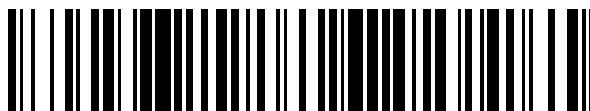


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 740 325**

51 Int. Cl.:

C07D 471/04 (2006.01)

A61K 31/4985 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.11.2014 PCT/GB2014/053490**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015 WO15075483**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2014 E 14806358 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 3074396**

54 Título: **Derivados de 1-(5-terc-butil-2-aril-pirazol-3-il)-3-[2-fluoro-4-[(3-oxo-4h-pirido[2,3 b]piracin-8-il)oxi]fenil]urea como inhibidores raf para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

25.11.2013 GB 201320729

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

05.02.2020

73 Titular/es:

**CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LTD (50.0%)
Angel Building, 407 St John Street
London, Greater London EC1V 4AD, GB y
INSTITUTE OF CANCER RESEARCH: ROYAL
CANCER HOSPITAL (THE) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SPRINGER, CAROLINE JOY;
MARAIS, RICHARD;
GIROTTI, ROMINA;
NICULESCU-DUVAZ, DAN;
NICULESCU-DUVAZ, ION y
ZAMBON, ALFONSO**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 740 325 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

Derivados de 1-(5-terc-butil-2-aril-pirazol-3-il)-3-[2-fluoro-4-[(3-oxo-4h-pirido[2,3-b]piracin-8-il)oxi]fenil]urea como inhibidores raf para el tratamiento del cáncer

CAMPO TÉCNICO

- 5 La presente invención trata generalmente del campo de los compuestos terapéuticos. Más específicamente, la presente invención trata de ciertos compuestos de 1-(5-terc-butil-2-aril-pirazol-3-il)-3-[2-fluoro-4-[(3-oxo-4H-pirido[2,3-b]piracin-8-il)oxi]fenil]urea (denominados en la presente “compuestos de TBAP”) que, entre otras cosas, inhiben RAF (p. ej., BRAF, CRAF, etc.). La presente invención también trata de composiciones farmacéuticas que comprenden tales compuestos, y tales compuestos y composiciones para el uso, tanto in vitro como in vivo, para
- 10 inhibir RAF (p. ej., BRAF, CRAF, etc.) y para tratar trastornos que incluyen: trastornos proliferativos; cáncer (incluyendo, p. ej., melanoma maligno, carcinoma colorrectal, adenocarcinoma pancreático); inflamación; trastornos inmunológicos; infecciones virales; trastornos fibróticos; trastornos asociados con una forma mutada de RAF (p. ej., BRAF, CRAF, etc.); trastornos mejorados por la inhibición de RAF (p. ej., BRAF, CRAF, etc.); trastornos mejorados por la inhibición de BRAF mutante; trastornos mejorados por la inhibición de BRAF y CRAF; trastornos
- 15 asociados con mutaciones de RAS y/o activación de la ruta de MAPK; trastornos mejorados por la inhibición de SRC, p38, FGFRA, VEGFR-2 (KDR) y/o LCK; etc.

ANTECEDENTES

Se cita en la presente un número de publicaciones a fin de describir y divulgar más a fondo la invención y el estado de la técnica de la que trata la invención.

- 20 A lo largo de esta memoria descriptiva, incluyendo las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que la palabra “comprenden” y variaciones tales como “comprende” y “que comprende” implican la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas indicados pero no la exclusión de ningún otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

- 25 Se debe apuntar que, según se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “uno(a)” y “el(la)” incluyen las referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a “un portado farmacéutico” incluye mezclas de dos o más de tales portadores, y similares.

- 30 Los intervalos a menudo se expresan en la presente como de “aproximadamente” un valor particular y/o hasta “aproximadamente” otro valor particular. Cuando se expresa tal intervalo, otra realización incluye desde un valor particular y/o hasta el otro valor particular. De forma similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso de “aproximadamente” precedente, se entenderá que el valor particular forma otra realización.

- Esta divulgación incluye información que puede ser útil para comprender la presente invención. No es una admisión de que cualquier información proporcionada en la presente sea técnica anterior o pertinente para la invención actualmente reivindicada, o que cualquier publicación mencionada específicamente o implícitamente sea técnica anterior.

35 RAF, Trastornos Proliferativos y Cáncer

- Se considera generalmente que las mutaciones en los genes que controlan directamente o indirectamente el crecimiento y la diferenciación celular son la principal causa del cáncer. Los tumores malignos se desarrollan a través de una serie de cambios escalonados progresivos que conducen a la pérdida del control del crecimiento característica de las células cancerosas, es decir, proliferación desregulada continua, la capacidad para invadir tejidos circundantes, la capacidad para metastatizarse en diferentes zonas orgánicas, la estimulación de la angiogénesis, la resistencia a la apoptosis, la capacidad para evadir el sistema inmunitario, rutas metabólicas anormales e inflamación local. Estudios in vitro cuidadosamente controlados han ayudado a definir los factores que caracterizan el crecimiento de células normales y neoplásticas y han conducido a la identificación de proteínas específicas que controlan el crecimiento y la diferenciación celular.

- 45 RAF es una diana aguas abajo clave para las proteínas RAS de unión a nucleótidos de guanina / GTPasa y media en la activación de la cascada de MAP cinasa que consiste en RAF-MEK-ERK. La ERK activada es una cinasa que posteriormente tiene como diana un número de proteínas responsables de mediar en, entre otras cosas, el crecimiento, la supervivencia y las funciones de transcripción de la ruta. Estas incluyen los factores de transcripción ELK1, C-JUN, la familia Ets (incluyendo Ets 1, 2 y 7) y la familia FOS. La ruta de transducción de señales
- 50 RAS-RAF-MEK-ERK se activa en respuesta a muchos estímulos celulares incluyendo factores de crecimiento tales como EGF, PDGF, KGF, etc. Debido a que la ruta es una diana principal para la acción de factores de crecimiento, se ha encontrado que la actividad de RAF-MEK-ERK se regula al alza en muchos tumores dependientes de factores. La observación de que aproximadamente 20% de todos los tumores han sufrido una mutación activadora en una de las proteínas RAS indica que la ruta es más ampliamente importante en la tumorigénesis.

La familia de oncogenes RAF incluye tres genes muy conservados denominados *ARAF*, *BRAF* y *CRAF* (también denominado *Raf-1*). Los genes RAF codifican proteína cinasas que se cree que representan papeles reguladores importantes en procesos de transducción de señales que regulan la proliferación celular. Los genes RAF codifican proteína cinasas específicas para serina-treonina muy conservadas, que son incorporadas en la membrana plasmática después de la unión directa a RAS, que es el episodio iniciador en la activación de RAF. Las proteínas RAF son parte de una ruta de transducción de señales que se cree que consiste en tirosina cinasas receptoras, cinasas p21 RAS, RAF, Mek1 (activador de ERK, o MAPKK) y cinasas ERK (MAPK), que finalmente fosforilan varios sustratos celulares, incluyendo factores de transcripción. La señalización a través de esta ruta puede mediar en la diferenciación, la proliferación o la transformación oncogénica en diferentes contextos celulares. Así, se cree que las cinasas RAF representan un papel fundamental en la ruta de transducción de señales celular normal, acoplando una multitud de factores de crecimiento a su efecto neto, la proliferación celular. Debido a que las proteína RAF son efectores aguas abajo directos de proteína RAS, se cree que las terapias dirigidas contra cinasas RAF son útiles en el tratamiento de tumores dependientes de RAS.

Las cinasas RAF se regulan y expresan diferencialmente. *CRAF* se expresa en todos los órganos y en todas las líneas celulares que se han examinado. *ARAF* y *BRAF* también parecen ser ubicuas, pero se expresan lo más intensamente en tejidos urogenitales y cerebrales, respectivamente. Debido a que *BRAF* se expresa mucho en tejidos neurales, se creyó una vez que se limitaba a estos tejidos, pero se ha encontrado desde entonces que se expresa más ampliamente. Aunque todas las proteínas RAF pueden unirse a RAS activa, *BRAF* es más fuertemente activada por RAS oncogénica.

BRAF es importante en el cáncer, debido a que se muta en aproximadamente la mitad de los melanomas malignos y carcinomas papilares tiroideos, 30% del cáncer de ovario de baja malignidad, 15% de cánceres de colon, y con frecuencia muy alta en tricoleucemia, así como ocurre a frecuencias menores en un número de otros cánceres, totalizando 7% de los cánceres humanos. Véase, p. ej., <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>. Un subtipo específico de cánceres pancreáticos, el carcinoma medular natural del páncreas *KRAS2*, presenta mutaciones de *BRAF* en 30% de las muestras (véase, p. ej., Calhoun y cols., 2003). En contraste, las mutaciones de *ARAF* y *CRAF* son muy raras en el cáncer humano.

<i>Frecuencia de Mutaciones de BRAF en Diferentes Tipos de Cánceres</i>		
Tipo de tumor	Frecuencia	Cita
Melanoma Maligno	50%	
Cáncer Tiroideo Papilar (PTC)		Xing, 2013
PTC Convencional	45%	
PTC Variante folicular	15%	
PTC de células altas	80-100%	
Cáncer Tiroideo Anaplástico	25%	
Carcinoma colorrectal	15%	
Carcinomas ováricos de baja malignidad	30%	
Tricoleucemia	100%	Arcaini y cols., 2012
Colangiocarcinoma	15%	
Tumores del sistema nervioso	7%	Schindler y cols., 2011
Astrocitomas pilocíticos	9%	
Ganglioglioma	18%	
Xantastrocitoma pleomórfico	66%	
Mieloma múltiple	4%	Chapman y cols., 2011
Cáncer de Pulmón No Microcítico	1-3%	
Carcinoma medular del páncreas	30%	

Tabla 1		
<i>Frecuencia de Mutaciones de BRAF en Otras enfermedades</i>		
Histiocitosis		
Histiocitosis de células de Langerhans	57%	Badalian-Very y cols., 2011
Enfermedad de Erdheim-Chester	54%	Haroche y cols., 2012

Se han descrito más de 100 mutaciones diferentes en BRAF en el cáncer, pero una sola mutación (una sustitución de la valina (V) por ácido glutámico (E) en la posición 600) explica aproximadamente 80% de las mutaciones de BRAF totales en el cáncer. Este mutante activa BRAF 500 veces, y permite que estimule la señalización constitutiva de ERK y NFkB, estimulando la supervivencia y la proliferación. Por consiguiente, ^{V600E}BRAF puede transformar células tales como fibroblastos y melanocitos. La inhibición de ^{V600E}BRAF en células cancerosas inhibe la proliferación celular e induce apoptosis in vitro; in vivo, suprime el crecimiento de células tumorales, validando ^{V600E}BRAF como una diana terapéutica.

Otras mutaciones V600 BRAF identificada en melanoma son V600K, V600D y V600R (véase, p. ej., Davies y cols., 2002; Wan y cols., 2004; Long y cols., 2011; Rubinstein y cols., 2010). Un subgrupo secundario de melanomas también se identificó con mutaciones de BRAF en posiciones distintas a 600. Estos mutantes de BRAF de posición distinta a V600 no activan necesariamente la actividad de BRAF cinasa directamente, sino que requieren la presencia de CRAF para transactivar su señalización de MAPK (véase, p. ej., Smalley y cols., 2009). En tal caso, la inhibición de la actividad de RAF seguiría siendo un objetivo beneficioso en el tratamiento del cáncer.

De forma importante, se ha mostrado que los fármacos que inhiben BRAF mutante tales como vemurafenib (PLX4032, RG7204, Zelboraf) (véase, p. ej., Flaherty y cols., 2010) y dabrafenib (GSK-2118436) (véase, p. ej., Falchook y cols., 2012) pueden mediar en respuestas impresionantes en pacientes cuyos tumores expresan BRAF oncogénica (revisado en Salama y cols., 2013). En particular, el vemurafenib ha mostrado resultados prometedores en melanoma accionado por BRAF mutante (véanse, p. ej., Chapman y cols., 2011; Sosman y cols., 2012). Fue aprobado en 2011 por the USA Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento de melanoma metastásico o inextirpable en fase tardía por mutante de BRAF V600E, y en 2012 por la Agencia Europea del Medicamento (EMA, por sus siglas en inglés) como monoterapia para el tratamiento de pacientes adultos con cualquier melanoma inextirpable o metastásico positivo a mutación BRAF V600. El dabrafenib fue aprobado por la FDA y la EMA en 2013 para la misma indicación.

Estos datos validan BRAF mutante como una diana terapéutica en el melanoma y una diana potencial para otros cánceres y enfermedades proliferativas en los que la BRAF se muta. Esta y otra evidencia sugieren que la inhibición de la actividad de RAF (p. ej., BRAF) sería beneficiosa en el tratamiento del cáncer, y que la inhibición de la actividad de RAF (p. ej., BRAF) podría ser particularmente beneficiosa en los cánceres que contienen una mutación de BRAF activada constitutivamente.

Resistencia a Inhibidores de BRAF

A pesar de ser capaz de mediar en respuestas clínicas significativas, la mayoría de los pacientes tratados con vemurafenib y dabrafenib finalmente empeoran durante el tratamiento (véanse p. ej., Flaherty y cols., 2010; Sosman y cols., 2012) debido a la adquisición de resistencia que puede estar mediada por varios mecanismos (véase, p. ej., Sullivan y cols., 2011). Por otra parte, aproximadamente 30% de los pacientes presentan resistencia primaria y no responden a pesar de la presencia de una mutación de BRAF (véase, p. ej., Chapman y cols., 2011).

Las mutaciones en KRAS (G12S, G12V, G12D, G12A, G12C, G13A, G13D) se han sugerido como marcadores predictivos para identificar tumores que no son sensibles al tratamiento con inhibidores de BRAF mutante (véase, p. ej., Hatzivassiliou y cols., 2011). La mutación Q16K de NRAS confiere resistencia al inhibidor de BRAF vemurafenib (véase, p. ej., Nazarian y cols., 2010). De forma similar, la resistencia al tratamiento con el inhibidor de BRAF dabrafenib es predicha por las mutaciones Q16K y A146T de la proteína NRAS (véase, p. ej., Greger y cols., 2012). La activación de RAS a través de mutaciones condujo a un incremento en la dimerización de RAF (formación del heterodímero de CRAF con la proteína BRAF y/o el homodímero CRAF/BRAF) con un incremento de la señalización a través de la cascada de MAPK y un incremento de la proliferación celular (véase, p. ej., Poulidakos y cols. 2010).

La regulación al alza de (y las mutaciones en) CRAF es otro mecanismo de resistencia observado en melanomas resistentes tratados con inhibidores de BRAF (véanse, p. ej., Heidorn y cols., 2010; Montagut y cols., 2008; Antony y cols. 2013). Por lo tanto, es probable que los inhibidores de panRAF de múltiples isoformas de RAF (BRAF y CRAF especialmente) tengan un efecto mejorado en melanomas mutados en RAS y otros cánceres mutados en RAS, y se dirijan a un mecanismo de resistencia clave para inhibidores de BRAF selectivos.

El aumento del número de copias del gen BRAFV600E está asociado con la resistencia a inhibidores de BRAF en melanoma con mutante de BRAF (véase, p. ej., Shi y cols., 2012) y carcinoma colorrectal (véase, p. ej., Corcoran y cols., 2010). Ambos modelos son sensibles a la inhibición concomitante de BRAF y MEK, pero solo el melanoma con

mutante de BRAF amplificado es sensible al inhibidor de MEK solo. Es probable que este mecanismo de resistencia sea sensible a la inhibición de panRAF que solamente a la inhibición de BRAF.

5 En algunos melanomas, la resistencia de vemurafenib se adquiría a través de la expresión de isoformas variantes de empalme de BRAFV600E. Una variante de empalme de 61kDa de BRAFV600E (p61BRAFV600E) carecía de los exones 4-8 que codifican el dominio de unión a RAS, y era resistente a vemurafenib. p61BRAFV600E se dimeriza constitutivamente en ausencia de RAS activada. Se observó que la dimerización de p61BRAFV600E era crítica para mediar en la resistencia a inhibidores de BRAF (véase, p. ej., Poulikakos y cols., 2011).

10 La fusión génica de BRAF y CRAF es un mecanismo alternativo de la activación de la ruta de MAPK. Estos productos de fusión génica activadores se han identificado en el cáncer de próstata, el cáncer gástrico y el melanoma (SLC45A3-BRAF y ESRP1-RAF1) (véase, p. ej., Palanisamy y cols., 2010), cánceres tiroideos (AKAP9-BRAF) (véase, p. ej., Ciampi y cols., 2005) y astrocitomas pediátricos (KIAA1549-BRAF) (véase, p. ej., Sievert y cols., 2013). Algunos de los modelos que expresan fusiones de RAF (por ejemplo SLC45A3-BRAF) son sensibles a la inhibición de BRAF y MEK; en contraste, el modelo KIAA1549-BRAF es resistente a PLX4720, pero es sensible a un inhibidor de BRAF de segunda generación.

15 El supresor de cinasa de Ras (KSR) es un modulador positivo conservado de la ruta RAS-RAF-MEK-ERK. KSR1 interactúa constitutivamente con MEK y se sabe que representa un papel importante en la colocación de MEK con RAF en la membrana plasmática. La KSR1 está implicada en la activación de la ruta de MAPK por inhibidores de BRAF en mutante de RAS o células RAS activadas (véase, p. ej., McKay y cols., 2011). Se han propuesto dos mecanismos de activación farmacológica de la ruta. Un mecanismo implica la formación del dímero CRAF-KSR1, la formación de complejos con MEK y la fosforilación de MEK mediante el dímero KSR1-CRAF (véase, p. ej., Hu y cols., 2011). En el otro mecanismo, KSR1 se dimeriza con BRAF, y compiten con el heterodímero BRAF-CRAF que es el conductor de la fosforilación de MEK. Se ha sugerido que las células activadas por RAS con menor expresión de KSR1 mostrarán más activación de la ruta paradójica (véase, p. ej., McKay y cols., 2011). En ambos mecanismos, es probable que los inhibidores de panRAF reduzcan la activación de la ruta independientemente del nivel de expresión de KSR1.

25 La sobreexpresión de tirosina cinasas receptoras (RTK) es otro mecanismo de resistencia a inhibidores de BRAF. La sobreexpresión de EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) conduce a la reactivación de la ruta de MAPK mediada por EGFR y la resistencia a vemurafenib en cánceres colorrectales con mutantes de BRAF (véase, p. ej., Corcoran y cols., 2012). En líneas celulares de melanoma con mutantes de BRAF resistentes a fármacos, la señalización de EGFR-SFK-STAT3 puede mediar en la resistencia a inhibidores de BRAF in vitro e in vivo, en el melanoma (véase, p. ej., Girotti y cols., 2013). Las cinasas de la familia Src SFK representan un papel clave para mediar en la resistencia a inhibidores de BRAF en células de melanoma (véase, p. ej., Girotti y cols., 2013; Vergani y cols., 2011). Se observa una fosforilación elevada de las SFK LYN, YES y FYN en las líneas resistentes a vemurafenib. El crecimiento de células resistentes es sensible a la inhibición de SFK: El dasatinib y el agotamiento de SRC y LYN suprimen ambos la invasión de las células resistentes in vitro. De importancia crítica, la señalización de SFK se incrementaba en un tumor de un paciente con resistencia intrínseca a vemurafenib, y el dasatinib inhibía el crecimiento y la metástasis de este tumor en ratones.

Corcoran y cols., 2012, "EGFR-mediated reactivation of MAPK signaling contributes to insensitivity of BRAF-mutant cancer colorrectals to RAF inhibition with vemurafenib", *Cancer Discovery*, Vol. 2, pp. 227-235.

40 Se encontró que PDGFR-β se sobreexpresaba y se hiperfosforilaba en líneas celulares de BRAF mutante resistentes a vemurafenib, y se regulan al alza en varios casos de tumores resistentes a vemurafenib procedentes de pacientes, sugiriendo que este mecanismo puede ser clínicamente pertinente (véase, p. ej., Nazarian y cols., 2010). La regulación al alza de PDGFR-β puede conducir la resistencia al activar otras rutas aguas abajo independientes de ERK1/2 (PI3K, PLCγ).

45 Los estudios mecanicistas mostraron que la señalización de IGF1R mediaba en la señalización de PI3K/AKT incrementada en células que adquirían resistencia adquirida a inhibidores de BRAF y que la resistencia se podría invertir al tratar las células con la combinación de una PI3K y un inhibidor de MEK o un IGF1R y un inhibidor de MEK (véase, p. ej., Villanueva y cols., 2011). La importancia aplicada de este hallazgo se confirmó por la observación de que 1 de 5 especímenes con melanoma de pacientes que fracasaban con vemurafenib expresaban niveles incrementados de IGF1R (véase, p. ej., Villanueva y cols., 2011).

55 La regulación al alza de factores de crecimiento por el estroma es un mecanismo de resistencia. Se ha observado una correlación significativa entre la expresión de células estromáticas de HGF en pacientes con melanoma con mutante de BRAF y resistencia innata al tratamiento con inhibidores de RAF (véase, p. ej., Wilson y cols., 2012). cMET y/o sus ligandos se reivindican como marcadores predictivos para identificar tumores que no son vulnerables a un inhibidor de BRAF (véanse, p. ej., Hatzivassiliou y cols., 2011; Straussman y cols., 2012). La inhibición doble de RAF y bien HGF o bien MET dio como resultado la inversión de la resistencia al fármaco, sugiriendo la terapia de combinación inhibidora de RAF más HGF o MET como una estrategia terapéutica potencial (véanse, p. ej., Hatzivassiliou y cols., 2011; Straussman y cols., 2012).

5 FGFR1 está implicado en el empeoramiento de melanomas, y la desactivación de FGFR1 da como resultado la inhibición del crecimiento de melanomas in vivo (véase, p. ej., Wang y cols., 1997). El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, por sus siglas en inglés) rescata algunas células mutantes en BRAF del tratamiento con PLX4032 (véase, p. ej., Wilson y cols., 2012) y la inhibición de FGFR1 es sinérgica con el inhibidor de múltiples cinasas/BRAF sorafenib y el inhibidor de BRAF específico RG7204 (véase, p. ej., Metzner y cols., 2012). Estos hallazgos sugieren que la inhibición de RTK tales como EGFR, PDGFR- β , HGFR, IGF1R y FGFR, y de SFKs debe tener como diana un número de mecanismos de resistencia para inhibidores de BRAF selectivos y por consiguiente ser de utilidad en tumores con mutantes de BRAF que se han vuelto resistentes a inhibidores selectivos de BRAF.

Cáncer y RAS

10 Las proteínas RAS son proteínas pequeñas que se unen a nucleótidos de guanina, que están aguas abajo de receptores de factores de crecimiento, citocinas y hormonas. Estos receptores de la superficie celular activan proteínas llamadas factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GNEF, por sus siglas en inglés), que reemplazan GDP por GTP en proteínas RAS, estimulando la activación de RAS. Otras proteínas llamadas proteínas activadoras de GTPasa (GAP, por sus siglas en inglés) estimulan la actividad intrínseca para GTPasa de RAS, promoviendo de ese modo la hidrólisis de GTP y devolviendo RAS a su estado inactivo unido a GDP. La RAS
15 activada se une a varias proteínas efectoras, incluyendo fosfoinosítido 3-cinasa (PI3K, por sus siglas en inglés), la familia RAF de proteína cinasas y el factor de intercambio de nucleótidos de guanina Ras. A su vez, estos efectores regulan la actividad de las rutas de señalización que controlan la proliferación, la senescencia, la supervivencia y la diferenciación celulares. Hay tres genes RAS en mamíferos denominados HRAS, KRAS y NRAS y cumplen
20 funciones solapadas pero no conservadas.

Las proteínas RAS también son importantes en el cáncer. 20-30% de los tumores humanos albergan mutaciones somáticas de ganancia de función en uno de los genes RAS. Lo más comúnmente, estas implican a los codones para glicina 12 (G12), glicina 13 (G13) y glutamina 61 (Q61) y estas mutaciones dificultan, a través de diferentes
25 mecanismos, la actividad intrínseca de GTPasa estimulada por GAP de RAS, reteniéndola en el estado activo unido a GTP y permitiendo que promueva la tumorigénesis. Véanse, p. ej., Downward y cols., 2003; Young y cols., 2009; Bos y cols., 1989.

Tabla 2
Frecuencia de Mutaciones de RAS en Diferentes Tipos de Cánceres

Tipo de Tumor	Frecuencia	Cita
Páncreas	90%	
Tiroides (Papilar indiferenciado)	60%	
Tiroides (Folicular)	55%	
Colorrectal	45%	
Seminoma	45%	
Adenocarcinoma pulmonar (no microcítico)	35%	
Hígado	30%	
Enfermedades malignas hematológicas:		Ward y cols., 2012
Leucemia mielógena aguda (AML)	16%	
Leucemia mielomonocítica juvenil (JMML)	25%	
Leucemia mielomonocítica crónica (JMML)	30%	
Síndrome mielodisplástico (MDS)	6%	
Leucemia linfoblástica aguda (ALL)	14%	
Mieloma múltiple (MM)	26%	
Linfoma de Burkitt	10%	
Linfoma de Hodgkin	16%	
Melanoma Maligno	20%	

Tabla 2		
Frecuencia de Mutaciones de RAS en Diferentes Tipos de Cánceres		
Tipo de Tumor	Frecuencia	Cita
Carcinoma de células transicionales de vejiga	12%	Fernandes-Medarde, 2011
Riñón	10%	
Cánceres ováricos epiteliales	11%	www.mycancergenome.org
Seroso de baja malignidad (Tipo I)	33%	
Mucinoso (Tipo I)	50-75%	
Cánceres endometriales	0-46%	Mammas y cols.,2005
Cáncer de cuello uterino	0-61%	Mammas y cols.,2005
Adenocarcinoma del tracto biliar	35%	Fernandes-Medarde, 2011
Sarcoma de tejidos blandos *		Fernandes-Medarde, 2011
Angiosarcoma	49%	
Leiomioma	8%	
Rabdomiosarcoma	11%	
Mixoma	11%	
Histiocitoma fibroso maligno	16%	

(*) La RAS más frecuentemente mutada citada (KRAS o NRAS o HRAS).

Otros cánceres tienen mutaciones menos frecuentes de los genes de la familia RAS, pero su mutación predice un pronóstico, por ejemplo neuroblastoma (8% de mutación de NRAS), adenocarcinoma de estómago (6% de mutante de KRAS).

5 RAS y RAF

Las proteínas RAS activas activan varios efectores aguas abajo, incluyendo las proteínas de la familia RAF. Hay tres proteínas RAF, ARAF, BRAF y CRAF. RAF activada fosforila y activa una segunda proteína cinasa llamada MEK, que a continuación fosforila y activa una tercera proteína cinasa llamada ERK. ERK fosforila una multitud de sustratos citosólicos y nucleares, regulando de ese modo procesos celulares tales como proliferación, supervivencia, diferenciación y senescencia.

Notablemente, sin embargo, en las células cancerosas, la RAS oncogénica no señala a través de BRAF, sino que en cambio señala exclusivamente a través de CRAF para activar MEK.

En la gran mayoría de los cánceres, las mutaciones en BRAF y RAS son mutuamente exclusivas. Esto proporciona una evidencia genética para sugerir que estas proteínas están en la misma ruta y que conducen los mismos procesos en células cancerosas. Sin embargo, hay diferencias claras entre las funciones de BRAF oncogénica y RAS oncogénica en células cancerosas. En primer lugar, RAS activa varias rutas, mientras que solo se sabe que BRAF active la ruta MEK/ERK. Como consecuencia, las células con mutantes en BRAF son más dependientes de la señalización de MEK/ERK y así son considerablemente más sensibles a inhibidores de BRAF o MEK que la célula en la que se muta RAS. Véanse, p. ej., Garnett y cols., 2004; Wellbrock y cols., 2004; Gray-Schopfer y cols., 2007; Solit y cols., 2006.

Aparte de las mutaciones, las proteínas de señalización en la cascada de MAPK se sobreexpresan en un número de enfermedades malignas. Por ejemplo, HRAS y NRAS se sobreexpresan en cánceres de cuello uterino. Las mutaciones en RAS son raras en el carcinoma adrenocortical, pero la población colectiva de tumores con mutaciones en RAS, BRAF y EGFR muestran un incremento de la señalización a través de la ruta y pueden ser una diana para inhibidores de la ruta de MAPK (véase, p. ej., Kotoula y cols., 2009). Los cánceres ováricos de baja malignidad y el cáncer peritoneal responden al bloqueo de la ruta de MAPK con el inhibidor de MEK selumetinib independientemente del estado de mutación de RAS/RAF. En el melanoma uveal, la ruta de MAPK es activada a través de la mutación de GNAQ que explica 50% de los melanomas uveales (véase, p. ej., Gaudi y cols., 2011). cRAF se sobreexpresa en una variedad de cánceres humanos primarios, tales como de pulmón, hígado, próstata, tumores neurodérmicos primitivos, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (véanse, p. ej., Damodar

Reddy y cols., 2001; Hwang y cols., 2004; Mukterjee y cols., 2005; Schreck y cols., 2006; Riva y cols., 1995). La ruta de MAPK se activa en 74% de las muestras de pacientes con leucemia mieloide aguda (véase, p. ej., Milella y cols., 2001). En la neurofibromatosis tipo 1, la pérdida del gen supresor de tumores NF1 conduce a una hiperactivación de la señalización de RAS, y una desregularización de la señalización de Ras/ERK que es crítica para el crecimiento de tumores de los nervios periféricos NF1 (véase, p. ej., Jessen y cols., 2013). Un inhibidor de panRAF provoca un bloqueo efectivo de la ruta de MAPK para tumores con mutantes en BRAF y para tumores con mutantes en RAS y tiene una amplia aplicación para cánceres con desregulación de la ruta de señalización de MAPK.

Por lo tanto, los cánceres con mutaciones activadoras de RAS, RAF y EGFR o sobreexpresión de RAS, RAF y EGFR, incluyendo cualquiera de las isoformas de las mismas, pueden ser particularmente sensibles a la inhibición de panRAF (p. ej., CRAF y BRAF). los cánceres con otras anomalías que conducen a una ruta de RAF-MEK-ERK desregulada también pueden ser particularmente sensibles al tratamiento con inhibidores de la actividad de panRAF (p. ej., CRAF y BRAF). Ejemplos de tales anomalías incluyen la activación constitutiva de un receptor de factor de crecimiento; la sobreexpresión de uno o más receptores de factores de crecimiento; la sobreexpresión de uno o más factores de crecimiento; la activación de rutas mediadas por KSR; y las fusiones génicas de BRAF o CRAF.

Ruta de MAPK en Otras Enfermedades

La ruta RAF-MEK-ERK funciona aguas abajo de muchos receptores y estímulos indicando un amplio papel en la regulación de la función celular. Por esta razón, los inhibidores de RAF pueden encontrar utilidad en otras afecciones que están asociadas con la regulación al alza de la señalización a través de esta ruta. La ruta RAF-MEK-ERK también es un componente importante de la respuesta normal de células no transformadas a la acción de factores de crecimiento. Por lo tanto, los inhibidores de RAF se pueden usar en enfermedades en las que hay una proliferación inapropiada o excesiva de tejido normal. Estas incluyen, por ejemplo, glomerulonefritis y psoriasis.

La función de las células inflamatorias está controlada por muchos factores, cuyos efectos están mediados por diferentes rutas de transducción de señales. Aunque algunas funciones proinflamatorias clave están mediadas por p38 Map cinasa (p. ej., liberación de TNF), otras están mediadas por otras rutas. La ruta RAF-MEK-ERK, en particular, es una importante señal activadora y proliferativa en muchas células inflamatorias. Los linfocitos B y T, en particular, requieren la activación de la ruta RAF-MEK-ERK para la expansión clonal y la generación de poblaciones efectoras (véanse, p. ej., Cantrell, 2003; Genot y cols., 2000). La ruta de señalización celular de la que forma parte RAF se ha relacionado con trastornos inflamatorios caracterizados por la proliferación de células T (activación y crecimiento de células T), tales como rechazo de injertos tisulares, choque endotóxico y nefritis glomerular.

La activación de la señalización de MAPK/ERK se ha demostrado en muchos modelos de enfermedad, y se ha mostrado que la inhibición de la ruta, usando, por ejemplo, inhibidores de MEK, es potencialmente beneficiosa en estas enfermedades diversas tales como:

- Dolor: Evidencia de Eficacia en Modelos de Dolor: La ruta de MEK es regulada al alza en neuronas del asta posterior en el dolor persistente (véanse, p. ej., Ji y cols., 2002; Song y cols., 2005; Ma y cols., 2005; Karim y cols., 2006); Inhibidores de Mek en el dolor neuropático (véase, p. ej., Dixon y cols., 2001).
- Apoplejía: Evidencia de Eficacia en Modelos de Apoplejía Neuroprotección Significativa contra Lesión Cerebral Isquémica por Inhibición de la MEK (véanse, p. ej., Wang y cols., 2003; Wang y cols., 2004; Maddahi y cols., 2010).
- Diabetes: Evidencia en Complicaciones Diabéticas (véase, p. ej., Fujita y cols., 2004).
- Inflamación: Evidencia de Eficacia en Modelos de Inflamación (véanse, p. ej., Jaffee y cols., 2000; Thalhamer y cols., 2008; Geppert y cols., 1994).
- Artritis: Evidencia de eficacia en osteoartritis experimental (véase, p. ej., Pelletier y cols., 2003); modelo de artritis reumatoide (véanse, p. ej., Chun y cols., 2002; Dudley y cols., 2000); revisado en Thalhamer y cols., 2008.
- Remodelación cardíaca, por ejemplo, en el síndrome metabólico (véase, p. ej., Asrih y cols., 2013).
- Lesión orgánica, por ejemplo, en una lesión renal inducida por cisplatino (véase, p. ej., Jo y cols., 2005).
- Hemoglobinopatías: drepanocitosis, β -talasemia, hemoglobinopatía H (véase, p. ej., Zennadi y cols., 2012).
- Asma (véase, p. ej., Bridges y cols., 2000).
- Rechazo de trasplantes (véase, p. ej., Gilbertsen y cols., 2000).
- Choque séptico (véase, p. ej., Geppert y cols., 1994).
- Infección viral, por ejemplo hepatitis B (véase, p. ej., Benn y cols., 1994), hepatitis C (véase, p. ej., Zhang y cols., 2012), virus de inmunodeficiencia humana (HIV, por sus siglas en inglés) (véase, p. ej., Yang y cols., 1999), virus de Epstein-Barr (EBV, por sus siglas en inglés) (véase, p. ej., Fukuda y cols., 2007), HPV (véase, p. ej., Payne y cols.,

2001), herpesvirus humano-8 (HHV, por sus siglas en inglés) asociado con sarcoma de Kaposi (véase, p. ej., Akula y cols., 2004), citomegalovirus humano (véase, p. ej., Johnson y cols., 2001), virus de Coxsackie B3 (véase, p. ej., Luo y cols., 2002), virus de Borna (véase, p. ej., Planz y cols., 2001), virus de la gripe (véase, p. ej., Pleschka y cols., 2001).

5 • infecciones crónicas y enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo, al inhibir la actividad de células T reguladoras (véase, p. ej., Kjetil y cols., 2013).

• Aterosclerosis (véase, p. ej., Miura y cols., 2004).

• Reestenosis (véase, p. ej., Graf y cols., 1997).

• Cardiomiopatía (véase, p. ej., Lorenz y cols., 2009).

10 • Lesión por reperfusión isquémica cardíaca (véase, p. ej., Zouki y cols., 2000).

• Psoriasis (véase, p. ej., Haase y cols., 2001).

15 • Enfermedad de Alzheimer (véase, p. ej., Mei y cols., 2006) y otros trastornos neurológicos inducidos tales como mielopatía asociada a HTLV-I/enfermedades parasitarias espáticas tropicales o neurodegenerativas tales como enfermedad de Parkinson o esclerosis lateral amiloide a través de modulación de variantes de empalme de CD44 (véase, p. ej., Pinner y cols., 2009).

• Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (véase, p. ej., Mercer y cols., 2006).

• Enteropatía inflamatoria (véase, p. ej., Lowenberg y cols., 2005).

• Enfermedades fibrogenéticas, tales como fibrosis quística (véase, p. ej., Li y cols., 1998), fibrosis hepática, por ejemplo, cirrosis hepática (véase, p. ej., Davies y cols., 1996).

20 • Las mutaciones en RAS hereditarias conducen a un grupo de enfermedades llamadas colectivamente rasopatía. Elegir como diana la ruta de MAPK en estas enfermedades se ha propuesto como un enfoque terapéutico en este tipo de enfermedades tales como el síndrome de Noonan (véase, p. ej., Gu y cols., 2013), el síndrome cardiorfaciocutáneo (véase, p. ej., Anastasaki y cols., 2012) y malformaciones capilares (véase, p. ej., Vikkula y cols., 2004).

25 RTKs

Las tirosina cinasas receptoras (RTK) son importantes en la transmisión de señales bioquímica a través de la membrana plasmática de las células. Estas moléculas transmembranarias consisten característicamente en un dominio de unión a ligando extracelular conectado a través de un segmento en la membrana plasmática a un dominio de tirosina cinasa intracelular. La unión del ligando al receptor da como resultado la estimulación de la actividad de tirosina cinasa asociada al receptor que conduce a la fosforilación de residuos de tirosina tanto en el receptor como en otras proteínas intracelulares, conduciendo a una variedad de respuestas celulares. Hasta la fecha, se han identificado al menos diecinueve subfamilias de RTK distintas, definidas por la homología de la secuencia de aminoácidos.

30

FGFR

35 La familia de factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) de polipéptidos de señalización regula una serie diversa de funciones fisiológicas incluyendo mitogénesis, curación de heridas, diferenciación celular y angiogénesis, y desarrollo. El crecimiento así como la proliferación de células tanto normales como malignas están afectados por cambios en la concentración local de estas moléculas de señalización extracelular, que actúan como factores autocrinos así como paracrinos. La señalización de FGF autocrina puede ser particularmente importante en el empeoramiento de cánceres dependientes de hormonas esteroideas y para un estado independiente de hormonas (véase, p. ej., Powers y cols., 2000).

40

Los FGF y sus receptores se expresan en niveles incrementados en varios tejidos y líneas celulares y se cree que la sobreexpresión contribuye al fenotipo maligno. Por otra parte, un número de oncogenes son homólogos de genes que codifican receptores de factores de crecimiento, y hay un potencial para la activación aberrante de la señalización dependiente de FGF en cáncer pancreático humano (véase, p. ej., Ozawa y cols., 2001).

45

Los dos miembros prototípicos son factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF o FGF1) y factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF o FGF2) y, hasta la fecha, se han identificado al menos veinte miembros distintos de la familia de FGF. La respuesta celular a FGF se transmite a través de cuatro tipos de receptores de factor de crecimiento de fibroblastos de tirosina cinasa transmembranaria de alta afinidad numerados de 1 a 4 (FGFR-1 a FGFR-4). Al unirse al ligando, los receptores se dimerizan y auto- o trans-fosforilan residuos de tirosina citoplásmicos específicos para transmitir una señal intracelular que finalmente alcanza efectores de factores de transcripción nucleares.

50

La interrupción de la ruta de FGFR-1 (FGFRA) afecta a la proliferación de células tumorales debido a que esta cinasa se activa en muchos tipos de tumores además de células endoteliales proliferativas. La sobreexpresión y la activación de FGFR-1 en la vasculatura asociada a tumores ha sugerido un papel de estas moléculas en la angiogénesis tumoral.

- 5 FGFR-2 tiene gran afinidad por los factores de crecimientos de fibroblastos ácidos y/o básicos, así como los ligandos de factor de crecimiento de queratinocitos. FGFR-2 también propaga los potentes efectos oncogénicos de los FGF durante el crecimiento y la diferenciación de osteoblastos. Se observó que las mutaciones en FGFR-2, que conducen a alteraciones funcionales complejas, inducen osificación anormal de suturas craneales (craneosinostosis), que implican un papel principal de la señalización de FGFR en la formación ósea intramembranosa. Por ejemplo, en el síndrome de Apert (AP, por sus siglas en inglés), caracterizado por una osificación prematura de la sutura craneal, la mayoría de los casos se asocian con mutación puntuales que engendran ganancia de función en FGFR-2 (véase, p. ej., Lemonnier y cols., 2001).

15 Lemonnier y cols., 2001, "Role of N-cadherin and protein kinase C in osteoblast gene activation induced by the S252W fibroblast growth factor receptor 2 mutation in Apert craniosynostosis", *J. Bone Miner. Res.*, Vol. 16, pp. 832-845.

20 Varias anomalías graves en el desarrollo esquelético humano, incluyendo síndromes de Apert, Crouzon, Jackson-Weiss, piel corrugada del cuero cabelludo de Beare-Stevenson y Pfeiffer se asocian a la presencia de mutaciones en FGFR-2. La mayoría, si no todos, los casos de síndrome de Pfeiffer (PS, por sus siglas en inglés) también están provocados por la mutación *de novo* del gen de FGFR-2 (véanse, p. ej., Meyers y cols., 1996; Plomp y cols., 1998), y se observó recientemente que las mutaciones en FGFR-2 rompen una de las reglas cardinales que gobiernan la especificidad de los ligandos. A saber, dos formas de empalme mutantes de receptor de factor de crecimiento de fibroblastos, FGFR2c y FGFR2b, han adquirido la capacidad de unirse a y ser activadas por ligandos de FGF atípicos. Esta pérdida de especificidad conduce a una señalización aberrante y sugiere que los fenotipos graves de estos síndromes patológicos resultan de la activación dependiente de ligandos ectópicos de FGFR-2 (véase, p. ej., Yu y cols., 2000).

30 Mutaciones activadoras del receptor la tirosina cinasa receptora FGFR-3 tales como translocaciones cromosómicas o mutaciones puntuales producen receptores FGFR-3 constitutivamente activos desregulados que se han relacionado con el mieloma múltiple y con carcinomas de vejiga urinaria y cuello uterino (véase, p. ej., Powers y cols., 2000). Según esto, la inhibición de FGFR-3 sería útil en el tratamiento del mieloma múltiple y carcinomas de vejiga urinaria y cuello uterino.

Angiogénesis

Las enfermedades proliferativas crónicas a menudo están acompañadas por una angiogénesis profunda, que puede contribuir a o mantener un estado inflamatorio y/o proliferativo, OK conduce a la destrucción de tejidos a través de la proliferación invasiva de vasos sanguíneos. Véanse, p. ej., Folkman, 1995; Folkman, 1997; Folkman y cols., 1992.

35 Angiogénesis se usa generalmente para describir el desarrollo de vasos sanguíneos nuevos o de sustitución, o neovascularización. Es un proceso necesario y fisiológicamente normal por el que se establece la vasculatura en el embrión. En general, la angiogénesis no se produce en la mayoría de los tejidos adultos normales, siendo excepciones las zonas de ovulación, menstruación y curación de heridas. Sin embargo, muchas enfermedades se caracterizan por una angiogénesis persistente y desregulada. Por ejemplo, en la artritis, nuevos vasos sanguíneos capilares invaden la articulación y destruyen el cartílago (véase, p. ej., Colville-Nash and Scott, 1992). En la diabetes (y en muchas enfermedades oculares diferentes), nuevos vasos sanguíneos invaden la mácula o la retina u otras estructuras oculares, y pueden provocar ceguera (véase, p. ej., Alon y cols., 1995). El proceso de la aterosclerosis se ha ligado a la angiogénesis (véase, p. ej., Kahlon y cols., 1992). Se ha encontrado que el crecimiento y la metástasis de tumores son dependientes de la angiogénesis (véanse, p. ej., Folkman, 1992; Denekamp, 1993; Fidler and Ellis, 1994).

50 El reconocimiento de la implicación de la angiogénesis en enfermedades importantes se ha acompañado por la investigación para identificar y desarrollar inhibidores de la angiogénesis. Estos inhibidores se clasifican generalmente en respuesta a dianas discretas en la cascada de angiogénesis, tales como activación de células endoteliales por una señal angiogénica; síntesis y liberación de enzimas degradativas; migración de células endoteliales; proliferación de células endoteliales; y formación de túbulos capilares. Por lo tanto, la angiogénesis se produce en muchos estadios y se están haciendo intentos de descubrir y desarrollar compuestos que trabajen para bloquear la angiogénesis en estos diversos estadios.

55 Hay muchas publicaciones que muestran que los inhibidores de la angiogénesis, que trabajan mediante diversos mecanismos, son beneficiosos en enfermedades tales como cáncer y metástasis (véanse, p. ej., O'Reilly y cols., 1994; Ingber y cols., 1990), enfermedades oculares (véase, p. ej., Friedlander y cols., 1995), artritis (véase, p. ej., Peacock y cols., 1992; Peacock y cols., 1995) y hemangioma (véase, p. ej., Tarabozetti y cols., 1995).

VEGFR

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés), un polipéptido, es mitogénico para células endoteliales in vitro y estimula respuestas angiogénicas in vivo. El VEGF también se ha relacionado con una angiogénesis inapropiada (véase, p. ej., Pinedo y cols., 2000). Los VEGFR son tirosina cinasas receptoras (RTK). Las RTK catalizan la fosforilación de residuos de tirosilo específicos en proteínas implicadas en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular (véanse, p. ej., Wilks y cols., 1990; Courtneidge y cols., 1993; Cooper y cols., 1994; Paulson y cols., 1995; Chan y cols., 1996).

Se han identificados tres receptores RTK para VEGF: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1 o KDR) y VEGFR-3 (Flt-4). Estos receptores están implicados en la angiogénesis y participan en la transducción de señales (véase, p. ej., Mustonen y cols., 1995).

De particular interés es VEGFR-2 (KDR), que es una RTK receptora transmembranaria expresada principalmente en células endoteliales. La activación de VEGFR-2 por VEGF es una etapa crítica en la ruta de transducción de señales que inicia la angiogénesis tumoral. La expresión de VEGF puede ser constitutiva a las células tumorales y también puede ser regulada al alza en respuesta a ciertos estímulos. Uno de tales estímulos es la hipoxia, donde la expresión de VEGF es regulada al alza en tejidos hospedadores tanto tumorales como asociados. El ligando VEGF activa VEGFR-2 al unirse a su centro de unión a VEGF extracelular. Esto conduce a la dimerización del receptor de los VEGFR y autofosforilación de residuos de tirosina en el dominio de cinasa intracelular de VEGFR-2. El dominio de cinasa funciona para transferir un fosfato desde ATP hasta los residuos de tirosina, proporcionando así centros de unión para proteínas de señalización aguas abajo de VEGFR-2 conduciendo finalmente al inicio de la angiogénesis (véase, p. ej., McMahon y cols., 2000).

La inhibición en el centro de unión al dominio de cinasa de VEGFR-2 bloquearía la fosforilación de residuos de tirosina y serviría para interrumpir el inicio de la angiogénesis.

VEGFR-2 (y VEGFR-3) se localizan principalmente en la vasculatura tumoral (sanguínea y/o linfática) que soporta la mayoría de los cánceres sólidos, y se regula al alza significativamente. Es probable que el mecanismo de acción clínico primario de los inhibidores de la señalización de VEGF sea a través de la elección como diana de vasos tumorales en lugar de células tumorales (véase, p. ej., Smith y cols., 2010), aunque se han descrito otros mecanismos. Se ha observado que los agentes que tienen como diana el factor de crecimiento endotelial vascular growth factor (VEGF), administrados bien como agentes únicos o bien en combinación con quimioterapia, benefician a los pacientes con enfermedades malignas en estadio avanzado (véase, p. ej., Ellis y cols., 2008).

KDR representa un papel crucial en otras enfermedades, y los inhibidores de KDR pueden encontrar utilidad en estas afecciones.

Aterosclerosis: KDR se expresa intensamente tanto en células endoteliales durante la angiogénesis como en el endotelio luminal de vasos ateroscleróticos humanos, pero no en arterias o venas normales (véase, p. ej., Belgore y cols., 2004). La interacción entre VEGF y el receptor de VEGF 2 (KDR, humano; Flk-1, ratón) es clave para la angiogénesis patológica y se ha relacionado con el desarrollo de lesiones ateroscleróticas (véase, p. ej., Inoue y cols., 1998). La vacunación contra KDR dio como resultado la activación de células T, la supresión de la neoangiogénesis y una notable reducción en la aterosclerosis que era independiente de la hipercolesterolemia en ratones tanto macho como hembra (véase, p. ej., Petrovan y cols., 2007).

Obesidad: La formación de nuevos vasos en tejidos grasos durante la obesidad inducida por la dieta se debe en gran parte a la angiogénesis en lugar de a la vasculogénesis *de novo*. El tratamiento antiangiogénico mediante el bloqueo de VEGFR2 pero no VEGFR1 puede limitar la expansión del tejido adiposo (véase, p. ej., Tam y cols., 2009).

Retinopatía y Maculopatía: La activación anormal del sistema VEGF-VEGFR está íntimamente implicada en la progresión de la degeneración macular asociada a la edad (AMD, por sus siglas en inglés). Por lo tanto, un aptámero contra VEGF-A₁₆₅, un anticuerpo neutralizador de VEGF (tipo Fab) y VEGF-Trap están ahora aprobados para el tratamiento de la AMD (véase, p. ej., Masabumi y cols., 2013). El bevacizumab, un anticuerpo anti-VEGF, se usa extraoficialmente en afecciones tales como la AMD, la retinopatía diabética y el edema macular diabético (DME, por sus siglas en inglés) (véase, p. ej., Rotsos y cols., 2008).

Síndrome de dolor neuropático: VEGF y VEGFR2 están implicados en la patogénesis del dolor neuropático. El tratamiento anti-rVEGF en ratas CCI puede aliviar el dolor neuropático crónico al disminuir las expresiones de VEGFR2 y receptores de P2X2/3 en neuronas del DRG para inhibir la transmisión de la señalización del dolor neuropático (véase, p. ej., Lin y cols., 2010).

Artritis reumatoide: PTK787/ZK222584, un inhibidor de tirosina cinasa receptora con actividad específica contra los VEGFR, y que exhibe una fuerte inhibición de VEGF-R2 (KDR) y una inhibición ligeramente más débil de VEGFR1 (Flt-1), Flk-1 (el homólogo de ratón de KDR) y Flt-4 (el receptor encontrado en el sistema linfático), inhibió la hinchazón de rodilla en 40%, puntuaciones de gravedad (en 51%) y puntuaciones histológicas globales en ratones con artritis inducida por colágeno (véase, p. ej., Grosios y cols., 2004).

TIE

La angiopoyetina 1 (Ang1), un ligando para la tirosina cinasa receptora específica del endotelio TIE-2, es un factor angiogénico (véanse, p. ej., Davis y cols., 1996; Partanen y cols., 1992; Davis y cols., 1994; Davis y cols., 1996; Alitalo y cols., 1996; Godowski y cols., 1997). El acrónimo TIE representa "dominios de homología de Ig y EGF que contienen tirosina cinasa". TIE se usa para identificar una clase de tirosina cinasas receptoras, que se expresan exclusivamente en células endoteliales vasculares y células hematopoyéticas tempranas. Típicamente, las tirosina cinasas receptoras TIE se caracterizan por la presencia de un dominio similar a EGF y un dominio similar a inmunoglobulina (IG), que consiste en unidades de plegamiento extracelulares, estabilizados por enlaces disulfuro intracatenarios (véase, p. ej., Partanen y cols., 1999). A diferencia de VEGF, que funciona durante los estadios iniciales del desarrollo vascular, Ang1 y su receptor TIE-2 funcionan en los estadios tardíos del desarrollo vascular, es decir, durante la remodelación vascular (remodelación se refiere a la formación de una luz vascular) y la maduración (véanse, p. ej., Yancopoulos y cols., 1998; Peters y cols., 1998; Suri y cols., 1996).

Por consiguiente, se esperaría que la inhibición de TIE-2 sirviera para interrumpir la remodelación y la maduración de nueva vasculatura iniciada por angiogénesis interrumpiendo de ese modo el proceso angiogénico.

p38

p38 es un miembro de la familia MAPK de 38 kDa que se activa en respuesta al estrés y representa un papel importante en la respuesta inmunitaria y la supervivencia y la diferenciación celular. Se han descrito cuatro p38 MAPK cinasas; estas proteínas comparten un alto grado de homología (p38 α , β , γ y δ). Las p38 MAPK se pueden activar mediante diferentes estímulos tales como factores de crecimiento, citocinas inflamatorias o una variedad de estreses ambientales. Las p38 MAPK pueden activar a su vez un número de dianas aguas abajo, incluyendo proteína cinasas, sustratos citosólicos, factores de transcripción y factores de remodelación de cromatina. La fuerte activación de las p38 MAPKs por citocinas y estreses celulares promueve generalmente la inhibición del crecimiento celular e induce la apoptosis (véase, p. ej., la revisión en Cuadrado y cols., 2010). Más recientemente, se ha encontrado que p38 α representa papeles importantes en el mantenimiento de la homeostasis y patologías relacionadas. El papel más conocido y más ampliamente presentado de p38 α en la enfermedad está relacionado con su función en la señalización de citocinas y la promoción de la inflamación patológica. Varios estudios han mostrado cómo p38 α puede mediar en una serie de modelos de enfermedad, incluyendo artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad de Alzheimer, enteropatía inflamatoria, enfermedad de Crohn, tumorigénesis, enfermedad cardiovascular y apoplejía. Por otra parte, hay una evidencia de un papel de la p38 MAPK en el desarrollo y el mantenimiento de un número de enfermedades pulmonares, tales como asma, fibrosis quística, fibrosis pulmonar idiopática y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Así, p38 α es una diana farmacéutica interesante especialmente debido a su importante papel en enfermedades inflamatorias (véase, p. ej., la revisión en Oeztuerk-Winder y cols., 2012). Fármacos de piridinilimidazol tales como SB203580 fueron los primeros inhibidores de p38 MAPK en ser identificados que se unen competitivamente en el bolsillo de unión a ATP, y se han usado ampliamente para estudiar las funciones de p38 MAPK (véase, p. ej., Coulthard y cols., 2009).

SRC

c-SRC pertenece a las cinasas de la familia SRC no receptoras (SFK). Estas proteínas están implicadas en muchos episodios celulares tales como proliferación, supervivencia y movilidad celular. Así, la hiperactivación de la señalización de SRC contribuye a diversos aspectos del desarrollo de tumores. La función más destacada de c-SRC es su interacción intensiva con tirosina cinasas receptoras (RTK) transmembranarias en la membrana celular a través de sus dominios SH2 y SH3. c-SRC interactúa con muchas RTK incluyendo el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés), el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2, por sus siglas en inglés), el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR, por sus siglas en inglés), el receptor del factor de crecimiento insulinoide 1 (IGF-1R, por sus siglas en inglés) y el receptor de c-Met/factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR, por sus siglas en inglés). A través de estas interacciones, c-SRC integra y regula la señalización de RTK y transduce directamente señales de supervivencia a efectores aguas abajo tales como fosfoinosítido 3-cinasas (PI3Ks), Akt, y transductor de señales y activador de la transcripción 3 (STAT3, por sus siglas en inglés) (véase, p. ej., Zhang y cols., 2012). Otros receptores membranaarios tales como integrinas también pueden activar c-SRC desencadenando así una cascada de señales que regula la migración, la adherencia y la invasión celular. La activación de c-Src a través de la interacción con catenina p120 promueve la disociación de uniones adherentes célula-célula mejorando así la movilidad celular. c-SRC fosforila directamente la cinasa de adherencia focal (FAK, por sus siglas en inglés) estabilizando complejos de adherencia focales, que consisten en FAK, paxilina, RhoA y otros componentes, y mejora la adherencia celular a la matriz extracelular. Por otra parte, c-SRC representa un importante papel en la regulación del microambiente tumoral. La activación de c-SRC en la hipoxia promueve la angiogénesis a través de la estimulación de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), metaloproteínasa de matriz (MMP, por sus siglas en inglés) e interleucina-8 (IL-8) (véase, p. ej., Yeatman y cols., 2004).

La elección como diana de SFK es un enfoque terapéutico bien establecido para muchos tipos de cáncer. El dasatinib es un inhibidor de molécula pequeña de múltiples cinasas que inhibe potentemente cinasas de la familia SRC (SRC, LCK, YES, FYN), pero también BCR-ABL, c-KIT, PDGFR- α y β , y cinasa receptora de efrina (véase, p. ej., Lindauer y cols., 2010). Estudios más recientes han presentado que Src también está implicada en la ruta de señalización relacionada con la inflamación. Muchos estudios han mostrado que c-SRC representa un papel crítico

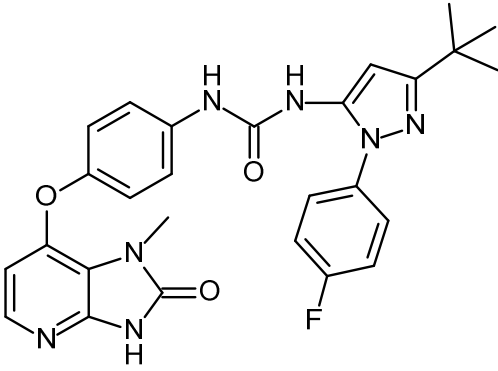
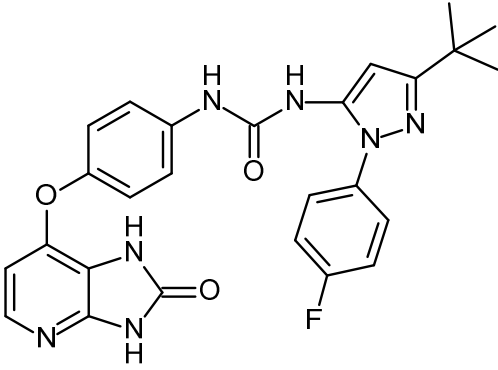
en respuestas inflamatorias mediadas por macrófagos. De forma importante, una variedad de enfermedades inflamatorias está estrechamente relacionada con la activación de macrófagos; por lo tanto, la inhibición de c-SRC puede representar una estrategia útil para enfermedades mediadas por macrófagos (véase, p. ej., Byeon y cols., 2012)

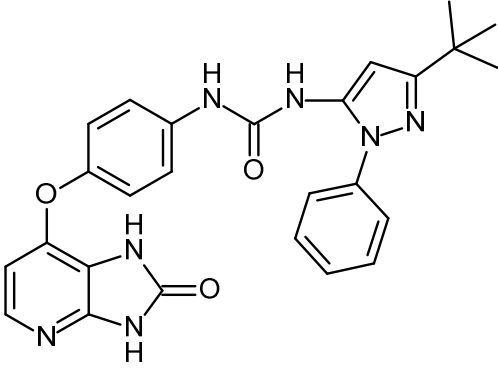
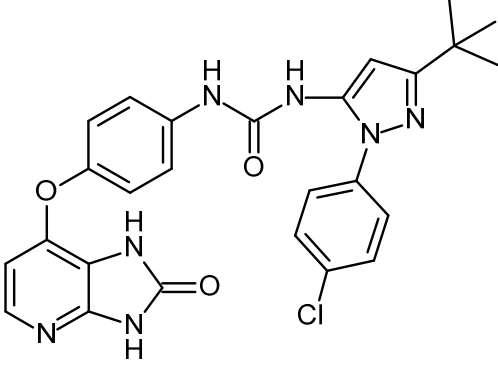
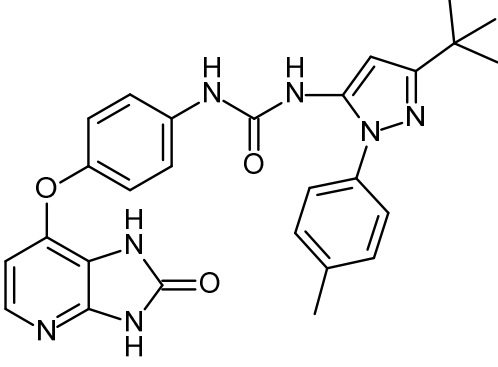
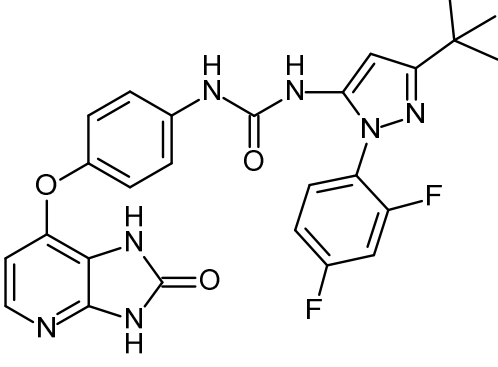
5 Lck

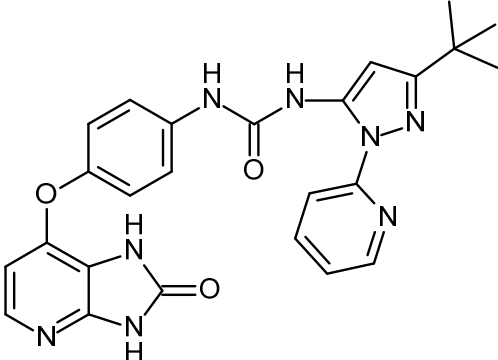
La Lck (cinasa específica de linfocitos, por sus siglas en inglés) es una cinasa de las SFK que es crítica para la activación de células T, y su actividad está inducida por el receptor de células T (TCR, por sus siglas en inglés). Las señales de TCR iniciadas por Lck conducen a episodios de regulación génica que dan como resultado liberación de citocinas, proliferación y supervivencia de células T específicas para antígenos, amplificando de ese modo respuestas inmunitarias específicas. Se espera que la inhibición de Lck ofrezca un nuevo enfoque terapéutico para el tratamiento de trastornos autoinmunitarios e inflamatorios mediados por células T y/o rechazo de trasplantes de órganos (véase, p. ej., Martin y cols., 2010).

Compuestos conocidos

15 Niculescu-Duvaz y cols., 2006, describe ciertos compuestos de imidazo[4,5-b]piridin-2-ona y oxazolo[4,5-b]piridin-2-ona que, entre otras cosas, inhiben la actividad de RAF (p. ej., BRAF), y que son útiles en el tratamiento de trastornos proliferativos tales como cáncer. Un número de compuestos mostrados allí tienen un grupo 5-(terc-butil)-2-(fenil)-pirazol-3-ilo o un grupo 5-(terc-butil)-2-(piridil)-pirazol-3-ilo. Sin embargo, en todos los casos, el grupo fenilo y piridilo no está sustituido, está sustituido en *para* o está disustituido en *orto,para*; en ninguno de los compuestos, está sustituido en *meta*. Se muestran los siguientes compuestos:

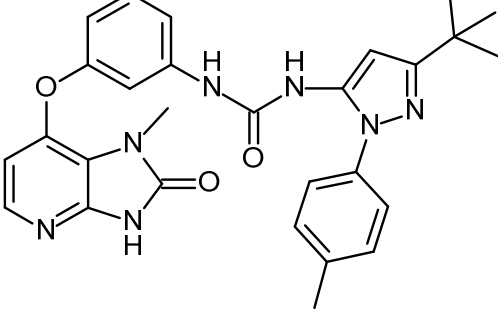
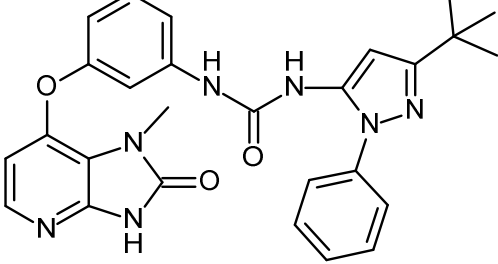
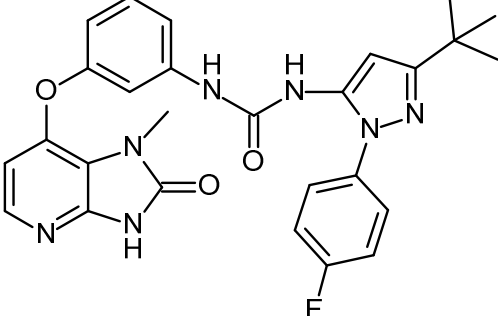
Estructura	Cita
	CJS 3247
	CJS 3600

Estructura	Cita
 <p>The structure of CJS 3608 consists of a pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-2(1H)-one core. At the 6-position of the pyrimidine ring, there is a 4-(4-tert-butyl-1H-imidazol-2-ylamino)phenoxy group. The imidazole ring is substituted with a tert-butyl group at the 5-position and a phenyl ring at the 2-position.</p>	CJS 3608
 <p>The structure of CJS 3609 is similar to CJS 3608, but the phenyl ring attached to the imidazole ring is substituted with a chlorine atom at the para position.</p>	CJS 3609
 <p>The structure of CJS 3614 is similar to CJS 3608, but the phenyl ring attached to the imidazole ring is substituted with a methyl group at the para position.</p>	CJS 3614
 <p>The structure of CJS 3615 is similar to CJS 3608, but the phenyl ring attached to the imidazole ring is substituted with two fluorine atoms at the meta and para positions.</p>	CJS 3615

Estructura	Cita
	CJS 3617

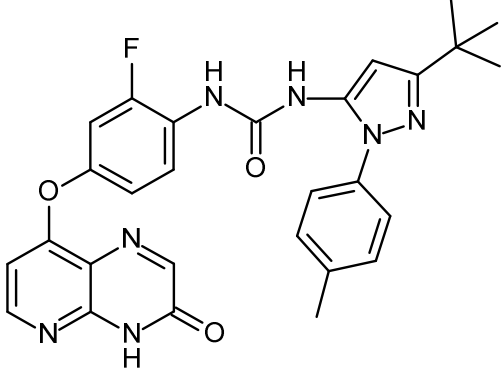
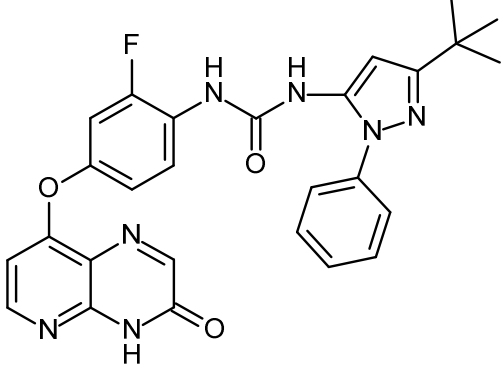
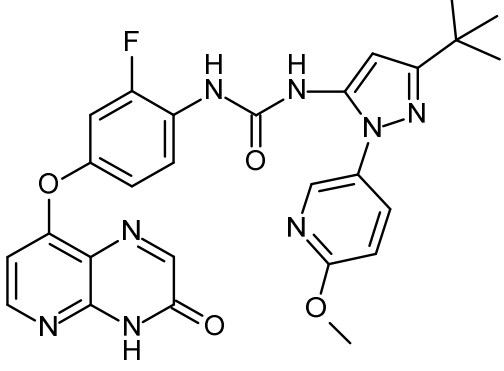
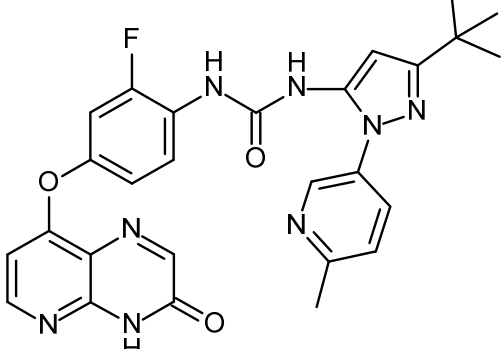
Niculescu-Duvaz y cols., 2007, describe ciertos compuestos de imidazo[4,5-b]piridin-2-ona y oxazolo[4,5-b]piridin-2-ona que, entre otras cosas, inhiben la actividad de RAF (p. ej., BRAF), y que son útiles en el tratamiento de trastornos proliferativos tales como cáncer. Un número de compuestos mostrados allí tienen un grupo 5-(terc-butil)-2-(fenil)-pirazol-3-ilo. Sin embargo, en todos los casos, el grupo fenilo no está sustituido o está sustituido en *para*; en ninguno de los compuestos, está sustituido en *meta*. Se muestran los siguientes compuestos:

5

Estructura	Cita
	CJS 3683
	CJS 3741
	CJS 3742

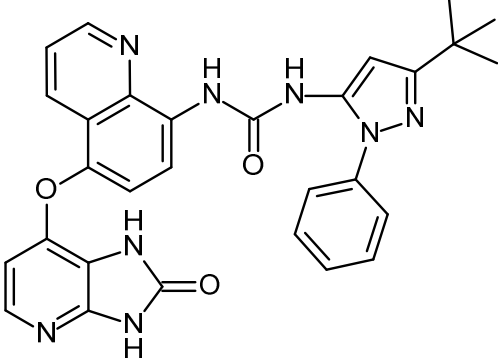
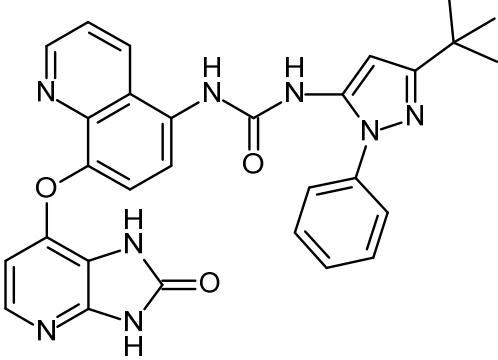
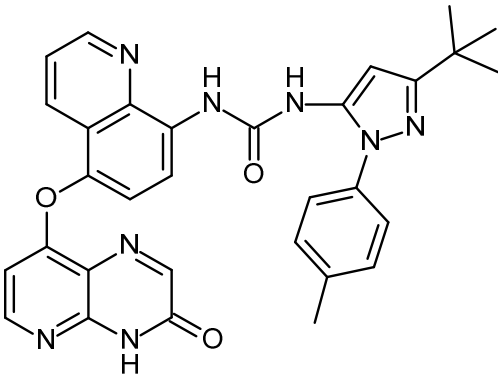
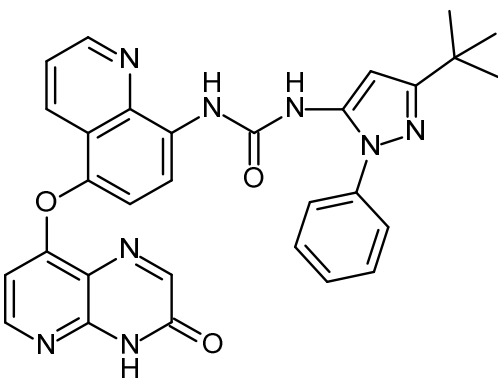
Springer y cols., 2009, describe ciertos compuestos de sustituidos en 8 con pirido[2,3-b]piracina que, entre otras cosas, inhiben la actividad de RAF (p. ej., BRAF), y que son útiles en el tratamiento de trastornos proliferativos tales como cáncer. Un número de compuestos mostrados allí tienen un grupo 5-(terc-butil)-2-(fenil)-pirazol-3-ilo o un grupo 5-(terc-butil)-2-(piridil)-pirazol-3-ilo. Sin embargo, en todos los casos, el grupo fenilo y el grupo piridilo no está

sustituido o está sustituido en *para*; en ninguno de los compuestos, está sustituido en *meta*. Se muestran los siguientes compuestos:

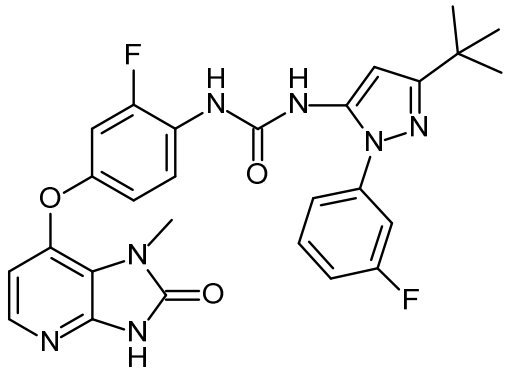
Estructura	Cita
	Compuesto AA-018
	Compuesto AA-019
	Compuesto AA-062
	Compuesto AA-084

Niculescu-Duvaz y cols., 2009, describe ciertos compuestos de arilquinolinilo que, entre otras cosas, inhiben la actividad de RAF (p. ej., BRAF), y que son útiles en el tratamiento de trastornos proliferativos tales como cáncer. Un número de compuestos mostrados allí tienen un grupo 5-(terc-butil)-2-(fenil)-pirazol-3-ilo. Sin embargo, en todos los

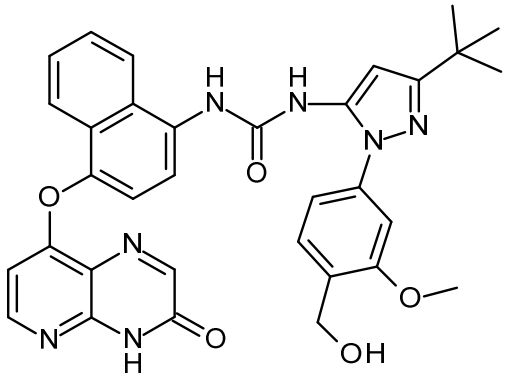
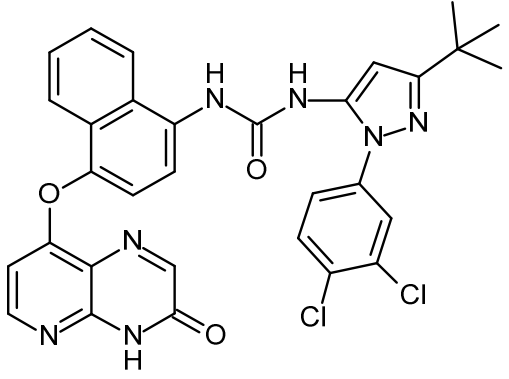
casos, el grupo fenilo no está sustituido o está sustituido en *para*; en ninguno de los compuestos está sustituido en *meta*. Se muestran los siguientes compuestos:

Estructura	Cita
	AA-005
	AA-006
	BB-007
	BB-008

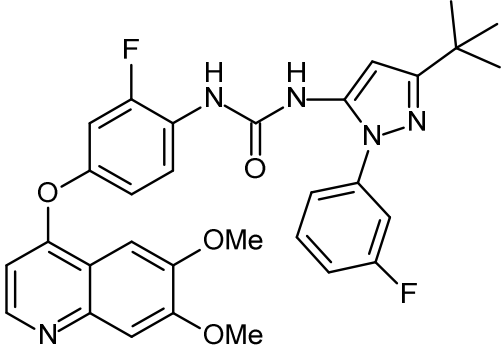
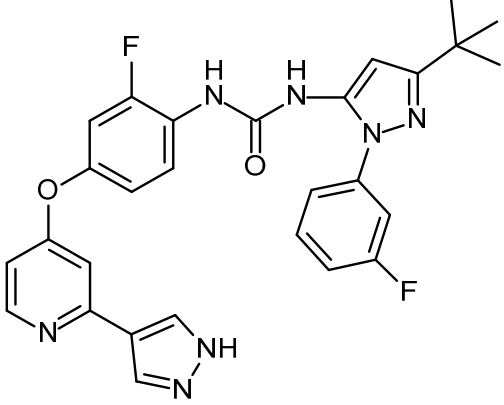
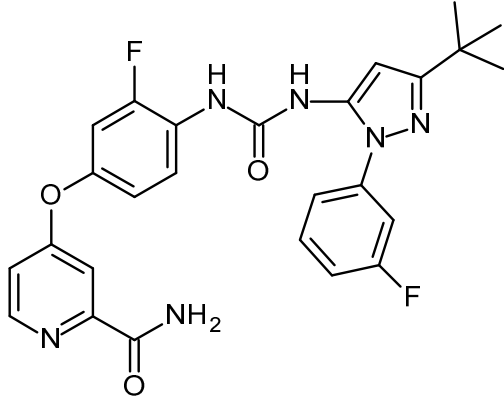
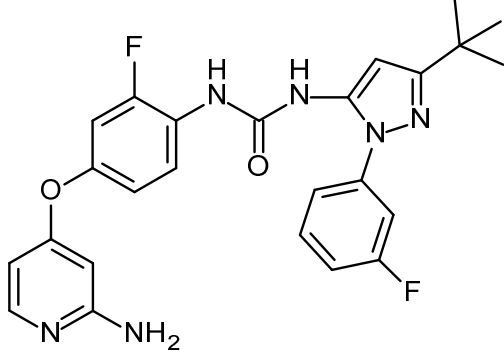
Springer y cols., 2011, describe ciertos compuestos de 1-(5-terc-butil-2-fenil-2H-pirazol-3-il)-3-[2-fluoro-4-(1-metil-2-oxo-2,3-dihidro-1H-imidazo[4,5-b]piridin-7-iloxi)-fenil]urea que, entre otras cosas, inhiben la actividad de RAF (p. ej., BRAF), y que son útiles en el tratamiento de trastornos proliferativos tales como cáncer. Se muestra el siguiente compuesto:

Estructura	Cita
	<p>Compuesto AA-04</p>

- 5 Murray y cols., 2011, describe ciertos compuestos de para el uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria o un trastorno respiratorio. Unos pocos de los compuestos mostrados allí tienen un grupo 5-(terc-butil)-2-(fenil)-pirazol-3-ilo o un grupo 5-(terc-butil)-2-(piridil)-pirazol-3-ilo. Sin embargo, en todos los casos, el grupo fenilo y piridilo no está sustituido, está sustituido en *para* o está sustituido en *meta*, *para*; en ninguno de los compuestos, está sustituido en *meta*, no sustituido en *para*. Se muestran los siguientes compuestos:

Estructura	Cita
	<p>Ejemplo 18 (página 58)</p>
	<p>Ejemplos 32 (página 63)</p>

- 10 Se conoce un número de compuestos que tienen un grupo 5-(terc-butil)-2-(3-fluoro-fenil)-pirazol-3-ilo, incluyendo los siguientes:

Estructura	Cita
	<p>Furuta y cols., 2012</p>
	<p>Flynn y cols., 2008</p>
	<p>Smith y cols., 2007</p>
	<p>Cantin y cols., 2007</p>

Un aspecto de la invención trata de ciertos compuestos de 1-(5-terc-butil-2-aril-pirazol-3-il)-3-[2-fluoro-4-[(3-oxo-4H-pirido[2,3-b]piracin-8-il)oxi]fenil]urea (denominados en la presente "compuestos de TBAP"), según se describe en la presente.

5 Otro aspecto de la invención trata de una composición (p. ej., una composición farmacéutica) que comprende un compuesto de TBAP, según se describe en la presente, y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

También se describe en la presente un método para preparar una composición (p. ej., una composición farmacéutica) que comprende la etapa de mezclar un compuesto de TBAP, según se describe en la presente, y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

10 También se describe en la presente un método para inhibir la función de RAF (p. ej., BRAF, CRAF, etc.) (p. ej., en una célula), in vitro o in vivo, que comprende poner el contacto la célula con una cantidad eficaz de un compuesto de TBAP, según se describe en la presente.

Otro aspecto de la presente invención trata de un compuesto de TBAP según se describe en la presente para el uso en un método de tratamiento del cuerpo de un ser humano o un animal mediante terapia, por ejemplo, para el uso en un método de tratamiento de un trastorno (p. ej., una enfermedad) según se describe en la presente.

15 También se describe en la presente el uso de un compuesto de TBAP, según se describe en la presente, en la fabricación de un medicamento, por ejemplo, para el uso en un método de tratamiento, por ejemplo, para el uso en un método de tratamiento de un trastorno (p. ej., una enfermedad) según se describe en la presente.

20 También se describe en la presente un método de tratamiento, por ejemplo, un método de tratamiento de un trastorno (p. ej., una enfermedad) según se describe en la presente, que comprende administrar a un sujeto que necesite tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de TBAP, según se describe en la presente, preferiblemente en la forma de una composición farmacéutica.

25 También se describe en la presente un estuche que comprende (a) un compuesto de TBAP, según se describe en la presente, preferiblemente proporcionado como una composición farmacéutica y en un recipiente adecuado y/o con un envase adecuado; y (b) instrucciones de uso, por ejemplo, instrucciones escritas sobre cómo administrar el compuesto.

También se describe en la presente un compuesto de TBAP obtenible mediante un método de síntesis según se describe en la presente, o un método que comprende un método de síntesis según se describe en la presente.

También se describe en la presente un compuesto de TBAP obtenido mediante un método de síntesis según se describe en la presente, o un método que comprende un método de síntesis según se describe en la presente.

30 También se describen en la presente nuevos productos intermedios, según se describe en la presente, que son adecuados para el uso en los métodos de síntesis descritos en la presente.

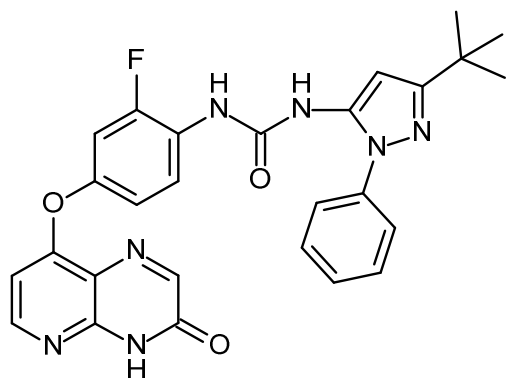
También se describe en la presente el uso de tales nuevos productos intermedios, según se describe en la presente, en los métodos de síntesis descritos en la presente.

35 Como será apreciado por un experto en la técnica, características y realizaciones preferidas de un aspecto de la invención también tratarán de otros aspectos de la invención.

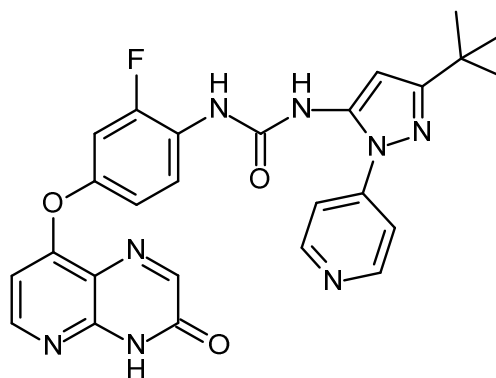
DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Compuestos

40 Un aspecto de la presente invención se refiere a ciertos compuestos de 1-(5-terc-butil-2-aril-pirazol-3-il)-3-[2-fluoro-4-[(3-oxo-4H-pirido[2,3-b]piracin-8-il)oxi]fenil]urea que están estructuralmente relacionados con los siguientes compuestos:



1-(5-terc-butil-2-**fenil**-pirazol-3-il)-
3-[2-fluoro-4-[(3-oxo-4H-pirido[2,3-
b]piracin-8-il)oxi]fenil]urea

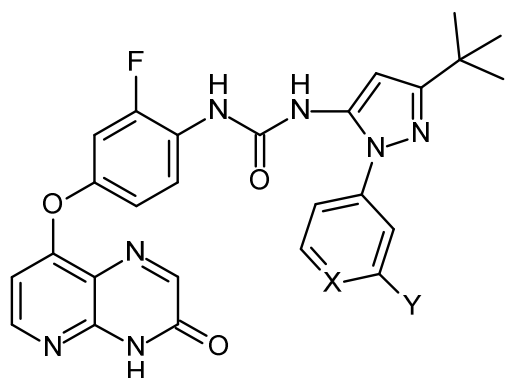


1-(5-terc-butil-2-(**4-piridil**)pirazol-3-il)-
3-[2-fluoro-4-[(3-oxo-4H-pirido[2,3-
b]piracin-8-il)oxi]fenil]urea

Más particularmente, la presente invención se refiere a ciertos compuestos relacionados que tienen adicionalmente un solo sustituyente en *meta* (indicado en la presente como -Y).

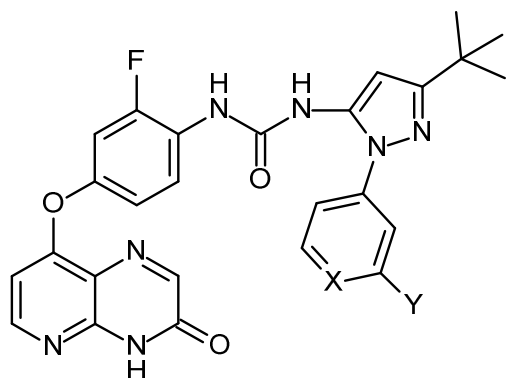
Así, un aspecto de la presente invención trata de compuestos seleccionados de compuestos de la siguiente fórmula, y sales farmacéuticamente aceptables, N-óxidos, hidratos y solvatos de los mismos, en donde =X- e -Y son como se definen en la presente (por comodidad, denominados colectivamente "compuestos de TBAP"):

5



Algunas realizaciones de la invención incluyen las siguientes:

(1) Un compuesto seleccionado de compuestos de la siguiente fórmula, y sales farmacéuticamente aceptables, N-óxidos, hidratos y solvatos de los mismos:



10

en donde:

=X- es independientemente =CH- o =N-;

-Y es independientemente -Y¹, -Y², -Y³, -Y⁴, -Y⁵ o -Y⁶;

-Y¹ es independientemente -F, -Cl, -Br o -I;

-Y² es alquilo C₁₋₄ saturado lineal o ramificado;

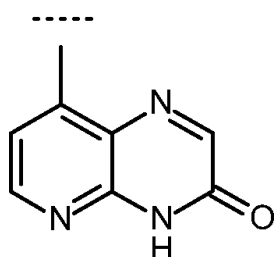
-Y³ es haloalquilo C₁₋₄ saturado lineal o ramificado;

5 -Y⁴ es -OH;

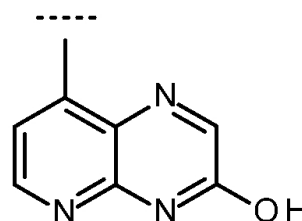
-Y⁵ es alcoxi C₁₋₄ saturado lineal o ramificado; y

-Y⁶ es haloalcoxi C₁₋₄ saturado lineal o ramificado.

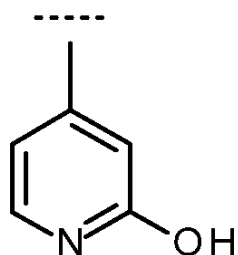
10 Nótese que es posible la tautomerización en el grupo 3-oxo-3,4-dihidropirido[3,2-*b*]piracin-8-ilo, como se muestra posteriormente. A menos que se indique otra cosa, una referencia a un tautómero pretende ser una referencia a ambos tautómeros.



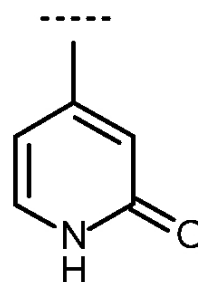
es un tautómero de



Nótese que cuando -X= es -N= e -Y es -Y⁴ (es decir, -OH), es posible la tautomerización en el grupo 2-hidroxi-pirid-4-ilo resultante, como se muestra posteriormente. A menos que se indique otra cosa, una referencia a un tautómero pretende ser una referencia a ambos tautómeros.

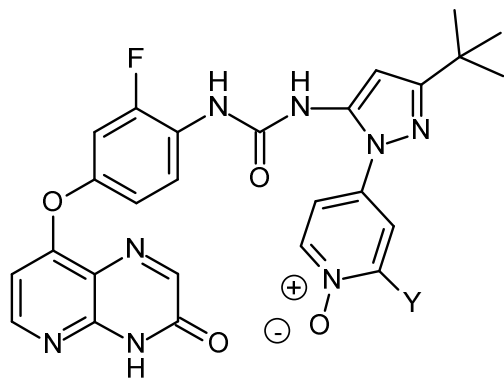


es un tautómero de



15

Nótese que cuando =X- es =N-, el grupo resultante es un grupo piridil-4-ilo grupo, y se puede formar un N-óxido, según se muestra posteriormente.



20

Para evitar dudas, el término “haloalquilo C₁₋₄ saturado lineal o ramificado” se refiere a un grupo alquilo C₁₋₄ saturado lineal o ramificado que tiene 1 o más (p. ej., 1, 2, 3, etc.) sustituyentes halógeno (p. ej., -F, -Cl, -Br, -I). Un ejemplo de tal grupo es -CF₃.

Para evitar dudas, el término “alcoxi C₁₋₄ saturado lineal o ramificado” se refiere a un grupo -OR, donde R es un grupo alquilo C₁₋₄ saturado lineal o ramificado. Un ejemplo de tal grupo es -OMe.

De forma similar, el término “haloalcoxi C₁₋₄ saturado lineal o ramificado” se refiere a un grupo -OR, donde R es un grupo haloalquilo C₁₋₄ saturado lineal o ramificado. Un ejemplo de tal grupo es -OCF₃.

Para evitar dudas: metilo se abrevia como -Me; etilo se abrevia como -Et; *n*-propilo se abrevia como -nPr; *isopropilo* se abrevia como -iPr; *n*-butilo se abrevia como -nBu; *iso*-butilo se abrevia como -iBu; *sec*-butilo se abrevia como -sBu; *terc*-butilo se abrevia como -tBu; y fenilo se abrevia como -Ph.

5

El Grupo =X-

(2) Un compuesto según (1), en el que =X- es =CH-.

(3) Un compuesto según (1), en el que =X- es =N-.

El Grupo -Y

10 (4) Un compuesto según uno cualquiera de (1) a (3), en el que -Y es -Y¹.

(5) Un compuesto según uno cualquiera de (1) a (3), en el que -Y es -Y².

(6) Un compuesto según uno cualquiera de (1) a (3), en el que -Y es -Y³.

(7) Un compuesto según uno cualquiera de (1) a (3), en el que -Y es -Y⁴.

(8) Un compuesto según uno cualquiera de (1) a (3), en el que -Y es -Y⁵.

15 (9) Un compuesto según uno cualquiera de (1) a (3), en el que -Y es -Y⁶.

El Grupo -Y¹

(10) Un compuesto según uno cualquiera de (1) a (9), en el que -Y¹, si está presente, es independientemente -F, -Cl, -Br.

20 (11) Un compuesto según uno cualquiera de (1) a (9), en el que -Y¹, si está presente, es independientemente -F o -Cl.

(12) Un compuesto según uno cualquiera de (1) a (9), en el que -Y¹, si está presente, es -F.

(13) Un compuesto según uno cualquiera de (1) a (9), en el que -Y¹, si está presente, es -Cl.

(14) Un compuesto según uno cualquiera de (1) a (9), en el que -Y¹, si está presente, es -Br.

(15) Un compuesto según uno cualquiera de (1) a (9), en el que -Y¹, si está presente, es -I.

25 El Grupo -Y²

(16) Un compuesto según uno cualquiera de (1) a (15), en el que -Y², si está presente, es independientemente -Me, -Et, -nPr, -iPr, -nBu, -iBu, -sBu o -tBu.

(17) Un compuesto según uno cualquiera de (1) a (15), en el que -Y², si está presente, es independientemente -Me, -Et, -nPr o -iPr.

30 (18) Un compuesto según uno cualquiera de (1) a (15), en el que -Y², si está presente, es independientemente -Me o -Et.

(19) Un compuesto según uno cualquiera de (1) a (15), en el que -Y², si está presente, es -Me.

El Grupo -Y³

35 (20) Un compuesto según uno cualquiera de (1) a (19), en el que -Y³, si está presente, es fluoroalquilo C₁₋₄ saturado lineal o ramificado.

(21) Un compuesto según uno cualquiera de (1) a (19), en el que -Y³, si está presente, es independientemente -CH₂F, -CHF₂, -CF₃, -CH₂CH₂F, -CH₂CHF₂ o -CH₂CF₃.

(22) Un compuesto según uno cualquiera de (1) a (19), en el que -Y³, si está presente, es independientemente -CH₂F, -CHF₂ o -CF₃.

40 (23) Un compuesto según uno cualquiera de (1) a (19), en el que -Y³, si está presente, es -CF₃.

El Grupo -Y⁵

(24) Un compuesto según uno cualquiera de (1) a (23), en el que -Y⁵, si está presente, es independientemente -O-Me, -O-Et, -O-nPr, -O-iPr, -O-nBu, -O-iBu, -O-sBu o -O-tBu.

5 (25) Un compuesto según uno cualquiera de (1) a (23), en el que -Y⁵, si está presente, es independientemente -O-Me, -O-Et, -O-nPr o -O-iPr.

(26) Un compuesto según uno cualquiera de (1) a (23), en el que -Y⁵, si está presente, es independientemente -O-Me o -O-Et.

(27) Un compuesto según uno cualquiera de (1) a (23), en el que -Y⁵, si está presente, es -O-Me.

El Grupo -Y⁶

10 (28) Un compuesto según uno cualquiera de (1) a (27), en el que -Y⁶, si está presente, es fluoroalquilo C₁₋₄ saturado lineal o ramificado.

(29) Un compuesto según uno cualquiera de (1) a (27), en el que -Y⁶, si está presente, es independientemente -O-CH₂F, -O-CHF₂, -O-CF₃, -O-CH₂CH₂F, -O-CH₂CHF₂ o -O-CH₂CF₃.

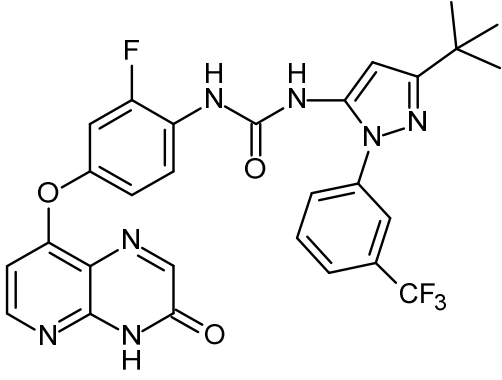
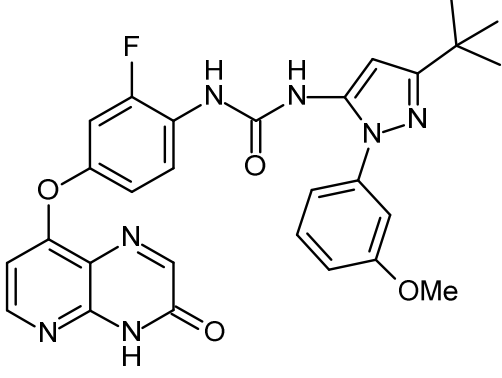
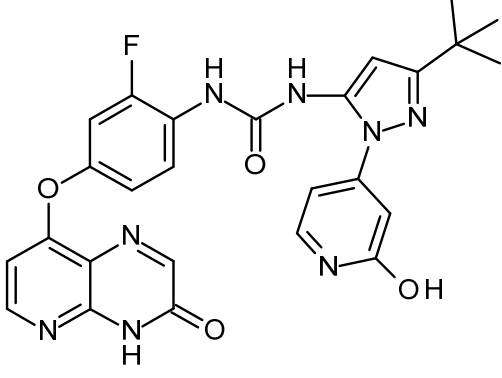
15 (30) Un compuesto según uno cualquiera de (1) a (27), en el que -Y⁶, si está presente, es independientemente -O-CH₂F, -O-CHF₂ o -O-CF₃.

(31) Un compuesto según uno cualquiera de (1) a (27), en el que -Y⁶, si está presente, es -O-CF₃.

Algunos Compuestos Preferidos

(32) Un compuesto según (1), seleccionado de compuestos de las siguientes fórmulas y sales farmacéuticamente aceptables, N-óxidos, hidratos y solvatos de los mismos:

Código	Estructura
TBAP-01	
TBAP-02	

TBAP-03	
TBAP-04	
TBAP-05	

Combinaciones

Se aprecia que ciertas características de la invención, que, por claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también se pueden proporcionar en combinación en una sola realización. A la inversa, diversas características de la invención, que, por brevedad, se describen en el contexto de una sola realización, también se pueden proporcionar separadamente o en cualquier subcombinación adecuada. Todas las combinaciones de las realizaciones que tratan de los grupos químicos representados por las variables (p. ej., =X-, -Y, -Y¹, -Y², -Y³, -Y⁴, -Y⁵, -Y⁶, etc.) son abarcadas específicamente por la presente invención y se divulgan en la presente justamente como si todas y cada una de las combinaciones se divulgaran individualmente y explícitamente, hasta el punto de que tales combinaciones abarcan compuestos que son compuestos estables (es decir, compuestos que se pueden aislar, caracterizar y probar con respecto a la actividad biológica). Además, todas las subcombinaciones de los grupos químicos listados en las realizaciones que describen tales variables también son abarcadas específicamente por la presente invención y se divulgan en la presente justamente como si todas y cada una de las subcombinaciones de grupos químicos se divulgaran individualmente y explícitamente en la presente.

Formas Sustancialmente Purificadas

Un aspecto de la presente invención trata de compuestos de TBAP, según se describe en la presente, en forma sustancialmente purificada y/o en una forma sustancialmente libre de contaminantes.

5 En una realización, el compuesto está en forma sustancialmente purificada y/en una forma sustancialmente libre de contaminantes.

En una realización, el compuesto está en una forma sustancialmente purificada con una pureza de al menos 50% en peso, p. ej., al menos 60% en peso, p. ej., al menos 70% en peso, p. ej., al menos 80% en peso, p. ej., al menos 90% en peso, p. ej., al menos 95% en peso, p. ej., al menos 97% en peso, p. ej., al menos 98% en peso, p. ej., al menos 99% en peso.

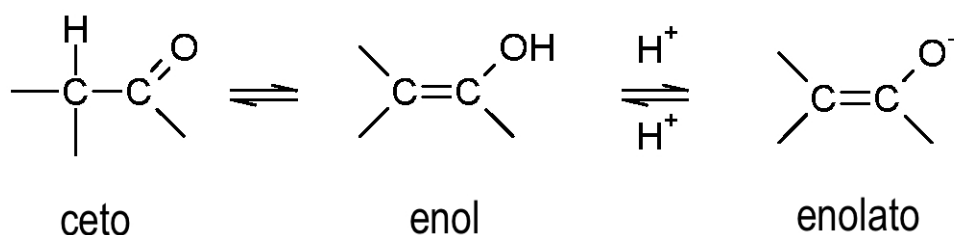
10 En una realización, el compuesto está en una forma sustancialmente libre de contaminantes en la que los contaminantes representan no más de 50% en peso, p. ej., no más de 40% en peso, p. ej., no más de 30% en peso, p. ej., no más de 20% en peso, p. ej., no más de 10% en peso, p. ej., no más de 5% en peso, p. ej., no más de 3% en peso, p. ej., no más de 2% en peso, p. ej., no más de 1% en peso. A menos que se especifique, los contaminantes se refieren a otros compuestos.

15 Isómeros

Ciertos compuestos pueden existir en una o más formas geométricas, ópticas, enantiómeras, diastereoisómeras, epímeras, atrópicas, estereoisómeras, tautómeras, conformacionales o anómeras particulares, incluyendo, pero no limitadas a, formas cis y trans; formas E y Z; formas c, t y r; formas endo y exo; formas R, S y meso; formas D y L; formas d y l; formas (+) y (-); formas ceto, enol y enolato; formas sin y anti; formas sinclinales y anticlinales; formas α y β ; formas axiales y ecuatoriales; formas de bote, silla, trenza, sobre y media silla; y combinaciones de las mismas, posteriormente denominadas en la presente "isómeros" (o "formas isómeras").

20 Nótese que, excepto cuando se analiza posteriormente para las formas tautómeras, se excluyen específicamente del término "isómeros", según se usa en la presente, los isómeros estructurales (o generales) (es decir, isómeros que difieren en las conexiones entre átomos en vez de meramente por la posición de los átomos en el espacio). Por ejemplo, una referencia a un grupo metoxi, $-\text{OCH}_3$, no se debe considerar como una referencia a su isómero estructural, un grupo hidroximetilo, $-\text{CH}_2\text{OH}$. De forma similar, una referencia a orto-clorofenilo no se debe considerar como una referencia a su isómero estructural, meta-clorofenilo. Sin embargo, una referencia a una clase de estructuras puede incluir perfectamente formas estructuralmente isómeras que estén dentro de esa clase (p. ej., alquilo C_{1-7} incluye n-propilo e isopropilo; butilo incluye n-, iso-, sec- y terc-butilo; metoxifenilo incluye orto-, meta- y para-metoxifenilo).

25 La exclusión anterior no trata de formas tautómeras, por ejemplo, formas ceto, enol y enolato, como, por ejemplo, en los siguientes pares tautómeros: ceto/enol (ilustrado posteriormente), imina/enamina, amida/iminoalcohol, amidina/amidina, nitroso/oxima, tiocetona/enotiol, N-nitroso/hidroxiatio y nitro/acinitro.



35 Nótese que en el término "isómero" se incluyen específicamente compuestos con una o más sustituciones isotópicas. Por ejemplo, H puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ^1H , ^2H (D) y ^3H (T); C puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ^{12}C , ^{13}C y ^{14}C ; O puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ^{16}O y ^{18}O ; y similares.

40 A menos que se especifique otra cosa, una referencia a un compuesto particular incluye todas estas formas isómeras, incluyendo mezclas de las mismas. Métodos para la preparación y separación de tales formas isómeras bien son conocidos en la técnica o bien se pueden obtener fácilmente adaptando los métodos mostrados en la presente o métodos conocidos, de un modo conocido.

Salas

45 Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y/o manejar una sal correspondiente del compuesto, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables se analizan en Berge y cols., 1977, "Pharmaceutically Acceptable Salts", J. Pharm. Sci., Vol. 66, pp. 1-19.

5 Por ejemplo, si el compuesto es aniónico o tiene un grupo funcional que puede ser aniónico (p. ej., -COOH puede ser -COO^-), entonces se puede formar una sal con un catión adecuado. Ejemplos de cationes inorgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, iones de metales alcalinos tales como Na^+ y K^+ , cationes alcalinotérreos tales como Ca^{2+} y Mg^{2+} , y otros cationes tales como Al^{3+} . Ejemplos de cationes orgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, ion amonio (es decir, NH_4^+) e iones amonio sustituidos (p. ej., NH_3R^+ , NH_2R_2^+ , NHR_3^+ , NR_4^+). Ejemplos algunos iones amonio sustituido adecuados son los derivados de: etilamina, dietilamina, dicitclohexilamina, trietilamina, butilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperacina, bencilamina, fenilbencilamina, colina, meglumina y trometamina, así como aminoácidos, tales como lisina y arginina. Un ejemplo de un ion amonio cuaternario común es $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$.

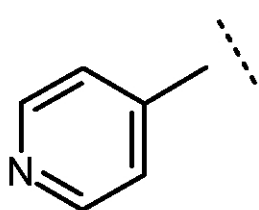
10 Si el compuesto es catiónico o tiene un grupo funcional que puede ser catiónico (p. ej., -NH_2 puede ser -NH_3^+), entonces se puede formar una sal con un anión adecuado. Ejemplos de aniones inorgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, los derivados de los siguientes ácidos inorgánicos: clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico, sulfuroso, nítrico, nitroso, fosfórico y fosforoso.

15 Ejemplos de aniones orgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, los derivados de los siguientes ácidos orgánicos: 2-acetoxibenzoico, acético, ascórbico, aspártico, benzoico, canforsulfónico, cinámico, cítrico, edético, etanodisulfónico, etanosulfónico, fórmico, fumárico, glucoheptónico, glucónico, glutámico, glicólico, hidroximaleico, hidroxinaftalenocarboxílico, isetiónico, láctico, lactobiónico, láurico, maleico, málico, metanosulfónico, múcico, oleico, oxálico, palmítico, pamoico, pantoténico, fenilacético, fenilsulfónico, propiónico, pirúvico, salicílico, esteárico, succínico, sulfanílico, tartárico, toluenosulfónico y valérico. Ejemplos de aniones orgánicos poliméricos adecuados incluyen, pero no se limitan a, los derivados de los siguientes ácidos poliméricos: ácido tánico, carboximetilcelulosa.

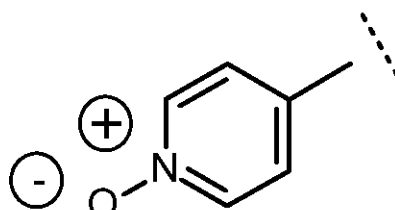
20 A menos que se especifique otra cosa, una referencia a un compuesto particular también incluye formas salinas del mismo.

N-Óxidos

25 Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y/o manejar un N-óxido correspondiente del compuesto. Por ejemplo, un compuesto que tiene un grupo piridilo se puede preparar, purificar y/o manejar como el N-óxido correspondiente.



pirid-4-ilo



N-óxido de pirid-4-ilo

A menos que se especifique otra cosa, una referencia a un compuesto particular también incluye formas de N-óxido del mismo.

30 Hidratos y Solvatos

Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y/o manejar un solvato correspondiente del compuesto. El término "solvato" se usa en la presente en el sentido convencional para referirse a un complejo de soluto (p. ej., compuesto, sal de compuesto) y disolvente. Si el disolvente es agua, el solvato se puede denominar convenientemente un hidrato, por ejemplo, un monohidrato, un dihidrato, un trihidrato, etc.

35 A menos que se especifique otra cosa, una referencia a un compuesto particular también incluye las formas de solvato e hidrato del mismo.

Formas Químicamente Protegidas

40 Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y/o manejar el compuesto en una forma químicamente protegida. El término "forma químicamente protegida" se usa en la presente en el sentido químico convencional y trata de un compuesto en el que uno o más grupos funcionales reactivos se protegen de reacciones químicas no deseables bajo condiciones especificadas (p. ej., pH, temperatura, radiación, disolvente y similares). En la práctica, se emplean métodos químicos muy conocidos para hacer reversiblemente no reactivo a un grupo funcional, que de otro modo sería reactivo, bajo condiciones especificadas. En una forma químicamente protegida, uno o más grupos funcionales reactivos están en la forma de un grupo protegido o protector (también conocido como un grupo enmascarado o enmascarante o un grupo bloqueado o bloqueante). Al proteger un grupo funcional reactivo, se

45

pueden realizar reacciones que implican otros grupos funcionales reactivos desprotegidos, sin afectar al grupo protegido; el grupo protector se puede retirar, habitualmente en una etapa posterior, sin afectar sustancialmente al resto de la molécula. Véase, por ejemplo, Protective Groups in Organic Synthesis (T. Greene y P. Wuts; 4ª Edición; John Wiley and Sons, 2006).

- 5 Una amplia variedad de tales métodos de “protección”, “bloqueo” o “enmascaramiento” son ampliamente usados y muy conocidos en la síntesis orgánica. Por ejemplo, un compuesto que tiene dos grupos funcionales reactivos no equivalentes, ambos de los cuales serían reactivos bajo condiciones especificadas, se puede derivar para hacer que uno de los grupos funcionales esté “protegido”, y de ese modo no sea reactivo, bajo las condiciones especificadas; así protegido, el compuesto se puede usar como un reaccionante que tiene efectivamente sólo un grupo funcional reactivo. Después de que se termine la reacción deseada (que implica al otro grupo funcional), el grupo protegido se puede “desproteger” para volver a su funcionalidad original.

Por ejemplo, un grupo hidroxilo se puede proteger como un éter (-OR) o un éster (-OC(=O)R), por ejemplo, como: un éter t-butílico; un éter bencílico, benzhidrílico (difenilmetílico) o tritílico (trifenilmetílico); un éter trimetilsilílico o t-butildimetilsilílico; o un éster acetílico (-OC(=O)CH₃, -OAc).

- 15 Por ejemplo, un grupo aldehído o cetona se puede proteger como un acetal (R-CH(OR)₂) o cetal (R₂C(OR)₂), respectivamente, en los que el grupo carbonilo (>C=O) se convierte en un diéter (>C(OR)₂), mediante una reacción con, por ejemplo, un alcohol primario. El grupo aldehído o cetona se regenera fácilmente mediante hidrólisis usando un gran exceso de agua en presencia de ácido.

Profármacos

- 20 Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y/o manejar el compuesto en la forma de un profármaco. El término “profármaco”, según se usa en la presente, trata de un compuesto que, cuando se metaboliza (p. ej., in vivo), da el compuesto activo deseado. Típicamente, el profármaco es inactivo o menos activo que el compuesto activo deseado, pero puede proporcionar propiedades de manejo, administración o metabólicas ventajosas.

- 25 Por ejemplo, algunos profármacos son ésteres del compuesto activo (p. ej., un éster metabólicamente lábil fisiológicamente aceptable). Durante el metabolismo, el grupo éster (-C(=O)OR) se escinde para dar el fármaco activo. Tales ésteres se pueden formar mediante esterificación, por ejemplo, de cualquiera de los grupos ácido carboxílico (-C(=O)OH) en el compuesto originario, con, cuando sea apropiado, antes de la protección de cualesquiera otros grupos reactivos presentes en el compuesto originario, seguido por desprotección si se requiere.

- 30 Además, algunos profármacos se activan enzimáticamente para dar el compuesto activo o un compuesto que, durante una reacción química adicional, da el compuesto activo (por ejemplo, como en ADEPT, GDEPT, LIDEPT, etc.). Por ejemplo, el profármaco puede ser un derivado de azúcar u otro conjugado glicosídico o puede ser un derivado de éster de aminoácido.

Síntesis Química

- 35 Se describen en la presente métodos para la síntesis química de compuestos de la presente invención. Estos y/u otros métodos muy conocidos se pueden modificar y/o adaptar de maneras conocidas a fin de facilitar la síntesis de compuestos adicionales dentro del alcance de la presente invención.

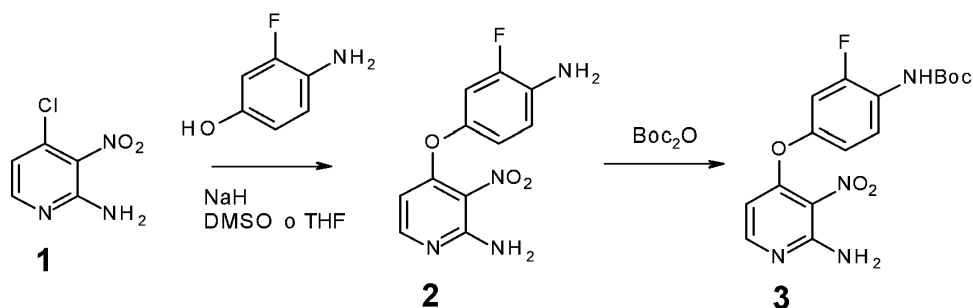
Descripciones de métodos y procedimientos de laboratorio generales, útiles para la preparación de los compuestos descritos en la presente, se proporcionan en Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry, 5ª Edición, 1989, (Editores: Furniss, Hannaford, Smith y Tatchell) (publicado por Longmann, Reino Unido).

- 40 Métodos para la síntesis de compuestos de piridina en particular se describen en Heterocyclic Chemistry, 3ª Edición, 1998, (Editores: Joule, Mills y Smith) (publicado por Chapman & Hall, Reino Unido).

- 45 Los compuestos de TBAP descritos en la presente se pueden preparar a través del producto intermedio (2) clave. Este producto intermedio se puede preparar a partir de una materia prima disponible comercialmente, 2-amino-3-nitro-4-cloropiridina (1) y 3-fluoro-4-aminofenol. El producto intermedio (2) se puede proteger selectivamente en el grupo amino, por ejemplo como un carbamato BOC, para proporcionar el producto intermedio (3).

Un ejemplo de tal método se ilustra en el siguiente esquema.

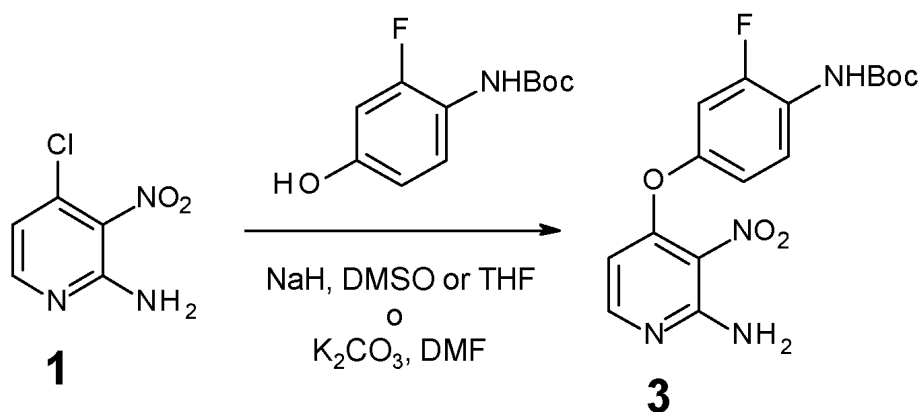
Esquema 1



El producto intermedio (3) también se puede obtener directamente a partir de 2-amino-3-nitro-4-cloropiridina (1) y 3-fluoro-4-aminofenol protegido con BOC en N.

Un ejemplo de tal método se ilustra en el siguiente esquema.

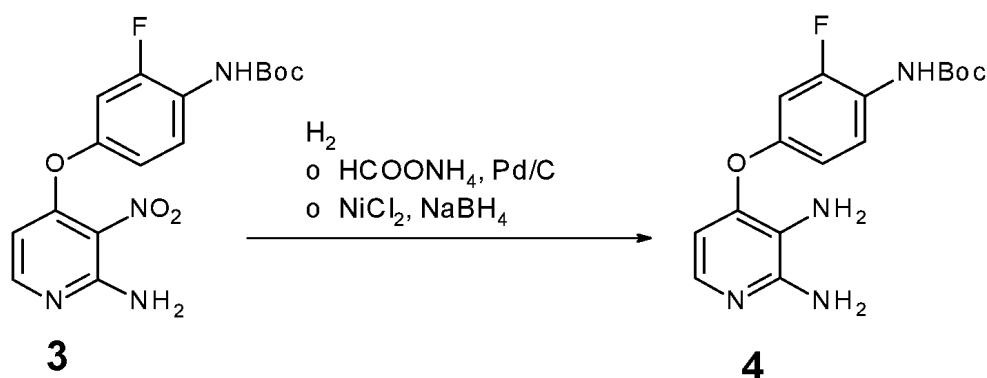
5 Esquema 2



El grupo nitro del producto intermedio protegido (3) se puede reducir para dar un grupo amino, por ejemplo, con Pd/C y formiato amónico o hidrógeno o con NiCl_2 y NaBH_4 , para dar el producto intermedio diaminado (4).

Un ejemplo de tal método se ilustra en el siguiente esquema.

10 Esquema 3

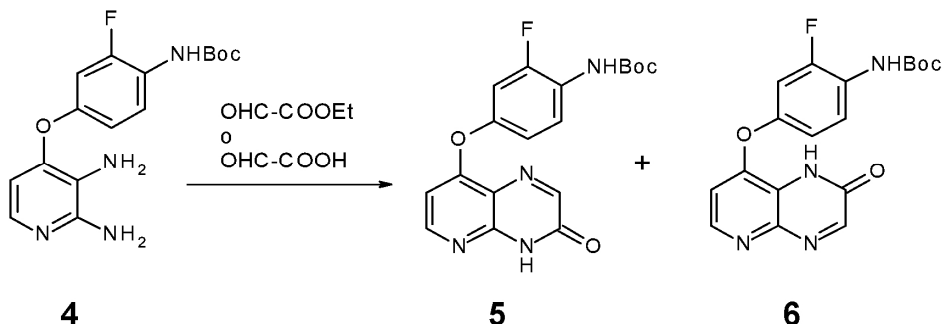


Se pueden obtener piridopiracinas a partir del producto intermedio (4) mediante la reacción con glioxilato de etilo o ácido glioxílico. Ambos isómeros (5) y (6) se pueden obtener a partir de la reacción de (4) con glioxalato de etilo o ácido glioxílico. La relación de los dos isómeros puede estar influenciada por la elección de los reactivos y los disolventes, de modo que se obtenga uno preferentemente. El isómero (5) deseado se puede separar de la mezcla mediante cromatografía en columna o cristalización selectiva de la mezcla.

15

Un ejemplo de tal método se ilustra en el siguiente esquema.

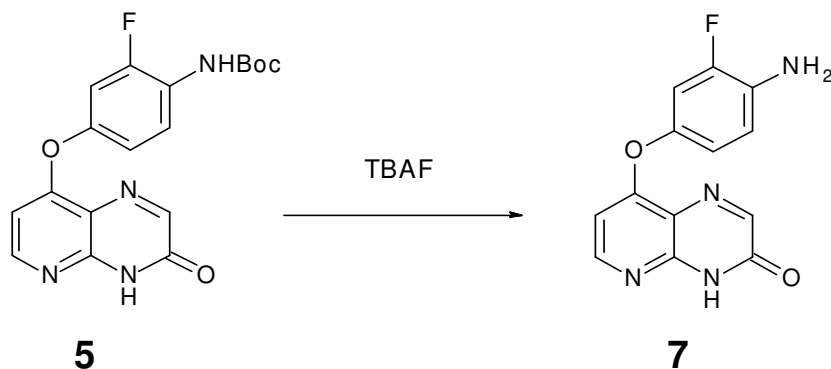
Esquema 4



La desprotección del grupo protector (PG), por ejemplo, con fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) para un grupo protector Boc, produce el producto intermedio (7) común.

- 5 Un ejemplo de tal método se ilustra en el siguiente esquema.

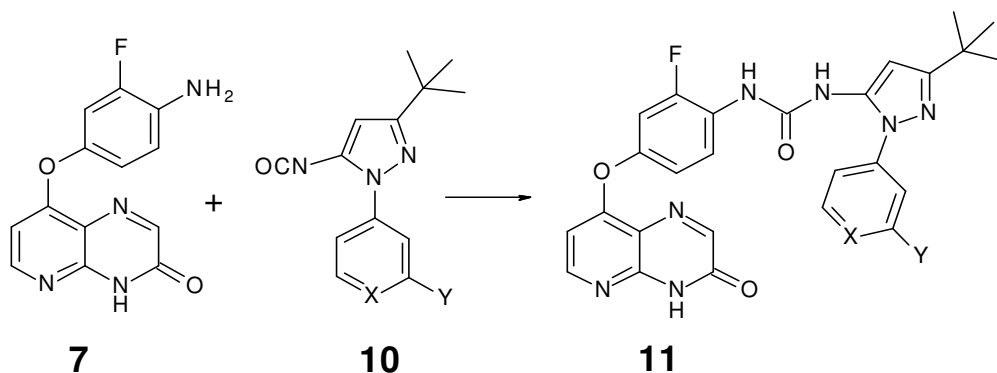
Esquema 5



El producto intermedio (7) clave se hace reaccionar con 3-terc-butil-5-isocyanato-1-aril-1H-pirazols (10) para proporcionar las ureas (11) correspondientes.

- 10 Un ejemplo de tal método se ilustra en el siguiente esquema.

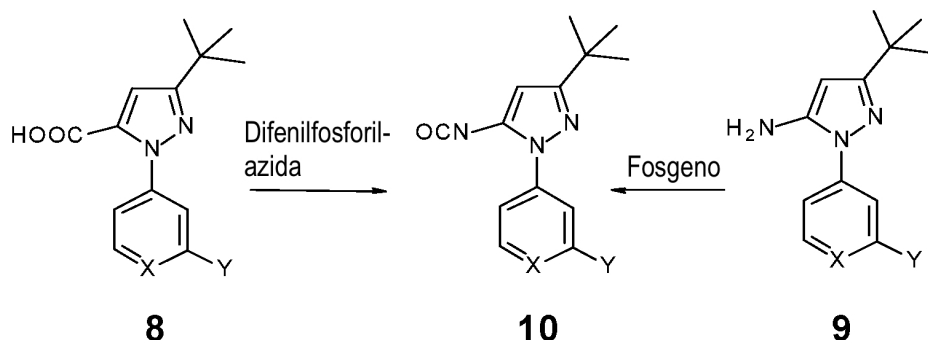
Esquema 6



- 15 Los isocyanatos (10) respectivos se pueden obtener, por ejemplo, mediante la reacción de aminas (9) con fosgeno, trifosgeno o sus derivados o mediante la conversión de los ácidos carboxílicos (8) correspondientes en azidas de acilo con, por ejemplo, difenilfosforilazida, seguido por transposición de Curtius. Estas reacciones se identifican solamente para ilustración, y se debe apuntar que se conocen en la técnica otros reactivos adecuados que también se pueden usar para convertir aminas o ácidos carboxílicos en isocyanatos.

Ejemplos de tales métodos se ilustran en el siguiente esquema.

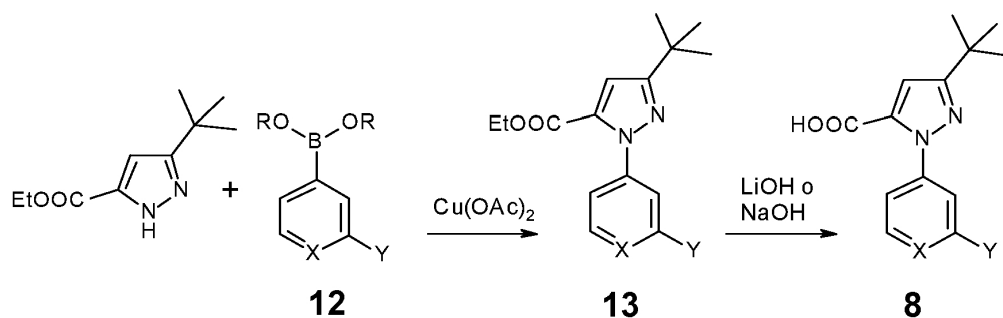
Esquema 7



5 Los ácidos carboxílicos (8) deseados se pueden obtener, por ejemplo, mediante la reacción de los ácidos fenil- o piridil-borónicos sustituidos en meta (R es H) o ésteres borónicos (R es alquilo) (12) correspondientes con éster de 3-*tert*-butil-1*H*-pirazol-5-carboxilato seguido por la hidrólisis del éster en ácido carboxílico. Los ésteres borónicos, B(OR)₂, incluyen ésteres cíclicos, tales como 4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-ilo.

Un ejemplo de tal método se ilustra en el siguiente esquema.

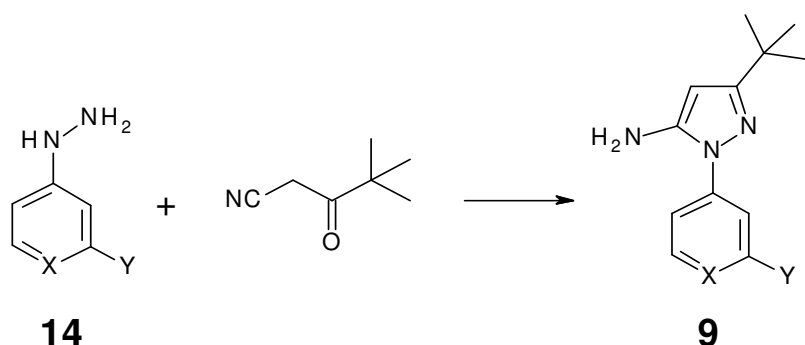
Esquema 8



10 Las aminas (9) deseadas se pueden obtener, por ejemplo, mediante la reacción de las fenil- o piridil-hidracinas (14) sustituidas en meta correspondientes con 4,4-dimetil-3-oxopentanitrilo.

Un ejemplo de tal método se ilustra en el siguiente esquema.

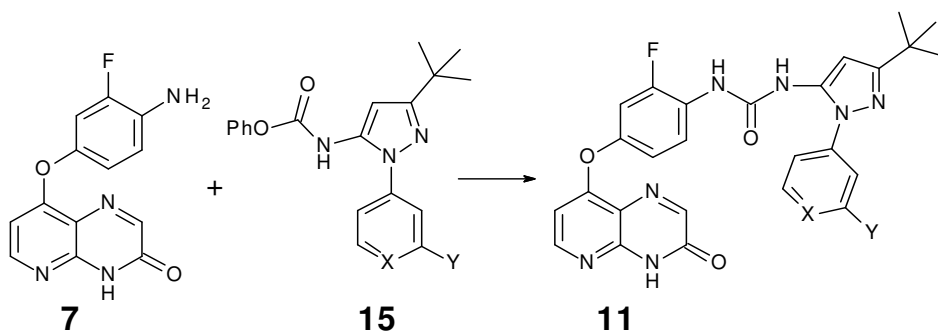
Esquema 9



15 En un enfoque alternativo, el producto intermedio (7) se hace reaccionar con carbamatos activados de 3-*tert*-butil-5-amino-1-*aril*-1*H*-pirazols para proporcionar las ureas correspondientes.

Un ejemplo de tal método se ilustra en el siguiente esquema.

Esquema 10

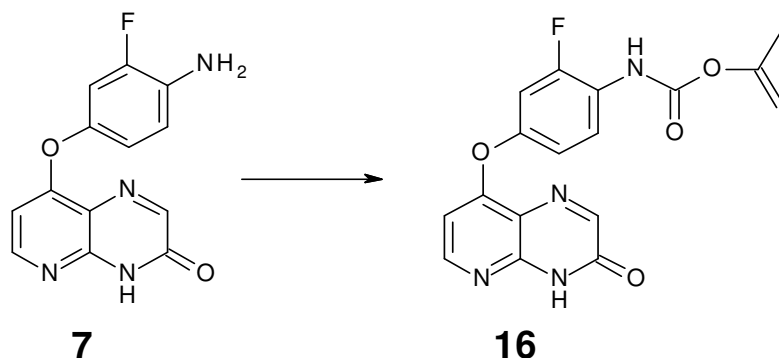


5 Los carbamatos activados respectivos se pueden obtener, por ejemplo, mediante la reacción de aminas (**9**) con cloroformatos, por ejemplo, con cloroformato de fenilo para formar (3-(terc-butil)-1-aril-1H-pirazol-5-il)carbamato de fenilo (**15**) o con cloroformato de 1-metilvinilo para formar (3-(terc-butil)-1-aril-1H-pirazol-5-il)carbamato de 1-metilvinilo.

Alternativamente, la posición amino del producto intermedio (**7**) común se puede activar mediante reacción, por ejemplo, con cloroformato de fenilo o cloroformato de 1-metilvinilo.

Un ejemplo de tal método se ilustra en el siguiente esquema.

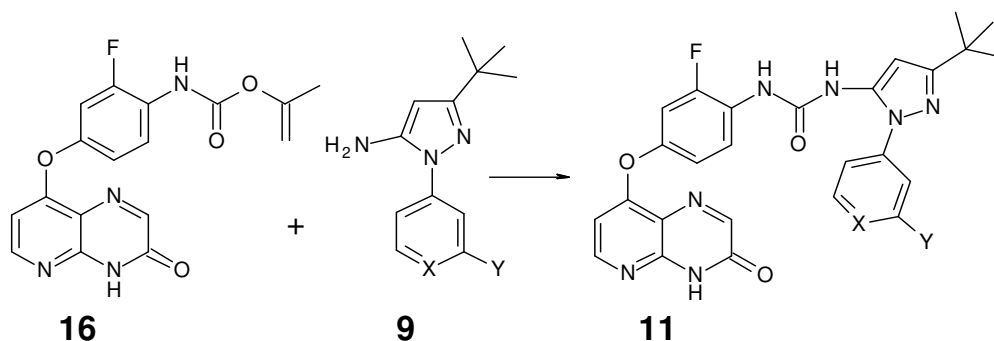
Esquema 11



10 El carbamato activado así formado se puede hacer reaccionar a continuación con una amina aromática para proporcionar la urea correspondiente.

Un ejemplo de tal método se ilustra en el siguiente esquema.

Esquema 12

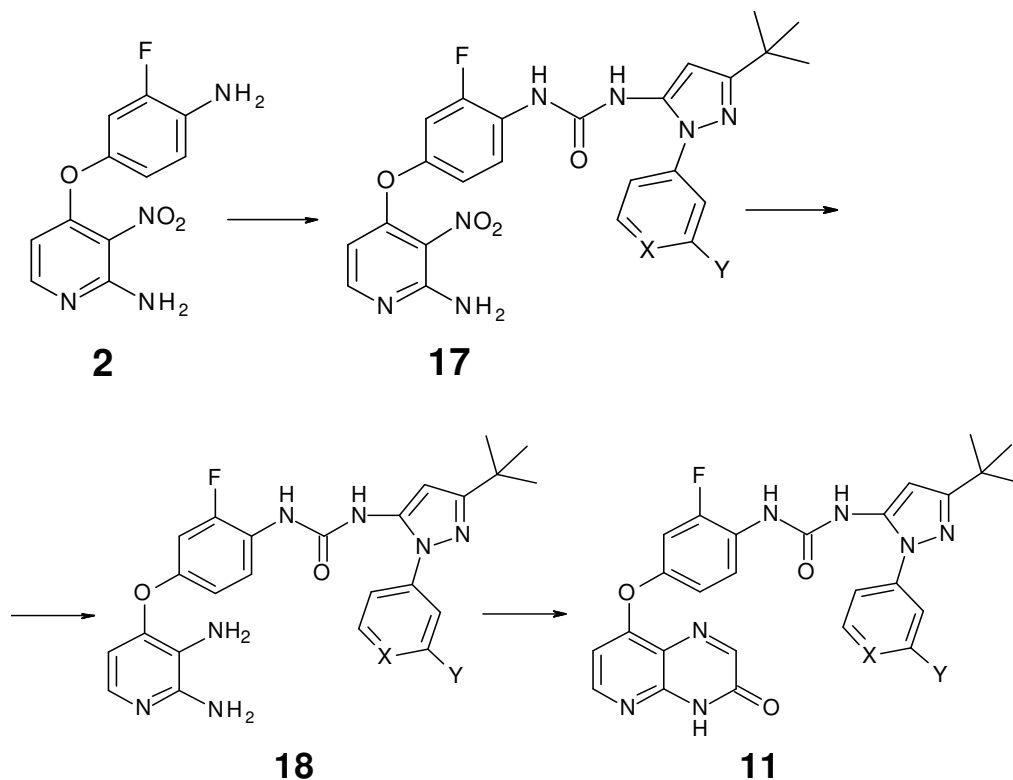


15 Los carbamatos activados mostrados en los Esquemas 10-12 anteriores son meramente ejemplos. También se pueden usar otros carbamatos activados conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, carbamatos de 4-nitrofenilo y carbamatos de N-hidroxisuccinimida.

En un enfoque alternativo, la urea se forma en primer lugar, antes de la ciclación.

20 Un ejemplo de tal método se ilustra en el siguiente esquema.

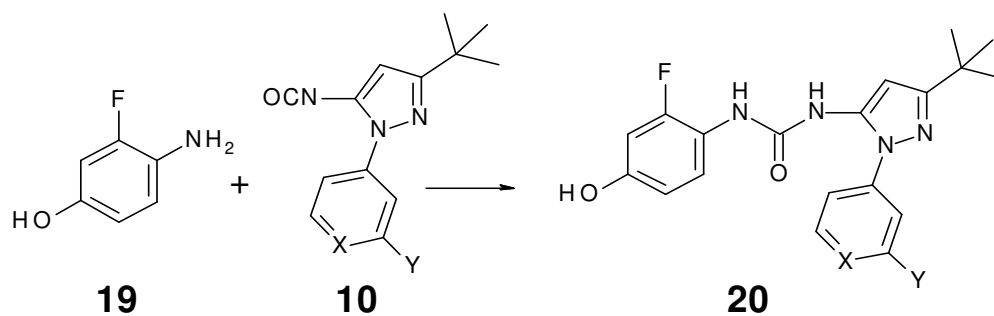
Esquema 13



En un enfoque alternativo, los aminofenoles se pueden convertir en ureas para formar el producto intermedios (20).

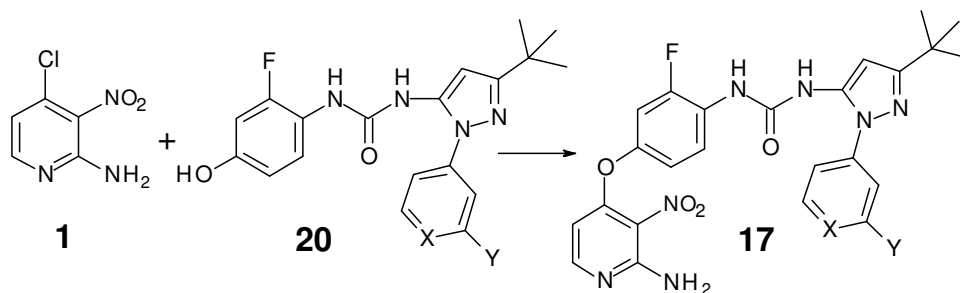
5 Un ejemplo de tal método se ilustra en el siguiente esquema.

Esquema 14



The producto intermedios (20) se puede acoplar a continuación con (1) para proporcionar (17). Una conversión adicional, por ejemplo, según se describe anteriormente en el Esquema 13, conduce al producto (11).

10 Un ejemplo de tal método se ilustra en el siguiente esquema.

Esquema 15Composiciones

5 Un aspecto de la presente invención trata de una composición (p. ej., una composición farmacéutica) que comprende un compuesto de TBAP, según se describe en la presente, y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

También se describe en la presente un método para preparar una composición (p. ej., una composición farmacéutica) que comprende mezclar un compuesto de TBAP, según se describe en la presente, y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 Usos

Los compuestos de TBAP descritos en la presente son útiles en el tratamiento de, por ejemplo, trastornos proliferativos (como “agentes antiproliferativos”), cáncer (como “agentes anticancerosos”), enfermedades inflamatorias (como “agentes antiinflamatorios”), infecciones virales (como “agentes antivirales”), enfermedades neurodegenerativas (como “agentes antineurodegenerativos”), enfermedades fibróticas (como “agentes antifibróticos”), etc.

Uso en Métodos para Inhibir RAF (p. ej., BRAF, CRAF, etc.)

También se describe en la presente un método para inhibir la función de RAF (p. ej., BRAF, CRAF, etc.) (p. ej., en una célula), in vitro o in vivo, que comprende poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un compuesto de TBAP, según se describe en la presente.

20 Un experto normal en la técnica es capaz de determinar fácilmente si un compuesto candidato inhibe o no RAF (p. ej., BRAF, CRAF, etc.). Por ejemplo, ensayos adecuados se describen en la presente o se conocen en la técnica.

En una realización, el método se realiza in vitro.

En una realización, el método se realiza in vivo.

25 En una realización, el compuesto de TBAP se proporciona en la forma de una composición farmacéuticamente aceptable.

Se puede tratar cualquier tipo de célula, incluyendo adiposa, pulmonar, gastrointestinal (incluyendo, p. ej., intestino, colon), de mama (mamarias), ováricas, prostáticas, de hígado (hepáticas), de riñón (renales), de vejiga urinaria, pancreáticas, cerebrales y cutáneas.

30 Por ejemplo, una muestra de células se puede hacer crecer in vitro y un compuesto se puede poner en contacto con dichas células, y se puede observar el efecto del compuesto sobre esas células. Como un ejemplo de “efecto”, se puede determinar el estado morfológico de las células (p. ej., vivas o muertas, etc.). Cuando se encuentra que el compuesto ejerce una influencia sobre las células, esto se puede usar como un marcador de pronóstico o diagnóstico de la eficacia del compuesto en métodos para tratar a un paciente que tiene células del mismo tipo celular.

35 Uso en Métodos para Inhibir la Proliferación Celular, etc.

Los compuestos de TBAP descritos en la presente, p. ej., (a) regulan (p. ej., inhiben) la proliferación celular; (b) inhiben la progresión del ciclo celular; (c) promueven la apoptosis; o (d) una combinación de uno o más de estos.

40 También se describe en la presente un método para regular (p. ej., inhibir) la proliferación celular (p. ej., la proliferación de una célula), inhibir la progresión del ciclo celular, promover la apoptosis o una combinación de uno o más de estos, in vitro o in vivo, que comprende poner en contacto una célula con una cantidad eficaz de un compuesto de TBAP, según se describe en la presente.

En una realización, el método es un métodos para regular (p. ej., inhibir) la proliferación celular (p. ej., la proliferación de una célula), in vitro o in vivo, que comprende poner en contacto una célula con una cantidad eficaz de un compuesto de TBAP, según se describe en la presente.

En una realización, el método se realiza in vitro.

5 En una realización, el método se realiza in vivo.

En una realización, el compuesto de TBAP se proporciona en la forma de una composición farmacéuticamente aceptable.

10 Se puede tratar cualquier tipo de célula, incluyendo pulmonar, gastrointestinal (incluyendo, p. ej., intestino, colon), de mama (mamaria), ovárica, prostática, de hígado (hepática), de riñón (renal), de vejiga urinaria, pancreática, cerebral y cutánea.

Un experto normal en la técnica es capaz de determinar fácilmente si un compuesto candidato regula (p. ej., inhibe) o no la proliferación celular, etc. Por ejemplo, se describen en la presente ensayos que se pueden usar convenientemente para evaluar la actividad ofrecida por un compuesto particular.

15 Por ejemplo, una muestra de células (p. ej., procedente de un tumor) se puede hacer crecer in vitro y un compuesto se puede poner en contacto con dichas células, y se puede observar el efecto del compuesto sobre esas células. Como un ejemplo de "efecto", se puede determinar el estado morfológico de las células (p. ej., vivas o muertas, etc.). Cuando se encuentra que el compuesto ejerce una influencia sobre las células, esto se puede usar como un marcador de pronóstico o diagnóstico de la eficacia del compuesto en métodos para tratar a un paciente que tiene células del mismo tipo celular.

20 Uso en Métodos de Terapia

Otro aspecto de la presente invención trata de un compuesto de TBAP, según se describe en la presente, para el uso en un método de tratamiento del cuerpo de un ser humano o un animal mediante terapia, por ejemplo, para el uso en un método de tratamiento de un trastorno (p. ej., una enfermedad) según se describe en la presente.

Uso en la Fabricación de Medicamentos

25 También se describe en la presente el uso de un compuesto de TBAP, según se describe en la presente, en la fabricación de un medicamento, por ejemplo, para el uso en un método de tratamiento, por ejemplo, para el uso en un método de tratamiento de un trastorno (p. ej., una enfermedad) según se describe en la presente.

En una realización, el medicamento comprende el compuesto de TBAP.

Métodos de Tratamiento

30 También se describe en la presente un método de tratamiento, por ejemplo, un método de tratamiento de un trastorno (p. ej., una enfermedad) según se describe en la presente, que comprende administrar a un sujeto que necesite tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de TBAP, según se describe en la presente, preferiblemente en la forma de una composición farmacéutica.

Trastornos Tratados - Trastornos Proliferativos

35 En una realización (p. ej., para el uso en métodos de terapia, de uso en la fabricación de medicamentos, de métodos de tratamiento), el tratamiento es el tratamiento de un trastorno proliferativo.

El término "trastorno proliferativo", según se usa en la presente, trata de una proliferación celular no querida o descontrolada de células excesivas o anormales que no se desea, tal como crecimiento neoplástico o hiperplástico.

40 En una realización, el tratamiento es el tratamiento de: un trastorno proliferativo caracterizado por proliferación celular benigna, premaligna o maligna.

En una realización, el tratamiento es el tratamiento de: hiperplasia; un neoplasma; un tumor (p. ej., un histocitoma, un glioma, un astrocitoma, un osteoma); cáncer; psoriasis; una enfermedad ósea; un trastorno fibroproliferativo (p. ej., de tejidos conectivos); fibrosis pulmonar; aterosclerosis; o proliferación celular del músculo liso en los vasos sanguíneos (p. ej., estenosis o reestenosis después de angioplastia).

45 Trastornos Tratados - Cáncer

En una realización (p. ej., de uso en métodos de terapia, de uso en la fabricación de medicamentos, de métodos de tratamiento), el tratamiento es el tratamiento de cáncer.

En una realización, el tratamiento es el tratamiento de metástasis cancerosa.

Entre los cánceres se incluyen:

(1) Carcinomas, incluyendo tumores derivados de epitelios escamosos estratificados (carcinomas de células escamosas) y tumores que surgen dentro de órganos o glándulas (adenocarcinomas). Ejemplos incluyen mama, colorrectal, pulmón, páncreas, próstata, ovario.

5 (2) Sarcomas, incluyendo: osteosarcoma y sarcoma osteogénico (hueso); condrosarcoma (cartílago); leiomiomasarcoma (músculo liso); rabiomiomasarcoma (músculo esquelético); sarcoma mesotelial y mesotelioma (revestimiento membranoso de cavidades corporales); fibrosarcoma (tejido fibroso); angiosarcoma y hemangioendotelioma (vasos sanguíneos); liposarcoma (tejido adiposo); glioma y astrocitoma (tejido conectivo neurogénico encontrado en el cerebro); mixosarcoma (tejido conectivo embrionario primitivo); tumor mesenquimal y mesodérmico mixto (tipos de tejido conectivo mixtos).

10 (3) Mieloma.

(4) Melanomas incluyendo, p. ej., melanoma de propagación superficial, melanoma nodular, melanoma lentiginoso maligno, melanoma acral y melanoma uveal.

15 (5) Tumores hemtopoyéticos, incluyendo: leucemia mielógena y granulocítica (enfermedad maligna de la serie mieloide y de glóbulos blancos granulocíticos); leucemia linfática, linfocítica y linfoblástica (enfermedad maligna de la serie linfoide y glóbulos rojos linfocíticos); policitemia verdadera (también conocida como eritremia) (enfermedad maligna de diversos productos celulares sanguíneos, pero predominando los glóbulos rojos).

(6) Linfomas, incluyendo: linfomas hodgkiniano y no hodgkiniano.

20 (7) Tipos Mixtos, incluyendo, p. ej., carcinoma adenoescamoso; tumor mesodérmico mixto; carcinosarcoma; teratocarcinoma.

En una realización, el cáncer se caracteriza por o se caracteriza además por células madre cancerosas.

En una realización, el tratamiento es el tratamiento de cáncer que es resistente al tratamiento con un anticuerpo, p. ej., un anticuerpo conocido, p. ej., un anticuerpo aprobado legislativamente. En una realización, el tratamiento es el tratamiento de melanoma que es resistente al tratamiento con un anticuerpo, p. ej., un anticuerpo conocidos, p. ej., un anticuerpo aprobado legislativamente. Ejemplos de tales anticuerpos que son conocidos para tratar el melanoma incluyen: anticuerpos que se unen a CTLA-4 (antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos 4, por sus siglas en inglés), tales como ipilimumab (aprobado); anticuerpos que se unen a PD-1 (receptor de muerte celular programada 1), tales como pembrolizumab (aprobado) y nivolumab (aprobado); anticuerpos que se unen a PD-L1 (ligando de muerte celular programada 1, por sus siglas en inglés), tales como MEDI4736 (en estudios clínicos) y MPDL3280A (en estudios clínicos); anticuerpos y conjugados de anticuerpo que se unen a glicoproteína de antígeno de melanoma NMB, tales como glebatumumab vedotina (en estudios clínicos); anticuerpos que se unen a marcador endotelial antitumoral 1, tales como ontuxizumab (en estudios clínicos); anticuerpos que se unen a VEGF, tales como bevacizumab, solos o en combinación con quimioterapia estándar o IFN- α 2b en bajas dosis (en estudios clínicos); anticuerpos que se unen a gangliósido GD3, tales como KW-2871 (en estudios clínicos); anticuerpos que se unen a isoformas de integrina, tales como $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ y $\alpha_v\beta_6$, tales como intetumumab (en estudios clínicos).

El efecto anticancerosos puede surgir a través de uno o más mecanismos, incluyendo, pero no limitados a, la regulación de la proliferación celular, la inhibición de la progresión del ciclo celular, la inhibición de la angiogénesis (la formación de nuevos vasos sanguíneos), la inhibición de metástasis (la propagación de un tumor desde su origen), la inhibición de la migración celular (la propagación de células cancerosas a otras partes del cuerpo), la inhibición de la invasión (la propagación de células tumorales en estructuras normales próximas), la promoción de la apoptosis (muerte celular programada), la muerte por necrosis o la inducción de muerte por autofagia. Los compuestos descritos en la presente se pueden usar en el tratamiento de los cánceres descritos en la presente, independientemente de los mecanismos analizados en la presente.

Trastornos Tratados - Inflamación

45 En una realización (p. ej., para el uso en métodos de terapia, de uso en la fabricación de medicamentos, de métodos de tratamiento), el tratamiento es el tratamiento de la inflamación (p. ej., un trastorno o reacción inflamatorio).

En una realización, el tratamiento es el tratamiento de la inflamación aguda (p. ej., mediada por infección aguda).

En una realización, el tratamiento es el tratamiento de la inflamación crónica (p. ej., mediada por infección crónica).

50 En una realización, la enfermedad inflamatoria se selecciona de enfermedades inflamatorias del pulmón (p. ej., asma; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD, por sus siglas en inglés)); el ojo (p. ej., uveítis); y el tracto gastrointestinal (p. ej., enfermedad de Crohn; colitis ulcerativa).

En una realización, la enfermedad inflamatoria se selecciona de:

(i) enfermedades o trastornos pulmonares que tienen un componente inflamatorio, tales como fibrosis quística, hipertensión pulmonar, sarcoidosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática y, particularmente, COPD (incluyendo bronquitis crónica y enfisema), asma y asma pediátrica;

5 (ii) enfermedades o trastornos cutáneos que tienen un componente inflamatorio, tales como dermatitis atópica, dermatitis alérgica, dermatitis de contacto y psoriasis;

(iii) enfermedades o trastornos nasales que tienen un componente inflamatorio, tales como rinitis alérgica, rinitis y sinusitis;

10 (iv) enfermedades o trastornos oculares que tienen un componente inflamatorio, tales como conjuntivitis, conjuntivitis alérgica, queratoconjuntivitis seca (ojo seco), glaucoma, retinopatía diabética, edema macular (incluyendo edema macular diabético), oclusión de la vena retinal central (CRVO, por sus siglas en inglés), degeneración macular seca y/o húmeda asociada a la edad (AM O), inflamación después de una operación de cataratas y, particularmente, uveítis (incluyendo uveítis posterior, anterior y panuveítis), rechazo de injertos corneal y trasplante de células límbicas; y

15 (v) enfermedades o trastornos gastrointestinales que tienen un componente inflamatorio, tales como enteropatía sensible al gluten (enfermedad celíaca), esofagitis eosinofílica, enfermedad intestinal del injerto contra el hospedador y, particularmente, enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa.

20 En una realización, la enfermedad inflamatoria se selecciona de: fibrosis quística; hipertensión pulmonar; sarcoidosis pulmonar; fibrosis pulmonar idiopática; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) (incluyendo bronquitis crónica y enfisema); asma; asma pediátrica; dermatitis atópica; dermatitis alérgica; dermatitis de contacto; psoriasis; rinitis alérgica; rinitis; sinusitis; conjuntivitis; conjuntivitis alérgica; queratoconjuntivitis seca (ojo seco); glaucoma; retinopatía diabética; edema macular (incluyendo edema macular diabético); oclusión de la vena retinal central (CRVO); degeneración macular seca y/o húmeda asociada a la edad (AMD); inflamación después de una operación de cataratas; uveítis (incluyendo uveítis posterior, anterior y panuveítis); rechazo de injerto corneal y trasplante de células límbicas; enteropatía sensible al gluten (enfermedad celíaca); esofagitis eosinofílica; enfermedad intestinal del injerto contra el hospedador; enfermedad de Crohn; y colitis ulcerativa.

25 En una realización, la enfermedad inflamatoria es asma o COPD.

En una realización, la enfermedad inflamatoria es uveítis, enfermedad de Crohn o colitis ulcerativa.

Trastornos Tratados - Trastornos Inmunológicos

30 En una realización (p. ej., para el uso en métodos de terapia, de uso en la fabricación de medicamentos, de métodos de tratamiento), el tratamiento es el tratamiento de un trastorno inmunológico.

En una realización, el tratamiento es el tratamiento de una alergia.

En una realización, el tratamiento es el tratamiento de una enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias, tal como asma.

En una realización, el tratamiento es el tratamiento de dermatitis de contacto alérgica.

35 En una realización, el tratamiento es el tratamiento de una enfermedad del sistema inmunitario.

40 En una realización, el tratamiento es el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, p. ej., artritis reumatoide; lupus eritematoso sistémico (lupus); enteropatía inflamatoria (IBD, por sus siglas en inglés); esclerosis múltiple (MS, por sus siglas en inglés); diabetes mellitus tipo 1; síndrome de Guillain-Barre; psoriasis; enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto; miastenia grave; vasculitis; una enfermedad de inmunodeficiencia; inmunodeficiencia combinada grave (SCID, por sus siglas en inglés); inmunodeficiencia variable común (CVID, por sus siglas en inglés); virus de inmunodeficiencia humana (HIV); síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida); inmunodeficiencia inducida por fármacos; o síndrome del injerto contra el hospedador.

Trastornos Tratados - Infección Viral

45 En una realización (p. ej., para el uso en métodos de terapia, de uso en la fabricación de medicamentos, de métodos de tratamiento), el tratamiento es el tratamiento de una infección viral.

En una realización, el tratamiento es el tratamiento de una infección viral por:

(Grupo I:) un virus de dsDNA, p. ej., un adenovirus, un herpesvirus, un poxvirus;

(Grupo II:) un virus de ssDNA, p. ej., un parvovirus;

(Grupo III:) un virus de dsRNA, p. ej., un reovirus;

(Grupo IV:) un virus de (+)ssRNA, p. ej., un picornavirus, un togavirus;

(Grupo V:) un virus de (-)ssRNA, p. ej., un ortomixovirus, un rbdovirus;

(Grupo VI:) un virus de ssRNA-RT, p. ej., un retrovirus; o

(Grupo VII:) un virus de dsDNA-RT, p. ej., a hepadnavirus.

- 5 Según se usa anteriormente: ds: doble hebra; ss: hebra +; (+)ssRNA: RNA de hebra +; (-)ssRNA: RNA de hebra -; ssRNA-RT: RNA (hebra +) con producto intermedio de DNA en el ciclo vital.

10 En una realización, el tratamiento es el tratamiento de: virus de inmunodeficiencia humana (HIV); virus de hepatitis B (HBV, por sus siglas en inglés); virus de hepatitis C (HCV, por sus siglas en inglés); virus del papiloma humano (HPV, por sus siglas en inglés); citomegalovirus (CMV, por sus siglas en inglés); o virus de Epstein-Barr (EBV); herpesvirus humano 8 (HHV) asociado con sarcoma de Kaposi; virus de Coxsackie B3; virus de Borna; virus de la gripe.

Trastornos Tratados - Trastornos Fibróticos

15 En una realización (p. ej., para el uso en métodos de terapia, de uso en la fabricación de medicamentos, de métodos de tratamiento), el tratamiento es el tratamiento de un trastorno fibrótico (p. ej., un trastorno caracterizado por fibrosis excesiva, p. ej., un exceso de tejido conectivo fibroso en un tejido u órgano, p. ej., desencadenado por un proceso reparador o reactivo, p. ej., en respuesta a una lesión (p. ej., cicatrización, curación) o tejido fibrótico en exceso que surge de una sola línea celular (p. ej., fibroma)).

En una realización, el tratamiento es el tratamiento de:

(para los pulmones:) fibrosis pulmonar; fibrosis pulmonar secundaria a fibrosis quística; fibrosis pulmonar idiopática; fibrosis masiva progresiva del minero del carbón;

20 (para el hígado:) cirrosis;

(para el corazón:) fibrosis endomiocárdica; antiguo infarto de miocardio; fibrosis auricular;

(para el mediastino:) fibrosis mediastinal;

(para el hueso:) mielofibrosis;

(para el retroperitoneo:) fibrosis retroperitoneal;

25 (para la piel:) fibrosis sistémica nefrogénica; cicatrización queloidea; esclerosis sistémica; escleroderma;

(para el intestino:) enfermedad de Crohn;

(para el tejido conectivo:) artrofibrosis; o capsulitis.

Trastornos Tratados - Trastornos Mejorados por la Inhibición de BRAF Mutante

30 En una realización (p. ej., para el uso en métodos de terapia, de uso en la fabricación de medicamentos, de métodos de tratamiento), el tratamiento es el tratamiento de un trastorno (p. ej., una enfermedad) (p. ej., un trastorno proliferativo, p. ej., cáncer) que está asociado con una forma mutada de RAF (p. ej., BRAF), tal como, por ejemplo, las mutaciones descritas en Davies y cols., 2002; Wan y cols., 2004; y Stratton y cols., 2003.

35 En una realización (p. ej., para el uso en métodos de terapia, de uso en la fabricación de medicamentos, de métodos de tratamiento), el tratamiento es el tratamiento de un trastorno (p. ej., una enfermedad) (p. ej., un trastorno proliferativo, p. ej., cáncer) que se mejora mediante la inhibición de RAF (p. ej., BRAF).

En una realización, el tratamiento es el tratamiento de: un trastorno (p. ej., una enfermedad) que se caracteriza por células que sobreexpresan RAF mutante (p. ej., BRAF) (p. ej., en comparación con células normales correspondientes; p. ej., en el que la sobreexpresión en un factor de 1.5, 2, 3, 5, 10, 20 o 50).

Trastornos proliferativos:

40 En una realización, el tratamiento es el tratamiento de: melanoma maligno; carcinoma colorrectal; carcinoma colorrectal metastásico; cáncer tiroideo folicular; cáncer tiroideo insular; cáncer tiroideo papilar; carcinoma ovárico; carcinoma ovárico de baja malignidad; cáncer pulmonar no microcítico; tricoleucemia; colangiocarcinoma; glioma pediátrico de baja malignidad (p. ej., astrocitoma pilocítico; ganglioglioma; xantastrocitoma pleomórfico); mieloma múltiple; o carcinoma medular del páncreas. En una realización, el tratamiento es el tratamiento de: adenocarcinoma ductal pancreático.

45

En una realización, el tratamiento es el tratamiento de un trastorno (p. ej., una enfermedad) que está asociado con una forma mutada de RAF (p. ej., BRAF, CRAF, etc.) pero que es resistente al tratamiento con un inhibidor de RAF conocido (p. ej., aprobado) (p. ej., BRAF, CRAF, etc.). Ejemplos inhibidores de BRAF conocidos (p. ej., aprobados) incluyen vemurafenib (PLX4032, RG7204, Zelboraf) (aprobado) y dabrafenib (GSK-2118436) (aprobado).

- 5 En una realización, el tratamiento es el tratamiento de un trastorno (p. ej., una enfermedad) que está asociado con una forma mutada de RAF (p. ej., BRAF, CRAF, etc.) pero que es resistente al tratamiento con una combinación de un inhibidor de RAF conocidos (p. ej., aprobado) (p. ej., BRAF, CRAF, etc.) y un inhibidor de MEK conocido (p. ej., aprobado). Ejemplos de inhibidores de MEK incluyen: trametinib (GSK 1120212) (aprobado); selumetinib (AZD6244) (en estudios clínicos); PD 325901 (en estudios clínicos); cobimetinib (GDC 0973, XL 518) (en estudios clínicos); y CI 1040 (PD184352) (en estudios clínicos).

- 15 En una realización, el tratamiento es el tratamiento de: melanoma por mutante de BRAF intrínsecamente resistente a vemurafenib; melanoma por mutante de BRAF que adquiere resistencia al tratamiento con vemurafenib; melanoma por mutante de BRAF intrínsecamente resistente a dabrafenib; melanoma por mutante de BRAF que adquiere resistencia al tratamiento con dabrafenib; o melanoma por mutante de BRAF que adquiere resistencia a una combinación de un inhibidor de BRAF y un inhibidor de MEK (p. ej., dabrafenib y trametinib).

Otros Trastornos:

En una realización, el tratamiento es el tratamiento de: histiocitosis de células de Langerhans (LCH, por sus siglas en inglés) o enfermedad de Erdheim-Chester.

Trastornos Tratados - Trastornos Mejorados por la Inhibición tanto de BRAF como de CRAF

- 20 Los cánceres con, por ejemplo, mutaciones activadoras de RAS, RAF y EGFR o la sobreexpresión de RAS, RAF y EGFR, incluyendo cualquiera de las isoformas de los mismos, pueden ser particularmente sensibles a la inhibición de panRAF (p. ej., CRAF y BRAF). Los cánceres con otras anomalías que conducen a una señal de la ruta RAF-MEK-ERK regulada al alza también pueden ser particularmente sensibles al tratamiento con inhibidores de la actividad de panRAF (p. ej., CRAF y BRAF). Ejemplos de tales anomalías incluyen la activación constitutiva de un receptor de factor de crecimiento; la sobreexpresión de uno o más receptores de factores de crecimiento; la sobreexpresión de uno o más factores de crecimiento; activación de la ruta mediada por KSR; y las fusiones génicas de BRAF o CRAF.

- 30 En una realización (p. ej., para el uso en métodos de terapia, de uso en la fabricación de medicamentos, de métodos de tratamiento), el tratamiento es el tratamiento de un trastorno (p. ej., una enfermedad) (p. ej., un trastorno proliferativo, p. ej., cáncer) que se mejora mediante la inhibición tanto de BRAF como de CRAF.

- 35 En una realización, el tratamiento es el tratamiento de: un trastorno (p. ej., una enfermedad) (p. ej., un trastorno proliferativo, p. ej., cáncer) que se caracteriza por la activación constitutiva de un receptor de factor de crecimiento; la sobreexpresión de uno o más receptores de factores de crecimiento (p. ej., en comparación con células normales correspondientes; p. ej., en el que la sobreexpresión es en un factor de 1.5, 2, 3, 5, 10, 20 o 50); la sobreexpresión de uno o más factores de crecimiento (p. ej., en comparación con células normales correspondientes; p. ej., en el que la sobreexpresión es en un factor de 1.5, 2, 3, 5, 10, 20 o 50); y/o fusiones génicas activadoras de BRAF y/o CRAF.

En una realización, el tratamiento es el tratamiento de: un trastorno (p. ej., una enfermedad) (p. ej., un trastorno proliferativo, p. ej., cáncer) que se caracteriza por uno o más o la totalidad de:

- 40 (a) mutantes activadores de RAS y/o RAF;
 (b) regulación al alza de RAS y/o RAF;
 (c) regulación al alza de señales de la ruta RAF-MEK-ERK; y
 (d) regulación al alza de receptores de factores de crecimiento (p. ej., ERBB2 y EGFR).

- 45 En una realización, el tratamiento es el tratamiento de: una enfermedad inflamatoria; una infección; un trastorno autoinmunitario; apoplejía; isquemia; un trastorno cardíaco; un trastorno neurológico; un trastorno fibrogenético, un trastorno proliferativo; un trastorno hiperproliferativo; un trastorno hiperproliferativo no canceroso; un tumor; leucemia; un neoplasma; cáncer; carcinoma; una enfermedad metabólica; una enfermedad maligna; reestenosis vascular; psoriasis; aterosclerosis; artritis reumatoide; osteoartritis; insuficiencia cardíaca; dolor crónico; dolor neuropático; ojo seco; glaucoma de ángulo cerrado; o glaucoma de ángulo amplio.

50 Trastornos Tratados - Trastornos Asociados con Mutaciones de RAS y/o Activación de la Ruta de MAPK

En una realización (p. ej., para el uso en métodos de terapia, de uso en la fabricación de medicamentos, de métodos de tratamiento), el tratamiento es el tratamiento de un trastorno (p. ej., una enfermedad) que está asociado con una

mutación de RAS (p. ej., KRAS, NRAS, HRAS) y/o activación de la ruta de MAPK (p. ej., hiperactividad de la ruta de MAPK).

Trastornos proliferativos:

5 En una realización, el tratamiento es el tratamiento de un trastorno proliferativo (p. ej., cáncer) que está asociado con una mutación de RAS (p. ej., KRAS, NRAS, HRAS) y/o la activación de la ruta de MAPK (p. ej., hiperactividad de la ruta de MAPK).

10 En una realización, el tratamiento es el tratamiento de: carcinoma no microcítico; cáncer colorrectal; cáncer colorrectal metastásico; carcinoma hepatocelular; adenocarcinoma pancreático; melanoma maligno; una enfermedad maligna hematológica (p. ej., leucemia mielomonocítica juvenil (JMML); leucemia mielomonocítica crónica (CMML);
15 síndrome mielodisplástico (MDS, por sus siglas en inglés); leucemia linfoblástica aguda (ALL, por sus siglas en inglés); mieloma múltiple (MM); linfoma de Burkitt; linfoma de Hodgkin); cáncer ovárico epitelial tipo I; cáncer peritoneal primario; adenocarcinoma del tracto biliar; cáncer tiroideo folicular; cáncer tiroideo papilar indiferenciado; sarcoma de tejidos blandos (p. ej., angiosarcoma; leiomiomasarcoma; rhabdomyosarcoma; mixoma; histiocitoma fibroso maligno); neurofibromatosis tipo 1 (NF1); neurofibromas plexiformes (PN, por sus siglas en inglés) inoperables;
20 melanoma uveal; melanoma de los cuerpos ciliares; melanoma coroidal; melanoma del iris; melanoma intraocular metastásico; carcinoma adrenocortical; cáncer renal; seminoma; cáncer de la vejiga urinaria; cáncer endometrial; cáncer del cuello uterino; neuroblastoma; adenocarcinoma de estómago; carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello; o cáncer de próstata.

Otros Trastornos:

20 En una realización, el tratamiento es el tratamiento de: rechazo de trasplantes (p. ej., xenoinjerto; piel; un miembro; un órgano; médula ósea); osteoartritis; artritis reumatoide; fibrosis quística; una complicación de la diabetes (p. ej., retinopatía diabética; nefropatía diabética); hepatomegalia; cardiomegalia; síndrome de Noonan; síndrome cardiorfaciocutáneo; cardiomiopatía hipertrófica; apoplejía (p. ej., apoplejía isquémica focal aguda; isquemia cerebral global); insuficiencia cardíaca; choque séptico; asma; trastorno pulmonar obstructivo crónico; enfermedad de
25 Alzheimer; dolor crónico (p. ej., dolor idiopático; dolor asociado con alcoholismo crónico, deficiencia de vitaminas, uremia o hipotiroidismo; dolor crónico asociado con inflamación; dolor posoperatorio crónico); o dolor neuropático (p. ej., asociado con inflamación; dolor posoperatorio; dolor del miembro fantasma; dolor por quemaduras; gota; neuralgia trigeminal; dolor herpético agudo; dolor posherpético; causalgia; neuropatía diabética; avulsión del plexo; neuroma; vasculitis; infección viral; lesión por aplastamiento; lesión por constricción; lesión tisular; amputación de
30 miembros; lesión nerviosa entre el sistema nervioso periférico y el sistema nervioso central).

Trastornos Tratados - Trastornos Mejorados por la Inhibición de SRC

En una realización (p. ej., para el uso en métodos de terapia, de uso en la fabricación de medicamentos, de métodos de tratamiento), el tratamiento es el tratamiento de un trastorno (p. ej., una enfermedad) que es mejorado por la inhibición de SRC.

35 En una realización, el tratamiento es el tratamiento de: un trastorno (p. ej., una enfermedad) (p. ej., un trastorno proliferativo) que está asociado con una mutación de SRC; la sobreexpresión de SRC (p. ej., en comparación con células normales correspondientes; p. ej., en el que la sobreexpresión es en un factor de 1.5, 2, 3, 5, 10, 20 o 50); o la activación de la ruta aguas arriba de SRC (p. ej., por señalización elevada de RTK).

40 En una realización, el tratamiento es el tratamiento de: cáncer endometrial; carcinoma no microcítico; mesotelioma pleural maligno; melanoma maligno; leucemia mielóide crónica (p. ej., resistente a imatinib); metástasis óseas; cáncer de próstata resistente a hormonas; cáncer de próstata recurrente; osteosarcoma recurrente; leucemia linfoblástica aguda; cáncer colorrectal; cáncer colorrectal metastásico; cáncer de mama; cáncer ovárico; cáncer de cabeza y cuello recurrente o metastásico (p. ej., cáncer de cuello escamoso metastásico con carcinoma celular escamoso primario oculto; cáncer de cuello escamoso metastásico recurrente con primario oculto; carcinoma de
45 células escamosas recurrente de la hipofaringe; carcinoma de células escamosas recurrente de la laringe; carcinoma de células escamosas recurrente de los labios y la cavidad oral; carcinoma de células escamosas recurrente de la nasofaringe; carcinoma de células escamosas recurrente de la orofaringe; carcinoma de células escamosas recurrente del seno paranasal y la cavidad nasal; carcinoma verrugoso recurrente de la laringe; carcinoma verrugoso recurrente de la cavidad oral; carcinoma de células escamosas de la hipofaringe; carcinoma de células escamosas de la laringe; carcinoma de células escamosas de los labios y la cavidad oral; carcinoma de células escamosas de la
50 nasofaringe; carcinoma de células escamosas de la orofaringe; carcinoma de células escamosas del seno paranasal y la cavidad nasal; carcinoma verrugoso de la laringe; carcinoma verrugoso de la cavidad oral; cáncer de lengua); cáncer de piel recurrente; carcinoma de células escamosas de la piel; leucemia mielógena aguda; glioblastoma; o glioma pontino intrínseco difuso.

Trastornos Tratados - Trastornos Mejorados por la Inhibición de p38

En una realización (p. ej., para el uso en métodos de terapia, de uso en la fabricación de medicamentos, de métodos de tratamiento), el tratamiento es el tratamiento de un trastorno (p. ej., una enfermedad) que es mejorado por la inhibición de p38 (p. ej., p38α, p38γ).

- 5 En una realización, el tratamiento es el tratamiento de: un trastorno (p. ej., una enfermedad) (p. ej., un trastorno proliferativo) que está asociado con una mutación en p38 (p. ej., p38α, p38γ); la sobreexpresión de p38 (p. ej., p38α, p38γ) (p. ej., en comparación con células normales correspondientes; p. ej., en el que la sobreexpresión es en un factor de 1.5, 2, 3, 5, 10, 20 o 50); o la activación de la ruta aguas arriba de p38 (p. ej., p38α, p38γ).

Trastornos proliferativos:

- 10 En una realización, el tratamiento es el tratamiento de: cáncer ovárico; cáncer de células escamosas de la cavidad oral; mieloma múltiple; neoplasmas de la médula ósea; o síndrome mielodisplástico.

Otros Trastornos:

En una realización, el tratamiento es el tratamiento de: un trastorno inflamatorio caracterizado por proliferación de células T (p. ej., activación y crecimiento de células T).

- 15 En una realización, el tratamiento es el tratamiento de: artritis reumatoide; osteoartritis; artritis psoriásica; síndrome de Reiter; artritis traumática; artritis rubeólica; sinovitis aguda; artritis gotosa; o espondilitis.

En una realización, el tratamiento es el tratamiento de: psoriasis; eccema; rinitis alérgica; conjuntivitis alérgica; asma; síndrome de dificultad respiratoria del adulto; lesión pulmonar aguda (ALI, por sus siglas en inglés); síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS, por sus siglas en inglés); enfermedad pulmonar crónica; enfermedad pulmonar obstructiva crónica; caquexia sistémica; glomerulonefritis; insuficiencia cardíaca crónica; aterosclerosis; síndrome coronario agudo; isquemia cardíaca; o infarto de miocardio.

- 20 En una realización, el tratamiento es el tratamiento de: endotoxemia; síndrome de choque tóxico; enteropatía inflamatoria; aterosclerosis; síndrome del intestino irritable; enfermedad de Crohn; colitis ulcerativa; una enfermedad de resorción ósea; osteoporosis; diabetes; lesión por reperfusión; reacción del injerto contra el hospedador; rechazo de aloinjertos; septicemia; choque séptico; choque endotóxico; septicemia gramnegativa; glomerulonefritis; reestenosis; o trombosis.

En una realización, el tratamiento es el tratamiento de dolor.

- 30 En una realización, el tratamiento es el tratamiento de: dolor crónico; dolor neuromuscular; cefalea; dolor por cáncer; dolor inflamatorio agudo o crónico asociado con osteoartritis o artritis reumatoide; dolor inflamatorio posoperatorio; dolor neuropático; neuropatía diabética; neuralgia trigeminal; neuralgia poshepática; neuropatía inflamatoria; dolor migrañoso; radiculopatía lumbosacra; dolor dental; traumatismo nervioso; o isquemia neural.

Trastornos Tratados - Trastornos Mejorados por la Inhibición de FGFR1

- 35 En una realización (p. ej., para el uso en métodos de terapia, de uso en la fabricación de medicamentos, de métodos de tratamiento), el tratamiento es el tratamiento de un trastorno (p. ej., una enfermedad) que es mejorado por la inhibición de FGFR1.

En una realización, el tratamiento es el tratamiento de: un trastorno (p. ej., una enfermedad) (p. ej., un trastorno proliferativo) que está asociado con una mutación en FGFR1; la sobreexpresión de FGFR1 (p. ej., en comparación con células normales correspondientes; p. ej., en el que la sobreexpresión es en un factor de 1.5, 2, 3, 5, 10, 20 o 50); o la activación de la ruta aguas arriba de FGFR1.

- 40 En una realización, el tratamiento es el tratamiento de: cáncer de mama; cáncer pulmonar escamoso; cáncer de estómago; carcinoma urotelial; mieloma múltiple; síndrome mieloproliferativo 8p11; o carcinoma hepatocelular.

Trastornos Tratados - Trastornos Mejorados por la Inhibición de VEGFR-2 (KDR)

- 45 En una realización (p. ej., para el uso en métodos de terapia, de uso en la fabricación de medicamentos, de métodos de tratamiento), el tratamiento es el tratamiento de un trastorno (p. ej., una enfermedad) que es mejorado por la inhibición de VEGFR-2 (KDR).

En una realización, el tratamiento es el tratamiento de: un trastorno (p. ej., una enfermedad) (p. ej., un trastorno proliferativo) que está asociado con una mutación en VEGFR-2; la sobreexpresión de VEGFR-2 (p. ej., en comparación con células normales correspondientes; p. ej., en el que la sobreexpresión es en un factor de 1.5, 2, 3, 5, 10, 20 o 50); o la activación de la ruta aguas arriba de VEGFR-2.

En una realización, el tratamiento es el tratamiento de: un trastorno (p. ej., una enfermedad) que se caracteriza por un incremento en la producción de VEGF (p. ej., bien por células cancerosas o bien por células estromáticas).

Trastornos proliferativos:

5 En una realización, el tratamiento es el tratamiento de: cáncer pancreático; cáncer pulmonar no microcítico (NSCLC, por sus siglas en inglés); neoplasmas ováricos; neoplasma peritoneales; neoplasmas de las trompas de Falopio; cáncer pulmonar y efusión pleural asociada; cáncer de células escamosas recurrente o metastásico de la cabeza y el cuello; carcinoma nasofaríngeo localmente avanzado; glioblastoma (p. ej., glioblastoma multiforme; glioblastoma de células gigantes); gliosarcoma; glioma pontino intrínseco difuso; sarcoma de Kaposi relacionado con HIV; mieloma múltiple; carcinoma de células renales; adenocarcinoma gástrico metastásico; leucemia mieloide aguda
10 (AML); carcinoma hepatocelular; dermatofibrosarcoma; cáncer tiroideo medular (MTC, por sus siglas en inglés); cáncer tiroideo papilar; cáncer tiroideo folicular; síndrome mielodisplásico; neurofibromatosis tipo 1; neurofibroma plexiforme; neurofibroma de la médula espinal; cáncer de mama; neoplasmas del tracto biliar; cáncer de cuello uterino; cáncer de próstata; melanoma; carcinoma de vejiga urinaria; carcinoma de uretra; carcinoma de uréter; carcinoma renal; carcinoma pélvico; sarcoma; liposarcoma; cáncer de colon; osteosarcoma; carcinoma sinovial;
15 neuroblastoma; o rhabdomyosarcoma.

Otros Trastornos:

En una realización, el tratamiento es el tratamiento de: aterosclerosis; obesidad; síndrome de dolor neuropático; degeneración macular asociada a la edad; retinopatía diabética; edema macular diabético; o artritis reumatoide.

Trastornos Tratados - Trastornos Mejorados por la Inhibición de LCK

20 En una realización (p. ej., para el uso en métodos de terapia, de uso en la fabricación de medicamentos, de métodos de tratamiento), el tratamiento es el tratamiento de un trastorno (p. ej., una enfermedad) que es mejorado por la inhibición de LCK.

En una realización, el tratamiento es el tratamiento de: un trastorno (p. ej., una enfermedad) que está asociado con una mutación en LCK; la sobreexpresión de LCK (p. ej., en comparación con células normales correspondientes; p. ej., en el que la sobreexpresión es en un factor de 1.5, 2, 3, 5, 10, 20 o 50); o la activación de la ruta aguas arriba de LCK.
25

En una realización, el tratamiento es el tratamiento de: una enfermedad afección patológica inmunológica que implica un componente inmunológico.

30 En una realización, el tratamiento es el tratamiento de: artritis reumatoide; enteropatía inflamatoria (p. ej., colitis ulcerativa; enfermedad de Crohn); psoriasis; artritis psoriásica; rechazo de trasplantes de tejidos u órganos (incluyendo, p. ej., prevención de); enfermedad del injerto contra el hospedador aguda o crónica; rechazo de aloinjertos; rechazo de xenoinjertos; asma alérgica; esclerosis múltiple; diabetes tipo 1; fibrosis pulmonar; o una reacción de hipersensibilidad de la piel.

Tratamiento

35 El término “tratamiento”, según se usa en la presente en el contexto de tratar un trastorno, se relaciona generalmente con el tratamiento de un ser humano o un animal (p. ej., en aplicaciones veterinarias), en el que se alcanza algún efecto terapéutico deseado, por ejemplo, la inhibición de progreso del trastorno, e incluye una reducción en la velocidad del progreso, una interrupción en la velocidad de progreso, un alivio de los síntomas del trastorno, una mejora del trastorno y una cura del trastorno. También se incluye el tratamiento como una medida profiláctica (es decir, profilaxis). Por ejemplo, el uso con pacientes que todavía no han desarrollado el trastorno, pero
40 que tienen riesgo de desarrollar el trastorno, abarcado por el término “tratamiento”.

Por ejemplo, el tratamiento incluye la profilaxis de cáncer, reduciendo la incidencia del cáncer, aliviando los síntomas del cáncer, etc.

45 El término “cantidad terapéuticamente eficaz”, según se usa en la presente, trata de la cantidad de un compuesto o un material, una composición o una forma de dosificación que comprende un compuesto, que es eficaz para producir algún efecto terapéutico deseado, de acuerdo con una relación beneficio/riesgo razonable, cuando se administra según un régimen de tratamiento deseado.

Terapias Combinadas

50 El término “tratamiento” incluye tratamientos y terapias combinados, en los que se combinan dos o más tratamientos o terapias, por ejemplo, secuencialmente o simultáneamente. Por ejemplo, los compuestos descritos en la presente también se pueden usar en terapias combinadas, p. ej., junto con otros agentes. Ejemplos de tratamientos y terapias incluyen quimioterapia (la administración de agentes activos, incluyendo, p. ej., fármacos, anticuerpos (p. ej., como en la inmunoterapia), profármacos (p. ej., como en la terapia fotodinámica, GDEPT, ADEPT, etc.); cirugía; radioterapia; terapia fotodinámica; terapia génica; y dietas controladas.

También se describe en la presente un compuesto según se describe en la presente, en combinación con uno o más (p. ej., 1, 2, 3, 4, etc.) agentes terapéuticos adicionales, según se describe posteriormente.

La combinación particular será a discreción del médico, que seleccionará las dosificaciones usando su conocimiento general común y regímenes de dosificación conocidos por un profesional experto.

- 5 Los agentes (es decir, el compuesto descrito en la presente más uno o más de otros agentes) se pueden administrar simultáneamente o secuencialmente, y se pueden administrar en esquemas de dosificación que varían individualmente y a través de diferentes vías. Por ejemplo, cuando se administran secuencialmente, los agentes se pueden administrar a intervalos poco separados (p. ej., a lo largo de un período de 5-10 minutos) o a intervalos mayores (p. ej., 1, 2, 3, 4 o más horas separados o incluso separados períodos aún mayores cuando se requiera), estando el régimen de dosificación preciso de acuerdo con las propiedades del agente o los agentes terapéuticos.

Los agentes (es decir, el compuesto descrito en la presente más uno o más de otros agentes) se pueden formular conjuntamente en una sola forma de dosificación o alternativamente, los agentes individuales se pueden formular separadamente y se pueden presentar conjuntamente en la forma de un estuche, opcionalmente con instrucciones para su uso.

- 15 Ejemplos de agentes/terapias adicionales que se pueden coadministrar/combinar con el tratamiento con los compuestos de TBAP descritos en la presente memoria incluyen los siguientes: antimetabolitos; agentes alquilantes; venenos para el huso; inhibidores topoisomerasas; agentes de unión a DNA; inhibidores de cinasas; anticuerpos terapéuticos; inhibidores de PARP; inhibidores del metabolismo de NAD; inhibidores metabólicos; agentes elegidos como diana; agentes endocrinos; etc.

20 Otros Usos

Los compuestos de TBAP descritos en la presente también se pueden usar como aditivos de cultivos celulares para inhibir RAF (p. ej., BRAF, CRAF, etc.).

- 25 Los compuestos de TBAP descritos en la presente también se pueden usar como parte de un ensayo in vitro, por ejemplo, a fin de determinar si un hospedante candidato es propenso a beneficiarse del tratamiento con el compuesto en cuestión.

Los compuestos de TBAP descritos en la presente también se pueden usar como un patrón, por ejemplo, en un ensayo, a fin de identificar otros compuestos activos, distintos a inhibidores de RAF (p. ej., BRAF, CRAF, etc.), etc.

Estuches

- 30 También se describe en la presente un estuche que comprende (a) un compuesto de TBAP según se describe en la presente o una composición que comprende un compuesto de TBAP según se describe en la presente, p. ej., proporcionado preferiblemente en un recipiente adecuado y/o con un envase adecuado; y (b) instrucciones de uso, p. ej., instrucciones escritas sobre cómo administrar el compuesto la composición.

Las instrucciones escritas también pueden incluir una lista de indicaciones para las que el ingrediente activo es un tratamiento adecuado.

35 Vías de Administración

El compuesto de TBAP o la composición farmacéutica que comprende el compuesto de TBAP se puede administrar a un sujeto mediante cualquier vía de administración conveniente, ya sea sistémicamente/periféricamente o tópicamente (es decir, en la zona de acción deseada).

- 40 Ejemplos de vías de administración incluyen oral (p. ej., mediante ingestión); yugal; sublingual; transdérmica (incluyendo, p. ej., mediante un parche, un emplasto, etc.); transmucosa (incluyendo, p. ej., mediante un parche, un emplasto, etc.); intranasal (p. ej., mediante pulverización nasal); ocular (p. ej., mediante gotas oculares); pulmonar (p. ej., mediante terapia de inhalación o insuflación usando, p. ej., un aerosol, p. ej., a través de la boca o la nariz); rectal (p. ej., mediante un supositorio o enema); vaginal (p. ej., mediante un pesario); parenteral, por ejemplo, mediante inyección, incluyendo subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intracardíaca, intratecal, 45 intraespinal, intracapsular, subcapsular, intraorbital, intraperitoneal, intratraqueal, subcuticular, intraarticular, subaracnoidea e intraesternal; mediante el implante de un depósito o una reserva, por ejemplo, subcutáneamente o intramuscularmente.

El Sujeto/Paciente

- 50 El sujeto/paciente puede ser un cordado, un vertebrado, un mamífero, un mamífero placentario, un marsupial (p. ej., canguro, wómbat), un roedor (p. ej., una cobaya, un hámster, una rata, un ratón), un múrido (p. ej., un ratón), un lagomorfo (p. ej., un conejo), un ave (p. ej., un pájaro), un cánido (p. ej., un perro), un felino (p. ej., un gato), un equino (p. ej., un caballo), un porcino (p. ej., un cerdo), un óvido (p. ej., una oveja), un bóvido (p. ej., una vaca), un

primate, simio (p. ej., un simio inferior o un simio superior), un simio inferior (p. ej., títí, babuino), un simio superior (p. ej., gorila, chimpancé, orangután, gibón) o un ser humano.

Por otra parte, el sujeto/paciente puede estar en cualquiera de sus formas de desarrollo, por ejemplo, un feto.

En una realización preferida, el sujeto/paciente es un ser humano.

5 Formulaciones

Aunque es posible que un compuesto de TBAP se administre solo, es preferible presentarlo como una formulación farmacéutica (p. ej., composición, preparación, medicamento) que comprenda al menos un compuesto de TBAP, según se describe en la presente, junto con uno o más de otros ingredientes farmacéuticamente aceptables muy conocidos para los expertos en la técnica, incluyendo portadores, diluyentes, excipientes, adyuvantes, cargas, tampones, conservantes, antioxidantes, lubricantes, estabilizantes, solubilizantes, tensioactivos (p. ej., agentes humectantes), agentes enmascarantes, agentes colorantes, agentes aromatizantes y agentes edulcorantes farmacéuticamente aceptables. La formulación puede comprender además otros agentes activos, por ejemplo, otros agentes terapéuticos o profilácticos.

Así, la presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas, según se definen anteriormente, y métodos para elaborar una composición farmacéutica que comprenden mezclar al menos un compuesto de TBAP, según se describe en la presente, junto con uno o más de otros ingredientes farmacéuticamente aceptables muy conocidos por los expertos en la técnica, p. ej., portadores, diluyentes, excipientes, etc. Si se formulan como unidades discretas (p. ej., comprimidos, etc.), cada unidad contiene una cantidad predeterminada (dosificación) del compuesto.

El término “farmacéuticamente aceptable”, según se usa en la presente, trata de compuestos, ingredientes, materiales, composiciones, formas de dosificación, etc., que son, dentro del alcance del juicio médico razonable, adecuados para el uso en contacto con los tejidos del sujeto en cuestión (p. ej., el ser humano) sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación excesivos, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable. Cada portador, diluyente, excipiente, etc. también debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación.

Portadores, diluyentes, excipientes, etc. adecuados se pueden encontrar en textos farmacéuticos estándar, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990; y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5ª edición, 2005.

Las formulaciones se pueden preparar mediante cualesquiera métodos muy conocidos en la técnica de la farmacia. Tales métodos incluyen la etapa de asociar el compuesto con un portador que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan al asociar uniformemente e íntimamente el compuesto con los portadores (p. ej., portadores líquidos, un portador sólido finamente dividido, etc.), y a continuación conformar el producto, si es necesario.

La formulación se puede preparar para proporcionar una liberación rápida o lenta; liberación inmediata, retardada, temporizada o sostenida; o una combinación de las mismas.

Las formulaciones pueden estar adecuadamente en forma de líquidos, soluciones (p. ej., acuosas, no acuosas), suspensiones (p. ej., acuosas, no acuosas), emulsiones (p. ej., aceite en agua, agua en aceite), elixires, jarabes, electuarios, colutorios, gotas, comprimidos (incluyendo, p. ej., comprimidos revestidos), gránulos, polvos, caramelos para chupar, pastillas, cápsulas (incluyendo, p. ej., cápsulas de gelatina duras y blandas), obleas, píldoras, ampollas, bolos, supositorios, pesarios, tinturas, geles, pastas, pomadas, cremas, lociones, aceites, espumas, pulverizaciones, nebulizaciones o aerosoles.

Las formulaciones se pueden proporcionar adecuadamente como un parche, un emplastro adhesivo, un vendaje, un apósito o similar que está impregnado con uno o más compuestos y opcionalmente uno o más de otros ingredientes farmacéuticamente aceptables, incluyendo, por ejemplo, mejoradores de la penetración, la impregnación y la absorción. Las formulaciones también se pueden proporcionar adecuadamente en la forma de un depósito o una reserva.

El compuesto puede estar disuelto en, suspendido en o mezclado con uno o más de otros ingredientes farmacéuticamente aceptables. El compuesto se puede presentar en un liposoma u otro material en forma de micropartículas que está diseñado para dirigir el compuesto, por ejemplo, a componentes de la sangre o uno o más órganos.

Formulaciones adecuadas para la administración oral (p. ej., mediante ingestión) incluyen líquidos, soluciones (p. ej., acuosas, no acuosas), suspensiones (p. ej., acuosas, no acuosas), emulsiones (p. ej., aceite en agua, agua en aceite), elixires, jarabes, electuarios, comprimidos, gránulos, polvos, cápsulas, obleas, píldoras, ampollas, bolos.

- 5 Formulaciones adecuadas para la administración yugal incluyen colutorios, caramelos para chupar, pastillas, así como parches, emplastos adhesivos, depósitos y reservas. Los caramelos para chupar comprenden típicamente el compuesto en una base aromatizada, habitualmente sacarosa y goma arábica o tragacanto. Las pastillas comprende típicamente el compuesto en una matriz inerte, tal como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábica. Los colutorios comprenden típicamente el compuesto en un portador líquido adecuado.
- Formulaciones adecuadas para la administración sublingual incluyen comprimidos, caramelos para chupar, pastillas, cápsulas y píldoras.
- 10 Formulaciones adecuadas para la administración transmucosa oral incluyen líquidos, soluciones (p. ej., acuosas, no acuosas), suspensiones (p. ej., acuosas, no acuosas), emulsiones (p. ej., aceite en agua, agua en aceite), colutorios, caramelos para chupar, pastillas, así como parches, emplastos adhesivos, depósitos y reservas.
- Formulaciones adecuadas para la administración transmucosa no oral incluyen líquidos, soluciones (p. ej., acuosas, no acuosas), suspensiones (p. ej., acuosas, no acuosas), emulsiones (p. ej., aceite en agua, agua en aceite), supositorios, pesarios, geles, pastas, pomadas, cremas, lociones, aceites, así como parches, emplastos adhesivos, depósitos y reservas.
- 15 Formulaciones adecuadas para la administración transdérmica incluyen geles, pastas, pomadas, cremas, lociones y aceites, así como parches, emplastos adhesivos, vendajes, apósitos, depósitos y reservas.
- Los comprimidos se pueden elaborar por medios convencionales, p. ej., compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos en forma comprimida se pueden preparar al comprimir en una máquina adecuada el compuesto en una forma que fluye libremente tal como un polvo o gránulos, opcionalmente
- 20 mezclados con uno o más aglutinantes (p. ej., povidona, gelatina, goma arábica, sorbitol, tragacanto, hidroxipropilmetilcelulosa); cargas o diluyentes (p. ej., lactosa, celulosa microcristalina, hidrogenofosfato cálcico); lubricantes (p. ej., estearato magnésico, talco, sílice); desintegrantes (p. ej., almidón glicolato sódico, povidona reticulada, carboximetilcelulosa sódica reticulada); agentes tensioactivos o dispersantes o humectantes (p. ej., laurilsulfato sódico); conservantes (p. ej., p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, ácido
- 25 sórbico); aromas, agentes mejoradores del aroma y edulcorantes. Los comprimidos moldeados se pueden elaborar al moldear en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Opcionalmente, los comprimidos pueden estar revestidos o ranurados y se pueden formular a fin de proporcionar una liberación lenta o controlada del compuesto de los mismos usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado. Los
- 30 comprimidos se pueden proveer opcionalmente de un revestimiento, por ejemplo, para afectar a la liberación, por ejemplo un revestimiento entérico, para proporcionar liberación en partes del sistema digestivo diferentes al estómago.
- Las pomadas se preparan típicamente a partir del compuesto y una base para pomadas parafínica o miscible con agua.
- 35 Las cremas se preparan típicamente a partir del compuesto y una base para cremas de aceite en agua. Si se desea, la fase acuosa de la base para cremas puede incluir, por ejemplo, al menos aproximadamente 30% p/p de un alcohol polihidroxilado, es decir, un alcohol que tiene dos o más grupos hidroxilo tal como propilenglicol, butano-1,3-diol, manitol, sorbitol, glicerol y polietilenglicol y mezclas de los mismos. Las formulaciones tópicas pueden incluir deseablemente un compuesto que mejore la absorción o la penetración del compuesto a través de la piel u otras
- 40 áreas afectadas. Ejemplos de tales mejoradores de la penetración dérmica incluyen dimetilsulfóxido y análogos relacionados.
- Las emulsiones se preparan típicamente a partir del compuesto y una fase oleosa, que opcionalmente puede comprender simplemente un emulsionante (conocido de otro modo como un emulgente) o puede comprender una mezcla de al menos un emulsionante con una grasa o un aceite o tanto con una grasa como con un aceite.
- 45 Preferiblemente, se incluye un emulsionante hidrófilo junto con un emulsionante lipófilo que actúa como un estabilizante. También se prefiere incluir tanto un aceite como una grasa. Conjuntamente, el emulsionante o los emulsionantes con o sin estabilizante o estabilizantes constituyen la llamada base para pomadas emulsionante, y la cera junto con el aceite y/o la grasa constituyen la llamada base para pomadas emulsionante que forma la fase dispersada oleosa de las formulaciones en crema.
- 50 Emulgentes y estabilizantes de la emulsión adecuados incluyen Tween 60, Span 80, alcohol cetosteárico, alcohol miristílico, monoestearato de glicerilo y laurilsulfato sódico. La elección de aceites o grasas adecuados para la formulación se basa en alcanzar las propiedades cosméticas deseadas, puesto que la solubilidad del compuesto en la mayoría de los aceites con probabilidades de ser usados en formulaciones farmacéuticas en emulsión puede ser muy baja. Así, la crema debe ser preferiblemente un producto no graso, que no manche y lavable con consistencia
- 55 adecuada para evitar la pérdida de los tubos u otros recipientes. Se pueden usar ésteres alquílicos mono- o dibásicos de cadena lineal o ramificada tales como diisoadipato, estearato de isocetilo, diéster propilenglicólico de ácidos grasos de coco, miristato de isopropilo, oleato de decilo, palmitato de isopropilo, estearato de butilo, palmitato de 2-etilhexilo o una combinación de ésteres de cadena ramificada conocida como Crodamol CAP, siendo los tres

últimos ésteres preferidos. Estos se pueden usar solos o en combinación dependiendo de las propiedades requeridas. Alternativamente, se pueden usar lípidos de alto punto de fusión tales como parafina blanda blanca y/o parafina líquida u otros aceites minerales.

5 Formulaciones adecuadas para la administración intranasal, en las que el portador es un líquido, incluyen, por ejemplo, una pulverización nasal, gotas nasales o mediante administración en aerosol mediante un nebulizador, incluyen soluciones acuosas u oleosas del compuesto.

10 Formulaciones adecuadas para la administración intranasal, en las que el portador es un sólido, incluyen, por ejemplo, las presentadas como un polvo grueso que tiene un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 500 micras que se administra del modo en el que se toma el rapé, es decir, mediante inhalación rápida a través de la fosa nasal desde un recipiente del polvo mantenido cerca de la nariz.

Formulaciones adecuadas para la administración pulmonar (p. ej., mediante terapia de inhalación o insuflación) incluyen las presentadas como una pulverización en aerosol desde un envase presurizado, con el uso de un propelente adecuado, tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otros gases adecuados.

15 Formulaciones adecuadas para la administración ocular incluyen gotas oculares en las que el compuesto está disuelto o suspendido en un portador adecuado, especialmente un disolvente acuoso para el compuesto.

20 Formulaciones adecuadas para la administración rectal se pueden presentar como un supositorio con una base adecuada que comprende, por ejemplo, aceites naturales o endurecidos, ceras, grasas, polioles semilíquidos o líquidos, por ejemplo, mantaca de cacao o un salicilato; o como una solución o suspensión para el tratamiento mediante un enema.

Formulaciones adecuadas para la administración vaginal se pueden presentar como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones para pulverización que contienen además del compuesto portadores tales como los que se conocen en la técnica como apropiados.

25 Formulaciones adecuadas para la administración parenteral (p. ej., mediante inyección) incluyen líquidos (p. ej., soluciones, suspensiones) acuosos o no acuosos, isotónicos, libres de pirógenos, estériles, en los que el compuesto está disuelto, suspendido o proporcionado de otro modo (p. ej., en un liposoma u otro material en forma de micropartículas). Tales líquidos pueden contener adicionalmente otros ingredientes farmacéuticamente aceptables, tales como antioxidantes, tampones, conservantes, estabilizantes, bacteriostáticos, agentes de suspensión, agentes espesantes y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre (u otro fluido corporal pertinente) del receptor pretendido. Ejemplos de excipientes incluyen, por ejemplo, agua, alcoholes, polioles, glicerol, aceites vegetales y similares. Ejemplos de portadores isotónicos adecuados para el uso en tales formulaciones incluyen inyección de cloruro sódico, inyección de solución de Ringer o inyección de solución de Ringer con lactato. Típicamente, la concentración del compuesto en el líquido es de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 10 µg/ml, por ejemplo de aproximadamente 10 ng/ml to aproximadamente 1 µg/ml. Las formulaciones se pueden presentar en recipientes sellados de monodosis o de múltiples dosis, por ejemplo, ampollas y viales, y se pueden almacenar en un estado secado por congelación (liofilizado) que sólo requiere la adición del portador líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes del uso. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporánea se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos.

Dosificación

40 Será apreciado por el experto en la técnica que las dosificaciones apropiadas de los compuestos de TBAP y las composiciones que comprenden los compuestos de TBAP pueden variar de paciente a paciente. Determinar la dosificación óptima implicará generalmente el equilibrio del nivel de beneficio terapéutico frente a cualquier riesgo o efectos secundarios perjudiciales. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores incluyendo la actividad del compuesto de TBAP particular, la vía de administración, el momento de la administración, la velocidad de excreción del compuesto de TBAP, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación, la gravedad del trastorno, y la especie, el sexo, la edad, el peso, el estado, la salud general y los antecedentes médicos del paciente. La cantidad de compuesto de TBAP y la vía de administración estarán finalmente a discreción del médico, veterinario o profesional clínico, aunque generalmente la dosificación se seleccionará para alcanzar concentraciones locales en la zona de acción que alcanzan el efecto deseado sin provocar efectos secundarios dañinos o perjudiciales sustanciales.

55 La administración se puede efectuar en una dosis, continuamente o intermitentemente (p. ej., en dosis divididas a intervalos apropiados) a lo largo del curso del tratamiento. Métodos para determinar los medios más eficaces y la dosificación de administración son muy conocidos por los expertos en la técnica y variarán con la formulación usada para la terapia, el propósito de la terapia, la célula o células diana que se traten y el sujeto que se trate. Se pueden llevar a cabo administraciones únicas o múltiples siendo seleccionados el nivel y el patrón de la dosis por el médico, veterinario o profesional clínico responsable.

En general, una dosis adecuada del compuesto de TBAP es en intervalo de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 250 mg (más típicamente de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 25 mg) por kilogramo de peso corporal del sujeto al día. Cuando el compuesto es una sal, un éster, una amida, un profármaco o similares, la cantidad administrada se calcula basándose en el compuesto originario y así el peso real que se va a usar se incrementa proporcionalmente.

Síntesis Química

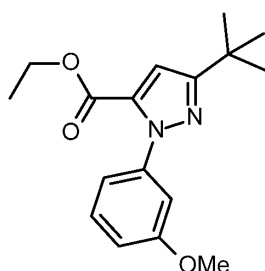
Todas las materias primas, los reactivos y los disolventes para las reacciones eran de calidad para reactivos y se usaron según se adquirieron. Los disolventes de cromatografía eran de calidad para HPLC y se usaron sin purificación adicional. Las reacciones se verificaron mediante análisis por cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés) usando placas de capa fina F-254 de gel de sílice 60 de Merck. La cromatografía en columna de desarrollo rápido se llevó a cabo en gel de sílice 60 de Merck (0.015-0.040 mm) o en columna de gel de sílice desechables Isolute Flash Si y Si II. Los análisis por LCMS se realizaron en un sistema de HPLC Micromass LCT / Alliance 2795 de Water con una columna de 5 µm, C18, 50 mm x 4,6 mm d. i. Discovery de Supelco a una temperatura de 22°C usando el siguiente sistema de disolventes: Disolvente A: Metanol; Disolvente B: ácido fórmico al 0,1% en agua a un caudal de 1 ml/min. Gradiente comenzando con 10% de A / 90% de B (en volumen) de 0 - 0,5 minutos y a continuación 10% de A / 90% de B a 90% de A / 10% de B de 0,5 minutos a 6,5 minutos y continuando a 90% de A / 10% de B hasta 10 minutos. De 10-10.5 minutos el gradiente se volvió hasta 10% de A / 90% de B de donde las concentraciones permanecieron hasta 12 minutos. La detección UV era a 254 nm y la ionización era electropulverización iónica positiva o negativa. El intervalo de exploración del peso molecular es 50-1.000. Las muestras se suministraron como 1 mg/ml en DMSO o metanol con 3 µl inyectados en un relleno parcial del circuito. Los espectros de NMR se registraron en DMSO-d₆ en un espectrómetro de 500 MHz de Bruker Advance.

Parte(I): N-arilación de ésteres de pirazolcarboxilato

Método A: 3-*tert*-butil-1*H*-pirazol-5-carboxilato de etilo (1 equiv.), el ácido borónico deseado (2 equiv.), acetato de cobre (II) (1,5 equiv) y DMF seca se añadieron bajo remoción para dar una solución azul. Se añadió piridina seca (2 equiv.), con lo que el color se volvía verde, seguido por una cucharada de tamices moleculares de 4 Å (0.4 nm) en polvo secados al horno. La mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón hasta la terminación de la reacción, según se verificó por LC-MS. Después de la terminación de la reacción, la mezcla se diluyó con solución de AcOEt y NH₄Cl. La fase orgánica se aisló, se lavó con solución de NH₄Cl, NaHCO₃ ac. sat., se secó (MgSO₄ con resina atrapadora de Cu), se filtró y se evaporó para dar una sustancia oleosa, que en algunos casos se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna.

Síntesis 1

3-*tert*-Butil-1-(3-metoxifenil)-1*H*-pirazol-5-carboxilato de etilo

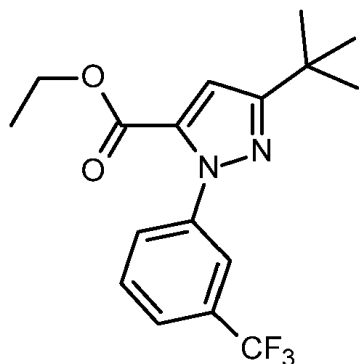


Se usó el Método A con 3-*tert*-butil-1*H*-pirazol-5-carboxilato de etilo (320 mg, 1.631 mmol) y ácido 3-metoxifenilborónico (307 mg, 2.020 mmol). La reacción se terminó después de remover a temperatura ambiente durante 22 horas. Después del tratamiento, el aceite amarillo resultante se disolvió en DCM / hexano y se cargó en una columna SNAP de 50 g, que se eluyó con 2 → 20% (en volumen) de EtOAc en hexano. El compuesto del epígrafe se obtuvo como un aceite incoloro.

Rendimiento: 462 mg (94%, 92% puro). ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ (ppm), J (Hz): 1.17 (t, 3H, ³J_{HH}=7.1, CH₃), 1.30 (s, 9H, *tert*-Bu), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 4.17 (q, 2H, ³J_{HH}=7.1, OCH₂CH₃), 6.98 (m, 4H, HAr), 7.36 (t, 1H, ³J_{HH}=8.1, HAr), LC-MS (2.79 min): *m/z* calc. para C₁₇H₂₂N₂O₃ [M+H]⁺: 303.1; encontrado: 303.2.

Síntesis 2

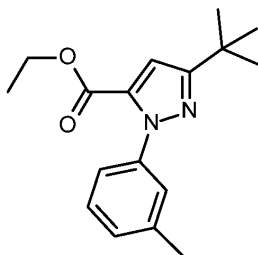
3-*tert*-Butil-1-(3-trifluorometilfenil)-1*H*-pirazol-5-carboxilato de etilo



- 5 El Método A se usó con 3-*tert*-butilpirazol-5-carboxilato de etilo (320 mg, 1.60 mmol), and 3-trifluorometilfenilborónico (307 mg, 1.60 mmol). Después de 20 horas, la mezcla de reacción se diluyó con AcOEt (20 ml), se lavó con 2 x 20 ml de agua, NaHCO₃ (20 ml, conc.) y finalmente con 20 ml de salmuera. La capa orgánica se secó (MgSO₄) y se evaporó hasta sequedad para dar un aceite (417 mg). El compuesto se usó para la etapa de hidrólisis posterior sin purificación adicional.

Síntesis 3

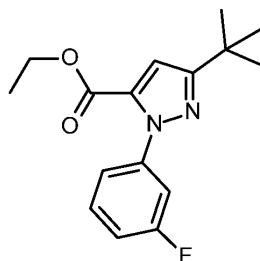
3-*tert*-Butil-1-(3-metilfenil)-1*H*-pirazol-5-carboxilato de etilo



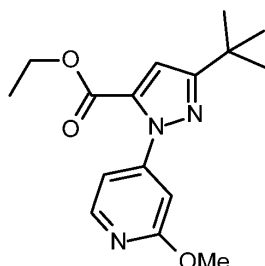
- 10 Se usó el Método A con 3-*tert*-butilpirazol-5-carboxilato de etilo (320 mg, 1.60 mmol) y ácido 3-metilfenilborónico (218 mg, 1.60 mmol). Después de 20 horas, la mezcla de reacción se diluyó con AcOEt (20 ml), se lavó con 2 x 20 ml de agua, NaHCO₃ (20 ml; conc.) y finalmente con 20 ml de salmuera. La capa orgánica se secó (MgSO₄) y se evaporó hasta sequedad para dar un aceite (466 mg). El compuesto se usó en la etapa de hidrólisis posterior sin purificación adicional.

Síntesis 4

3-*tert*-Butil-1-(3-fluorofenil)-1*H*-pirazol-5-carboxilato de etilo



- 20 Se usó el Método A con 3-*tert*-butilpirazol-5-carboxilato de etilo (320 mg, 1.60 mmol) y ácido 3-fluorofenilborónico (224 mg, 1.60 mmol). Después de 20 horas, la mezcla de reacción se diluyó con AcOEt (20 ml), se lavó con 2 x 20 ml de agua, NaHCO₃ (20 ml; conc.) y finalmente con 20 ml de salmuera. La capa orgánica se secó (MgSO₄) y se evaporó hasta sequedad para dar un aceite (463 mg). El compuesto se usó en la etapa de hidrólisis posterior sin purificación adicional.

Síntesis 53-*tert*-Butil-1-(2-metoxipiridin-4-yl)-1*H*-pirazol-5-carboxilato de etilo

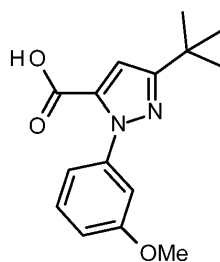
5 Se usó el Método A con 3-*tert*-butilpirazol-5-carboxilato de etilo (202 mg, 1.03 mmol) y ácido 2-metoxipiridin-4-ilborónico (208 mg, 1.360 mmol). La purificación con 2 → 50% (en volumen) EtOAc en hexano dio el compuesto del epígrafe como un aceite incoloro.

Rendimiento: 243 mg (59%). ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ (ppm), J (Hz): 1.22 (t, 3H, ³J_{HH}=7.1, CH₃), 1.29 (s, 9H, *tert*-Bu), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 4.23 (q, 2H, ³J_{HH}=7.1, OCH₂CH₃), 6.94 (d, 1H, ³J_{HH}=1.7, HPir), 7.07 (s, 1H, HAr), 7.13 (dd, 1H, ³J_{HH}=5.6, 1.7, HPir), 8.23 (d, 1H, ³J_{HH}=5.6, HPir). LC-MS (2.83 min): *m/z* calc. para C₁₆H₂₁N₃O₃ [M+H]⁺: 304.1; encontrado: 303.1.

Parte(II): Hidrólisis del éster etílico

15 Método B. El 3-*tert*-butil-1*H*-pirazol-5-carboxilato de etilo sustituido en 1 apropiado (1 equiv.) se disolvió en una mezcla 4 : 1 : 1 de THF / MeOH / H₂O, se añadió monohidrato de hidróxido de litio (1.1 equiv.) y la mezcla incolora se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. Las materias volátiles se evaporaron posteriormente, y el sólido resultante se redisolvió en H₂O y el pH de la solución se ajustó hasta 1 con HCl acuoso al 10%. La mezcla lechosa resultante se extrajo con EtOAc dos veces y la fracción orgánica combinada se lavó con salmuera, se secó y se concentró hasta sequedad para dar un sólido cristalino blanco.

20 Método C. El 3-*tert*-butilpirazol-5-carboxilato de etilo sustituido en 1 apropiado (1 equiv.) se sometió a reflujo durante 30 minutos en 10 ml de EtOH y 3 ml de solución de NaOH (2 M). Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se neutralizó hasta pH 4.0 (AcOH), se diluyó con 20 ml de agua y se extrajo con AcOEt. La capa orgánica se lavó con 2 x 20 ml de agua, se secó (MgSO₄) y se evaporó hasta sequedad y el residuo así obtenido se purificó usando un sistema Biotage Isolera.

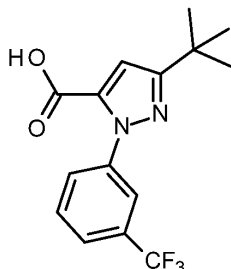
Síntesis 6Ácido 3-*tert*-butil-1-(3-metoxifenil)-1*H*-pirazol-5-carboxílico

25 Usar el Método B, 3-*tert*-butil-1-(4-metoxifenil)-1*H*-pirazol-5-carboxilato de etilo (442 mg, 1.345 mmol) dio el compuesto del epígrafe como cristales blancos.

30 Rendimiento: 300 mg (81%). ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ (ppm), J (Hz): 1.29 (s, 9H, *tert*-Bu), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 6.90 (s, 1H, HAr), 6.97 (m, 4H, HAr), 7.35 (t, 1H, ³J_{HH}=8.1, HAr), 13.14 (s, 1H, COOH). LC-MS (2.51 min): *m/z* calc. para C₁₅H₁₈N₂O₃ [M+H]⁺: 275.1; encontrado: 275.0.

Síntesis 7

Ácido 3-*tert*-butil-1-(3-trifluorometilfenil)-1*H*-pirazol-5-carboxílico

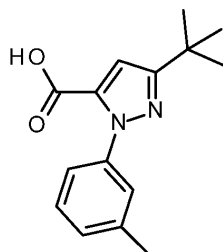


- 5 Usando el Método C con 3-*tert*-butil-1-(3-trifluorometilfenil)-1*H*-pirazol-5-carboxilato de etilo en bruto (471 mg), se obtuvo un producto sólido que se sometió a purificación adicional usando un sistema Biotage Isolera y una mezcla de ciclohexano:EtOAc 1:1 como eluyente (modo isocrático) y dio el compuesto del epígrafe.

Rendimiento: 133 mg (26.6% a lo largo de 2 etapas). ^1H NMR (DMSO), δ_{H} (ppm), J (Hz): 1.31 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 6.99 (s, 1H, H Pir), 7.70 (t, 1H, H_5 Arom., $J=7.7\text{Hz}$), 7.76-7.82 (m, 3H, H_{2+4+6} Arom.), 13.32 (s, 1H, CO_2H Pir.). Masa ex.: ($\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2$) calc. 313.1157, encontrada 313.1155.

10 Síntesis 8

Ácido 3-*tert*-butil-1-(3-metilfenil)-1*H*-pirazol-5-carboxílico

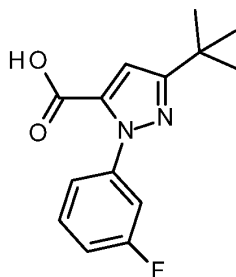


- 15 Usando el Método C con 3-*tert*-butil-1-(3-metilfenil)-1*H*-pirazol-5-carboxilato de etilo en bruto (460 mg), se obtuvo el compuesto del epígrafe después de la purificación usando un sistema Biotage Isolera y una mezcla 1:1 de ciclohexano:EtOAc como eluyente (modo isocrático).

Rendimiento: 101 mg (24% a lo largo de 2 etapas). ^1H NMR (DMSO), δ_{H} (ppm), J (Hz): 1.29 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 2.35 (s, 3H, 3- CH_3), 6.89 (s, 1H, Pir-H), 7.18 (d, 1H, H_2 Arom., $J=7.2\text{Hz}$), 7.20-7.24 (m, 2H, H_{4+6} Arom.), 7.32 (t, 1H, H_5 Arom. $J=7.3\text{Hz}$), 13.09 (s, 1H, CO_2H Pir.). Masa ex.: ($\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$) calc. 258.1368, encontrada 258.1373.

Síntesis 9

- 20 Ácido 3-*tert*-butil-1-(3-fluorofenil)-1*H*-pirazol-5-carboxílico

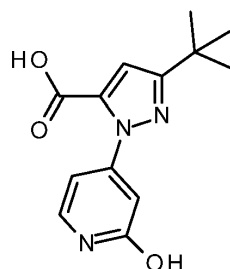


Usando el Método C con 3-*tert*-butil-1-(3-fluorofenil)-1*H*-pirazol-5-carboxilato de etilo en bruto (463 mg), se obtuvo el compuesto del epígrafe. Véase, p. ej., Springer y cols., 2011.

- 25 Rendimiento 166 mg (39.6% a lo largo de 2 etapas). ^1H NMR (DMSO), δ_{H} (ppm), J (Hz): 1.29 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 6.95 (s, 1H, Pir-H), 7.23-7.30 (m, 2H, Arom- H_{4+5}), 7.35 (d, 1H, H_2 Arom., $J=9.8\text{Hz}$), 7.44-7.53 (m, 1H, H_6 Arom.), 13.24 (s, 1H, CO_2H Pir.). Masa ex.: ($\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{FN}_2\text{O}_2$) calc. 262.1118, encontrada 262.1117.

Síntesis 10

Hidrocloreto de ácido 3-*tert*-butil-1-(2-oxo-1,2-dihidropiridin-4-yl)-1*H*-pirazol-5-carboxílico



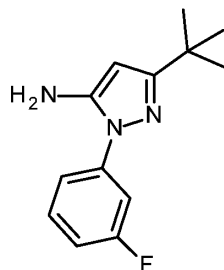
5 Método D: Se disolvió 3-*tert*-butil-1-(2-metoxipiridin-4-yl)-1*H*-pirazol-5-carboxilato de etilo (110 mg, 0.363 mmol) en HCl 6 M en H₂O (4.5 ml, 27.00 mmol) y la solución incolora se calentó hasta 90°C durante 48 h. Todas las materias volátiles se evaporaron posteriormente y el aceite incoloro resultante se coevaporó con DCM (10 ml) y a continuación con Et₂O (10 ml), lo que dio el compuesto del epígrafe como un sólido blanco.

10 Rendimiento: 93 mg (98%). ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ (ppm), J (Hz): 1.28 (s, 9H, *tert*-Bu), 6.32 (d, 1H, *J*=1.9, *H*Ar), 6.37 (dd, 1H, *J*=7.1, 1.9, *H*Ar), 6.99 (s, 1H, *H*Ar), 7.46 (d, 1H, *J*=7.1, *H*Ar). LC-MS (2.14 min): *m/z* calc. para C₁₃H₁₆N₃O₃ [M-Cl]⁺: 262.1; encontrado: 262.0;

Parte(III): Formación de 5-aminopirazoles

Síntesis 11

3-(*tert*-Butil)-1-(3-fluorofenil)-1*H*-pirazol-5-amina



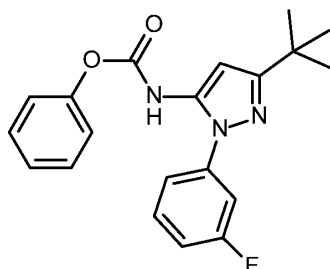
15 Método E: Una mezcla de 4,4-dimetil-3-oxopentanitrilo (77 g, 0.62 mol) e hidrocloreto de 3-fluorofenilhidracina (100 g, 0.62 mol) se añadió a tolueno (1 l) y se calentó hasta 100°C durante 24 horas, punto después del cual se dejó que la reacción se enfriara hasta 20°C. La mezcla se filtró, se lavó con tolueno (2 x 250 ml) se secó. La sal de HCl en bruto se combinó con una partida previa (realizada usando 180 g de hidrocloreto de 3-fluorofenilhidracina y 234 g de hidrocloreto de 3-fluorofenilhidracina) y se repartió entre DCM (4 l) y NaHCO₃ ac. sat. (4 l). La mezcla se agitó hasta que no quedaba sólido. La capa de DCM se separó, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró a vacío para proporcionar el compuesto del epígrafe como un sólido naranja (210g) con 52% de rendimiento. Pureza >95% (sobre una base molar) mediante NMR y 94.4% (sobre una base molar) mediante LCMS.

20

Parte(IV): Formación de carbamatos de 5-aminopirazol

Síntesis 12

25 N-[3-*tert*-Butil-1-(3-fluorofenil)-1*H*-pirazol-5-il]carbamato de fenilo

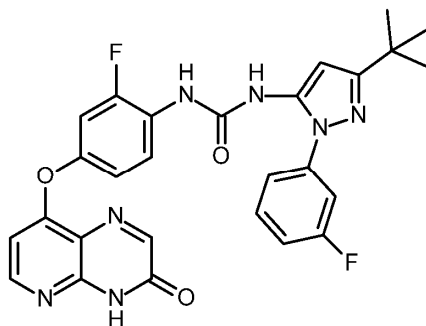


Método F: Se disolvió 3-(*terc*-butil)-1-(3-fluorofenil)-1H-pirazol-5-amina (210 g, 0.90 mol) en THF (5 l) a 0°C antes de la adición de piridina (146 ml, 1.80 mol). Se cargó cloroformiato de fenilo (113 ml, 0.90 mol) en THF (300 ml) gota a gota a 0-5°C a lo largo de 30 minutos. La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 30 minutos y a continuación se dejó calentar hasta temperatura ambiente. Después de 4 horas, la HPLC mostró que quedaba 8% del estadio 1. Se añadió una carga adicional de cloroformiato de fenilo (11 ml, 0.088 mol) y, después de 30 minutos, el análisis de HPLC indicó que la reacción había terminado. Se cargó EtOAc (5 l) y la capa orgánica se lavó con HCl 1 M (2 x 1.2 l), agua (1.2 l), NaHCO₃ ac. sat. (1.2 l) y salmuera sat. (1.2 l). La capa orgánica se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró a vacío. El aceite en bruto se recogió en una mezcla 1 : 3 de EtOAc / heptano y se concentró a vacío para dar un sólido. El sólido se suspendió en heptano (2.5 l) durante 1 hora, se filtró y se lavó con heptano (200 ml). El material se secó a 40°C durante la noche para dar el compuesto del epígrafe (286 g) con 90% de rendimiento. Pureza >95% por NMR.

Parte(V): Acoplamiento de fragmentos de arilpirazol y 4-aminofenoxi-piridopiracinona con formación de un conector de urea

Síntesis 13

15 1-[3-*terc*-butil-1-[(3-fluoro-fenil)-1H-pirazol-5-il]3-[2-fluoro-4(3-oxo-3,4-dihidropirido[2,3-b]piracin-8-iloxi)fenil]urea (TBAP-001)



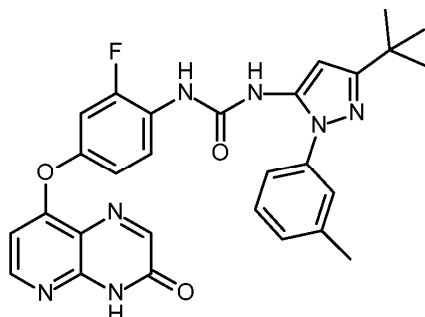
Método G: Se disolvieron 81 mg (0.31 mmol) de ácido 3-*terc*-butil-1-(3-fluorofenil)-pirazol-5-carboxílico en 2 ml de DMF en un tubo Carousel bajo remoción y atmósfera inerte. A continuación, se añadieron 0.044 ml (0.32 mmol) de trietilamina y 0.067 ml (0.032 mmol) de DPPA y la remoción continuó durante 30 minutos a 0°C y durante 1 hora adicional a temperatura ambiente. Se añadió de una vez a esta mezcla de reacción la 4-(3-fluoro-4-aminofenil)-piridino-[2.3-b]-piracin-2-ona (40 mg, 0.15 mmol) (véase, p. ej., Zambon y cols., 2010) y el tubo con la mezcla de reacción se calentó a 100°C durante 30 minutos, bajo remoción y una atmósfera de argón. Después de enfriar a temperatura ambiente, la solución se diluyó con 10 ml de AcOEt. La capa orgánica se lavó con 2 x 10 ml de salmuera, se secó (MgSO₄) y se evaporó hasta sequedad. El residuo así obtenido se trituró con Et₂O y se filtró para dar el compuesto del epígrafe como un sólido amorfo pardo claro.

Rendimiento: 66 mg (83.0%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.29 (s, 9H, t-Bu), 6.41 (s, 1H, H_{Pirazol}), 6.64 (d, 1H, H_{Pir}, J=5.6Hz), 7.02-7.07 (m, 1H, H_{Arom central}), 7.22-7.30 (m, 2H, H_{Arom pirazol}), 7.40-7.44 (m, 2H, H_{Arom central}+ H_{Arom pirazol}), 7.53-7.60 (m, 1H, H_{Arom pirazol}), 8.14 (t, 1H, H_{Arom central}, J=9.1Hz), 8.17 (s, 1H, H_{Piracinona}), 8.36 (d, 1H, H_{Pir}, J=5.6 Hz), 8.87 (s, 1H, NH_{urea}), 8.98 (s, 1H, NH_{urea}), 12.90 (s, 1H, NH). LC-MS, t_R = 2.61 min, m/z: 531.2 (M)⁺, calc. para C₂₇H₂₃F₂N₇O₃. HRMS: (M)⁺ calc. para C₂₇H₂₃F₂N₇O₃, 531.1830, encontrado: 531.1832.

Método H: Se cargaron N-[3-*terc*-butil-1-(3-fluorofenil)-1H-pirazol-5-il]carbamato de fenilo (220 g, 0.623 mol) y DMSO (1.7 l) a 4-(3-fluoro-4-aminofenil)-piridino-[2.3-b]-piracin-2-ona (169.5 g, 0.623 mol). La mezcla de reacción se agitó a 20-22°C durante la noche. La ¹H NMR indicó que la reacción había terminado. La reacción se desactivó en agua (8.6 l) y se agitó durante 1 hora antes de filtrarse y lavarse con agua (2 x 2 l). El material se secó a 60°C a lo largo del fin de semana. El sólido se suspendió en EtOAc (3.39 l) durante 1 hora, se filtró y se lavó con EtOAc (750 ml) para dar 320 g del compuesto del epígrafe. La NMR indicó que todavía había fenol presente. El material se resuspendió en EtOAc (3.2 l) durante 1 hora, se filtró y se lavó con EtOAc (500 ml) y se secó para proporcionar 293 g del compuesto del epígrafe (9% en peso de EtOAc) por NMR, una sola impureza 0.8% en peso). El sólido se recristalizó en THF (5.7 l) y heptano (2.85 l), dejando que la partida se enfriara hasta temperatura ambiente antes de separar los sólidos por filtración. La torta filtrante se lavó con heptano (2.85 l) y se secó a 45°C durante la noche para dar 221 g del compuesto del epígrafe. El análisis por HPLC mostró que la impureza previa en 0.8% (en peso) se reducía hasta 0.23% (en peso); sin embargo, la impureza de urea se enriquecía hasta 0.58% (en peso). La ¹H NMR mostró 5% de heptano (en peso). El material se secó a 110°C durante 12 horas para llevar el nivel de heptano hasta < 0.5% (en peso) por NMR, dando un total de 211 g del compuesto del epígrafe como un sólido cristalino blanco con un rendimiento de 64%. Pureza por HPLC 98.8% (en peso), una sola impureza 0.58% (en peso).

Síntesis 14

1-[3-*tert*-Butil-1-[(3-metil-fenil)-1H-pirazol-5-il]3-[2-fluoro-4(3-oxo-3,4-dihidropirido[2,3-b]piracin-8-iloxi)fenil]urea (TBAP-002)

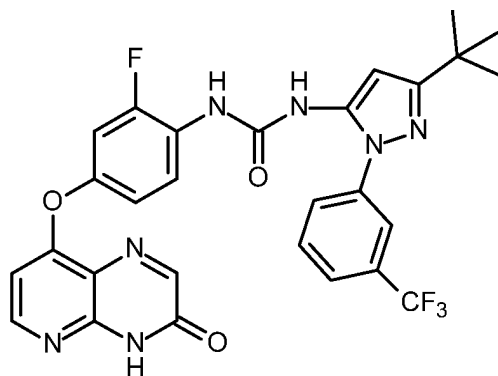


- 5 Usando el Método G, con ácido 3-*tert*-butil-1-(3-metilfenil)-1H-pirazol-5-carboxílico (80 mg, 0.31 mmol) y 4-(3-fluoro-4-aminofenil)-piridino-[2,3-b]-piracin-2-ona (40 mg, 0.15 mmol), se obtuvo el compuesto del epígrafe como un sólido blancuzco.

Rendimiento: 69 mg (87.4%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.28 (s, 9H, t-Bu), 2.40 (s, 3H, 3-CH₃), 6.39 (s, 1H, H_{Pirazol}), 6.64 (d, 1H, H_{Pir}, J=5.6Hz), 7.02-7.06 (m, 1H, H_{Arom central}), 7.22-7.36 (m, 4H, 3 H_{Arom pirazol} + 1H_{Arom central}), 7.43 (t, 1H, H_{Arom pirazol}, J=7.7Hz), 8.16 (t, 1H, H_{Arom central}, J=9.1Hz), 8.17 (s, 1H, H_{piracinona}), 8.36 (d, 1H, H_{pir}, J=5.6 Hz), 8.81 (s, 1H, NH_{urea}), 8.98 (s, 1H, NH_{urea}), 12.90 (s, 1H, NH), LC-MS, t_R = 2.65 min, m/z: 527.2 (M)⁺, calc. para C₂₈H₂₆FN₇O₃, HRMS: (M+H)⁺ calc. para C₂₈H₂₆FN₇O₃, 527.2081, encontrado: 527.2088.

Síntesis 15

- 15 1-[3-*tert*-Butil-1-[(3-trifluorometil-fenil)-1H-pirazol-5-il]3-[2-fluoro-4(3-oxo-3,4-dihidropirido[2,3-b]piracin-8-iloxi)fenil]urea (TBAP-003)

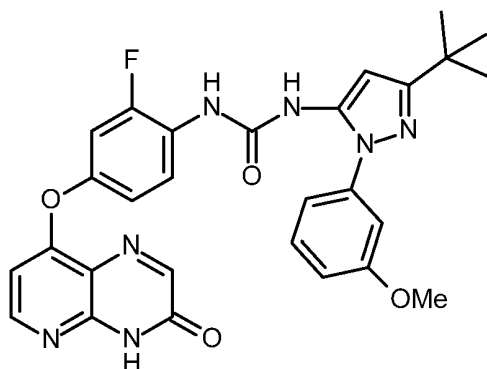


Usando el Método G, con ácido 3-*tert*-butil-1-(3-trifluorometilfenil)-1H-pirazol-5-carboxílico (97 mg, 0.31 mmol) y 4-(3-fluoro-4-aminofenil)-piridino-[2,3-b]-piracin-2-ona (40 mg, 0.15 mmol), se obtuvo el compuesto del epígrafe como un sólido blancuzco.

- 20 Rendimiento: 70 mg (80.4%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.30 (s, 9H, t-Bu), 6.42 (s, 1H, H_{Pirazol}), 6.64 (d, 1H, H_{Pir}, J=5.6Hz), 7.02-7.06 (m, 1H, H_{Arom central}), 7.27-7.36 (m, 1H, H_{Arom central}), 7.74-7.80 (m, 2H, H_{Arom pirazol}), 7.86-7.90 (m, 2H, H_{Arom pirazol}), 8.05 (t, 1H, H_{Arom central}, J=9.1Hz), 8.17 (s, 1H, H_{piracinona}), 8.36 (d, 1H, H_{pir}, J=5.6 Hz), 8.87 (s, 1H, NH_{urea}), 8.93 (s, 1H, NH_{urea}), 12.90 (s, 1H, NH), LC-MS, t_R = 2.71 min, m/z: 581.2 (M)⁺, calc. para C₂₈H₂₃F₄N₇O₃, HRMS: (M+H)⁺ calc. para C₂₈H₂₃F₄N₇O₃, 581.1798, encontrado: 581.1796.

Síntesis 16

1-(3-*tert*-butil-1-(3-metoxifenil)-1H-pirazol-5-il)-3-(2-fluoro-4-(3-oxo-3,4-dihidropirido[3,2-b]piracin-8-iloxi)fenil)urea (TBAP-004)

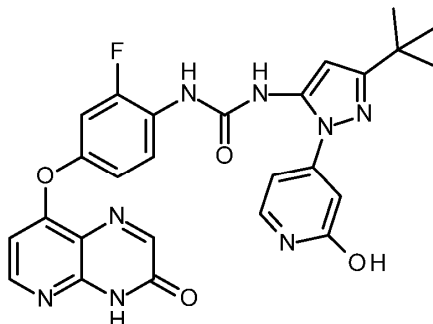


Usando el Método G con ácido 3-*tert*-butil-1-(3-metoxifenil)-1*H*-pirazol-5-carboxílico (60 mg, 0.22 mmol) y 8-(4-amino-3-fluorofenoxi)-pirido[2,3-*b*]piracin-3(4*H*)-ona (31.6 mg, 0.12 mmol), el compuesto del epígrafe se obtuvo como un sólido amarillo claro.

- 5 Rendimiento: 50 mg (84%). $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6), δ (ppm), J (Hz): 1.29 (s, 9H, *tert*-Bu), 3.83 (s, 3H, OCH_3), 6.41 (s, 1H, *HPir*), 6.66 (d, $^3J_{\text{HH}}=5.7$, 1H, *HPir*), 7.01-7.12 (m, 4H, *HAr*), 7.31 (m, 1H, *HAr*), 7.46 (t, $^3J_{\text{HH}}=8.1$, 1H, *HAr*), 8.18 (m, 2H, *HAr*), 8.38 (d, $^3J_{\text{HH}}=5.7$, 1H, *HPir*), 8.85 (s an, 1H, *NH*), 9.03 (s an, 1H, *NH*), 12.92 (s an, 1H, *NH*); $^{19}\text{F-NMR}$ (DMSO- d_6), δ (ppm): -124.8. LC-MS (2.59 min): m/z calc. para $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{FN}_7\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 544.1; encontrado: 544.1. HRMS (3.19 min): m/z calc. para $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{FN}_7\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 544.21031; encontrado: 544.21029.

10 Síntesis 17

1-(3-*tert*-Butil-1-(2-oxo-1,2-dihidropiridin-4-il)-1*H*-pirazol-5-yl)-3-(2-fluoro-4-(3-oxo-3,4-dihidropirido[3,2-*b*]piracin-8-iloxi)fenil)urea (TBAP-005)



- 15 Usando el Método G con hidrocloreto de ácido 3-*tert*-butil-1-(2-oxo-1,2-dihidropiridin-4-il)-1*H*-pirazol-5-carboxílico (70.8 mg, 0.238 mmol) y 8-(4-amino-3-fluorofenoxi)-pirido[2,3-*b*]piracin-3(4*H*)-ona (32.4 mg, 0.119 mmol), se obtuvo un sólido que se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyendo con 5 \rightarrow 30% (en volumen) de MeOH en DCM, para dar el compuesto del epígrafe como un sólido blanco.

- 20 Rendimiento: 15 mg (24%), $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6), δ (ppm), J (Hz): 1.28 (s, 9H, *tert*-Bu), 6.43 (s, 1H, *HPir*), 6.50 (d, $^3J_{\text{HH}}=2.2$, 1H, *HAr*), 6.58 (dd, $^3J_{\text{HH}}=7.2$, 2.2, 1H, *HAr*), 6.66 (d, $^3J_{\text{HH}}=5.6$, 1H, *HPir*), 7.06 (m, 1H, *HAr*), 7.32 (m, 1H, *HAr*), 7.50 (d, $^3J_{\text{HH}}=7.2$, 1H, *HAr*), 8.13 (m, 1H, *HAr*), 8.18 (m, 1H, *HAr*), 8.37 (d, $^3J_{\text{HH}}=5.6$, 1H, *HPir*), 9.05 (s an, 1H, *NH*), 9.13 (s, 1H, *NH*), 11.66 (s an, 1H, *NH*), 12.90 (s an, 1H, *NH*). LC-MS (2.36 min): m/z calc. para $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{FN}_8\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 531.1; encontrado: 531.2. HRMS (2.97 min): m/z calc. para $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{FN}_8\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 531.18991; encontrado: 531.18952.

Métodos y Datos Biológicos

25 Ensayo de cinasa DELFIA

Los compuestos se evaluaron en un ensayo de cinasa realizado según el siguiente protocolo.

Preparación de $^{\text{V600E}}$ BRAF:

- 30 Se generó $^{\text{V600E}}$ BRAF mediante la infección de células de insecto SF9 cultivadas en medio SF-900 II (Invitrogen, Paisley, Escocia) con un baculovirus que contenía BRAF humana de longitud completa con una cola de histidina N-terminal y se purificó mediante cromatografía de afinidad de níquel-agarosa.

Preparación de GST-MEK:

ES 2 740 325 T3

La proteína MEK1 de conejo de longitud completa se expresó con una cola de GST en el extremo N y una cola de histidina C-terminal en bacterias Escherichia coli JM109 y se purificó mediante cromatografía de afinidad de níquel-agarosa.

Purificación de ^{V600E}BRAF y GST-MEK:

5 *Procedimiento:*

1. Sométanse las células a lisis en tampón de resuspensión (1 ml por 10 ml de cultivo de SF9 o cultivo de JM109 para BRAF o MEK, respectivamente), sométanse a ultrasonidos durante 1-2 minutos y centrifúguense a 14.000 rpm (en tubos de 2 ml) durante 10 minutos.

2. Tómense 1.5 ml de 'cuentas' de níquel-agarosa por 10 ml de lisado y añádanse a la columna (Bio-rad).

10 3. Lávese la columna con tampón de resuspensión 3 veces.

4. Añádase el lisado a la columna.

5. Lávese 3 veces con 10 ml de tampón de lavado.

6. Añádanse 10 ml de tampón de elución a las cuentas y recójense en tubos de 2 ml.

15 7. Compruébese la concentración de proteína de las eluciones y dialícese durante la noche a 4°C en tampón de diálisis.

Tampones:

Tabla 3			
Solución	Tampón de Resuspensión (100 ml)	Tampón de Lavado (100 ml)	Tampón de Elución (30 ml)
Tris 1 M pH 8.0	50 mM - 5 ml	50 mM - 5 ml	50 mM - 1.5 ml
NaCl 5 M	100 mM - 2 ml	100 mM - 2 ml	100 mM - 600 µl
MgCl ₂ 1 M	0,5 mM - 50 µl	-	-
Triton X100	10% - 1 ml	10% - 1 ml	10% - 300 µl
Benzamidina 1 M	1 mM - 100 µl	1 mM - 100 µl	1 mM - 30 µl
Aprotinina (5 mg/ml)	5 µg/ml - 100 µl	5 µg/ml - 100 µl	5 µg/ml - 30 µl
Leupeptina (5 mg/ml)	10 µg/ml - 200 µl	10 µg/ml - 200 µl	10 µg/ml - 60 µl
PMSF 1 M	1 mM - 100 µl	1 mM - 100 µl	1 mM - 30 µl
Imidazol	-	-	150 mM - 2.25 ml
β-Mercaptoetanol	-	-	1% - 300 µl

ES 2 740 325 T3

Tampón de Diálisis (mezclado y almacenado en una habitación fría):

Tabla 4	
Solución	Volumen
Tris 1 M pH 7.5	20 ml
EDTA 0.5 M pH 8.0	2 ml
Triton X100	1 ml
Agua	Hasta 0.5 l
Glicerol	Hasta 1 l
β -Mercaptoetanol	3 ml (antes del uso)

Tampón de Cinasa DELFIA (DKB):

Tabla 5			
Reactivo	Concentración de Reserva	Volumen por ml (μ l)	Volumen por placa de 10 ml (μ l)
MOPS 20 mM pH 7.2	0.2 M	100	1000
EGTA 0.5 M pH 8.0	0.5 M	10	100
MgCl ₂ 10 mM	1 M	10	100
β -mercaptoetanol al 0.1%	-	1	10
β -glicerofosfato 25 mM	0.5 M	50	500
Agua	100%	829	8290

MOPS = Ácido 3-[N-morfolino]propanosulfónico (Sigma M3183).

EGTA = Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético (Sigma E3889).

5 *DKB1 (DKB con proteína BRAF y MEK):*

Combinense 4950 μ l de DKB y 50 μ l de solución de reserva de 2.5 mg/ml de GST-MEK obtenida como se describe anteriormente (para dar 1 mg de MEK por 40 μ l). A continuación, añádanse 22.5 μ l de solución de reserva de BRAF obtenida como se describe anteriormente para dar ~0.2 μ l de BRAF por 40 μ l.

DKB2 (DKB con proteína MEK):

- 10 Combinense 4950 μ l de DKB y 50 μ l de solución de reserva de 2.5 mg/ml de GST-MEK (para dar 1 mg de MEK por 40 μ l). Úsen 500 μ l de esta para la extinción ("blow out" (BO)) y el control del vector vacío (EV, por sus siglas en inglés).

ATP:

- 15 Dilúyase solución de reserva de ATP 100 mM en agua destilada hasta 500 μ M para dar una concentración final de 100 μ M en el ensayo.

Inhibidores (Compuestos de Prueba):

Dilúyase solución de reserva 100 mM hasta 10, 3, 1, 0.3, 0.1, 0.03, 0.01, 0.003, 0.001, 0.0003 y 0.0001 mM en DMSO en una placa para fármacos, dando como resultado concentraciones de 100, 30, 10, 3, 1, 0.3, 0.1, 0.03, 0.01, 0.003 y 0.001 μ M en el ensayo.

ES 2 740 325 T3

Anticuerpo primario:

Fosfo-MEK1/2 CST N° 9121S diluido 1:1000 en tampón de ensayo (AB, por sus siglas en inglés) DELFIA. Preincúbase el anticuerpo en el AB durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de usar.

Anticuerpo secundario:

- 5 Anticuerpo secundario marcado con europio contra globulinas de conejo Perkin Elmer N° AD0105 diluido 1:1000 en tampón de ensayo (AB) DELFIA. Preincúbase el anticuerpo en el AB durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de usar. (Los anticuerpos primario y secundario se incubaron conjuntamente.)

Tween:

0.1% de Tween 20 en agua.

10 *Tampón de Ensayo:*

Tampón de ensayo DELFIA Perkin Elmer N° 4002-0010.

Solución de Mejora:

Solución de mejora DELFIA Perkin Elmer N° 4001-0010.

Placas de Ensayo:

- 15 Placa negra revestida con glutatona de 96 pocillos Perbio N° 15340.

Procedimiento:

1. Prebloquéense los pocillos con 5% de leche en TBS durante 1 hora.
2. Lávense los pocillos 3 veces con 200 µl de TBS.
3. Siémbrense 40 µl de DKB1 para todos los inhibidores (compuestos de prueba), control de DMSO y opcionalmente otros compuestos de control.
4. Siémbrense 40 µl de DKB2 para pocillos de BO y EV.
5. Añádanse los inhibidores (compuestos de prueba) en 0,5 µl por pocillo según la disposición deseada de la placa.
6. Añádanse 0.5 µl de DMSO a los pocillos de control con vehículo.
7. Añádanse 2 µl de BRAF a pocillos de BO y EV.
8. Preincúbase con los compuestos de prueba durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación.
9. Añádanse 10 µl de solución de reserva de ATP 500 µM, en DKB, para dar una concentración de ensayo de 100 µM.
10. Séllense las placas con TopSeal e incúbase a temperatura ambiente con agitación durante 45 minutos.
11. Lávense las placas 3 veces con 200 µl de Tween20 al 0.1%/agua para terminar la reacción.
12. Añádanse 50 µl por pocillo de mezcla de anticuerpos e incúbase durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación.
13. Lávense las placas 3 veces con 200 µl de Tween20 al 0.1%/agua.
14. Añádanse 100 µl de solución de mejora DELFIA por pocillo, cúbrase con papel de aluminio e incúbase a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación.
15. Léase en un lector de placas Victor (Perkin-Elmer, Turku, Finlandia) usando el protocolo del europio.

Los valores para muestra sin analito (Vector vacío) se sustraen de todos los valores. Los controles de DMSO se fijan como 100% de actividad y los puntos de ensayo (la respuesta) se calculan como un porcentaje del control de DMSO. Los datos se representan usando el programa Graphpad Prism y se calcula una línea de regresión no lineal usando una ecuación de respuesta a la dosis sigmoidea de pendiente variable:

40
$$Y = \text{Inferior} + [\text{Superior} - \text{Inferior}] / [1 + 10^{-(\text{LogEC50} - X) * \text{Ladera}}]$$

donde X es el logaritmo de la concentración e Y es la respuesta. La IC₅₀ generada por este procedimiento es la concentración del fármaco que produce un valor del porcentaje de control de fluorescencia a medio camino entre la saturación y la meseta de efecto cero. Habitualmente se realizan tres ensayos independientes y se presenta la IC₅₀ media.

5 Los datos se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 6	
Datos de Ensayo de Cinasa BRAF V600E	
Compuesto	IC ₅₀ (μM)
TBAP-01	0.062
TBAP-02	0.099
TBAP-03	0.13
TBAP-04	0.047
TBAP-05	0.39

Ensayo de Fosfo-ERK Basado en Células (Células BRAF WM266.4 mutantes)

Los compuestos se ensayaron usando un ensayo basado en células que se realizó según el siguiente protocolo.

Día 0:

Siémbrense 16.000 células BRAF WM266.4 mutantes/pocillo en 99 μl de medio en una placa de 96 pocillos.

10 *Día 1:*

1. Añádase 1 μl de compuesto de prueba a las células (1 μl de solución total).
2. Incúbense las células con el compuesto de prueba durante 6 horas a 37°C.
3. Aspírese la solución de todos los pocillos.
4. Fíjense las células con 100 μl de formaldehído al 4%/Triton X-100 al 0.25% en PBS por pocillo.

15

5. Incúbese la placa durante 1 hora a 4°C.
6. Aspírese la solución de fijación y añádanse 300 μl de TBS por pocillo.
7. Déjese la placa durante la noche a 4°C.

Día 2:

1. Lávese la placa 2 veces con 200 μl de PBS por pocillo.
- 20 2. Bloquéese con 100 μl de leche secada al 5% en TBS.
3. Incúbese la placa durante 20 minutos a 37°C.
4. Lávese la placa 2 veces con Tween al 0.1%/H₂O.
5. Añádanse 50 μl de 3 μg/ml de anticuerpo primario pERK (Sigma M8159), diluido en leche en polvo al 5%/TBS, a cada pocillo.
- 25 6. Incúbese la placa durante 2 horas a 37°C.
7. Lávese la placa 3 veces con Tween al 0.1%/H₂O.
8. Añádanse a cada pocillo 50 μl de 0.45 μg/ml de anticuerpo secundario contra globulinas de ratón marcado con europio (Perkin Elmer).
9. Incúbese la placa durante 1 hora a 37°C.
- 30 10. Lávese la placa 3 veces con Tween al 0.1%/H₂O.
11. Añádanse a cada pocillo 100 μl de solución de mejora (Perkin Elmer).

12. Déjese la placa durante aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente antes de batir suavemente la placa.
13. Léase la fluorescencia resuelta con el tiempo con europio en un lector de placas Victor2 (Perkin-Elmer, Turku, Finlandia).
- 5 14. Lávese la placa 2 veces con Tween al 0.1%/H₂O.
15. Mídase la concentración de proteína con el ensayo de ácido bicinconínico (BCA, Sigma) al añadir 200 µl de solución por pocillo.
16. Incúbese la placa durante 30 minutos a 37°C.
17. Léanse los niveles de absorbancia a 570 nm en un lector de placas.
- 10 Nótese que los recuentos de europio se normalizan para los niveles de proteína al dividir los recuentos por la absorbancia.

Los valores para la muestra sin analito (sin células) se sustraen de todos los valores. Los controles de DMSO se fijan como 100% de actividad y los puntos de ensayo (las respuestas) se calculan como un porcentaje del control de DMSO. Los datos se representan usando el programa Graphpad Prism y se calcula una línea de regresión no lineal usando una ecuación de respuesta a la dosis sigmoidea de pendiente variable:

- 15

$$Y = \text{Inferior} + [\text{Superior} - \text{Inferior}] / [1 + 10^{-(\text{LogEC50} - X) * \text{Ladera}}]$$

donde X es el logaritmo de la concentración e Y es la respuesta). La IC₅₀ generada por este procedimiento es la concentración del fármaco que produce un valor del porcentaje de control de fluorescencia a medio camino entre la saturación y la meseta de efecto cero. Habitualmente se realizan tres ensayos independientes y se presenta la IC₅₀ media.

- 20

Los datos se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 7	
Datos de Ensayo de Fosfo-ERK Basado en Células	
Compuesto	IC ₅₀ (µM)
TBAP-01	0.018
TBAP-02	0.012
TBAP-03	0.019
TBAP-04	0.008
TBAP-05	0.45

Ensayo de Proliferación Celular de SRB (GI₅₀ de SRB)

- 25 Las líneas celulares se cultivan normalmente en DMEM o RPMI1640 complementados con 10% de suero bovino fetal a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 10% saturada con agua. Los cultivos se mantienen en fase de crecimiento exponencial al subcultivar antes de haberse vuelto confluentes (intervalos de 3-5 días). Se preparan suspensiones de células simples al recoger un matraz de cultivo tisular de 80 cm² con 5 ml de tripsina-EDTA comercial. Después de 5 minutos, las células separadas se mezclan con 5 ml de medio de cultivo totalmente complementado y se nodulizan centrífugamente (1000 rpm durante 7 minutos). Después de aspirar el sobrenadante, el nódulo celular se resuspende en 10 ml de medio reciente y las células se desagregan completamente al hacer correr hacia arriba/hacia abajo 5 veces todo el volumen a través de una aguja de calibre 19. La concentración de las células se determina usando un hemocitómetro (dilución 1/10). Un volumen adecuado para dar un exceso de al menos 2 veces para el número de pruebas que se efectúan, típicamente 100-200 ml, se prepara al diluir la suspensión celular hasta 10.000-40.000/ml, y se aportan 100 µl/pocillo a placas de 96 pocillos usando una bomba peristáltica programable de 8 canales, dando 1.000-4.000 células/pocillo, dejando la columna 12 sin tratamiento. Las placas se devuelven a la incubadora durante 24 horas para permitir que las células se unan de nuevo.
- 30
- 35

Los compuestos que se prueban se preparan a 10 mM en DMSO. Se diluyen partes alícuotas (24 µl) en 1.2 ml de medio de cultivo dando 200 µM, y se realizan 10 diluciones en serie de 3 veces al transferir 80 µl a 160 µl. Se añaden partes alícuotas (100 µl) de cada dilución a los pocillos, usando un pipeteador de 8 canales, realizando así una solución adicional de 2 veces, y dando dosis que varían de 100 µM a 0.005 µM. La columna 11 recibe

solamente medio de cultivo simple. Cada compuesto se prueba por cuadruplicado, siendo cada repetición el promedio de cuatro pocillos.

5 Después de un crecimiento adicional de 5 días, las placas se vacían, y las células se fijan en ácido tricloroacético al 10% durante 30 minutos a 4°C. Después de un enjuague a fondo en agua corriente del grifo, las placas se secan, y se tiñen al añadir 50 µl de una solución de sulforodamina-B al 0.1% en ácido acético al 1%, durante 10 minutos a temperatura ambiente. La mancha se vierte y las placas se enjuagan a fondo bajo una corriente de ácido acético al 1% (retirando así la mancha no unida) y se secan. La mancha unida se recoge en solución mediante la adición de 100 µl de tampón de Tris pH 8, seguido por 10 minutos en un agitador de placas (aproximadamente 500 rpm). La absorbancia a 540 nm en cada pocillo (que es proporcionar al número de células presente) se determina usando un lector de placas.

10 Después de promediar los valores sin analito en la columna 12, esto se sustrajo de todos los valores, y los resultados se expresaron como un porcentaje del valor no tratado (columna 11). Los 10 valores así derivados (por cuadruplicado) se representan frente al logaritmo de la concentración de fármaco, y se analizan mediante regresión no lineal para una ecuación logística de cuatro parámetros, fijando restricciones si es sugerido por una inspección. 15 La GI₅₀ generada por este procedimiento es la concentración del fármaco que produce un porcentaje de control A₅₄₀ a medio camino entre la saturación y la meseta de efecto cero.

Los resultados para una gama de líneas celulares se resumen posteriormente.

Tabla 8	
Datos de Ensayo de Proliferación Celular de SRB para TBAP-01 en un Conjunto de Líneas Celulares de BRAF Mutante (mutBRAF)	
Línea celular	GI ₅₀ (µM)
A375 (melanoma)	0.178
WM266.4 (melanoma)	0.062
UACC62 (melanoma)	0.072
LOX INVI (melanoma)	0.093
HT29 (carcinoma colorrectal)	0.59
COLO205 (carcinoma colorrectal)	0.043
RKO (carcinoma colorrectal)	0.69
Mawi (carcinoma colorrectal)	0.49
WiDr (carcinoma colorrectal)	0.39
Colo741 (carcinoma colorrectal)	0.48

Tabla 9	
Datos de Ensayo de Proliferación Celular de SRB para TBAP-01 en un Conjunto de Líneas Celulares de RAS Mutante	
Línea celular	GI ₅₀ (µM)
SW620 (carcinoma colorrectal humano)	0.48
HCT116 (carcinoma colorrectal humano)	0.60
SKMEL2 (melanoma humano)	0.39
DO4 (melanoma humano)	0.71
WM1361 (melanoma humano)	0.39

ES 2 740 325 T3

Tabla 9	
Datos de Ensayo de Proliferación Celular de SRB para TBAP-01 en un Conjunto de Líneas Celulares de RAS Mutante	
Línea celular	GI ₅₀ (μM)
PDAC R172H (p53 mut) (carcinoma pancreático de ratón)	1.15
MiaPaCa (carcinoma pancreático humano)	0.29
Panc-1 (carcinoma pancreático humano)	2.78
RPMI8226 (mieloma humano)	0.49
A549 (carcinoma pulmonar humano)	1.81
H23 (carcinoma pulmonar humano)	1.26

Tabla 10	
Datos de Ensayo de Proliferación Celular de SRB para TBAP-01 en un Conjunto de Líneas Celulares BRAF y RAS naturales (wtBRAF/RAS)	
Línea celular	GI ₅₀ (μM)
D35 (melanoma humano)	1.45
KM12 (carcinoma colorrectal humano)	1.74
D24 (melanoma humano)	2.73

Tabla 11	
Datos de Ensayo de Proliferación Celular de SRB para TBAP-01 en Líneas Celulares Adicionales	
Línea celular	GI ₅₀ (μM)
A375	0.178
A375/R (hecha resistente a PLX4720 in vitro)	0.839
A375/R/X (hecha resistente a PLX4720 in vivo)	0.252
A375/DR (hecha resistente a PLX4720 y resistente a dabrafenib in vivo)	0.95
Colo829	0.189
Colo829/R (hecha resistente a PLX4720 in vitro)	0.029
DO4 (mutante NRAS)	0.275
SBCL2 (mutante de NRAS)	0.719
Línea celular RM-11 virgen derivada de un paciente no tratado con resistencia a PLX4720 inducida in vitro	1.34

Células de melanoma derivadas de paciente humano LP2 CL2 (LÍNEA 1) (BRAF mutante, resistencia adquirida a vemurafenib)	0.043
Células de melanoma derivadas de paciente humano LP2 CL3 (BRAF mutante, resistencia adquirida a vemurafenib)	0.269
Células de melanoma derivadas de paciente humano RM-7 (BRAF mutante, resistencia adquirida a vemurafenib)	2.6
Células de melanoma derivadas de paciente humano RM-2 (LÍNEA 2) (BRAF mutante, resistencia intrínseca a vemurafenib)	0.569
Células de melanoma derivadas de paciente humano RM-17 (LÍNEA 3) (BRAF mutante, resistente a la combinación de dabrafenib y trametinib)	2.600
Células de melanoma derivadas de paciente humano RM33S (wt BRAF, wt RAS, resistentes a ipilimumab)	1.13

Estudios de Xenoinjertos

5 Para líneas celulares estándar, las células se inocularon subcutáneamente en suspensión (0.2 ml) en el costado de ratones hembra atímicos o con inmunodeficiencia combinada grave. Grupos de 7-8 ratones se asignaron al tratamiento siguiendo una asignación estratificada de volúmenes tumorales. El tratamiento con TBAP-01 comenzó entre los días 11-14 después de la administración de las células. Se administraron por sonda 200 µl de un suspensión (DMSO : agua, 1 : 19, v/v en 10 ml/kg). Los animales de control recibieron una dosificación similar de vehículo (DMSO : agua, 1 : 19, v/v). El tratamiento con TBAP-01 se continuó una vez al día durante 24 dosis.

10 Para xenoinjertos derivados de pacientes (PDX, por sus siglas en inglés), se recogió tejido reciente inmediatamente después de la cirugía en RPMI complementado con FBS al 10%. El tejido se transfirió a una placa de Petri estéril. Las partes necróticas del tumor se retiraron y un trozo de 5 x 5 x 5 mm se implantó subcutáneamente en el costado de un ratón Cb 17 NOD SCID. Cuando el tumor alcanzaba los límites de tamaño autorizados por el ministerio del interior, se extirpaba, y el tejido viable se diseccionó en cubos de 5 x 5 x 5 mm y se trasplantó en ratones Cb 17 NOD SCID adicionales usando el mismo procedimiento. Los análisis genómicos e histológicos conformaron que los tumores en cada punto se derivaban del material de partida. Después del trasplante, se dejó que el tumor RM-2 (LÍNEA 2) (mutante de BRAF, xenoinjerto derivado de paciente con resistencia intrínseca a vemurafenib), el tumor RM-17 (LÍNEA 3) (mutante de BRAF, xenoinjerto derivado de paciente resistente a una combinación de dabrafenib + trametinib) y RM33S (tipo BRAF natural Ras natural de un paciente que es refractario a ipilimumab) crecieran hasta aproximadamente 50-60mm³ antes del inicio del tratamiento mediante sonda orogástrica diaria de TBAP-01 en 20 mg/kg/día o vehículo durante 24 o 17 días, respectivamente. La célula derivada de paciente LP2-CL2 (LÍNEA 1) (mutante de BRAF, derivado de un paciente que adquirió resistencia a vemurafenib en la clínica después de 3 meses de tratamiento) se estableció a partir de tejido reciente recogido después de la cirugía. Las células se hicieron crecer en RPMI complementado con FBS al 10%.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 12		
Estudios de Xenoinjertos		
Eficacia Terapéutica:		
Relación del Volumen del Tumor (tratado) / Volumen del Tumor (Control)		
Xenoinjerto	TBAP-01	TBAP-02
Células de melanoma humano A375 (BRAF mutante)	0.07	0.31
Células de melanoma humano WM266.4 (BRAF mutante)	0.08	-
Células de melanoma humano A375/R (BRAF mutante, resistente a vemurafenib)	0.33	-
Células de carcinoma colorrectal humano SW620 (RAS mutante)	0.4	-
PDAC R172H (p53 mut) (carcinoma pancreático de ratón)	0.45	-

Células de melanoma derivadas de paciente humano LP2 CL2 (LÍNEA 1) (BRAF mutante, resistencia adquirida a vemurafenib)	0.09	-
Células de melanoma derivadas de paciente humano RM-2 (LÍNEA 2) (BRAF mutante, resistencia intrínseca a vemurafenib)	0.13	-
Células de melanoma derivadas de paciente humano RM-17 (LÍNEA 3) (BRAF mutante, resistente a una combinación de dabrafenib y trametinib)	0.18	-
Células de melanoma derivadas de paciente humano RM33S (wt BRAF, wt RAS, resistente a ipilimumab)	0.45	

Estudios de Biomarcadores

- 5 Las células se inocularon subcutáneamente en suspensión (0.2 ml) en el costado de ratones atómicos hembra. Grupos de 3-6 ratones se asignaron al tratamiento con una sola dosis de compuesto de prueba (para los estudios de inmunotransferencia presentados en la Tabla 13) o 4 dosis diarias (para los estudios inmunohistoquímicos presentados en la Tabla 13) 14-21 días después de la administración de las células. Se administraron por sonda 200 µl de 40-50 mg/kg de suspensión de TBAP-01 en DMSO : agua. Los animales de control recibieron una dosificación similar de vehículo (DMSO : agua, 1 :19, v/v). Los tumores se recogieron 2-8 horas después de la dosificación y se sometieron a lisis en tampón de lisis NP40 al 1% (100 µl de tampón / 15 mg de tejido) usando un homogeneizador de tejidos (Precellys 24). El contenido de proteína total se midió usando el 660 nm Protein Assay (Pierce) y 40 µg de proteína total se cargaron en una SDS-PAGE para inmunotransferencia adicional. Se usaron anticuerpos para ERK2 (Santa Cruz Technologies), fosfo-MEK (Cell Signaling) y fosfo-ERK (Sigma) para la inmunotransferencia; la señal se reveló usando anticuerpos secundarios fluorescentes (Invitrogen y Li-cor) en el sistema Odyssey (Li-cor). Alternativamente, los tumores se recogieron 1 hora después de la dosificación final al acabar la terapia (24 dosis diarias) y se procesaron de un modo similar al descrito anteriormente.
- 10
- 15 Inmunohistoquímica (IHC): Los tumores se fijaron con formalina y se prepararon como se describe en otras partes (véase p. ej., Dhomen y cols., 2009) para tinción con hematoxilina y eosina, pSRC (Invitrogen 44660G) y pERK (Cell Signaling 20G11) de conejo. Se incluyeron controles positivos y negativos en cada experimento. La puntuación del patrón y la intensidad de la tinción se realizó de un modo enmascarado.
- 20 Los datos se resumen en la siguiente tabla, que muestra el porcentaje de reducción de fosfo-MEK (ppMEK) y fosfo-ERK (ppERK), en comparación con los controles tratados con vehículo, para TBAP-01. pMEK y pERK se normalizan a ERK total en las muestras tratadas así como en las muestras de control.

Tabla 13				
Estudios con Biomarcadores				
Porcentaje de Reducción de Fosfo-MEK (ppMEK)				
Fosfo-ERK (ppERK) y Fosfo-SRC (pSRC)				
Biomarcador	Células de melanoma humano WM266.4 (BRAF mutante) (1 dosis)	Células de carcinoma colorrectal humano SW620 (RAS mutante) (1 dosis)	Células de carcinoma pancreático de ratón PDAC R172H (RAS mutante) (4 dosis diarias)	Células de carcinoma pancreático de ratón PDAC R172H (RAS mutante) (24 dosis diarias)
ppMEK 2h	60%			
ppMEK 4h		42%		
ppMEK 8h	68%			
ppERK 1h				85%
ppERK 2h	67%			
ppERK 8h	40%			
pSRC 4h			80%	

Estudios Farmacocinéticos

Se usaron ratones BALB/cAnNCrl hembra de al menos 6 semanas de edad para los análisis farmacocinéticos. Los ratones fueron dosificados intravenosamente (2 mg/kg, en DMSO:Tween 20:agua 10:1:89 v/v) u oralmente por sonda. Se recogieron muestras en 7 u 8 momentos entre los 5 minutos y las 18 o 24 horas para la vía intravenosa y en 6 u 8 momentos entre los 15 minutos y las 18 o 24 horas para la vía oral. Se usaron tres ratones por momento por vía. Se sometieron a anestesia con halotano o isoflurano y se recogió sangre para la preparación de plasma mediante punción cardíaca terminal en jeringas heparinizadas. Las muestras de plasma se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y a continuación se almacenaron a -70°C antes del análisis. Todos los procedimientos que involucraban a animales se realizaron según las regulaciones nacionales del Ministerio del Interior bajo the Animals (Scientific Procedures) Act 1986 y dentro de las directrices indicadas por the Institute's Animal Ethics Committee y the United Kingdom Coordinating Committee for Cancer Research's *ad hoc* Committee on the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia.

Los datos se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 14			
Datos Farmacocinéticos			
Compuesto	C _{máx} (nM) (10 mg/kg po)	AUC (h*nmol/l) (10 mg/kg po)	Tiempo para que la concentración de fármaco esté por encima de GI ₅₀ de SRB (horas)
TBAP-01	68.831	509.747	>18
TBAP-02	13.041	41.754	>18
TBAP-03	25.533	48.158	>18
TBAP-04	47.870	125.950	>6

Inhibición de hERG

Se efectuaron estudios en Cypotex Discovery en Cheshire, Reino Unido, según el protocolo del contratista. Los estudios se realizaron en un instrumento IonWorks™ HT (Molecular Devices Corporation), que realiza automáticamente medidas electrofisiológicas en 48 células individuales simultáneamente en una placa de 384

5 pocillos especializada (PatchPlate™). La células usadas eran células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés) transfectadas establemente con hERG (línea celular obtenida de Cytomyx, Reino Unido). Se preparó una suspensión de células individuales en solución extracelular (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco con calcio y magnesio pH 7-7.2) y se añadieron automáticamente partes alícuotas a cada pocillo de una PatchPlate™. A continuación, las células se colocaron sobre un pequeño hueco en el fondo de cada pocillo al aplicar un vacío debajo de la placa para formar una junta eléctrica. El vacío se aplicó a través de un solo compartimento común a todos los pocillos que se rellenó con solución intracelular (tamponada hasta pH 7.2 con HEPES). La resistencia de cada junta se midió a través de un electrodo con toma de tierra común en el compartimento intracelular y se pusieron electrodos individuales en cada uno de los pocillos superiores.

10 El acceso eléctrico a la célula se alcanzó a continuación al hacer circular un agente de perforación, anfotericina, por debajo de la PatchPlate™ y a continuación medir la corriente de hERG antes del compuesto. Se colocó un electrodo en el compartimento extracelular y se aplicó un potencial de mantenimiento de -80 mV aplicado durante 15 segundos. Los canales de hERG se activaron a continuación al aplicar una etapa de despolarización hasta +40 mV durante 5 segundos y a continuación se pinzaron a -50 mV durante 4 segundos para provocar la corriente de cola de hERG, antes de volver a -80 mV durante 0.3 segundos. A continuación, el compuesto de prueba se añadió automáticamente a los pocillos superiores de la PatchPlate™ desde una placa de microvaloración de 96 pocillos que contenía un intervalo de concentraciones de compuesto TBAP-01. Se incluyó quinidina, un inhibidor de hERG establecido, como un control experimental. Se disolvió TBAP-01 en DMSO y se ensayó en concentraciones finales que variaban de 100 µM a 32 nM en DMSO al 0.25%. Se incluyó tampón que contenía DMSO al 0.25% como un control negativo. El compuesto de prueba se dejó en contacto con las células durante 300 segundos antes de registrar las corrientes usando el mismo protocolo de etapas de voltaje que en el barrido anterior al compuesto. Cada concentración se probó en 4 pocillos repetidos.

25 Las corrientes posteriores al compuesto se expresaron como un porcentaje de las corrientes anteriores al compuesto y se representaron frente a la concentración de cada compuesto. Cuando se observaba inhibición dependiente de la concentración, los datos se ajustaron a la siguiente ecuación:

$$y = (y_{\text{máx}} - y_{\text{mín}}) / (1 + (x / x_{50})^s) + y_{\text{mín}}$$

en la que:

y = (corriente posterior al compuesto / corriente anterior al compuesto) x 100;

x = concentración;

30 x_{50} = concentración requerida para inhibir la corriente en 50% (IC_{50}); y

s = pendiente de la gráfica.

Los datos se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 15	
Datos de Inhibición de hERG	
Compuesto	IC_{50} (µM)
TBAP-01	>100
TBAP-02	65
TBAP-03	>100
TBAP-04	>100
TBAP-05	-

Actividad Contra Otras Dianas

35 Se efectuaron estudios en Life Technologies en Paisley según el protocolo del contratista. Se disolvió TBAP-01 en DMSO y se ensayó en concentraciones finales que variaban de 10 µM a 0.5 nM en DMSO al 1%, en presencia de una concentración de ATP de 100 µM. Los valores de IC_{50} para los compuestos de prueba se determinaron usando el ensayo bioquímico Z'-LYTE® empleando un formato asociado a enzimas basado en fluorescencia, basado en la sensibilidad diferencial de péptidos fosforilados y no fosforilados a la escisión proteolítica.

40 Se efectuaron estudios adicionales en The International Centre for Kinase Profiling en Dundee según el protocolo del contratista. Se disolvió TBAP-01 en DMSO y se ensayó a una concentración final de 1 µM en DMSO al 2% frente a 131 cinasas. Los ensayos se llevaron a cabo usando un ensayo radiactivo de unión al filtro (^{33}P -ATP).

Los datos se resumen en las siguientes tablas.

Tabla 16	
Actividad de TBAP-01 Contra Diana Implicadas en la Resistencia a Inhibidores de BRAF	
IC ₅₀ CRAF	0.033 μM
IC ₅₀ KDR	0.12 μM
IC ₅₀ PDGFRα	0.8 μM
IC ₅₀ PDGFRβ	0.74 μM
IC ₅₀ MET	1.4 μM
IC ₅₀ EGFR	1.9 μM
IGF1Rβ	78% a 1 μM

Tabla 17	
Actividad de TBAP-01 Contra Otras Dianas de Cinasa	
IC ₅₀ Src	0.027 μM
IC ₅₀ Lck	0.019 μM
IC ₅₀ p38γ	0.22 μM
IC ₅₀ p38α	0.47 μM
IC ₅₀ FGFR1	0.47 μM
MINK1	4% de actividad remanente a 1 μM
TESK1	5% de actividad remanente a 1 μM
TAK1	6% de actividad remanente a 1 μM
YES1	6% de actividad remanente a 1 μM
ABL	4% de actividad remanente a 1 μM
Tie-2	3% de actividad remanente a 1 μM
TrkA	6% de actividad remanente a 1 μM
DDR2	3% de actividad remanente a 1 μM
VEGFR	6% de actividad remanente a 1 μM

5 Nótese, p. ej., que se sabe bien que: TAK1 es una diana en cánceres tales como linfoma y cáncer colorrectal y pancreático; TrkA es una diana en cáncer de pulmón y de mama; DDR2 es una diana en cánceres tales como cáncer pulmonar de células escamosas; VEGFR y Tie-2 son dianas antiangiogénicas; ABL es una diana en la leucemia; y YES1 es una diana en cánceres tales como melanoma y cáncer de mama.

Actividad Antiviral

10 La actividad antiviral de los compuestos contra la infección por el virus de la encefalomiocarditis (ECMV, por sus siglas en inglés) ATCC® VR-129B de células HepG2; la infección por el virus de herpes simples HSV-1, SC16 de células Vero; y virus de la gripe A, A/Panama/2007/99 (H3N2) en células MDCK; se evaluó en KWSBiotest (Bristol, Reino Unido), según el protocolo del contratista.

Las células que la replicación viral se hicieron crecer hasta números suficientes en medio de crecimiento con complementos. Una vez que las células eran confluentes, se sembraron en placas de fondo plano de 96 pocillos. Para la determinación de la EC₅₀ (Concentración Eficaz, 50%), el medio se retiró y los compuestos se añadieron a

10 veces la concentración final en DMSO al 0.4% 10 minutos antes de la infección viral. Una hora después de la infección, se añadió a los pocillos medio superpuesto para dar 1 vez la concentración de los compuestos a lo largo de la duración del estudio. Los pocillos con vehículo y control positivo se establecieron para controlar cualquier influencia sobre la viabilidad celular. Para la determinación de CC_{50} (Concentración Citotóxica, 50%), se siguió el mismo procedimiento, excepto que sólo se añadía medio en lugar de inóculo viral.

A continuación, los pocillos individuales se evaluaron usando el ensayo de MTT, que es un ensayo colorimétrico cuantitativo para la supervivencia de células de mamífero. Las células se incubaron durante 3 horas con solución de 1 mg/ml de MTT. A continuación, se determinó la intensidad cromática al cuantificar la absorbancia a la longitud de onda apropiada. El resultado proporciona una indicación de la eficacia antiviral de cada compuesto como una EC_{50} , así como una CC_{50} para mostrar cualquier efecto citotóxico de los compuestos sobre las células en ausencia de infección viral. Los pocillos infectados viralmente también se inspeccionaron visualmente para cualquier CPE o formación de sincitios.

Concentración Eficaz (EC_{50}): La capacidad de los compuestos para reducir la muerte celular inducida por virus se evaluó usando el ensayo colorimétrico de MTT para la supervivencia de células de mamífero. El resultado del ensayo se cuantificó usando un lector de placas de ELISA, y se determinó la EC_{50} para cada uno de los compuestos que se evalúan con cada virus. Los resultados se presentaron gráficamente junto con el error estándar de la media (SEM, por sus siglas en inglés) para cada. Se calculó la significación estadística de la eficacia de cada compuesto.

Concentración Citotóxica (CC_{50}): El efecto citotóxico de los compuestos se evaluó usando el ensayo colorimétrico de MTT para la supervivencia de células de mamífero. El resultado del ensayo se cuantificó usando un lector de placas de ELISA, y se determinó la CC_{50} para cada uno de los compuestos que se evalúan. Los resultados se presentaron gráficamente junto con el error estándar de la media (SEM) para cada grupo. Se calculó la significación estadística de la eficacia de cada compuesto.

Liberación de TNF- α Estimulada por LPS de Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) Humanas

El factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), una citocina secretada de 17 kDa, representa un papel importante en enfermedades inflamatorias y trastornos inmunitarios. El TNF- α es secretado principalmente por macrófagos activados (véase, p. ej., Shakhov y cols., 1990) y monocitos (véase, p. ej., Yao y cols., 1997) en respuesta a varios estímulos inflamatorios e inmunológicos. Por ejemplo, durante la infección bacteriana, el lipopolisacárido (LPS), un componente de la pared celular bacteriana gramnegativa, induce la liberación de TNF- α (véase, p. ej., Martich y cols., 1991).

La sobreproducción de citocinas inflamatorias, tales como TNF- α , se ha relacionado con trastornos inflamatorios tales como la enfermedad de Crohn (CD, por sus siglas en inglés) y la enteropatía inflamatoria (véase, p. ej., Kam y cols., 2000; Nakamura y cols., 2006), la artritis reumatoide (véase, p. ej., Keffer y cols., 1991; McCann y cols., 2010), el choque séptico (véase, p. ej., Link y cols., 2008; Shapira y cols., 1996), el asma (véase, p. ej., Berry y cols., 2007), la bronquitis crónica (CB, por sus siglas en inglés), la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), la lesión pulmonar aguda (ALI) y el síndrome de dificultad respiratoria agudo (ARDS) (véase, p. ej., Mukhopadhyay y cols., 2006). La reducción de los niveles de TNF- α se ha asociado con una mejora en estas afecciones.

La actividad del compuesto TBAP-01 en la liberación de TNF α estimulada por LPS de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas se determinó en Argenta/Charles River, Cowley, Oxford, según el protocolo del contratista. Las PBMC se aislaron de sangre de voluntarios humanos sanos usando una técnica de centrifugación con gradiente de densidad estándar. Las PBMC se suspendieron en medio y se aportaron a una placa de 96 pocillos y se incubaron a 37°C durante 3 horas en una incubadora humidificada. Después de la incubación, el medio se reemplazó y el compuesto de prueba, el compuesto de referencia (BIRB796) o el vehículo apropiado se añadieron a las células y la placa se incubó a 37°C durante 1 hora. Después de la incubación, se añadieron LPS (E coli 0111:84, 10 ng/ml) o un control de vehículo apropiado a las células a continuación y la placa se devolvió a la incubadora para la incubación durante la noche. Después de la incubación, la placa se centrifugó a 300 x g durante 4 minutos a temperatura ambiente. Los sobrenadantes libres de células se retiraron y se almacenaron (congeladas) hasta que se ensayaban con respecto a los niveles de TNF- α usando un estuche EUSA disponible comercialmente (R&D Systems).

El compuesto de prueba se disolvió en DMSO y se almacenaron congeladas partes alícuotas. Una parte alícuota separada se usó para cada experimento. Para cada experimento, el compuesto de prueba se diluyó en DMSO (hasta 1.000 veces la concentración de ensayo final), y a continuación se diluyó en medio de cultivo celular para dar las concentraciones requeridas mientras se mantenía una concentración constante de DMSO (concentración final de DMSO al 0.1% en el ensayo).

Se realizó una curva de respuesta a la dosis de 8 puntos, con tres experimentos separados (n=3). El efecto del compuesto de prueba en cada experimento se expresó como un porcentaje de inhibición de la respuesta estimulada por LPS. Los datos del porcentaje de inhibición para cada compuesto de prueba en cada experimento se reunieron para determinar un solo valor de IC_{50} para cada compuesto de prueba.

ES 2 740 325 T3

Se encontró que el compuesto TBAP-01 exhibía una potente inhibición usando este ensayo, con una IC₅₀ de 3.4 nM y un intervalo de confianza al 95% de 2.0-5.7 nM.

Datos de Comparación - 1

5 Datos para TBAP-01 y compuestos conocidos estructuralmente relacionados (AA-04 en Springer y cols., 2011; y AA-018, AA-019, AA-062, AA-084 en Springer y cols., 2009) se resumen posteriormente.

Tabla 18					
Datos de Eficacia In vivo					
(MED = dosis eficaz máxima)					
Compuesto	Línea celular	Relación Tumor/Control			
		Oral		IP	
		1 x MED	0.5 x MED	1 x MED	0.5 x MED
TBAP-01	mutBRAF A375M	0.07	0.47	-	-
TBAP-01	mutBRAF WM266.4	0.08	0.21	-	-
TBAP-01	mutRAS SW620	0.40			
TBAP-01	RM-17 (LÍNEA 3)	0.18			
TBAP-01	RM-2 (LÍNEA 2)	0.13			
TBAP-01	A375R	0.33			
TBAP-01	PDAC R172H	0.45			
AA-018	mutBRAF A375M	-	-	0.52	-
AA-019	mutBRAF A375M	0.15	-	-	-
AA-019	mutBRAF WM266.4	0.14	0.41	-	0.34
AA-019	mutRAS SW620	0.52			
AA-019	RM-17 (LÍNEA 3)	0.43			
AA-019	RM-2 (LÍNEA 2)	0.19			
AA-019	A375R	0.40			
AA-019	PDAC R172H	0.56			
AA-062	mutBRAF A375M	0.66		-	-

Clase	Línea celular	TBAP-01 GI ₅₀ (μM)	AA-019 GI ₅₀ (μM)
Mutante de BRAF	A375	0.178	0.249
	A375/R	0.839	1.897
	A375(X)	0.163	0.372
	A375(X)/R	0.252	0.501
Mutante de NRAS	DO4	0.275	0.573
	SBCL2	0.719	1.159
Resistente a Inhibidores de BRAF Aprobados	LP2-CL2 (LÍNEA 1)	0.043	0.684
	RM-2 (LÍNEA 2)	0.569	1.39
	RM-17 (LÍNEA 3)	2.6	3.0

Compuesto	Ensayo de cinasa BRAF V600E IC ₅₀ (μM)	Ensayo Basado en células de P-ERK IC ₅₀ (μM)	Ensayo de SRB IC ₅₀ (μM)	Inhibición de Herg IC ₅₀ (μM)
TBAP-01	0.062	0.018	0.062	>100
AA-04	0.650	0.137	0.291	-
AA-018	0.064	0.024	0.015	>100
AA-019	0.055	0.028	0.008	>100
AA-062	0.079	0.063	0.037	>100
AA-084	0.71	0.15	0.30	53

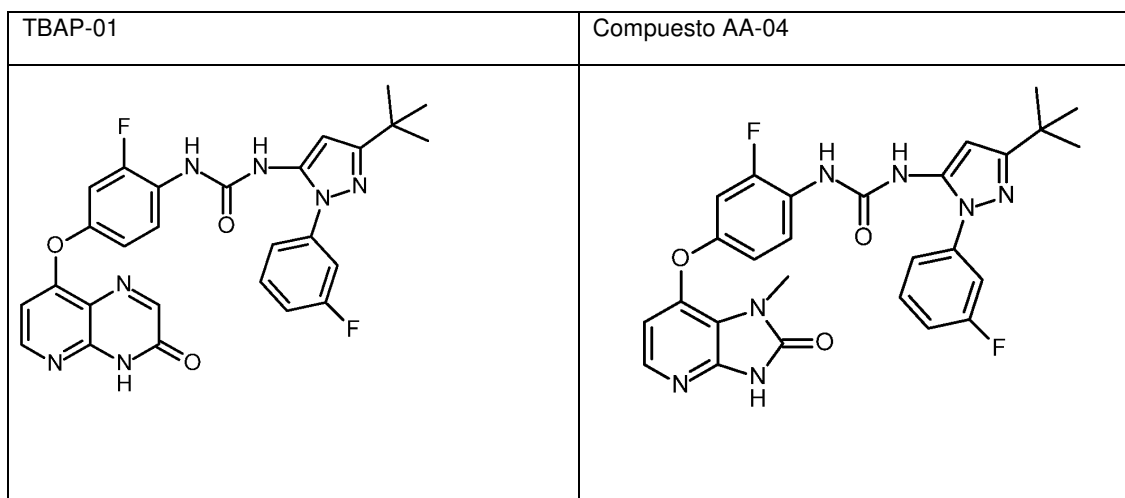
Tabla 21					
Comparación de Datos Farmacocinéticos Data					
Compuesto	Solubilidad Termodinámica a pH 7.4 (mg/ml)	C _{máx} (nM) (10 mg/kg po)	AUC (h*nmol/l) (10 mg/kg po)	F% ratón	MTD en ratones (mg/kg) (qd x 28 días)
TBAP-01	0.066	68831	509747	42	40-50 po
AA-018	-	33640	461407	24	10 ip
AA-019	0.035	40503	416286	54	20 po
AA-062		1055590	5888243	100	50 po

Tabla 22			
Comparación de Datos de Biomarcadores			
Compuesto	Línea celular	pERK (% residual frente a control de vehículo; 24 dosis diarias; 1 h después de la dosis)	pSRC (% residual frente a control de vehículo; 4 dosis diarias; 4 h después de la dosis)
TBAP-01	PDAC R172H	15	20
AA-019	PDAC R172H	>100 (Sin reducción)	53

Datos de Comparación - 2

En comparación con el Compuesto AA-04 en Springer y cols., 2011, TBAP-01 es:

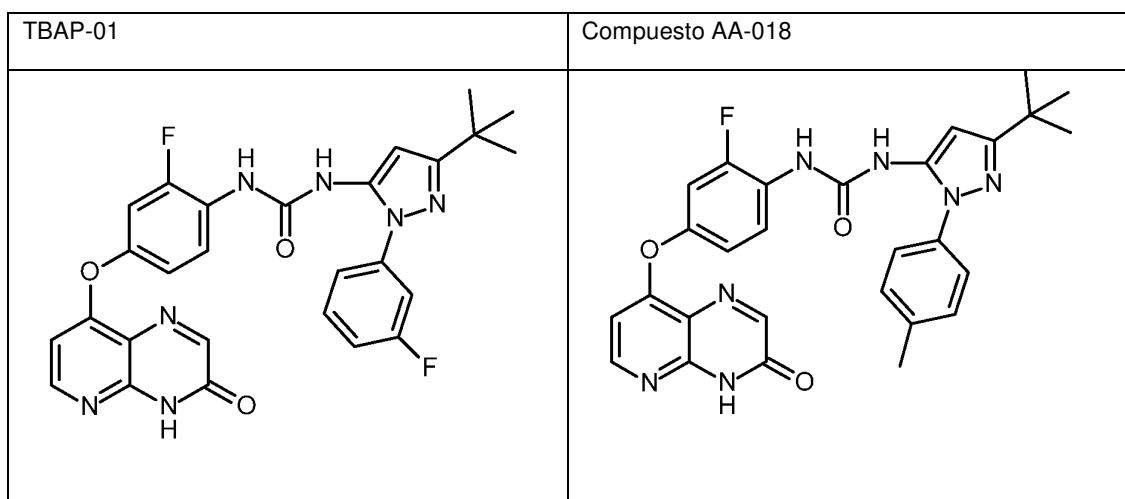
- (a) 10 veces más potente en el ensayo de cinasa BRAF;
- 5 (b) 8 veces más potente en el ensayo celular de pERK; y
- (c) 5 veces más potente en el ensayo de inhibición de la proliferación celular.



Datos de Comparación - 3

En comparación con el Compuesto AA-018 en Springer y cols., 2009, TBAP-01 es:

- (a) 7 veces más eficaz en xenoinjerto de melanoma por BRAF mutante A375M a la dosis eficaz máxima; y
- (b) 2 veces más biodisponibilidad oral.



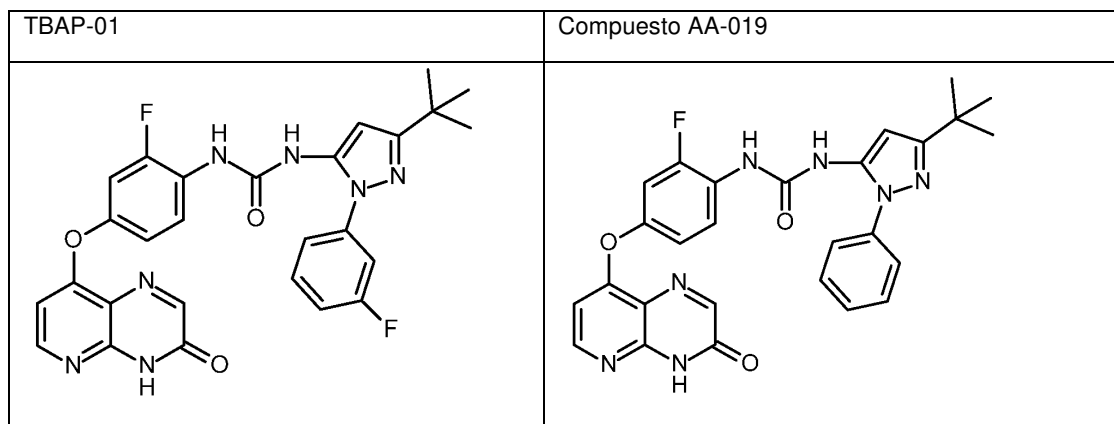
5 Datos de Comparación - 4

En comparación con el Compuesto AA-019 en Springer y cols., 2009, TBAP-01 es:

- (a) tolerado in vivo en dosis 2 veces superiores (es decir, 40-50 mg/kg), a pesar de tener una $C_{m\acute{a}x}$ y un AUC superiores que AA-019 a la misma dosis;
- 10 (b) hasta 16 veces más potente en la inhibición de la proliferación celular en líneas celulares vírgenes o resistentes a fármacos aprobados mutantes en BRAF y líneas celulares de RAS mutante;
- (c) 2 veces más soluble (es decir, tiene una solubilidad termodinámica 2 veces superior);
- (d) 2 veces más eficaz en xenoinjerto de melanoma con BRAF mutante A375M y xenoinjerto de melanoma con BRAF mutante WM266.4 a la dosis eficaz máxima;
- (e) 1.2 veces más eficaz sobre xenoinjerto colorrectal con RAS mutante SW620 a la dosis eficaz máxima;
- 15 (f) 1.2-1.5 veces más eficaz sobre xenoinjerto de melanoma con BRAF mutante derivado de un paciente resistente a vemurafenib RM-2 (LÍNEA 2) y xenoinjerto de melanoma con BRAF mutante A375R a la dosis eficaz máxima; y
- (g) 2.4 veces más eficaz sobre xenoinjerto de melanoma con BRAF mutante derivado de un paciente resistente a dabrafenib+trametinib RM-17 (LÍNEA 3) a la dosis eficaz máxima.

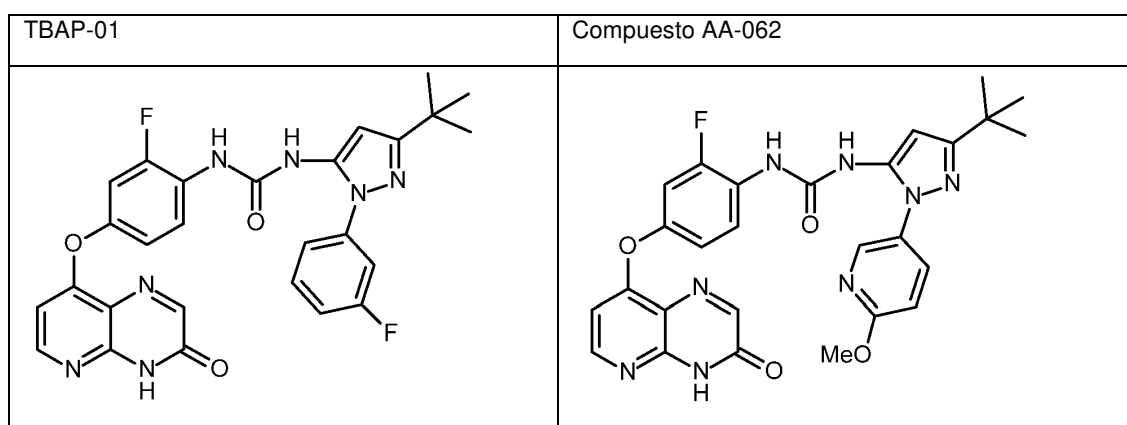
(h) >6.5 veces más eficaz en la inhibición del biomarcador pERK en el aloinjerto de PDAC R172H pancreático a la dosis eficaz máxima.

(i) 2.5 veces más eficaz en la inhibición del biomarcador pSRC en el aloinjerto PDAC R172H pancreático a la dosis eficaz máxima.



5 Datos de Comparación - 5

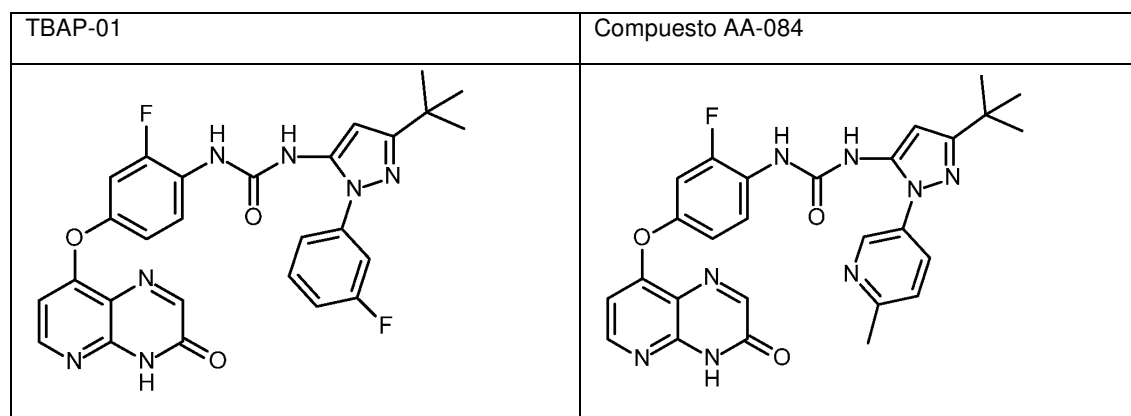
En comparación con el Compuesto AA-062 en Springer y cols., 2009, TBAP-01 es 9 veces más eficaz sobre xenoinjerto de melanoma con BRAF mutante A375M a la dosis eficaz máxima. Esto es sorprendente e inesperado debido a que AA-062 tiene una $C_{m\acute{a}x}$ 5 veces superior y una AUC 12 veces superior en comparación con TBAP-01.



Datos de Comparación - 6

10 En comparación con el Compuesto AA-084 en Springer y cols., 2009, TBAP-01 es:

- (a) 11 veces más potente sobre el ensayo de cinasa BRAF;
- (b) 8 veces más potente sobre el ensayo celular de pERK; y
- (c) 5 veces más potente sobre el ensayo de inhibición de la proliferación celular.



REFERENCIAS

Se cita en la presente un número de publicaciones a fin de describir y divulgar más a fondo la invención y el estado de la técnica de la que trata la invención. Las citas completas de estas referencias se proporcionan posteriormente.

- 5 Akula y cols., 2004, "Raf promotes human herpesvirus-8 (HHV-8/KSHV) infection", Oncogene, Vol. 23, pp. 5227-5241.
- Alitalo y cols., 1996, "Promoter for the receptor tyrosine kinase, Tie", Patente de EE. UU. Nº 5.877.020 concedida el 2 de marzo de 1999.
- Alon y cols., 1995, "Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity", Nature Med., Vol. 1, pp. 1024-1028.
- 10 Anastasaki y cols., 2012, "Continual low-level MEK inhibition ameliorates cardio-facio-cutaneous phenotypes in zebrafish", Disease Models & Mechanisms, Vol. 5, pp. 546-552.
- Antony y cols., 2013, "C-RAF Mutations Confer Resistance to RAF Inhibitors", Cancer Research, Vol. 73, pp. 4840-4851.
- 15 Arcaini y cols., 2012, "The *BRAF* V600E mutation in hairy cell leukemia and other mature B-cell neoplasms", Blood, Vol. 119, pp. 188-191.
- Asrih y cols., 2013, "Role of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in multifactorial adverse cardiac remodeling associated with Metabolic Syndrome", Mediators of Inflammation, Vol. 2013, Article ID No. 367245.
- Badalian-Very y cols., 2011, "Recent advances in the understanding of Langerhans cell histiocytosis", British Journal of Haematology, Vol. 156, pp. 163-172.
- 20 Belgore y cols., 2004, "Localisation of members of the vascular endothelial growth factor (VEGF) family and their receptors in human atherosclerotic arteries", J. Clin. Pathol., Vol. 57, pp. 266-272.
- Benn y cols., 1994, "Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade", PNAS, Vol. 91, pp. 10350-10354.
- Berry y cols., 2007, "TNF-alpha in asthma", Curr. Opin. Pharmacol., Vol. 7, No. 3, pp. 279-282.
- 25 Bos y cols., 1989, "Ras oncogenes in human cancer: a review", Cancer Research, Vol. 49, pp. 4682-4689.
- Bridges y cols., 2000, "Treatment of asthma with MEK inhibitors", publicación de solicitud de patente internacional (PCT) número WO 00/40235, publicada el 13 de julio de 2000.
- Byeon y cols., 2012, "The role of Src kinase in macrophage-mediated inflammatory responses", Mediators of Inflammation, Vol. 2012, Article ID No. 512926.
- 30 Calhoun y cols., 2003, "BRAF and FBXW7 (CDC4, FBW7, AGO, SEL10) Mutations in Distinct Subsets of Pancreatic Cancer", American Journal of Pathology, Vol. 163, pp. 1255-1260.
- Cantin y cols., 2007, "Pirazolyl urea derivatives useful in the treatment of cancer", publicación de solicitud de patente internacional (PCT) número WO 2007/059202 A2, publicada el 24 de mayo de 2007.
- Cantrell, 2003, "GTPases and T cell activation", Immunol. Rev., Vol. 192, pp. 122-130.
- 35 Chan y cols., 1996, "Regulation of antigen receptor signal transduction by protein tyrosine kinases", Curr. Opin. Immunol., Vol. 8, No. 3, pp. 394-401.
- Chapman y cols., 2011, "Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation", New England Journal of Medicine, Vol. 364, pp. 2507-2516.
- 40 Chapman y cols., 2011, "Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma", Nature, Vol. 471, pp. 467-472.
- Chun y cols., 2002, "Pharmaceutical composition for prevention and treatment of joint arthritis and a screening method thereof", publicación de patente internacional número WO 02/102367, publicada el 27 de febrero de 2002.
- 45 Ciampi y cols., 2005, "Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer", J. Clin. Invest., Vol. 115, pp. 94-101.

- Colville-Nash and Scott, 1992, "Angiogenesis and rheumatoid arthritis: pathogenic and therapeutic implications", Ann. Rhum. Dis., Vol. 51, p. 919.
- Cooper y cols., 1994, "Membrane-associated tyrosine kinases as molecular switches", Semin. Cell Biol., Vol. 5, No. 6, pp. 377-387.
- 5 Corcoran y cols., 2010, "BRAF Gene Amplification Can Promote Acquired Resistance to MEK Inhibitors in Cancer Cells Harboring the BRAF V600E Mutation", Sci. Signal., Vol. 3, ra84.
- Coulthard y cols., 2009, "p38MAPK: stress responses from molecular mechanisms to therapeutics", Trends Mol. Med., Vol. 15, pp. 369-379.
- 10 Courtneidge y cols., 1993, "The Src family of protein tyrosine kinases: regulation and functions", Dev. Suppl., pp. 57-64.
- Cuadrado y cols., 2010, "Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling", Biochem. J., Vol. 429, pp. 403-417.
- Damodar Reddy y cols., 2001, "Role of MAP kinase pathways in primitive neuroectodermal tumours", Anticancer Research, Vol. 21, pp. 2733-2738.
- 15 Davies y cols., 1996, "Raf and Mitogen-activated Protein Kinase Regulate Stellate Cell Collagen Gene Expression", J. Biol. Chem., Vol. 271, pp. 11039-11042.
- Davies y cols., 2002, "Mutations of the BRAF gene in human cancer", Nature, Vol. 417, pp. 949-954.
- Davis y cols., 1994, "Tie-2 ligand 1", Patente de EE. UU. Nº 5.879.672 concedida el 09 de marzo de 1999.
- Davis y cols., 1994, "TIE-2 ligand, and method of making", Patente de EE. UU. Nº 5,521,073 concedida el 28 de mayo de 1996.
- 20 Davis y cols., 1996, "Isolation of Angiopoietin-1, a Ligand for the TIE2 Receptor, by Secretion-Trap Expression Cloning", Cell, Vol. 87, pp. 1161-1169.
- Denekamp, 1993, "Angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy", Br. J. Rad., Vol. 66, pp. 181-196.
- 25 Dhomen y cols., 2009, "Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice", Cancer Cell, Vol. 15, pp. 294-303.
- Dixon y cols., 2001, "Method for treating chronic pain using MEK inhibitors", publicación de solicitud de patente internacional (PCT) número WO 01/05392, publicada el 25 de enero de 2001.
- Downward y cols., 2003, "Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy", Nature Reviews Cancer, Vol. 3, pp. 11-22.
- 30 Dudley y cols., 2000, "Treatment of arthritis with MEK inhibitors", publicación de solicitud de patente internacional (PCT) número WO 00/35436, publicada el 22 de junio de 2000.
- Ellis y cols., 2008, "VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity", Nature Reviews Cancer, Vol. 8, pp. 579-591.
- 35 Falchook y cols., 2012, "Dabrafenib in patients with melanoma, untreated brain metastases, and other solid tumours: a phase 1 dose-escalation trial", The Lancet, Vol. 379, pp. 1893-1901.
- Fernandes-Medarde, 2011, "Ras in Cancer and Developmental Diseases", Genes & Cancer, Vol. 2, pp. 344-358.
- Fidler y Ellis, 1994, "The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis", Cell, Vol. 79, pp. 185-188.
- 40 Flaherty y cols., 2010, "Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma", New England Journal of Medicine, Vol. 363, pp. 809-819.
- Flynn y cols., 2008, "Enzyme modulators and treatments", publicación se solicitud de patente de EE. UU. número US 2008/0113967 A1, publicada el 15 de mayo de 2008.
- Folkman y cols., 1992, "Angiogenesis", J. Biol. Chem., Vol. 267, pp. 10931-10934.
- Folkman, 1992, "The role of angiogenesis in tumour growth", Semin. Cancer Biol., Vol. 3, pp. 65-71.
- 45 Folkman, 1995, "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease", Nature Medicine, Vol. 1, pp. 27-31.

- Folkman, 1997, "Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview", EXS, Vol. 79, pp. 1-81.
- Friedlander y cols., 1995, "Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins", Science, Vol. 270, pp. 1500-1502.
- 5 Fujita y cols., 2004, "ERK and p38 mediate high-glucose-induced hypertrophy and TGF- α expression in renal tubular cells", Am. J. Physiol. Renal. Physiol., Vol. 286, p. F120.
- Fukuda y cols., 2007, "Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 2A Mediates Transformation through Constitutive Activation of the Ras/PI3-K/Akt Pathway", J. Virol., Vol. 81, pp. 9299-9306.
- Furuta y cols., 2012, "Nitrogenated aromatic heterocyclic ring derivative", publicación de solicitud de patente internacional (PCT) número WO 2012/008564 A1, publicada el 19 de enero de 2012.
- 10 Garnett y cols., 2004, "Guilty as charged: B-RAF es a human oncogene", Cancer Cell, Vol. 6, pp. 313-319.
- Gaudi y cols., 2011, "Molecular Bases of Cutaneous and Uveal Melanomas", Pathology Research International, Vol. 2011, ID Artículo N° 159421.
- Genot y cols., 2000, "Ras regulation and function in lymphocytes", Curr. Opin. Immunol., Vol. 12, pp. 289-294.
- 15 Geppert y cols., 1994, "Lipopolysaccharide signals activation of Tumour Necrosis Factor biosíntesis through the Ras/Raf-1/MEK/MAPK pathway", Mol. Med., Vol. 1, pp. 93-103.
- Gilbertsen y cols., 2000, "Use of a MEK inhibitor for preventing transplant rejection", publicación de solicitud de patente internacional (PCT) número WO 00/35435, publicada el 22 de junio de 2000.
- Girotti y cols., 2013, "Inhibiting EGF receptor or SRC family kinase signaling overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma", Cancer Discovery, Vol. 3, pp. 158-167.
- 20 Godowski y cols., 1997, "Tie ligand homologues", Patente de EE. UU. N° 6.030.831 concedida el 29 de febrero de 2000.
- Graf y cols., 1997, "Mitogen-Activated Protein Kinase Activation es Involved in Platelet-Derived Growth Factor-Directed Migration by Vascular Smooth Muscle Cells", Hypertension, Vol. 29, pp. 334-339.
- Gray-Schopfer y cols., 2007, "Melanoma biology and new targeted therapy", Nature, Vol. 445, pp. 851-857.
- 25 Greger y cols., 2012, "Combinations of BRAF, MEK, and PI3K/mTOR Inhibitors Overcome Acquired Resistance to the BRAF Inhibitor GSK2118436 Dabrafenib, Mediated by NRAS or MEK Mutations", Molecular Cancer Therapeutics, Vol. 11, pp. 909-920.
- Grosios y cols., 2004, "Angiogenesis inhibition by the novel VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, PTK787/ZK222584, causes significant anti-arthritis effects in models of rheumatoid arthritis", Inflamm. Res., Vol. 53, pp. 133-142.
- 30 Gu y cols., 2013, "Use of organic compound for the treatment of Noonan syndrome", publicación de solicitud de patente internacional (PCT) número WO 2013/033133, publicada el 07 de marzo de 2013.
- Haase y cols., 2001, "A role for mitogen-activated protein kinase activation by integrins in the pathogenesis of psoriasis", J. Clin. Invest., Vol. 108, pp. 527-536.
- 35 Haroche y cols., 2012, "High prevalence of *BRAF V600E* mutations in Erdheim-Chester disease but not in other non-Langerhans cell histiocytoses", Blood, Vol. 120, pp. 2700-2703.
- Hatzivassiliou y cols., 2011, "Determining sensitivity of cells to B-Raf inhibitor treatment by detecting K-ras mutation and RTK expression levels", publicación de solicitud de patente internacional (PCT) número WO 2011/028540 publicada el 10 de marzo de 2011.
- 40 Hatzivassiliou y cols., 2011, "Determining sensitivity of cells to B-Raf inhibitor treatment by detecting K-ras mutation and RTK expression levels", publicación de solicitud de patente internacional (PCT) número WO 2011/028540 publicada el 10 de marzo de 2011.
- Heidorn y cols., 2010, "Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumour progression through CRAF", Cell, Vol. 140, pp. 209-221.
- 45 Hu y cols., 2011, "Mutation that blocks ATP binding creates a pseudokinase stabilizing the scaffolding function of kinase suppressor of Ras, CRAF and BRAF", PNAS, Vol. 18, pp. 6067-6072.

- Hwang y cols., 2004, "Over-expression of c-raf-1 proto-oncogene in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma", Hepatology Research, Vol. 29, pp. 113-121.
- Ingber y cols., 1990, "Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth", Nature, Vol. 348, pp. 555-557.
- 5 Inoue y cols., 1998, "Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis", Circulation, Vol. 98, pp. 2108-2116.
- Jaffee y cols., 2000, "Inhibition of MAP Kinase Kinase (MEK) Results in an Anti-inflammatory Response in Vivo", Biochem. Biophys. Res. Com., Vol. 268, p. 647.
- 10 Jessen y cols., 2013, "MEK inhibition exhibits efficacy in human and mouse neurofibromatosis tumours", Journal of Clinical Investigation, Vol. 123, pp. 340-347.
- Ji y cols., 2002, "ERK MAP Kinase Activation in Superficial Spinal Cord Neurons Induces Prodynorphin and NK-1 Upregulation and Contributes to Persistent Inflammatory Pain Hypersensitivity", J. Neurosci., Vol. 22, p. 478.
- 15 Jo y cols., 2005, "MEK inhibitor, U0126, attenuates cisplatin-induced renal injury by decreasing inflammation and apoptosis", Kidney Intl., Vol. 67, pp. 458-466.
- Johnson y cols., 2001, "The role of MKK1/2 kinase activity in human cytomegalovirus infection", J. Gen. Virol., Vol. 82, pp. 493-497.
- Kahlon y cols., 1992, "Angiogenesis in atherosclerosis", Can. J. Cardiol., Vol. 8, p. 60.
- 20 Kam y cols., 2000, "TNF-alpha antagonists for the treatment of Crohn's disease", Expert Opin. Pharmacother., Vol. 1, pp. 615-622.
- Karim y cols., 2006, "Impaired inflammatory pain and thermal hyperalgesia in mice expressing neuron-specific dominant negative mitogen activated protein kinase kinase (MEK)", Mol. Pain., Vol. 2, p. 2.
- Keffer y cols., 1991, "Transgenic mice expressing human necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis", EMBO J., Vol. 10, No. 13, pp. 4025-4031.
- 25 Kjetil y cols., 2013, "Métodos and compositions for inhibition of activation of regulatory T cells", publicación de solicitud de patente internacional (PCT) número WO 2013/001372, publicada el 03 de enero de 2013.
- Kotoula y cols., 2009, "Mutational analysis of the BRAF, RAS and EGFR genes in human adrenocortical carcinomas", Endocrine-Related Cancer, Vol. 16, pp. 565-572.
- 30 Li y cols., 1998, "Activation of NF-kB via a Src-dependent Ras-MAPK-pp90rsk pathway is required for Pseudomonas aeruginosa-induced mucin overproduction in epithelial cells", PNAS, Vol. 95, pp. 5718-5723.
- Lin y cols., 2010, "VEGF and its receptor-2 involved in neuropathic pain transmission mediated by P2X2/3 receptor of primary sensory neurons", Brain Research Bulletin, Vol. 83, pp. 284-291.
- Lindauer y cols., 2012, "Dasatinib", Recent Results in Cancer Research, Vol. 184, pp. 83-102.
- 35 Link y cols., 2008, "Phosphodiesterase 4 inhibition but not beta-adrenergic stimulation suppresses tumor necrosis factor-alpha release in peripheral blood mononuclear cells in septic shock", Crit. Care, Vol. 12, No. 6, R159.
- Long y cols., 2011, "Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma", J. Clin. Oncol., Vol. 29, N° 10, pp. 1239-1246.
- Lorenz y cols., 2009, "Cardiac hypertrophy: Targeting Raf/MEK/ERK1/2-signaling", The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, Vol. 41, pp. 2351-2355.
- 40 Lowenberg y cols., 2005, "Specific Inhibition of c-Raf Activity by Semapimod Induces Clinical Remission in Severe Crohn's Disease", J. Immunol., Vol. 175, pp. 2293-2300.
- Luo y cols., 2002, "Coxsackievirus B3 Replication es Reduced by Inhibition of the Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) Signaling Pathway", J. Virol., Vol. 76, pp. 3365-3373.
- 45 Ma y cols., 2005, "The ERK/MAPK pathway, as a target for the treatment of neuropathic pain", Expert Opin Ther Targets, Vol. 9, p. 699.
- Maddahi y cols., 2010, "Cerebral ischemia induces microvascular pro-inflammatory cytokine expression via the MEK/ERK pathway", J. Neuroinflammation, Vol. 7, pp. 1-14.

- Mammas y cols., 2005, "Involvement of the ras genes in female genital tract cancer (Review)", International Journal of Oncology, Vol. 26, pp. 1241-1255.
- Martich y cols., 1991, "Detection of interleukin 8 and tumor necrosis factor in normal humans after intravenous endotoxin: the effect of antiinflammatory agents", J. Exp. Med., Vol. 173, pp 1021-1024.
- 5 Martin y cols., 2010, "Update on lymphocyte specific kinase inhibitors: a patent survey", Expert Opin. Ther. Pat., Vol. 20, pp. 1573-1593.
- Masabumi y cols., 2013, "Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases", J. Biochem., Vol. 153, pp. 13-19.
- 10 McCann y cols., 2010, "Apremilast, a novel PDE4 inhibitor, inhibits spontaneous production of tumour necrosis factor-alpha from human rheumatoid synovial cells and ameliorates experimental arthritis", Arthritis Res. Ther., Vol. 12, No. 3, R107.
- McKay y cols., 2011, "Complexity in KSR function revealed by Raf inhibitor and KSR structure studies", Small GTPases, Vol. 2, pp. 276-281.
- McMahon y cols., 2000, "VEGF receptor signaling in tumour angiogenesis", The Oncologist, Vol. 5, pp. 3-10.
- 15 Mei y cols., 2006, "Distribution, levels and phosphorylation of Raf-1 in Alzheimer's disease", J. Neurochem., Vol. 99, pp. 1377-1388.
- Mercer y cols., 2006, "Emerging role of MAP kinase pathways as therapeutic targets in COPD", Int. J. of COPD, Vol. 1, pp. 137-150.
- 20 Metzner y cols., 2012, "Fibroblast Growth Factor Receptors as Therapeutic Targets in Human Melanoma: Synergism with BRAF Inhibition", Journal of Investigative Dermatology, Vol. 131, pp. 2087-2095.
- Meyers y cols., 1996, "FGFR2 exon IIIa and IIIc mutations in Crozon, Jackson-Weiss, and Pfeiffer syndromes: evidence for missense changes, insertions, and a deletion due to alternative RNA splicing", Am. J. Hum. Genet., Vol. 58, pp. 491-498.
- 25 Milella y cols., 2001, "Therapeutic targeting of the MEK/MAPK signal transduction module in acute myeloid leukemia", Journal of Clinical Investigation, Vol. 108, pp. 851-859.
- Miura y cols., 2004, "Simvastatin suppresses coronary artery endothelial tube formation by disrupting Ras/Raf/ERK signaling", Atherosclerosis, Vol. 175, pp. 235-243.
- Montagut y cols., 2008, "Elevated CRAF as a Potential Mechanism of Acquired Resistance to BRAF Inhibition in Melanoma", Cancer Research, Vol. 68, pp. 4853-4861.
- 30 Mukherjee y cols., 2005, "Raf-1 expression may influence progression to androgen insensitive prostate cancer", Prostate, Vol. 64, pp. 101-107.
- Mukhopadhyay y cols., 2006, "Role of TNFalpha in pulmonary pathophysiology", Respir. Res., Vol. 7, p. 125.
- Murray y cols., 2011, "Respiratory formulations and compuestos for use therein", publicación de solicitud de patente internacional (PCT) número WO 2011/158044 A2, publicada el 22 de diciembre de 2011.
- 35 Mustonen y cols., 1995, "Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis", J. Cell Biol., Vol. 129, pp. 895-898.
- Nakamura y cols., 2006, "Novel strategies for the treatment of inflammatory bowel disease: Selective inhibition of cytokines and adhesion molecules", World J. Gastroenterol., Vol. 12, pp. 4628-4235.
- 40 Nazarian y cols., 2010, "Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation", Nature, Vol. 468, pp. 973-979.
- Niculescu-Duvaz y cols., 2006, "Imidazo[4,5-b]pyridin-2-one and oxazolo[4,5-b]pyridin-2-one compounds and analogs thereof as therapeutic compounds", publicación de solicitud de patente internacional (PCT) número WO 2006/043090 A1, publicada el 27 de abril de 2006.
- 45 Niculescu-Duvaz y cols., 2007, "Imidazo[4,5-b]pyridin-2-one and oxazolo[4,5-b]pyridin-2-one compounds and analogs thereof as therapeutic compounds", publicación de solicitud de patente internacional (PCT) número WO 2007/125330 A1, publicada el 08 de noviembre de 2007.
- Niculescu-Duvaz y cols., 2009, "Aryl-quinolyl compounds and their use", publicación de solicitud de patente internacional (PCT) número WO 2009/130487 A1, publicada el 29 de octubre de 2009.

- O'Reilly y cols., 1994, "Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma.", Cell, Vol. 79, pp. 315-328.
- Oeztuerk-Winder y cols., 2012, "The many faces of p38 mitogen-activated protein kinase in progenitor/stem cell differentiation", Biochem. J., Vol. 445, pp. 1-10.
- 5 Ozawa y cols., 2001, "Growth factors and their receptors in pancreatic cancer", Teratog. Carcinog. Mutagen., Vol. 21, pp. 27-44.
- Palanisamy y cols., 2010, "Rearrangements of the RAF Kinase Pathway in Prostate Cancer, Gastric Cancer and Melanoma", Nat. Med., Vol. 16, pp. 793-798.
- 10 Partanen y cols., 1992, "A novel endothelial cell surface receptor tyrosine kinase with extracellular epidermal growth factor homology domains", Mol. Cell Biol., Vol. 12, pp. 1698-1707.
- Partanen y cols., 1999, "Functions of Tie1 and Tie2 Receptor Tyrosine Kinases in Vascular Development", Curr. Topics Microbiol. Immunol., Vol. 237, pp. 159-172.
- Paulson y cols., 1995, "Receptor tyrosine kinases and the regulation of hematopoiesis", Semin. Immunol., Vol. 7, No. 4, pp. 267-277.
- 15 Payne y cols., 2001, "Human Papillomavirus Type 6b Virus-Like Particles Are Able To Activate the Ras-MAP Kinase Pathway and Induce Cell Proliferation", J. Virol., Vol. 75, pp. 4150-4157.
- Peacock y cols., 1992, "Angiogenesis inhibition suppresses collagen arthritis", J. Exp. Med., Vol. 175, pp. 1135-1138.
- Peacock y cols., 1995, "A novel angiogenesis inhibitor suppresses rat adjuvant arthritis", Cell. Immunol., Vol. 160, pp. 178-184.
- 20 Pelletier y cols., 2003, "In vivo selective inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 in rabbit experimental osteoarthritis is associated with a reduction in the development of structural changes", Arthritis & Rheumatism, Vol. 48, p. 1582-1593.
- Peters, 1998, "Vascular Endothelial Growth Factor and the Angiopoietins: Working Together to Build a Better Blood Vessel", Circ. Res., Vol. 83, No. 3, pp. 342-343.
- 25 Petrovan y cols., 2007, "DNA Vaccination Against VEGF Receptor 2 Reduces Atherosclerosis in LDL Receptor-Deficient Mice", Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, Vol. 27, pp. 1095-1100.
- Pinedo y cols., 2000, "The Role of VEGF in Tumour Angiogenesis", The Oncologist, Vol. 5, pp. 1-2.
- Pinner y cols., 2009, "CD44 splice variants in neurodegenerative diseases", publicación de solicitud de patente internacional (PCT) número WO 2009/007934, publicada el 15 de enero de anuary 2009.
- 30 Planz y cols., 2001, "MEK-specific inhibitor U0126 blocks spread of Bornuna disease virus in cultured cells", J. Virol., Vol. 75, pp. 4871-4877.
- Pleschka y cols., 2001, "Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade", Nature Cell Biology, Vol. 3, pp. 301-305.
- 35 Plomp y cols., 1998, "Pfeiffer syndrome type 2: further delineation and review of the literature", Am. J. Med. Genet., Vol. 75, pp. 245-251.
- Poulikakos y cols., 2010, "RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF", Nature, Vol. 464, pp. 427-430.
- Poulikakos y cols., 2011, "RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E)", Nature, Vol. 480, pp. 387-390.
- 40 Powers y cols., 2000, "Fibroblast growth factors, their receptors and signaling", Endocr. Relat. Cancer, Vol. 7, pp. 165-197.
- Riva y cols., 1995, "Differential c-myc, c-jun, c-raf and p53 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck: Implication in drug and radioresistance", European Journal of Cancer ParteB: Oral Oncology, Vol. 31, pp. 384-391.
- 45 Rotsos y cols., 2008, "Cystoid macular edema", Clin. Ophthalmol., Vol. 2, pp. 919-930.
- Rubinstein y cols., 2010, "Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032", J. Transl. Med., Vol. 8, p. 67.

- Salama y cols., 2013, "BRAF in Melanoma: Current strategies and future directions", Clinical Cancer Research, Vol. 19, No. 16, pp. 4326-4334.
- 5 Schindler y cols., 2011, "Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumours reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma", Acta Neuropathologica, Vol. 121, pp. 397-405.
- Schreck y cols., 2006, "Raf kinases: Oncogenesis and drug discovery", International Journal of Cancer, Vol. 119, pp. 2261-2271.
- 10 Shakhov y cols., 1990, "Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages", J. Exp. Med., Vol. 171, pp. 35-47.
- Shapira y cols., 1996, "Protection against endotoxic shock and lipopolysaccharide-induced local inflammation by tetracycline: correlation with inhibition of cytokine secretion", Infect. Immun., Vol. 64, No. 3, pp. 825-828.
- Shi y cols., 2012, "Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance", Nature Commun., Vol. 3, p. 724.
- 15 Sievert y cols., 2013 "Paradoxical activation and RAF inhibitor resistance of BRAF protein kinase fusions characterizing pediatric astrocytomas", PNAS, Vol. 110, pp. 5957-5962.
- Smalley y cols., 2009, "CRAF inhibition induces apoptosis in melanoma cells with non-V600E BRAF mutations", Oncogene, Vol. 28, pp. 85-94.
- 20 Smith y cols., 2007, "Urea compounds useful in the treatment of cancer", publicación de solicitud de patente internacional (PCT) número WO 2007/064872 A2, publicada el 07 de junio de 2007.
- Smith y cols., 2010, "Vascular Endothelial Growth Factor Receptors VEGFR-2 and VEGFR-3 Are Localized Primarily to the Vasculature in Human Primary Solid Cancers", Clin. Cancer Res., Vol. 16, pp. 3548-3561.
- Solit y cols., 2006, "BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition", Nature, Vol. 439, pp. 358-362.
- 25 Song y cols., 2005, "Activation of ERK/CREB pathway in spinal cord contributes to chronic constrictive injury-induced neuropathic pain in rats", Acta Pharmacol Sin., Vol. 26, p. 789.
- Sosman y cols., 2012, "Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib", New England Journal of Medicine, Vol. 366, pp. 707-714.
- Springer y cols., 2009, "Pyrido[2,3-b]pirazine-8-substituted compounds and their use", publicación de solicitud de patente internacional (PCT) número WO 2009/077766 A1, publicada el 25 de junio de 2009.
- 30 Springer y cols., 2011, "1-(5-tert-Butyl-2-phenyl-2H-pyrazol-3-yl)-3-[2-fluoro-4-(1-methyl-2-oxo-2,3-dihydro-1H-imidazo[4,5-b]pyridin-7-yloxy)-phenyl]urea and related compuestos and their use in therapy", publicación de solicitud de patente internacional (PCT) número WO 2011/092469 A1, publicada el 04 de agosto de 2011.
- Stratton y cols., 2003, "Genes", publicación de solicitud de patente internacional (PCT) número WO 03/056036 A2 publicada el 10 de julio de 2003.
- 35 Straussman y cols., 2012, "Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion", Nature, Vol. 487, pp. 500-506.
- Suijkerbuijk y cols., 2010, "Development of novel, highly potent inhibitors of V-RAF murine sarcoma viral oncogene homologue B1 (BRAF): increasing cellular potency through optimization of a distal heteroaromatic group", J. Med. Chem., Vol. 53, pp. 2741-2756.
- 40 Sullivan y cols., 2011, "BRAF in melanoma: pathogenesis, diagnosis, inhibition, and resistance", J. Skin Cancer, Vol. 2011, Article ID No. 423239.
- Suri y cols., 1996, "Requisite Role of Angiopoietin-1, a Ligand for the TIE2 Receptor, during Embryonic Angiogenesis", Cell, Vol. 87, pp. 1171-1180.
- 45 Tam y cols., 2009, "Blockade of VEGFR2 and Not VEGFR1 Can Limit Diet-Induced Fat Tissue Expansion: Role of Local versus Bone Marrow-Derived Endothelial Cells", PLoS One, Vol. 4, e4974.
- Taraboletti y cols., 1995, "Inhibition of angiogenesis and murine hemangioma growth by batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases", J. Natl. Cancer Inst., Vol. 87, p. 293.

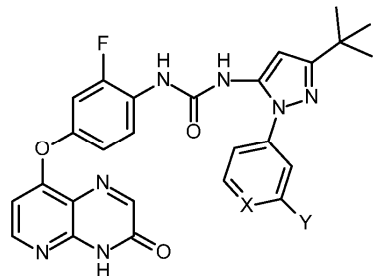
- Thalhamer y cols., 2008, "MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation", Rheumatology, Vol. 47, pp. 409-414.
- Vergani y cols., 2011, "Identification of MET and SRC activation in melanoma cell lines showing primary resistance to PLX4032", Neoplasia, Vol. 13, pp. 1132-1142.
- 5 Vikkula y cols., 2004, "Medical use of ras antagonists for the treatment of capillary malformation", publicación de solicitud de patente internacional (PCT) número WO 2004/083458, publicada el 30 de septiembre de 2004.
- Villanueva y cols., 2011, "Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by co-targeting MEK and IGF-1R/PI3K", Cancer Cell, Vol. 18, pp. 683-695.
- 10 Wan y cols., 2004, "Mechanism of activation of RAF-ERK signalling pathway by oncogenic mutations in B-RAF", Cell, Vol. 116, pp. 855-867.
- Wang y cols., 1997, "Antisense targeting of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-1 in human melanomas blocks intratumoural angiogenesis and tumour growth", Nature Medicine, Vol. 3, pp. 887-893.
- 15 Wang y cols., 2003, "Significant Neuroprotection against Ischemic Brain Injury by Inhibition of the MEK1 Protein Kinase in Mice: Exploration of Potential Mechanism Associated with Apoptosis", J. Pharmacol. Exp. Ther., Vol. 304, p. 172.
- Wang y cols., 2004, "Inhibition of MEK/ERK 1/2 pathway reduces pro-inflammatory cytokine interleukin-1 expression in focal cerebral ischemia", Brain Res., Vol. 996, p. 55.
- 20 Ward y cols., 2012, "Targeting oncogenic Ras signaling in hematologic malignancies", Blood, Vol. 120, pp. 3397-3406.
- Wellbrock y cols., 2004, "V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes", Cancer Research, Vol. 64, pp. 2338-2342.
- Whittaker y cols., 2010, "A novel, selective and efficacious nanomolar piridopiracinone inhibitor of V600EBRAF", Cancer Research, Vol. 70, No. 20, pp. 8036-8044.
- 25 Wilks y cols., 1990, "Structure and function of the protein tyrosine kinases", Progress in Growth Factor Research, Vol. 2, pp. 97-111.
- Wilson y cols., 2012, "Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors", Nature, Vol. 487, pp. 505-509.
- Xing, 2013, "Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer", Nature Reviews Cancer, Vol. 13, pp. 184-199.
- 30 Yancopoulos y cols., 1998, "Vasculogenesis, Angiogenesis, and Growth Factors: Ephrins Enter the Fray at the Border", Cell, Vol. 93, pp. 661-664.
- Yang y cols., 1999, "Regulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infectivity by the ERK Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway", J. Virol., Vol. 73, pp. 3460-3466.
- 35 Yao y cols., 1997, "Lipopolysaccharide induction of the tumor necrosis factor-alpha promoter in human monocytic cells. Regulation by Egr-1, c-Jun and NF-kappaB transcription factors", J. Biol. Chem., Vol. 272, pp. 17795-17801.
- Yeatman y cols., 2004, "A renaissance for SRC", Nature Reviews Cancer, Vol. 4, pp. 470-480.
- Young y cols., 2009, "Ras signaling and therapies", Advances in Cancer Research, Vol. 102, pp. 1-17.
- 40 Yu y cols., 2000, "Loss of fibroblast growth factor receptor 2 ligand binding specificity in Apert syndrome", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 97, pp. 14536-14541.
- Zamboni y cols., 2010, "Novel hinge binder improves activity and pharmacokinetic properties of BRAF inhibitors", J. Med. Chem., Vol. 53, No. 15, pp. 5639-5655.
- Zennadi y cols., 2012, "Methods of treating hemoglobinopathies", publicación de solicitud de patente internacional (PCT) número WO 2012/149547, publicada el 01 de noviembre de 2012.
- 45 Zhang y cols., 2012, "Activation of the Ras/Raf/MEK Pathway Facilitates Hepatitis C Virus Replication via Attenuation of the Interferon-JAK-STAT Pathway", J. Virol., Vol. 86, pp. 1544-1554.

Zhang y cols., 2012, "Targeting Src family kinases in anti-cancer therapies: turning promise into triumph", Trends Pharmacol. Sci. Med., Vol. 33, pp. 122-128.

Zouki y cols., 2000, "Peroxynitrite induces integrin-dependent adhesion of human neutrophils to endothelial cells via activation of the Raf-1/MEK/Erk pathway", FASEB J., Vol. 15, pp. 25-27.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado de compuestos de la siguiente fórmula, y sales farmacéuticamente aceptables, N-óxidos, hidratos y solvatos de los mismos:



5 donde: =X- es independientemente =CH- o =N-;

-Y es independientemente -Y¹, -Y², -Y³, -Y⁴, -Y⁵ o -Y⁶;

-Y¹ es independientemente -F, -Cl, -Br o -I;

-Y² es alquilo C₁₋₄ saturado lineal o ramificado;

-Y³ es haloalquilo C₁₋₄ saturado lineal o ramificado;

10 -Y⁴ es -OH;

-Y⁵ es alcoxi C₁₋₄ saturado lineal o ramificado; e

-Y⁶ es haloalcoxi C₁₋₄ saturado lineal o ramificado.

2. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que =X- es =CH-.

3. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que =X- es =N-.

15 4. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que:

-Y¹, si está presente, es -F;

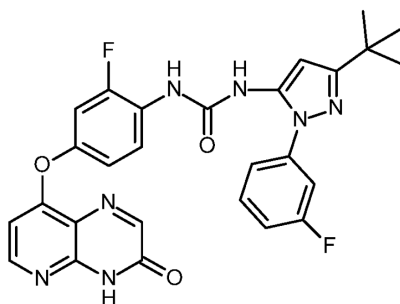
-Y², si está presente, es Me;

-Y³, si está presente, es -CF₃;

-Y⁵, si está presente, es -O-Me;

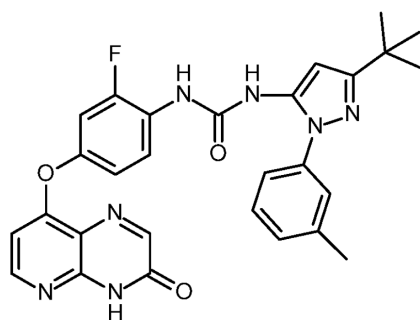
20 -Y⁶, si está presente, es -O-CF₃.

5. Un compuesto según la reivindicación 1, seleccionado del siguiente compuesto y sales farmacéuticamente aceptables, N-óxidos, hidratos y solvatos del mismo:



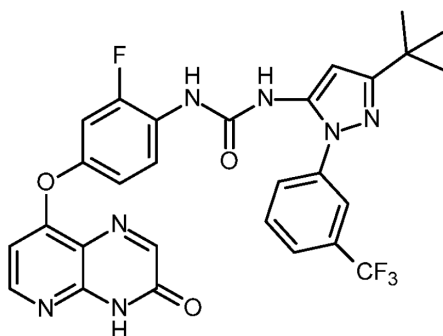
(TBAP-01).

25 6. Un compuesto según la reivindicación 1, seleccionado del siguiente compuesto y sales farmacéuticamente aceptables, N-óxidos, hidratos y solvatos del mismo:



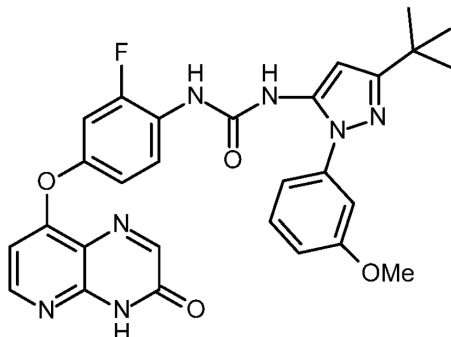
(TBAP-02).

7. Un compuesto según la reivindicación 1, seleccionado del siguiente compuesto y sales farmacéuticamente aceptables, N-óxidos, hidratos y solvatos del mismo:



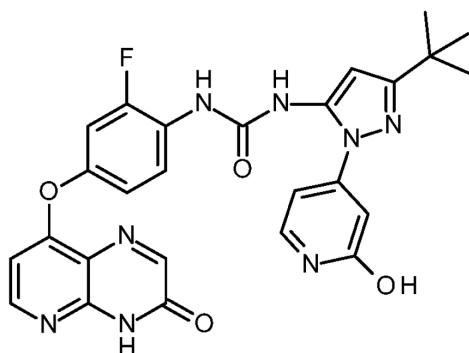
(TBAP-03).

5 8. Un compuesto según la reivindicación 1, seleccionado del siguiente compuesto y sales farmacéuticamente aceptables, N-óxidos, hidratos y solvatos del mismo:



(TBAP-04).

9. Un compuesto según la reivindicación 1, seleccionado del siguiente compuesto y sales farmacéuticamente aceptables, N-óxidos, hidratos y solvatos del mismo:



(TBAP-05).

10

10. Una composición que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

11. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para el uso en un método de tratamiento del cuerpo de un ser humano o un animal mediante terapia.

12. Un compuesto para el uso según la reivindicación 11, en un método de tratamiento de: un trastorno proliferativo; cáncer; inflamación; un trastorno inmunológico; una infección viral; un trastorno fibrótico; un trastorno asociado con una forma mutada de RAF; un trastorno mejorado por la inhibición de RAF; un trastorno mejorado por la inhibición de BRAF mutante; un trastorno mejorado por la inhibición de BRAF y CRAF; un trastorno asociado con mutaciones en RAS y/o la activación de la ruta de MAPK; un trastorno mejorado por la inhibición de SRC, p38, FGFR, VEGFR-2 (KDR) y/o LCK.
13. Un compuesto para el uso según la reivindicación 11, en un método de tratamiento de: un trastorno proliferativo.
14. Un compuesto para el uso según la reivindicación 11, en un método de tratamiento de: cáncer.
15. Un compuesto para el uso según la reivindicación 11, en un método de tratamiento de: cáncer pancreático; cáncer pulmonar no microcítico (NSCLC, por sus siglas en inglés); neoplasmas ováricos; neoplasma peritoneales; neoplasmas de las trompas de Falopio; cáncer pulmonar y efusión pleural asociada; cáncer de células escamosas recurrente o metastásico de la cabeza y el cuello; carcinoma nasofaríngeo localmente avanzado; glioblastoma (p. ej., glioblastoma multiforme; glioblastoma de células gigantes); gliosarcoma; glioma pontino intrínseco difuso; sarcoma de Kaposi relacionado con HIV; mieloma múltiple; carcinoma de células renales; adenocarcinoma gástrico metastásico; leucemia mieloide aguda (AML); carcinoma hepatocelular; dermatofibrosarcoma; cáncer tiroideo medular (MTC, por sus siglas en inglés); cáncer tiroideo papilar; cáncer tiroideo folicular; síndrome mielodisplásico; neurofibromatosis tipo 1; neurofibroma plexiforme; neurofibroma de la médula espinal; cáncer de mama; neoplasmas del tracto biliar; cáncer de cuello uterino; cáncer de próstata; melanoma; carcinoma de vejiga urinaria; carcinoma de uretra; carcinoma de uréter; carcinoma renal; carcinoma pélvico; sarcoma; liposarcoma; cáncer de colon; osteosarcoma; carcinoma sinovial; neuroblastoma; o rhabdomyosarcoma.
16. Un compuesto para el uso según la reivindicación 11, en un método de tratamiento de: melanoma maligno; carcinoma colorrectal; carcinoma colorrectal metastásico; cáncer tiroideo folicular; cáncer tiroideo insular; cáncer tiroideo papilar; carcinoma ovárico; carcinoma ovárico de baja malignidad; cáncer pulmonar no microcítico; tricoleucemia; colangiocarcinoma; glioma pediátrico de baja malignidad (p. ej., astrocitoma pilocítico; ganglioglioma; xantastrocitoma pleomórfico); mieloma múltiple; carcinoma medular del páncreas; o adenocarcinoma ductal pancreático.
17. Un compuesto para el uso según la reivindicación 11, en un método de tratamiento de: melanoma maligno.
18. Un compuesto para el uso según la reivindicación 11, en un método de tratamiento de: carcinoma colorrectal.
19. Un compuesto para el uso según la reivindicación 11, en un método de tratamiento de: adenocarcinoma pancreático.
20. Un compuesto para el uso según la reivindicación 11, en un método de tratamiento de: un trastorno asociado con una forma mutada de RAF.
21. Un compuesto para el uso según la reivindicación 11, en un método de tratamiento de: un trastorno resistente al tratamiento con un inhibidor de RAF conocido.
22. Un compuesto para el uso según la reivindicación 11, en un método de tratamiento de: un trastorno resistente al tratamiento con una combinación de un inhibidor de RAF conocido y un inhibidor de MEK conocido.
23. Un compuesto para el uso según la reivindicación 11, en un método de tratamiento de: un trastorno resistente al tratamiento con un anticuerpo conocido.
24. Un compuesto para el uso según la reivindicación 11, en un método de tratamiento de: una enfermedad inflamatoria seleccionada de: fibrosis quística; hipertensión pulmonar; sarcoidosis pulmonar; fibrosis pulmonar idiopática; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) (incluyendo bronquitis crónica y enfisema); asma; asma pediátrica; dermatitis atópica; dermatitis alérgica; dermatitis de contacto; psoriasis; rinitis alérgica; rinitis; sinusitis; conjuntivitis; conjuntivitis alérgica; queratoconjuntivitis seca (ojo seco); glaucoma; retinopatía diabética; edema macular (incluyendo edema macular diabético); oclusión de la vena retinal central (CRVO); degeneración macular seca y/o húmeda asociada a la edad (AMD); inflamación después de una operación de cataratas; uveítis (incluyendo uveítis posterior, anterior y panuveítis); rechazo de injerto corneal y trasplante de células límbicas; enteropatía sensible al gluten (enfermedad celíaca); esofagitis eosinofílica; enfermedad intestinal de injerto contra el hospedador; enfermedad de Crohn; y colitis ulcerativa.
25. Un compuesto para el uso según la reivindicación 11, en un método de tratamiento de: asma o COPD.