	TACCTGCAGA	AGAAGCGCCG	GCCAACTACG	TGCCAGCAGC	CGCGGTAAGA
DPJ-0024	TACCTGCAGA	AGAAGCGCCG	GCCAACTACG	TGCCAGCAGC	CGCGGTAAGA
	501				550
<i>S.arenicola</i>	CGTAGGGCGC	AAGCGTTGTC	CGGATTTATT	GGGCGTAAAG	AGCTCGTAGG
<i>S.tropica</i>	CGTAGGGCGC	AAGCGTTGTC	CGGATTTATT	GGGCGTAAAG	AGCTCGTAGG
DPJ-0019	CGTAGGGCGC	AAGCGTTGTC	CGGATTTATT	GGGCGTAAAG	AGCTCGTAGG
DPJ-0024	CGTAGGGCGC	AAGCGTTGTC	CGGATTTATT	GGGCGTAAAG	AGCTCGTAGG
	551				600
<i>S.arenicola</i>	CGGCTTGTCG	CGTCGACTGT	GAAAACCCGT	GGCTCAACTG	CGGGCTTGCA
<i>S.tropica</i>	CGGCTTGTCG	CGTCGACTGT	GAAAACCCGT	GGCTCAACTG	CGGGCTTGCA
DPJ-0019	CGGCTTGTCG	CGTCGACTGT	GAAAACCCGT	GGCTCAACTG	CGGGCTTGCA
DPJ-0024	CGGCTTGTCG	CGTCGACTGT	GAAAACCCGT	GGCTCAACTG	CGGGCTTGCA
	601				650
<i>S.arenicola</i>	GTCGATACGG	GCAGGCTAGA	GTTCCGGTAGG	GGAGACTGGA	ATTCTGTTGG
<i>S.tropica</i>	GTCGATACGG	GCAGGCTAGA	GTTCCGGTAGG	GGAGACTGGA	ATTCTGTTGG
DPJ-0019	GTCGATACGG	GCAGGCTAGA	GTTCCGGTAGG	GGAGACTGGA	ATTCTGTTGG
DPJ-0024	GTCGATACGG	GCAGGCTAGA	GTTCCGGTAGG	GGAGACTGGA	ATTCTGTTGG
	651				700
<i>S.arenicola</i>	TAGCGGTGAA	ATGCGCAGAT	ATCAGGAGGA	ACACCGGTGG	CGAAGGCGGG
<i>S.tropica</i>	TAGCGGTGAA	ATGCGCAGAT	ATCAGGAGGA	ACACCGGTGG	CGAAGGCGGG
DPJ-0019	TAGCGGTGAA	ATGCGCAGAT	ATCAGGAGGA	ACACCGGTGG	CGAAGGCGGG
DPJ-0024	TAGCGGTGAA	ATGCGCAGAT	ATCAGGAGGA	ACACCGGTGG	CGAAGGCGGG
	701				750
<i>S.arenicola</i>	TCTCTGGGCC	GATACTGACG	CTGAGGAGCG	AAAGCGTGGG	GAGCGAACAG
<i>S.tropica</i>	TCTCTGGGCC	GATACTGACG	CTGAGGAGCG	AAAGCGTGGG	GAGCGAACAG
DPJ-0019	TCTCTGGGCC	GATACTGACG	CTGAGGAGCG	AAAGCGTGGG	GAGCGAACAG
DPJ-0024	TCTCTGGGCC	GATACTGACG	CTGAGGAGCG	AAAGCGTGGG	GAGCGAACAG
	751				800
<i>S.arenicola</i>	GATTAGATAC	CCTGGTAGTC	CACGCTGTAA	ACGTTGGGCG	CTAGGTGTGG
<i>S.tropica</i>	GATTAGATAC	CCTGGTAGTC	CACGCTGTAA	ACGTTGGGCG	CTAGGTGTGG
DPJ-0019	GATTAGATAC	CCTGGTAGTC	CACGCTGTAA	ACGTTGGGCG	CTAGGTGTGG
DPJ-0024	GATTAGATAC	CCTGGTAGTC	CACGCTGTAA	ACGTTGGGCG	CTAGGTGTGG
	801				850
<i>S.arenicola</i>	GGGGCCTCTC	CGGTTCTCTG	TGCCGCAGCT	AACGCATTAA	GCGCCCCGCC
<i>S.tropica</i>	GGGGCCTCTC	CGGTTCTCTG	TGCCGCAGCT	AACGCATTAA	GCGCCCCGCC
DPJ-0019	GGGGCCTCTC	CGGTTCTCTG	TGCCGCAGCT	AACGCATTAA	GCGCCCCGCC
DPJ-0024	GGGGCCTCTC	CGGTTCTCTG	TGCCGCAGCT	AACGCATTAA	GCGCCCCGCC
	851				900
<i>S.arenicola</i>	TGGGGAGTAC	GGCCGCAAGG	CTAAAACTCA	AAGGAATTGA	CGGGGGCCCCG
<i>S.tropica</i>	TGGGGAGTAC	GGCCGCAAGG	CTAAAACTCA	AAGGAATTGA	CGGGGGCCCCG
DPJ-0019	TGGGGAGTAC	GGCCGCAAGG	CTAAAACTCA	AAGGAATTGA	CGGGGGCCCCG
DPJ-0024	TGGGGAGTAC	GGCCGCAAGG	CTAAAACTCA	AAGGAATTGA	CGGGGGCCCCG

	901				950
<i>S.arenicola</i>	CACAAGCGGC	GGAGCATGCG	GATTAATTCG	ATGCAACGCG	AAGAACCTTA
<i>S.tropica</i>	CACAAGCGGC	GGAGCATGCG	GATTAATTCG	ATGCAACGCG	AAGAACCTTA
DPJ-0019	CACAAGCGGC	GGAGCATGCG	GATTAATTCG	ATGCAACGCG	AAGAACCTTA
DPJ-0024	CACAAGCGGC	GGAGCATGCG	GATTAATTCG	ATGCAACGCG	AAGAACCTTA
	951				1000
<i>S.arenicola</i>	CCTGGGTTTG	ACATCGCCGG	AAATCCTTCA	GAGATGGGGG	GTCTTCGGG
<i>S.tropica</i>	CCTGGGTTTG	ACATCGCCGG	AAATCCTTCA	GAGATGGGGG	GTCTTCGGG
DPJ-0019	CCTGGGTTTG	ACATCGCCGG	AAATCCTTCA	GAGATGGGGG	GTCTTCGGG
DPJ-0024	CCTGGGTTTG	ACATCGCCGG	AAATCCTTCA	GAGATGGGGG	GTCTTCGGG
	1001				1050
<i>S.arenicola</i>	GCCGGTGACA	GGTGGTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC	GTGAGATGTT
<i>S.tropica</i>	GCCGGTGACA	GGTGGTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC	GTGAGATGTT
DPJ-0019	GCCGGTGACA	GGTGGTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC	GTGAGATGTT
DPJ-0024	GCCGGTGACA	GGTGGTGCAT	GGCTGTCGTC	AGCTCGTGTC	GTGAGATGTT
	1051				1100
<i>S.arenicola</i>	GGGTAAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAACCCTT	GTTCGATGTT	GCCAGCGCGT
<i>S.tropica</i>	GGGTAAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAACCCTT	GTTCGATGTT	GCCAGCGCGT
DPJ-0019	GGGTAAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAACCCTT	GTTCGATGTT	GCCAGCGCGT
DPJ-0024	GGGTAAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAACCCTT	GTTCGATGTT	GCCAGCGCGT
	1101				1150
<i>S.arenicola</i>	TATGGCGGGG	ACTCATCGAA	GA CTGCCGGG	GTCAACTCGG	AGGAAGGTGG
<i>S.tropica</i>	TATGGCGGGG	ACTCATCGAA	GA CTGCCGGG	GTCAACTCGG	AGGAAGGTGG
DPJ-0019	TATGGCGGGG	ACTCATCGAA	GA CTGCCGGG	GTCAACTCGG	AGGAAGGTGG
DPJ-0024	TATGGCGGGG	ACTCATCGAA	GA CTGCCGGG	GTCAACTCGG	AGGAAGGTGG
	1151				1200
<i>S.arenicola</i>	GGATGACGTC	AAGTCATCAT	GCCCCCTTATG	TCCAGGGCTT	CACGCATGCT
<i>S.tropica</i>	GGATGACGTC	AAGTCATCAT	GCCCCCTTATG	TCCAGGGCTT	CACGCATGCT
DPJ-0019	GGATGACGTC	AAGTCATCAT	GCCCCCTTATG	TCCAGGGCTT	CACGCATGCT
DPJ-0024	GGATGACGTC	AAGTCATCAT	GCCCCCTTATG	TCCAGGGCTT	CACGCATGCT
	1201				1250
<i>S.arenicola</i>	ACAATGGCCG	GTACAGTGGG	CTGCGATAACC	GTGAGGTGGA	GCGAATCCCA
<i>S.tropica</i>	ACAATGGCCG	GTACAGTGGG	CTGCGATAACC	GTGAGGTGGA	GCGAATCCCA
DPJ-0019	ACAATGGCCG	GTACAGTGGG	CTGCGATAACC	GTGAGGTGGA	GCGAATCCCA
DPJ-0024	ACAATGGCCG	GTACAGTGGG	CTGCGATAACC	GTGAGGTGGA	GCGAATCCCA
	1251				1300
<i>S.arenicola</i>	AAAAGCCGGT	CTCAGTTCGG	ATCGGGGTCT	GCAACTCGAC	CCCGTGAAGT
<i>S.tropica</i>	AAAAGCCGGT	CTCAGTTCGG	ATCGGGGTCT	GCAACTCGAC	CCCGTGAAGT
DPJ-0019	AAAAGCCGGT	CTCAGTTCGG	ATCGGGGTCT	GCAACTCGAC	CCCGTGAAGT
DPJ-0024	AAAAGCCGGT	CTCAGTTCGG	ATCGGGGTCT	GCAACTCGAC	CCCGTGAAGT
	1301				1350
<i>S.arenicola</i>	CGGAGTCGCT	AGTAATCGCA	GATCAGCAAC	GCTGCGGTGA	ATACGTTCCC
<i>S.tropica</i>	CGGAGTCGCT	AGTAATCGCA	GATCAGCAAC	GCTGCGGTGA	ATACGTTCCC
DPJ-0019	CGGAGTCGCT	AGTAATCGCA	GATCAGCAAC	GCTGCGGTGA	ATACGTTCCC
DPJ-0024	CGGAGTCGCT	AGTAATCGCA	GATCAGCAAC	GCTGCGGTGA	ATACGTTCCC

ES 2 502 917 T3

	1351				1400
S.arenicola	GGGCCTTGTA	CACACCGCCC	GTCACGTCAC	GAAAGTCGGC	AACACCCGAA
S.tropica	GGGCCTTGTA	CACACCGCCC	GTCACGTCAC	GAAAGTCGGC	AACACCCGAA
DPJ-0019	GGGCCTTGTA	CACACCGCCC	GTCACGTCAC	GAAAGTCGGC	AACACCCGAA
DPJ-0024	GGGCCTTGTA	CACACCGCCC	GTCACGTCAC	GAAAGTCGGC	AACACCCGAA
	1401				1450
S.arenicola	GCCGGTGGCC	TAACCCTTGT	GGGGGGAGCC	GTCGAAGGTG	GGGCTGGCGA
S.tropica	GCCGGTGGCC	TAACCCTTGT	GGGGGGAGCC	GTCGAAGGTG	GGGCTGGCGA
DPJ-0019	GCCGGTGGCC	TAACCCTTGT	GGGGGGAGCC	GTCGAAGGTG	GGGCTGGCGA
DPJ-0024	GCCGGTGGCC	TAACCCTTGT	GGGGGGAGCC	GTCGAAGGTG	GGGCTGGCGA
	1451		1479		
S.arenicola	TTGGGACGAA	GTCGTAACAA	GGTAGCCGT	(SEQ ID NO:6)	
S.tropica	TTGGGACGAA	GTCGTAACAA	GGTAGCCGT	(SEQ ID NO:7)	
DPJ-0019	TTGGGACGAA	GTCG.....		(SEQ ID NO:1)	
DPJ-0024	TTGGGACGAA	GT.....		(SEQ ID NO:2)	