



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 268**

51 Int. Cl.:
C07D 487/04 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08786828 .7**
96 Fecha de presentación : **04.08.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2188290**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.05.2010**

54 Título: **Derivados de pirazolo[3,4-D]-pirimidina como agente antiproliferativos.**

30 Prioridad: **14.08.2007 US 955653 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.10.2011

73 Titular/es: **F. Hoffmann-La Roche AG.**
Grenzacherstrasse, 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es: **Bartkovitz, David Joseph;**
Chu, Xin-Jie y
Luk, Kin-Chun Thomas

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

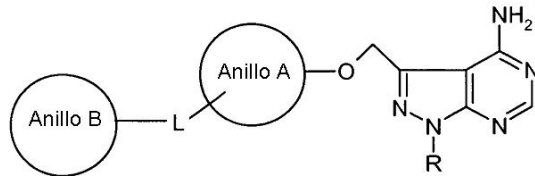
ES 2 366 268 T3

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 pirazolo[3,4-D]-pirimidina como agentes antiproliferativos

5 La presente invención está dirigida a nuevos derivados pirazolo[3,4-d]pirimidina de fórmula



y sales aceptables a nivel farmacéutico y ésteres de la misma, en la que R, el anillo A, L y el anillo B son como se describen aquí.

10 Estos compuestos y sus sales y ésteres aceptables a nivel farmacéutico inhiben la quinasa Raf y poseen actividad antiproliferativa. Como tales, son útiles en el tratamiento o control de los trastornos proliferativos como el cáncer, en particular de los tumores sólidos. Esta invención también está dirigida a una composición y una formulación de dosis unitaria que comprende tal compuesto o una sal o éster aceptable a nivel farmacéutico del mismo, los métodos para
15 preparar tales compuestos, y los compuestos, o sus sales o ésteres aceptables a nivel farmacéutico, para su utilización en el tratamiento de trastornos proliferativos, en particular de tumores sólidos, y más concretamente de tumores de mama, tumores de pulmón, tumores de colon, tumores de próstata y melanoma.

Antecedentes de la invención

20 Muchos estados o enfermedades se caracterizan por una proliferación y diferenciación descontrolada de células. Estos estados o enfermedades incluyen una serie de tipos celulares y enfermedades como el cáncer, la aterosclerosis y la restenosis. En muchos de estos estados o enfermedades, las quinasas, importantes enzimas celulares que realizan funciones esenciales mediante la regulación de la división y proliferación celulares, parecen
25 jugar un papel decisivo.

Los mecanismos moleculares y las vías de señalización que regulan la proliferación y la supervivencia celulares están recibiendo una atención considerable como dianas potenciales de estrategias antitumorales. Recientemente, ha habido un notable aumento de los esfuerzos dirigidos a alcanzar la vía de las MAPK, que integra un amplio grupo
30 de señales proliferativas iniciadas por las quinasas de tirosina receptoras (RTK) y receptores acoplados a proteína G.

La cascada de señalización de las MAPK incluye la proteína G Ras que actúa a un nivel anterior al de un núcleo modular que consiste en 3 quinasas: Raf, MEK1/2, y ERK1/2. Raf fosforila y por lo tanto activa a MEK1/2, que a su
35 vez, acaban en último término dando lugar a la activación de ERK1/2. La quinasa Raf se ha considerado durante mucho tiempo una diana atractiva para el descubrimiento de nuevos fármacos debido a su importancia como potencial punto de control de la transducción de señales relacionadas con el cáncer (Strumberg y Seeber, *Onkologie*, 2005, 28: 101-107; Beeram et al., *J. Clin. Oncol.* 2005, 23: 6771-6790). La importancia de la cascada de señalización de las MAPK para la proliferación y supervivencia de las células tumorales ha aumentado
40 recientemente con el descubrimiento de las mutaciones activadoras de B-Raf en tumores humanos. Se han identificado mutaciones activadoras de Raf en melanomas, cáncer de tiroides, colon y otros tumores (Strumberg y Seeber, *Onkologie*, 2005, 28:101-107; Bollag et al., *Current Opinion in Investigational Drugs*, 2003, 4:1436-1441).

Por lo tanto, además de un papel en el control de los tumores con las mutaciones de Ras y los receptores de factores de crecimiento activados, los inhibidores de la quinasa Raf podrían poseer un potencial terapéutico en los
45 tumores que son portadores de un oncogén B-Raf (Sharma et al., *Cancer Res.* 2005, 65: 2412-2421).

La familia de las quinasas de serina/treonina Raf de mamíferos consiste en tres proteínas de 68 a 74 kD denominadas A-Raf, B-Raf y C-Raf (Raf-1), que comparten las regiones reguladoras amino-terminales altamente conservadas y los dominios catalíticos del extremo carboxilo. Las proteínas Raf normalmente son citosólicas pero
50 son reclutadas en la membrana plasmática por la pequeña proteína G Ras. El reclutamiento por Ras es un paso esencial para la activación de Raf por los factores de crecimiento, citoquinas y hormonas. En la membrana, la activación de Raf ocurre a través de un proceso muy complejo que involucra cambios de conformación, la unión a otras proteínas, la unión a lípidos, y la fosforilación y defosforilación de algunos residuos.

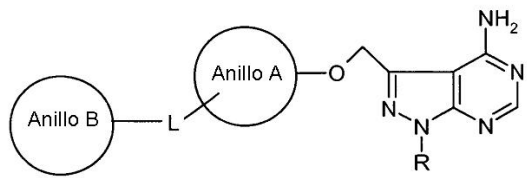
55 Se han descubierto una serie de agentes que interfieren con la quinasa Raf, lo que incluye oligonucleótidos antisentido y pequeñas moléculas. Estos inhibidores evitan la expresión de la proteína Raf, bloquean la interacción Ras/Raf u obstruyen su actividad quinasa. La regulación negativa de la actividad de B-Raf mediante siRNA o a través del inhibidor de la quinasa BAY-43-9006 conduce a la inhibición del crecimiento de células de melanoma y la

reducción de B-Raf mediada por siRNA da lugar a un potencial tumorigénico reducido en las células 1205 Lu. Los inhibidores de Raf que actualmente se están evaluando clínicamente muestran signos prometedores de eficacia antitumoral con un perfil de seguridad muy tolerable. El más avanzado a nivel clínico es el inhibidor de Raf BAY 43-9006, que se ha aprobado recientemente por la FDA para el tratamiento del carcinoma de células renales metastático con ensayos clínicos de fase II adicionales para el tratamiento de otros cánceres.

A pesar de los progresos que se han conseguido, se continúan buscando compuestos de bajo peso molecular que sean útiles para el tratamiento de una amplia variedad de tumores y otros trastornos proliferativos, lo que incluye la restenosis, angiogénesis, retinopatía diabética, psoriasis, adhesiones quirúrgicas, degeneración macular y aterosclerosis. Por lo tanto, existe una fuerte necesidad de proporcionar composiciones, compuestos farmacéuticos y/o medicamentos con actividad antiproliferativa. Tales composiciones, compuestos farmacéuticos y/o medicamentos pueden poseer no sólo una actividad, sino también dar lugar a efectos colaterales reducidos en comparación con otros agentes antiproliferativos. Además, el espectro de tumores que responden al tratamiento con tales composiciones, compuestos farmacéuticos y/o medicamentos puede ser amplio. Los compuestos activos de este tipo pueden ser adecuados en la indicación mencionada como agentes únicos y/o en terapias de combinación, en conjunto con otros agentes terapéuticos, con radiación, con procedimientos quirúrgicos, tratamiento de calor o cualquier otro tratamiento conocido en las indicaciones mencionadas.

Descripción detallada de la invención

La presente invención está relacionada con un compuesto de fórmula (1),



en la que

R es alquilo inferior;

el anillo A se selecciona de entre el grupo que consiste en:

heteroarilo;

heteroarilo sustituido por de 1 a 5 sustituyentes independientemente seleccionados de entre el grupo que consiste en alquilo inferior; halógeno; hidroxilo; alcoxi inferior; alcoxi inferior sustituido por hidroxilo o alcoxi inferior; y ciano;

fenilo; y

fenilo sustituido por de 1 a 4 sustituyentes independientemente seleccionados de entre el grupo que consiste en alquilo inferior; halógeno; hidroxilo; alcoxi inferior; alcoxi inferior sustituido por hidroxilo o alcoxi inferior; y ciano;

el anillo B se selecciona de entre el grupo que consiste en:

heteroarilo;

heteroarilo sustituido por de 1 a 5 sustituyentes seleccionados de entre el grupo que consiste en alquilo inferior; alquilo fluorado; alquilo sustituido con arilo; hidroxilo; alcoxi inferior; alcoxi inferior sustituido por hidroxilo o alcoxi inferior; halógeno; y $-NR^1R^2$;

fenilo; y

fenilo sustituido por de 1 a 5 sustituyentes seleccionados de entre el grupo que consiste en alquilo inferior; alquilo fluorado; alquilo sustituido con arilo; hidroxilo; alcoxi inferior; alcoxi inferior sustituido por hidroxilo o alcoxi inferior; halógeno; ciano; y $-NR^1R^2$;

R^1 y R^2 se seleccionan independientemente el uno del otro de entre el grupo que consiste en hidrógeno; alquilo inferior; y alquilo inferior sustituido con hidroxilo o alcoxi inferior; y R^1 y R^2 , junto con el N, puede formar un anillo heterocíclico de 5 o 6 miembros; y L se selecciona de entre el grupo que consiste en un enlace, $-OCH_2-$, $-CH_2O-$, $-NHCO-$, $-CONH-$, $-O-$, $-OCH_2CH_2-$, $-CH_2OCH_2-$, $-CH_2CH_2O-$, $-CF=CH-$, $-CH=CF-$, $-NH-$, $-NHCH_2-$, $-CH_2NH-$, $-SCH_2-$, $-CH_2S-$, $-SOCH_2-$, $-CH_2SO-$, $-SO_2CH_2-$, $-CH_2SO_2-$, $-S-$, $-CH=CH-$, y alquilo inferior;

con la condición de que, cuando L es un enlace, el anillo B es un azol sustituido por de 1 a 4 sustituyentes seleccionados de entre el grupo que consiste en: alquilo inferior; alquilo fluorado; alquilo sustituido con arilo; hidroxilo; alcoxi inferior; alcoxi inferior sustituido con hidroxilo o alcoxi inferior; halógeno; ciano; y $-NR^1R^2$;

o una sal o éster aceptable a nivel farmacéutico de tal compuesto.

Los presentes compuestos son pequeñas moléculas inhibitoras de la quinasa Raf, y por lo tanto son útiles como agentes antitumorales selectivos.

- 5 El término "alquenilo", tal y como se utiliza aquí, se refiere a un grupo hidrocarburo de a cadena sencilla o ramificada con al menos un doble enlace y de 2 a 6, preferiblemente de 2 a 4 átomos de carbono. Son ejemplos de "grupos alquenilo" el vinilo (etenilo), alilo, isopropenilo, 1-propenilo, 2-metil-1-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo, 2-etil-1-butenilo, 3-metil-2-butenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-pentenilo, 4-pentenilo, 4-metil-3-pentenilo, 1-hexenilo, 2-hexenilo, 3-hexenilo, 4-hexenilo y 5-hexenilo.
- 10 Los términos "alcoxi" y "alcoxilo", tal como se utilizan aquí, se refieren a un grupo en el que un alquilo (como se ha definido anteriormente) está unido a un átomo de oxígeno. El término "alcoxi inferior" se refiere a un grupo en el que un alquilo inferior (como se ha definido anteriormente) está unido a un átomo de oxígeno. Los grupos alcoxi inferior típicos incluyen metoxi, etoxi, isopropoxi o propoxi, butiloxi y similares. También se incluyen en el significado de alcoxi los alcoxi sustituidos con alcoxi, por ejemplo etoxietoxi, metoxietoxi, metoxietoxietoxi y similares, y las cadenas laterales sustituidas con, por ejemplo, dimetilaminoetoxi, dietilaminoetoxi y similares.
- 15 El término "alquilo", tal y como se utiliza aquí, se refiere a un grupo hidrocarburo saturado de cadena sencilla o ramificada con entre 1 y alrededor de 20 átomos de carbono, y en ciertas realizaciones, entre 1 y alrededor de 7 átomos de carbono. El término "alquilo inferior" se refiere a un grupo alquilo con entre 1 y 6 átomos de carbono, y en ciertas realizaciones, entre 1 y 4 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, s-butilo, t-butilo, n-pentilo y s-pentilo. El término "alquilo fluorado" significa un alquilo como se ha definido anteriormente, en el que uno o varios átomos de hidrógeno se han reemplazado por flúor. Son ejemplos el trifluorometilo, pentafluoroetilo y similares.
- 20 El término "alquinilo", tal y como se utiliza aquí, se refiere a un grupo hidrocarburo de cadena sencilla o ramificada con al menos un triple enlace y entre 2 y 6, preferiblemente entre 2 y 4 átomos de carbono. Son ejemplos de "grupos alquinilo" el etinilo, 1-propinilo, 2-propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 3-butinilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo, 3-pentinilo, 4-pentinilo, 1-hexinilo, 2-hexinilo, 3-hexinilo, 4-hexinilo y 5-hexinilo.
- 25 El término "arilo", tal y como se utiliza aquí, se refiere a un grupo hidrocarburo aromático monocíclico o bicíclico, que preferiblemente contiene de 6 a 10 átomos de carbono en el anillo. Los grupos arilo preferibles incluyen, pero no se limitan a, fenilo, naftilo, toliilo y xiloilo.
- 30 El término "azol", tal y como se utiliza aquí, se refiere a un heteroarilo de 5 miembros (definido a continuación) en la que al menos uno de los heteroátomos (definidos a continuación) es nitrógeno. Un "oxadiazol" es un azol con tres heteroátomos, siendo dos de ellos nitrógeno y uno oxígeno. Un "triazol" es un azol con tres heteroátomos, siendo los tres nitrógeno. Un "tetrazol" es un azol con cuatro heteroátomos, siendo los cuatro nitrógeno.
- 35 El término "transportador", tal y como se utiliza aquí, se refiere a un vehículo inerte a nivel farmacéutico (por ejemplo, un solvente o agente de suspensión) útil para la liberación de un compuesto activo, por ejemplo, un compuesto de fórmula (I) (definido a continuación), en un paciente.
- 40 El término "cicloalquenilo", tal y como se utiliza aquí, se refiere a un grupo hidrocarburo no aromático, monocíclico o policíclico, estable, que es insaturado y que contiene de 5 a 10 átomos en el anillo. Los ejemplos de cicloalquenilo incluyen, pero no se limitan a, ciclopentenilo o ciclohexenilo.
- 45 El término "cicloalquilo", tal y como se utiliza aquí, se refiere a un grupo hidrocarburo saturado no aromático, monocíclico o policíclico, estable, que contiene de 3 a 10 átomos en el anillo. Los ejemplos de cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, adamantilo, ciclooctilo, bicicloalquilos, lo que incluye biciclooctanos como [2.2.2]biciclooctano o [3.3.0]biciclooctano, bicliclononanos como [4.3.0]bicliclononano, y biciclodecanos como [4.4.0]biciclodecano (decalin), y compuestos spiro.
- 50 El término "excipiente", tal y como se utiliza aquí, se refiere a una sustancia inerte a nivel farmacéutico.
- 55 El término "halógeno", tal y como se utiliza aquí, se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo, preferiblemente flúor y cloro.
- 60 El término "heteroarilo", tal y como se utiliza aquí, se refiere a un grupo aromático mono o bicíclico que contiene al menos un heteroátomo. Los grupos heteroarilo preferibles incluyen, pero no se limitan a, tienilo, furilo, indolilo, pirrolilo, piridinilo, pirazinilo, oxazolilo, oxadiazolilo, tiazolilo, quinolinilo, pirimidinilo, imidazol, triazolilo y tetrazolilo. En el caso de un grupo heteroarilo bicíclico, debe entenderse que los átomos del anillo de un anillo pueden ser todos ellos carbono mientras el otro anillo puede contener un heteroátomo.
- 65 El término "heterociclo", tal y como se utiliza aquí, se refiere a un grupo no aromático, saturado o parcialmente insaturado, mono o bicíclico, de 4 a 8 miembros que contiene de 1 a 3 "heteroátomos". El término "heteroátomo", como se utiliza aquí, se refiere a un átomo del anillo que es nitrógeno, oxígeno o azufre. Los ejemplos de heterociclos incluyen el pirrolidin-2-ilo; pirrolidin-3-ilo; piperidinilo; morfolin-4-ilo y similares. En el caso de un

heterociclo bicíclico, debe entenderse que los átomos del anillo de un anillo pueden ser todos ellos carbono mientras el otro anillo puede contener un heteroátomo.

"Cl₅₀" se refiere a la concentración de un compuesto en particular necesaria para inhibir en un 50% una actividad específica medida. La Cl₅₀ puede medirse, entre otros, como se describe a continuación.

El término "aceptable a nivel farmacéutico", tal y como se utiliza aquí en referencia a un compuesto (por ejemplo, un transportador, una sal, un éster, etc.), significa que el compuesto es aceptable farmacológicamente y sustancialmente no tóxico para el sujeto al que se administra el compuesto en particular.

Una "sal aceptable a nivel farmacéutico" de un compuesto es una sal de adición ácida convencional o una sal de adición básica que mantiene la efectividad biológica y propiedades del compuesto y que se forma a partir de un ácido o base orgánica o inorgánica adecuado no tóxico. Sales de adición ácida de muestra incluyen las derivadas a partir de ácidos inorgánicos como el ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido sulfámico, ácido fosfórico y ácido nítrico, y aquellos derivados a partir de ácidos orgánicos como el ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico, ácido metanosulfónico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido fumárico, ácido trifluoroacético y similares. Sales de adición básica de muestra incluyen las derivadas a partir de los hidróxidos de amonio, litio, potasio, sodio y amonio cuaternario, como por ejemplo, hidróxido de tetrametilamonio. La modificación química de un compuesto farmacéutico (es decir un fármaco) en una sal es una técnica bien conocida para los químicos farmacéuticos para obtener una estabilidad física y química, higroscopicidad, fluidez y solubilidad de los compuestos. Véase, por ejemplo, Ansel et al., *Farmacéutica Dosage Forms and Drug Delivery Systems* (6ª Ed. 1995) en las págs. 196 y 1456; y Richard J. Bastin, Michael J. Bowker, Bryan J. Slater, *Organic Process Research & Development* 2000, 4, 427-435.

Un "éster aceptable a nivel farmacéutico" de un compuesto es un éster convencional del compuesto que contiene un grupo hidroxilo o carboxilo; el éster mantiene la efectividad biológica y propiedades del compuesto y puede escindirse *in vivo* (en el organismo) en el correspondiente alcohol o ácido carboxílico respectivamente.

El término "sustituido", tal y como se utiliza aquí para describir cualquiera de los anteriores grupos químicos (por ejemplo, alquilo sustituido, arilo sustituido, heteroarilo sustituido), se refiere a un grupo químico en el que de 1 a 5 átomos de hidrógeno, preferiblemente de 1 a 3, se han reemplazado independientemente con un sustituyente.

El término "formulación en una dosis unitaria", tal y como se utiliza aquí, se refiere a una preparación farmacéutica (por ejemplo, comprimido, cápsula) que comprende un compuesto activo, por ejemplo, un compuesto de acuerdo con la fórmula (I) (definido a continuación), en forma estable y que pueden administrarse a un paciente en una única dosis.

En una realización preferible de la presente invención, el anillo A está sustituido con un sustituyente seleccionado de entre el grupo que consiste en: alquilo inferior; halógeno; hidroxilo; alcoxi inferior; alcoxi inferior sustituido con hidroxilo o alcoxi inferior.

En otra realización preferible de la presente invención, cuando el anillo A es un fenilo o fenilo sustituido, L está enlazado en una posición que es meta en relación al 1-alquilo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ilmetoxi.

En otra realización preferible de la presente invención, cuando el anillo B es un heteroarilo sustituido o un fenilo sustituido, el anillo B está sustituido con 1 o 2 sustituyentes seleccionados de entre el grupo que consiste en: alquilo inferior; alquilo fluorado; alquilo sustituido con arilo; hidroxilo; alcoxi inferior; alcoxi inferior sustituido por hidroxilo o alcoxi inferior; halógeno; ciano; y -NR¹R²; en la que R¹ y R² son como se han definido anteriormente. En una realización particularmente preferible, el anillo B está monosustituido en posición 3 o 4 o 3,4-disustituido, y los sustituyentes pueden ser diferentes, y estos sustituyentes se seleccionan preferiblemente e independientemente de entre el grupo que consiste en: halógeno; hidroxilo; alcoxi inferior; alcoxi inferior sustituido con hidroxilo o alcoxi inferior; -NR¹R²; y -CF₃; siendo R¹ y R² como se han definido anteriormente.

En una realización preferible de la presente invención, L es un enlace y el anillo B se selecciona de entre el grupo que consiste en: 1,3,4-oxadiazol sustituido; 1,2,4-oxadiazol sustituido; 1,2,3-triazol sustituido; 1,2,4-triazol sustituido; y tetrazol sustituido; en el que los sustituyentes se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste en: alquilo inferior; alquilo fluorado; alquilo sustituido con arilo; hidroxilo; alcoxi inferior; alcoxi inferior sustituido por hidroxilo o alcoxi inferior; halógeno; ciano; y -NR¹R²; en el que R¹ y R² son como se han definido anteriormente. Las realizaciones en las que el anillo B es un 1,3,4-oxadiazol sustituido son particularmente preferibles.

En otra realización preferible, el anillo A es un fenilo sustituido por metilo en una posición que es orto en relación al 1-alquilo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ilmetoxi. En una realización especialmente preferible, el anillo A es un fenilo sustituido por metilo en una posición que es orto en relación al 1-alquilo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ilmetoxi y L está enlazado al anillo A en una posición que es para en relación con el metilo.

En otra realización preferible, R es metilo.

En otra realización preferible, el halógeno se selecciona de entre el grupo que consiste en Cl y F.

En otra realización preferible, L se selecciona de entre el grupo que consiste en -CH₂O-, -NHCO-, y -CONH-.

5 En una realización preferible:

el anillo A es un fenilo sustituido por de 1 a 4 sustituyentes independientemente seleccionados de entre el grupo que consiste en: alquilo inferior; halógeno; hidroxilo; alcoxi inferior; alcoxi inferior sustituido por hidroxilo o alcoxi inferior; y ciano;

10

L se selecciona de entre el grupo que consiste en -CH₂O-, -NHCO-, y -CONH-; y

el anillo B es un fenilo sustituido por de 1 a 5 sustituyentes seleccionados de entre el grupo que consiste en: alquilo inferior; alquilo fluorado; alquilo sustituido con arilo; hidroxilo; alcoxi inferior; alcoxi inferior sustituido por hidroxilo o alcoxi inferior; halógeno; ciano; y -NR¹R²; siendo R¹ y R² como se han definido anteriormente.

15

Más preferiblemente, R es metilo. Aún más preferiblemente, R es metilo y el anillo B está monosustituido en posición 3 o 4 o 3,4-disustituido, y los dos sustituyentes pueden ser diferentes. Los sustituyentes preferibles para el anillo B son halógeno, -NR¹R², hidroxilo, alcoxi inferior, alcoxi inferior sustituido con hidroxilo o alcoxi inferior, y -CF₃, siendo R¹ y R² como se han definido anteriormente.

20

En otra realización preferible:

25 el anillo A se selecciona de entre el grupo que consiste en fenilo y fenilo sustituido por metilo;

L es un enlace; y

30

el anillo B es un azol sustituido, por ejemplo, 1,3,4-oxadiazol sustituido, 1,2,4-oxadiazol sustituido, 1,2,3-triazol sustituido, 1,2,4-triazol sustituido, y tetrazol sustituido, preferiblemente un 1,3,4-oxadiazol sustituido, en la que los sustituyentes se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste en: alquilo inferior; alquilo fluorado; alquilo sustituido con arilo; hidroxilo; alcoxi inferior; alcoxi inferior sustituido por hidroxilo o alcoxi inferior; halógeno; ciano; y -NR¹R²; en la que R¹ y R² son como se han definido anteriormente.

35

Más preferiblemente R es metilo. Aún más preferiblemente, R es metilo y el anillo B está sustituido con un alquilo inferior, -NR¹R², hidroxilo, alcoxi inferior, alcoxi inferior sustituido con hidroxilo o alcoxi inferior, o -CF₃, siendo R¹ y R² como se han definido anteriormente. Es especialmente preferible si R es metilo y el anillo B es un 1,3,4-oxadiazol sustituido como anteriormente.

40

En otra realización preferible de acuerdo con la presente invención se proporciona un compuesto de fórmula (I), en el que

R es alquilo (C₁₋₆);

45

el anillo A es fenilo, que no está sustituido o está monosustituido con un alquilo (C₁₋₆);

L es -CH₂O-, -O-CH₂-, -C(O)-NH-, o -NH-C(O)-;

50

el anillo B es fenilo, que no está sustituido o está monosustituido o bisustituido con un sustituyente independientemente seleccionado de entre halógeno, o -NH-(CH₂)₂-OH; o

L es un enlace, y

55

el anillo B es 3-metil-[1,2,4]oxadiazol-5-ilo.

Los siguientes compuestos específicos son especialmente preferibles:

3-(3-benciloxi-fenoximetil)-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina;

60

N-[3-(4-amino-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ilmetoxi)-4-metilfenilo]-3-cloro-4-(2-hidroxi-etilamino)-benzamida;

N-[3-(4-amino-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ilmetoxi)-4-metilfenilo]-3-cloro-benzamida;

65

4-cloro-1-metil-3-[2-metil-5-(3-metil-[1,2,4]oxadiazol-5-ilo)-fenoximetil]-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina;

3-(5-benciloxi-2-metil-fenoximetil)-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina;

3-(4-amino-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ilmetoxi)-N-(4-clorofenilo)-4-metil-benzamida;

5 3-[5-(4-cloro-benciloxi)-2-metil-fenoximetil]-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina;

1-metil-3-[2-metil-5-(5-metil-[1,3,4]oxadiazol-2-il)-fenoximetil]-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina; y

3-(4-amino-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ilmetoxi)-N-(3-cloro-4-fluoro-fenilo)-4-metil-benzamida;

10

y las sales y ésteres aceptables a nivel farmacéutico de cualquiera de los compuestos anteriores.

El compuesto de fórmula (I), o la sal o éster de la misma, (a partir de este momento, colectivamente, "el compuesto de la presente invención") puede existir como una mezcla racémica o como un estereoisómero aislado. El estereoisómero puede aislarse mediante métodos de separación conocidos, por ejemplo, mediante cromatografía.

15

El compuesto de la presente invención puede mostrar tautomerismo o isomerismo estructural. Se entenderá que la invención incluye cualquier forma tautomérica o isomérica estructural del compuesto de la presente invención, o mezclas de dichas formas, y no se limita a ninguna de las formas tautoméricas o isoméricas estructurales que se ilustran en la fórmula (I).

20

El compuesto de la presente invención es útil en el tratamiento o control de los trastornos proliferativos celulares, en particular los trastornos oncológicos. El compuesto, las composiciones y las formulaciones para dosis unitaria que contienen tal compuesto pueden ser útiles en el tratamiento o control de los tumores sólidos, como por ejemplo, los tumores de mama, tumores de colon, tumores de pulmón, tumores de próstata y el melanoma.

25

Una cantidad efectiva a nivel terapéutico de un compuesto de la presente invención es una cantidad de compuesto que es efectiva para evitar, reducir o mejorar los síntomas de una enfermedad o prolongar la supervivencia de un sujeto en tratamiento. La cantidad o dosis efectiva a nivel terapéutico puede variar dentro de unos amplios límites y puede determinarse de manera conocida en la materia. Tal dosis se ajustará a las necesidades individuales de cada caso particular, lo que incluye el(los) compuesto(s) específico(s) a administrar, la vía de administración, la condición a tratar, así como el paciente a tratar. En general, en el caso de administración oral o parenteral del compuesto de la presente invención a humanos adultos de un peso aproximado de 70 kg, sería apropiada una dosis diaria de alrededor de 10 mg a alrededor de 10.000 mg, preferiblemente de alrededor de 200 mg a alrededor de 1.000 mg, aunque el límite superior puede excederse cuando esté indicado. La dosis diaria puede administrarse como una única dosis o en dosis múltiples, o en el caso de la administración parenteral, puede administrarse como una infusión continua.

30

35

En consecuencia, en otra realización de acuerdo con la presente invención, se proporciona un compuesto de fórmula (I) para su utilización como medicamento.

40

En otra realización, se proporciona un compuesto de fórmula (I) para su utilización como medicamento para el tratamiento del cáncer, en particular de tumores sólidos, más concretamente los tumores de mama, tumores de colon, tumores de pulmón, tumores de próstata y el melanoma.

45

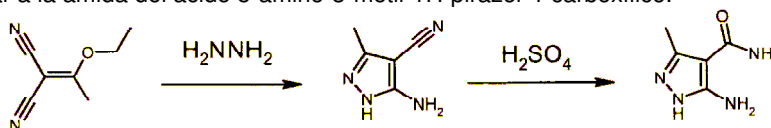
En otra realización, se proporciona la utilización de un compuesto de fórmula (I) durante para la elaboración de medicamentos para el tratamiento del cáncer, en particular de tumores sólidos, y más concretamente los tumores de mama, tumores de colon, tumores de pulmón, tumores de próstata y el melanoma.

50

La presente invención también está relacionada con un proceso para la preparación del compuesto de fórmula (I). Los compuestos de la presente invención pueden prepararse mediante cualquier método convencional. Los procesos adecuados para sintetizar estos compuestos se proporcionan en los ejemplos. Generalmente, los compuestos de fórmula (I) pueden prepararse de acuerdo con el esquema descrito a continuación.

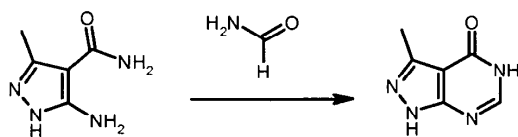
55

1) Se hace reaccionar 1-(etoxietiliden)malononitrilo (Aldrich) con hidrazina hidrato (Aldrich) para dar lugar a 5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-carbonitrilo. Entonces se hace reaccionar 5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-carbonitrilo con ácido sulfúrico para dar lugar a la amida del ácido 5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-carboxílico.

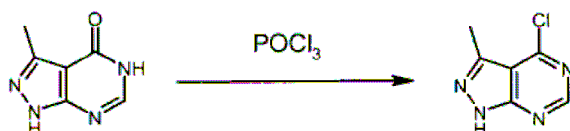


60

2) Se hace reaccionar la amida del ácido 5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-carboxílico con formamida (Aldrich) para dar lugar a 3-metilpirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona.



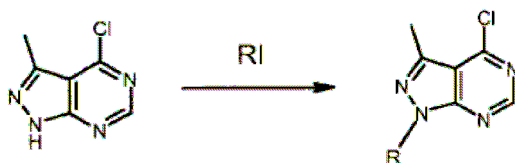
3) Se hace reaccionar la 3-metil-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona con oxiclورو de fósforo para dar lugar a 4-cloro-3-metil- 1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina.



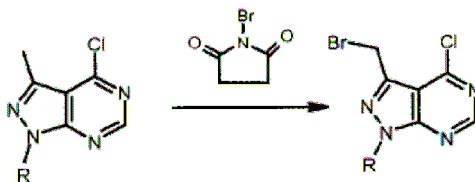
5

4) Se hace reaccionar la 4-cloro-3-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina con RI, en el que R es alquilo inferior como se ha descrito anteriormente e I es yodo (por ejemplo, yodometilo disponible de Aldrich) para dar lugar a 1-alquilo-4-cloro-3-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina.

10

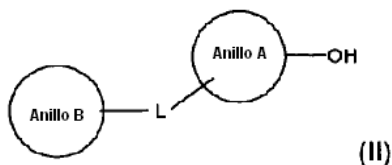


5) Se hace reaccionar 1-alquilo-4-cloro-3-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina con N-bromosuccinato (Aldrich) para dar lugar a 1-alquilo-3-bromometil-4-cloro-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina.

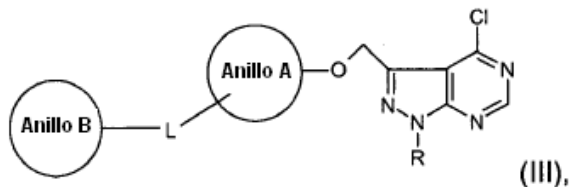


15

6) Se hace reaccionar 1-alquilo-3-bromometil-4-cloro-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina con un compuesto de fórmula (II)

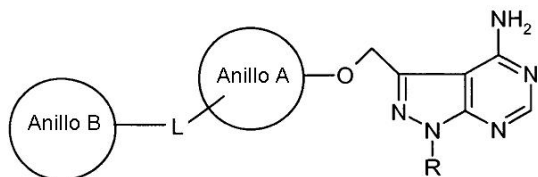


(por ejemplo, 3-benciloxi-fenol, disponible de TCI) para dar lugar a un compuesto de fórmula (III)



20

7) El compuesto obtenido en (6) se hace reaccionar con amonio para dar lugar a un compuesto de Fórmula (I).



El proceso de acuerdo con los pasos de 1 a 7 anteriores, en particular los pasos 6 y 7, formar otra realización de acuerdo con la presente invención.

5 La presente invención también está relacionada con una composición y una formulación de dosis unitaria que comprende el compuesto de la presente invención. La composición y la formulación de dosis unitaria comprenden una cantidad efectiva a nivel terapéutico del compuesto de la presente invención y un transportador. Las composiciones y formulaciones de dosis unitaria pueden comprender ingredientes adicionales accesorios, por ejemplo, otros excipientes. En general, entre alrededor del 1 y alrededor del 99 por ciento de la composición o formulación de dosis unitaria consiste en el compuesto de la presente invención, preferiblemente entre alrededor del 10 y alrededor del 70 por ciento, y más preferiblemente entre alrededor del 10 y alrededor del 30 por ciento.

15 Pueden utilizarse, por ejemplo, lactosa, almidón de maíz o derivados del mismo, talco, ácido esteárico o sus sales, y similares, como transportadores en los comprimidos, comprimidos recubiertos, grageas y cápsulas de gelatina dura. Los transportadores adecuados para las cápsulas de gelatina blandas son, por ejemplo, aceites vegetales, ceras, grasas, polioles semisólidos y líquidos, y similares. Sin embargo, dependiendo de la naturaleza de la sustancia activa, a menudo no son necesarios transportadores en el caso de las cápsulas de gelatina blandas. Los transportadores adecuados para la producción de soluciones y jarabes son, por ejemplo, agua, polioles, glicerol, aceites vegetales y similares. Los transportadores adecuados para los supositorios son, por ejemplo, los aceites naturales o endurecidos, ceras, grasas, polioles semilíquidos o líquidos y similares.

20 La composición y la formulación de dosis unitaria de la presente invención también puede comprender excipientes adicionales, por ejemplo, conservantes, solubilizantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsificantes, endulzantes, colorantes, aromatizantes, sales para modificar la presión osmótica, tampones, agentes emascarantes y antioxidantes.

25 La composición y la formulación de dosis unitaria de la presente invención también puede comprender agentes activos a nivel terapéutico adicionales.

30 Las formulaciones de dosis unitaria de la presente invención incluyen aquellas que son adecuadas para su administración por vía oral, nasal, tópica (lo que incluye bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. La formulación puede prepararse mediante cualquiera de los métodos conocidos en el área de la farmacia.

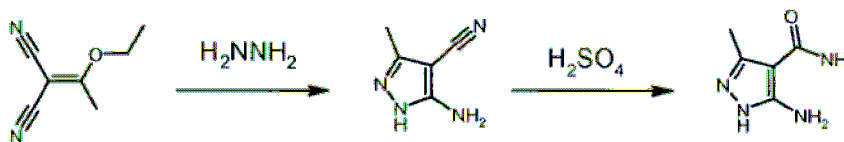
35 Las formulaciones de dosis unitaria de la presente invención que son adecuadas para su administración por vía oral pueden estar en forma de cápsulas, cachets, sobres, píldoras, comprimidos, pastillas romboidales (utilizando una base aromatizada, habitualmente de sacarosa y acacia o tragacanto), polvos, granulados, elixires, jarabes, pastillas (utilizando una base inerte, como la gelatina y la glicerina, o la sacarosa y acacia), enjuagues bucales y similares. La formulación también puede ser una solución o una suspensión del compuesto de la presente invención en un líquido acuoso o no acuoso. La formulación también puede ser una emulsión líquida de aceite en agua o de agua en aceite. El compuesto de la presente invención también puede administrarse como un bolo, electuario o pasta.

40 La presente invención también está relacionada con los métodos para obtener la composición y formulación de dosis unitaria de la presente invención. Tales métodos comprenden el paso de asociar un compuesto de la presente invención con un transportador y, opcionalmente, uno o más ingredientes auxiliares. En general, las composiciones y formulaciones de la presente invención se preparan mediante la asociación uniforme e íntima de un compuesto de la presente invención con un transportador líquido, un transportador sólido finamente dividido o ambos, y luego, si es necesario, dando forma al producto.

50 La presente invención también está relacionada con un compuesto para su utilización en un método para tratar un paciente que padece un trastorno proliferativo, y que comprende el paso de administrar un compuesto de la presente invención al paciente. El compuesto puede estar contenido en una composición o formulación en dosis unitaria. En una realización preferible, el trastorno proliferativo es un tumor sólido. En una realización especialmente preferible, el trastorno proliferativo se selecciona de entre el grupo que consiste en un tumor de mama, tumor de pulmón, tumor de colon, tumor de próstata y melanoma.

55 Los siguientes ejemplos y referencias se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se indica en las reivindicaciones anexas.
Ejemplo 1

60 Amida del ácido 5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-carboxílico



Preparado mediante el procedimiento de Robins, R. K. J. Am. Chem. Soc., 1956, 78, 784.

Paso 1:

5

Se añadió 1-(etoxietiliden)malononitrilo (25,05 g, 184,0 mmol) (Aldrich) en pequeñas porciones a (wt) hidracina hidrato al 35% (37 mL, Aldrich). Tras haber añadido aproximadamente la mitad del 1-(etoxietiliden)-malononitrilo, la mezcla de reacción se enfrió en agua fría y se añadió el 1-(etoxi-etiliden)malononitrilo restante a un ritmo tal que el contenido del recipiente hirvieron ligeramente. Tras completarse la adición, la mezcla se calentó a reflujo durante 2

10

Paso 2:

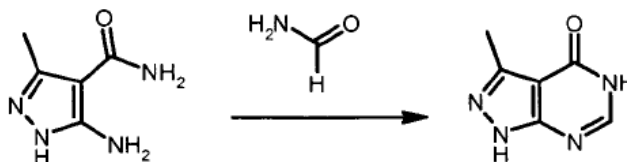
15

Se añadió el 5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-carbonitrilo (15,0 g anteriores) a ácido sulfúrico concentrado en agitación (47 mL, al 95%) enfriado en un baño de agua fría. Tras la adición, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas antes de vertirse en agitación en una mezcla de hielo y agua. El precipitado se recogió mediante filtración, se lavó con agua fría para eliminar el exceso de ácido sulfúrico, y se secó en un desecador al vacío para proporcionar la amida del ácido 5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-carboxílico. (Rendimiento 19,6 g).

20

Ejemplo 2

3-metil-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona



25

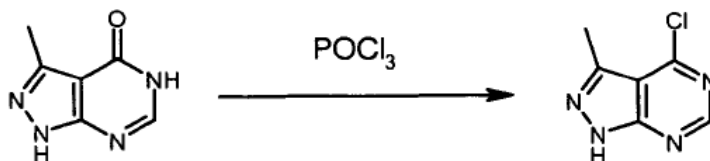
Una mezcla de la amida del ácido 5-amino-3-metil-1H-pirazol-4-carboxílico (11,06 g, 79,0 mmol, Ejemplo 1) y formamida (60 mL, Aldrich) se calentó a 180 °C durante 3,5 horas. Tras enfriarse hasta 80 °C, se añadió agua helada (100 g) y la mezcla se agitó vigorosamente para proporcionar un precipitado blanco. El precipitado se filtró y se lavó con agua fría y luego se secó en un desecador al vacío para proporcionar 3-metil-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona como un sólido blanquecino. (Rendimiento 9,07 g). Este material se utilizó en el siguiente paso (descrito en el Ejemplo 3) sin posterior purificación.

30

Ejemplo 3

35

4-cloro-3-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina



40

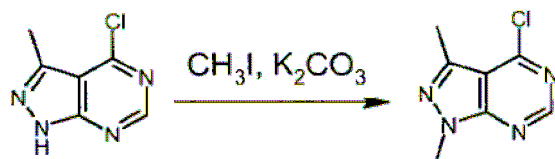
A una suspensión en agitación de 3-metil-[3,4-d]pirimidin-4-ona (7,50 g, 50,0 mmol, Ejemplo 2) en oxicloruro de fósforo (150 mL) se añadió diisopropiletilamina (31 mL, 175 mmol, Aldrich). La mezcla se calentó a reflujo durante 2,5 horas antes de evaporar el solvente bajo presión reducida. El residuo se trató con hielo (200 g) y se hizo ligeramente básico con una solución acuosa de hidróxido sódico 4N y se extrajo con acetato de etilo (3 x 250 mL). los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua, salmuera, se secaron y se concentraron para proporcionar 4-cloro-3-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina como un sólido blanco. (Rendimiento 6,38 g).

45

Ejemplo 4

4-cloro-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina

50

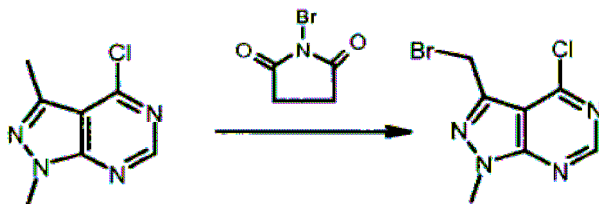


5 A una mezcla de 4-cloro-3-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina (150,4 mg, 0,89 mmol, Ejemplo 3) y carbonato potásico (187 mg, 1,35 mmol) en dimetilformamida (6 mL) se añadió yodometano (225 mg, 1,59 mmol, Aldrich). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas antes de diluirse con acetato de etilo, se lavó con agua, salmuera, se secó y se concentró. El producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida (gel de sílice, hexanos - acetato de etilo, de 90/10 a 60/40) para proporcionar 4-cloro-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina como un sólido blanco. (Rendimiento 162,3 mg).

10 HRMS (ES+) m/z Calculado para $C_7H_7ClN_4 + H [(M+H)^+]$: 183,0431. Obtenido: 183,0432.

Ejemplo 5

15 3-bromometil-4-cloro-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina

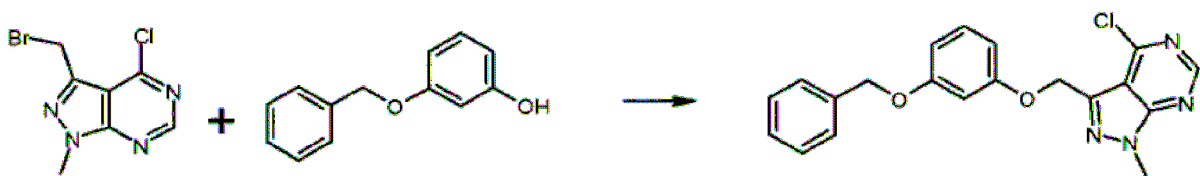


20 A una solución de 4-cloro-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina (752 mg, 4,12 mmol, Ejemplo 4) en tetracloruro de carbono (45 mL) se añadieron N-bromosuccinimida (964,4 mg, 5,36 mmol, Aldrich) y AIBN (209,6 mg, 1,25 mmol, Aldrich). La mezcla se calentó a reflujo durante 7 horas. La mezcla de reacción resultante se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía rápida (gel de sílice, hexanos - acetato de etilo, de 95/5 a 70/30) para proporcionar 3-bromometil-4-cloro-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina como un sólido blanco. (Rendimiento 941,3 mg).

25 HRMS (ES+) m/z Calculado para $C_7H_6BrClN_4 + H [(M+H)^+]$: 260,9537. Obtenido: 260,9537.

Ejemplo 6

30 3-(3-benciloxi-fenoximetil)-4-cloro-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina

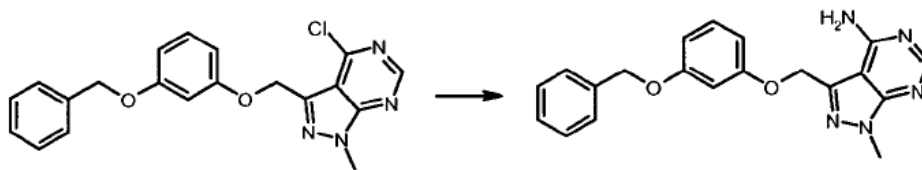


35 Una mezcla de 3-bromometil-4-cloro-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina (90,2 mg, 0,28 mmol, Ejemplo 5), 3-benciloxi-fenol (75,2 mg, 0,36 mmol, TCI) y carbonato potásico (59,6 mg, 0,43 mmol) en dimetilformamida se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. La mezcla resultante se concentró bajo presión reducida y el residuo se disolvió en acetato de etilo, se lavó con agua y salmuera, se secó y se concentró. El producto bruto se utilizó directamente en el siguiente paso (descrito en el Ejemplo 7) o se purificó mediante cromatografía rápida (gel de sílice, hexanos - acetato de etilo, de 90/10 a 60/40) para proporcionar 3-(3-benciloxi-fenoximetil)-4-cloro-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina pura. (Rendimiento 33 mg).

40 HRMS (ES+) m/z Calculado para $C_{20}H_{17}ClN_4O_2 + H [(M+H)^+]$: 381,1115. Obtenido: 381,1113

Ejemplo 7

45 3-(3-benciloxi-fenoximetil)-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina



Se hizo burbujear amonio gaseoso a través de una suspensión de 3-(3-benciloxi-fenoximetil)-4-cloro-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina (20 mg, Ejemplo 6) en 2-propanol (11 mL) durante 15 minutos. La mezcla se calentó entonces hasta 130°C durante 1 hora en microondas. El solvente se eliminó bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía rápida (gel de sílice, diclorometano - metanol, de 99/1 a 95/5) para proporcionar 3-(3-benciloxi-fenoximetil)-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina como un sólido blanco. (Rendimiento 5 mg).

HRMS (ES+) m/z Calculado para $C_{20}H_{19}N_5O_2 + H [(M+H)^+]$: 362,1611. Obtenido: 362,1612.

Ejemplo 8

3-cloro-N-[3-(4-cloro-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ilmetoxi)-4-metil-fenil]-4-(2-hidroxi-etilamino)-benzamida

Paso 1

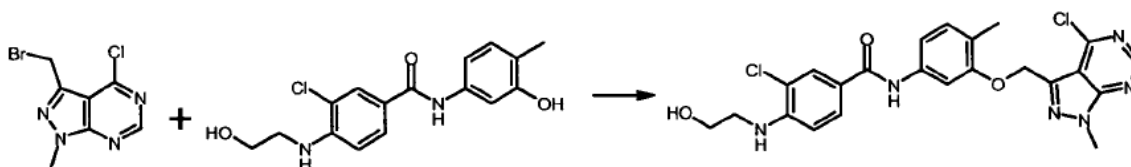
Una solución de cloruro de 3-cloro-4-fluorobenzoilo (21,23 g, 110 mmol, Avocado) en tetrahidrofurano (50 mL) se añadió a una solución de 5-amino-o-cresol (6,16 g, 50 mmol, Aldrich), trietilamina (17,5 mL, 125 mmol, Aldrich) y tetrahidrofurano (50 mL) gota a gota en agitación magnética y enfriamiento en un baño de agua helada. Cuando se completó la adición, se permitió que la mezcla alcanzara la temperatura ambiente y se dejó en agitación durante 16 horas. La mezcla se diluyó entonces con agua (125 mL) y una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico (125 mL). Tras agitar durante otros 30 minutos, se recogió el precipitado para proporcionar 3-cloro-4-fluoro-benzoato de 5-(3-cloro-4-fluoro-benzoilamino)-2-metil-fenilo bruto como un polvo blanquecino. (Rendimiento 21,83 g).

Se disolvió el 3-cloro-4-fluoro-benzoato de 5-(3-cloro-4-fluoro-benzoilamino)-2-metil-fenilo (3,93 g, 9 mmol, del anterior paso) en una mezcla de tetrahidrofurano (25 mL), metanol (50 mL) y hidróxido sódico acuoso 1 N (9 mL, 9 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La mezcla se concentró luego bajo presión reducida para eliminar la mayoría del solvente orgánico. La suspensión resultante se diluyó entonces con agua (45 mL) y una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico (5 mL). Tras dejarlo reposar durante 30 minutos, el precipitado se recogió, se lavó con agua y se secó para proporcionar 3-cloro-4-fluoro-N-(3-hidroxi-4-metil-fenil)-benzamida bruta como un polvo blanco. (Rendimiento 2,59 g).

Paso 2

Una solución de 3-cloro-4-fluoro-N-(3-hidroxi-4-metil-fenil)-benzamida (1,0 g, 3,58 mmol, del anterior paso) en dimetilsulfóxido (5,0 mL) se trató con etanolamina (10,0 mL) (Aldrich) y se calentó hasta 140 °C durante 50 minutos en un reactor microondas. La mezcla de reacción se repartió entonces entre acetato de etilo y agua. La fase acuosa se acidificó con ácido clorhídrico 2N. El precipitado se filtró, se lavó con agua y se secó. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (2X). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera, se secaron (sulfato magnésico) y se concentraron. Las dos muestras sólidas se combinaron y se secaron para proporcionar 3-cloro-4-(2-hidroxi-etilamino)-N-(3-hidroxi-4-metil-fenil)-benzamida. (Rendimiento 1,13 g).

Paso 3



Una mezcla de 3-cloro-4-(2-hidroxi-etilamino)-N-(3-hidroxi-4-metil-fenil)-benzamida (34,2 mg, 0,11 mmol) y carbonato potásico (17,3 mg, .123 mmol) se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de añadir 3-bromometil-4-cloro-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina (25,4 mg, 0,097 mmol, Ejemplo 5). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche y luego se concentró bajo presión reducida para eliminar la dimetilformamida. El residuo se disolvió en acetato de etilo, se lavó con agua, se secó y se concentró. El producto bruto se utilizó directamente en el siguiente paso (descrito en el Ejemplo 9) o se purificó mediante cromatografía rápida (gel de sílice, hexanos - acetato de etilo, de 90/10 a 60/40) para proporcionar 3-cloro-N-[3-(4-cloro-1-metil-1H-pirazolo[3,4-

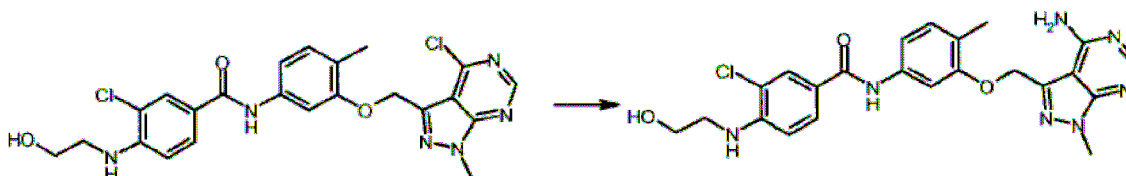
d]pirimidin-3-ilmetoxi)-4-metil-fenil]-4-(2-hidroxi-etilamino)-benzamida pura como un sólido blanco. (Rendimiento 22 mg).

HRMS (ES+) m/z Calculado para $C_{23}H_{22}Cl_2N_6O_3 + H [(M+H)^+]$: 501,1197. Obtenido: 503,1203.

5

Ejemplo 9

N-[3-(4-amino-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ilmetoxi)-4-metil-fenil]-3-cloro-4-(2-hidroxi-etilamino)-benzamida



10

Se hizo burbujear amonio gaseoso a través de una suspensión de 3-cloro-N-[3-(4-cloro-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ilmetoxi)-4-metil-fenil]-4-(2-hidroxi-etilamino)-benzamida (20,9 mg, Ejemplo 8) en 2-propanol (10 mL) durante 15 minutos. La mezcla se calentó entonces hasta 130 °C durante 1 hora en microondas antes de eliminar el solvente bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida (gel de sílice, diclorometano - metanol, de 99/1 a 95/5) para proporcionar N-[3-(4-amino-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ilmetoxi)-4-metil-fenil]-3-cloro-4-(2-hidroxi-etilamino)-benzamida. (Rendimiento 7,9 mg).

15

HRMS (ES+) m/z Calculado para $C_{23}H_{24}ClN_7O_3 + H [(M+H)^+]$: 482,1702. Obtenido: 482,1702.

20

Ejemplo 10

3-cloro-N-[3-(4-cloro-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ilmetoxi)-4-metil-fenil]-benzamida

25 Paso 1

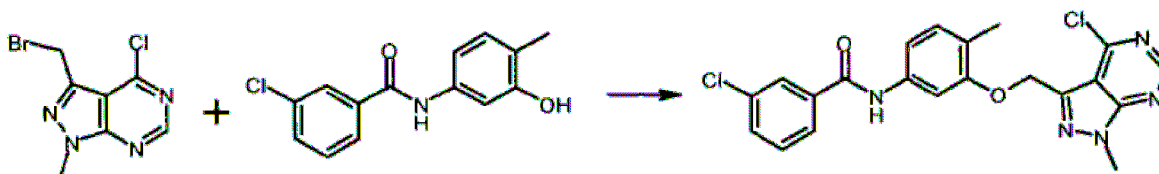
Una solución de cloruro de 3-clorobenzoilo (32,81 g, 187,5 mmol, Aldrich) en tetrahidrofurano (50 mL) se añadió a una solución de 5-amino-o-cresol (9,24 g, 75 mmol, Aldrich), trietilamina (31,43 mL, 225 mmol, Aldrich) y tetrahidrofurano (150 mL) gota a gota con agitación magnética y enfriamiento en un baño de agua helada. Cuando se completó la adición, se permitió que la mezcla alcanzara la temperatura ambiente y se dejó en agitación durante 16 horas. La mezcla se diluyó entonces con agua (200 mL) y una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico (200 mL). Tras agitar durante otros 30 minutos, el precipitado se recogió para proporcionar 3-cloro-benzoato de 5-(3-cloro-benzoilamino)-2-metil-fenilo bruto como un polvo blanquecino. (Rendimiento 31,74 g). El 3-cloro-benzoato de 5-(3-cloro-benzoilamino)-2-metil-fenilo bruto (11,42 g, 28,5 mmol) se disolvió en una mezcla de tetrahidrofurano (70 mL), metanol (140 mL) e hidróxido sódico acuoso 1 N (28,5 mL, 28,5 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas y luego se concentró bajo presión reducida para eliminar la mayoría del solvente orgánico. La suspensión resultante se diluyó con agua (90 mL) y una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico (10 mL). Tras dejarlo reposar durante 30 minutos, el precipitado se recogió, se lavó con agua y se secó para proporcionar 3-cloro-N-(3-hidroxi-4-metil-fenil)-benzamida como un polvo blanquecino. (Rendimiento 6,06 g).

30

35

40

Paso 2



45

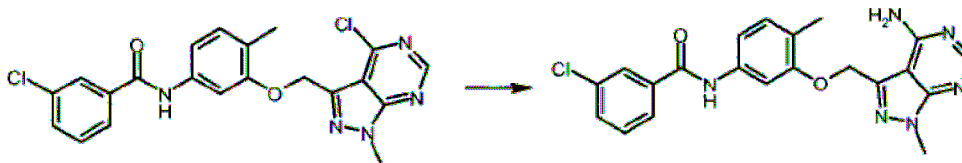
Una mezcla de 3-cloro-N-(3-hidroxi-4-metil-fenil)-benzamida (100 mg, 0,38 mmol, 36721-253A) y carbonato potásico (63,1 mg, 0,45 mmol) se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de añadir 3-bromometil-4-cloro-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina (90,9 mg, 0,28 mmol, Ejemplo 5). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche y luego se concentró bajo presión reducida para eliminar la dimetilformamida. El residuo se disolvió en acetato de etilo, se lavó con agua, se secó y se concentró. El producto bruto se utilizó directamente en el siguiente paso (descrito en el Ejemplo 11) o se purificó mediante cromatografía rápida (gel de sílice, hexanos - acetato de etilo, de 90/10 a 60/40) para proporcionar 3-cloro-N-[3-(4-cloro-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ilmetoxi)-4-metil-fenil]-benzamida pura como un sólido blanco. (Rendimiento 33,3 mg).

50

Ejemplo 11

N-[3-(4-amino-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ilmetoxi)-4-metil-fenil]-3-cloro-benzamida

5



10

Se hizo burbujear amonio gaseoso a través de una suspensión de 3-cloro-N-[3-(4-cloro-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ilmetoxi)-4-metil-fenil]-benzamida (56,7 mg, Ejemplo 10) en 2-propanol (15 mL) durante 15 minutos. La mezcla se calentó entonces hasta 130 °C durante 1 hora en microondas antes de eliminar el solvente bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida (gel de sílice, diclorometano - metanol, de 99/1 a 95/5) para proporcionar N-[3-(4-amino-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ilmetoxi)-4-metilfenil]-3-cloro-benzamida. (Rendimiento 46,7 mg).

15

HRMS (ES+) m/z Calculado para C₂₁H₁₉ClN₆O₂ + H [(M+H)+]: 423,1331. Obtenido: 423,1331.

Ejemplo 12

4-cloro-1-metil-3-[2-metil-5-(3-metil-[1,2,4]oxadiazol-5-il)-fenoximetil]-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina

20

Paso 1

25

Una mezcla de ácido 3-hidroxi-4-metilbenzoico (25,0 g, 164 mmol, Aldrich) y ácido sulfúrico concentrado (3 mL) en etanol absoluto (165 mL) se calentó a reflujo durante 20 horas. Tras enfriarse, se añadió bicarbonato sódico sólido (7 g) para neutralizar el ácido. La mezcla se repartió entonces entre éter de dietilo (2 X 300 mL) y agua (2 X 300 mL). Las capas orgánicas se lavaron con salmuera (300 mL), se combinaron, se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron. El residuo se recristalizó a partir de hexanos para proporcionar 3-hidroxi-4-metil-benzoato de etilo en dos recogidas como cristales blancos. (Rendimiento 28,90 g, 97,8%).

30

Paso 2

35

Se lavó hidruro sódico (al 60% en aceite, 4,80 g, 120 mmol, Aldrich) con pentano (2 X 50 mL). Se eliminó el pentano mediante una pipeta. El sólido resultante se resuspendió en dimetilformamida anhidra (30 mL) y se enfrió en un baño de agua helada. Una solución de 3-hidroxi-4-metil-benzoato de etilo (14,42 g, 80 mmol) en dimetilformamida (30 mL) se añadió gota a gota a lo largo de 30 minutos. Tras agitar durante otros 30 minutos se añadió gota a gota éter de clorometilmetilo (8,2 mL, 108 mmol, Aldrich) a lo largo de 10 minutos. tras su agitación a temperatura ambiente durante otras 2 horas, la mezcla de reacción se repartió entre agua (3 X 250 mL) y éter de dietilo (2 X 250 mL). Las capas orgánicas se lavaron con salmuera (250 mL), luego se combinaron, se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron para proporcionar un aceite incoloro. Éste se filtró a través de gel de sílice (Biotage 40L, diclorometano - hexanos, v/v 2:3, y luego diclorometano) para proporcionar 3-metoximetoxi-4-metil-benzoato de etilo bruto como un aceite incoloro (que contenía cantidades traza de material de R_f inferior). (Rendimiento 18,01 g, 100%).

40

Paso 3

45

Se disolvió 3-metoximetoxi-4-metil-benzoato de etilo (4,5 g, 20 mmol) en una mezcla de etanol (50 mL), agua (20 mL) y solución acuosa de hidróxido sódico 1 N (30 mL) y en agitación a temperatura ambiente durante 18 horas. La mezcla se concentró bajo presión reducida para eliminar la mayoría del etanol. La solución acuosa resultante se acidificó añadiendo ácido acético (2,5 g, 41,6 mmol). Se formó un precipitado blanco. Tras dejarlo reposar durante otros 30 minutos, el precipitado se recogió mediante filtración, se lavó con agua y se secó para proporcionar el ácido 3-metoximetoxi-4-metil-benzoico bruto como un polvo blanco. (Rendimiento 3,82 g, 97,0%).

50

Paso 4

55

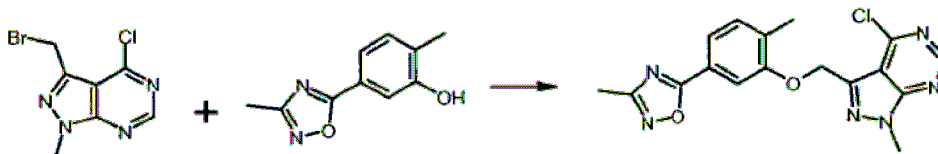
Una mezcla de ácido 3-metoximetoxi-4-metil-benzoico (1,96 g, 10 mmol), 1-(3-dimetil-aminopropilo-3-etilcarbo-diimida (1,92 g, 10 mmol, Aldrich) y 1-hidroxibenzotriazol hidrato (1,5 g, 10 mmol, Aldrich) se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió acetamida oxima (0,74 g, 10 mmol) (GFS Chemicals) y la mezcla se calentó hasta 140 °C con agitación magnética durante 2 horas. Tras enfriarse, la mezcla se repartió entre acetato de etilo (2 X 100 mL) y una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico (100 mL). Las soluciones de acetato de etilo se combinaron y se concentraron para proporcionar 5-(3-metoximetoxi-4-metil-fenil)-3-metil-[1,2,4]oxadiazol bruto. (Rendimiento 1,23 g, 52,5%).

60

Paso 5

5 A una solución de 5-(3-metoximetoxi-4-metil-fenil)-3-metil-[1,2,4]oxadiazol (1,23 g, 5,25 mmol) en tetrahidrofurano/ isopropanol (1:1, 30 mL) se añadieron 13,1 mL de HCl 4 M en dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La solución se concentró. El residuo se diluyó con acetato de etilo, se lavó con agua y salmuera, se secó (sulfato magnésico) y se concentró. El residuo se recristalizó a partir de acetato de etilo/ hexano para dar lugar a 2-metil-5-(3-metil-[1,2,4]oxadiazol-5-il)-fenol. (Rendimiento 0,88 g, 88%).

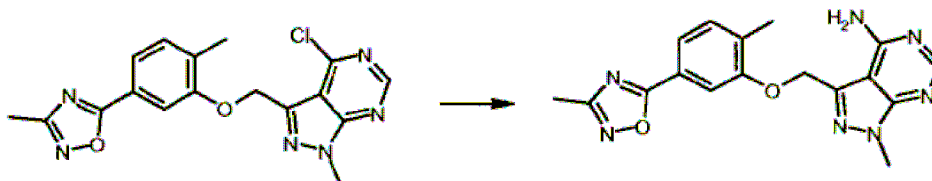
10 Paso 6



15 Una mezcla de 2-metil-5-(3-metil-[1,2,4]oxadiazol-5-il)-fenol (72,0 mg, 0,379 mmol) y carbonato potásico (64,2 mg, 0,455 mmol) en dimetilformamida se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de añadir 3-bromometil-4-cloro-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina (89,8 mg, 0,280 mmol, Ejemplo 5). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche y luego se concentró bajo presión reducida para eliminar la dimetilformamida. El residuo se disolvió en acetato de etilo, se lavó con agua, se secó y se concentró. El producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida (gel de sílice, hexanos - acetato de etilo, de 90/10 a 60/40) para proporcionar 4-cloro-1-metil-3-[2-metil-5-(3-metil-[1,2,4]oxadiazol-5-il)-fenoxy]methyl-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina pura como un sólido blanco. (Rendimiento 41,0 mg).

Ejemplo 13

25 4-cloro-1-metil-3-[2-metil-5-(3-metil-[1,2,4]oxadiazol-5-il)-fenoxy]methyl-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina



30 Se hizo burbujear amonio gaseoso a través de una suspensión de 4-cloro-1-metil-3-[2-metil-5-(3-metil-[1,2,4]oxadiazol-5-il)-fenoxy]methyl-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina (40,0 mg, Ejemplo 12) en 2-propanol (15 mL) durante 15 minutos. La mezcla se calentó entonces hasta 130 °C durante 1 hora en microondas antes de eliminar el solvente bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida gel de sílice, diclorometano - metanol, de 99/1 a 95/5) para proporcionar 4-cloro-1-metil-3-[2-metil-5-(3-metil-[1,2,4]oxadiazol-5-il)-fenoxy]methyl-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina. (Rendimiento 21,8 mg).

35 HRMS (ES+) m/z Calculado para $C_{17}H_{17}N_7O_2 + H [(M+H)^+]$: 352,1516. Obtenido: 352,1517.

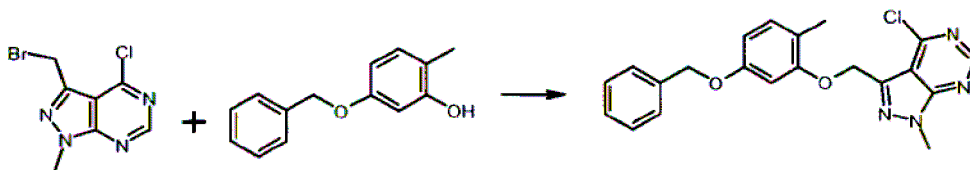
Ejemplo 14

40 3-(5-benciloxi-2-metil-fenoxy)metil-4-cloro-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina

Paso 1

45 A una solución de 4-benciloxi-2-hidroxibenzaldehído (2,28 g, 10,0 mmol, preparada mediante el método del Ejemplo 18 a continuación) y cianoborohidruro sódico (2,0 g, 15,9 mmol) en tetrahidrofurano (60 mL) se añadió naranja de metilo como indicador, proporcionando un color amarillo a la solución; se añadió lentamente una solución acuosa de HCl 1 N (15 mL), manteniendo la solución anaranjada. La mezcla se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. Se añadió agua y la mezcla se extrajo con acetato de etilo tres veces. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera, se secaron ($MgSO_4$) y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida eluyendo con acetato de etilo del 0 - 40% en hexanos para proporcionar 5-benciloxi-2-metil-fenol. (Rendimiento 0,64 g).

Paso 2

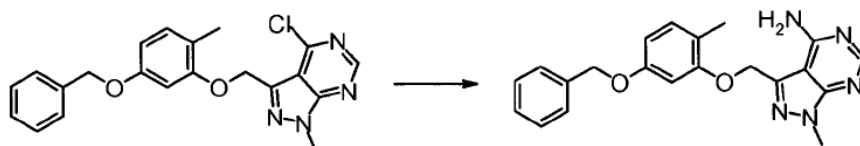


Una mezcla de 5-benciloxi-2-metil-fenol (83,4 mg, 0,389 mmol, 37009-93A) y carbonato potásico (61,8 mg, 0,438 mmol) se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de añadir 3-bromometil-4-cloro-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina (89,8 mg, 0,344 mmol, Ejemplo 5). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche y luego se concentró bajo presión reducida para eliminar la dimetilformamida. El residuo se disolvió en acetato de etilo, se lavó con agua, se secó y se concentró. El producto bruto se utilizó directamente en el siguiente paso o se purificó mediante cromatografía rápida (gel de sílice, hexanos - acetato de etilo, de 90/10 a 60/40) para proporcionar 3-(5-benciloxi-2-metil-fenoximetil)-4-cloro-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina pura como un sólido blanco. (Rendimiento 48,0 mg).

HRMS (ES+) m/z Calculado para $C_{21}H_{19}ClN_4O_2 + H [(M+H)^+]$: 395,1270. Obtenido: 395,1270.

Ejemplo 15

3-(5-benciloxi-2-metil-fenoximetil)-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina



Se hizo burbujear amoníaco gaseoso a través de una suspensión de 3-(5-benciloxi-2-metil-fenoximetil)-4-cloro-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina (46,6 mg, Ejemplo 14) en 2-propanol (15 mL) durante 15 minutos. La mezcla se calentó entonces hasta 130°C durante 1 hora en microondas antes de eliminar el solvente bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida (gel de sílice, diclorometano - metanol, de 99/1 a 95/5) para proporcionar 3-(5-benciloxi-2-metil-fenoximetil)-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina. (Rendimiento 34,5 mg). HRMS (ES+) m/z Calculado para $C_{21}H_{21}N_6O_2 + H [(M+H)^+]$: 376,1768. Obtenido: 376,1768.

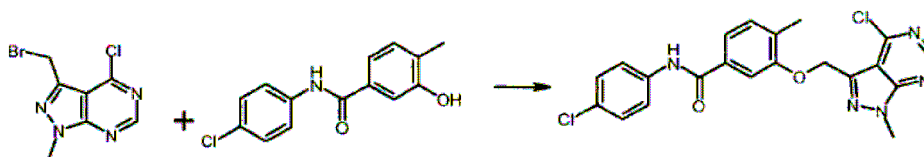
Ejemplo 16

3-(4-cloro-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ilmetoxi)-N-(4-cloro-fenilo)-4-metil-benzamida

Paso 1

Una suspensión de ácido 3-hidroxi-4-metilbenzoico (10,73 g, 70,5 mmol, Lancaster) en acético anhídrico (25 mL, 265 mmol, Aldrich) se calentó a reflujo durante 5 horas. Tras enfriarse hasta temperatura ambiente, la mezcla se vertió en una mezcla de hielo y agua (600 mL) y se mantuvo en agitación durante toda la noche. Los acúmulos sólidos se disgregaron y se recogieron mediante filtración. El residuo se lavó con agua y se secó en un horno de vacío para proporcionar el ácido 3-acetoxi-4-metil-benzoico como un sólido. (Rendimiento 11,82 g). Se resuspendió ácido 3-acetoxi-4-metil-benzoico (1,94 g, 10 mmol) en cloruro de tionilo (3 mL, 40 mmol, Aldrich) y N,N-dimetilformamida (3 gotas) y se calentó a reflujo durante 2 horas. Tras enfriarse hasta temperatura ambiente, la mezcla se diluyó con tolueno (30 mL) y se concentró bajo presión reducida. El aceite resultante se disolvió en diclorometano (30 mL) y se añadió gota a gota a una solución de 4-cloroanilina (1,34 g, 10,5 mmol, Aldrich) y N,N-diisopropiletilamina (1,6 g, 12,5 mmol) en diclorometano (50 mL). Tras agitar durante otras 2 horas, la mezcla se diluyó con agua (50 mL) y se mantuvo en agitación durante otros 30 minutos. Las capas se separaron. La capa orgánica se lavó con agua (50 mL). Las capas acuosas se lavaron de nuevo con diclorometano (50 mL). Luego se combinaron las capas orgánicas y se concentraron. El residuo se disolvió en una mezcla de tetrahidrofurano (25 mL), metanol (25 mL) e hidróxido sódico 1 N acuoso (10 mL, 10 mmol). Tras agitarse durante 16 horas, la mezcla se diluyó con agua (100 mL) y ácido acético (5 mL) y se concentró bajo presión reducida para eliminar la mayoría del solvente orgánico. El precipitado formado se recogió mediante filtración y se lavó con agua, y se secó para proporcionar N-(4-cloro-fenilo)-3-hidroxi-4-metil-benzamida como unos cristales blanquecinos. (Rendimiento 2,57 g).

Paso 2



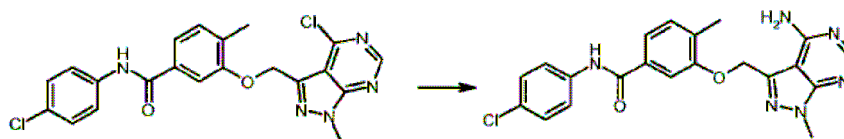
Una mezcla de N-(4-cloro-fenilo)-3-hidroxi-4-metil-benzamida (127,4 mg, 0,487 mmol) y carbonato potásico (77,7 mg, 0,551 mmol) se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de añadir 3-bromometil-4-cloro-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina (90,6 mg, 0,346 mmol, Ejemplo 5). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche y luego se concentró bajo presión reducida para eliminar la dimetilformamida. El residuo se disolvió en acetato de etilo, se lavó con agua, se secó y se concentró. El producto bruto se utilizó directamente en el siguiente paso (descrito en el Ejemplo 17) o se purificó mediante cromatografía rápida (gel de sílice, hexanos - acetato de etilo, de 90/10 a 60/40) para proporcionar 3-(4-cloro-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ilmetoxi)-N-(4-clorofenilo)-4-metil-benzamida pura como un sólido blanco. (Rendimiento 25,0 mg).

HRMS (ES+) m/z Calculado para $C_{21}H_{17}Cl_2N_5O_2 + H [(M+H)^+]$: 442,0830. Obtenido: 442,0832.

Ejemplo 17

15

3-(4-amino-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ilmetoxi)-N-(4-cloro-fenilo)-4-metil-benzamida



Se hizo burbujear amonio gaseoso a través de una suspensión de 3-(4-cloro-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ilmetoxi)-N-(4-cloro-fenilo)-4-metil-benzamida (24,0 mg, Ejemplo 16) en 2-propanol (11 mL) durante 15 minutos. La mezcla se calentó entonces hasta 130°C durante 1 hora en microondas antes de eliminar el solvente bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida (gel de sílice, diclorometano - metanol, de 99/1 a 95/5) para proporcionar 3-(4-amino-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ilmetoxi)-N-(4-clorofenilo)-4-metil-benzamida. (Rendimiento 19,2 mg).

HRMS (ES+) m/z Calculado para $C_{21}H_{19}ClN_6O_2 + H [(M+H)^+]$: 423,1327. Obtenido: 423,1331.

Ejemplo 18

30

4-cloro-3-[5-(4-cloro-benciloxi)-2-metil-fenoximetil]-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina

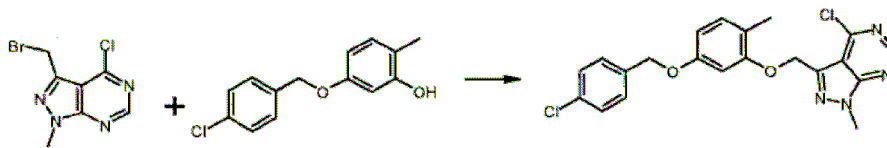
Paso 1

Una mezcla de 2,4-dihidroxi-benzaldehído (6,62 g, 48 mmol, Fluka), fluoruro potásico (5,57g, 96 mmol, Aldrich) y cloruro de 4-clorobencilo (13,50 g, 84 mmol, Aldrich) en acetonitrilo (50 mL) se calentó a 90°C durante 24 horas. Tras enfriarse, la mezcla se repartió entre éter (2 X 100 mL) y agua (2 X 100 mL). Las capas orgánicas se lavaron con salmuera (100 mL), se combinaron, se secaron ($MgSO_4$), se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida (Biotage 75S, hexanos, y luego hexanos - diclorometano 1:1 como solvente) para proporcionar una separación parcial. Las fracciones puras de producto se combinaron y se concentraron, y el residuo se cristalizó a partir de hexanos con trazas de diclorometano para proporcionar 4-(4-cloro-benciloxi)-2-hidroxi-benzaldehído en forma de cristales blancos. (Rendimiento 4,74 g). La solución inicial y las fracciones impuras se combinaron y se purificaron posteriormente mediante cromatografía rápida (Biotage 40L, el mismo solvente utilizado anteriormente), y se combinaron las fracciones puras y se concentraron. El residuo se recrystalizó para proporcionar una segunda recogida de 4-(4-cloro-benciloxi)-2-hidroxi-benzaldehído. (Rendimiento 3,03 g).

Paso 2

A una solución de 4-(4-cloro-benciloxi)-2-hidroxi-benzaldehído (1,31 g, 5,0 mmol) y cianoborohidruro sódico (1,0 g, 15,9 mmol, Aldrich) en tetrahidrofurano (30 mL) se añadió naranja de metilo como indicador, proporcionando a la solución color amarillo; se añadió lentamente una solución acuosa de HCl 1 N (7,5 mL), manteniendo la solución anaranjada. La mezcla se mantuvo entonces en agitación durante toda la noche a temperatura ambiente. Se añadió agua, y la mezcla se extrajo con acetato de etilo tres veces. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera, se secaron ($MgSO_4$) y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida eluyendo con acetato de etilo al 0 - 40% en hexanos para proporcionar 5-(4-cloro-benciloxi)-2-metilfenol. (Rendimiento 0,43 g).

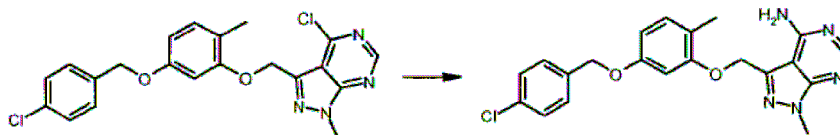
Paso 3



5 Una mezcla de 5-(4-cloro-benciloxi)-2-metil-fenol (95,6 mg, 0,384 mmol) y carbonato potásico (58,2 mg, 0,421 mmol) se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de añadir 3-bromometil-4-cloro-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina (90,1 mg, 0,344 mmol, Ejemplo 5). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche y luego se concentró bajo presión reducida para eliminar la dimetilformamida. El residuo se disolvió en acetato de etilo, se lavó con agua, se secó y se concentró. El producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida (gel de sílice, hexanos - acetato de etilo, de 90/10 a 60/40) para proporcionar la 4-cloro-3-[5-(4-cloro-benciloxi)-2-metil-fenoximetil]-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina pura como un sólido blanco. (Rendimiento 38,0 mg).

Ejemplo 19

15 3-[5-(4-cloro-benciloxi)-2-metil-fenoximetil]-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina



20 Se hizo burbujear amonio gaseoso a través de una suspensión de 4-cloro-3-[5-(4-cloro-benciloxi)-2-metil-fenoximetil]-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina (37,0 mg, Ejemplo 18) en 2-propanol (11 mL) durante 15 minutos. La mezcla se calentó entonces hasta 130 °C durante 1 hora en microondas antes de eliminar el solvente bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida (gel de sílice, diclorometano - metanol, de 99/1 a 95/5) para proporcionar 3-[5-(4-cloro-benciloxi)-2-metil-fenoximetil]-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina. (Rendimiento 25,0 mg).

HRMS (ES+) m/z Calculado para $C_{21}H_{20}ClN_5O_2 + H [(M+H)^+]$: 410,1379. Obtenido: 410,1379.

Ejemplo 20

30 4-cloro-1-metil-3-[2-metil-5-(5-metil-[1,3,4]oxadiazol-2-ilo)-fenoximetil]-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina

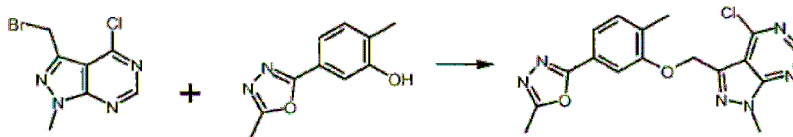
Paso 1

35 Una mezcla de ácido 3-hidroxi-4-metilbenzoico (25,42 g, 167 mmol, TCI US) y ácido sulfúrico concentrado (3 mL) en etanol absoluto (180 mL) se calentó a reflujo durante 20 horas. Tras enfriarse, se añadió bicarbonato sódico sólido (10 g) para neutralizar el ácido. La mezcla se repartió entre éter de dietilo (2 X 400 mL) y agua (2 X 300 mL). Las capas orgánicas se lavaron con salmuera (300 mL), se combinaron, se secaron ($MgSO_4$), se filtraron y se concentraron. El residuo se recrystalizó a partir de hexanos para proporcionar 3-hidroxi-4-metil-benzoato de etilo en forma de cristales blancos en dos recogidas. (Rendimiento 29,14 g).

Paso 2

45 Una suspensión de etil 3-hidroxi-4-metilbenzoato (3,60 g, 20 mmol) en hidrazina anhidra (10 mL, 318 mmol) (Aldrich) se calentó a reflujo (temperatura del baño 150 °C) durante 3 horas. Tras enfriarse hasta temperatura ambiente, la mezcla se concentró bajo presión reducida para proporcionar un sólido seco. Éste se resuspendió en xileno (50 mL) y se concentró bajo presión reducida. El sólido resultante se resuspendió en orto-acetato de trietilo (35 mL, 191 mmol) (Aldrich) y se calentó a reflujo (temperatura del baño 150 °C) durante 20 horas con eliminación del etanol. Tras enfriarse, se añadió diclorometano y el sólido se recogió mediante filtración para proporcionar 2-metil-5-(5-metil-[1,3,4]oxadiazol-2-il)-fenol en forma de material cristalino blanquecino. (Rendimiento 2,28 g). El filtrado del paso anterior se purificó mediante cromatografía rápida (Biotage 40L, acetato de etilo al 10%, y luego al 40%, en diclorometano como solvente) para proporcionar una segunda recogida de 2-metil-5-(5-metil-[1,3,4]oxadiazol-2-il)-fenol en forma de material cristalino blanco. (Rendimiento 0,99 g).

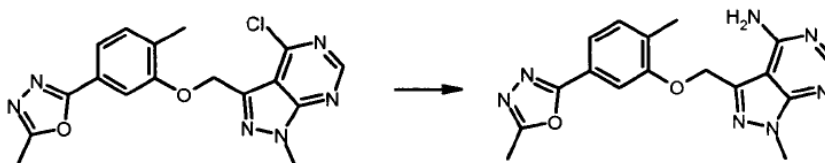
Paso 3



5 Una mezcla de 2-metil-5-(5-metil-[1,3,4]oxadiazol-2-il)-fenol (73,3 mg, 0,385 mmol) y carbonato potásico (60,9 mg, 0,432 mmol) se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de añadir 3-bromometil-4-cloro-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina (89,6 mg, 0,343 mmol, Ejemplo 5). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche y luego se concentró bajo presión reducida para eliminar la dimetilformamida. El residuo se disolvió en acetato de etilo, se lavó con agua, se secó y se concentró. El producto bruto se utilizó directamente en el siguiente paso o se purificó mediante cromatografía rápida (gel de sílice, hexanos - acetato de etilo, de 90/10 a 60/40) para proporcionar 4-cloro-1-metil-3-[2-metil-5-(5-metil-[1,3,4]oxadiazol-2-il)-fenoximetil]-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina pura como un sólido blanco. (Rendimiento 34,9 mg).

Ejemplo 21

15 1-metil-3-[2-metil-5-(5-metil-[1,3,4]oxadiazol-2-il)-fenoximetil]-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina



20 Se hizo burbujear amonio gaseoso a través de una suspensión de 4-cloro-1-metil-3-[2-metil-5-(5-metil-[1,3,4]oxadiazol-2-il)-fenoximetil]-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina (34,5 mg, Ejemplo 20) en 2-propanol (11 mL) durante 15 minutos. La mezcla se calentó entonces hasta 130 °C durante 1 hora en microondas antes de eliminar el solvente bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida (gel de sílice, diclorometano - metanol, de 99/1 a 95/5) para proporcionar 1-metil-3-[2-metil-5-(5-metil-[1,3,4]oxadiazol-2-il)-fenoximetil]-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina. (Rendimiento 15,0 mg).

25

Ejemplo 22

N-(3-cloro-4-fluoro-fenilo)-3-(4-cloro-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ilmetoxi)-4-metil-benzamida

30 Paso 1:

Una solución de cloruro de 3-cloro-4-fluorobenzoilo (21,23 g, 110 mmol, Avocado) en tetrahidrofurano (50 mL) se añadió a una solución de 5-amino-o-cresol (6,16 g, 50 mmol, Aldrich) y trietilamina (17,5 mL, 125 mmol, Aldrich) y se añadió gota a gota tetrahidrofurano (50 mL) con agitación magnética y enfriando en un baño de agua helada. Cuando se completó la adición, se permitió que la mezcla alcanzara la temperatura ambiente y se mantuvo en agitación durante 16 horas. La mezcla se diluyó entonces con agua (125 mL) y una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico (125 mL). Tras agitar durante otros 30 minutos, el precipitado se recogió para proporcionar 3-cloro-4-fluoro-benzoato de 5-(3-cloro-4-fluoro-benzoilamino)-2-metilfenilo bruto como un polvo blanquecino. (Rendimiento 21,83 g, 101 %).

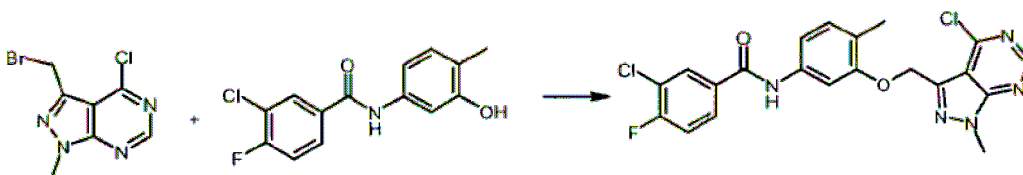
40

Se disolvió el 3-cloro-4-fluoro-benzoato de 5-(3-cloro-4-fluoro-benzoilamino)-2-metilfenilo (3,93 g, 9 mmol) en una mezcla de tetrahidrofurano (25 mL), metanol (50 mL) e hidróxido sódico acuoso 1 N (9 mL, 9 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas y luego se concentró bajo presión reducida para eliminar la mayoría del solvente orgánico. La suspensión resultante se diluyó con agua (45 mL) y una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico (5 mL). Tras dejarlo reposar durante 30 minutos, el precipitado se recogió y se lavó con agua y se secó para proporcionar 3-cloro-4-fluoro-N-(3-hidroxi-4-metil-fenil)-benzamida bruta como un polvo blanco. (Rendimiento 2,59 g, 103%).

45

Paso 2:

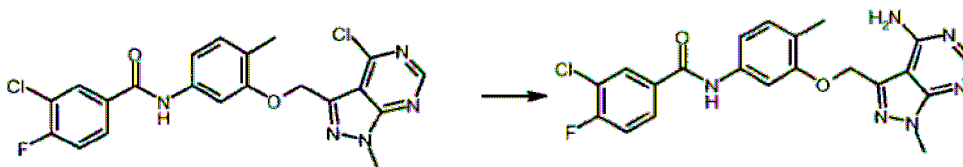
50



Una mezcla de 3-cloro-4-fluoro-N-(3-hidroxi-4-metil-fenil)-benzamida (105,9 mg, 0,379 mmol) y carbonato potásico (59,6 mg, 0,431 mmol) en dimetilformamida se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de añadir 3-bromometil-4-cloro-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina (90,7 mg, 0,347 mmol, Ejemplo 5). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche y luego se concentró bajo presión reducida para eliminar la dimetilformamida. El residuo se disolvió en acetato de etilo, se lavó con agua, se secó y se concentró. El producto bruto se utilizó directamente durante el siguiente paso o se purificó mediante cromatografía rápida (gel de sílice, hexanos - acetato de etilo, de 90/10 a 50/50) para proporcionar 3-cloro-N-[3-(4-cloro-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ilmetoxi)-4-metil-fenil]-4-fluoro-benzamida pura como un sólido blanco. (Rendimiento 35,5 mg).

Ejemplo 23

3-(4-amino-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ilmetoxi)-N-(3-cloro-4-fluoro-fenil)-4-metil-benzamida



Se hizo burbujear amonio gaseoso a través de una suspensión de 3-cloro-N-[3-(4-cloro-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ilmetoxi)-4-metil-fenil]-4-fluoro-benzamida (34,5 mg, Ejemplo 22) en 2-propanol (11 mL) durante 15 minutos. La mezcla se calentó entonces hasta 130 °C durante 1 hora en microondas antes de eliminar el solvente bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida (gel de sílice, diclorometano - metanol, de 98/2 a 90/10) para proporcionar 3-(4-amino-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ilmetoxi)-4-metil-fenil]-3-cloro-4-fluoro-benzamida como un sólido blanco. (Rendimiento 25,6 mg).

HRMS (ES⁺) m/z Calculado para C₂₁H₁₈ClFN₆O₂ + H [(M+H)⁺]: 441,1235. Obtenido: 441,1237.

Ejemplo 24

La actividad antiproliferativa de los compuestos de la presente invención se demuestra a continuación. Esta actividad indica que los compuestos de la presente invención son útiles para el tratamiento del cáncer, en particular los tumores sólidos como los tumores de mama, los tumores de pulmón, los tumores de colon, los tumores de próstata y el melanoma.

Ensayo de inhibición de la enzima quinasa (CI₅₀)

Ensayo HTRF de c-Raf con 6H-MEK como sustrato (dosis-respuesta)

Principio del ensayo:

El ensayo utiliza 6H-MEK como sustrato. Tras la fosforilación de c-Raf, se detecta la 6H-MEK fosforilada con anticuerpos anti-fosfo-MEK1/2 de conejo, anti-conejo marcado con Eu y anti-6H marcado con APC.

Reactivos e Instrumentos:

Enzima: c-Raf humana clonada con una marca de EE; fosforilada (coexpresada con v-src-FLAG en células Hi5 con baculovirus), 0,2 mg/mL (2,74 μM asumiendo un peso molecular de 73 kD) almacenada a -15 °C.

Sustrato: 6H-MEK salvaje de longitud completa, 4,94 mg/mL (154,4 μM asumiendo un PM de 32 kD) almacenada a -15 °C.

Anticuerpos: Anticuerpo (α-P-(Ser 217/221)-MEK-1/2 de conejo (de Cell Signaling, N° cat. 9121 B, Lote 14); IgG Eu (α-conejo (de Wallace, N° cat. AD0083, Lote 318663, 710 ug/mL, 4,4 μM); (α-6H-SureLight-APC (de Martek, N° cat. AD0059H, Lote E012AB01, 3,03 μM).

Lector: Envision de PerkinElmer, modo de lectura HTRF con espejo 412.

Placa de ensayo: Placas de polipropileno completamente negras de Matrix (Nº cat. 4344).

Otros: Placas de polipropileno 384 Weidman (REMP) para las placas de compuestos.

5 Procedimiento de ensayo:

Se prepara tampón para el ensayo quinasa (KAB): HEPES 50 mM (HyClone) pH 7, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, Na₃V₂O₄ 0,1 mM y BSA 0,3 mg/ml.

10 Se prepara 6H-MEK (150 nM) en KAB. Se añaden 12 µL/pocillo en la placa de ensayo.

Se prepara ATP (66 µM) en KAB.

Se diluyen los compuestos a 2,4 mM y cualquiera de los controles positivos a 480 µM en DMSO.

15 Se realiza una dilución de 3x 10 puntos en DMSO. Se retiran 2,5 µL/pocillo de solución de DMSO y se añaden hasta 27,5 µL/pocillo de solución de ATP del punto (3).

20 Se mezcla, luego se añaden 6 µL/pocillo de solución del punto (4) a la placa de ensayo para obtener una concentración de DMSO del 2,1% durante la fosforilación de MEK.

Se prepara c-Raf (12 nM) en KAB.

25 Se añaden 6 µL/pocillo de KAB en las columnas 1-2 y 6 µL/pocillo de c-Raf en las columnas 3-24. Se incuban a 37°C durante 30 min.

Se prepara anticuerpo α-P-(Ser 217/221)-MEK-1/2 de conejo (1:240 a partir de la solución de reserva) en AB1: HEPES 50 mM pH 7, BSA 0,2 mg/mL y EDTA 43 mM.

30 Para detener la reacción, se añaden 6 µL/pocillo de solución del paso (9) a la placa de ensayo y se incuban a 37°C durante 30 min.

Se prepara IgG α-conejo con Eu (9 nM) y α-6H-SureLight-APC (120 nM) en AB2: HEPES 50 mM pH 7 y BSA 0,2 mg/mL.

35 Se añaden 6 µL/pocillo de solución del paso (11) a la placa de ensayo.

Para determinar el factor de interferencia del espectro, se preparan dos muestras siguiendo los pasos de (1) a (10). Para la muestra blanco, se añaden 6 µL/pocillo de AB2. Para la muestra de factor de interferencia, se añaden 6 µL/pocillo de IgG anti conejo con Eu (9 nM).

Se incuban a temperatura ambiente durante 1,5 horas.

45 Se leen las señales de HTRF a 615 nm y 665 nm en el equipo Envision. Se normalizan las señales de HTRF tras la corrección de la interferencia del espectro.

Expresión y purificación de c-Raf

50 Se expresó c-Raf con una marca de EE en el extremo N terminal en células High-5. Un cultivo de 5 litros se co-transfectó con el virus con EE-c-Raf y FLAG-vSrc en una proporción 1:2 y se recogió tras 48 horas. El botón celular se lisó en TBS que contenía EDTA 5 mM, KF 50 mM, pirofosfato Na 20 mM, β-glicerolfosfato 20 mM, VO₃ Na 0,5 mM NP-40 al 1% (p/v) y comprimidos de inhibidores de proteasa completos. El lisado se centrifugó a 20.000 x g durante 1 hora. El sobrenadante se incubó con 8 mL de anti-Proteína G-marca EE Sepharose durante 2 horas a 4°C. La resina se lavó luego con 30 volúmenes del tampón anterior. La proteína c-Raf se eluyó mediante la incubación con el tampón anterior que contiene 100 mg/mL de péptido EE durante 1 hora a 4°C. La proteína se concentró utilizando una celda de centrifugación Amicon con una membrana YM10. La proteína concentrada se dializó frente a TBS que contenía DTT 1 mM y glicerol al 30%. La concentración de proteína se determinó mediante el método DC de BioRad.

60 Purificación de 6H-MEK1 (62-393)

65 Se hicieron crecer células de E. coli que contenían el plásmido para la expresión de 6H-MEK1 (62-393) en medio rico y se indujeron con IPTG 1 mM durante 24 horas a 22°C. El botón celular se resuspendió en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, MgCl₂ 5 mM, CHAPS 10 mM, TCEP 2 mM, y comprimidos de inhibidores de proteasa completos. Las células se lisaron mediante sonicación. El lisado se clarificó mediante centrifugación a

- 13.000 x g durante 45 minutos. El sobrenadante se diluyó 1:1 con tampón fosfato potásico 50 mM, pH 8,0, imidazol 10 mM, TCEP 4 mM, NaCl 300 mM, CHAPS 10 mM, pirrol-2-carboxilato 2 mM y ZnCl₂ 100 mM, luego se incubó con la resina de afinidad a metales TALON durante 1 hora a 4°C. La resina se lavó con 10 volúmenes de tampón fosfato potásico 50 mM, pH 8,0, imidazol 5 mM, TCEP 2 mM, NaCl 300 mM, CHAPS 10 mM, pirrol-2-carboxilato 1 mM y ZnCl₂ 50 mM. Las proteínas se eluyeron mediante la incubación con 5 volúmenes de HEPES 20 mM, pH 8,0, EDTA 100 mM, TCEP 2 mM, glicerol al 10% v/v durante 1 hora a 4°C. El material eluido se concentró utilizando dispositivos Amicon Ultra 15 con membranas con un umbral de PM de 10 Kd. La muestra luego se sometió a una cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Superdex 200 26/60. El pico 6H-MEK1 se agrupó y se concentró como anteriormente. La proteína se determinó mediante el método de BioRad.
- 10 Ensayo HTRF de b-Raf de tipo salvaje con 6H-MEK como sustrato (Respuesta a dosis)
- Principio del ensayo:
- 15 El ensayo utiliza 6H-MEK como sustrato. Tras la fosforilación de b-Raf WT, el 6H-MEK fosforilado se detecta con anticuerpos anti-fosfo-MEK1/2 de conejo, anti-conejo marcado con Eu, y anti-6H marcado con APC.
- Reactivos e instrumentos:
- 20 Enzima: los residuos 416-final de b-Raf recombinante humano con marcaje GST en N-terminal de Upstate; (expresados por baculovirus en células de insecto Sf21), 0,26 mg/mL (3.87 µM asumiendo un peso molecular de 67,2 kD) N° de Cat. 14-530M, Lote N° 25502AU, almacenado a -80°C.
- 25 Sustrato: 6H-MEK WT de longitud completa, 4,94 mg/mL (154,4 µM asumiendo un PM de 32 kD) almacenado a -15°C.
- Anticuerpos: Ac de conejo (α-P-(Ser 217/221)-MEK-1/2 (de Cell Signaling, N° de Cat. 9121 B, Lote 14); Eu-(α-IgG de conejo (de Wallac, N° de Cat. AD0083, Lote 318663, 710 ug/mL, 4,4 µM); (α-6H-SureLight-APC (de Martek, N° de Cat. AD0059H, Lote E012AB01, 3.03 µM).
- 30 Lector: Envision de PerkinElmer, modo de lectura de HTRF con placa de ensayo con espejo 412: placas Matrix de polipropileno negras (N° de Cat. 4344)
- Otros: Placas de polipropileno Weidman 384 (REMP) para la placa de compuesto.
- 35 Procedimiento del ensayo:
- Se prepara el tampón quinasa del ensayo (KAB): HEPES 50 mM (HyClone) pH7, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, Na₃V₂O₄ 0,1 mM, y BSA 0,3 mg/ml.
- 40 Se prepara 6H-MEK (150 nM) en KAB. Se añaden 12 µL/pocillo en la placa de ensayo.
- Se prepara ATP (66 µM) en KAB.
- 45 Se diluyen los compuestos a 2,4 mM y cualquier control positivo a 480 µM en DMSO.
- Se realiza una dilución 3x de 10 puntos en DMSO. Se retiran 2.5 µL/ pocillo de solución de DMSO y se añaden a 27,5 µL/ pocillo de solución de ATP en (3).
- 50 Se mezcla, después se añade 6 µL/ pocillo de solución en (4) a la placa de ensayo para una concentración de DMSO de 2,1 % durante la fosforilación de MEK.
- Se prepara b-Raf WT (100 pM) en KAB.
- 55 Se añade 6 µL/ pocillo de KAB en las columnas 1-2 y 6 µL/ pocillo de b-Raf WT en las columnas 3-24. Se incuba a 37°C durante 30 min.
- Se prepara Ac (α-P-(Ser 217/221)-MEK-1/2 de conejo (1:200 a partir de solución de reserva) en AB1: HEPES 50 mM pH7, BSA 0,2 mg/ml, y EDTA 43 mM.
- 60 Para parar la reacción, se añaden 6 µL/pocillo de solución a partir de (9) a la placa de ensayo y se incuba a 37°C durante 30 min.
- 65 Se prepara Eu-(α-IgG de conejo (9 nM) y (α-6H-SureLight-APC (180 nM) en AB2: HEPES 50 mM pH7 y BSA 0,2 mg/mL.

Se añade 6 µL/ pocillo de solución a partir de (11) a la placa de ensayo.

Para determinar el factor de interferencia del espectro, se preparan 2 muestras siguiendo los pasos (1) a (10). Para la muestra blanco, se añade 6 µL/ pocillo de AB2. Para la muestra de factor de interferencia, se añade 6 µL/ pocillo de Eu-anti IgG de conejo (9 nM).

Se incuba a temperatura ambiente durante 1,5 horas.

Se realizan las lecturas de las señales de HTRF a 615 nm y 665 nm en el Envision. Se normalizan las señales de HTRF tras la corrección del espectro de intercomunicación.

Ensayo HTRF de b-Raf V600E mutante con 6H-MEK como sustrato (Respuesta a dosis)

Principio del ensayo:

El ensayo utiliza 6H-MEK como sustrato. Tras la fosforilación de b-Raf V600E, el 6H-MEK fosforilado se detecta con anticuerpos anti-fosfo-MEK1/2 de conejo, anti-conejo marcado con Eu, y anti-6H marcado con APC.

Reactivos e instrumentos:

Enzima: los residuos 416-final de b-Raf recombinante humano que contienen una mutación V600E con marcaje GST en N-terminal de Upstate; (expresados por baculovirus en células de insecto Sf21), 0,26 mg/mL (7.49 µM asumiendo un peso molecular de 67,3 kD) N° de Cat. 14-5M, Lote N° 25633AU, almacenado a -80 °C.

Sustrato: 6H-MEK WT de longitud completa, 4,94 mg/mL (154,4 µM asumiendo un PM de 32 kD) almacenado a -15 °C.

Anticuerpos: Ac de conejo (α-P-(Ser 217/221)-MEK-1/2 (de Cell Signaling, N° de Cat. 9121 B, Lote 14); Eu-(α-IgG de conejo (de Wallac, N° de Cat. AD0083, Lote 318663, 710 ug/mL, 4,4 µM); (α-6H-SureLight-APC (de Martek, N° de Cat. AD0059H, Lote E012AB01, 3.03 µM).

Lector: Envision de PerkinElmer, modo de lectura de HTRF con placa de ensayo con espejo 412: placas Matrix de polipropileno negras (N° de Cat. 4344)

Otros: Placas de polipropileno Weidman 384 (REMP) para la placa de compuesto.

Procedimiento del ensayo:

(1) Se prepara el tampón quinasa del ensayo (KAB): HEPES 50 mM (HyClone) pH7, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, Na₃V₂O₄ 0,1 mM, y BSA 0,3 mg/ml.

(2) Se prepara 6H-MEK (150 nM) en KAB. Se añaden 12 µL/pocillo en la placa de ensayo.

(3) Se prepara ATP (66 µM) en KAB.

(4) Se diluyen los compuestos a 2,4 mM y cualquier control positivo a 480 µM en DMSO. Se realiza una dilución 3x de 10 puntos en DMSO. Se retiran 2.5 µL/ pocillo de solución de DMSO y se añaden a 27,5 µL/ pocillo de solución de ATP en (3).

(5) Se mezcla, después se añade 6 µL/ pocillo de solución en (4) a la placa de ensayo para una concentración de DMSO de 2,1 % durante la fosforilación de MEK.

(6) Se prepara b-Raf WT (100 pM) en KAB.

(7) Se añade 6 µL/ pocillo de KAB en las columnas 1-2 y 6 µL/ pocillo de b-Raf WT en las columnas 3-24.

(8) Se incuba a 37 °C durante 30 min.

(9) Se prepara Ac (α-P-(Ser 217/221)-MEK-1/2 de conejo (1:200 a partir de solución de reserva) en AB1: HEPES 50 mM pH7, BSA 0,2 mg/ml, y EDTA 43 mM.

(10) Para parar la reacción, se añaden 6 µL/pocillo de solución a partir de (9) a la placa de ensayo y se incuba a 37 °C durante 30 min.

(11) Se prepar Eu-(α -IgG de conejo (9 nM) y (α -6H-SureLight-APC (180 nM) en AB2: HEPES 50 mM pH7 y BSA 0,2 mg/mL.

5 (12) Se añade 6 μ L/ pocillo de solución a partir de (11) a la placa de ensayo.

(13) Para determinar el factor de interferencia del espectro, se preparan 2 muestras siguiendo los pasos (1) a (10). Para la muestra blanco, se añade 6 μ L/ pocillo de AB2. Para la muestra de factor de interferencia, se añade 6 μ L/ pocillo de Eu-anti IgG de conejo (9 nM).

10 (14) Se incuba a temperatura ambiente durante 1,5 horas.

(15) Se realizan las lecturas de las señales de HTRF a 615 nm y 665 nm en el Envision. Se normalizan las señales de HTRF tras la corrección del espectro de intercomunicación.

15 Datos del ensayo

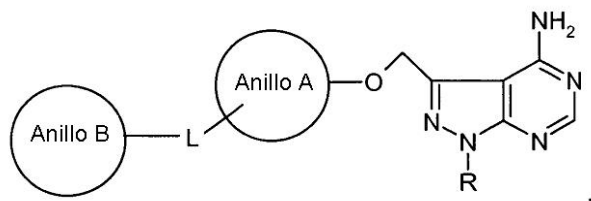
Tabla 1: Ensayo de inhibición de la enzima quinasa (CI_{50})

Ejemplo	cRaf CI_{50} (μ M)	bRaf tipo salvaje CI_{50} (μ M)	bRaf(V600E) CI_{50} (μ M)
9	<10	<10	<10
17	<10	<10	<10
23	<10	<10	<10
13	<10	<10	<10
11	<10	<10	<10
15	<10	<10	<10
7	<10	<10	<10
19	<10	<10	<10
21	<10	<10	<10

20

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que es uno de acuerdo con la Fórmula (I),

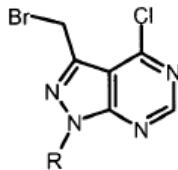


- 5 en la que
R es alquilo inferior;
- 10 el anillo A se selecciona de entre el grupo que consiste en:
heteroarilo;
heteroarilo sustituido por de 1 a 5 sustituyentes independientemente seleccionados de entre el grupo que
consiste en alquilo inferior; halógeno; hidroxilo; alcoxi inferior; alcoxi inferior sustituido por hidroxilo o alcoxi
inferior; y ciano;
15 fenilo; y
fenilo sustituido por de 1 a 4 sustituyentes independientemente seleccionados de entre el grupo que
consiste en alquilo inferior; halógeno; hidroxilo; alcoxi inferior; alcoxi inferior sustituido por hidroxilo o alcoxi
inferior; y ciano;
- 20 el anillo B se selecciona de entre el grupo que consiste en:
heteroarilo;
heteroarilo sustituido por de 1 a 5 sustituyentes seleccionados de entre el grupo que consiste en alquilo
inferior; alquilo fluorado; alquilo sustituido con arilo; hidroxilo; alcoxi inferior; alcoxi inferior sustituido por
hidroxilo o alcoxi inferior; halógeno; y -NR¹R²;
25 fenilo; y
fenilo sustituido por de 1 a 5 sustituyentes seleccionados de entre el grupo que consiste en alquilo inferior;
alquilo fluorado; alquilo sustituido con arilo; hidroxilo; alcoxi inferior; alcoxi inferior sustituido por hidroxilo o
alcoxi inferior;
halógeno; ciano; y -NR¹R²;
- 30 R¹ y R² se seleccionan independientemente el uno del otro de entre el grupo que consiste en hidrógeno; alquilo
inferior; y alquilo inferior sustituido con hidroxilo o alcoxi inferior; y R¹ y R², junto con el N, puede formar un anillo
heterocíclico de 5 o 6 miembros; y L se selecciona de entre el grupo que consiste en un enlace, -OCH₂-, -CH₂O-, -
NHCO-, -CONH-, -O-, -OCH₂CH₂-, -CH₂OCH₂-, -CH₂CH₂O-, -CF=CH-, -CH=CF-, -NH-, -NHCH₂-, -CH₂NH-, -SCH₂-, -
35 CH₂S-, -SOCH₂-, -CH₂SO-, -SO₂CH₂-, -CH₂SO₂-, -S-, -CH=CH-, y alquilo inferior; y
- en el que el término "inferior" se refiere a un grupo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono;
- 40 con la condición de que, cuando L es un enlace, el anillo B es un azol sustituido por de 1 a 4 sustituyentes
seleccionados de entre el grupo que consiste en: alquilo inferior; alquilo fluorado; alquilo sustituido con arilo;
hidroxilo; alcoxi inferior; alcoxi inferior sustituido con hidroxilo o alcoxi inferior; halógeno; ciano; y -NR¹R²;
- o una sal o éster aceptable a nivel farmacéutico de un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I),.
- 45 2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en la que L es un enlace y el anillo B es un azol sustituido por
de 1 a 4 sustituyentes seleccionados de entre el grupo que consiste en alquilo inferior; alquilo fluorado; alquilo
sustituido con arilo; hidroxilo; alcoxi inferior; alcoxi inferior sustituido por hidroxilo o alcoxi inferior; halógeno; ciano; y
- NR¹R²; y dicho azol se selecciona de entre el grupo que consiste en 1,3,4-oxadiazol, 1,2,4-oxadiazol, 1,2,3-triazol,
1,2,4-triazol, y tetrazol.
- 50 3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2 en la que el anillo B es un 1,3,4-oxadiazol.
4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en la que anillo A es fenilo sustituido por metil en una posición
que es orto en relación al 1-alquilo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ilmetoxi.
- 55 5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en la que R es metilo.
6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en la que L se selecciona de entre el grupo que consiste en
-CH₂O-, -NHCO-, y -CONH-.

7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en el que: el anillo A se selecciona de entre el grupo que consiste en fenilo y fenilo sustituido por metilo; L es un enlace; y el anillo B es un azol sustituido por de 1 a 4 sustituyentes seleccionados de entre el grupo que consiste en alquilo inferior; alquilo fluorado; alquilo sustituido con arilo; hidroxilo; alcoxi inferior; alcoxi inferior sustituido por hidroxilo o alcoxi inferior; halógeno; ciano; y $-NR^1R^2$.
- 5 8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 7 en el que dicho azol se selecciona de entre el grupo que consiste en 1,3,4-oxadiazol; 1,2,4-oxadiazol; 1,2,3-triazol; 1,2,4-triazol; y tetrazol.
- 10 9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que
R es alquilo (C_{1-6});
el anillo A es fenilo, que no está sustituido o está monosustituido con un alquilo (C_{1-6});
- 15 L es $-CH_2-O-$, $-O-CH_2-$, $-C(O)-NH-$, o $-NH-C(O)-$;
el anillo B es fenilo, que no está sustituido o está monosustituido o bisustituido con un sustituyente independientemente seleccionado de entre halógeno, o $-NH-(CH_2)_2-OH$; o
- 20 L es un enlace, y
el anillo B es 3-metil-[1,2,4]oxadiazol-5-ilo.
- 25 10. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 seleccionado de entre el grupo que consiste en:
3-(3-benciloxi-fenoximetil)-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina;
N-[3-(4-amino-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ilmetoxi)-4-metilfenilo]-3-cloro-4-(2-hidroxi-etilamino)-benzamida;
- 30 N-[3-(4-amino-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ilmetoxi)-4-metilfenilo]-3-cloro-benzamida;
4-cloro-1-metil-3-[2-metil-5-(3-metil-[1,2,4]oxadiazol-5-ilo)-fenoximetil]-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina;
- 35 3-(5-benciloxi-2-metil-fenoximetil)-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina;
3-(4-amino-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ilmetoxi)-N-(4-clorofenilo)-4-metil-benzamida;
- 40 3-[5-(4-cloro-benciloxi)-2-metil-fenoximetil]-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina;
1-metil-3-[2-metil-5-(5-metil-[1,3,4]oxadiazol-2-il)-fenoximetil]-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina; y
3-(4-amino-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ilmetoxi)-N-(3-cloro-4-fluoro-fenilo)-4-metil-benzamida;
- 45 y las sales y ésteres aceptables a nivel farmacéutico de cualquiera de los compuestos anteriores.
- 50 11. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva a nivel terapéutico de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 y a transportador.
12. Una formulación de dosis unitaria que comprende una cantidad efectiva a nivel terapéutico de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 y un transportador.
- 55 13. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para su utilización en un método durante el tratamiento de un paciente que padece un trastorno proliferativo, en particular un tumor sólido, más en particular un tumor de mama, tumor de pulmón, tumor de colon, tumor de próstata y melanoma que comprende el paso de administrar al paciente un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1.
14. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su utilización como medicamento.
- 60 15. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su utilización como medicamento para el tratamiento de un cáncer, en particular tumores sólidos, más en particular un tumor de mama, tumor de pulmón, tumor de colon, tumor de próstata y melanoma.
- 65 16. La utilización de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 durante la fabricación de medicamentos durante el tratamiento del cáncer, en particular tumores sólidos, más en particular un tumor de mama, tumor de pulmón, tumor de colon, tumor de próstata y melanoma.

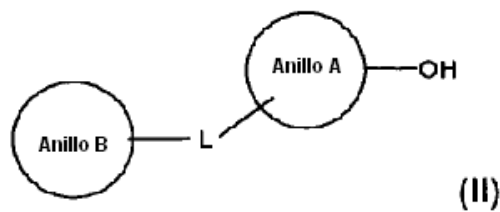
17. Un proceso durante la preparación de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en la que

a) un derivado de 1-alkilo-3-bromometil-4-cloro-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina de la fórmula



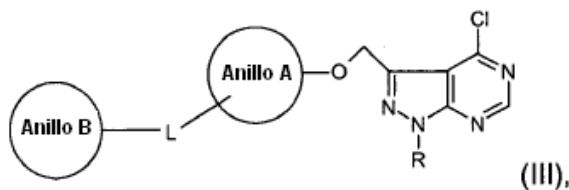
5

se hace reaccionar con un compuesto de fórmula (II)



10

para proporcionar el correspondiente compuesto de fórmula (III)



y

15

b) dicho compuesto de fórmula (III) se hace reaccionar además con amoníaco para proporcionar el correspondiente compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1; en la que todos los sustituyentes poseen el significado proporcionado en la reivindicación 1.