

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 656**

51 Int. Cl.:
C07D 231/40 (2006.01)
C07D 231/56 (2006.01)
A61K 31/416 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07762713 .1**
96 Fecha de presentación: **26.01.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1981851**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.10.2008**

54 Título: **Inhibidores de cinasas y procedimientos de utilización de los mismos**

30 Prioridad:
31.01.2006 US 763712 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.04.2012

73 Titular/es:
**ARRAY BIOPHARMA, INC.
3200 WALNUT STREET
BOULDER, CO 80301, US**

72 Inventor/es:
**GRONEBERG, Robert;
BURGESS, Laurence, E.;
HARVEY, Darren;
LAIRD, Ellen;
MUNSON, Mark;
RIZZI, James;
RODRIGUEZ, Martha;
EARY, Charles, Todd y
WATSON, Daniel**

74 Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

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).

ES 2 379 656 T3

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de cinasas y procedimientos de utilización de los mismos.

5 **Antecedentes de la invención**1. Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a inhibidores de cinasas, a composiciones farmacéuticas que contienen los inhibidores y a procedimientos para preparar estos inhibidores. Los inhibidores de cinasas de la presente invención son útiles para el tratamiento de inflamación, osteoartritis, artritis reumatoide, cáncer, enfermedades autoinmunitarias y otras enfermedades mediadas por citocinas.

15 2. Descripción del estado de la técnica

20 Varias afecciones inflamatorias crónicas y agudas se han asociado con la sobreproducción de citocinas proinflamatorias. Las citocinas de este tipo incluyen pero no se limitan a factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 8 (IL-8) e interleucina 6 (IL-6). La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad crónica en la que TNF- α e IL-1 β están implicados en la aparición de las enfermedades y en la progresión de la destrucción articular y ósea observada con esta afección debilitante. Tratamientos terapéuticos recientemente aprobados para AR han incluido receptor de TNF- α soluble (ENBREL™) y antagonista del receptor de IL-1 (ANAKINRA™). Estos tratamientos funcionan bloqueando la capacidad de sus citocinas respectivas para unirse a sus receptores naturales. Métodos alternativos para tratar enfermedades mediadas por citocinas están actualmente en investigación. Un método de este tipo implica la inhibición de la ruta de señalización que regula la síntesis y producción de citocinas proinflamatorias tales como p38.

30 La P38 (también conocida como CSBP o RK) es una serina/treonina proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) que se ha demostrado que regula las citocinas proinflamatorias. La MAPK p38 se identificó por primera vez como una cinasa que se fosforila en tirosina en monocitos de ratón tras el tratamiento con lipopolisacárido (LPS). Se estableció por primera vez un vínculo entre MAPK p38 y la respuesta de células a citocinas por Saklatvala *et al.*, (Cell, 1994, 78:1039-1049), que mostraron que IL-1 activa una cascada de proteína cinasas que da como resultado la fosforilación de la proteína de choque térmico pequeña, Hsp27, probablemente por la proteína cinasa 2 activada por proteína activada por mitógeno (MAPKAP cinasa-2). El análisis de las secuencias peptídicas derivadas de la cinasa purificada indicó que estaba relacionada con la MAPK p38 activada por LPS en monocitos de ratón (Han, J., *et al.*, Science, 1994, 265:808-811). Al mismo tiempo, se mostró que la MAPK p38 se activaba por sí misma mediante una cinasa aguas arriba en respuesta a una variedad de estreses celulares, incluyendo exposición a radiación UV y choque osmótico, y la identidad de la cinasa que fosforila directamente Hsp27 se confirmó como MAPKAP cinasa 2 (Rouse, J., *et al.*, Cell, 1994, 78:1027-1037). Posteriormente, se mostró que la MAPK p38 era la diana molecular de una serie de compuestos de piridinilimidazol que inhibían la producción de TNF a partir de monocitos humanos expuestos a LPS (Lee, J., *et al.*, Nature, 372:739-746). Esto fue un descubrimiento clave y ha conducido al desarrollo de varios inhibidores selectivos de la MAPK p38 y el esclarecimiento de su papel en la señalización por citocinas.

45 Es conocido en la actualidad que múltiples formas de la MAPK p38 (α , β , γ ,), cada una codificada por un gen separado, forman parte de una cascada de cinasas implicada en la respuesta de las células a una variedad de estímulos, incluyendo estrés osmótico, luz UV y acontecimientos mediados por citocinas. Se cree que estas cuatro isoformas de p38 regulan diferentes aspectos de la señalización intracelular. La activación de p38 es parte de una cascada de acontecimientos de señalización que conduce a la síntesis y producción de citocinas proinflamatorias tales como TNF- α . La P38 funciona fosforilando sustratos aguas abajo que incluyen otras cinasas y factores de transcripción. Se ha demostrado que los agentes que inhiben la MAPK p38 bloquean la producción de citocinas incluyendo pero sin limitarse a TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-1 β en modelos *in vitro* e *in vivo* (Adams, J. L., *et al.*, Progress in Medicinal Chemistry, 2001, 38:1-60).

55 La Abl (también conocida como Ableson) es una tirosina cinasa que se expresa en células hematopoyéticas y está implicada en la progresión de diversos tumores líquidos incluyendo leucemia mieloide crónica (LMC) y leucemia linfoblástica aguda (LLA). La transformación es un resultado de una translocación cromosómica, conocida como cromosoma Filadelfia. Esto conduce a una quimera activada de manera constitutiva entre Ableson y la región de agrupación de punto de rotura (BCR), la proteína Abl-BCR. El GLEEVEC®, también conocido como imatinib (Novartis) es un potente inhibidor de Abl y se utiliza actualmente para tratar pacientes con LMC (N. Engl. J. Med., 2001, 344:1031-1037). Este fármaco se ha convertido en el tratamiento de referencia para esta enfermedad mortal y también está considerándose en una variedad de otros entornos de cáncer incluyendo tumores del estroma gastrointestinal (GIST).

65 Existen pruebas de que los fibroblastos responden a la proteína de factor de crecimiento TGF- β estimulando la ruta de Abl y conducen a cambios morfológicos indicativos de fibrosis; por tanto Abl podría desempeñar un papel en la patogénesis de enfermedades fibróticas como la fibrosis pulmonar idiopática. Leof *et al.* (J. Clin. Invest., 2004,

114(9) 1308-1316) han demostrado la eficacia preclínica de GLEEVEC® en un modelo mediado por bleomicina de fibrosis pulmonar en ratón. El GLEEVEC® está evaluándose en pacientes con fibrosis pulmonar.

La TEK (también conocido como Tie-2) es otra tirosina cinasa receptora expresada sólo en células endoteliales que se ha mostrado que desempeña un papel en la angiogénesis. La unión del factor angiopoyetina-1 da como resultado autofosforilación del dominio cinasa de TEK y da como resultado un proceso de transducción de señales que parece mediar la interacción de células endoteliales con células de soporte periendoeliales, facilitando así la maduración de vasos sanguíneos recién formados. El factor angiopoyetina-2, por otro lado, parece antagonizar la acción de angiopoyetina-1 sobre TEK y altera la angiogénesis (Maisonpierre *et al.*, *Science*, 1997,277:55-60). Tie2 está regulado por incremento en vasos angiogénicos tumorales (Trogan, E. Br. J. Cancer, 1998, 77:51-56) y existen pruebas de que puede ejercer un papel de apoyo en cánceres hematopoyéticos (L. Naldini *et al.*, *Cancer Cell*, 2005, 8:211-226; Suda, T. *et al.*, *Cell*, 2004, 118:149-161). Además de su posible papel en el cáncer, la angiogénesis también puede presentar implicaciones en enfermedades como artritis reumatoide (AR), psoriasis y la progresión de patologías provocadas por inflamación. La formación del paño, la región destructora responsable de la progresión artrítica, está provocada en parte por la formación de nuevos vasos sanguíneos y un artículo reciente de Lin, C. *et al.* (*Arthritis and Rheumatism*, 2005, 52 (5):1585-1594) demuestra el papel patológico de Tie2 en modelos de AR de artritis inducida por colágeno en ratón. Por tanto, la inhibición de Tie2 podría proporcionar un efecto beneficioso contra enfermedades inflamatorias y proliferativas.

Se ha implicado a varias otras cinasas en la progresión de enfermedades proliferativas tales como cáncer. Entre éstas, se ha mostrado que numerosas proteínas miembros de la familia Src ejercen un papel similar a Src y pueden proporcionar rutas de señalización paralelas durante la proliferación celular incontrolada. Los ejemplos principales incluyen las tirosina cinasas Lyn, Fyn, Lck y Hck. Se ha implicado a Lyn y Hck en la progresión de la leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B), un cáncer hematopoyético de células B (Li, S. *et al.* *Nat Genet.*, 2004 36(5):453-461).

La familia Eph (secuencia amplificada del hepatoma productor de eritropoyetina) de receptores tirosina cinasa se une a efrinas, lo que conduce a numerosos procesos celulares. Los Eph parecen ejercer una función modulando la adhesión y motilidad e invasividad de células tumorales, y algunas pruebas demuestran un papel activo de Eph y efrinas en la neovascularización durante procesos patológicos. Los receptores Eph A se sobreexpresan en pulmón, riñón y vasculatura tumoral gástrica, y se ha mostrado que proteínas EphA2 o A3 solubles, dominantes-negativas modulan la progresión y angiogénesis tumoral *in vivo* (Lackmann M. *et al.*, *IUBMB Life*, 2005, 57(6):421-31).

Los factores de crecimiento endoteliales vasculares y sus receptores relacionados, por ejemplo KDR (VEGFR2) y FLT1 (VEGFR1) son reguladores clave de la angiogénesis. El fármaco terapéutico proteico AVASTIN® ha demostrado ser prometedor en cáncer de colon y funciona a través de la ruta de VEGFR. El SUTENT/SU11248 (malato de sunitinib) (Pfizer) es un potente inhibidor de KDR y ha mostrado resultados prometedores contra GIST y carcinomas de células renales.

Se ha demostrado que los monocitos de sangre periférica (CMSP) expresan y secretan citocinas proinflamatorias cuando se estimulan con lipopolisacárido (LPS) *in vitro*. Los inhibidores de p38 bloquean eficazmente este efecto cuando se tratan previamente CMSP con compuestos de este tipo antes de la estimulación con LPS (Lee, J.C., *et al.*, *Int. J. Immunopharmacol.*, 1988, 10: 835-843). La eficacia de inhibidores de p38 en modelos animales de enfermedad inflamatoria ha dado lugar a una investigación del/de los mecanismo(s) subyacente(s) que podrían explicar el efecto de estos inhibidores. Se ha investigado el papel de la p38 en la respuesta de las células a IL-1 y TNF en varios sistemas de células relevantes para la respuesta inflamatoria utilizando un inhibidor de piridinilimidazol: células endoteliales e IL-8 (Hashimoto, S., *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2001, 293: 370-375), fibroblastos e IL-6/GM-CSF/PGE2 (Beyaert, R., *et al.*, *EMBO J.*, 1996, 15:1914-1923), neutrófilos e IL-8 (Albanyan, E. A., *et al.*, *Infect. Immun.*, 2000, 68:2053-2060) macrófagos e IL-1 (Caivano, M. y Cohen, P., *J. Immunol.*, 2000, 164:3018-3025) y células de músculo liso y RANTES (Maruoka, S., *et al.*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1999, 161:659-668). Los efectos destructivos de muchos estados patológicos están provocados por la sobreproducción de citocinas proinflamatorias. La capacidad de los inhibidores de p38 para regular esta sobreproducción los convierte en excelentes candidatos para agentes modificadores de la enfermedad.

Inhibidores conocidos de la MAPK p38 son activos en una variedad de modelos de enfermedad ampliamente reconocidos. Los inhibidores de la MAPK p38 muestran efectos positivos en varios modelos animales convencionales de inflamación incluyendo artritis inducida por colágeno en rata (Jackson, J.R., *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1998, 284:687-692); artritis inducida por adyuvante en rata (Badger, A. M., *et al.*, *Arthritis Rheum.*, 2000, 43:175-183; Badger, A. M., *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, (1996) 279:1453-1461); y edema de la pata inducido por carragenanos en el ratón (Nishikori, T., *et al.*, *Eur. J. Pharm.*, 2002, 451:327-333). Se ha mostrado que las moléculas que bloquean la función de p38 son eficaces en la inhibición de la resorción ósea, la inflamación y otras patologías inmunitarias y basadas en inflamación en estos modelos animales.

Por tanto, un inhibidor de cinasas seguro y eficaz proporcionaría unos medios para tratar enfermedades debilitantes que pueden regularse mediante la modulación de una o más cinasas.

La publicación de solicitud de patente internacional WO n° 2004/078116 da a conocer ciertos compuestos como inhibidores de cinasas. Entre estos compuestos se encuentran ciertos derivados de indazol N1-sustituídos que presentan un sustituyente en la posición 5 que contiene un grupo pirazol-5-ilurea. Los ejemplos de compuestos de este tipo incluyen los compuestos de los ejemplos 94 y 138 en los que el sustituyente N1 es respectivamente un grupo metilo y un grupo 2-hidroxi-2-metilpropilo.

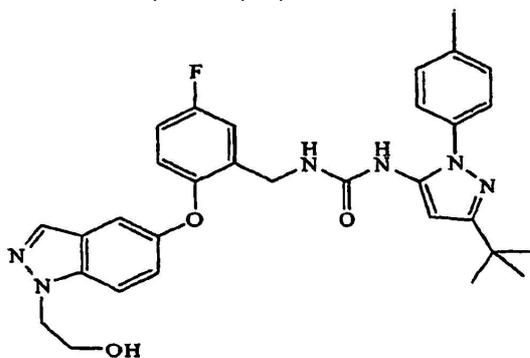
Se ha descubierto que pueden obtenerse compuestos que presentan propiedades particularmente deseables seleccionando el grupo alcohol primario, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, como sustituyente N1, y un sustituyente particular en la posición 5 que contiene un grupo 3-*terc*-butil-1-*p*-tolil-1*H*-pirazol-5-ilo.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona compuestos que inhiben una o más cinasas y acontecimientos mediados por cinasas tales como la inhibición de la producción de citocinas, angiogénesis o proliferación celular. Los compuestos de este tipo presentan utilidad como agentes terapéuticos para enfermedades que pueden tratarse mediante la inhibición de rutas de señalización por cinasas.

Descripción detallada de la invención

En un aspecto, la invención proporciona un compuesto que presenta la fórmula I:



I

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

El compuesto también puede describirse mediante el nombre químico 1-(3-*terc*-butil-1-*p*-tolil-1*H*-pirazol-5-il)-3-(5-fluoro-2-(1-(2-hidroxietil)-1*H*-indazol-5-iloxi)encil)urea.

Se descubrió que el compuesto de fórmula I presenta una potencia mejorada contra ciertas cinasas. Además, se observó que la solubilidad del compuesto correspondiente en el que se reemplaza el sustituyente N1 por un grupo éster de fosfato de fórmula $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OPO}_3\text{H}$ es varios órdenes de magnitud mayor que la del compuesto de fórmula I. Por tanto, el compuesto de fórmula I presenta una posición única para crear profármacos solubles. Más particularmente, tal como se demuestra con los datos de pruebas a continuación en la presente memoria, se ha encontrado que el compuesto de fórmula I es un inhibidor significativamente más potente de Abl y Tie2 que los compuestos de los ejemplos 94 y 138 del documento WO 2004/078116. Además, los compuestos de los ejemplos 94 y 138 del documento WO 2004/078116 no presentan un grupo alcohol primario que pueda derivatizarse para proporcionar un profármaco.

Además del compuesto de fórmula I, la invención también incluye sales farmacéuticamente aceptables del compuesto, y solvatos del compuesto y sus sales farmacéuticamente aceptables.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" hace referencia a que la sustancia o composición es compatible química y/o toxicológicamente con los otros componentes que comprenden una formulación, y/o el mamífero que está tratándose con la misma.

Un "solvato" se refiere a una asociación o complejo de una o más moléculas de disolvente y un compuesto de la invención. Los ejemplos de disolventes que forman solvatos incluyen, pero no se limitan a, agua, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético y etanolamina. El término "hidrato" se refiere al complejo en el que la molécula de disolvente es agua.

Según otro aspecto, la presente invención proporciona la utilización de un compuesto de fórmula I en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección mediada por cinasas en un mamífero.

La presente memoria describe un método de tratamiento o prevención de un estado mediado por cinasas, que

comprende administrar un compuesto de fórmula I en una cantidad eficaz para tratar o prevenir dicha afección mediada por cinasas.

También se proporcionan en la presente memoria los profármacos del compuesto de fórmula I.

5 Un "profármaco" es un compuesto que puede convertirse en condiciones fisiológicas o mediante solvólisis en el compuesto especificado o en una sal de un compuesto de este tipo.

10 El grupo hidroxilo libre del compuesto de la presente invención puede derivatizarse como un profármaco convirtiendo el grupo hidroxilo en un grupo tal como, pero sin limitarse a, un grupo éster de fosfato, hemisuccinato, dimetilaminoacetato o fosforiloximetiloxicarbonilo, tal como se explica resumidamente en *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1996, 19, 115. También se incluyen profármacos de carbamato de grupos hidroxilo, ya que son profármacos de carbonato, ésteres de sulfonato y ésteres de sulfato de grupos hidroxilo. También se abarca la derivatización de grupos hidroxilo como (aciloxi)metil y (aciloxi)etil éteres, en los que el grupo acilo puede ser un éster alquílico opcionalmente sustituido con grupos incluyendo, pero sin limitarse a, funcionalidades éter, amina y ácido carboxílico, o en los que el grupo acilo es un éster de aminoácidos tal como se describió anteriormente. Se describen profármacos de este tipo en *J. Med. Chem.*, 1996, 39, 10. Los ejemplos más específicos incluyen el reemplazamiento del átomo de hidrógeno del grupo alcohol por un grupo tal como alcanoiloxi (C₁-C₆)metilo, 1-(alcanoiloxi (C₁-C₆))etilo, 1-metil-1-(alcanoiloxi (C₁-C₆))etilo, alcoxi (C₁-C₆)carboniloximetilo, N-alcoxi (C₁-C₆)carbonilaminometilo, succinoilo, alcanoil (C₁-C₆), α-aminoalcanoil (C₁-C₄), arilacilo y α-aminoacilo, o α-aminoacilo-α-aminoacilo, en el que cada grupo α-aminoacilo se selecciona independientemente de los L-aminoácidos que se producen de manera natural, P(O)(OH)₂, -P(O)(O-alquilo (C₁-C₆))₂ o glicosilo (el radical resultante de la eliminación de un grupo hidroxilo de la forma de hemiacetal de un hidrato de carbono).

25 Por tanto, según otro aspecto, la presente invención proporciona la utilización de un profármaco de un compuesto de fórmula I en la preparación de un medicamento para el tratamiento con un compuesto según reivindicación 1 de una afección medido por cinasas en un mamífero, en el que el profármaco es dihidrogenofosfato de 2-(5-(2-((3-(3-*terc*-butil-1-*p*-tolil-1*H*-pirazol-5-il)ureido)-metil)-4-fluoro-fenoxi)-1*H*-indazol-1-il)etilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de tratamiento o prevención de una afección mediada por cinasas en un mamífero con un compuesto de fórmula I, que comprende administrar a un mamífero un profármaco de un compuesto de fórmula I en una cantidad eficaz para tratar o prevenir dicha afección mediada por cinasas, en el que el profármaco es dihidrogenofosfato de 2-(5-(2-((3-(3-*terc*-butil-1-*p*-tolil-1*H*-pirazol-5-il)ureido)-metil)-4-fluoro-fenoxi)-1*H*-indazol-1-il)etilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

35 Sin pretender limitarse a la teoría, se cree que el compuesto de éster de fosfato funciona como profármaco para el alcohol primario correspondiente.

40 Tal como se describe en la presente memoria, se ha descubierto que el éster de fosfato del compuesto de fórmula I presenta una solubilidad particularmente buena.

45 Una "sal farmacéuticamente aceptable," a menos que se indique lo contrario, incluye las sales que conservan la eficacia biológica de la base o el ácido libres correspondientes del compuesto especificado y no son indeseables biológicamente o de otra manera. Un compuesto de la invención puede presentar un grupo suficientemente ácido, un grupo suficientemente básico, o ambos grupos funcionales, y por consiguiente reaccionan con cualquiera de varias bases o ácidos orgánicos o inorgánicos para formar una sal farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales preparadas mediante la reacción de los compuestos de la presente invención con un ácido mineral u orgánico o una base inorgánica, incluyendo tales sales, pero sin limitarse a, sulfatos, piro-sulfatos, bisulfatos, sulfitos, bisulfitos, fosfatos, monohidrogenofosfatos, dihidrogenofosfatos, metafosfatos, pirofosfatos, cloruros, bromuros, yoduros, acetatos, propionatos, decanoatos, caprilatos, acrilatos, formiatos, isobutiratos, caproatos, heptanoatos, propiolatos, oxalatos, malonatos, succinatos, suberatos, sebacatos, fumaratos, maleatos, butin-1,4-dioatos, hexin-1,6-dioatos, benzoatos, clorobenzoatos, metilbenzoatos, dinitrobenzoatos, hidroxibenzoatos, metoxibenzoatos, ftalatos, sulfonatos, xilenosulfonatos, fenilacetatos, fenilpropionatos, fenilbutiratos, citratos, lactatos, γ-hidroxi-butilatos, glicolatos, tartratos, metanosulfonatos, propanosulfonatos, naftaleno-1-sulfonatos, naftaleno-2-sulfonatos y mandelatos. Puesto que un único compuesto de la presente invención puede incluir más de un resto ácido o básico, los compuestos de la presente invención pueden incluir mono-, di- o trisales en único compuesto.

50 Si el compuesto de la invención es una base, puede prepararse la sal farmacéuticamente aceptable deseada mediante cualquier procedimiento adecuado disponible en la técnica, por ejemplo, mediante tratamiento de la base libre con un compuesto ácido, por ejemplo un ácido inorgánico tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, o con un ácido orgánico, tal como ácido acético, ácido maleico, ácido succínico, ácido mandélico, ácido fumárico, ácido malónico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido glicólico, ácido salicílico, un ácido de piranosidilo tal como ácido glucurónico o ácido galacturónico, un alfa-hidroxiácido tal como ácido cítrico o ácido tartárico, un aminoácido tal como ácido aspártico o ácido glutámico, un ácido aromático tal

como ácido benzoico o ácido cinámico, un ácido sulfónico tal como ácido p-toluenosulfónico o ácido etanosulfónico, o similares.

Si el compuesto de la invención es un ácido, puede prepararse la sal farmacéuticamente aceptable deseada mediante cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo, mediante tratamiento del ácido libre con una base orgánica o inorgánica. Los ejemplos de sales inorgánicas adecuadas incluyen las formadas con metales alcalinos y alcalinotérreos tales como litio, sodio, potasio, bario y calcio. Los ejemplos de sales de bases orgánicas adecuadas incluyen, por ejemplo, amonio, dibencilamonio, bencilamonio, 2-hidroxiethylamonio, bis(2-hidroxiethyl)amonio, feniletibencilamina, dibenciletildiamina y sales similares. Otras sales de restos ácidos pueden incluir, por ejemplo, las sales formadas con procaína, quinina y N-metilglucosamina, más sales formadas con aminoácidos básicos tales como glicina, ornitina, histidina, fenilglicina, lisina y arginina.

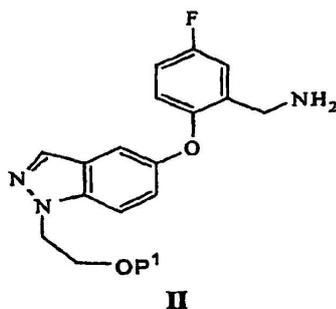
La presente invención comprende asimismo los compuestos de la presente invención marcados isotópicamente que son idénticos a los mencionados en la presente memoria, excepto por el hecho de que uno o más átomos se reemplazan por un átomo que presenta una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o número másico habitualmente encontrados en la naturaleza. Pueden prepararse generalmente compuestos de la presente invención marcados isotópicamente siguiendo procedimientos análogos a los dados a conocer en los esquemas y/o en los ejemplos a continuación en la presente memoria, sustituyendo un reactivo no marcado isotópicamente por un reactivo marcado isotópicamente.

Síntesis de compuestos de la invención

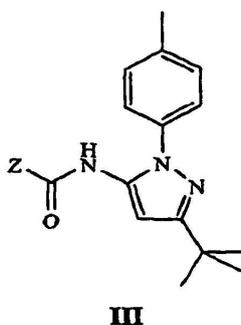
Los compuestos de la presente invención pueden prepararse mediante rutas sintéticas que incluyen procedimientos análogos a los bien conocidos en las técnicas químicas, o tal como se describe en la publicación de solicitud de patente internacional WO n° 2004/078116, particularmente a la vista de la descripción contenida en la presente memoria. Los materiales de partida están disponibles generalmente a partir de fuentes comerciales tales como Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI) o se preparan fácilmente utilizando procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia (por ejemplo, preparados mediante procedimientos descritos en general en Louis F. Fieser y Mary-Fieser, Reagents for Organic Synthesis, v. 1-19, Wiley, N.Y. (1967-1999 ed.), o Beilsteins Handbuch der organischen Chemie, 4, Aufl. ed. Springer-Verlag, Berlín, incluyendo suplementos (también disponibles a través de la base de datos en línea de Beilstein).

Según otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende:

(a) acoplar un compuesto de fórmula II

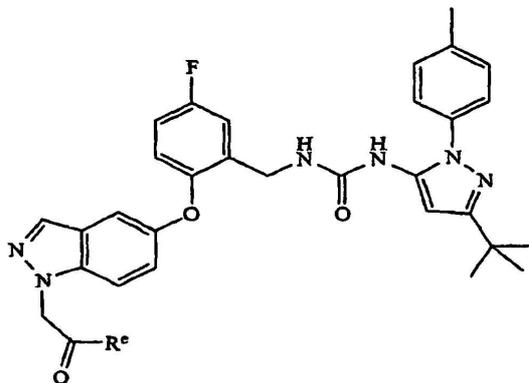


o una sal del mismo, en la que P¹ representa un átomo de hidrógeno o un grupo protector de hidroxilo, con un compuesto de fórmula III



en la que Z representa un grupo saliente, o el isocianato correspondiente; o

(b) reducir un compuesto de fórmula IV



IV

en la que R^e representa un átomo de hidrógeno o un residuo de un alcohol;

5 seguido por eliminar cualquier grupo protector y, si se desea, formar una sal farmacéuticamente aceptable.

Los ejemplos de grupos protectores de hidroxilo convenientes representados por P¹ incluyen hemiacetales cíclicos, tales como tetrahidro-2H-piran-2-ilo.

10 El grupo saliente representado por Z puede ser, por ejemplo un grupo hidrocarbilo sustituido o no sustituido, por ejemplo un grupo haloalcoxilo (C1-6), tal como 2,2,2-tricloroetoilo, un grupo alquenilo tal como CH₂=C(CH₃)O-, o un grupo arilo opcionalmente sustituido, por ejemplo, con uno o más grupos seleccionados de F, Cl, Br y NO₂. Los valores particulares para un grupo arilo opcionalmente sustituido incluyen fenilo, 4-clorofenilo, 4-bromofenilo, 4-fluorofenilo, 4-nitrofenilo y 2-nitrofenilo. En una forma de realización particular, Z es fenilo.

Se ha descubierto que el compuesto IV puede aislarse ventajosamente con un buen rendimiento y alta pureza sin una etapa de cromatografía cuando Z del compuesto III es un grupo arilo opcionalmente sustituido, tal como un grupo fenilo.

20 El acoplamiento de un compuesto de fórmula (II) con un compuesto de fórmula (III) cuando Z es un grupo fenilo opcionalmente sustituido puede realizarse convenientemente a una temperatura de entre 0 y 100°C, y más particularmente a temperatura ambiente. Los disolventes convenientes incluyen disolventes apróticos tales como éteres (por ejemplo tetrahidrofurano o p-dioxano), DMF, DMSO o acetonitrilo. La reacción de acoplamiento se realiza convenientemente en presencia de una base tal como una amina terciaria (por ejemplo, trietilamina o DMA).

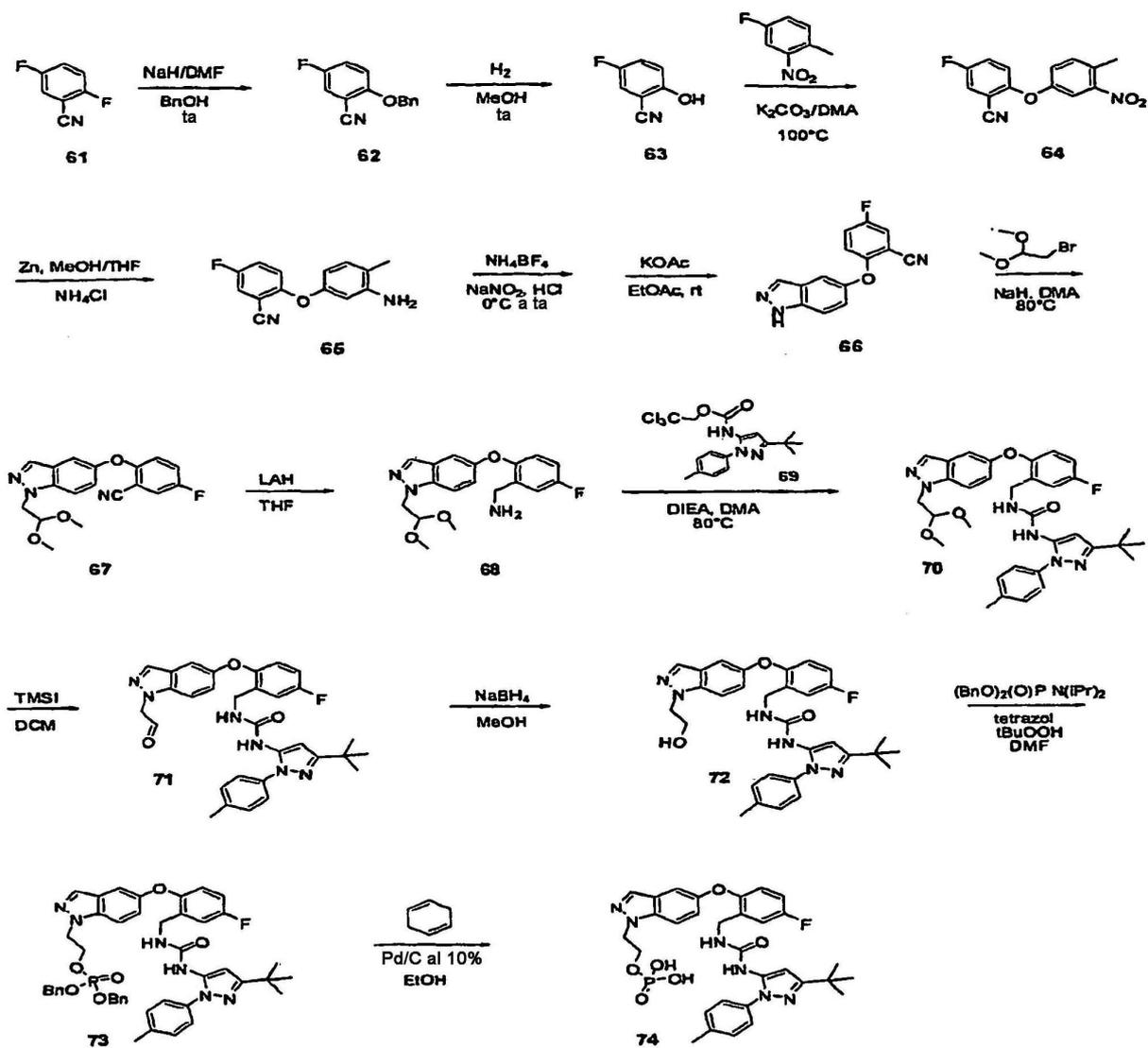
Los valores particulares de R^e cuando se representa mediante un residuo de un alcohol incluyen grupos alcoxilo (C1-6), tales como etilo.

30 Se cree que los compuestos de las fórmulas (II) y (IV) son nuevos y están previstos como aspectos adicionales de la invención.

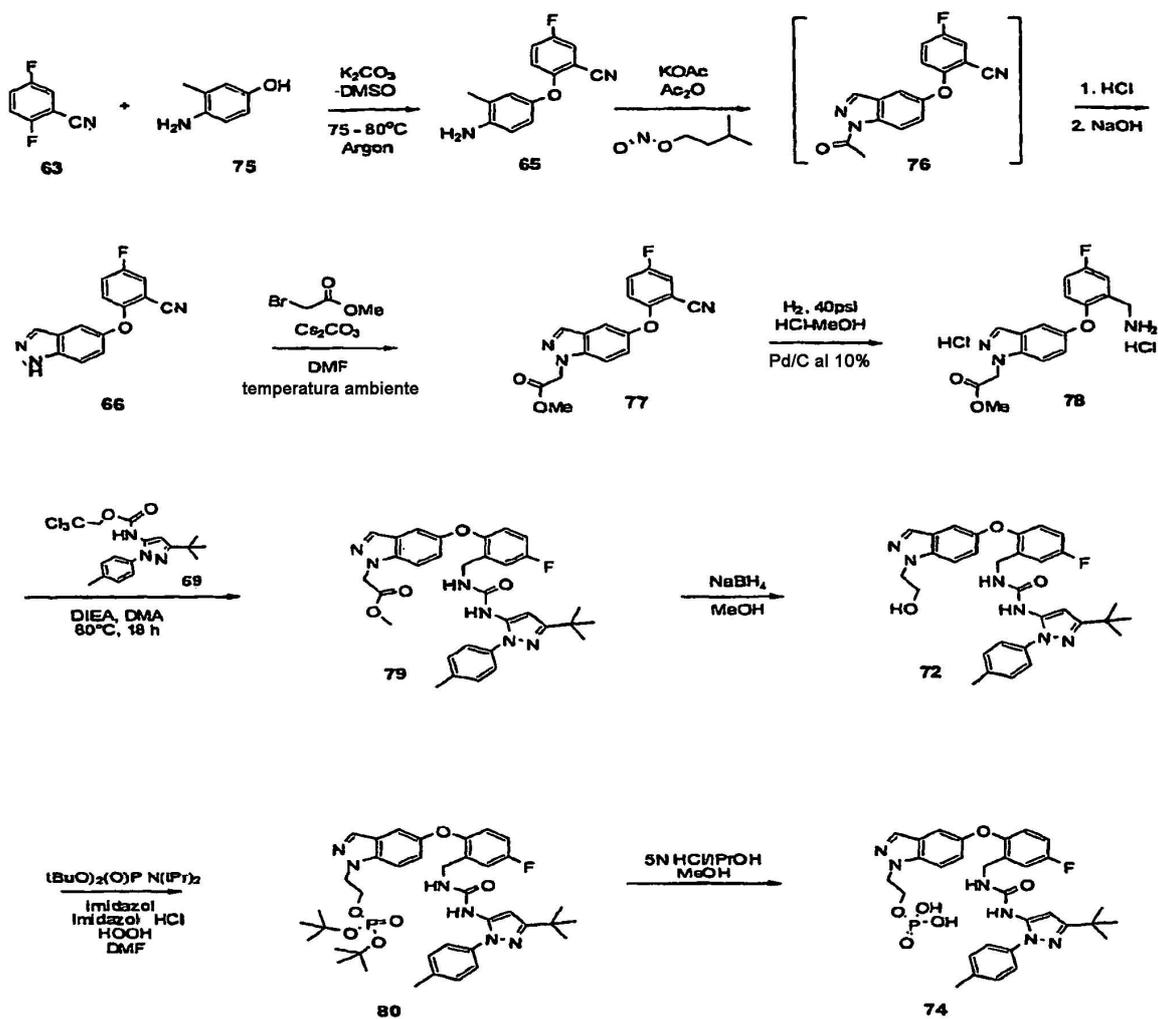
35 En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar un profármaco de fosfato del compuesto de fórmula I, es decir, dihidrogenofosfato de 2-(5-(2-((3-(3-*tert*-butil-1-*p*-tolil-1*H*-pirazol-5-il)ureido)metil)-4-fluorofenoxi)-1*H*-indazol-1-il)etil), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende fosforilar 1-(3-(3-*tert*-butil-1-*p*-tolil-1*H*-pirazol-5-il)-3-(5-fluoro-2-(1-(2-hidroxietil)-1*H*-indazol-5-il)oxi)encil)urea, o una sal de la misma.

40 La fosforilación acorde se realiza convenientemente haciendo reaccionar el alcohol con una dialquifosfinamida de dialquilo o diarilo, tal como diisopropilfosfinamida de di-*tert*-butilo o diisopropilfosfinamida de di-fenilo, seguido por la eliminación de los grupos alquilo o arilo en el producto de fosfato mediante hidrólisis o hidrogenación catalítica.

45 Para fines ilustrativos, los esquemas 1 y 2 y los ejemplos ilustran procedimientos para preparar los compuestos de la presente invención así como productos intermedios clave. Los expertos en la materia apreciarán que pueden utilizarse otras rutas sintéticas para sintetizar los compuestos de la invención. Aunque se representan reactivos y materiales de partida específicos en los esquemas y se comentan a continuación; otros reactivos y materiales de partida pueden sustituirse fácilmente para proporcionar una variedad de derivados y/o condiciones de reacción. Además, muchos de los compuestos preparados mediante los procedimientos descritos a continuación pueden modificarse adicionalmente a la vista de esta descripción utilizando química convencional bien conocida por los expertos en la materia.

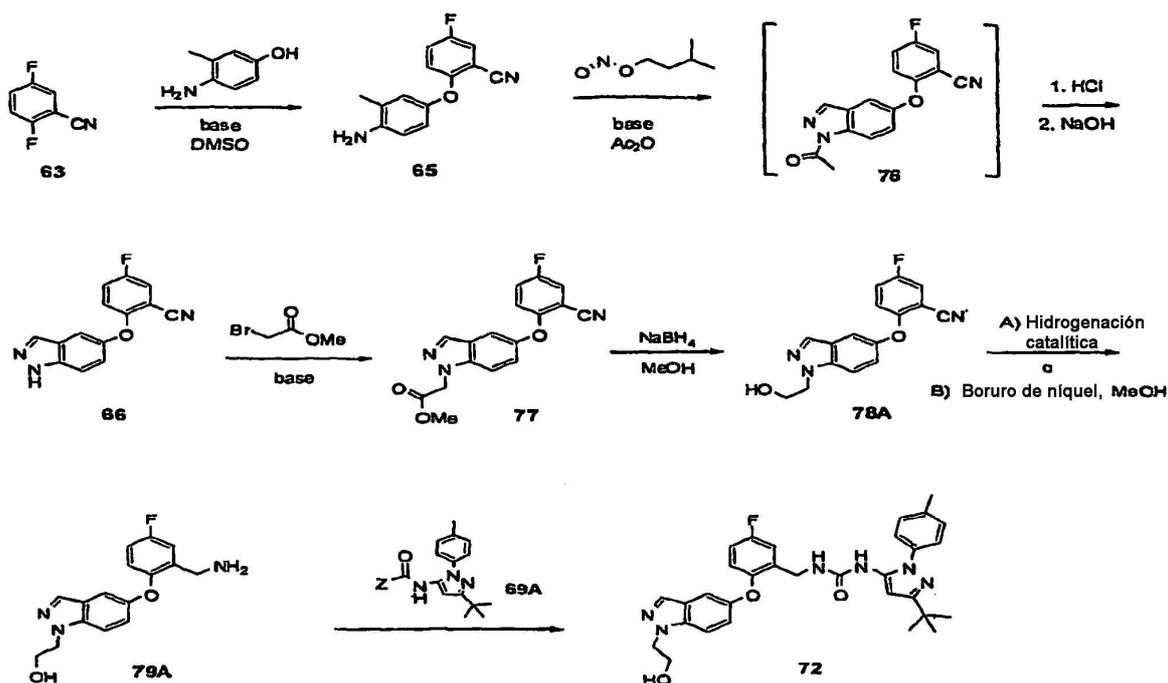


Esquema 1



Esquema 2

5 La reducción del nitrilo del compuesto 77 tal como se muestra en 2 requiere altas concentraciones de ácido (por ejemplo, HCl o ácido acético) para minimizar la formación de dímeros. Sin embargo, concentraciones más altas de ácido también pueden provocar la hidrólisis de parte del compuesto de éster 78 para proporcionar el ácido correspondiente. El esquema 3 ilustra un procedimiento mejorado para la preparación del compuesto de fórmula I, que reduce la formación de las impurezas de ácidos y dímeros.



Esquema 3

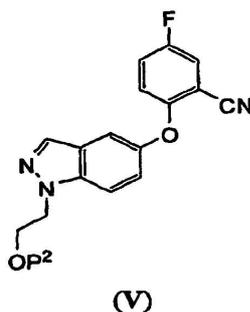
El esquema 3 ilustra un procedimiento de reducción del grupo éster del compuesto 77 para proporcionar el alcohol correspondiente antes de la reducción del grupo nitrilo para proporcionar el compuesto 79A libre de impurezas de ácidos y con mínima formación de impurezas de dímeros.

Más específicamente, el compuesto 77 puede reducirse de un modo progresivo, en el que el grupo éster se reduce con borohidruro de sodio en un disolvente adecuado para proporcionar el correspondiente compuesto de alcohol 78A. El grupo nitrilo del compuesto 78A se reduce entonces en condiciones de hidrogenación catalítica convencionales o utilizando boruro de níquel en un disolvente orgánico adecuado para proporcionar el correspondiente compuesto de metilamina 79A.

La ruta mostrada en el esquema 3 ofrece varias ventajas con respecto a las rutas mostradas en el esquema 2 para la formación del compuesto de fórmula I. Utilizando las rutas mostradas en el esquema 3, puede realizarse la reducción del grupo nitrilo con concentraciones más altas de HCl, lo que disminuye ventajosamente la cantidad de impureza de dímeros que se forma. Además, la ruta mostrada en el esquema 3 evita la utilización de borohidruro de sodio en la etapa final, evitando de ese modo etapas de purificación adicionales para eliminar impurezas de boro residuales del producto final. Por tanto, incluyendo la etapa de reducción con borohidruro de sodio previamente en la secuencia de reacción, puede eliminarse fácilmente el boro residual durante las etapas de secuencia intermedias. Además, el acoplamiento del compuesto de aminoalcohol 79A con el compuesto 69A puede realizarse a temperaturas inferiores, mejorando así la pureza del producto 72. Por consiguiente, la ruta representada en el esquema 3 permite un rendimiento mejorado para la síntesis del compuesto de fórmula I, y en consecuencia proporciona una ruta sintética eficaz para la producción del compuesto de fórmula I que es más susceptible de o adecuada para la fabricación a gran escala.

Por consiguiente, también se proporciona un procedimiento para preparar un compuesto de fórmula (II), que comprende:

(i) reducir un compuesto de fórmula (V)

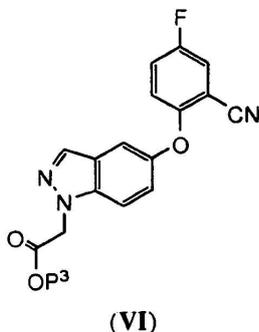


en la que P² representa hidrógeno o un grupo protector de hidroxilo, en condiciones de hidrogenación catalítica o en presencia de boruro de níquel

5 Refiriéndose a la etapa (i), los catalizadores de hidrogenación incluyen cualquier catalizador de paladio adecuado, tal como Pd(OH)₂ o paladio soportado sobre carbono. La hidrogenación tiene lugar en condiciones ácidas (tal como mediante la adición de un ácido, por ejemplo HCl o ácido acético) o con la adición de amoníaco. La hidrogenación catalítica puede llevarse a cabo en cualquier sistema de disolvente adecuado tal como un alcohol (por ejemplo, metanol, etanol, isopropanol), éster (por ejemplo, acetato de etilo) o éter (por ejemplo, THF). Los disolventes mezclados, por ejemplo alcohol y THF, también son adecuados para la etapa de hidrogenación. La presión de hidrógeno puede estar en el intervalo de entre 25 y 100 psi, por ejemplo 40 psi. La reducción se realiza normalmente a una temperatura de entre 20-100°C.

15 Refiriéndose a la etapa (i), el boruro de níquel puede prepararse *in situ* a partir de una sal de metal de transición, preferentemente una sal de Ni (II) y borohidruro de sodio. En una forma de realización preferida, el boruro de níquel se prepara a partir de cloruro de níquel (II) y borohidruro de sodio. La reacción se realiza convenientemente en un disolvente adecuado tal como un alcohol (por ejemplo, metanol, etanol, isopropanol). La reducción se realiza normalmente a temperatura ambiente.

20 Puede prepararse un compuesto de fórmula (V) reduciendo un compuesto de fórmula (VI)



25 en la que P³ es tal como se definió para P², utilizando cualquier condición de reducción de éster conveniente (por ejemplo, borohidruro de sodio), en un disolvente adecuado tal como un alcohol (por ejemplo, metanol, etanol, isopropanol).

30 En la preparación de los compuestos de la presente invención, puede ser necesaria la protección de funcionalidades alejadas (por ejemplo, aminas primarias o secundarias, alcoholes, etc.) de productos intermedios. La necesidad de una protección de este tipo variará dependiendo de la naturaleza de la funcionalidad remota y las condiciones de los procedimientos de preparación. Por ejemplo, los grupos protectores de amino (NH-Pg) adecuados incluyen acetilo, trifluoroacetilo, t-butoxicarbonilo (BOC), benciloxicarbonilo (CBz) y 9-fluorenilmetileno carbonilo (Fmoc). Los grupos protectores de hidroxilo convenientes incluyen tetrahidro-2H-piran-2-ilo, bencilo, trialkilsililo y acetal. La necesidad de una protección de este tipo la determina fácilmente un experto en la materia. Para una descripción general de grupos protectores y su utilización, véase T. W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, Nueva York, 1991.

40 Métodos de tratamiento

Los compuestos de la invención pueden utilizarse para tratar enfermedades mediadas por modulación o regulación de proteínas cinasas. Por consiguiente, los métodos de tratamiento o prevención de enfermedades o afecciones descritas en la presente memoria comprenden la administración a un mamífero, tal como un ser humano, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención, o sal farmacéuticamente aceptable del

mismo, en una cantidad eficaz para tratar o prevenir dicho trastorno. En una forma de realización, el método comprende administrar a un mamífero un compuesto de la presente invención en una cantidad eficaz para inhibir una o más cinasas.

5 Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de compuesto que, cuando se administra a un mamífero que necesita un tratamiento de este tipo, es suficiente para efectuar el tratamiento para una enfermedad mediada por la actividad de una o más proteínas cinasas, tales como la MAPK p38, y los acontecimientos mediados por cinasas asociadas tales como la producción de citocinas. Por tanto, por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención o una sal, metabolito activo del mismo, es una cantidad suficiente para modular, regular o inhibir la actividad de una o más proteínas cinasas de manera que un estado patológico que está mediado por esa actividad se reduce o se alivia.

15 "Tratar" pretende significar al menos la mitigación de un estado patológico en un mamífero, tal como un ser humano, que está afectado, al menos en parte, por la actividad de una o más proteínas cinasas. Los términos "tratar" y "tratamiento" se refieren tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en los que el objetivo es prevenir o ralentizar (atenuar) un trastorno o cambio fisiológico no deseado. Para los fines de la presente invención, los resultados clínicos deseados o beneficiosos incluyen, pero no se limitan a, alivio de síntomas, disminución del grado de enfermedad, estabilización (es decir, no empeoramiento) del estado de la enfermedad, retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado patológico, y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o no detectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Los que necesitan tratamiento incluyen los que ya presentan la afección o el trastorno así como los propensos a presentar la afección o el trastorno o aquéllos en los que la afección o el trastorno va a prevenirse.

25 La cantidad de un compuesto de la presente invención administrado a un mamífero variará dependiendo de factores tales como el compuesto particular, el estado patológico y su gravedad, la identidad (por ejemplo, peso) del mamífero que necesita tratamiento, pero no obstante puede determinarse de manera rutinaria por un experto en la materia.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "mamífero" se refiere a un animal de sangre caliente que presenta o corre el riesgo de desarrollar una enfermedad descrita en la presente memoria e incluye, pero no se limita a, cobayas, perros, gatos, ratas, ratones, hámsteres y primates, incluyendo seres humanos.

35 En un aspecto de la presente invención, los compuestos de la presente invención o sales farmacéuticas de los mismos pueden formularse en composiciones farmacéuticas para su administración a animales o seres humanos para tratar o prevenir una afección mediada por cinasas. El término "afección mediada por cinasas" tal como se utiliza en la presente memoria significa cualquier enfermedad u otra afección perjudicial en la que se sabe que p38 ejerce una función, e incluye estados que se sabe que están provocados por la sobreproducción de IL-1, TNF, IL-6 o IL-8. Las afecciones de este tipo incluyen, pero no se limitan a, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, trastornos óseos destructivos, trastornos proliferativos, enfermedades infecciosas, enfermedad viral, enfermedad fibrótica y enfermedades neurodegenerativas.

45 Las enfermedades inflamatorias que pueden tratarse o prevenirse incluyen, pero no se limitan a, pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, asma, alergia y síndrome de dificultad respiratoria en el adulto.

50 Las enfermedades autoinmunitarias que pueden tratarse o prevenirse incluyen, pero no se limitan a, glomerulonefritis, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, tiroiditis crónica, enfermedad de Graves, gastritis autoinmunitaria; diabetes mellitus insulino dependiente (tipo I), anemia hemolítica autoinmunitaria, neutropenia autoinmunitaria, trombocitopenia, dermatitis atópica, hepatitis activa crónica, miastenia grave, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, psoriasis o enfermedad de injerto contra huésped.

55 Los trastornos óseos destructivos que pueden tratarse o prevenirse incluyen, pero no se limitan a, osteoporosis, osteoartritis y trastorno óseo relacionado con mieloma múltiple.

Las enfermedades fibróticas que pueden tratarse o prevenirse incluyen, pero no se limitan a, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis hepática y renal.

60 Las enfermedades proliferativas que pueden tratarse o prevenirse incluyen, pero no se limitan a, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, melanoma metastásico, sarcoma de Kaposi, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple, astrocitoma, cáncer de huesos, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, glioma, glioblastoma, multiforme, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hematológico, trastornos de la hematopoyesis, enfermedades pulmonares intersticiales, sarcoma de Kaposi, leucemia linfocítica, melanoma, leucemia mielóide, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, sarcoma, cáncer de piel, cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de estómago. Otros pacientes que pueden tratarse incluyen los que se someten a trasplante de médula ósea.

Las enfermedades infecciosas que pueden tratarse o prevenirse incluyen, pero no se limitan a, septicemia, choque séptico y shigelosis.

5 Las enfermedades virales que pueden tratarse o prevenirse incluyen, pero no se limitan a, infección de hepatitis aguda (incluyendo hepatitis A, hepatitis B y hepatitis C), infección por VIH y retinitis por CMV.

10 Las enfermedades o las afecciones degenerativas que pueden tratarse o prevenirse mediante los compuestos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Alzheimer; enfermedad de Parkinson, isquemia cerebral y otras enfermedades neurodegenerativas.

15 El término "afecciones mediadas por cinasas" también incluye isquemia/reperfusión en accidente cerebrovascular, ataques al corazón, isquemia miocárdica, hipoxia orgánica, hiperplasia vascular, hipertrofia cardiaca y agregación plaquetaria inducida por trombina.

20 Además, los inhibidores de cinasas de la presente invención también son útiles para inhibir la expresión de proteínas proinflamatorias inducibles tales como prostaglandina endoperóxido sintasa-2 (PGHS-2), también denominada ciclooxigenasa-2 (COX-2). Por tanto, otras "afecciones mediadas por cinasas" incluyen, pero no se limitan a, edema, analgesia, fiebre y dolor, tal como dolor neuromuscular, cefalea, dolor por cáncer, dolor dental y dolor por artritis.

25 Las afecciones y enfermedades que pueden tratarse o prevenirse mediante los inhibidores de cinasas de la presente invención pueden agruparse también convenientemente por la citocina (por ejemplo, IL-1, TNF, IL-6, IL-8) que se cree que es responsable de la enfermedad.

30 Por tanto, una enfermedad o afección mediada por IL-1 incluye artritis reumatoide, osteoartritis, accidente cerebrovascular, endotoxemia y/o síndrome de choque tóxico, reacción inflamatoria inducida por endotoxina, enfermedad inflamatoria del intestino, tuberculosis, aterosclerosis, degeneración muscular, caquexia, artritis psoriásica, síndrome de Reiter, gota, artritis traumática, artritis por rubéola, sinovitis aguda, diabetes, enfermedad de células β pancreáticas y enfermedad de Alzheimer.

35 Las enfermedades o afecciones mediadas por TNF incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide, espondilitis reumatoide, osteoartritis, artritis gotosa y otras afecciones artríticas, choque séptico por septicemia, choque endotóxico, septicemia gram negativa, síndrome de choque tóxico, síndrome de dificultad respiratoria en el adulto, malaria cerebral, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, silicosis, sarcoidosis pulmonar, enfermedades de resorción ósea, lesión por reperfusión, reacción de injerto contra huésped, rechazos de aloinjertos, fiebre y mialgias debidas a infección, caquexia posterior a infección, SIDA, CRS o tumor maligno, formación de queloides, formación de tejido cicatrizante, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa o piresis. Las enfermedades mediadas por TNF también incluyen infecciones virales, tales como VIH, CMV, influenza y herpes; e infecciones virales veterinarias, tales como infecciones por lentivirus, incluyendo, pero sin limitarse a virus de la anemia infecciosa equina, virus de la artritis caprina, virus visna o virus maedi; o infecciones por retrovirus, incluyendo virus de la inmunodeficiencia felina, virus de la inmunodeficiencia bovina o virus de la inmunodeficiencia canina.

45 Las enfermedades o afecciones mediadas por IL-8 incluyen, pero no se limitan a, enfermedades caracterizadas por infiltración masiva de neutrófilos, tal como psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, asma, lesión por reperfusión cardiaca y renal, síndrome de dificultad respiratoria en el adulto, trombosis y glomerulonefritis.

50 Además, los compuestos de la presente invención pueden utilizarse por vía tópica para tratar o prevenir afecciones provocadas o agravadas por IL-1 o TNF. Las afecciones de este tipo incluyen, pero no se limitan a, articulaciones inflamadas, eccema, psoriasis, afecciones inflamatorias de la piel tales como quemaduras solares, afecciones inflamatorias de los ojos tales como conjuntivitis, piresis; dolor y otras afecciones relacionadas con inflamación.

55 Aunque los compuestos de la presente invención son principalmente valiosos como agentes terapéuticos para su utilización en animales de sangre caliente (incluyendo seres humanos), también son útiles siempre que se requiere inhibir los efectos de citocinas. Por tanto, también son útiles como patrones farmacológicos para su utilización en el desarrollo de nuevas pruebas biológicas y en la búsqueda de nuevos agentes farmacológicos.

60 El tamaño de la dosis para fines terapéuticos o profilácticos de un compuesto de la presente invención variará naturalmente según la naturaleza y gravedad de las afecciones, la edad y el sexo del animal o paciente y la vía de administración, según principios de medicina bien conocidos.

65 Otro aspecto de la presente invención proporciona un compuesto de la presente invención para su utilización como medicamento en el tratamiento de las enfermedades o afecciones descritas en la presente memoria en un mamífero, por ejemplo, un ser humano, que padece una enfermedad o afección de este tipo. También está prevista la utilización de un compuesto de la presente invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de las enfermedades y afecciones descritos en la presente memoria en un animal de sangre caliente, tal como un mamífero, por ejemplo un ser humano, que padece un trastorno de este tipo.

Terapia de combinación

5 Los compuestos de la presente invención pueden utilizarse en combinación con otros fármacos y terapias utilizados en el tratamiento de estados patológicos que se beneficiarían de la inhibición de cinasas y las citocinas asociadas, tales como IL-1, TNF, IL-6 o IL-8. La dosis del segundo fármaco puede seleccionarse apropiadamente basándose en una dosis utilizada en la práctica clínica. La proporción del compuesto de la presente invención y el segundo fármaco puede determinarse apropiadamente según el sujeto de administración, la vía de administración, la enfermedad diana, el estado clínico, la combinación y otros factores. En casos en los que el sujeto de administración es un ser humano, por ejemplo, el segundo fármaco puede utilizarse en una cantidad de 0,01 a 100 partes en peso por parte en peso del compuesto de la presente invención.

15 El segundo fármaco de la formulación de combinación farmacéutica o régimen de dosificación presenta, por ejemplo, actividades complementarias al compuesto de la presente invención de manera que no se afectan de manera adversa entre sí. Los fármacos de este tipo están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el fin pretendido. Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención proporciona una composición que comprende un compuesto de la presente invención en combinación con un segundo fármaco, tal como se describe en la presente memoria.

20 El compuesto de la presente invención y el/los fármaco(s) farmacéuticamente activo(s) adicional(es) pueden administrarse juntos en una composición farmacéutica unitaria o por separado y, cuando se administran por separado, esto puede producirse simultánea o secuencialmente en cualquier orden. Una administración secuencial de este tipo puede ser próxima en el tiempo o alejada en el tiempo. Las cantidades del compuesto de la presente invención y el/los segundo(s) fármaco(s) y los momentos relativos de administración se seleccionarán con el fin de lograr el efecto terapéutico combinado deseado.

30 La terapia de combinación puede proporcionar "sinergia" y demostrar ser "sinérgica", es decir, el efecto logrado cuando los principios activos se utilizan juntos es mayor que la suma de los efectos que resultan de la utilización de los compuestos por separado. Puede lograrse un efecto sinérgico cuando un compuesto de la presente invención y el segundo fármaco: (1) se formulan conjuntamente y se administran o suministran simultáneamente en una formulación de dosificación unitaria, combinada; (2) se suministran mediante alternancia o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) mediante algún otro régimen. Cuando se suministran en terapia de alternancia, puede lograrse un efecto sinérgico cuando un compuesto de la presente invención y el segundo fármaco se administran o suministran secuencialmente, por ejemplo, mediante diferentes inyecciones en jeringuillas separadas. Por ejemplo, durante la terapia de alternancia, puede administrarse secuencialmente una dosificación eficaz de cada principio activo, es decir, en serie, mientras que en la terapia de combinación, se administran juntas dosis eficaces de dos o más principios activos.

40 Por ejemplo, en virtud de su capacidad para inhibir citocinas, los compuestos de la presente invención son valiosos en el tratamiento de ciertas enfermedades inflamatorias y no inflamatorias que se tratan actualmente con un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) inhibidor de ciclooxigenasa tal como indometacina, ketorolaco, ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, sulindaco, tolmetina y piroxicam. La coadministración de un compuesto de la presente invención con un AINE puede dar como resultado una reducción de la cantidad de este último agente necesaria para producir un efecto terapéutico, y por tanto la posibilidad de que se reduzcan los efectos secundarios adversos del AINE tales como efectos gastrointestinales. Por tanto, según una característica adicional de la invención, está prevista una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, conjuntamente o en mezcla con un agente antiinflamatorio no esteroideo inhibidor de ciclooxigenasa, y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

50 Los compuestos de la presente invención también pueden utilizarse en el tratamiento de afecciones tales como artritis reumatoide en combinación con agentes antiartríticos tales como oro, metotrexato, esteroides y penicilamina, y en afecciones tales como osteoartritis en combinación con esteroides.

55 Los compuestos de la presente invención también pueden utilizarse en el tratamiento de enfermedades degradativas, por ejemplo osteoartritis, en combinación con agentes condroprotectores, antidegradativos y/o reparadores tales como Diacerhein, formulaciones de ácido hialurónico tales como Hyalan, Rumalon, Arteparon y sales de glucosamina tales como Anril.

60 Los compuestos de la presente invención también pueden utilizarse en el tratamiento de asma en combinación con agentes antiasmáticos tales como broncodilatadores y antagonistas de leucotrienos.

Administración de compuestos de la invención

65 Los compuestos de la invención pueden administrarse mediante cualquier vía apropiada para la afección que va a tratarse. Las vías adecuadas incluyen oral, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intradérmica, intratecal y epidural), transdérmica, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual),

vaginal, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal. Se apreciará que la vía utilizada puede variar con, por ejemplo, el estado del receptor. Cuando el compuesto se administra por vía oral, puede formularse como una píldora, una cápsula, un comprimido, etc. con un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable. Cuando el compuesto se administra por vía parenteral, puede formularse con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable y en una forma farmacéutica inyectable unitaria, tal como se expone a continuación.

Formulaciones farmacéuticas

Con el fin de utilizar un compuesto de la presente invención para el tratamiento terapéutico (incluyendo tratamiento profiláctico) de mamíferos incluyendo seres humanos, se formula normalmente según la práctica farmacéutica convencional como una composición farmacéutica. Según este aspecto de la invención, está prevista una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención en asociación con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se formulan, dosifican y administran de un modo, es decir, cantidades, concentraciones, programas, ciclo, vehículos y vía de administración, que concuerda con la buena práctica médica. Los factores para su consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que está tratándose, el mamífero particular que está tratándose, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, el programa de administración y otros factores conocidos por los profesionales médicos. La cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto que va a administrarse estará determinada por consideraciones de este tipo, y es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar o tratar el trastorno. El compuesto de la presente invención se formula normalmente en formas de dosificación farmacéuticas para proporcionar una dosificación fácilmente controlable del fármaco y para permitir el cumplimiento del paciente con el régimen prescrito.

La composición para su utilización en la presente memoria es preferentemente estéril. En particular, las formulaciones que van a utilizarse para la administración *in vivo* deben ser estériles. Una esterilización de este tipo se logra fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. El compuesto puede almacenarse habitualmente como una composición sólida, una formulación liofilizada o como una disolución acuosa.

Pueden prepararse formulaciones farmacéuticas de los compuestos de la presente invención para diversas vías y tipos de administración. Por ejemplo, un compuesto de la presente invención que presenta el grado de pureza deseado puede mezclarse opcionalmente con diluyentes, portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) 16^a edición, Osol, A. Ed.), en forma de una formulación liofilizada, un polvo molido o una disolución acuosa. La formulación puede realizarse mezclando a temperatura ambiente al pH apropiado, y al grado de pureza deseado, con portadores fisiológicamente aceptables, es decir, portadores que no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas. El pH de la formulación depende principalmente de la utilización particular y la concentración de compuesto, aunque puede oscilar por ejemplo de desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 8. La formulación en un tampón acetato a pH 5 es una forma de realización adecuada. Las formulaciones pueden prepararse utilizando procedimientos de mezclado y disolución convencionales. Por ejemplo, la sustancia farmacológica a granel (es decir, el compuesto de la presente invención o la forma estabilizada del compuesto (por ejemplo, un complejo con un derivado de ciclodextrina u otro agente de complejación conocido) se disuelve en un disolvente adecuado en presencia de uno o más excipientes.

El portador, diluyente o excipiente particular utilizado dependerá de los medios y el fin para que el compuesto de la presente invención esté aplicándose. Los disolventes se seleccionan generalmente basándose en disolventes reconocidos por expertos en la materia como seguros (GRAS) para administrarse a un mamífero. En general, disolventes seguros son disolventes acuosos no tóxicos tales como agua y otros disolventes no tóxicos que son solubles o miscibles en agua. Los disolventes acuosos adecuados incluyen agua, etanol, propilenglicol, polietilenglicoles (por ejemplo, PEG 400, PEG 300), etc. y mezclas de los mismos. Los diluyentes, portadores, excipientes y estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones utilizadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímero hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG). Las formulaciones también pueden incluir uno más agentes estabilizantes, tensioactivos, agentes humectantes, agentes lubricantes, emulsionantes, agentes de suspensión, conservantes, antioxidantes, agentes opacificantes, deslizantes, adyuvantes de procesamiento, colorantes, edulcorantes, agentes de perfume, agentes aromatizantes y otros aditivos conocidos para proporcionar

una presentación elegante del fármaco (es decir, un compuesto de la presente invención o composición farmacéutica del mismo) o ayudar en la fabricación del producto farmacéutico (es decir, medicamento). Los principios farmacéuticos activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Se dan a conocer técnicas de este tipo en Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edición, Osol, A. Ed. (1980). Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta por diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos que es útil para el suministro de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen comúnmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de lípidos de las membranas biológicas.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida de compuestos de la presente invención. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen un compuesto de la presente invención, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente US n^o 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y poli-ácido D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden estar en forma de una preparación inyectable estéril, tal como una suspensión oleaginosa o acuosa inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse según la técnica conocida utilizando los agentes de suspensión y agentes humectantes o de dispersión adecuados que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril también puede ser una suspensión o disolución inyectable estéril en un disolvente o diluyente parenteralmente aceptable no tóxico, tal como una disolución en 1,3-butanodiol o preparada como un polvo liofilizado. Entre los disolventes y vehículos aceptables que pueden utilizarse están agua, disolución de Ringer y disolución de cloruro de sodio isotónica. Además, pueden utilizarse convencionalmente aceites fijos estéril como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, puede utilizarse cualquier aceite fijo insípido incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, pueden utilizarse asimismo ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de inyectables.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para administración parenteral incluyen disoluciones de inyección estériles no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes.

Las composiciones de la invención también pueden formularse en una forma adecuada para utilización oral (por ejemplo como comprimidos, pastillas para chupar, cápsulas duras o blandas, suspensiones acuosas o aceitosas, emulsiones, gránulos o polvos dispersables, jarabes o elixires), para utilización tópica (por ejemplo, como cremas, pomadas, geles o suspensiones o disoluciones acuosas o aceitosas), para administración mediante inhalación (por ejemplo, como un polvo finamente dividido o un aerosol líquido), para administración mediante insuflación (por ejemplo como un polvo finamente dividido).

Los excipientes farmacéuticamente aceptables para una formulación de comprimido incluyen, por ejemplo, diluyentes inertes tales como lactosa, carbonato de sodio, fosfato de calcio o carbonato de calcio, agentes disgregantes y de granulación tales como almidón de maíz o ácido algínico; agentes de unión tales como almidón; agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco; agentes conservantes tales como p-hidroxibenzoato de etilo o propilo, y antioxidantes, tales como ácido ascórbico. Las formulaciones de comprimidos pueden estar recubiertas o no recubiertas o bien para modificar su disgregación y posterior absorción del principio activo dentro del tubo digestivo, o bien para mejorar su solubilidad y/o aspecto, en cualquier caso, utilizando procedimientos y agentes de recubrimiento convencionales bien conocidos en la técnica.

Las composiciones para utilización oral pueden formularse en forma de cápsulas de gelatina duras en las que el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín, o como cápsulas de gelatina blandas en las que el principio activo se mezcla con agua o un aceite tal como aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

Las suspensiones acuosas contienen generalmente el principio activo en forma finamente pulverizada junto con uno más agentes de suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinil-pirrolidona, goma tragacanto y goma arábiga; agentes humectantes o de dispersión tales como lecitina o productos de condensación de un óxido de alquileno con ácidos grasos (por ejemplo estearato de polioxietileno), o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de polioxietileno-sorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo

monooleato de polietileno-sorbitano. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes (tales como p-hidroxibenzoato de etilo o propilo, antioxidantes (tales como ácido ascórbico), agentes colorantes, agentes aromatizantes y/o agentes edulcorantes (tales como sacarosa, sacarina o aspartamo).

5 Pueden formularse suspensiones aceitosas suspendiendo el principio activo en un aceite vegetal (tal como aceite de maní, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco) o en un aceite mineral (tal como parafina líquida). Las suspensiones aceitosas también pueden contener un agente espesante tal como cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Pueden añadirse agentes edulcorantes tales como los expuestos anteriormente y agentes aromatizantes para proporcionar una preparación oral agradable. Estas composiciones pueden conservarse
10 mediante la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico.

Los gránulos y polvos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua contienen generalmente el principio activo junto con un agente humectante o de dispersión, agente de suspensión y uno más conservantes. Se muestran a modo de ejemplo agentes humectantes o de dispersión y
15 agentes de suspensión adecuados mediante los ya mencionados anteriormente. También pueden estar presentes excipientes adicionales tales como agentes edulcorantes, aromatizantes y colorantes.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden estar también en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase aceitosa puede ser un aceite vegetal, tal como aceite de oliva o aceite de maní, o un aceite mineral, tal como
20 por ejemplo parafina líquida o una mezcla de cualquiera de estos. Agentes emulsionantes adecuados pueden ser, por ejemplo, gomas que se producen de manera natural tales como goma arábica o goma tragacanto, fosfátidas que se producen de manera natural tales como semilla de soja, lecitina, ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol (por ejemplo monooleato de sorbitano) y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno tales como monooleato de polioxitileno-sorbitano. Las emulsiones también
25 pueden contener agentes edulcorantes, aromatizantes y conservantes.

Pueden formularse jarabes y elixires con agentes edulcorantes tales como glicerol, propilenglicol, sorbitol, aspartamo o sacarosa, y también pueden contener un emoliente, conservante, agente aromatizante y/o colorante.

30 Pueden prepararse formulaciones de supositorio mezclando el principio activo con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperaturas habituales pero líquido a la temperatura rectal y por tanto se fundirá en el recto para liberar el fármaco. Los excipientes adecuados incluyen, por ejemplo, manteca de cacao y polietilenglicoles. Pueden presentarse formulaciones adecuadas para administración vaginal como óvulos, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen además del principio
35 activo portadores tales como los que se sabe en la técnica que son apropiados.

Pueden obtenerse generalmente formulaciones tópicas, tales como cremas, pomadas, geles y suspensiones o disoluciones acuosas o aceitosas formulando un principio activo con un diluyente o vehículo convencional aceptable por vía tópica utilizando procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica.
40

Las composiciones para administración transdérmica pueden estar en forma de los parches cutáneos transdérmicos que conocen bien los expertos ordinarios en la materia.

45 Las composiciones para administración mediante insuflación puede estar en forma de un polvo finamente dividido que contiene partículas de diámetro promedio de, por ejemplo, 30 μm o mucho menos, comprendiendo el propio polvo o bien principio activo solo o bien diluido con uno o más portadores fisiológicamente aceptables tales como lactosa. El polvo para insuflación se retiene entonces convenientemente en una cápsula que contiene, por ejemplo, de 1 a 50 mg de principio activo para su utilización con un dispositivo turboinhalador, tal como se utiliza para la insuflación del agente conocido cromoglicato de sodio.
50

Las composiciones para administración mediante inhalación pueden estar en forma de un aerosol presurizado convencional dispuesto para dispensar el principio activo como un aerosol que contiene gotitas o bien líquidas o bien sólidas finamente divididas. Pueden utilizarse propelentes de aerosoles convencionales tales como hidrocarburos o hidrocarburos fluorados volátiles y el dispositivo de aerosol está dispuesto convenientemente para dispensar una
55 cantidad medida de principio activo.

La composición farmacéutica (o formulación) para su aplicación puede envasarse en una variedad de modos dependiendo del método utilizado para administrar el fármaco. Por ejemplo, un artículo para su distribución puede incluir un recipiente en el que se deposita la formulación farmacéutica en una forma apropiada. Los expertos en la
60 materia conocen bien los recipientes adecuados e incluyen materiales tales como frascos (de plástico y vidrio), sobres, ampollas, bolsas de plástico, cilindros metálicos y similares. El recipiente también puede incluir un ensamblaje a prueba de manipulación para impedir el acceso indiscreto al contenido del envase. Además, el recipiente presenta sobre el mismo una etiqueta que describe el contenido del envase. La etiqueta puede incluir también advertencias apropiadas. Las formulaciones pueden envasarse también en recipientes de dosis unitaria o
65 de múltiples dosis, por ejemplo viales y ampollas selladas, y pueden almacenarse en un estado secado por congelación (liofilizado) que requiere sólo la adición del portador líquido estéril, por ejemplo agua, para inyección

inmediatamente antes de su utilización. Se preparan suspensiones y disoluciones de inyección extemporáneas a partir de comprimidos, gránulos y polvos estériles de la clase previamente descrita. Las formulaciones farmacéuticas unitarias preferidas son las que contienen una dosis diaria o una subdosis diaria unitaria, tal como se mencionó anteriormente en la presente memoria, o una fracción apropiada de la misma, del principio activo.

La invención proporciona además composiciones veterinarias que comprenden al menos un principio activo tal como se definió anteriormente junto con un portador veterinario para el mismo. Los portadores veterinarios son materiales útiles para el fin de administrar la composición y pueden ser materiales sólidos, líquidos o gaseosos que son por lo demás inertes o aceptables en la técnica veterinaria y son compatibles con el principio activo. Estas composiciones veterinarias pueden administrarse por vía parenteral, por vía oral o mediante cualquier otra vía deseada.

La cantidad de un compuesto de la presente invención que se combina con uno o más excipientes para producir una única forma farmacéutica variará necesariamente dependiendo del sujeto tratado, la gravedad del trastorno o afección, la tasa de administración, la disposición del compuesto y el criterio del médico encargado. En una forma de realización, se administra una cantidad adecuada de un compuesto de la presente invención a un mamífero que lo necesita. La administración en una forma de realización se produce en una cantidad de entre aproximadamente 0,001 mg/kg de peso corporal y aproximadamente 60 mg/kg de peso corporal al día. En otra realización, la administración se produce en una cantidad de entre 0,5 mg/kg de peso corporal y aproximadamente 40 mg/kg de peso corporal al día. En algunos casos, niveles de dosificación por debajo del límite inferior del intervalo mencionado anteriormente pueden ser más que adecuados, mientras que en otros casos pueden utilizarse dosis todavía mayores sin provocar ningún efecto secundario perjudicial, siempre que tales dosis mayores se dividan en primer lugar en varias dosis pequeñas para su administración a lo largo del día. Para una información adicional sobre vías de administración y regímenes de dosificación, véase el capítulo 25.3 en el volumen 5 de Comprehensive Medicinal Chemistry (Corwin Hansch; Chairman of Editorial Board), Pergamon Press 1990.

Artículos de fabricación

También se describe en la presente memoria un artículo de fabricación o "kit", que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. En una realización, el kit comprende un recipiente que comprende un compuesto de la presente invención. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringuillas, envases de blíster, etc. El recipiente puede formarse a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente puede contener un compuesto de la presente invención o una formulación del mismo que es eficaz para tratar la afección y puede presentar un punto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que presenta un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica).

El kit puede comprender además una etiqueta o prospecto en o asociado con el recipiente. El término "prospecto" se utiliza para referirse a las instrucciones habitualmente incluidas en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, la utilización, la dosificación, la administración, las contraindicaciones y/o las advertencias referentes a la utilización de productos terapéuticos de este tipo. En una realización, la etiqueta o los prospectos indican que la composición que comprende un compuesto de la presente invención puede utilizarse para tratar un trastorno o enfermedad mediada por cinasas. La etiqueta o prospecto también puede indicar que la composición puede utilizarse para tratar otros trastornos.

En ciertas formas de realización, los kits son adecuados para el suministro de formas orales sólidas de un compuesto de la presente invención, tales como comprimidos o cápsulas. Un kit de este tipo incluye preferentemente varias dosificaciones unitarias. Los kits de este tipo pueden incluir una tarjeta que presenta las dosificaciones orientadas en el orden de su utilización prevista. Un ejemplo de un kit de este tipo es un "envase de blíster". Los envases de blíster se conocen bien en la industria de envasado y se utilizan ampliamente para envasar formas de dosificación unitarias farmacéuticas. Si se desea, puede proporcionarse un recordatorio, por ejemplo en forma de números, letras u otras marcas o con un calendario insertado, que designa los días en el programa de tratamiento en los que pueden administrarse las dosificaciones.

Según otra forma de realización, un kit puede comprender (a) un primer recipiente con un compuesto de la presente invención contenido en el mismo; y (b) un segundo recipiente con una segunda formulación farmacéutica contenida en el mismo, en el que la segunda formulación farmacéutica comprende un segundo compuesto útil para tratar un trastorno o una enfermedad mediada por cinasas. Alternativa o adicionalmente, el kit puede comprender además un tercer recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. El kit puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

El kit puede comprender además indicaciones para la administración del compuesto de la presente invención y, si está presente, la segunda formulación farmacéutica. Por ejemplo, si el kit comprende una primera composición que comprende un compuesto de la presente invención y una segunda formulación farmacéutica, el kit puede comprender además indicaciones para la administración simultánea, secuencial o separada de las composiciones

farmacéuticas primera y segunda a un paciente que lo necesita.

En otras ciertas realizaciones en las que el kit comprende una composición de la presente invención y una segunda formulación farmacéutica, el kit puede comprender un recipiente para contener las composiciones separadas tal como un frasco dividido o un sobre de aluminio dividido, sin embargo, las composiciones separadas también pueden estar contenidas dentro de un único recipiente no dividido. En ciertas realizaciones, el kit comprende indicaciones para la administración de los componentes separados. La forma del kit es particularmente ventajosa cuando los componentes separados se administran preferentemente en diferentes formas farmacéuticas (por ejemplo, oral y parenteral), se administran a diferentes intervalos de dosificación o cuando el médico encargado desea la nitración de los componentes individuales de la combinación.

Actividad biológica

Inhibición de la MAPK p38

La actividad de los compuestos de la presente invención puede someterse a ensayo para determinar la inhibición de la MAPK p38 *in vitro*, *in vivo* o en una línea celular. Los ensayos *in vitro* incluyen ensayos que determinan la inhibición de o bien la actividad cinasa o bien la actividad ATPasa de la MAPK p38 activada. Los ensayos *in vitro* alternativos cuantifican la capacidad del inhibidor para unirse a la MAPK p38 y pueden medirse o bien mediante radiomarcaje del inhibidor antes de la unión, aislando el complejo inhibidor/MAPK p38 y determinando la cantidad de radiomarcador unido, o bien realizando un experimento de competición en el que se incuban nuevos inhibidores con la MAPK p38 unida a radioligandos conocidos. Estos y otros ensayos de cultivo celular e *in vitro* útiles bien conocidos por los expertos en la materia.

Pueden utilizarse ensayos de cultivo celular del efecto inhibidor de los compuestos de la presente invención para determinar las cantidades de TNF- α , IL-1, IL-6 o IL-8 producidas en sangre completa o fracciones celulares de la misma en células tratadas con inhibidor en comparación con células tratadas con controles negativos. El nivel de estas citocinas puede determinarse a través de la utilización de ELISA disponibles comercialmente o tal como se describe en la sección de ejemplos biológicos a continuación.

Ejemplos

Con el fin de ilustrar la invención, se incluyen los siguientes ejemplos. Sin embargo, debe apreciarse que estos ejemplos no limitan la invención y sólo pretenden sugerir un procedimiento de puesta en práctica de la invención.

Ejemplos biológicos

Se demostraron las actividades biológicas de los compuestos de la invención mediante los siguientes ensayos *in vitro*. Los compuestos utilizados en los ejemplos C-M fueron: compuesto 72: 1-(3-*tert*-butil-1-*p*-tolil-1*H*-pirazol-5-il)-3-(5-fluoro-2-(1-(2-hidroxietil)-1*H*-indazol-5-iloxi)bencil)urea (ejemplos 1 y 3); y compuesto 74: dihidrogenofosfato de 2-(5-(2-((3-(3-*tert*-butil-1-*p*-tolil-1*H*-pirazol-5-il)ureido)metil)-4-fluorofenoxi)-1*H*-indazol-1-il)etil) (ejemplos 2 y 4).

Ejemplo A

Ensayo bioquímico de p38

Se sometió a ensayo la actividad de p38 a temperatura ambiente en una reacción de 100 μ l que contenía enzima p38 α activada 5 nM y ATF-2 1 μ M (proteína de fusión del factor de transcripción de activación 2) como sustrato en HEPES 25 mM (pH 7,4), vanadato 100 μ M, DTT 1 mM, MgCl₂ 10 mM y [γ -³³P]-ATP 10 μ M (~0,1 μ Ci de P³³/reacción). Se terminó la reacción tras 30-40 minutos añadiendo TCA al 25%, se dejó reposar durante 5 minutos, y entonces se transfirió directamente a una placa filtrante de membrana GF-B. Se lavó el filtro dos veces durante 30 segundos con ácido fosfórico al 0,5% utilizando un colector automatizado Tomtec Mach III. Tras el lavado, se continuó el vacío durante 30 segundos para secar el filtro. Se añadieron aproximadamente 30 μ l de centelleador por pocillo en la placa filtrante y entonces se leyó en un contador de centelleo líquido (Packard TopCount HTS).

Ejemplo B

Ensayo de CMSP

Se evaluó la capacidad de los compuestos de la presente invención para inhibir la producción de TNF- α utilizando células mononucleares de sangre periférica ("CMSP") humanas que sintetizan y secretan TNF- α cuando se estimulan con lipopolisacárido.

Se prepararon disoluciones de prueba de compuestos preparando diluciones en serie de 5 veces en DMSO, diluciones que entonces se diluyeron hasta disoluciones madre de 5x diluyendo con MEM, suero bovino fetal ("FBS") inactivado por calor al 2%, HEPES 20 mM, L-glutamina 2 mM y penicilina/estreptomicina al 1%.

Se aislaron CMSP de la sangre humana tal como se expone a continuación. Se recogieron muestras de sangre completa a partir de voluntarios humanos en tubos Vacutainer™ CPT de Becton Dickinson. Se mezclaron los tubos y se centrifugaron a temperatura ambiente (18 - 25°C) en un rotor horizontal durante un mínimo de 15 minutos a FCR (fuerza centrífuga relativa) de 1500-1800. Para cada donante, se combinaron las capas leucocíticas en un tubo individual y se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato ("PBS"). Se resuspendió el sedimento celular en MEM, suero bovino fetal ("FBS") inactivado por calor al 2%, HEPES 20 mM, L-glutamina 2 mM y penicilina/estreptomicina al 1%. Se determinó el número de células total utilizando un hemocitómetro y se ajustó la suspensión celular a $2,0 \times 10^6$ células/ml.

A cada pocillo de una placa de cultivo celular de 96 pocillos se le añadieron 0,1 ml de suspensión celular. Se añadió una disolución de prueba de compuestos (30 µl), y se incubaron las células en un incubador a 37°C/5% de CO₂ durante 1 hora, y entonces se añadieron 20 µl de lipopolisacárido 7,5 ng/ml (LPS de *E. Coli* K-235) a cada pocillo, y se devolvieron las células al incubador a 37°C/5% de CO₂ durante 16-20 horas. Se centrifugaron las células durante 15 minutos a FCR de 1100. Se transfirieron aproximadamente 0,12 ml del sobrenadante a una placa de polipropileno de 96 pocillos transparente. Las muestras o bien se sometieron a ensayo inmediatamente o bien se almacenaron a -80°C hasta que estaban listas para el ensayo. Se determinaron los niveles de TNF-α en cada muestra utilizando un ensayo ELISA para TNF-α humano tal como el descrito a continuación.

Se determinaron los niveles de TNF-α utilizando el siguiente ensayo. Se prepararon placas recubiertas con anticuerpo frente a TNF-alfa añadiendo 150 µl de IgG monoclonal de ratón purificada antiTNF-α 2 µg/ml en tampón carbonato-bicarbonato (envase de tampón carbonato-bicarbonato BupH™) a los pocillos de una placa Immulon 4 de 96 pocillos (placa de fondo plano para ELISA Immulon 4; Dynex, número de catálogo 011-010-3855) y se incubaron durante la noche a 2 - 8°C. Se eliminó la disolución de recubrimiento y se añadieron 200 µl de tampón de bloqueo (HEPES 20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, BSA al 2%) y se almacenaron las placas a 2 - 8°C hasta que estaban listas para su utilización. Se preparó una curva patrón de TNF-α humano recombinante de diez puntos mediante una dilución en serie 1:2 en un diluyente de muestra (HEPES 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, MgCl₂ 2 mM, BSA al 1%) con una concentración superior de 6000 pg/ml.

Se eliminó la disolución de bloqueo de las placas de ELISA para TNF-α lavando cinco veces con 300 µl de "tampón de lavado" (HEPES 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, MgCl₂ 2 mM, Tween-20 al 0,02%). Se añadieron 50 µl de diluyente de muestra a todos los pocillos, y entonces se añadieron o bien 50 µl de una disolución de curva patrón de TNF-α o bien el sobrenadante de compuesto de prueba a todos los pocillos. Se incubó la placa a temperatura ambiente durante una hora con agitación (300 rpm). Se lavó la placa cinco veces con 300 µl de tampón de lavado. Se añadieron 100 µl de anticuerpo de cabra biotinilado antiTNF-α humano 0,2 µg/ml en "diluyente de anticuerpos" (HEPES 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, MgCl₂ 2 mM, BSA al 1%, Tween-20 al 0,02%) por pocillo, y se incubó la placa a temperatura ambiente durante una hora con agitación (300 rpm). Se lavó la placa cinco veces con 300 µl de tampón de lavado por pocillo. Se añadieron 100 µl de estreptavidina-fosfatasa alcalina 0,02 µg/ml en diluyente de anticuerpos por pocillo, y se incubó la placa a temperatura ambiente durante una hora con agitación (300 rpm). Se lavó la placa cinco veces con 300 µl de tampón de lavado por pocillo. Se añadieron 200 µl de pNPP 1 mg/ml (fosfato de p-nitrofenilo) en tampón dietanolamina con MgCl₂ 0,5 mM por pocillo, y se incubó la placa durante de 30 a 45 minutos a temperatura ambiente con agitación (300 rpm). Se monitorizó el avance de la reacción determinando la densidad óptica: cuando el patrón superior alcanzó una DO de entre 2,0 y 3,0, se añadieron 50 µl de NaOH 2 N por pocillo. Se determinó la densidad óptica de cada pocillo en el plazo de 30 minutos, utilizando un lector de placas de microtitulación ajustado a 405 nm. Se analizaron los datos en el ajuste XL utilizando ajuste a una curva de 4 parámetros.

Se utilizaron los siguientes reactivos en los ensayos descritos anteriormente. Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco sin calcio ni magnesio (número de catálogo de Gibco 14190); medio esencial mínimo de Eagle (MEM; número de catálogo de Gibco 11090); penicilina-estreptomicina (número de catálogo de Gibco 15140); L-glutamina, 200 mM (número de catálogo de Gibco 25030); HEPES, 1 M (número de catálogo de Gibco 15630); suero bovino fetal ("FBS"; número de catálogo de HyClone SH30070.03); lipopolisacáridos de *Escherichia coli* K-235 ("LPS"; número de catálogo de Sigma L2018); IgG monoclonal de ratón purificada, antiTNF-α (número de catálogo de R&D Systems MAB210); envase de tampón carbonato-bicarbonato BupH™ (número de catálogo de Pierce 28382); HEPES (FW 238.3; número de catálogo de Sigma H3575); NaCl (número de catálogo de Sigma S7653); albúmina sérica bovina ("BSA"; número de catálogo de Jackson ImmunoResearch 001-000-162); monolaurato de polioxietileno 20-sorbitano (número de catálogo de Sigma P2287); cloruro de magnesio, hexahidratado (número de catálogo de Sigma M2670); TNF-α humano recombinante (número de catálogo de R&D Systems 210TA010); IgG de cabra purificada con afinidad por TNF-α biotinilada (número de catálogo de R&D Systems BAF210); estreptavidina-fosfatasa alcalina (número de catálogo de Jackson ImmunoResearch 016-050-084); tampón de sustrato dietanolamina (número de catálogo Pierce 34064); fosfato de p-nitrofenilo (número de catálogo de Sigma N2765).

Ejemplo C

Actividad del compuesto 72 contra diversas cinasas

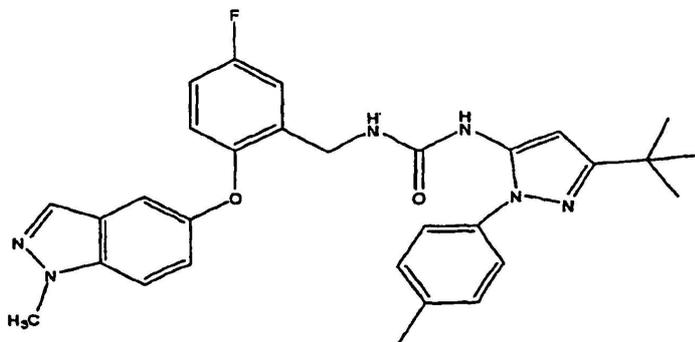
Se exploró la actividad p38 α del compuesto 72 utilizando un ensayo de cinasas radioactivas de p38 α de desarrollo interno utilizando ATF-2 como sustrato. Se determinó la selectividad del compuesto 72 sometiendo a ensayo la actividad de 202 proteínas cinasas en presencia de compuesto 72 1 μ M. Posteriormente se realizaron determinaciones de CI₅₀ para las cinasas inhibidas en >80% en la selección inicial (concentración de ATP a Km) por protocolos establecidos.

Tal como se muestra en la tabla 1, el compuesto 72 es un potente inhibidor de la tirosina cinasa citoplásmica Abelson p38 α (Abl), el gen relacionado con Abelson (Arg) y la tirosina cinasa receptora Tie-2. Además de estas actividades, el compuesto 72 también es moderadamente potente contra la forma resistente a Imatinib de BCR-Abl T315I, las tirosina cinasas Hck, Lyn y Fyn de la familia src, y las tirosina cinasas receptoras FGFR1 (receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 1; FGFR1) y VEGFR2 (receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2; KDR).

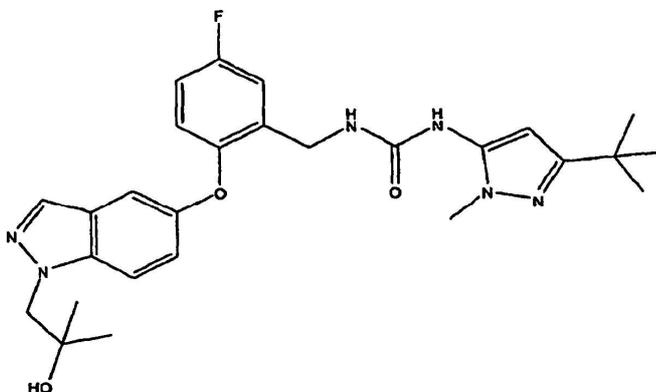
Tabla 1

Cinasa	CI ₅₀
p38 α	<2 nM
Abl	4 nM
Arg	10 nM
Tie2	1 nM
Abl (T315I)	68 nM
Hck	26 nM
Lyn	25 nM
Fyn	41 nM
FGFR1	28 nM
VEGFR	74 nM

A modo de comparación, también se sometieron a prueba los compuestos de los ejemplos 94 y 138 del documento WO 2004/078116.



Ejemplo 94



Ejemplo 138

Se proporcionan los resultados en la tabla 1 a continuación.

Tabla 1 a

	Ejemplo 94	Ejemplo 138
Cinasa	CI₅₀	CI₅₀
P38 α	<2 nM	<2 nM
Abl	10 nM	>500 nM
Tie2	4 nM	>500 mM

Los resultados muestran que el compuesto 72 es un inhibidor de Abl y Tie2 significativamente más potente que los compuestos de los ejemplos 94 y 138 del documento WO 2004/078116.

Ejemplo D

Actividad celular del compuesto 72 contra la ruta de p38

Se trataron células HeLa con el compuesto 72 durante 60 minutos antes de la estimulación con anisomicina 1 μ g/ml durante 60 minutos para inducir la activación de la ruta de p38. Se marcaron las células con anticuerpos contra la forma fosforilada de HSP27 (Ser78) y GAPDH como control de normalización. Se obtuvieron imágenes de las células y se cuantificaron utilizando un generador de imágenes LI-COR Aeriustm.

Los resultados demostraron que el compuesto 72 es un potente inhibidor de la ruta de p38 en células, con una CI₅₀ aparente de 2 nM. En un ensayo celular funcional, también se sometió a prueba este compuesto para determinar su capacidad para inhibir la producción de TNF- α en sangre completa tratada con lipopolisacárido (LPS) bacteriano para inducir la producción de citocinas (tal como se detectó mediante ELISA), generando una CI₅₀ aparente de 30 nM.

Ejemplo E

Actividad celular del compuesto 72 contra el receptor Tie2

Durante el transcurso del experimento, se privaron de suero células HUVEC durante 2 horas, entonces se estimularon con 200 ng/ml del agonista del receptor Tie2 angiopoyetina-1 (Ang-1). Se recogieron las células a los puntos de tiempo indicados y se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpos contra fosfo-AKT, fosfo-Erk, fosfo-HSP27, fosfo-p38 y GAPDH. Se cuantificaron las señales y se normalizaron con respecto a GAPDH para evaluar el grado de inducción como resultado de la activación del receptor Tie2. Se demostraron los resultados como una inmunotransferencia y un gráfico que muestra el transcurso de tiempo de la activación de la ruta de Erk, AKT y p38 en respuesta al agonista del receptor Tie2 Ang-1 en células endoteliales vasculares umbilicales humanas (HUVEC). Los resultados muestran que sólo las rutas de AKT y Erk se activan en respuesta a la activación del receptor Tie2.

Para el estudio de activación de Tie2, se privaron de suero células HUVEC durante 2 horas, entonces se trataron con concentraciones variables del compuesto 72 durante 60 minutos antes de la estimulación con Ang-1 200 ng/ml durante 10 minutos. Entonces se inmunopurificó (IP) Tie2 y se sometió a inmunotransferencia con anticuerpos antifosfotirosina (ptyr) y antiTie2 para evaluar el grado de autofosforilación de Tie2. Se sometieron a inmunotransferencia los lisados con los anticuerpos antifosfo-Erk y antifosfo-AKT (Ser473), respectivamente. Se cuantificaron las señales y se normalizaron con respecto a GAPDH como control de carga. Se mostraron los resultados en una inmunotransferencia y un gráfico. El tratamiento con el compuesto 72 dio como resultado una inhibición dependiente de la dosis de tanto la autofosforilación de Tie2 así como sus efectores aguas abajo Erk y AKT con una CI₅₀ de <33 nM para el primero y <11 nM para el último.

Ejemplo F

Actividad celular del compuesto 72 contra BCR-Abl

Se trató la línea celular de leucemia mielógena crónica K562 positiva para BCR-Abl con diversas concentraciones de Imatinib o compuesto 72 tal como se indicó durante 72 horas a 37°C, 5% de CO₂. Posteriormente se midió la viabilidad celular utilizando CellTiter Blue (Promega) para determinar los valores de CI₅₀ para cada compuesto. Los valores de CI₅₀ determinados eran de 278 nM y 62 nM para Imatinib y el compuesto 72, respectivamente.

Se prepararon extractos de células K562 tratadas con concentraciones variables de o bien Imatinib o bien compuesto 72 durante 2 horas a 37°C, 5% de CO₂ y se sometieron a inmunotransferencia para Abl autofosforilada (p-Abl, Tyr245) y sustratos de Abl STATS (pSTAT5, Tyr694) y CrkL (pCrkL, Tyr207). Los resultados muestran que el compuesto 72 es más de cuatro veces más potente que Imatinib en la inhibición de la proliferación en la línea celular K562 dirigida por BCR-Abl. Se midieron los resultados de la inmunotransferencia de los extractos de K562 tratados con pBCR-Abl, pSTAT5, pCrkL o GAPDH a las concentraciones de Imatinib o compuesto 72 5000, 1000, 333, 111,

37 y 0 nM. Este ensayo muestra que tanto el compuesto 72 como Imatinib pueden inhibir la autofosforilación de la BCR-Abl así como sus sustratos STAT5 y CrkL. El compuesto 72, según los datos de proliferación, es más potente en la inhibición de la fosforilación de estos sustratos.

5 Ejemplo G

Propiedades físicas, perfil metabólico y perfil de seguridad de los compuestos 72 y 74

1. Determinación de la solubilidad

Los resultados de la determinación de la solubilidad se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Solubilidad

Compuesto 72	Compuesto 74 (profármaco)
pH 3,0 <0,005 mg/ml	pH 1,2 <1 mg/ml
pH 7,4 <0,005 mg/ml	pH 6,5 >1000 mg/ml
	pH 7,4 ~ 940 mg/ml

A modo de comparación, se encontró que las solubilidades de los compuestos de los ejemplos 94 y 138 del documento WO 2004/078116 eran <0,001 mg/ml a pH 6,5 y 7,4.

2. Ensayos de inhibición de CYP (fluorescente, CL-EM)

Se dedujeron los valores de CI_{50} para CYP3A4, CYP2C19 y CYP2C9 midiendo la razón de la formación de metabolito de un sustrato específico frente al patrón interno en comparación con el control mediante cromatografía de líquidos/espectrometría de masas (CL/EM) utilizando microsomas hepáticos humanos combinados (n = 1). Se dedujeron los valores de CI_{50} para CYP2D6 y CYP1A2 midiendo la fluorescencia relativa en comparación con el control de sondas fluorescentes específicas para la isoforma P450 disponibles comercialmente y proteína recombinante (n = 1). Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Perfil de inhibición (compuesto 72)

	CI_{50}
CYP3A4	Midazolam: ~ 8 μ M Testosterona: ~ 10 μ M
CYP2D6	3 μ M
CYP2C9	5 μ M (CL/EM)
CYP19	25 μ M (CL/EM)
CYP1A2	25 μ M

3. Ensayos de toxicidad inespecífica

Se sometió a ensayo el compuesto 72 para determinar la unión (ensayo de desplazamiento de ligando) a 10 μ M contra el siguiente panel de 28 receptores, canales iónicos y transportadores.

De las 28 entidades moleculares seleccionadas, se demostró que sólo el canal de sodio (sitio 2) interactuaba significativamente (desplazamiento >50%) con el compuesto.

4. Ensayos de evaluación de la seguridad

Se realizó el ensayo hERG utilizando un protocolo de registro electrofisiológico de fijación de voltaje convencional. Se realizó el ensayo AMES (ensayo de mutación inversa bacteriana) según el protocolo. Se sometió a prueba el compuesto 72 a 0,5-5000 μ g/placa de prueba con/sin activación de S9. Se realizaron ensayos de micronúcleos *in vitro* e *in vivo* según el protocolo. Se muestran los resultados en la tabla 4.

Tabla 4: Seguridad

Ensayo	Compuesto 72
Registro electrofisiológico de fijación de voltaje hERG	64% de inhibición a 10 μ M
Mutagenicidad AMES	Negativo
Micronúcleos (<i>in vitro</i>)	Negativo

5. Estudio de tolerancia

Se dosificaron ratones (cepa CD-1, n = 5 por grupo de dosis) con el compuesto 72 (como compuesto 74) a 10, 30 ó 100 mg/kg dos veces al día durante 14 días. Se evaluó la pérdida de peso a lo largo de todo el estudio. Se extrajo sangre en el día final para la química clínica (albúmina, fosfatasa alcalina, ALT, amilasa, BUN, calcio, colesterol, creatinina, glucosa, fosfato, bilirrubina total, TP, globulina). Los resultados se muestran en la tabla 5. No se observaron mortalidades relacionadas con el compuesto. En este estudio, incluso a 100 mg/kg, no se observaron toxicidades limitantes de la dosis (TLD) y por tanto no se identificó una dosis máxima tolerada (DMT).

Tabla 5: Tolerancia (*in vivo*)

Especie	Ratón (CD-1)
Dosificación	10, 30 y 100 mg/kg dos veces al día
Duración del estudio	14 días
Pérdida de peso	<5% (todos los grupos de dosis)
Química clínica	Dentro del intervalo normal (todos los grupos de dosis)
Comentarios:	Mortalidades relacionadas con el compuesto no observadas, TLD y DMT no logradas

Ejemplo H15 Farmacocinética del compuesto 72 en roedores y primates

Se utilizaron procedimientos no compartimentales (independientes del modelo) para analizar las curvas de concentración plasmática-tiempo derivadas de todas las especies tal como se describe a continuación. A continuación se proporcionan valores de aclaramiento (Cl), razones de extracción en porcentaje calculadas (% de ER), volumen de distribución (Vz), tiempo hasta la ½ de la concentración máxima (t½) y exposición (AUC, área bajo la curva) para ratón, rata y mono, respectivamente.

1. Ratón: Se examinó la farmacocinética del compuesto 72 tras administración intravenosa en bolo (i.v., 1 mg/kg) u oral (v.o., 10 mg/kg) en ratones Balb/c hembra (n = 3/punto de tiempo). Se obtuvieron muestras de sangre a los 15 y 30 minutos, y 1, 2, 4, 8 y 24 horas tras la dosificación de v.o., y a los 15 y 30 minutos, y 1, 2, 4, y 8 horas para la administración i.v..

i.v.: 1 mg/kg

Cl = 2,6 ml/min./kg

ER = 2,8%

Vz = 0,085 l/kg

t½ = 3,9 h

AUC = 6,6 µg-h/kg

Oral: 10 mg/kg

AUC = 10,5 µg-h/kg

F = 16%

C_{máx.} = 1,8 µg/ml

2. Rata: Se examinó la farmacocinética del compuesto 72 en ratas Sprague-Dawley macho (n = 3/punto de tiempo) tras la administración i.v. en bolo (2 mg/kg) o v.o. (30 mg/kg). Se tomaron muestras de sangre en los mismos momentos que se enumeraron para el estudio PK de ratón.

i.v.:1 mg/kg

Cl = 3,2 ml/min./kg

ER = 4,6%

Vz = 0,048 l/kg

t½ = 3,9 h

AUC = 4,7 µg-h/kg

Oral: 30 mg/kg

AUC = 35 µg-h/kg

F = 15%

C_{máx.} = 4,5 µg/ml

3. Mono: Se examinó la farmacocinética del compuesto 72 en monos *Cynomologus* macho (n = 3/punto de tiempo) tras la administración i.v. en bolo (2 mg/kg) o v.o. (10 mg/kg). Se tomaron muestras de sangre en los mismos momentos que se enumeraron para el estudio PK de ratón.

i.v.: 1 mg/kg

Cl = 8,8 ml/min./kg

ER = 20%

Vz = 3,2 l/kg

t½ = 4,6 h

AUC = 4,1 µg-h/kg

Oral: 10 mg/kg

AUC = 7,6 µg-h/kg

F = 38%

C_{máx.} = 0,26 µg/ml

Ejemplo I

El compuesto 72 en un modelo de rata de artritis inducida por colágeno (AIC)

5 Se dosificó el compuesto 72 en forma de profármaco (compuesto 74) en este estudio. Se inyectó a ratas Lewis hembra (200 g); n = 8 por grupo de tratamiento colágeno tipo II/adyuvante incompleto de Freund (inyección de 300 µl de 0,6 mg de colágeno, superficie dorsal día 0 y día 6). Se dosificaron los animales con: (1) vehículo: 5 ml/kg, v.o., dos veces al día x 7; (2) compuesto 72: 0,3, 1, 3 ó 10 mg/kg, v.o., dos veces al día x 7; o (3) ENBREL®: 10 mg/kg, s.c., días 1 y 4. ENBREL® sirvió como control positivo. Se administraron los compuestos en los días 11-18. Se midió el diámetro del tobillo en el día 11 y cada día a partir de entonces (figura 70). Al final del estudio, se determinaron el peso de la pata y la histología microscópica. Se extirparon tanto las patas como las rodillas traseras, se pesaron las patas traseras y entonces se colocaron, con las rodillas, en formalina. Tras 1-2 días en fijador y 4-5 días en descalcificador, se procesaron las articulaciones de los tobillos y las rodillas, se incrustaron, se cortaron y se tiñeron con azul de toluidina. Se dieron a los tobillos y las rodillas puntuaciones de 0-5 para inflamación, formación de paño y resorción ósea.

Los resultados muestran que el compuesto 72 mejoró de manera dependiente de la dosis todos los parámetros asociados con este modelo de enfermedad. Para el diámetro del tobillo y la histopatología, el compuesto 72 presentaba una DE₅₀ aparente de 1,5 y 3,0 mg/kg, respectivamente. El compuesto 72 a 10 mg/kg indujo regresión de la enfermedad al final del estudio.

Ejemplo J

El compuesto 72 inhibe la angiogénesis *in vivo*

25 Se dosificó el compuesto 72 en forma de profármaco (compuesto 74) en este estudio. Se implantaron por vía subcutánea a ratones CD-1 hembra (19-22 g), n = 4 por grupo de tratamiento, 500 µl de matrigel reducido en factores de crecimiento que contenía bFGF 1500 ng/ml o bFGF 0 ng/ml como control negativo. Se administraron los compuestos de prueba mediante sonda nasogástrica oral a las dosis y programas indicados. Se dosificaron los animales con (1) vehículo: tampón fosfato 30 mM, 10 ml/kg, v.o., dos veces al día x 7; (2) compuesto 72: 10, 30 ó 100 mg/kg de fármaco activo, v.o., dos veces al día x 7; o (3) SU11248: (Sutent) 40 mg/kg, v.o., una vez al día x 7. Sutent es un inhibidor de KDR y sirvió como control de fármaco positivo en este estudio. Se sacrificaron los animales en el día 7. Se recogió el matrigel, se pesó y se homogeneizó en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. Se centrifugaron las muestras y se analizó el lisado resultante para determinar la concentración de hemoglobina mediante reacción colorimétrica. El compuesto 72 inhibió la angiogénesis inducida por bFGF de una manera dependiente de la dosis. A 100 mg/kg, se inhibió significativamente la angiogénesis en un 72% (p<0,05, prueba de comparación múltiple de Dunnett).

Ejemplo K

El compuesto 72 inhibe tumores dirigidos por BCR-Abl

40 Se dosificó el compuesto 72 en forma de profármaco (compuesto 74) en este estudio. Se implantaron a ratones Scid-beis hembra (17-20 g), n = 8 por grupo, 107 células K562 por vía subcutánea en el costado derecho. Se administraron los compuestos de prueba mediante sonda nasogástrica oral a las dosis y programas indicados cuando los tumores alcanzaron 200 ± 50 mm³ en tamaño. Se dosificaron los animales con (1) vehículo: Trappsol al 20%, 10 ml/kg, v.o., dos veces al día x 7; (2) compuesto 74: 30 ó 100 mg/kg de fármaco activo, v.o., dos veces al día o una vez al día x 7) o (3) Imatinib (GLEEVEC®): 400 mg/kg, v.o., dos veces al día x 7. Imatinib es un inhibidor conocido de Abl y sirvió como un control de fármaco positivo en este estudio. Se monitorizaron el tamaño del tumor y el peso corporal a lo largo de todo el estudio. Se muestran los resultados en la tabla 6.

Tabla 6

Tratamiento	% de regresión y respuestas completas
Imatinib 400 mg/kg dos veces al día	98% de R (6/8)
Compuesto 72 30 mg/kg dos veces al día	Estasis (0/8)
100 mg/kg dos veces al día	93% de R (5/8)
100 mg/kg una vez al día	Estasis (0/8)

55 El compuesto 74 era eficaz en este modelo. La administración de 30 mg/kg dos veces al día o 100 mg/kg una vez al día dio como resultado estasis del tumor, y se produjo una regresión del tumor del 94% y 5 ó 8 animales tuvieron una respuesta completa (regresión del tumor del 100%) cuando se aumentó la dosis hasta 100 mg/kg dos veces al día. Se toleró bien el compuesto 72 provocando menos del 10% de pérdida de peso corporal a lo largo de todo el transcurso del tratamiento.

Ejemplo LEl compuesto 72 en un modelo de mieloma múltiple

5 Se dosificó el compuesto 72 en forma de profármaco (compuesto 74) en este estudio. Se implantaron a ratones Scid-beis hembra (17-20 g), n = 8 por grupo, 15 x 10⁶ células RPMI 8226 por vía subcutánea en el costado derecho con o bien vehículo (Trappsol al 20%, 10 ml/kg, v.o., dos veces al día x 14) o bien el compuesto 74 (100 mg/kg de fármaco activo, v.o., dos veces al día x 14). Se administraron los compuestos de prueba mediante sonda nasogástrica oral a las dosis y los programas indicados cuando los tumores alcanzaron 200 ± 50 mm³ en tamaño. Se monitorizaron el tamaño del tumor y el peso corporal a lo largo de todo el estudio y se evaluó el compuesto 72 con respecto a la capacidad para inhibir el crecimiento tumoral (% de TGI = (1-T/C) x 100). Los resultados se muestran en la tabla 7. El compuesto 72 (dosificado en su forma de profármaco como compuesto 74) produjo un efecto estadísticamente significativo sobre el crecimiento tumoral a lo largo del transcurso de este estudio. Estos datos sugieren que el efecto del compuesto 72 observado en este estudio es adicional o independiente de su capacidad para inhibir p38. Se toleró bien el compuesto 72 provocando menos del 10% de pérdida de peso corporal a lo largo de todo el tratamiento.

Tabla 7

Grupo	% de inhibición del crecimiento tumoral (TGI)
Control	0%
Compuesto 37d 60 mg/kg	31%
Compuesto 72 100 mg/kg	67%

20 Se trató la línea celular de mieloma múltiple RPMI 8226 con diversas concentraciones del inhibidor proteosómico MG-132 (que sirve como control positivo) o el compuesto 72 durante 72 horas a 37°C, 5% de CO₂. Entonces se midió la viabilidad celular utilizando CellTiter Blue (Promega) para determinar los valores de CI₅₀ para cada compuesto (tabla 8). El tratamiento con el compuesto 72 no fue antiproliferativo a lo largo del intervalo de concentración indicado. MG-132 produjo una CI₅₀ que estaba dentro de los intervalos históricos de la prueba de desarrollo interno (tabla 8). Estos datos indican fuertemente que el efecto de TGI observado para el compuesto 72 detectado *in vivo* se debe probablemente a los efectos extra-tumorales. Un papel de este tipo concuerda con los informes publicados que sugieren que la actividad de tanto p38 como Tie2 puede ser crítica para el crecimiento/la supervivencia de este tipo de tumor *in vivo*.

Tabla 8

Compuesto	CI ₅₀ de proliferación
MG-132	114 nM
Compuesto 72	> 10.000 nM

Ejemplo MActividad celular del compuesto 72 contra VEGFR2

40 Se privaron de suero células HUVEC durante 2 horas, entonces se trataron con concentraciones variables del compuesto 72 o el inhibidor de VEGFR2 control ((Z)-3-[(2,4-dimetil-3-(etoxicarbonil)pirrol-5-il)metilidenil]indolin-2-ona) durante 60 minutos antes de la estimulación con VEGF 20 ng/ml durante 5 minutos. Se prepararon lisados de los diversos tratamientos y se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpos específicos para VEGFR2 fosforilado en Tyr1175. Entonces se obtuvieron imágenes de las inmunotransferencias resultantes para el compuesto 72 y el inhibidor control VEGFR1 y se cuantificaron utilizando el generador de imágenes LI-COR Aeriustm. Se normalizó la señal fosfo-VEGFR2 con respecto a GAPDH como control de carga. Entonces se utilizaron estos valores para generar valores de CI₅₀ para el compuesto 72 y el inhibidor control de VEGFR2 VEGFR1, utilizando un protocolo de ajuste a una curva de 4 parámetros.

50 El compuesto 72 inhibe la autofosforilación del receptor endotelial vascular tipo II (VEGFR2) en células HUVEC. Los resultados muestran que el tratamiento con el compuesto 72 da como resultado una inhibición dependiente de la dosis de la autofosforilación de VEGFR2 en el residuo de tirosina 1175 con una CI₅₀ de 48 nM

Ejemplos preparativos

55 En los ejemplos descritos a continuación, a menos que se indique lo contrario, se exponen todas las temperaturas en grados centígrados. Se adquirieron reactivos de proveedores comerciales tales como Aldrich Chemical Company, Lancaster, TCI o Maybridge, y se utilizaron sin purificación adicional a menos que se indique lo contrario. Se

adquirieron tetrahidrofurano (THF), N,N-dimetilformamida (DMF), diclorometano (DCM), tolueno, dioxano y 1,2-difluoroetano de Aldrich en frascos con sello de seguridad y se utilizaron tal como se recibieron.

Se realizaron las reacciones expuestas a continuación en general a presión de nitrógeno o argón positiva o con un tubo de secado (a menos que se indique lo contrario) en disolventes anhidros, y los matraces de reacción estaban equipados normalmente con tapones de caucho para la introducción de sustratos y reactivos mediante jeringuilla. Se secó en horno y/o se secó mediante calor el material de vidrio.

Se realizó la cromatografía en columna en un sistema Biotage (Fabricante: Dyax Corporation) que presentaba una columna de gel de sílice o en un cartucho SepPak de sílice (Waters).

Se registraron los espectros de ^1H -RMN en un instrumento Varian que funcionaba a 400 MHz. Se obtuvieron los espectros de ^1H -RMN como disoluciones de CDCl_3 (notificado en ppm), utilizando cloroformo como patrón de referencia (7,25 ppm). Se utilizaron otros disolventes de RMN cuando era necesario. Cuando se notifican multiplicidades de picos, se utilizan las siguientes abreviaturas: s (singlete), d (doblete), t (triplete), m (multiplete), a (ancho), dd (doblete de dobletes), dt (doblete de tripletes). Las constantes de acoplamiento, cuando se proporcionan, se presentan en hercios (Hz).

Ejemplo 1

Preparación de 1-(3-terc-butil-1-p-tolil-1H-pirazol-5-il)-3-(5-fluoro-2-(1-(2-hidroxietil)-1H-indazol-5-iloxi)bencil)urea (72): Procedimiento 1

La síntesis del compuesto (72) según el procedimiento 1 se muestra en el esquema 1, etapas A a J.

Etapa A: Preparación de 2-(benciloxi)-5-fluorobenzonitrilo 62: En un matraz de fondo redondo de 4 bocas, de 12 l equipado con un agitador mecánico y una sonda de temperatura, se añadió a una suspensión de hidruro de sodio (74 g, 1,82 mol) en DMF (1,95 l) alcohol bencilico (142 g, 1,3 mol) a través de un embudo de goteo lentamente a lo largo de 30 minutos en un baño de hielo bajo nitrógeno. Se agitó la mezcla en un baño de hielo (0°C) durante 120 minutos, se añadió una disolución de 2,5-difluorobenzonitrilo (180 g, 1,3 mol) en DMF (650 ml) a través de un embudo de goteo a lo largo de 35 minutos. Se calentó la mezcla resultante hasta temperatura ambiente. Tras 2 horas, se enfrió la mezcla en un baño de hielo (4°C) y se extinguió con NH_4Cl saturado (130 ml) seguido por la adición de agua (2,6 l x 3). Se agitó la suspensión a temperatura ambiente durante la noche y se filtró el precipitado y se lavó con agua (650 ml x 3). Se secó el sólido a vacío durante 2 días dando 292 g (99,3%) del compuesto deseado. ^1H -RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7,78 (dd, 1H, J = 3,2 Hz, J = 8,2 Hz), 7,5-7,76 (m, 1H), 7,35-7,48 (m, 6H), 5,28 (s, 2H).

Etapa B: Preparación de 5-fluoro-2-hidroxibenzonitrilo 63: Se colocó Pd al 10%/C seco (2,48 g) en un matraz de 5 l bajo N_2 . Se añadió lentamente una disolución de 2-(benciloxi)-5-fluorobenzonitrilo (148 g, 651 mmol) en metanol (2,34 l) bajo N_2 . Se eliminó el aire del matraz mediante vacío y se cargó el matraz con H_2 (balón) tres veces. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora. Se repitió el procedimiento anterior dos veces más para llevar la reacción hasta el final. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante otras 2 horas. Se filtró la mezcla a través de un lecho de Celite bajo N_2 y se lavó con EtOAc (150 ml x 2). Se enjuagó el residuo de paladio con agua (50 ml) y se desechó. Se concentraron los filtrados dando (94,6 g, 106%) del compuesto deseado como un sólido de color amarillo. Se detectó EM ((APCI -) m/z 137 (M-1). ^1H -RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11,07 (a, 1H), 7,58 (dd, 1H, J = 3,2 Hz, J = 8,2 Hz), 7,43 (m, 1H), 6,91-7,03 (dd, 1H J = 4,5 Hz, J = 9,2 Hz).

Etapa C: Preparación de 5-fluoro-2-(4-metil-3-nitrofenoxi) benzonitrilo 64: En un matraz de 5 l de 3 bocas, equipado con un agitador mecánico, un condensador y una sonda de temperatura J-Kem, se añadió una disolución de 5-fluoro-2-nitrotolueno (158 g, 1,02 mol) en N,N-dimetilacetamida (500 ml) a una mezcla de 5-fluoro-2-hidroxibenzonitrilo (147 g, 1,07 mol) y carbonato de potasio (163 g, 1,2 mol) en N,N-dimetilacetamida (573 ml) a temperatura ambiente. Se calentó la mezcla hasta 100°C. Tras 8 horas, se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se añadió agua (3400 ml) en un baño de hielo. Se filtró el precipitado, se lavó con agua (1073 ml x 2), y se secó a vacío (40°C) proporcionando (264 g, 90%) del compuesto deseado como un sólido de color marrón. Se detectó EM (APCI -) m/z 272 (M-1). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8,10 (d, 1H, J = 9 Hz), 7,41-7,48 (m, 1H), 7,38 (m, 1H), 7,07-7,14 (m, 1H), 6,88-7,10 (m, 1H), 2,63 (s, 3H).

Etapa D: Preparación de 2-(3-amino-4-metilfenoxi)-5-benzonitrilo 65: En un matraz de fondo redondo de 12000 ml de 4 bocas, equipado con un agitador mecánico, un condensador y una sonda de temperatura J-Kem, se colocaron 2-(3-amino-4-metilfenoxi)-5-benzonitrilo (247 g, 907 mmol) y polvo de Zn (297 g, 4,5 mol) y se suspendieron en MeOH/THF 1:1 (2,2 l). Se añadió lentamente NH_4Cl acuoso saturado (1,6 l) a lo largo de 40 minutos a través de un embudo de adición (manteniendo la temperatura interna por debajo de 60°C). Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se eliminó el polvo de zinc mediante filtración y se lavó la torta con EtOAc (450 ml x 3). Se añadieron NH_4OAc acuoso saturado (1500 ml, preparado a partir de 2 kg de NH_4OAc y 4 l de H_2O) y H_2O (1500 ml x 2). Se concentraron los filtrados mediante evaporación rotatoria hasta que quedaba mayoritariamente agua. Se filtró el sólido de color tostado y se lavó con H_2O (1500 ml x

4), y se secó a vacío proporcionando 211,5 g (96%) del compuesto deseado. Se detectó EM (APCI +) m/z 243 (M+1). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,38 (m, 1H), 7,18 (m, 1H), 6,65-6,85 (m, 5H), 3,60 (a, 2H), 2,17 (s, 3H).

5 Etapa E: Preparación de 2-(1H-indazol-5-iloxi)-5-fluorobenzonitrilo 66: En un matraz de fondo redondo de 6 l equipado con un agitador mecánico, una sonda de temperatura J-KEM, se trató una disolución fría (0°C) de 2-(3-amino-4-metilfenoxi)-5-benzonitrilo (209 g, 862 mmol) y NH₄BF₄ en ácido acético (1,75 l)/agua (862 ml) con HCl concentrado (359 ml) gota a gota a lo largo de 2 minutos. Se agitó la suspensión en un baño de hielo durante 30 minutos y se añadió nitrito de sodio. Se agitó la suspensión a 0°C durante 1 hora y entonces se calentó hasta temperatura ambiente. Tras la agitación a temperatura ambiente durante 3 horas, se eliminaron los disolventes mediante evaporación rotatoria y se formó la mezcla azeotrópica con tolueno (200 ml x 2). Se secó el residuo a vacío durante la noche. Se suspendió el sólido en acetona (200 ml) y EtOAc (200 ml) y se eliminaron los disolventes mediante evaporación rotatoria. Se suspendió el residuo en EtOAc (200 ml) y se eliminó mediante evaporación rotatoria. Se suspendió el residuo en EtOAc (1145 ml) y se añadió acetato de potasio (254 g, 2,6 mol) en una porción. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 20 horas y se filtró. Se lavó la torta con EtOAc (500 ml x 6). Se concentraron los filtrados combinados. Se suspendió el residuo en EtOAc (500 ml) y heptano (500 ml). Se filtró el sólido de color amarillo (141,3 g). Se concentraron las aguas madres y se recrystalizaron en MTBE/hexano (100 ml/100 ml) produciendo 20,1 g. Se concentraron las segundas aguas madres y se trituraron con MTBE/heptano (100 ml/100 ml) dando 14,28 g adicionales. Las cosechas combinadas produjeron 176 g (rendimiento del 81%) del compuesto deseado. EM (APCI +) m/z 254 (M+1) detectado. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 13,38 (a, 1H), 8,07 (s, 1H), 7,94 (dd, 1H, J = 3,1 Hz, J = 8,2 Hz), 7,64 (d, 1H, J = 9 Hz), 7,54 (m, 2H), 7,21 (dd, 1H, J = 9 Hz), 6,96 (dd, 1H, J = 4,3 Hz, J = 9,3 Hz).

25 Etapa F: Preparación de 2-(1-(2,2-dimetoxietil)-1H-indazol-5-iloxi)-5-fluorobenzonitrilo 67: Se suspendió 2-(1H-indazol-5-iloxi)-5-fluorobenzonitrilo (5,000 g, 19,7 mmol) en N,N-dimetilacetamida (50 ml) y se añadió en porciones hidruro de sodio (0,684 g, 25,7 mmol) a temperatura ambiente. Se añadió gota a gota 2-bromo-1,1-dimetoxietano (3,49 ml, 29,6 mmol) en una porción y se calentó la mezcla de reacción hasta 80°C durante 18 horas. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se concentró a presión reducida produciendo el material bruto, que se repartió entre EtOAc y NH₄Cl acuoso saturado. Se lavaron las fases orgánicas combinadas con agua (3x), salmuera y se secaron (MgSO₄) y entonces se concentraron a presión reducida produciendo el material bruto. Se purificó el material bruto mediante cromatografía en columna ultrarrápida (eluyente EtOAc al 25%/hexanos) proporcionando 3,88 g (57,6%) del compuesto deseado. No se aisló el isómero N-2. Se detectó EM (APCI +) m/z 342 (M+1). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,98 (s, 1H), 7,54 (d, 1H, J = 9 Hz), 7,36 (m, 2H), 7,16 (m, 2H), 6,82 (dd, 1H, J = 4,3 Hz, J = 9,3 Hz), 4,76 (t, 1H, J = 5,3 Hz), 4,49 (d, 2H, J = 5,3 Hz), 3,41 (s, 6H).

35 Etapa G: Preparación de (2-(1-(2,2-dimetoxietil)-1H-indazol-5-iloxi)-5-fluorofenil)metanamina 68: Se añadió gota a gota 2-(1-(2,2-dimetoxietil)-1H-indazol-5-iloxi)-5-fluorobenzonitrilo (3,80 g, 11,13 mmol) en THF (100 ml) a una suspensión a 0°C con agitación de hidruro de aluminio y litio (0,6338 g, 16,70 mmol) en THF (100 ml). Se mantuvo la mezcla de reacción a 0°C hasta que se logró la adición completa del material de partida. Se calentó la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se agitó hasta que se observó el consumo completo del material de partida mediante análisis de HPLC. Se añadió gota a gota la mezcla de reacción a una disolución a temperatura ambiente con agitación de sal de Rochelle acuosa saturada. Se agitó rápidamente la mezcla de dos fases durante 30 minutos hasta que las sales de aluminio estaban en disolución. Se separaron las fases y se extrajo la fase acuosa con más EtOAc. Se secaron las fases orgánicas combinadas (MgSO₄) y se concentraron a presión reducida produciendo 3,73 g (97%) del producto bruto, que se utilizó sin purificación adicional. Se detectó EM (APCI +) m/z 346 (M+1). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,90 (s, 1H), 7,48 (d, 1H, J = 9 Hz), 6,9-7,15 (m, 5H), 4,76 (t, 1H, J = 5,3 Hz), 4,49 (d, 2H, J = 5,3 Hz), 3,88 (s, 2H), 3,36 (s, 6H).

50 Etapa H: Preparación de 1-(3-*tert*-butil-1-*p*-tolil-1H-pirazol-5-il)-3-(2-(1-(2,2-dimetoxietil)-1H-indazol-5-iloxi)-5-fluorobencil)urea 70: Se suspendieron 2-(1-(2,2-dimetoxietil)-1H-indazol-5-iloxi)-5-fluorofenil)metanamina (2,00 g, 5,791 mmol), 3-*tert*-butil-1-*p*-tolil-1H-pirazol-5-ilcarbamato de 2,2,2-tricloroetil (3,516 g, 8,686 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (3,026 ml, 17,37 mmol) en N,N-dimetilacetamida (50 ml) y se calentaron a 80°C durante la noche. Se concentró la mezcla de reacción a presión reducida y se diluyó el residuo con EtOAc y NH₄Cl acuoso saturado. Se lavaron las fases orgánicas con agua (3x), salmuera, se secaron (MgSO₄) y entonces se concentraron a presión reducida produciendo el material bruto, que se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (eluyente EtOAc al 35 - 45%/hexanos). Tras la evaporación del disolvente, se obtuvo el producto deseado como una espuma de color amarillo pálido (2,57 g, 74%). Se detectó EM (APCI +) m/z 602 (M+1): ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,88 (s, 1H), 7,43 (d, 1H, J = 9 Hz), 6,72-7,30 (m, 9H), 6,18 (s, 1H), 6,01 (a, 1H), 5,47 (t, 1H, J = 6,1 Hz), 4,76 (t, 1H, J = 5,3 Hz), 4,44 (t, 4H, J = 5,6 Hz), 3,38 (s, 6H); 2,37 (s, 3H), 1,30 (s, 9H).

60 Etapa I: Preparación de 1-(3-*tert*-butil-1-*p*-tolil-1H-pirazol-5-il)-3-(5-fluoro-2-(1-(2-oxoetil)-1H-indazol-5-iloxi)bencil) urea 71: Se disolvió 1-(3-*tert*-butil-1-*p*-tolil-1H-pirazol-5-il)-3-(2-(1-(2,2-dimetoxietil)-1H-indazol-5-iloxi)-5-fluorofenil) metil)urea (0,500 g, 0,8324 mmol) en diclorometano a temperatura ambiente y se añadió gota a gota yodotrimetilsilano (0,3554 ml, 2,497 mmol) a la disolución con agitación. Se monitorizó la mezcla de reacción mediante análisis de HPLC y cuando no se detectaba el material de partida, se diluyó la mezcla con diclorometano y se lavó con Na₂S₂O₄ acuoso al 10%, NaHCO₃ acuoso saturado, salmuera, se secó (MgSO₄) y se concentró a presión reducida produciendo 536 mg (rendimiento cuant.) del producto bruto, que se utilizó sin purificación

adicional. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,76 (s, 1H), 7,97 (s, 1H), 6,78-7,30 (m, 10H), 6,17 (s, 1H), 5,99 (a, 1H), 5,44 (q, 1H, J = 6,1 Hz), 4,46 (m, 4H), H 2,35 (s, 3H), 1,34 (s, 9H).

5 Etapa J: Preparación de 1-(3-*terc*-butil-1-*p*-tolil-1*H*-pirazol-5-il)-3-(5-fluoro-2-(1-(2-hidroxi)etil)-1*H*-indazol-5-il)fenil)metil)urea 72: Se suspendió 1-(3-*terc*-butil-1-*p*-tolil-1*H*-pirazol-5-il)-3-((5-fluoro-2-(1-(2-oxo)etil)-1*H*-indazol-5-il)fenil)metil)urea (2,179 g, 3,929 mmol) en MeOH (40 ml) y se trató con borohidruro de sodio (0,7432 g, 19,64 mmol) en porciones a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente hasta que se observó la conversión completa del material de partida en producto mediante análisis de HPLC. Se concentró la mezcla de reacción a presión reducida y entonces se diluyó con NH₄Cl acuoso saturado y se extrajo en diclorometano. Se secaron las fases orgánicas (MgSO₄) y se concentraron a presión reducida produciendo el material bruto, que se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (eluyente iPrOH al 2-6%/DCM) proporcionando 1,21 g (55%) del compuesto deseado. Se detectó EM (APCI +) m/z 557 (M+1). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,29 (s, 1H), 7,97 (s, 1H), 7,68 (d, 1H, J = 9,1 Hz), 7,35 (s, 1H), 6,85-7,4 (m, 8H), 6,24 (s, 1H), 4,87 (t, 1H, J = 5,4 Hz), 4,43 (t, 1H, J = 5,6 Hz), 4,28 (d, 1H, J = 5,9 Hz), 3,80 (q, 1H, J = 5,5 Hz), 2,35 (s, 3H), 1,25 (s, 9H).

15 Ejemplo 2

Preparación de dihidrogenofosfato de 2-(5-(2-((3-(3-*terc*-butil-1-*p*-tolil-1*H*-pirazol-5-il)ureido)metil)-4-fluorofenoxi)-1*H*-indazol-1-il)etilo (74): Procedimiento 1

20 La síntesis del compuesto (74) según el procedimiento 1 se muestra en el esquema 1, etapas K a L.

25 Etapa K: Preparación de 2-(5-(2-((3-(3-*terc*-butil-1-*p*-tolil-1*H*-pirazol-5-il)ureido)metil)-4-fluorofenoxi)-1*H*-indazol-5-il)etilfosfato de dibencilo 73: Se suspendieron 1-(3-*terc*-butil-1-*p*-tolil-1*H*-pirazol-5-il)-3-((5-fluoro-2-(1-(2-hidroxi)etil)-1*H*-indazol-5-il)fenil)metil)urea (0,357 g, 0,6414 mmol), diisopropilfosforamidita de difenilo (0,2970 ml, 0,9620 mmol) y 2H-tetrazol (0,07189 g, 1,026 mmol) en DMF (10 ml) y se agitaron a temperatura ambiente hasta que el análisis de CCF (DCM-Et₂O 10:1) mostró el consumo completo del material de partida. Se añadió peróxido de t-butilhidrógeno (0,4439 ml, 3,207 mmol) y entonces se monitorizó la reacción mediante análisis de HPLC. Tras la finalización de la reacción, se añadió Na₂S₂O₃ acuoso al 10% y se agitó la mezcla de reacción durante 10 minutos. Se vertió la mezcla de reacción en NaHCO₃ acuoso saturado y se extrajo en EtOAc. Se lavaron las fases orgánicas combinadas con agua (2x) y salmuera. Se secaron las fases orgánicas (MgSO₄) y se concentraron a presión reducida produciendo el material bruto, que se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (eluyente EtOAc al 30 - 40%/hexanos) proporcionando 458 mg (87%) del compuesto deseado. Se detectó EM (APCI +) m/z 817 (M+1). ¹H-RMN(400 MHz, CDCl₃) δ 7,85 (s, 1H), 6,7-7,35 (m, 10H), 6,18 (s, 1H), 6,16 (s, 1H), 4,62 (s, 1H), 5,36 (t, 1H, J = 6 Hz), 4,81 (d, 4H, J = 8,2 Hz), 4,54 (t, 2H, J = 5,1 Hz), 4,39 (m, 4H), 2,35 (s, 3H), 1,25 (s, 9H).

40 Etapa L: Preparación de dihidrogenofosfato de 2-(5-(2-((3-(3-*terc*-butil-1-*p*-tolil-1*H*-pirazol-5-il)ureido)metil)-4-fluorofenoxi)-1*H*-indazol-1-il)etilo 74: Se suspendió 2-(5-(2-((3-(3-*terc*-butil-1-*p*-tolil-1*H*-pirazol-5-il)ureido)metil)-4-fluorofenoxi)-1*H*-indazol-1-il)etilfosfato de dibencilo (1,920 g, 2,35 mmol) en EtOH (0,05 M, 50 ml) y se añadieron ciclohexa-1,4-dieno (3,56 ml, 82,14 mmol) y Pd al 10% /C (al 20%/peso, 0,384 g). Se sometió a reflujo la mezcla de reacción durante la noche. Se filtró la mezcla de reacción a través de papel GF y se lavó con MeOH. Se concentraron las fases orgánicas a presión reducida produciendo el material bruto, que se disolvió en MeOH y se hizo pasar a través de un filtro Gellman Acrodisk (0,45 um) para eliminar las trazas de contaminación con paladio. Tras la evaporación del disolvente, se trituró la goma resultante en CH₃CN y se recogieron los sólidos formados mediante filtración y se secaron a alto vacío durante 3 horas proporcionando 1,21 g (89%) del compuesto deseado. Se detectó EM (APCI +) m/z 637 (M+1). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,30 (s, 1H); 8,00 (s, 1H), 7,71 (d, 1H, J = 9 Hz), 6,88-7,37 (m, 10H), 6,24 (s, 1H), 4,61 (a, 1H), 4,28 (d, 2H, J = 5,7 Hz), 4,19 (dd, 2H, J = 5,2 Hz), 2,35 (s, 3H), 1,25 (s, 9H).

50 Ejemplo 3

Preparación de 1-(3-*terc*-butil-1-*p*-tolil-1*H*-pirazol-5-il)-3-((5-fluoro-2-(1-(2-hidroxi)etil)-1*H*-indazol-5-il)fenil)metil)urea (72): Procedimiento 2

55 Se muestra un procedimiento alternativo para la síntesis del compuesto (72), según el procedimiento 2, en el esquema 2, etapas A a F.

60 Etapa A: Preparación de 2-(4-amino-3-metilfenoxi)-5-fluorobenzonitrilo 65: En un matraz de 4 bocas, de 3 l, que se había evacuado y cargado de nuevo con argón, se disolvieron 2,5-difluorobenzonitrilo (295,3 ml, 812,0 mmol) y 4-amino-3-metilfenol (100,0 g, 812,0 mmol) en DMSO seco (2,75 M) con agitación rápida a temperatura ambiente. Se evacuó la disolución/se cargó de nuevo con argón (3x). Se añadió carbonato de potasio (185,2 g, 1340 mmol) (malla de -325). Se evacuó la mezcla de reacción/se cargó de nuevo con argón (3x) y se calentó hasta 80°C (sonda interna) durante 16 horas. La CCF indicó conversión completa. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se vertió lentamente en 2 l de agua helada con agitación rápida. Se llevó el residuo en el matraz de fondo redondo a agua repetidamente y se vertió en el agua helada hasta que se logró un volumen total de 3 l y todos los sólidos estaban en el agua helada. Se agitó rápidamente la suspensión durante 2 horas cuando alcanzó la

temperatura ambiente. Se recogieron los sólidos de color marrón mediante filtración, se lavaron con agua (3 l), se secaron al aire, se secaron con dique de látex, y se secaron a alto vacío a 40°C durante 44 horas proporcionando 194 g (99%) del producto deseado como un sólido de color tostado. Se detectó EM (APCI +) m/z 243 (M+1). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,38 (m, 1H), 7,18 (m, 1H), 6,65-6,85 (m, 5H), 3,60 (a, 2H), 2,17 (s, 3H).

5 Etapa B: Preparación de 2-(1H-indazol-5-iloxi)-5-fluorobenzonitrilo 66: En un matraz de una boca de 500 ml que contenía una barra de agitación magnética grande, se llevó 2-(4-amino-3-metilfenoxi)-5-fluorobenzonitrilo (274,5 ml, 219,6 mmol) a cloroformo (0,8 M) y se trató con acetato de potasio (25,86 g, 263,5 mmol) a temperatura ambiente. Se enfrió la mezcla de reacción hasta 0°C y se trató con anhídrido acético (62,28 ml, 658,8 mmol) a través de un embudo de adición a lo largo de 5 minutos. Se conectó reacción a un condensador de reflujo, se trató con 100 ml adicionales de cloroformo y se calentó hasta 40°C. Se añadió gota a gota nitrito de isoamilo (58,74 ml, 439,2 mmol) a través de un embudo de adición. Se enjuagó el embudo de adición con 60 ml + 40 ml de cloroformo, se eliminó y se sustituyó por un tapón de vidrio. Se calentó a reflujo la reacción durante 20 horas, se enfrió hasta temperatura ambiente y se concentró a vacío proporcionando un sólido de color marrón. Tras secarse a alto vacío durante 30 minutos, se suspendió el sólido de color marrón en 1 l de agua, se agitó vigorosamente durante 15 minutos, y se filtró. Se llevó el sólido de color marrón anaranjado resultante (83 g) a 400 ml de MeOH y se trató con ácido clorhídrico 1,0 M (241,6 ml, 241,6 mmol) a temperatura ambiente. Se conectó la mezcla a un condensador de reflujo y se calentó hasta 70°C durante 20 horas. Se enfrió la reacción hasta 0°C y se añadió hidróxido de sodio 1,0 M (252,6 ml, 252,6 mmol), seguido por agua (250 ml). Se agitó la suspensión amarilla resultante en el baño de hielo durante 10 minutos y entonces se dejó sedimentar. Se filtró la suspensión, se lavó con agua (1 l), se secó al aire, se secó con dique de látex y se secó a alto vacío a 40°C durante 36 horas, proporcionando 50,7 g (91%) del producto deseado como un sólido de color tostado de flujo libre. EM (APCI +) m/z 254 (M+1) detectado. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 13,38 (a, 1H), 8,07 (s, 1H), 7,94 (dd, 1H, J = 3,1 Hz, J = 8,2 Hz), 7,64 (d, 1H, J = 9 Hz), 7,54 (m, 2H), 7,21 (dd, 1H, J = 9 Hz), 6,96 (dd, 1H, J = 4,3 Hz, J = 9,3 Hz).

25 Etapa C: Preparación de 2-(5-(2-ciano-4-fluorofenoxi)-1H-indazol-1-il)acetato de metilo 77: Se disolvió 2-(1H-indazol-5-iloxi)-5-fluorobenzonitrilo (40,7 g, 160,7 mmol) en 400 ml de DMF y se colocó la disolución en un baño de agua (temperatura ambiente). Se añadió carbonato de cesio (157,1 g, 482,2 mmol). Tras 30 minutos en un baño de agua, se añadió gota a gota 2-bromoacetato de metilo (33,47 ml, 353,6 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 4 horas. A la mezcla se le añadió agua (400 ml, ligeramente exotérmica) y se transfirió la mezcla completa a un embudo separador de 2 l (contenidos 400 ml de EtOAc). Se separaron las fases, y se extrajo la fase acuosa con EtOAc (3 X 200 ml). Se lavaron los extractos combinados con agua y salmuera y se separaron las fases. Se secó la fase orgánica sobre MgSO₄, se filtró a través de un lecho de Celite, se concentró a presión reducida y se secó a alto vacío durante 1 hora proporcionando 66,3 g de sólido de color tostado. Se disolvió el sólido en 400 ml de EtOAc caliente y se trató con carbón durante 10 minutos a reflujo. Se filtró la mezcla a través de un lecho de Celite y se concentró a presión reducida. Se eliminaron los materiales insolubles mediante filtración. Se disolvió el sólido en 300 ml de EtOAc caliente y se añadieron 300 ml de hexanos. Se enfrió la mezcla hasta temperatura ambiente. Se recogió el sólido de color marrón claro mediante filtración, 32,24 g (61,7%). Se detectó EM (APCI +) m/z 326 (M+1). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,03, 1H), 7,41 - 7,36 (m, 3H), 7,22 - 7,16 (m, 2H), 6,81 (dd, J = 4,29 Hz, 9,37 Hz, 1H), 5,19 (s, 2H), 3,79 (s, 3H).

45 Etapa D: Preparación de diclorhidrato de 2-(5-(2-(aminometil)-4-fluorofenoxi)-1H-indazol-1-il)acetato de metilo 78: Se colocó 2-(5-(2-ciano-4-fluorofenoxi)-1H-indazol-1-il)acetato de metilo (10,00 g, 30,74 mmol) en un recipiente de hidrogenación Parr de 2500 ml. Se añadieron metanol (0,1 M, 310 ml) y HCl concentrado (25,62 ml, 307,4 mmol). Se añadió Pd al 10%/C (2,0 g, tipo Degussa) y se purgó el recipiente con gas hidrógeno (tres veces, no se realizó evacuación a vacío). Se cargó el recipiente con gas hidrógeno a 40 psi y se dejó sobre el agitador durante 18 horas. A la mezcla se le añadieron 1,0 g adicionales de Pd al 10%/C y se colocó de nuevo la mezcla en el hidrogenador Parr durante 18 horas adicionales. Se filtró la mezcla a través de un lecho de Celite y se concentró a presión reducida (temperatura del baño mantenida por debajo de 20°C). Se formó el residuo azeotrópico con MeOH (3X100 ml). Se elevó la temperatura del baño hasta 40°C tras la formación de la tercera mezcla azeotrópica. Se secó el residuo (aceite) a alto vacío durante 2 horas proporcionando el producto deseado como un sólido de color amarillo (11,6 g, 93,8%). Se detectó EM (APCI +) m/z 330 (M+1). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,08 (s, 1H), 6,84-7,76 (m, 6H), 5,43 (s, 2H), 4,8 (a, 2H), 4,105 (q, 2H, J = 5,6 Hz), 3,68 (s, 3H).

55 Etapa E: Preparación de 2-(5-(2-((3-(3-*terc*-butil-1-*p*-tolil-1H-pirazol-5-il)ureido)metil)-4-fluorofenoxi)-1H-indazol-1-il)acetato de metilo 79: Se trató una disolución de diclorhidrato de 2-(5-(2-(aminometil)-4-fluorofenoxi)-1H-indazol-1-il)acetato de metilo (17,5 g, 43,51 mmol) en dimetilacetamida (0,5 M, 88 ml) con 2,2,2-tricloroetil-3-*terc*-butil-1-*p*-tolil-1H-pirazol-5-ilcarbamato (17,96 g, 44,38 mmol), seguido por diisopropiletilamina (30,3 ml, 174 mmol) a temperatura ambiente. Se calentó la mezcla a 80°C durante la noche. Se concentró la mezcla a vacío y se distribuyó el residuo entre EtOAc y NH₄Cl acuoso saturado. Se separó la fase orgánica y se lavó con salmuera, se filtró a través de papel 1PS, se evaporó a vacío proporcionando una espuma de color marrón. Se trituró la espuma en éter, y se recogieron los sólidos precipitados mediante filtración proporcionando 22,55 g (89%) del compuesto deseado. Se detectó EM (APCI +) m/z 585 (M+1). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,3 (s, 1H), 8,07 (s, 1H), 7,68 (d, 1H, J = 8,9 Hz), 6,85-7,37 (m, 8H), 6,24 (s, 1H), 5,4 (S, 2H), 4,28 (d, 2H, J = 5,8 Hz), 3,68 (s, 3H), 2,35 (s, 3H), 1,25 (s, 9H).

65 Etapa F: Preparación de 1-(3-*terc*-butil-1-*p*-tolil-1H-pirazol-5-il)-3-((5-fluoro-2-(1-(2-hidroxietil)-1H-indazol-5-

iloxi)fenil)metil)urea 72: Se trató una disolución de 2-(5-(2-((3-(3-*terc*-butil-1-*p*-tolil-1*H*-pirazol-5-il)ureido)metil)-4-fluorofenoxi)-1*H*-indazol-1-il)acetato de metilo (4,6 g, 7,87 mmol) en metanol (0,1 M, 80 ml) con borohidruro de sodio (893 mg, 23,6 mmol) en porciones a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 18 horas, y se evaporó el disolvente a vacío proporcionando un residuo de color amarillo oscuro. Se distribuyó el residuo entre diclorometano y NH₄Cl acuoso saturado. Se filtró la fase orgánica a través de papel 1PS, se evaporó a vacío y se purificó en Biotage eluyendo con iPrOH/DCM al 2-10%. Se evaporaron las fracciones deseadas a vacío proporcionando una espuma blanca, 2,97 g (68%). Se detectó EM (APCI +) m/z 557 (M+1). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,29 (s, 1H), 7,97 (s, 1H), 7,68 (d, 1H, J = 9,1 Hz), 7,35 (s, 1H), 6,85-7,4 (m, 8H), 6,24 (s, 1H), 4,87 (t, 1H, J = 5,4 Hz), 4,43 (t, 1H, J = 5,6 Hz), 4,28 (d, 1H, J = 5,9 Hz), 3,80 (q, 1H, J = 5,5 Hz), 2,35 (s, 3H), 1,25 (s, 9H).

Ejemplo 4

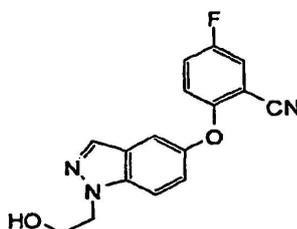
Preparación de dihidrogenofosfato de 2-(5-(2-((3-(3-*terc*-butil-1-*p*-tolil-1*H*-pirazol-5-il)ureido)metil)-4-fluorofenoxi)-1*H*-indazol-1-il)etilo (74): Procedimiento 2

Se muestra un procedimiento alternativo para la síntesis del compuesto (72), según el procedimiento 2, en el esquema 2, etapas G a H.

Etapas G: Preparación de 2-(5-(2-((3-(3-*terc*-butil-1-*p*-tolil-1*H*-pirazol-5-il)ureido)metil)-4-fluorofenoxi)-1*H*-indazol-1-il)etilfosfato de di-*terc*-butilo 80: Se trató una disolución de 1-(3-*terc*-butil-1-*p*-tolil-1*H*-pirazol-5-il)-3-((5-fluoro-2-(1-(2-hidroxietil)-1*H*-indazol-5-iloxi)fenil)metil)urea (1,5 g, 2,69 mmol) en DMF (0,2 M, 15 ml) con imidazol (183 mg, 2,69 mmol), y clorhidrato de imidazol (423 mg, 4,04 mmol) a temperatura ambiente. Tras observarse la completa disolución, se añadió diisopropilfosforamida de di-*terc*-butilo (1,28 ml, 4,04 mmol). Se prolongó la agitación a temperatura ambiente durante 18 horas. Se añadió lentamente peróxido de hidrógeno (acuoso al 50%, 0,535 ml, 9,43 mmol) a temperatura ambiente, y se prolongó la agitación durante 1 hora. Se completó la reacción tal como se detectó mediante CL y CCF. Se distribuyó el residuo entre diclorometano y Na₂S₂O₃ acuoso al 10%. Se extrajo la fase acuosa d con EtOAc (2x). Se lavaron los extractos orgánicos combinados con salmuera, se filtraron a través de papel 1PS, se evaporaron a vacío proporcionando un aceite amarillo. Se purificó el aceite mediante un tapón de gel de sílice eluyendo con DCM, MeOH al 3-5%/DCM. Se evaporaron las fracciones deseadas a vacío proporcionando el producto deseado como una espuma de color blanco, 1,59 g (79%). Se detectó EM (APCI +) m/z 749 (M+). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,29 (s, 1H), 8,01 (s, 1H), 7,73 (d, 1H, J = 9,1 Hz), 6,79-7,35 (m, 8H), 6,23 (s, 1H), 4,62 (t, 2H, J = 4,7 Hz), 4,26 (m, 4H), 2,35 (s, 3H), 1,43 (s, 9H), 1,25 (s, 18H).

Etapas H: Preparación de dihidrogenofosfato de 2-(5-(2-((3-(3-*terc*-butil-1-*p*-tolil-1*H*-pirazol-5-il)ureido)metil)-4-fluorofenoxi)-1*H*-indazol-1-il)etilo 74: Se trató una disolución de 2-(5-(2-((3-(3-*terc*-butil-1-*p*-tolil-1*H*-pirazol-5-il)ureido)metil)-4-fluorofenoxi)-1*H*-indazol-1-il)etilfosfato de di-*terc*-butilo (3,66 g, 4,89 mmol) en EtOH (0,2 M, 24 ml) con HCl 5 N iPrOH (2,93 ml, 14,7 mmol) a temperatura ambiente. Se continuó la agitación a temperatura ambiente durante la noche. Se evaporó el disolvente a vacío, y se evaporó conjuntamente el residuo del tolueno y el éter (2x). Se llevó la espuma beis en MeOH y se vertió lentamente en un vaso de precipitados que contenía agua. Se recogieron los sólidos precipitados mediante filtración proporcionando 2,83 g (91%) del producto deseado. Se detectó EM (APCI +) m/z 637 (M+1). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,30 (s, 1H), 8,00 (s, 1H), 7,71 (d, 1H, J = 9 Hz), 6,88-7,37 (m, 10H), 6,24 (s, 1H), 4,61 (a, 1H), 4,28 (d, 2H, J = 5,7 Hz), 4,19 (dd, 2H, J = 5,2Hz), 2,35 (s,3H), 1,25 (s, 9H).

Ejemplo 5



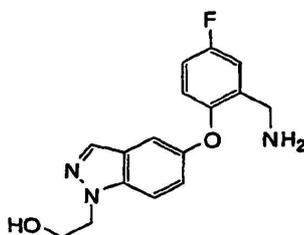
5-Fluoro-2-(1-(2-hidroxietil)-1*H*-indazol-5-iloxi)benzonitrilo (78A)

A una disolución de 2-(5-(2-ciano-4-fluorofenoxi)-1*H*-indazol-1-il)acetato de metilo 77 (preparado como en el ejemplo 3) (60,0 g, 184,4 mmol) en MeOH (370 ml) se le añadió NaBH₄ (24,42 g) en cinco porciones de 5 gramos a lo largo de 90 minutos. La temperatura aumentó desde 25°C hasta 44,7°C en la adición final de NaBH₄. Se concentró la mezcla a vacío. Al concentrado se le añadió NH₄Cl saturado (600 ml) y EtOAc (600 ml) y se agitó vigorosamente la mezcla durante 1 hora. Se separaron las fases y se extrajo la fase acuosa con EtOAc (2 X 100 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con NH₄Cl saturado (2 X 100 ml), agua (200 ml), salmuera (500 ml), se secaron sobre MgSO₄, se filtraron a través de papel GF/F y se concentró proporcionando un sólido de color naranja brillante. Se disolvió el sólido bruto en CH₂Cl₂ (1 l) y se añadieron hexanos (2,25 l) con agitación. Se formó un sólido de color marrón claro y tras agitar durante 30 min. se recogió el sólido y se secó a alto vacío produciendo 45,5 g. Se

concentró el filtrado a presión reducida. Se redisolvió este material en CH₂Cl₂ (100 ml) y se añadieron hexanos (200 ml). Se recogió el sólido resultante (6,2 g) a través de filtración. Se combinaron las dos cosechas proporcionando 51,7 g (94,3%) de 78A. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,99 (s, 1H), 7,49 (d, 1H), 7,39 - 7,36 (m, 2H), 7,21 - 7,16 (m, 2H), 6,90 (dd, 1H), 4,49 (t, 2H), 4,17 - 4,13 (m, 2H), 2,81 (t, 1H).

5

Ejemplo 6

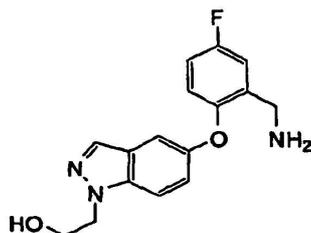


10 2-(5-(2-(Aminometil)-4-fluorofenoxi)-1H-indazol-1-il)etanol (79A) (Procedimiento A)

A un agitador Parr de 250 ml se le añadió 5-fluoro-2-(1-(2-hidroxietil)-1H-indazol-5-iloxi)benzotrilo 78A (preparado como en el ejemplo 5) (80,0 g, 269,1 mmol), Pd(OH)₂ (32 g, carga del 40%), EtOH (5 l) y HCl concentrado (224 ml, 2691 mmol). Se selló el recipiente, se purgó con hidrógeno, se ventiló y se cargó con hidrógeno hasta 180 PSI. Se disminuyó la temperatura interna hasta 18°C y tras agitar durante 23 horas se consideró que la reacción era completa mediante HPLC. Se retiró la mezcla de reacción anterior y se repitió dos veces la secuencia completa con 80 g de material de partida, y entonces con 53,2 g de material de partida. Se filtraron las mezclas de reacción combinadas (4 reacciones) a través de GF/F y se concentró el filtrado a presión reducida. Se disolvió el residuo en HCl 1 N (3,0 l) y se lavó con EtOAc (3 X 2 l). A la fase acuosa se le añadió EtOAc (2 l) y se agitaron vigorosamente las fases durante 10 minutos y entonces se eliminó la fase orgánica. Se repitió esta etapa 2 veces más y se transfirió la fase acuosa a un matraz enfriado (baño de hielo). A la mezcla acuosa ácida se le añadieron gránulos de NaOH (40 g x 11) de una manera tal que la temperatura no aumentó por encima de 35°C. Una vez que el pH era ~14, se transfirió la mezcla a un embudo separador y se extrajo con CH₂Cl₂ (4 X 1 l). Se lavaron los extractos combinados con agua (2 X 1 l) y salmuera (2 X 1 l). Se secó el extracto sobre MgSO₄ (~250 g), se filtró a través de GF/F y se concentró a presión reducida. Se disolvió el concentrado en CH₂Cl₂ (3,5 l) y se añadieron hexanos (4 l). Tras añadir los primeros 2 l de hexanos, se formó un sólido de color marrón. Tras agitar durante 1 hora, se recogió el sólido a través de filtración y se lavó la torta con CH₂Cl₂/hexanos 1:2 (500 ml). Se secó la torta a vacío produciendo 165,1 g (55,6%) de 79A. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,90 (s, 1H), 7,42 (d, 1H), 7,17-7,12 (m, 3H), 6,87 (td, 1H), 6,80 (dd, 1H), 4,46 (t, 2H), 4,12 (t, 2H), 3,86 s (2H), 1,87 (s a, 1H).

30

Ejemplo 7

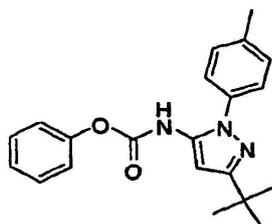


35 2-(5-(2-(Aminometil)-4-fluorofenoxi)-1H-indazol-1-il)etanol (79A)

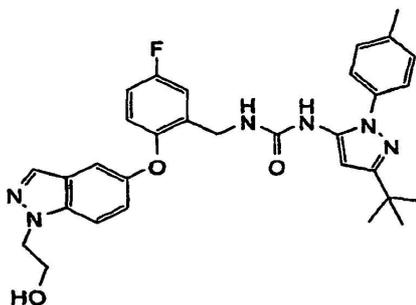
(Procedimiento B)

A una disolución de (5-fluoro-2-(1-(2-hidroxietil)-1H-indazol-5-iloxi)benzotrilo (1,0 g, 3,36 mmol) y NiCl₂·6H₂O (148 mg, 0,336 mmol) en MeOH (30 ml) se le añadió NaBH₄ (636 mg, 16,8 mmol) en porciones (2-3), y se agitó la reacción durante 3 horas. Se añadió lentamente una disolución de Na₂CO₃ saturado (15 ml) y se agitó la mezcla durante 75 minutos, durante los cuales se formó un sólido fino. Se filtró la mezcla de reacción a través de GF/F y se lavó la torta con MeOH (20 ml). Se concentró el filtrado hasta aproximadamente 15 ml a vacío, se añadió acetato de isopropilo (20 ml) y se concentró la mezcla. Al concentrado se le añadió acetato de isopropilo (20 ml) y se agitó la mezcla durante 5 minutos. Se separaron las fases, y se lavó la fase orgánica con salmuera al 10% (20 ml). Se añadió ácido cítrico (0,1 M, 20 ml) y se mezclaron vigorosamente las fases. Se eliminó la fase orgánica y se lavó la fase acuosa con acetato de isopropilo (20 ml) y EtOAc (20 ml). A la fase acuosa se le añadió acetato de isopropilo (20 ml) y se añadió NaOH al 50% (1 ml). Se mezclaron vigorosamente las fases y se eliminó la fase acuosa. Se lavó la fase orgánica con salmuera al 10% (20 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró hasta 850 mg (85%).

45

Ejemplo 83-*tert*-Butil-1-*p*-tolil-1*H*-pirazol-5-ilcarbamato de fenilo

5 A una disolución de 3-*tert*-butil-1-*p*-tolil-1*H*-pirazol-5-amina (102,9 g, 448,9 mmol) en EtOAc (1 l) a 10,9°C se le añadió una disolución de NaOH (2,5 M, 269 ml), y se calentó la mezcla de reacción bifásica hasta 15,9 y entonces se estabilizó. Se añadió cloroformiato de fenilo (98,4 g, 156,5 mmol) en una porción y la temperatura aumentó hasta 25,5 y entonces se estabilizó. Se retiró el baño de hielo y se monitorizó la reacción mediante HPLC. Tras 1 hora, se añadieron 25 ml adicionales de NaOH 2,5 M. Se agitó la mezcla de reacción durante la noche, y entonces se diluyó con EtOAc (200 ml). Se lavó la fase orgánica con salmuera (1 l), se secó sobre Na₂SO₄ (200 g) y se concentró hasta aproximadamente de 400 a 500 ml de EtOAc. Se calentó la disolución concentrada hasta 60°C. Tras haberse disuelto los sólidos, se añadió lentamente heptano (2 l), durante lo cual se formaron sólidos. Tras la agitación durante 30 minutos, se recogió el sólido a través de filtración y se lavó la torta con 400-500 ml de heptano. Se secó la torta en un horno de vacío a temperatura ambiente produciendo 156,9 g (95,0%) del compuesto del título. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,39 - 7,31 (m, 6H), 7,26-7,225 (m, 2H), 7,13 (s a, 2H), 6,96 (s a, 1H), 6,47 (s a, 1H), 2,42 (s, 3H), 1,34 (s, 9H).

Ejemplo 91-(3-*tert*-Butil-1-*p*-tolil-1*H*-pirazol-5-il)-3-(5-fluoro-2-(1-(2-hidroxietyl)-1*H*-indazol-5-iloxi)encil)urea (72):

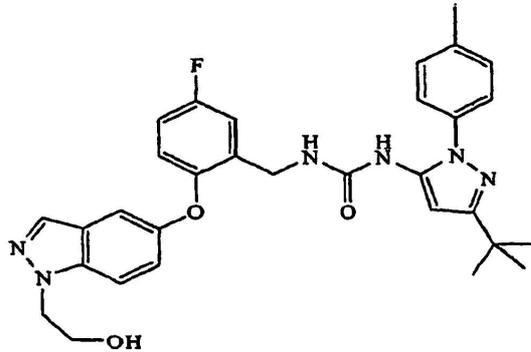
25 A una disolución a 4,1°C de 2-(5-(2-(aminometil)-4-fluorofenoxi)-1*H*-indazol-1-il)etanol (71,55 g, 237 mmol) en DMA (350 ml) se le añadió una disolución en DMA (350 ml) de 3-*tert*-butil-1-*p*-tolil-1*H*-pirazol-5-ilcarbamato de fenilo (80,5 g, 230 mmol). La temperatura aumentó hasta 18,4°C y se estabilizó. Se retiró el baño de hielo y se agitó la reacción durante 2 horas. Se añadió una porción adicional de 2-(5-(2-(aminometil)-4-fluorofenoxi)-1*H*-indazol-1-il)etanol y se agitó la reacción durante 2 horas. Se repartió la mezcla de reacción entre acetato de isopropilo (1,6 l) y agua (2,4 l). Se eliminó la fase acuosa y se lavó la fase orgánica con NaOH 0,5 N (2 X 2,4 l) y luego salmuera saturada (1 X 2,4 l). Se secó la fase orgánica sobre Na₂SO₄ (300 g) y se concentró produciendo 110,8 g (86,6%).

35 La descripción anterior se considera sólo como ilustrativa de los principios de la invención. Además, puesto que numerosas modificaciones y cambios resultarán fácilmente evidentes para los expertos en la materia, no se desea limitar la invención a la construcción y el procedimiento exactos mostrados tal como se describió anteriormente.

40 Las palabras "comprender," "que comprende," "incluir," "que incluye" e "incluye" cuando se utilizan en esta memoria descriptiva y en las siguientes reivindicaciones, pretenden especificar la presencia de características, números enteros, componentes o etapas establecidos, pero no excluyen la presencia o adición de una o más otras características, números enteros, componentes, etapas o grupos de los mismos.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que presenta la fórmula I:

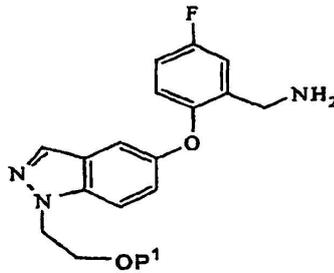


I

5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

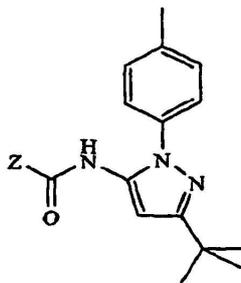
2. Procedimiento para la preparación de un compuesto según la reivindicación 1, que comprende:

(a) acoplar un compuesto de fórmula II



II

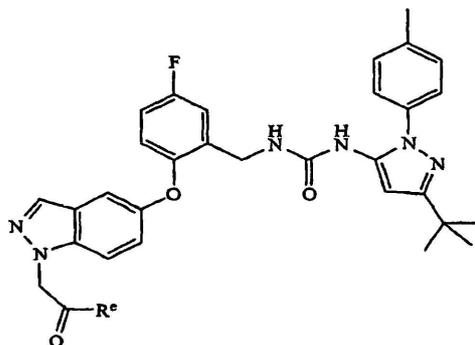
10 o una sal del mismo, en el que P¹ representa un átomo de hidrógeno o un grupo protector de hidroxilo, con un compuesto de fórmula III



III

en el que Z representa un grupo saliente, o el isocianato correspondiente; o

15 (b) reducir un compuesto de fórmula IV



IV

en el que R⁹ representa un átomo de hidrógeno o un residuo de un alcohol;

seguido por la eliminación de cualquier grupo protector y, si se desea, la formación de una sal farmacéuticamente aceptable.

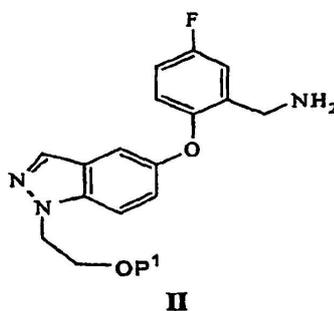
5 3. Composición farmacéutica, que comprende un compuesto según la reivindicación 1 y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

10 4. Compuesto según reivindicación 1, para su utilización como medicamento.

5. Utilización de un compuesto según la reivindicación 1, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección mediada por cinasas en un mamífero.

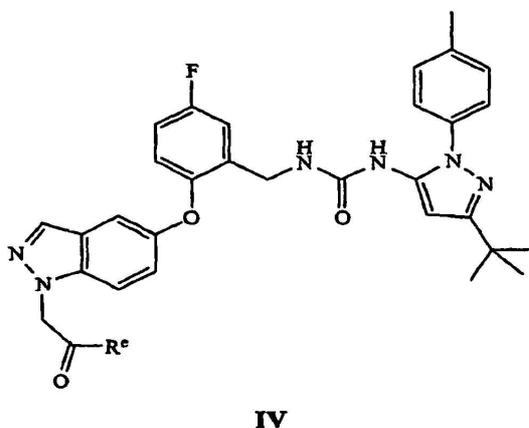
15 6. Utilización según la reivindicación 5, en la que dicha afección mediada por cinasas es enfermedad inflamatoria, enfermedad autoinmunitaria, trastorno óseo destructivo, trastorno proliferativo, enfermedad infecciosa, enfermedad viral o enfermedad neurodegenerativa.

7. Compuesto de fórmula II



20 o una sal del mismo, en el que P¹ representa un átomo de hidrógeno o un grupo protector de hidroxilo.

8. Compuesto de fórmula IV



en el que R⁹ representa un átomo de hidrógeno o un residuo de un alcohol.

25 9. Utilización de un profármaco de un compuesto según la reivindicación 1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento con un compuesto según la reivindicación 1 de una afección mediada por cinasas en un mamífero, en la que el profármaco es dihidrogenofosfato de 2-(5-(2-((3-(3-*tert*-butil-1-*p*-tolil-1*H*-pirazol-5-il)ureido)metil)-4-fluorofenoxi)-1*H*-indazol-1-il)etilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 10. Utilización según la reivindicación 9, en la que dicha afección mediada por cinasas es enfermedad inflamatoria, enfermedad autoinmunitaria, trastorno óseo destructivo, trastorno proliferativo, enfermedad infecciosa, enfermedad viral o enfermedad neurodegenerativa.

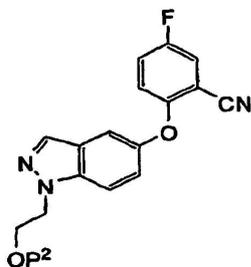
35 11. Dihidrogenofosfato de 2-(5-(2-((3-(3-*tert*-butil-1-*p*-tolil-1*H*-pirazol-5-il)ureido)metil)-4-fluorofenoxi)-1*H*-indazol-1-il)etilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

40 12. Composición farmacéutica, que comprende un compuesto según la reivindicación 11 y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

13. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que Z es un grupo ariloxilo opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de entre F, Cl, Br y NO₂.

5 14. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicho compuesto de fórmula (II) se ha preparado mediante el procedimiento que comprende:

(i) reducir un compuesto de fórmula (V)



(V)

10 en el que P² representa hidrógeno o un grupo protector de hidroxilo, en condiciones de hidrogenación catalítica o en presencia de boruro de níquel.