

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 403 546**

51 Int. Cl.:

C07D 487/00 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

C07D 487/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2007 E 07867362 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2013 EP 2089391**

54 Título: **Sonda de actividad de la tirosina-cinasa de Bruton y procedimiento de utilización**

30 Prioridad:

03.11.2006 US 864350 P

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

20.05.2013

73 Titular/es:

**PHARMACYCLICS, INC. (100.0%)
995 E. ARQUES AVENUE
SUNNYVALE, CA 94085, US**

72 Inventor/es:

**PAN, ZHENGYING;
LI, SHYR, JIANN;
SCHEREENS, HELEEN;
HONIGBERG, LEE y
VERNER, ERIK**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 403 546 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sonda de actividad de la tirosina-cinasa de Bruton y procedimiento de utilización.

5 **Campo de la invención**

En la presente memoria se describen sondas para la tirosina-cinasa de Bruton (Btk) y la utilización de dichas sondas para medir la actividad de la Btk, para evaluar la actividad de los moduladores de la Btk y para evaluar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de dichos moduladores.

10

Antecedentes

La tirosina-cinasa de Bruton (Btk), un miembro de la familia Tec de las tirosina-cinasas no receptoras, tiene un papel esencial en la vía de señalización de los linfocitos B que enlaza la estimulación del receptor de superficie de los linfocitos B (BCR) con las respuestas intracelulares posteriores. Resulta necesaria para el desarrollo y el funcionamiento normales de los linfocitos B en humanos y ratones, tal como ponen de manifiesto las mutaciones en el gen de la Btk que dan lugar al fenotipo de agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (XLA) en humanos y a un fenotipo de inmunodeficiencia ligada al cromosoma X (xid) en ratones. Véase, por ejemplo, D. A. Fruman y otros, (2000), *Immunity* 13:1-3. La Btk se expresa en todos los tipos de células hematopoyéticas, excepto en los linfocitos T y en los linfocitos citolíticos naturales, y participa en una serie de vías de señalización de receptores TLR y de citocinas, incluida la producción de TNF- α inducida por lipopolisacáridos (LPS) en los macrófagos, lo que sugiere la existencia de una función general de la Btk en la regulación inmunitaria.

La Btk contiene un dominio de homología a plectrina (PH) aminoterminal seguido por un dominio de homología a Tec (TH), dominios reguladores de homología a Src (SH3, SH2) y un dominio de cinasa carboxiterminal (SH1). En los linfocitos B no estimulados, la Btk se localiza en el citoplasma, donde es catalíticamente inactiva, presumiblemente debido a una conformación terciaria derivada de las interacciones intramoleculares entre el dominio de cinasa y los dominios SH2 y/o SH3, que bloquean el acceso de los sustratos al sitio activo. Tras la estimulación del BCR, la Btk se recluta en la membrana celular a través de interacciones entre el dominio PH aminoterminal y los fosfoinosítidos de la membrana celular. A continuación, la Btk asociada a la membrana es fosforilada en la Tyr 551 en el bucle de activación por parte de las cinasas de la familia Src. La posterior autofosforilación en Tyr 223 de la Btk estabiliza la conformación activa y activa completamente la actividad de la cinasa Btk. La Btk activada fosforila la fosfolipasa (PLC γ), dando inicio a la movilización del calcio y generando diacilglicerol (DAG) como señales secundarias, lo que finalmente conduce a la activación transcripcional y la amplificación de la estimulación del BCR.

El documento WO 2006/053121 da a conocer imidazo[1,2-a]pirazin-8-ilaminas y compuestos relacionados, composiciones que comprenden dichos compuestos y procedimientos de utilización de las mismas. El documento WO 2006/0529131 da a conocer pirazolo[1,5-a]pirimidinas útiles como inhibidores de proteína-cinasas. El documento WO 2007/041712 da a conocer una clase de compuestos aminosustituídos de pirazolo[1,5-a]pirimidina como inhibidores de cinasas de proteínas y/o puntos de regulación. El documento WO 03/081210 describe la identificación de inhibidores de las proteína-cinasas que se unen preferentemente a la conformación inactiva de una proteína-cinasa diana. El documento WO 2008/039218 se refiere a compuestos que forman enlaces covalentes con la tirosina-cinasa de Bruton. En Nam N-H y otros, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, pergamon, GB, vol. 12, n $^{\circ}$. 22, 15 de noviembre de 2004, páginas 5.753-5.766, se describen conjugados ATP-fosfopéptido como inhibidores de las tirosina-cinasas de tipo Src.

Características de la invención

La presente invención se refiere a sondas de actividad de la tirosina-cinasa de Bruton (Btk) tal como se definen en las reivindicaciones. Además, se describen sondas de actividad de la Btk tal como se definen en las reivindicaciones, que incluyen un inhibidor irreversible de la Btk, un resto conector y un resto indicador. Además, se describen sondas de actividad de la Btk tal como se definen en las reivindicaciones, que incluyen un resto aceptor de adición de Michael en la estructura de la sonda de actividad. Además, se describen sondas de actividad de la Btk tal como se definen en las reivindicaciones, que forman un enlace covalente con un residuo de cisteína de la Btk. Además, en la presente memoria se describen sondas de actividad que forman un enlace no covalente con un residuo de cisteína de la Btk. Además, en la presente memoria se describen sondas de actividad de otras tirosina-cinasas, en las que las otras tirosina-cinasas presentan homología con la Btk, o son sustancialmente idénticas a la misma, por tener un residuo de cisteína (incluido un residuo Cys 481) que forma un enlace covalente o no covalente con la sonda de actividad. También se describen en la presente memoria procedimientos para la síntesis de dichas sondas de actividad, procedimientos para la utilización de dichas sondas de actividad en el estudio de la actividad de la Btk y otras tirosina-cinasas que presentan un residuo Cys 481, procedimientos para la utilización de dichas sondas de actividad en el estudio de inhibidores de la Btk y otras tirosina-cinasas que presentan un residuo Cys 481, y procedimientos para la utilización de dichas sondas de actividad en el estudio de las propiedades farmacodinámicas de inhibidores de la Btk y otras tirosina-cinasas que presentan un residuo Cys 481.

65

En un aspecto, la presente invención da a conocer una sonda de actividad de la Btk que comprende un resto inhibidor de la Btk, tal como se define en las reivindicaciones, un resto indicador y un resto conector que une el resto inhibidor al resto indicador.

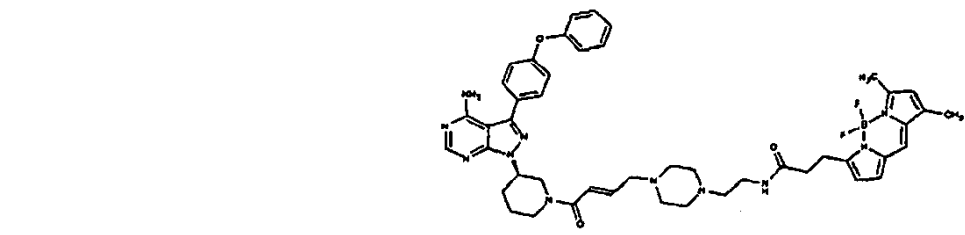
5 Una forma de realización consiste en una sonda de actividad de la Btk en la que el resto conector enlaza covalentemente el resto inhibidor al resto indicador. Otro ejemplo consiste en una sonda de actividad de la Btk en la que el resto inhibidor de la Btk modifica un residuo de cisteína de una enzima Btk. Otra forma de realización consiste en una sonda de actividad de la Btk en la que el resto inhibidor de la Btk modifica covalentemente el residuo de cisteína de la enzima Btk. Aún otra forma de realización consiste en una sonda de actividad de la Btk en la que el residuo de cisteína se encuentra en el bolsillo de unión a ATP de la enzima Btk. Aún otra forma de realización consiste en una sonda de actividad de la Btk en la que el residuo de cisteína es la Cys 481 de la enzima Btk. Una forma de realización consiste en una sonda de actividad de la Btk en la que el resto conector se selecciona entre un enlace, un resto alquilo opcionalmente sustituido, un resto heterociclo opcionalmente sustituido, un resto amida opcionalmente sustituido, un resto cetona, un resto carbamato opcionalmente sustituido, un resto éster o una combinación de los mismos. Otra forma de realización consiste en una sonda de actividad de la Btk en la que el resto conector comprende un resto heterociclo opcionalmente sustituido. Otra forma de realización consiste en una sonda de actividad de la Btk en la que el resto heterociclo opcionalmente sustituido comprende un resto basado en piperazínilo.

20 También se describe en la presente memoria una sonda de actividad de la Btk en la que el resto indicador se selecciona entre el grupo formado por un marcador, un colorante, un fotorreticulador, un compuesto citotóxico, un fármaco, un marcador de afinidad, un marcador de fotoafinidad, un compuesto reactivo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un biomaterial, una nanopartícula, un marcador de espín, un fluoróforo, un resto que contiene un metal, un resto radiactivo, un nuevo grupo funcional, un grupo que interactúa de forma covalente o no covalente con otras moléculas, un resto que contiene una jaula fotoactivable, un resto excitable por radiación actínica, un ligando, un resto fotoisomerizable, biotina, un análogo de la biotina, un resto que presenta un átomo pesado, un grupo químicamente escindible, un grupo fotoescindible, un agente con actividad redox, un resto marcado isotópicamente, una sonda biofísica, un grupo fosforescente, un grupo quimioluminiscente, un grupo con alta densidad electrónica, un grupo magnético, un grupo intercalante, un cromóforo, un agente de transferencia de energía, un agente biológicamente activo, un marcador detectable o una combinación de los mismos. En la presente forma de realización, está prevista una sonda de actividad de la Btk en la que el resto indicador es un fluoróforo. Aún otra forma de realización consiste en una sonda de actividad de la Btk en la que el fluoróforo es un fluoróforo Bodipy. Aún otra forma de realización consiste en una sonda de actividad de la Btk en la que el fluoróforo Bodipy es un fluoróforo Bodipy FL.

35 En la presente memoria se da a conocer una sonda de actividad de la Btk en la que el resto inhibidor se deriva de un inhibidor irreversible de la Btk. En la presente forma de realización, está prevista una sonda de actividad de la Btk en la que el inhibidor irreversible de la Btk es:



Otra forma de realización consiste en una sonda de actividad de la Btk que presenta la siguiente estructura:



Otra forma de realización consiste en una sonda de actividad de la Btk en la que la sonda marca selectivamente una conformación fosforilada de la Btk. Otra forma de realización consiste en una sonda de actividad de la Btk en la que la conformación fosforilada de la Btk es una forma o bien activa o bien inactiva de la Btk. Otra forma de realización

consiste en una sonda de actividad de la Btk en la que la conformación fosforilada de la Btk es una forma activa de la Btk. Una forma de realización consiste en una sonda de actividad de la Btk en la que la sonda puede atravesar las células.

5 Un aspecto de la presente invención consiste en una sonda de actividad de la Btk tal como se define en las reivindicaciones para su utilización en la evaluación de la eficacia de un inhibidor potencial de la Btk en un mamífero, que comprende la administración de un inhibidor potencial de la Btk al mamífero, la administración de la sonda de actividad de la Btk que se describe en la presente memoria al mamífero o a células aisladas del mismo; la medición de la actividad del resto indicador de la sonda de actividad de la Btk y la comparación de la actividad del resto
10 indicador con un patrón.

Otro aspecto consiste en una sonda de actividad de la Btk tal como se define en las reivindicaciones para su utilización en la evaluación de las propiedades farmacodinámicas de un inhibidor de la Btk en un mamífero, que comprende la administración de un inhibidor de la Btk al mamífero, la administración de la sonda de actividad de la Btk descrita en la presente memoria al mamífero o a células aisladas del mismo, y la medición de la actividad del resto indicador de la sonda de actividad de la Btk en diferentes instantes tras la administración del inhibidor.
15

Otro aspecto consiste en un procedimiento para la marcación *in vitro* de una enzima Btk que comprende poner en contacto una enzima Btk activa con la sonda de actividad de la Btk que se describe en la presente memoria y tal como se define en las reivindicaciones. Una forma de realización consiste en un procedimiento para la marcación *in vitro* de una enzima Btk en el que la etapa de puesta en contacto comprende la incubación de la enzima Btk activa con la sonda de actividad de la Btk que se describe en la presente memoria y tal como se define en las reivindicaciones.
20

Otro aspecto consiste en un procedimiento para la marcación *in vitro* de una enzima Btk que comprende poner en contacto células o tejidos que expresan la enzima Btk con una sonda de actividad de la Btk tal como se describe en la presente memoria y tal como se define en las reivindicaciones.
25

Un aspecto consiste en un procedimiento para detectar una enzima Btk marcada que comprende la separación por electroforesis de proteínas, comprendiendo dichas proteínas una enzima Btk marcada por una sonda de actividad de la Btk, tal como se describe en la presente memoria y tal como se define en las reivindicaciones, y la detección de la sonda de actividad de la Btk por fluorescencia.
30

Debe entenderse que los procedimientos y composiciones descritos en la presente memoria no se limitan a la metodología, los protocolos, las líneas celulares, los constructos y los reactivos concretos descritos en la presente memoria, y que pueden variar en algunas formas de realización. Debe entenderse también que la terminología utilizada en la presente memoria tiene por objeto de describir únicamente formas de realización concretas, y que no pretende limitar el alcance de los procedimientos y composiciones descritos en la presente memoria, que resultan limitados exclusivamente por las reivindicaciones adjuntas.
35

Tal como se utiliza en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, y “el”, “la”, incluyen la referencia al plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.
40

Algunas definiciones

45 El término “alquilo”, solo o como parte de otra molécula, se refiere, a menos que se indique lo contrario, a una cadena lineal o ramificada, o a un radical hidrocarburo cíclico, o a una combinación de los mismos. En algunas formas de realización, la cadena alquílica está completamente saturada, monoinsaturada o poliinsaturada. En otras formas de realización, la cadena alquílica incluye radicales divalentes y multivalentes, y se indica el número de átomos de carbono (es decir, C₁-C₁₀ significa de uno a diez átomos de carbono). En otras formas de realización, entre los ejemplos de radicales hidrocarburos saturados se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexil)metilo, ciclopropilmetilo, homólogos e isómeros, por ejemplo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo y similares. Un grupo alquilo insaturado es un grupo que presenta uno o más enlaces dobles o enlaces triples. En otra forma de
50 realización, entre los ejemplos de grupos alquilo insaturados se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1-propinilo y 3-propinilo, 3-butinilo y los homólogos e isómeros superiores. En otras formas de realización, a menos que se indique lo contrario, el término “alquilo” incluye los derivados alquílicos definidos con más detalle en la presente memoria, tales como “heteroalquilo”, “haloalquilo” y “homoalquilo”.
55

60 El término “sonda biofísica,” tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a sondas que detectan o controlan los cambios estructurales de las moléculas. En algunas formas de realización, entre dichas moléculas se incluyen, aunque sin limitarse a las mismas, proteínas, y la “sonda biofísica” se utiliza para detectar o controlar la interacción de las proteínas con otras macromoléculas. En otras formas de realización, entre los ejemplos de sondas biofísicas se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, marcadores de espín, fluoróforos y grupos fotoactivables.
65

El término “carbonilo”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un grupo que contiene un resto seleccionado entre el grupo formado por -C(O)-, -S(O)-, -S(O)₂- y -C(S)-, incluidos, aunque sin limitarse a los mismos, grupos que contienen por lo menos un grupo cetona y/o por lo menos un grupo aldehído, y/o por lo menos un grupo éster, y/o por lo menos un grupo ácido carboxílico, y/o por lo menos un grupo tioéster. Entre dichos grupos carbonilo se incluyen cetonas, aldehídos, ácidos carboxílicos, ésteres y tioésteres. En algunas formas de realización, estos grupos forman parte de moléculas lineales, ramificadas o cíclicas.

El término “grupo quimioluminiscente”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un grupo que emite luz como consecuencia de una reacción química sin adición de calor. Únicamente a título de ejemplo, el luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazindiona) reacciona con oxidantes tales como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en presencia de una base y un catalizador metálico, y produce un producto de estado excitado (3-aminofalato, 3-APA).

El término “cromóforo”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una molécula que absorbe luz de longitudes de onda visibles, UV o IR.

El término “Cys 481”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la cisteína presente en las cinasas de la figura 2(a) en la posición correspondiente a la Cys 481 de la Btk (es decir, el “C” destacado en negrita).

En otras formas de realización, el término “marcador detectable”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un marcador que se puede observar mediante técnicas analíticas, entre las que se incluyen, aunque sin limitarse a las mismas, fluorescencia, quimioluminiscencia, resonancia de espín electrónico, espectroscopía de absorbanza ultravioleta/visible, espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear, resonancia magnética y procedimientos electroquímicos.

El término “colorante”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una sustancia colorante soluble que contiene un cromóforo.

El término “grupo con elevada densidad electrónica”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un grupo que dispersa los electrones cuando se irradia con un haz de ellos. Entre dichos grupos se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, molibdato de amonio, subnitrito de bismuto, yoduro de cadmio, 99%, carbohidrazida, cloruro férrico hexahidratado, tetramina de hexametileno, 98,5%, tricloruro de indio anhidro, nitrato de lantano, acetato de plomo trihidratado, citrato de plomo trihidratado, nitrato de plomo, ácido peryódico, ácido fosfomolibdico, ácido fosfotungstico, ferricianuro potásico, ferrocianuro potásico, rojo de rutenio, nitrato de plata, proteinato de plata (ensayo de Ag: 8,0-8,5%) “fuerte”, tetrafenilporfina de plata (S-TPPS), cloroaurato de sodio, tungstato de sodio, nitrato de talio, tiosemicarbazida (TSC), acetato de uranilo, nitrato de uranilo y sulfato de vanadilo.

En otras formas de realización, el término “agente de transferencia de energía”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una molécula que dona o acepta energía de otra molécula. Únicamente a título de ejemplo, la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) es un procedimiento de acoplamiento dipolo-dipolo mediante el cual se transfiere de forma no radiativa la energía del estado excitado de una molécula donante de fluorescencia a una molécula aceptora no excitada que a continuación emite de forma fluorescente la energía donada a una longitud de onda más elevada.

Los términos “potenciar” o “potenciación” se refieren al aumento o prolongación de la potencia o la duración de un efecto deseado. A título de ejemplo, “potenciar” el efecto de agentes terapéuticos se refiere a la capacidad de aumentar o prolongar, en potencia o duración, el efecto de dichos agentes terapéuticos durante el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección. Tal como se utiliza en la presente memoria, una “cantidad eficaz para la potenciación” se refiere a una cantidad adecuada para potenciar el efecto de un agente terapéutico en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección. Cuando se administran a un paciente, dichas cantidades eficaces para este uso dependen de la gravedad y el curso de la enfermedad, trastorno o afección, de la existencia de terapias anteriores, del estado de salud del paciente y de su respuesta a los fármacos, así como del criterio del médico responsable.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “fluoróforo” se refiere a una molécula que, tras su excitación, emite fotones y, por lo tanto, es fluorescente.

En algunas formas de realización, el término “marcador”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una sustancia que se incorpora en un compuesto y se detecta fácilmente, por lo que se detecta y/o controla su distribución física.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “enlace” se refiere a enlaces o a un resto químico formado por una reacción química entre el grupo funcional de un conector y otra molécula. En algunas formas de realización, entre dichos enlaces se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, enlaces covalentes y enlaces no covalentes, mientras que entre dichos restos químicos se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, ésteres, carbonatos, iminas, ésteres de fosfato, hidrazonas, acetales, ortoésteres, enlaces peptídicos y enlaces oligonucleotídicos. La expresión “enlaces hidrolíticamente estables” se refiere al hecho de que los enlaces son sustancialmente estables

en agua y no reaccionan con la misma a valores útiles de pH, incluidas, aunque sin limitarse a las mismas, las condiciones fisiológicas durante un periodo prolongado, quizás incluso de forma indefinida. La expresión “enlaces hidrolíticamente inestables o degradables” se refiere al hecho de que los enlaces se pueden degradar en agua o en soluciones acuosas, incluida, por ejemplo, la sangre. En otras formas de realización, la expresión “enlaces enzimáticamente inestables o degradables” se refiere al hecho de que los enlaces son degradados por una o más enzimas. Únicamente a título de ejemplo, el PEG y los polímeros similares incluyen enlaces degradables en la cadena polimérica principal o en el grupo conector entre la cadena polimérica principal y uno o más de los grupos funcionales terminales de la molécula de polímero. Entre dichos enlaces degradables se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, enlaces éster formados por la reacción de ácidos carboxílicos de PEG o ácidos carboxílicos de PEG activado con grupos alcohol en un agente biológicamente activo, en el que dichos grupos éster se hidrolizan normalmente en condiciones fisiológicas y liberan el agente biológicamente activo. Otros enlaces hidrolíticamente degradables incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, enlaces carbonato; enlaces imina resultantes de la reacción de una amina y un aldehído; enlaces éster de fosfato formados mediante la reacción de un alcohol con un grupo fosfato; enlaces hidrazona, que son el producto de la reacción entre una hidrazida y un aldehído; enlaces acetal, que son el producto de la reacción entre un aldehído y un alcohol; enlaces ortoéster, que son el producto de la reacción entre un formiato y un alcohol; enlaces peptídicos formados por un grupo amina, incluidos, aunque sin limitarse a los mismos, los de un extremo de un polímero, tal como PEG, y un grupo carboxilo de un péptido; y enlaces oligonucleotídicos formados por un grupo fosforamídita, incluidos, aunque sin limitarse a los mismos, los de un extremo de un polímero, y un grupo hidroxilo en 5' de un oligonucleótido.

La expresión “medición de la actividad del resto indicador” (o cualquier expresión parecida) se refiere a procedimientos para cuantificar (en términos absolutos, aproximados o relativos) el resto indicador en un sistema sometido a estudio. En algunas formas de realización, entre dichos procedimientos se incluyen todos los procedimientos que cuantifican un resto indicador que es un colorante; un fotorreticador; un compuesto citotóxico; un fármaco; un marcador de afinidad; un marcador de fotoafinidad; un compuesto reactivo; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un biomaterial; una nanopartícula; un marcador de espín; un fluoróforo, un resto que contiene un metal; un resto radioactivo; un nuevo grupo funcional; un grupo que interactúa covalentemente o no covalentemente con otras moléculas; un resto que contiene una jaula fotoactivable; un resto excitable por radiación actínica; un ligando; un resto fotoisomerizable; biotina; un análogo de la biotina; un resto que presenta un átomo pesado; un grupo químicamente escindible; un grupo fotoescindible; un agente con actividad redox; un resto marcado isotópicamente; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo con elevada densidad electrónica; un grupo magnético; un grupo intercalante; un cromóforo; un agente de transferencia de energía; un agente biológicamente activo; un marcador detectable; y cualquier combinación de los anteriores.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “resto que presenta un átomo pesado” se refiere a un grupo que presenta un ion de un átomo que habitualmente es más pesado que el carbono. En algunas formas de realización, entre dichos iones o átomos se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, el silicio, el tungsteno, el oro, el plomo y el uranio.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “nanopartícula” se refiere a una partícula que tiene un tamaño de partícula comprendido entre aproximadamente 500 nm y aproximadamente 1 nm.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “farmacéuticamente aceptable” se refiere a un material, incluidos, aunque sin limitarse a los mismos, una sal, un vehículo o un diluyente, que no anula la actividad biológica o las propiedades del compuesto y es relativamente inocuo. En una forma de realización, dicho material se administra a un individuo sin causarle efectos biológicos no deseados ni interactuar de un modo perjudicial con ninguno de los componentes de la composición en la que está contenido.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “marcador de fotoafinidad” se refiere a un marcador con un grupo que, tras su exposición a la luz, forma un enlace con una molécula para la que el marcador tiene afinidad. Únicamente a título de ejemplo, en algunas formas de realización, dicho enlace es covalente o no covalente.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “resto que contiene una jaula fotoactivable” se refiere a un grupo que, tras su iluminación a longitudes de onda determinadas, se enlaza de forma covalente o no covalente a otros iones o moléculas.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “resto fotoisomerizable” se refiere a un grupo que, tras su iluminación con luz, pasa de una forma isomérica a otra.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “resto radioactivo” se refiere a un grupo cuyos núcleos emiten espontáneamente radiación nuclear, tal como partículas alfa, beta o gamma; donde las partículas alfa núcleos de helio, las partículas beta son electrones y las partículas gamma son fotones de alta energía.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “marcador de espín” se refiere a moléculas que contienen un átomo o grupo de átomos que presentan un espín de electrón no apareado (es decir, un grupo paramagnético estable) que, en algunas formas de realización, se detectan por espectroscopia de resonancia de espín electrónico

y, en otras formas de realización, están unidos a otra molécula. Entre dichas moléculas marcadoras de espín se incluyen, aunque sin limitarse a las mismas, radicales nitrilo y nitroxidos, y, en algunas formas de realización, son marcadores de espín simple o marcadores de espín doble.

- 5 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “sujeto” se refiere a un animal que es objeto de tratamiento, observación o experimentación. En una forma de realización, el sujeto es un mamífero, incluido un ser humano, aunque sin limitarse al mismo.

10 En algunas formas de realización, el término “sustituyentes”, también expresado como “sustituyentes no interferentes”, se refiere a grupos que se utilizan para sustituir a otro grupo en una molécula. Entre dichos grupos se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, grupos halo, alquilo C₁-C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀, alquinilo C₂-C₁₀, alcoxi C₁-C₁₀, aralquilo C₅-C₁₂, cicloalquilo C₃-C₁₂, cicloalquenilo C₄-C₁₂, fenilo, fenilo sustituido, toluoilo, xilenilo, bifenilo, alcoxialquilo C₂-C₁₂, alcoxiarilo C₅-C₁₂, ariloxialquilo C₅-C₁₂, oxiarilo C₇-C₁₂, alquilsulfínilo C₁-C₆, alquilsulfonilo C₁-C₁₀, -(CH₂)_m-O-(alquilo C₁-C₁₀), en el que m está comprendido entre 1 y 8, arilo, arilo sustituido, alcoxi sustituido, 15 fluoroalquilo, radical heterocíclico, radical heterocíclico sustituido, nitroalquilo, -NO₂, -CN, -NRC(O)-(alquilo C₁-C₁₀), -C(O)-(alquilo C₁-C₁₀), alquiltioalquilo C₂-C₁₀, -C(O)O-(alquilo C₁-C₁₀), -OH, -SO₂, =S, -COOH, -NR₂, carbonilo, -C(O)-(alquilo C₁-C₁₀)-CF₃, -C(O)-CF₃, -C(O)NR₂, -(arilo C₁-C₁₀)-S-(arilo C₆-C₁₀), -C(O)-(arilo C₆-C₁₀), -(CH₂)_m-O-(CH₂)_m-O-(alquilo C₁-C₁₀), en el que cada m está comprendido entre 1 y 8, -C(O)NR₂, -C(S)NR₂, -SO₂NR₂, -NRC(O)NR₂, -NRC(S)NR₂, sales de los mismos y similares. En algunas formas de realización, todos los grupos R de la lista anterior pueden ser, aunque sin limitarse a los mismos, H, alquilo o alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido, o 20 alcarilo. Cuando los grupos sustituyentes se especifican mediante su fórmula química convencional, escrita de izquierda a derecha, incluyendo igualmente los sustituyentes químicamente idénticos que resultarían de escribir la estructura de derecha a izquierda; por ejemplo, -CH₂O- es equivalente a -OCH₂-.

25 En algunas formas de realización, y únicamente a título de ejemplo, entre los sustituyentes para los radicales alquilo y heteroalquilo (incluidos los grupos denominados alquilenilo, alquenilo, heteroalquilenilo, heteroalquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquenilo y heterocicloalquenilo) se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos: -OR, =O, =NR, =N-OR, -NR₂, -SR, -halógeno, -SiR₃, -OC(O)R, -C(O)R, -CO₂R, -CONR₂, -OC(O)NR₂, -NRC(O)R, -NRC(O)NR₂, -NR(O)₂R, -NR-C(NR₂)=NR, -S(O)R, -S(O)₂R, -S(O)₂NR₂, -NRSO₂R, -CN y -NO₂. En otras formas de 30 realización, todos los grupos R de la lista anterior pueden ser, aunque no se limitan a los mismos, hidrógeno, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, incluidos, aunque sin limitarse a los mismos, arilo sustituido con de 1 a 3 halógenos, alquilo sustituido o no sustituido, grupos alcoxi o tioalcoxi, o grupos aralquilo. En algunas formas de realización, cuando dos grupos R están unidos al mismo átomo de nitrógeno, se combinan con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5-, 6- o 7- miembros. En otras formas de realización, por ejemplo, 35 el grupo -NR₂ incluye, sin limitarse a los mismos, el 1-pirrolidinilo y el 4-morfolinilo.

En otras formas de realización, y únicamente a título de ejemplo, entre los sustituyentes para los grupos arilo y heteroarilo se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, -OR, =O, =NR, =N-OR, -NR₂, -SR, -halógeno, -SiR₃, -OC(O)R, -C(O)R, -CO₂R, -CONR₂, -OC(O)NR₂, -NRC(O)R, -NRC(O)NR₂, -NR(O)₂R, -NR-C(NR₂)=NR, -S(O)R, -S(O)₂R, -S(O)₂NR₂, -NRSO₂R, -CN, -NO₂, -R, -N₃, -CH(Ph)₂, fluoro(alcoxi C₁-C₄), y fluoro(alquilo C₁-C₄), en un número comprendido entre cero y el número total de valencias abiertas en el sistema de anillo aromático. En otra forma de realización, todos los grupos R de la lista anterior pueden ser, aunque sin limitarse a los mismos, hidrógeno, alquilo, heteroalquilo, arilo y heteroarilo.

45 A menos que se indique lo contrario, se utilizan procedimientos convencionales de espectroscopia de masas, RMN, HPLC, química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología.

Los compuestos presentados en la presente memoria incluyen compuestos marcados isotópicamente, que son idénticos a los citados en las diversas fórmulas y estructuras indicadas en la presente memoria, excepto por el hecho de que uno o más átomos se sustituyen por un átomo que tiene una masa atómica o un número másico diferente de la masa atómica o número atómico habitualmente presente en la naturaleza. En algunas formas de 50 realización, entre los ejemplos de isótopos que se incorporan a los presentes compuestos se incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, flúor y cloro, tales como: ²H, ³H, ¹³C, ¹⁴C, ¹⁵N, ¹⁸O, ¹⁷O, ³⁵S, ¹⁸F, ³⁶Cl, respectivamente. Algunos compuestos marcados isotópicamente descritos en la presente memoria, por ejemplo aquellos a los que se incorporan isótopos radiactivos, tales como ³H y ¹⁴C, resultan útiles en ensayos de distribución tisular de fármacos y/o sustratos. Además, en otras formas de realización, la sustitución con isótopos tales como deuterio, es decir, ²H, proporciona ciertas ventajas terapéuticas derivadas de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, una mayor semivida in vivo o menores dosis necesarias.

60 Otras formas de realización consisten en compuestos descritos en la presente memoria que presentan átomos de carbono asimétricos y, por consiguiente, existen como enantiómeros o diastereómeros. En algunas formas de realización, las mezclas diastereoméricas se separan en sus diastereómeros individuales aprovechando sus diferencias fisicoquímicas, por ejemplo, por cromatografía y/o cristalización fraccionada. En otras formas de realización, se separan los enantiómeros mediante la conversión de la mezcla enantiomérica en una mezcla 65 diastereomérica por reacción con un compuesto apropiado ópticamente activo (por ejemplo, un alcohol), la separación de los diastereómeros y la conversión (por ejemplo, la hidrólisis) de los diastereómeros individuales en

los correspondientes enantiómeros puros. Todos estos isómeros, incluidos diastereómeros, enantiómeros y mezclas de los mismos, se consideran parte de las composiciones descritas en la presente memoria.

5 Los compuestos descritos en la presente memoria se pueden utilizar en forma de profármacos. Los compuestos descritos en la presente memoria se pueden metabolizar tras la administración a un organismo que necesita producir un metabolito que, a continuación, se utiliza para obtener un efecto deseado, por ejemplo un efecto terapéutico deseado.

10 Los procedimientos y formulaciones descritos en la presente memoria incluyen la utilización de N-óxidos, formas cristalinas (también conocidas como polimorfos) o sales farmacéuticamente aceptables. En algunas formas de realización, los compuestos descritos en la presente memoria existen como tautómeros. Todos los tautómeros están incluidos dentro del alcance de los compuestos presentados en la presente memoria. En algunas formas de realización, los compuestos descritos en la presente memoria existen tanto en formas no solvatadas como en formas solvatadas con disolventes farmacéuticamente aceptables, tales como agua, etanol y similares. Se considera que las formas solvatadas de los compuestos presentados en la presente memoria también se dan a conocer en la presente memoria.

20 Otras formas de realización consisten en compuestos descritos en la presente memoria que existen en varias formas tautoméricas. Todas estas formas tautoméricas se consideran parte de las composiciones descritas en la presente memoria. También, por ejemplo en algunas formas de realización, todas las formas enol-cetónicas de cualquier compuesto descrito en la presente memoria se consideran parte de las composiciones descritas en la presente memoria.

25 En otras formas de realización, los compuestos descritos en la presente memoria son ácidos y, en algunas formas de realización, forman una sal con un catión farmacéuticamente aceptable. Algunos de los compuestos de la presente invención son básicos y, en algunas formas de realización, forman una sal con un anión farmacéuticamente aceptable. Todas estas sales, incluyendo las disales, están incluidas dentro del alcance de las composiciones descritas en la presente memoria y, en algunas formas de realización, se preparan por procedimientos convencionales. Por ejemplo, en otras formas de realización, se preparan sales poniendo en contacto las entidades ácidas y básicas en un medio acuoso, no acuoso o parcialmente acuoso. Las sales se recuperan mediante la utilización, por lo menos, de una de las siguientes técnicas: filtración, precipitación con un no disolvente seguida de filtración, evaporación del disolvente, o, en el caso de soluciones acuosas, liofilización.

35 En algunas formas de realización, las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos que se dan a conocer en la presente memoria se forman cuando un protón ácido presente en el compuesto original se sustituye por un ion metálico, a modo de ejemplo un ion de metal alcalino, un ion alcalinotérreo o un ion de aluminio; o bien cuando el mismo se coordina con una base orgánica. Además, en otras formas de realización, las formas salinas de los compuestos que se dan a conocer se preparan utilizando sales de los materiales de partida o productos intermedios.

40 En otras formas de realización, entre los tipos de sales farmacéuticamente aceptables se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos: (1) sales de adición de ácido, formadas con ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares; o formadas con ácidos orgánicos, tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etanodisulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-metilbicyclo-[2.2.2]oct-2-eno-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 4,4'-metilén-bis-(3-hidroxi-2-eno-1-carboxílico), ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido ter-butilacético, ácido laurilsulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico y similares; (2) sales que se forman cuando un protón ácido presente en el compuesto original se sustituye por un ion metálico, por ejemplo, un ion de metal alcalino, un ion alcalinotérreo o un ion de aluminio; o bien cuando el mismo se coordina con una base orgánica. En otra forma de realización, entre las bases orgánicas aceptables se incluyen etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina y similares. En algunas formas de realización, entre las bases inorgánicas aceptables se incluyen hidróxido de aluminio, hidróxido de calcio, hidróxido de potasio, carbonato de sodio, hidróxido de sodio y similares.

55 En algunas formas de realización, los correspondientes contraiones de las sales farmacéuticamente aceptables se analizan e identifican mediante diversos procedimientos, incluidos, aunque sin limitarse a los mismos, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía iónica, electroforesis capilar, plasma acoplado inductivamente, espectroscopia de absorción atómica, espectrometría de masas o cualquier combinación de los mismos.

60 Debe entenderse que, en algunas formas de realización, la referencia a una sal incluye las formas de adición de disolvente y las formas cristalinas de la misma, particularmente los solvatos y polimorfos. En otras formas de realización, los solvatos contienen cantidades estequiométricas o no estequiométricas de un disolvente y a menudo se forman durante el proceso de cristalización con disolventes farmacéuticamente aceptables, tales como agua, etanol y similares. En otra forma de realización, se forman hidratos si el disolvente es agua, o alcoholatos si el

disolvente es un alcohol. Los polimorfos incluyen las diferentes disposiciones de empaquetamiento cristalino con la misma composición elemental de un compuesto. Una forma de realización consiste en polimorfos con diferentes espectros de difracción de rayos X, espectros infrarrojos, puntos de fusión, densidades, durezas, formas cristalinas, propiedades ópticas y eléctricas, estabildades y solubilidades. En otras formas de realización, diversos factores, tales como el tipo de disolvente de recristalización, la velocidad de cristalización y la temperatura de almacenamiento, hacen que domine una sola forma cristalina.

La selección y caracterización de las sales, polimorfos y/o solvatos farmacéuticamente aceptables se pueden llevar a cabo mediante diversas técnicas, entre las cuales se incluyen, aunque sin limitarse a las mismas, análisis térmico, difracción de rayos X, espectroscopia, sorción de vapor y microscopía. Los procedimientos de análisis térmico se ocupan de la degradación química o de procesos termofísicos, entre los que se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, las transiciones polimórficas, y dichos procedimientos se utilizan para analizar las relaciones entre las formas polimórficas, para determinar la pérdida de peso, para determinar la temperatura de transición vítrea o para estudios de compatibilidad del excipiente. Entre dichos procedimientos se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, la calorimetría diferencial de barrido (DSC), la calorimetría diferencial de barrido modulada (MDCS), el análisis termogravimétrico (TGA) y la termogravimetría con espectrometría de infrarrojos (TG/IR). Entre los procedimientos de difracción de rayos X se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, difractómetros de monocristal y fuentes de sincrotrón. Entre las diversas técnicas espectroscópicas utilizadas se incluyen, aunque sin limitarse a las mismas, Raman, FTIR, UVIS y RMN (de estado líquido y sólido). Entre las diversas técnicas de microscopía se incluyen, aunque sin limitarse a las mismas, microscopía de luz polarizada, microscopía electrónica de barrido (SEM) con análisis de energía dispersiva de rayos X (EDX), microscopía electrónica de barrido ambiental con EDX (en atmósfera de gas o de vapor de agua), microscopía IR y microscopía Raman.

Breve descripción de los dibujos

Se puede obtener una mejor comprensión de las características y ventajas de los presentes procedimientos y composiciones a partir de la siguiente descripción detallada, que expone formas de realización ilustrativas en las que se utilizan los principios de nuestros procedimientos, composiciones, dispositivos y aparatos, y a partir de los dibujos adjuntos, de los que:

La figura 1 presenta estructuras de inhibidores de la Btk reversibles (compuesto 1) e irreversibles (compuesto 2) y una sonda de la cinasa Btk ilustrativa derivada del compuesto 2 (compuesto 3) y una sonda ilustrativa derivada del compuesto 2 que no es una sonda de la Btk (compuesto 4).

La figura 2 presenta la caracterización de una sonda ilustrativa de la Btk (compuesto 3) *in vitro*. (a) Alineaciones de secuencia del bolsillo de unión a ATP en cinasas que contienen la cisteína conservada (flecha) que corresponde a la Cys 481 en la Btk. También se indican los números de entrada de las proteínas. (b) Marcación dependiente de la dosis de la Btk activa purificada *in vitro*. Se incubó una cantidad fija de enzima Btk (1 μg , obteniéndose una concentración final de 0,13 μM) con una sonda 0-10 μM en incrementos en un factor de 3 (de izquierda a derecha: 0 μM , 0,007 μM , 0,024 μM , 0,08 μM , 0,27 μM , 0,9 μM , 3 μM , 10 μM). El panel inferior muestra una carga idéntica de la Btk en cada carril, tal como se detecta mediante una transferencia Western anti-Btk del mismo gel. (c) Competencia para la marcación de la Btk tras la preincubación de la Btk con compuesto 2 1 μM (carril 1) o ATP γS 0,5 mM (carril 3). El carril 2 y el carril 4 corresponden a la marcación con sonda de la Btk sin competidor. (d) Incubación de His6-Btk activa, recombinante, con (+CIP) o sin (-CIP) fosfatasa alcalina intestinal bovina, seguida de marcado con sonda 1 μM y análisis por SDS-PAGE (panel superior). Los paneles central e inferior muestran las inmunotransferencias anti-Btk y anti-fosfotirosina (4G10) del mismo gel, respectivamente.

La figura 3 presenta un análisis de expresión y marcación con sonda de la Btk recombinante ilustrativo en células de mamífero transfectadas. (a) Análisis de transferencia Western de lisados de células 293H no transfectadas (carril 1), células cotransfectadas temporalmente con plásmidos de expresión para His6-Btk y PLC γ 2-V5 (carril 2), o células transfectadas únicamente con PLC γ 2 (carril 3). El gel se sometió a inmunotransferencia con un anticuerpo anti-fosfotirosina-1217-PLC γ 2 (panel superior), se extrajo y se volvió a someter a inmunotransferencia secuencialmente con anticuerpos anti-PLC γ 2 (panel central) y anti-Btk (panel inferior). (b) Las células 293H no transfectadas (carril 1) o células transfectadas temporalmente con His6-Btk se marcaron con una sonda ilustrativa de la Btk (compuesto 3) y a continuación se lisaron y se trataron con bolas de Ni-NTA a fin de precipitar la His-Btk (carriles 1, 2) o se lisaron y trataron con bolas de Ni-NTA seguido de marcado con sonda (carril 3). El panel inferior muestra una transferencia Western anti-Btk del mismo gel. (c) Células 293H que coexpresan de forma estable His-Btk y PLC γ 2 tratadas con concentraciones crecientes de la sonda ilustrativa (de izquierda a derecha: 0, 0,007, 0,024, 0,08, 0,27, 0,9, 3, 10 μM) añadida al medio de cultivo (panel superior). A continuación, el gel se sometió secuencialmente a inmunotransferencia con anti-fosfotirosina-1217-PLC γ 2 (panel central) o anticuerpos anti-Btk (panel inferior). (d) Células 293H no transfectadas (carril 5) o células cotransfectadas temporalmente con PLC γ 2 y mutantes naturales (carril 1) o K430A (carril 2), C481A (carril 3), Y551A (carril 4) de la Btk marcada con la sonda ilustrativa. Tras la exploración para la marcación de la sonda, el gel se sometió secuencialmente a inmunotransferencia con anticuerpos anti-Btk (panel superior derecho), anti-fosfotirosina-1217-PLC γ 2 (panel central derecho) y anti-PLC γ 2 (panel inferior derecho).

La figura 4 presenta una marcación con sonda ilustrativa de la Btk endógena en una línea celular de linfoma de linfocitos B. (a) Se trataron linfocitos B DOHH2 (4×10^5 células/carril) con concentraciones crecientes del compuesto 3 de sonda ilustrativa durante una hora, se lisaron y se analizaron por SDS-PAGE. (b) Se trataron linfocitos B DOHH2 (4×10^5 células/carril) con concentraciones crecientes del compuesto 4 durante una hora, se lisaron y se analizaron por SDS-PAGE. La Btk no queda significativamente marcada por el compuesto 4, lo que ilustra que no todas las combinaciones de compuesto 2 con un fluoróforo son sondas específicas de la cinasa Btk. (c) Células DOHH2 (4×10^5 células/carril) preincubadas con concentraciones crecientes del compuesto 2 inhibidor durante 1 hora, seguido de incubación con compuesto 3 $2 \mu\text{M}$ durante una hora. (d) Densitometría de la intensidad de banda de la Btk del gel de 4(c) que ilustra la relación lineal entre la concentración de inhibidor y la intensidad de banda.

La figura 5 presenta una marcación con sonda ilustrativa de linfocitos B esplénicos *ex vivo* para mostrar la utilización de la sonda para medir la inhibición de la Btk, la duración de la inhibición de la Btk *in vivo* y la especificidad de la sonda para la Btk. (a) Esplenocitos recién preparados preincubados con concentraciones crecientes de compuesto 1 o compuesto 2, seguido de marcado con el compuesto 3 $1 \mu\text{M}$. Las células se lisaron, se fraccionaron por SDS-PAGE y se analizaron por fluorescencia. (b) Desarrollo temporal de marcado con sonda *ex vivo* de esplenocitos de ratones que recibieron dosis orales de 30 mg/kg de compuesto 2. Se muestran los datos representativos obtenidos con esplenocitos de uno de entre dos ratones tratados de forma independiente. (c) Esplenocitos aislados 16 h después de la administración oral de solución salina (Sa.), tampón de formulación (veh.) o compuesto 2 (30 mg/kg en $t = 0$ y 2 h) de ratones xid (panel izquierdo) o CBA naturales (panel derecho) y marcados con sonda (compuesto 3) *ex vivo*. Los paneles inferiores en (a), (b) y (c) muestran la inmunotransferencia anti-Btk de los mismos geles.

La figura 6 presenta un ejemplo ilustrativo de marcado *ex vivo* de la Btk esplenocítica en ratones a los que se ha administrado inhibidor. El panel (a) muestra el protocolo de tratamiento. Se administraron a los ratones por vía oral inhibidores de la Btk (compuesto 1 o compuesto 2 a las 0 horas), dichos ratones se provocaron con $20 \mu\text{g}$ de lipopolisacárido (LPS) a las 0,5 horas tras la administración, se les volvió a administrar a las 2,5 horas una segunda dosis oral de compuesto 1 o compuesto 2, y se sacrificaron a las 16 horas. A continuación, se recogieron esplenocitos y se marcaron durante 1 h con compuesto 3 $1 \mu\text{M}$, se lisaron, se fraccionaron por SDS-PAGE y se cuantificaron mediante análisis de fluorescencia. El panel (b) muestra los resultados de la marcación con sonda de la Btk esplenocítica de ratones a los que se ha administrado por vía oral el compuesto 1 (el inhibidor reversible) en diversas dosis. El panel (c) muestra la marcación de ratones a los que se ha administrado compuesto 2 (el inhibidor irreversible) en diversas dosis. (Sa. = reciben únicamente solución salina, o vehículo = tampón de formulación). Se indican las bandas proteínicas de la Btk marcada con sonda y las bandas inmunorreactivas anti-Btk. El asterisco (*) de (c) indica la marcación de proteína BSA originalmente incluida en el tampón de marcado y omitida en los experimentos posteriores. Los paneles inferiores (b) y (c) muestran la inmunotransferencia anti-Btk de los mismos geles. La Btk total, determinada a partir de la intensidad de la banda proteínica anti-Btk inmunorreactiva, se utilizó para normalizar la cantidad de sonda de marcado en cada carril. Los diagramas de barras (b) y (c) muestran la inhibición media de marcado de por lo menos dos ratones a los que se administra de forma independiente para cada trastorno. (% de actividad = valores de píxel normalizados de muestras tratadas con compuesto/valores de píxel de muestras tratadas con vehículo).

Descripción detallada de la invención

En la presente memoria se describen la síntesis y la caracterización de sondas que pueden atravesar las células y que marcan la Btk en un residuo de cisteína único, no catalítico, en el bolsillo de unión de ATP. Otras formas de realización descritas en la presente memoria ponen de manifiesto la utilidad de dichas sondas para evaluar las características farmacodinámicas en mamíferos tratados con inhibidores de la Btk de moléculas pequeñas.

Compuestos de sonda de actividad de la Btk

Los compuestos de sonda de actividad de la Btk descritos en la presente memoria están compuestos por un resto que comprende un inhibidor de la Btk, un resto conector y un resto indicador. En una forma de realización, el inhibidor de la Btk es un inhibidor irreversible. En otra forma de realización, el inhibidor irreversible de la Btk se une a un residuo no catalítico del bolsillo de unión a ATP de la Btk; dicho residuo no catalítico es un residuo de cisteína. En las presentes formas de realización, la sonda de actividad de la Btk forma un enlace covalente, por lo menos, con un residuo no catalítico de la Btk. En otros casos, la sonda de actividad de la Btk puede formar un enlace no covalente, por lo menos, con un residuo no catalítico de la Btk. En otra forma de realización, la sonda de actividad de la Btk forma enlaces de hidrógeno dentro del bolsillo de unión a ATP de la Btk. En otra forma de realización, la sonda de actividad de la Btk tiene atracciones de Van der Waals con la enzima Btk.

En otras formas de realización, las sondas de actividad de la Btk descritas en la presente memoria son dependientes de la actividad, de tal manera que la sonda se une únicamente a una enzima Btk activa. En otras formas de realización, la sonda de actividad de la Btk se une a una enzima Btk que se ha activado mediante fosforilación por parte de cinasas ascendentes. En otra forma de realización, las sondas de actividad de la Btk descritas en la presente memoria son independientes de la actividad, de tal modo que la sonda se une a enzimas Btk que no han sido activadas mediante fosforilación por parte de cinasas ascendentes. En algunas formas de realización, la sonda

de actividad de la Btk marca una conformación fosforilada de una enzima Btk. En otras formas de realización, la sonda de actividad de la Btk marca una Btk en una conformación no fosforilada.

En algunas formas de realización, la sonda de actividad de la Btk puede atravesar las células.

En otras formas de realización, el resto conector se selecciona entre un enlace, un resto alquilo sustituido, un resto heterociclo sustituido, un resto amida sustituido, un resto cetona, un resto carbamato sustituido, un resto éster o cualquier combinación de los mismos. En otras formas de realización, el resto indicador es un resto que se detecta mediante equipos de laboratorio estándares o modificados.

Los compuestos y procedimientos para la inhibición de la Btk se describen en la presente memoria.

En la presente memoria se describe una sonda de actividad de la Btk de fórmula (I), que comprende:



Fórmula (I);

en la que:

A es un resto inhibidor de la Btk;

X e Y se seleccionan independientemente entre el grupo formado por: un enlace, $-O(C=O)-$, $-NR^a(C=O)-$, $-NR^a-$, $[[N-]]$, $-O-$, $-S-$, $-S-S-$, $-O-NR^a-$, $O(C=O)O-$, $-O(C=O)NR^a-$, $-NR^a(C=O)NR^a-$, $-N=CR^a-$, $-S(C=O)-$, $-S(O)-$ y $-S(O)_2-$;

donde $[[N-]]$ forma un heterociclo que contiene N;

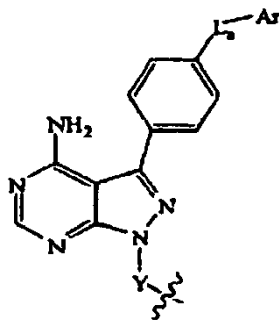
B es un resto conector;

C es un resto indicador; y

R^a es hidrógeno o alquilo.

En una forma de realización, el resto que comprende un inhibidor irreversible de la Btk se deriva de un inhibidor irreversible de la Btk. En algunas formas de realización, dichos inhibidores irreversibles de la Btk deben poseer, por lo menos, una de las siguientes características: potencia, selectividad y permeabilidad a través de las células. En otras formas de realización, dichos inhibidores irreversibles de la Btk poseen, por lo menos, dos de las características mencionadas anteriormente, y en otras formas de realización, por lo menos todas las características mencionadas.

En otro caso, el resto inhibidor de la Btk se deriva de un inhibidor de la Btk que presenta la estructura de la fórmula (II):



Fórmula (II)

en la que:

L_a es CH_2 , O, NH o S;

Ar es un arilo sustituido o no sustituido, o un heteroarilo sustituido o no sustituido; e

Y es un grupo opcionalmente sustituido seleccionado entre alquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo.

En algunos casos, L_a es CH_2 , O o NH. En otros casos, L_a es O o NH. En otros casos, L_a es O.

En otros casos, Ar es un arilo sustituido o no sustituido. En otros casos, Ar es un arilo de 6 miembros. En otros casos, Ar es fenilo.

En algunos casos, Y es un grupo opcionalmente sustituido seleccionado entre alquilo, heteroalquilo, cicloalquilo y heterocicloalquilo. En otros casos, Y es un grupo opcionalmente sustituido seleccionado entre alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, heteroalquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, cicloalquilo de 4-, 5-, 6- o 7- miembros y heterocicloalquilo de 4, 5, 6 o 7 miembros. En otros casos, Y es un grupo opcionalmente sustituido seleccionado entre alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, heteroalquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, cicloalquilo de 5 o 6 miembros y heterocicloalquilo de 5 o 6 miembros que contiene 1 o 2 átomos de N. En otros casos, Y es un cicloalquilo de 5 o 6 miembros, o un heterocicloalquilo de 5 o 6 miembros que contiene 1 o 2 átomos de N. En algunos casos, Y es un anillo cicloalquilo de 4, 5, 6 o 7 miembros; o Y es un anillo heterocicloalquilo de 4, 5, 6 o 7 miembros.

En algunos casos, el resto inhibidor de la Btk se deriva de un compuesto seleccionado entre: 1-(3-(4-amino-3-(4-fenoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidin-1-il)prop-2-en-1-ona; (E)-1-(3-(4-amino-3-(4-fenoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidin-1-il)but-2-en-1-ona; 1-(3-(4-amino-3-(4-fenoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidin-1-il)sulfonileno; 1-(3-(4-amino-3-(4-fenoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidin-1-il)prop-2-en-1-ona; 1-(4-(4-amino-3-(4-fenoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidin-1-il)prop-2-en-1-ona; N-((1s,4s)-4-(4-amino-3-(4-fenoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)ciclohexil)acrilamida; 1-((R)-3-(4-amino-3-(4-fenoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)pirrolidin-1-il)prop-2-en-1-ona; 1-((S)-3-(4-amino-3-(4-fenoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)pirrolidin-1-il)prop-2-en-1-ona; 1-((R)-3-(4-amino-3-(4-fenoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidin-1-il)prop-2-en-1-ona; 1-((S)-3-(4-amino-3-(4-fenoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidin-1-il)prop-2-en-1-ona; y (E)-1-(3-(4-amino-3-(4-fenoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidin-1-il)-4-(dimetilamino)but-2-en-1-ona.

En otro caso, el resto conector se selecciona entre un enlace, un polímero, un polímero soluble en agua, un alquilo opcionalmente sustituido, un heteroalquilo opcionalmente sustituido, un heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, un cicloalquilo opcionalmente sustituido, un heterocicloalquilalquilo opcionalmente sustituido un heterocicloalquilalqueno opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido y un heterocicloalquilalquenalquilo opcionalmente sustituido. En algunos casos, el resto conector es un heterociclo opcionalmente sustituido. En otros casos, el heterociclo se selecciona entre aziridina, oxirano, episulfuro, acetidina, oxetano, pirrolina, tetrahidrofurano, tetrahidrotiofeno, pirrolidina, pirazol, pirrol, imidazol, triazol, tetrazol, oxazol, isoxazol, oxireno, tiazol, isotiazol, ditiolano, furano, tiofeno, piperidina, tetrahidropirano, tiano, piridina, pirano, tiapirano, piridazina, pirimidina, pirazina, piperazina, oxazina, tiazina, ditiano y dioxano. En algunos casos, el heterociclo es piperazina. En otros casos, el resto conector está sustituido opcionalmente con halógeno, CN, OH, NO_2 , alquilo, S(O) y S(O)_2 . En otros casos, el polímero soluble en agua es un grupo PEG.

En otras formas de realización, el resto conector proporciona una separación espacial suficiente entre el resto indicador y el resto inhibidor de la Btk. En otras formas de realización, el resto conector es estable. En otra forma de realización, el resto conector no afecta sustancialmente a la respuesta del resto indicador. En otras formas de realización, el resto conector proporciona estabilidad química a la sonda de actividad de la Btk. En otras formas de realización, el resto conector proporciona una solubilidad suficiente a la sonda de actividad de la Btk.

En algunas formas de realización, los enlaces tales como polímeros solubles en agua están unidos en un extremo a un resto inhibidor de la Btk y a un resto indicador en el otro extremo. En otras formas de realización, los polímeros solubles en agua se unen a través de un grupo funcional o sustituyente del resto inhibidor de la Btk. En otras formas de realización, los polímeros solubles en agua se unen a través de un grupo funcional o sustituyente del resto indicador. En otras formas de realización, la unión covalente de polímeros hidrófilos a un resto inhibidor de la Btk y un resto indicador representa una estrategia para aumentar la solubilidad en agua (por ejemplo en un entorno fisiológico), la biodisponibilidad, la semivida sérica o los parámetros farmacodinámicos, o para prolongar el tiempo de circulación de la sonda de actividad de la Btk, incluyendo proteínas, péptidos y particularmente moléculas hidrófobas. En otras formas de realización, entre las características importantes adicionales de dichos polímeros hidrófilos se incluyen la biocompatibilidad y la ausencia de toxicidad. En otras formas de realización, para el uso terapéutico de la preparación final, el polímero es farmacéuticamente aceptable.

En algunas formas de realización, entre los ejemplos de polímeros hidrófilos se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos: éteres de polialquilo y análogos de los mismos terminados en alcoxi (por ejemplo, polioxietilenglicol, polioxietileno/propilenglicol y análogos de los mismos terminados en metoxi o etoxi, polioxietilenglicol, siendo conocido este último también como polietilenglicol o PEG); polivinilpirrolidonas; éteres de polivinilalquilo;

polioxazolinas, oxazolinas de polialquilo y oxazolinas de polihidroalquilo; poliacrilamidas, polialquilacrilamidas y polihidroalquilacrilamidas (por ejemplo, polihidroxiopropilmetacrilamida y sus derivados); acrilatos de polihidroalquilo; ácidos polisíalicos y análogos de los mismos; secuencias peptídicas hidrófilas; polisacáridos y sus derivados, incluidos el dextrano y sus derivados, por ejemplo, carboximetildextrano, sulfatos de dextrano, aminodextrano; celulosa y sus derivados, por ejemplo, carboximetilcelulosa, hidroxialquilcelulosas; quitina y sus derivados, por ejemplo, quitosano, succinilquitosano, carboximetilquitina, carboximetilquitosano; ácido hialurónico y sus derivados; almidones; alginatos; sulfato de condroitina; albúmina; pululano y carboximetilpululano; poliaminoácidos y derivados de los mismos, por ejemplo, ácidos poliglutámicos, polilisinas, ácidos poliaspárticos, poliaspartamidas; copolímeros de anhídrido maleico, tales como: copolímero de estireno y anhídrido maleico, copolímero de diviniletiléter y anhídrido maleico; alcoholes de polivinilo; copolímeros de los mismos; terpolímeros de los mismos; mezclas de los mismos; y derivados de los anteriores. En otras formas de realización, el polímero soluble en agua tiene cualquier forma estructural, incluidas, aunque sin limitarse a las mismas, las estructuras lineal, bifurcada o ramificada. En algunas formas de realización, son particularmente útiles cadenas poliméricas principales solubles en agua con entre 2 y aproximadamente 300 extremos. En otras formas de realización, entre los derivados de polímeros multifuncionales se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, polímeros lineales con dos extremos, estando enlazado cada extremo a un grupo funcional que es el mismo o diferente. En algunas formas de realización, el polímero soluble en agua comprende un resto poli(etilenglicol). En otras formas de realización, el peso molecular del polímero puede estar comprendido dentro de un amplio intervalo, por ejemplo, aunque sin limitarse a estos valores, entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da o más. En otras formas de realización, el peso molecular del polímero está comprendido entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da, siendo por ejemplo, aunque sin limitarse a estos valores, de aproximadamente 100.000 Da, de aproximadamente 95.000 Da, de aproximadamente 90.000 Da, de aproximadamente 85.000 Da, de aproximadamente 80.000 Da, de aproximadamente 75.000 Da, de aproximadamente 70.000 Da, de aproximadamente 65.000 Da, de aproximadamente 60.000 Da, de aproximadamente 55.000 Da, de aproximadamente 50.000 Da, de aproximadamente 45.000 Da, de aproximadamente 40.000 Da, de aproximadamente 35.000 Da, de 30.000 Da, de aproximadamente 25.000 Da, de aproximadamente 20.000 Da, de aproximadamente 15.000 Da, de aproximadamente 10.000 Da, de aproximadamente 9.000 Da, de aproximadamente 8.000 Da, de aproximadamente 7.000 Da, de aproximadamente 6.000 Da, de aproximadamente 5.000 Da, de aproximadamente 4.000 Da, de aproximadamente 3.000 Da, de aproximadamente 2.000 Da, de aproximadamente 1.000 Da, de aproximadamente 900 Da, de aproximadamente 800 Da, de aproximadamente 700 Da, de aproximadamente 600 Da, de aproximadamente 500 Da, de aproximadamente 400 Da, de aproximadamente 300 Da, de aproximadamente 200 Da, y de aproximadamente 100 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero está comprendido entre aproximadamente 100 Da y 50.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero está comprendido entre aproximadamente 100 Da y 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero está comprendido entre aproximadamente 1.000 Da y 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero está comprendido entre aproximadamente 5.000 Da y 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del polímero está comprendido entre aproximadamente 10.000 Da y 40.000 Da. En algunas formas de realización, la molécula de poli(etilenglicol) es un polímero ramificado. En otras formas de realización, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está comprendido entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 100.000 Da, siendo por ejemplo, aunque sin limitarse dichos valores, de aproximadamente 100.000 Da, de aproximadamente 95.000 Da, de aproximadamente 90.000 Da, de aproximadamente 85.000 Da, de aproximadamente 80.000 Da, de aproximadamente 75.000 Da, de aproximadamente 70.000 Da, de aproximadamente 65.000 Da, de aproximadamente 60.000 Da, de aproximadamente 55.000 Da, de aproximadamente 50.000 Da, de aproximadamente 45.000 Da, de aproximadamente 40.000 Da, de aproximadamente 35.000 Da, de aproximadamente 30.000 Da, de aproximadamente 25.000 Da, de aproximadamente 20.000 Da, de aproximadamente 15.000 Da, de aproximadamente 10.000 Da, de aproximadamente 9.000 Da, de aproximadamente 8.000 Da, de aproximadamente 7.000 Da, de aproximadamente 6.000 Da, de aproximadamente 5.000 Da, de aproximadamente 4.000 Da, de aproximadamente 3.000 Da, de aproximadamente 2.000 Da, y de aproximadamente 1.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está comprendido entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está comprendido entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está comprendido entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas formas de realización, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está comprendido entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 20.000 Da. La anterior lista para cadenas principales sustancialmente solubles en agua no es de ningún modo exhaustiva y es meramente ilustrativa, y en algunas formas de realización, los materiales poliméricos que tienen las cualidades descritas anteriormente son adecuados para su utilización en los procedimientos y composiciones descritos en la presente memoria.

En otras formas de realización, los diversos polímeros solubles en agua unidos a un resto inhibidor de la Btk y un resto indicador tal como se describen en la presente memoria se ajustan para proporcionar unas características farmacológicas, farmacocinéticas o farmacodinámicas modificadas (por ejemplo, aunque sin limitarse a ello, aumentadas o disminuidas), tal como la semivida in vivo. En algunas formas de realización, la semivida de la sonda de actividad de la Btk se aumenta, por lo menos, en aproximadamente el 10, aproximadamente el 20, aproximadamente el 30, aproximadamente el 40, aproximadamente el 50, aproximadamente el 60, aproximadamente el 70, aproximadamente el 80, aproximadamente el 90 por ciento, en un factor de

aproximadamente dos, aproximadamente cinco, aproximadamente 10, aproximadamente 50 o, por lo menos, aproximadamente 100 con respecto a una sonda de actividad de la Btk sin ningún conector soluble en agua.

5 En otra forma de realización, X se selecciona entre el grupo formado por: un enlace, $-O(C=O)-$, $-NR^a(C=O)-$, $-NR^a-$, $[[N-]]$, $-O-$, $-S-$, $-S-S-$, $-O-NR^a-$, $-O(C=O)O-$, $-O(C=O)NR^a-$, $-NR^a(C=O)NR^a-$, $-N=CR^a-$, $-S(C=O)-$, $-S(O)-$ y $-S(O)_2-$;

10 donde $[[N-]]$ forma un heterociclo que contiene N. En una forma de realización, X es $NR^a(C=O)$. En otra forma de realización, X es un enlace. En otra forma de realización, X es $-O(C=O)-$. En otra forma de realización, Y se selecciona entre el grupo formado por: un enlace, $-O(C=O)-$, $-NR^a(C=O)-$, $-NR^a-$, $[[N-]]$, $-O-$, $-S-$, $-S-S-$, $-O-NR^a-$, $-O(C=O)O-$, $-O(C=O)NR^a-$, $-NR^a(C=O)NR^a-$, $-N=CR^a-$, $-S(C=O)-$, $-S(O)-$ y $-S(O)_2-$;

15 donde $[[N-]]$ forma un heterociclo que contiene N. En otra forma de realización, Y es un enlace. En una forma de realización, Y es $-NR^a(C=O)-$. En otra forma de realización, R^a es hidrógeno. En otra forma de realización, R^a es alquilo.

20 El resto indicador se puede seleccionar entre el grupo formado por un marcador, un colorante, un fotorreticulador, un compuesto citotóxico, un fármaco, un marcador de afinidad, un marcador de fotoafinidad, un compuesto reactivo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un biomaterial, una nanopartícula, un marcador de espín, un fluoróforo, un resto que contiene un metal, un resto radiactivo, un nuevo grupo funcional, un grupo que interactúa de forma covalente o no covalente con otras moléculas, un resto que contiene una jaula fotoactivable, un resto excitable por radiación actínica, un ligando, un resto fotoisomerizable, biotina, un análogo de la biotina, un resto que presenta un átomo pesado, un grupo químicamente escindible, un grupo fotoescindible, un agente con actividad redox, un resto marcado isotópicamente, una sonda biofísica, un grupo fosforescente, un grupo quimioluminiscente, un grupo con alta densidad electrónica, un grupo magnético, un grupo intercalante, un cromóforo, un agente de transferencia de energía, un agente biológicamente activo, un marcador detectable o una combinación de los mismos.

25 En la presente forma de realización, el resto indicador es un fluoróforo. En otra forma de realización, el fluoróforo se selecciona entre el grupo formado por: BODIPY 493/503, BODIPY FL, BODIPY R6G, BODIPY 530/550, BODIPY TMR, BODIPY 558/568, BODIPY 564/570, BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, BODIPY TR, fluoresceína, 5(6)-carboxifluoresceína, 2,7-diclorofluoresceína, N,N-Bis(2,4,6-trimetilfenil)-3,4:9,10-perilenebis-dicarboximida, HPTS, etil eosina, DY-490XL MegaStokes, DY-485XL MegaStokes, Adirondack Green 520, ATTO 465, ATTO 488, ATTO 495, YOYO-1, 5-FAM, BCECF, BCECF, diclorofluoresceína, rodamina 110, rodamina 123, Rhodamine Green, YO-PRO-1, SYTOX Green, Sodium Green, SYBR Green I, Alexa Fluor 500, FITC, Fluo-3, Fluo-4, fluoro-esmeralda, YoYo-1 ssDNA, YoYo-1 dsDNA, YoYo-1, SYTO RNaselect, Diversa Green-FP, Dragon Green, EvaGreen, Surf Green EX, Spectrum Green, Oregon Green 488, NeuroTrace 500525, NBD-X, MitoTracker Green FM, LysoTracker Green DND-26, CBQCA, PA-GFP (tras activación), WEGFP (tras activación), F1ASH-CCXXCC, Azami Green monomérico, Azami Green, EGFP (Campbell Tsien 2003), EGFP (Patterson 2001), Fluoresceína, Kaede Green, 7-bencilamino-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol, Bex1, doxorubicina, Lumio Green y SuperGlo GFP.

35 En otra forma de realización, el fluoróforo se selecciona entre el grupo formado por: BODIPY 493/503, BODIPY FL, BODIPY R6G, BODIPY 530/550, BODIPY TMR, BODIPY 558/568, BODIPY 564/570, BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, BODIPY TR. En otra forma de realización, el fluoróforo es BODIPY FL. En algunas formas de realización, el fluoróforo no es BODIPY 530. En algunas formas de realización, el fluoróforo tiene un máximo de excitación comprendido entre aproximadamente 500 nm y aproximadamente 600 nm. En otras formas de realización, el fluoróforo tiene un máximo de excitación comprendido entre aproximadamente 500 nm y aproximadamente 550 nm. En otras formas de realización, el fluoróforo tiene un máximo de excitación comprendido entre aproximadamente 550 nm y aproximadamente 600 nm. En otras formas de realización, el fluoróforo tiene un máximo de excitación comprendido entre aproximadamente 525 nm y aproximadamente 575 nm. En otras formas de realización, el fluoróforo tiene un máximo de emisión comprendido entre aproximadamente 510 nm y aproximadamente 670 nm. En otras formas de realización, el fluoróforo tiene un máximo de emisión comprendido entre aproximadamente 510 nm y aproximadamente 600 nm. En otras formas de realización, el fluoróforo tiene un máximo de emisión comprendido entre aproximadamente 600 nm y aproximadamente 670 nm. En otras formas de realización, el fluoróforo tiene un máximo de emisión comprendido entre aproximadamente 575 nm y aproximadamente 625 nm.

40 A título meramente ilustrativo y en algunas formas de realización, la potencia, la selectividad y la permeabilidad a través de las células observadas en los compuestos tales como el compuesto 2 son apropiadas para incorporar estas moléculas en una sonda basada en la actividad dirigida a la Btk que permite la visualización directa de la actividad de la Btk en células intactas. Los perfiles *in vitro* frente a un conjunto de más de 100 cinasas puso de manifiesto que el compuesto 2 es un inhibidor muy potente y selectivo de las cinasas de la familia Tec, incluida la Btk, así como de las cinasas de la familia Src. Sin pretender limitar el alcance de las composiciones y procedimientos descritos en la presente memoria, se postula que la base estructural para la selectividad es la modificación covalente de un residuo de cisteína no catalítico (Cys 481 en la Btk) que se conserva en el bolsillo de unión a ATP de la familia Tec y diversas otras cinasas (figura 2a). El compuesto 2 inhibió la actividad de la Btk en ensayos basados en células y se mostró eficaz en un modelo murino de artritis reumatoide (tabla 1). El compuesto 2 (figura 1) es un inhibidor irreversible ilustrativo de la Btk con una IC_{50} igual a 0,5 nM. El compuesto 1 es un inhibidor

reversible ilustrativo de la Btk relacionado estructuralmente que se utiliza en experimentos de competitividad, tal como se describe a continuación.

Tabla 1. Perfiles de inhibición para los compuestos 1 a 3 en ensayos de cinasa seleccionados y en un ensayo de movilización de calcio basado en células (flujo de Ca^{2+}). Los datos son valores de IC_{50} en μM .

	Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3 (sonda)
Abl	0,81	0,78	0,3
Btk	0,031	0,0005	0,089
c-met	82	35	100
EGFR	-	-	2,9
Lck	0,01	0,12	0,24
Flujo de Ca^{2+}	0,62	0,01	0,23

Sin embargo, en otras formas de realización, cualquier inhibidor irreversible de la Btk que se une al residuo de cisteína no catalítico del bolsillo de unión a ATP de la Btk se utiliza en los compuestos y procedimientos descritos en la presente memoria.

Síntesis y caracterización general de una sonda de actividad de la Btk ilustrativa

Sin pretender limitar el alcance de las composiciones descritas en la presente memoria, se sintetizó una sonda ilustrativa (compuesto 3) uniendo un fluoróforo BODIPY FL al compuesto 2 por medio de un conector de piperazina (figura 1). El conector de piperazina sirvió para mantener la solubilidad de la sonda y proporcionó una separación espacial entre el fluoróforo y el núcleo de pirazolopirimidina.

En algunas formas de realización, el enlace formado es un enlace estable. En otras formas de realización, en caso de que el conjugado comprenda dos componentes, el resto conector forma un enlace, en algunas formas de realización un enlace estable, entre el resto inhibidor y el resto indicador. En algunas formas de realización, el resto conector es estable y proporciona los medios para controlar y determinar la distancia entre el resto inhibidor y el resto indicador. Además, en algunas formas de realización, el resto conector se selecciona de tal modo que se mantiene la solubilidad de la sonda. En algunas formas de realización, el resto conector es un resto de piperazinilo. En otras formas de realización, se forma un enlace basado en piperazinilo utilizando un compuesto que contiene piperazina. En otras formas de realización, el número y el orden de las unidades que comprenden el resto conector se selecciona de tal modo que se controlan la longitud entre el primer y el segundo componente, así como las características hidrófobas e hidrófilas del conector.

En el presente contexto, la expresión “separación espacial” se refiere a un grupo separador termoquímica y fotoquímicamente inactivo y, en algunas formas de realización, se utiliza para unir dos o más restos diferentes de los tipos definidos anteriormente. En otras formas de realización, los espaciadores se seleccionan sobre la base de una variedad de características, incluidas su hidrofobia, hidrofilia, flexibilidad molecular y longitud. Así, en algunas formas de realización, dicho espaciador comprende una cadena de átomos de carbono opcionalmente interrumpida o terminada por uno o más heteroátomos, tales como átomos de oxígeno, átomos de nitrógeno y/o átomos de azufre. Así, en algunas formas de realización, el espaciador comprende una o más funcionalidades amida, éster, amina, éter y/o tioéter, y opcionalmente hidrocarburos aromáticos o monoinsaturados/poliinsaturados, polioxietilenos tales como polietilenglicol, oligoamidas/poliámidas tales como poli- α -alanina, poliglicina, polilisina y péptidos en general, oligosacáridos, oligofosfatos/polifosfatos. Además, en otras formas de realización, el espaciador se compone de unidades combinadas de los mismos. En otras formas de realización, la longitud del espaciador varía teniendo en cuenta el posicionamiento deseado o necesario y la orientación espacial de la parte activa/funcional de la sonda de actividad de la Btk.

Sin pretender limitar el alcance de las composiciones descritas en la presente memoria, en algunas formas de realización, el resto indicador es Bodipy. En el presente contexto, el término “resto indicador” se refiere a un grupo detectable individualmente o como parte de una serie de detección.

En algunas formas de realización, el compuesto 3 mantiene la solubilidad y la permeabilidad a través de la membrana del compuesto 2, lo que permite la detección y cuantificación de la Btk marcada por SDS-PAGE y densitometría láser.

En algunas formas de realización, las sondas de actividad de la Btk marcadas descritas en la presente memoria se purifican por uno o más procedimientos que incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, cromatografía de afinidad; cromatografía de intercambio aniónico o catiónico (utilizando, aunque sin limitarse a la misma, DEAE SEPHAROSE); cromatografía sobre sílice; HPLC de fase inversa; filtración en gel (utilizando, aunque sin limitarse a la misma, SEPHADEX G-75); cromatografía de interacción hidrófoba; cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de quelatos metálicos; ultrafiltración/diafiltración; precipitación con etanol; precipitación con sulfato de amonio; cromatofocalización; cromatografía de desplazamiento; procedimientos electroforéticos (incluido, aunque sin

limitarse al mismo, el enfoque isoelectrico preparativo), solubilidad diferencial (incluida, aunque sin limitarse a la misma, la precipitación con sulfato de amonio), o extracción. En otras formas de realización, el peso molecular aparente se estima mediante GPC por comparación con patrones de proteínas globulares (Protein purification methods, a practical approach (Harris & Angal, editores) IRL Press 1989, 293-306).

Además, en algunas formas de realización, los procedimientos de síntesis descritos a continuación incluyen diversas purificaciones, tales como por cromatografía en columna, cromatografía en columna rápida, cromatografía en capa fina (TLC), recristalización, destilación, cromatografía líquida a alta presión (HPLC) y similares. Además, en otras formas de realización, se utilizan también diversas técnicas para la identificación y cuantificación de los productos de reacción química, tales como resonancia magnética nuclear de protones y carbono 13 (RMN de ^1H y ^{13}C), espectroscopía infrarroja y ultravioleta (IR y UV), cristalografía de rayos X, análisis elemental (EA), HPLC y espectroscopía de masas (MS).

A menos que se indique lo contrario, en algunas formas de realización se utilizan procedimientos de espectroscopía de masas, RMN, HPLC, química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y técnicas farmacológicas.

En un aspecto, se ensaya la potencia inhibidora *in vitro* de una sonda contra un panel de cinasas seleccionadas como medio rápido para confirmar la accesibilidad del resto reactivo con respecto al sitio activo de la Btk. A título únicamente ilustrativo, aunque es menos potente que el compuesto original 2, la sonda ilustrativa de compuesto 3 mantiene la potencia contra la Btk ($\text{IC}_{50} \sim 90 \text{ nM}$) (tabla 1). Por consiguiente, el conector de piperazina y el fluoróforo Bodipy no impiden notablemente la accesibilidad de la sonda ilustrativa al sitio activo de la enzima.

Síntesis del compuesto 3 - sonda de actividad de la Btk

Se prepara 4-amino-3-(4-fenoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina (producto intermedio 2). De forma resumida, se añadió ácido 4-fenoxibenzoico (48 g) a cloruro de tionilo (100 ml) y se calentó a reflujo suave durante 1 hora. Se eliminó el cloruro de tionilo por destilación, se disolvió el aceite residual en tolueno y el material volátil se eliminó a $80^\circ\text{C}/20 \text{ mbar}$. El cloruro de ácido resultante se disolvió en tolueno (200 ml) y tetrahidrofurano (35 ml). Se añadió malononitrilo (14,8 g) y la solución se agitó a -10°C con adición de diisopropiletetilamina (57,9 g) en tolueno (150 ml), manteniendo la temperatura por debajo de 0°C . Tras 1 hora a 0°C , la mezcla se agitó a 20°C hasta el día siguiente. El clorhidrato de amina se eliminó por filtración y el filtrado se evaporó a vacío. El residuo se recogió en acetato de etilo y se lavó con ácido sulfúrico 1,25 M, y a continuación con solución saturada de cloruro sódico, y se secó sobre sulfato de sodio. La evaporación de los disolventes dio un residuo semisólido que se trató con una porción de acetato de etilo, obteniéndose 4,1 g de 1,1-diciano-2-hidroxi-2-(4-fenoxifenil)eteno en forma de sólido blanco (p. f. $160\text{-}162^\circ\text{C}$). El filtrado tras la evaporación dio 56,58 g (96%) de 1,1-diciano-2-hidroxi-2-(4-fenoxifenil)eteno en forma de sólido gris marrónáceo, que era suficientemente puro para su utilización posterior.

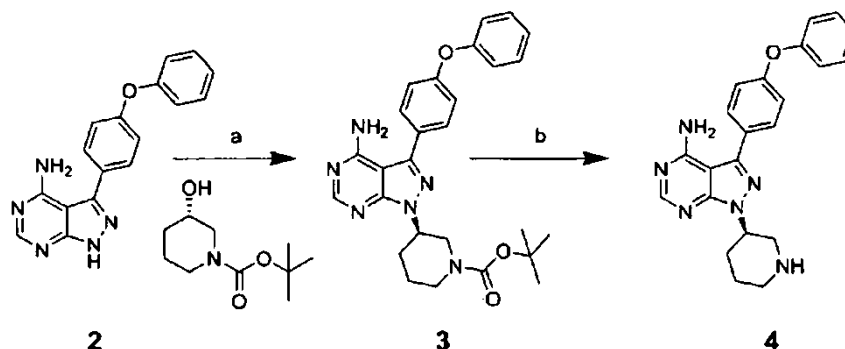
Se agitó 1,1-diciano-2-hidroxi-2-(4-fenoxifenil)eteno (56,5 g) en acetonitrilo (780 ml) y metanol (85 ml) en atmósfera de nitrógeno a 0°C con adición de diisopropiletetilamina (52,5 ml), seguido de trimetilsilildiazometano 2 M (150 ml) en THF. La reacción se agitó durante 2 días a 20°C y a continuación se añadieron 2 g de sílice (por cromatografía). La solución marrón rojiza se evaporó a vacío, el residuo se disolvió en acetato de etilo y se lavó bien con agua, luego con solución saturada de cloruro sódico, se secó y se evaporó. El residuo se extrajo con éter dietílico (3 x 250 ml), decantándolo del aceite insoluble. La evaporación de los extractos de éter dio 22,5 g de 1,1-diciano-2-metoxi-2-(4-fenoxifenil)eteno en forma de sólido naranja pálido. El aceite insoluble se purificó mediante cromatografía en columna rápida, obteniéndose 15,0 g de un aceite de color rojo anaranjado.

Se trataron 1,1-diciano-2-metoxi-2-(4-fenoxifenil)eteno (22,5 g) y aceite de 1,1-diciano-2-metoxi-2-(4-fenoxifenil)eteno (15 g) con una solución de hidrato de hidrazina (18 ml) en etanol (25 ml) y se calentaron en baño de vapor durante 1 hora. Se añadió etanol (15 ml) seguido de agua (10 ml). El sólido precipitado se recogió y se lavó con etanol:agua (4:1), y a continuación se secó al aire, obteniéndose 3-amino-4-ciano-5-(4-fenoxifenil)pirazol en forma de sólido naranja pálido.

Se suspendió 3-amino-4-ciano-5-(4-fenoxifenil)pirazol (29,5 g) en formamida (300 ml) y se calentó en atmósfera de nitrógeno a 180°C durante 4 horas. La mezcla de reacción se enfrió a 30°C y se añadió agua (300 ml). El sólido se recogió, se lavó bien con agua, luego con metanol, y se secó al aire, obteniéndose 4-amino-3-(4-fenoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina (producto intermedio 2).

Síntesis de 1-3-(4-amino-3-(4-fenoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidin-1-ilo (producto intermedio 4); a) trifenilfosfina (TPP), diazodicarboxilato de diisopropilo (DIAD), tetrahidrofurano (THF); b) TFA/ CH_2Cl_2 .

Esquema 1:



5 A una solución de 1-Boc-3-(S)-hidroxipiperidina (3,98 g, 19,8 mmol) y trifetilfosfina (5,19 g, 19,8 mmol) en THF (150 ml) se le añadió DIAD (3,9 ml, 19,8 mmol). La solución amarilla se agitó 1 minuto, a continuación se añadió el producto intermedio 2 (4,0 g, 13,2 mmol) y la reacción se calentó con una pistola de calor (~3-5 minutos) hasta que el sólido se disolvió. Tras agitar durante 1 hora a temperatura ambiente, se eliminó el disolvente y el aceite marrón

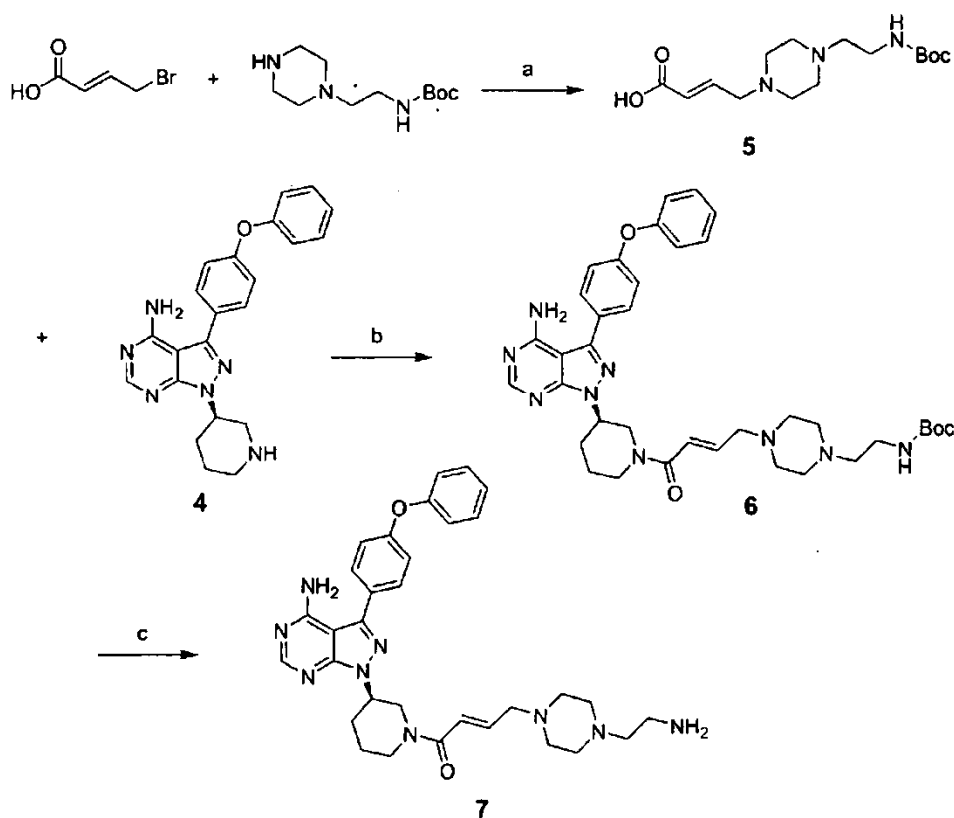
10 resultante se sometió a cromatografía en columna rápida (30%, después 50% de THF/hexanos), obteniéndose 4,45 g (69%) del producto intermedio 3 (están presentes trazas de óxido de trifetilfosfina) como espuma marrón claro.

A una solución de producto intermedio 3 (4,4 g, 9,0 mmol) en CH_2Cl_2 (20 ml) se le añadió TFA (2,8 ml, 36,2 mmol). Tras agitar durante 2 horas a temperatura ambiente, el disolvente se eliminó y el residuo se dividió entre acetato de etilo (250 ml) y solución acuosa diluida de K_2CO_3 . La capa orgánica se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró hasta

15 ~70 ml. La solución resultante se agitó y se añadió HCl 4,0 M en dioxano (4 ml), obteniéndose un precipitado naranja claro denso. Dicho precipitado se recogió por filtración y se lavó con acetato de etilo (50 ml). A continuación se dividió entre acetato de etilo (300 ml) y solución acuosa diluida de K_2CO_3 . La capa orgánica se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró, obteniéndose 2,78 g (80%) de producto intermedio 4 como espuma de color amarillo claro.

20 Síntesis del producto intermedio 7; a) TEA/THF; b) HATU/DMF; c) HCl 4,0 M/dioxano.

Esquema 2:



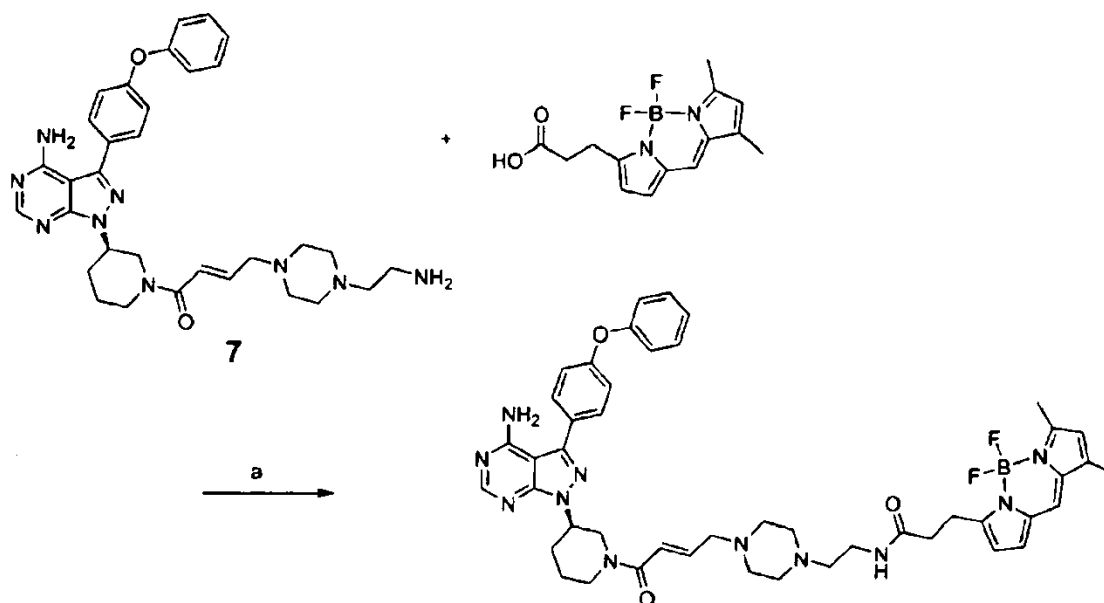
A una solución de ácido 4-bromocrotónico (72 mg, 0,44 mmol) en THF (3 ml) se le añadió una solución de TEA (0,18 ml, 1,3 mmol) y 1-(2-N-Boc-aminoetil)piperazina (0,1 g, 0,44 mmol) en THF (1 ml). Tras agitar la solución durante 2 horas a temperatura ambiente, se eliminó el disolvente y se obtuvo el producto intermedio bruto 5, que se utilizó sin ninguna purificación adicional.

A una solución de producto intermedio 4 (0,1 g, 0,26 mmol) y producto intermedio 5 en DMF (2 ml) se le añadió HATU (98 mg, 0,26 mmol). La solución de reacción se agitó durante 30 min a temperatura ambiente y a continuación se diluyó con EtOAc (50 ml) y se lavó con solución acuosa diluida de NaHCO₃ (2 x 50 ml). La capa orgánica se secó (MgSO₄), se filtró y a continuación se concentró. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna rápida (MeOH/CH₂Cl₂ 10%), obteniéndose 0,12 g (68%) de producto intermedio 6.

El producto intermedio 6 (0,12 g, 0,18 mmol) se agitó durante 10 min en HCl 4,0 M/dioxano (1 ml). La solución se concentró y a continuación se agitó en EtOAc, formándose un precipitado que se recogió por filtración y se secó a vacío, obteniéndose 0,16 g de producto intermedio 7 en forma de sólido amarillo claro. EM (calc.): 581,32; MS (ESI) m/e (M+1H)⁺: 582,25.

Síntesis del compuesto 3 - sonda de actividad de la Btk a) HATU/TEA, DMF.

Esquema 3:



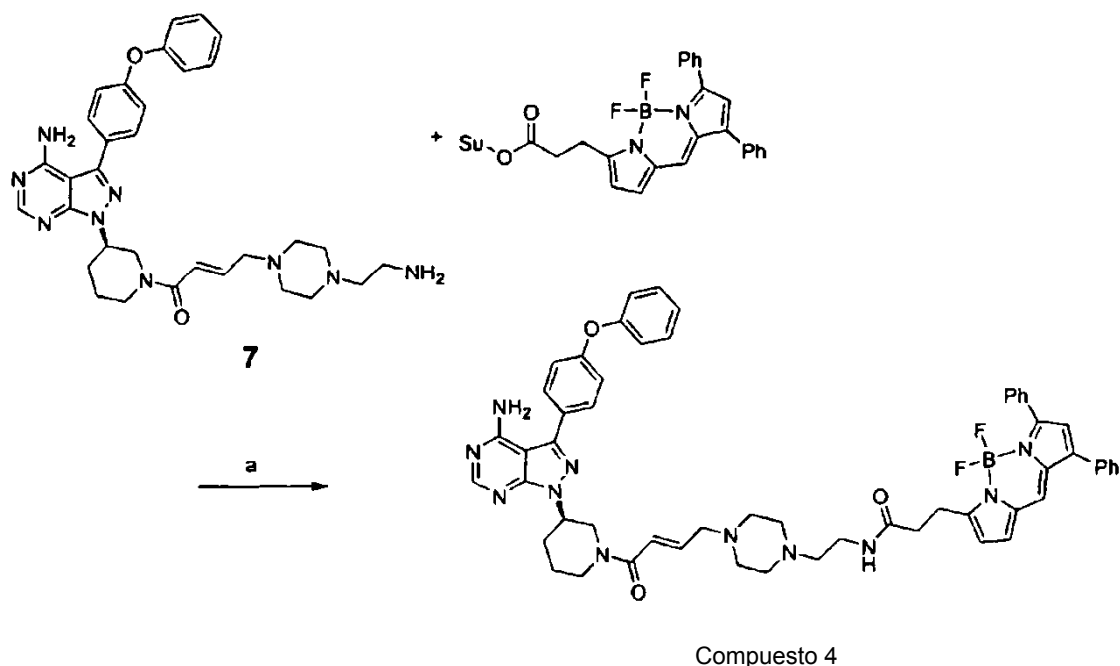
Compuesto 3

A una solución de producto intermedio 7 (40 mg, 69 μmol) y ácido 4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propiónico (10 mg, 34 μmol) en DMF (1 ml) se le añadió TEA (40 μl) y HATU (14 mg, 38 μmol). La solución se agitó durante 1,5 h a temperatura ambiente y a continuación se diluyó con EtOAc (50 ml) y se lavó con solución acuosa diluida de NaHCO₃ (2 x 50 ml). Las capas acuosas se combinaron y se volvieron a extraer con EtOAc (20 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron (MgSO₄), se filtraron y a continuación se concentraron. El residuo resultante de color naranja marrónáceo se purificó por cromatografía en columna rápida (MeOH/CH₂Cl₂ 20%), obteniéndose 25 mg (85%) de compuesto 3 en forma de sólido naranja marrónáceo. EM (calc.): 855,43; MS (ESI) m/e (M+1H)⁺: 856,25.

Síntesis del compuesto 4

Síntesis del compuesto 4: a) TEA/THF

Esquema 4:



Compuesto 4

5 A una solución de producto intermedio 7 (11 g, 20 μmol) y TEA (0,5 ml) EN THF (3 ml) se le añadió 4,4-difluoro-5,7-difenil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-propionato de succinimidilo (5 mg, 9,7 μmol). Tras agitar durante 4,5 h a temperatura ambiente, la solución de reacción se diluyó con EtOAc (50 ml) y se lavó con solución acuosa diluida de NaHCO_3 (1 x 50 ml). La capa orgánica se secó (MgSO_4), se filtró y a continuación se concentró. El residuo rojo brillante resultante se purificó por cromatografía en columna rápida (MeOH/ CH_2Cl_2 20%), obteniéndose 7,7 mg (81%) de compuesto 4 en forma de sólido rojo espumoso. EM (calc.): 979,46; MS (ESI) m/e ($\text{M}+1\text{H}$): 980,32.

10 Procedimientos de ensayo y utilización de sondas de actividad de la Btk

15 En algunas formas de realización, se analizó la capacidad de una sonda de actividad de la Btk de prueba para marcar la Btk incubando concentraciones crecientes de la sonda con una cantidad de enzima purificada. Tras esta etapa, la proteína marcada con BODIPY se visualizó tras un SDS-PAGE mediante el escaneo del gel con un densitómetro o un escáner de fluorescencia. En el caso de la sonda de actividad de la Btk ilustrativa, el compuesto 3, la intensidad de la banda de proteína marcada aumentó de forma directamente proporcional a la concentración de sonda añadida y alcanzó la saturación a $\sim 1 \mu\text{M}$, lo que indica que la sonda marcó cuantitativamente la Btk (figura 2b).

20 Además, la marcación con sonda se redujo sustancialmente si la Btk se preincubó con ATP- γ -S o compuesto 2 (figura 2c), lo que indica que la sonda de actividad de la Btk, al igual que su compuesto original 2, modifica de forma irreversible la Btk en el bolsillo de unión a ATP. A partir de estudios estructurales, se deduce que la activación de la Btk por fosforilación en la tirosina 551 tiene lugar a través de un cambio conformacional que hace que el bolsillo de unión a ATP sea accesible al sustrato.

30 En otras formas de realización, la determinación de si una sonda de actividad de la Btk de prueba sólo accede al bolsillo de unión de ATP y lo marca cuando la Btk se encuentra en su conformación fosforilada, y no en su conformación no fosforilada, se llevó a cabo comparando la Btk fosforilada, activa, marcada con sonda, con una Btk que se había desfosforilado *in vitro* mediante tratamiento con fosfatasa. Si el tratamiento con fosfatasa disminuye considerablemente la intensidad de la marcación (véase, por ejemplo, la figura 2d para una sonda de actividad de la Btk ilustrativa, compuesto 3), entonces la sonda marca preferentemente la forma fosforilada de la Btk. Sin pretender limitar el alcance de los procedimientos descritos en la presente memoria, en algunas formas de realización la marcación residual observada en el carril correspondiente a la Btk tratada con fosfatasa de la figura 2 representa una desfosforilación incompleta, aunque se detectó poca o ninguna fosforilación de tirosina residual con el anticuerpo 4G10 antifosfotirosina independiente de la secuencia. En algunas formas de realización, la desnaturalización parcial del dominio de la cinasa durante el tratamiento con fosfatasa permitió el acceso de la sonda al bolsillo de ATP en una pequeña fracción de la población de enzima.

Para evaluar la permeabilidad a través de las células y la especificidad de marcado en células intactas para una sonda de actividad de la Btk de prueba, se utilizaron células 293H de mamífero que expresaban de forma temporal o estable formas marcadas con epítipo de la Btk y/o PLC γ 2, un sustrato endógeno para la Btk en los linfocitos B. Por ejemplo, en este sistema, la fosforilación del PLC γ 2 en la tirosina 1217 demuestra la actividad de la Btk expresada ectópicamente (figura 3a). En experimentos de captura ("pull-down"), utilizando bolas recubiertas con Ni-NTA para purificar Btk marcada con His, la Btk marcada con His expresada temporalmente en células 293H se marcó de manera eficiente cuando se incubaron lisados con una sonda ilustrativa (compuesto 3), antes (figura 3B, carril 2) o después (figura 3B, carril 3) de la captura de Ni-NTA. No se observó marcación en las células no transfectadas, lo que confirmó que la sonda marcaba la Btk. En células 293H que coexpresaban de forma estable Btk y PLC γ 2 tratados con concentraciones crecientes de sonda, se observó una marcación dependiente de la dosis de una sola banda principal de proteína del peso molecular esperado para la Btk, con una marcación escasa e inespecífica de otras proteínas (figura 3c). Una correspondiente inhibición dependiente de la dosis de la fosforilación de PLC γ 2 en la Tyr 1217 indica que la unión irreversible de la sonda elimina la actividad de cinasa constitutiva de la Btk. Se estima que la EC₅₀ para la marcación de la Btk es de ~0,2 μ M, lo que es coherente con un valor correspondiente de IC₅₀ de ~0,3 μ M para la inhibición con sonda de fosforilación de PLC γ 2 cuantificada de forma independiente por un procedimiento ELISA. Estos resultados indican que la sonda de la Btk atraviesa la membrana celular y se puede utilizar para marcar selectivamente la Btk e inhibir su actividad de cinasa en células intactas.

En algunas formas de realización, se utiliza un sistema de expresión temporal combinado con mutagénesis dirigida al sitio para evaluar los requisitos estructurales de la enzima para la marcación con sonda en las células y para determinar si una sonda de actividad de la Btk de prueba modifica la Cys 481 en la Btk. Por ejemplo, se evaluó la marcación con sonda en células 293H que coexpresaban temporalmente PLC γ 2 y formas naturales o mutantes de la Btk (figura 3d). Una mutación de Cys 481 a Ala eliminó la marcación por la sonda de actividad de la Btk ilustrativa, el compuesto 3, pero redujo sólo ligeramente la actividad de cinasa de la Btk. La mutación del residuo de Lys 430 catalítico a Ala inactivó la actividad de cinasa, pero no tuvo ningún efecto sobre la marcación con la sonda. El mutante con un cambio de bucle de activación de Tyr 551 a Ala también resultó marcado, lo que sugiere que esta mutación en la Btk produce una enzima parcialmente activa.

Las sondas descritas en la presente memoria marcan la Btk en la Cys 481 no catalítica y, en algunas formas de realización, la marcación con sonda no necesita el mecanismo catalítico de por sí. De este modo, difieren de las sondas canónicas basadas en la actividad que se dirigen directamente al mecanismo catalítico de la enzima. En algunas formas de realización, la Btk experimenta un cambio conformacional dependiente de la fosforilación que está estrechamente unido a la unión a ATP y la activación de la cinasa. En algunas formas de realización, la marcación efectiva con una sonda requiere que la Btk se encuentre en su conformación activa a fin de detectar directamente la actividad de la Btk en las células. En otras formas de realización, la marcación efectiva con una sonda de actividad de la Btk no requiere que la Btk se encuentre en su conformación activa para detectar directamente la actividad de la Btk en las células.

En algunas formas de realización, para determinar si una sonda de la Btk de prueba detecta niveles endógenos de actividad de la Btk, se utilizaron linfocitos B cultivados en marcador, tales como linfocitos B Ramos o DOHH2. Por ejemplo, se observó una marcación de la Btk dependiente de la dosis (utilizando la sonda de actividad de la Btk ilustrativa, el compuesto 3) con una EC₅₀ para la marcación de ~0,2 μ M, coherente con una IC₅₀ de 0,23 μ M determinada para la sonda en un ensayo funcional que cuantificó la movilización de calcio intracelular en células Ramos tras la activación de los receptores de linfocitos B (tabla 1; figura 4a). En cambio, el compuesto de sonda 4 no es una sonda de actividad de la Btk fuerte, porque no marca significativamente una banda correspondiente a la Btk en las células DOHH2 (figura 4b).

En algunas formas de realización, se utiliza un experimento de competencia para evaluar la idoneidad de una sonda de actividad de la Btk de prueba para determinar las IC₅₀ del inhibidor en los linfocitos B. Por ejemplo, la marcación con sonda con la sonda de actividad de la Btk ilustrativa, el compuesto 3, resultó bloqueada por la preincubación con el compuesto 2 de una manera dependiente de la dosis, dando un valor de IC₅₀ para el compuesto 2 (~10 nM) parecido al obtenido con el ensayo de movilización de calcio (tabla 1; figura 4c). Tal como se describe en la presente memoria, también se han llevado a cabo con éxito ensayos de competencia parecidos utilizando inhibidores reversibles de la Btk (figura 5a). Por consiguiente, en otras formas de realización, los estudios de competencia de la sonda se utilizan como medio alternativo de cuantificación de la potencia de los inhibidores de la Btk en ensayos celulares.

Procedimientos para la utilización de sondas de actividad de la Btk en la evaluación del comportamiento farmacodinámico

Para explorar la utilidad de una sonda de actividad de la Btk de prueba en la evaluación de las propiedades farmacodinámicas (PD) de un compuesto en modelos de farmacología preclínica, se utilizó enzima Btk marcada de ratón *ex vivo* en esplenocitos aislados de ratones Balb/c utilizando la sonda de prueba. Dado que la Btk de ratón y de humano comparten una identidad de secuencia suficiente al nivel de los aminoácidos, debería producirse una reactividad cruzada de una sonda de prueba con la enzima de ratón. Por ejemplo, en una forma de realización, para la sonda de actividad de la Btk ilustrativa, el compuesto 3, se detectó una banda visible del PM apropiado cuando se

activaron esplenocitos de ratón con anti-IgM antes de la marcación. Aunque se observó un mayor nivel de marcado de fondo en los esplenocitos en comparación con las células 293H transfectadas, la marcación únicamente de la banda de 70 kD se eliminó eficazmente por competencia mediante inhibidores irreversibles (compuesto 2) y reversibles (compuesto 1) de la Btk, lo que sugiere que dicha banda era en efecto Btk de ratón (figura 5a). La marcación de la Btk es confirmada además mediante la detección de la Btk a 70 kD por transferencia Western (figura 5a).

En un estudio farmacodinámico ilustrativo, se incubaron sucesivamente esplenocitos obtenidos de ratones no tratados previamente en diferentes instantes tras la administración oral con un inhibidor irreversible de la Btk con una sonda de prueba a fin de determinar la detección de la modulación diana *in vivo* mediante etiquetado *ex vivo*. Con la sonda de actividad de la Btk ilustrativa, el compuesto 3, se observó competencia por la marcación con sonda y la actividad de la Btk de linfocitos B esplénicos fue eliminada por el inhibidor irreversible durante por lo menos 14 horas tras la administración, reapareciendo dicha actividad al cabo de 24 horas (figuras 5b y 5c). Los niveles totales de proteína Btk se mantuvieron relativamente constantes durante todo el tiempo, tal como muestra la inmunotransferencia anti-Btk, lo que sugiere que el compuesto 2 inhibió la actividad de la Btk en lugar de agotar el nivel celular de proteína Btk. En algunas formas de realización, la reaparición de la actividad de la Btk representa el recambio de la Btk en esplenocitos tras la eliminación del inhibidor de la circulación.

Para confirmar adicionalmente que la marcación por parte de la sonda de prueba *ex vivo* refleja la actividad de señalización del BCR, se comparó el perfil de marcado en esplenocitos de ratones xid con su cepa original CBA natural isogénica. Por ejemplo, los ratones xid son fenotípicamente nulos para la actividad de la Btk debido a una mutación de Arg 28 a Cys en el dominio PH de la Btk que impide la capacidad de unión del fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). La enzima mutante es defectuosa en la localización de membrana, permanece en el citoplasma en una conformación inactiva y, por consiguiente, no transduce señales tras la activación del BCR. Con la sonda de actividad de la Btk ilustrativa, se observa una marcación significativa de la Btk en esplenocitos de ratones CBA que se bloqueó mediante la administración oral previa del compuesto 2, mientras que se observó poca o ninguna marcación en las muestras procedentes de ratones xid (figura 5c). En una forma de realización, la sonda de actividad de la Btk discrimina contra la Btk inactiva de ratones xid, lo que concuerda con la selectividad conformacional de este reactivo y confirma que la marcación con sonda refleja la actividad de la Btk funcional en la transducción de señal de BCR *in vivo*.

En otro aspecto, las sondas de actividad de la Btk descritas en la presente memoria se pueden utilizar para caracterizar y medir las características farmacodinámicas de los compuestos que interactúan con la Btk, no sólo en modelos animales de enfermedades, sino también en pacientes humanos u otros mamíferos. A título únicamente ilustrativo, en algunas formas de realización, el compuesto 3 evalúa las características farmacodinámicas en un modelo murino de la inflamación. Se llevaron a cabo experimentos de respuesta a la dosis en ratones provocados con LPS con los inhibidores irreversibles y reversibles de la Btk y se cuantificaron los resultados de la marcación *ex vivo* por densitometría. Se observó una inhibición dependiente de la dosis de la marcación con sonda para los dos compuestos, aunque la inhibición con el inhibidor reversible, menos potente, se observó únicamente en dosis sustancialmente más altas y fue menos completa (figura 6). Se obtuvieron resultados parecidos en ausencia de provocación con LPS, y las respuestas comparativas a la dosis para la marcación con sonda son coherentes con las respuestas a la dosis observadas en dos estudios de eficacia y modulación de biomarcadores de los dos compuestos en un modelo murino de artritis inducida por colágeno.

Ejemplos

Reactivos

Los reactivos bioquímicos, medios de cultivo de tejidos, antibióticos y anticuerpos utilizados en este estudio fueron adquiridos de fuentes comerciales y se utilizaron según las instrucciones del fabricante. Las líneas celulares 293H (11631-017, Invitrogen), DOHH2 (ACC 47, DSMZ) y Ramos RA 1 (CRL-1596, ATCC) se cultivaron rutinariamente en D-MEM y RPMI, respectivamente, suplementados con FBS al 10% y aminoácidos no esenciales (Invitrogen). Se incluyeron los antibióticos blasticidina y G418 (Invitrogen) en el medio de cultivo cuando resultaba necesario para seleccionar o mantener las células transfectadas. La Btk activa recombinante y las bolas de Ni-NTA sefarosa fueron adquiridas a Upstate Biochem y a Qiagen, respectivamente. La CIP (fosfatasa alcalina intestinal bovina) se obtuvo a través de NEB (New England Biolabs). Los anticuerpos contra la Btk (anticuerpos monoclonales de ratón anti-Btk humana a través de BD Transduction Laboratories), el PLC γ 2, la fosfotirosina 1217-PLC γ 2, la fosfotirosina 4G10 (de Señalización Celular) y los anticuerpos anti-IgM humana (de Jackson Laboratory) se diluyeron y utilizaron en la detección por transferencia Western según las recomendaciones de los fabricantes.

Ejemplo 1 - ensayos de cinasa

Se determinó la actividad de cinasa de la Btk, Abl, c-met, ITK, LCK y EGFR utilizando la metodología de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia con resolución de tiempo (TR-FRET). Se realizaron mediciones en un volumen de reacción de 50 μ l utilizando placas de ensayo de 96 pocillos. Se incubaron enzima cinasa, inhibidor, ATP (en la Km para la cinasa) y sustrato peptídico 1 μ M (biotina-AVLESEEEYSSARQ-NH2) en un

tampón de reacción compuesto por Tris 20 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ (5-25 mM, en función de la cinasa), MnCl₂ (0-10 mM), DTT 1 mM, 0,1 mM EDTA, 0,01% de albúmina de suero bovino, 0,005% de Tween-20 y 10% de DMSO a pH 7,4 durante una hora. La reacción se inactivó mediante la adición de 1,2 equivalentes de EDTA (con respecto al catión divalente) en 25 µl de 1x tampón Lance (Perkin-Elmer). Se añadieron estreptavidina-APC (Perkin-Elmer) y anticuerpo Eulabeled p-Tyr100 (Perkin-Elmer) en 1x tampón Lance en un volumen de 25 µl a fin de obtener concentraciones finales de 100 nM y 2,5 nM, respectivamente, y la mezcla se dejó incubar durante una hora. La señal de TR-FRET se midió en un lector de placas multimodal con una longitud de onda de excitación de 330 nm y longitudes de onda de detección de 615 nm y 665 nm. La actividad se determinó mediante la relación entre la fluorescencia a 665 nm y a 615 nm. Para cada compuesto, la actividad enzimática se midió a diversas concentraciones de compuesto. Se llevaron a cabo reacciones negativas de control en ausencia del inhibidor en replicados de seis, y se utilizaron dos controles sin enzima para determinar los niveles basales de fluorescencia. Las constantes de inhibición { $K_i(\text{app})$ } se obtuvieron utilizando el programa BatchKi (23). Las IC₅₀ se obtuvieron de acuerdo con la siguiente ecuación: $IC_{50} = \{K_i(\text{app}) / (1 + [\text{ATP}] / K_m\text{ATP})\} + [E]_{\text{total}} / 2$; para todas las cinasas, [ATP] = KmATP, [Btk]_{total} = 0,5 nM y [Lck]_{total} = 6 nM.

Ejemplo 2 - marcación de la Btk *in vitro*

Para etiquetar la Btk *in vitro*, se diluyó el compuesto 3 a partir de una solución madre 10 µM en DMSO a las concentraciones indicadas (figura 2) y se incubaron las soluciones con 1 µg (0,13 µM) de la Btk activa purificada en 100 µl de tampón de reacción (Tris-HCl 20 mM, pH 7,2, NaCl 150 mM) durante 1 hora a 37°C. Las reacciones se detuvieron y la marcación se inactivó por ebullición en 1x tampón de muestreo SDS (SDS 2%, Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, 2-mercaptoetanol 5%) a 90°C durante 10 min. A continuación, las mezclas de reacción se fraccionaron por electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida en gradiente (4-20%) (Invitrogen) para separar el compuesto 3 sin incorporar de la Btk marcada. El gel se escaneó con un escáner Molecular Dynamics Typhoon (Ex = 532 nm y Em = 580 nm) para detectar las bandas proteínicas de la Btk marcada y éstas se cuantificaron con el software Image Quant. La desfosforilación de la Btk se llevó a cabo incubando 1 µg de la Btk purificada (Upstate Biochem) con 10 unidades de CIP (NEB) en una mezcla de reacción de 10 µl a 37°C durante 1 hora, y la reacción se detuvo mediante la adición de ortovanadato de sodio 10 mM. Se utilizó la Btk desfosforilada en los subsiguientes experimentos de marcado sin ninguna purificación adicional.

Ejemplo 3 - marcación de la Btk en lisados celulares y células de mamífero intactas

La transfección temporal de células 293H se llevó a cabo utilizando un ADN plasmídico purificado en columna Qiagen y Transfectamine 2000 (Invitrogen) según las descripciones del fabricante. Se llevaron a cabo experimentos de marcado con sonda 24 horas después de la transfección mediante la incubación de las células transfectadas en medio con suero reducido (Opti-MEM 1, Invitrogen) que contenían el compuesto 3 diluido (0,1 µM) o mediante la adición del compuesto 3 apropiadamente diluido a lisados celulares durante 1 hora a 37°C. Se generó una línea celular estable que coexpresaba Btk y PLCγ2 por cotransfección de plásmidos PDEs (Invitrogen) que codificaban His6-Btk y PLCγ2-V5, seguido por la selección clonal de colonias doblemente resistentes a G418/blastocidina. Los clones candidatos se caracterizaron adicionalmente por inmunotransferencia para confirmar que la Btk transfectada estaba activa y fosforilada en los sitios de activación (Y551) y autofosforilación (Y223) (datos no mostrados). La línea celular coexpresora seleccionada se mantuvo rutinariamente en D-MEM que contenía FBS 10%, 1x aminoácidos no esenciales, 1x antibióticos y suplementado con 200 µg/ml de G418 y 25 µg/ml de blastocidina. Para marcar las células 293H transfectadas, se incubaron ~5 x 10⁵ células en medio condicionado que contenía 1 µM de compuesto 3 (por dilución directa en el medio a partir de una solución madre de 10 µM en DMSO) a 37°C durante 1 hora. A continuación, las células se recogieron y se lisaron mediante incubación en 50 µl de tampón de lisis celular (CelLytic M, Sigma) suplementado con 1x inhibidor de proteasa y 1x cócteles inhibidores de fosfatasa (Calbiochem) durante 10 min sobre hielo. Se determinaron las concentraciones de proteína en los lisados celulares mediante ensayo de proteínas de Bradford (Pierce). Se fraccionaron lisados equivalentes a 20 µg de proteína total en geles de SDS en gradiente del 4 al 20% (Invitrogen) y se escanearon con un densitómetro Typhoon, tal como se ha descrito anteriormente. La marcación de células Ramos se llevó a cabo de una manera idéntica, excepto que se utilizó medio RPMI.

Ejemplo 4 - Ensayo de flujo de calcio

Se llevó a cabo un ensayo de flujo de calcio según el protocolo descrito por el fabricante (Molecular Devices). De forma resumida, se lavaron linfocitos B Ramos en medio RPMI suplementado con FBS 10% y se volvieron a disponer en medio bajo en suero a razón de aproximadamente 5 x 10⁵ células por 100 µl por cada pocillo en placas de 96 pocillos. Los compuestos que se deben someter a ensayo se disolvieron en DMSO, se diluyeron hasta concentraciones apropiadas en medio bajo en suero (concentraciones finales de 0 a 10 µM con un factor de dilución por etapas de 0,3), se añadieron a cada pocillo (la concentración final de DMSO fue del 0,01% en cada pocillo) y se incubaron a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5% durante 1 hora. A continuación se añadieron 100 µl de colorante de ensayo de calcio (kit de ensayo Calcium 3 de Molecular Devices) a cada pocillo y la incubación se prolongó durante una hora. Las células tratadas con el compuesto se estimularon con un anticuerpo de cabra anti-IgM humana (80 mg/ml) y la señal de movilización del calcio se leyó en un equipo Flexstation II 384 (Molecular Devices) a longitudes de onda de excitación y emisión de 485 nm y 538 nm, respectivamente, durante 200 segundos. Las

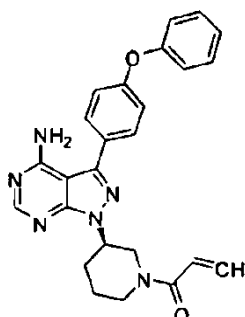
unidades de fluorescencia relativa (RFU) y los valores de concentración de inhibición del cincuenta por ciento (IC₅₀) se registraron y analizaron con el programa SoftMax (Molecular Devices).

Ejemplo 5 - marcación de la Btk en esplenocitos de ratón ex vivo

5 Todos los estudios con animales se llevaron a cabo de acuerdo con los protocolos aprobados por el Institutional
Animal Care and Use Committee de Celera. A los ratones hembra Balb/c se les administraron por vía oral las
cantidades indicadas (mg/kg) de inhibidores de la Btk formulados en CMC 0,5%/Tween 80 0,2%/agua o de tampón
10 de formulación sin inhibidor (ratones tratados con vehículo). El LPS se inyectó por vía intraperitoneal a razón de 20
µg/ratón 30 minutos después de la administración de compuesto. Se administraron dosis de recuerdo a los ratones
en las mismas cantidades de inhibidor dos horas después de la inyección de LPS. En esta pauta terapéutica, la
expresión "ratones tratados con vehículo" se refiere a ratones que recibieron inyecciones de tampón de formulación
y LPS en ausencia de inhibidor. "Ratones sin tratamiento previo" se refiere a ratones que recibieron únicamente
15 solución salina. Los ratones se sacrificaron por asfixia con CO₂ 16 horas después de la primera administración del
compuesto y sus bazos se recogieron en PBS sobre hielo para el aislamiento de esplenocitos. Los bazos se
tritularon suavemente entre 2 portaobjetos de microscopio de vidrio para liberar los esplenocitos, y los eritrocitos de
las preparaciones de esplenocitos se lisaron sobre hielo utilizando tampón de lisis de glóbulos rojos (Sigma). El
tejido conjuntivo y los restos celulares se eliminaron por filtración a través de tamices celulares de 70 µm (Falcon).
20 Las preparaciones de esplenocitos lavadas, que contienen típicamente > 90% de linfocitos B vivas, se contaron, se
volvieron a suspender en medio RPMI frío y se marcaron con sonda, tal como se describe en el ejemplo 3.

REIVINDICACIONES

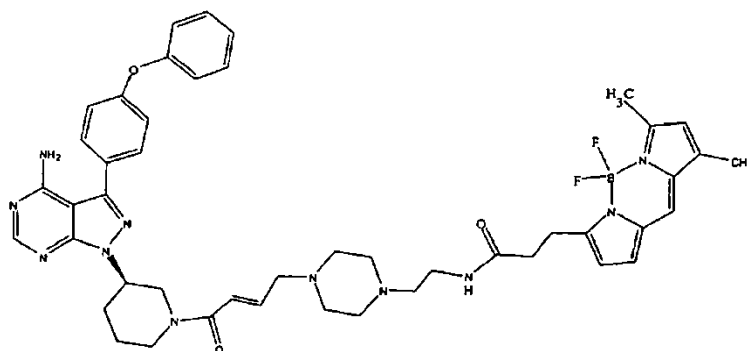
1. Sonda de actividad de la Btk que comprende un resto inhibidor de la Btk que se une covalentemente a un residuo de cisteína de una enzima Btk, un fluoróforo y un resto conector que une el resto inhibidor al fluoróforo, en la que el resto inhibidor es el siguiente:



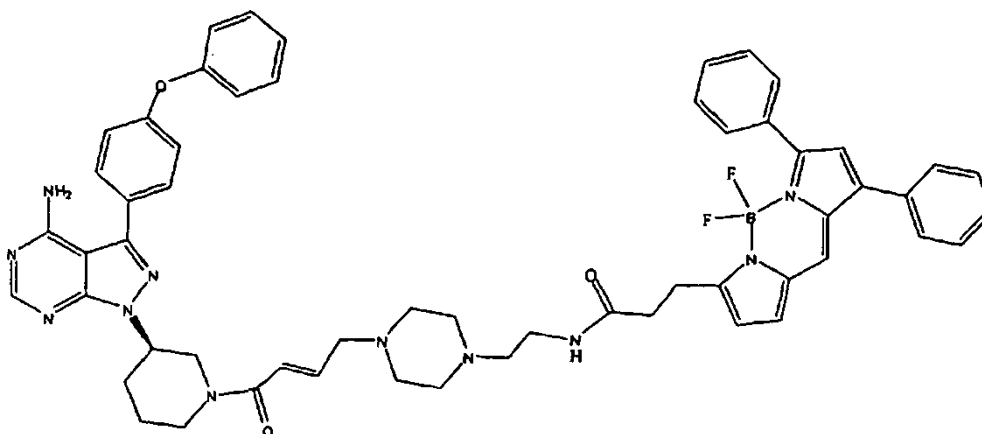
2. Sonda de actividad de la Btk según la reivindicación 1, en la que el fluoróforo es un fluoróforo Bodipy.

3. Sonda de actividad de la Btk según la reivindicación 1 o 2, en la que el resto conector se selecciona entre un enlace, un resto alquilo opcionalmente sustituido, un resto heterociclo opcionalmente sustituido, un resto amida opcionalmente sustituido, un resto cetona, un resto carbamato opcionalmente sustituido, un resto éster o una combinación de los mismos, opcionalmente en la que el resto conector comprende un resto heterociclo opcionalmente sustituido, opcionalmente en la que el resto heterociclo opcionalmente sustituido comprende un resto piperazinilo opcionalmente sustituido.

4. Sonda de actividad de la Btk según la reivindicación 2 de la estructura siguiente:



5. Sonda de actividad de la Btk según la reivindicación 2 de la estructura siguiente:

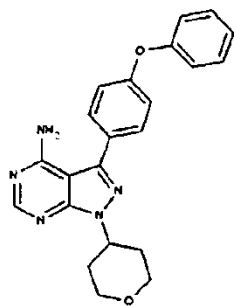


Núcleo

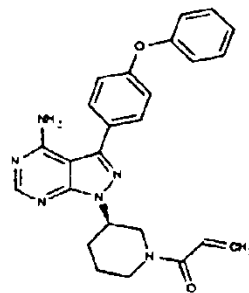
Conector

Bodipy 530

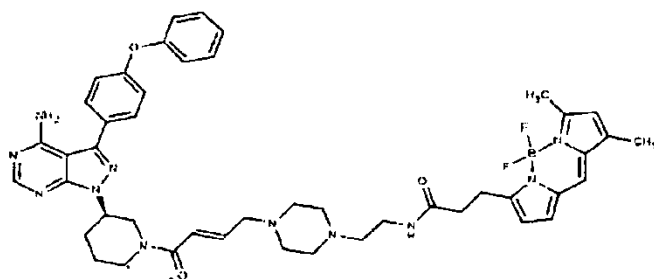
6. Sonda de actividad de la Btk según la reivindicación 1, para su utilización en la evaluación de la eficacia o las propiedades farmacodinámicas de un inhibidor de la Btk en un mamífero.
- 5 7. Sonda de actividad de la Btk para su utilización según la reivindicación 6, para evaluar la eficacia de un inhibidor potencial de la Btk en un mamífero mediante la administración de la sonda de actividad de la Btk al mamífero, medir la actividad de la sonda de actividad de la Btk en el mamífero o en células aisladas del mismo y comparar la actividad del resto indicador con un patrón.
- 10 8. Sonda de actividad de la Btk para su utilización según la reivindicación 6, para evaluar las propiedades farmacodinámicas de un inhibidor de la Btk en un mamífero mediante la administración de un inhibidor de la Btk a una pluralidad de mamíferos y medir la actividad de la sonda de actividad de la Btk en diferentes instantes tras la administración del inhibidor en el mamífero o en células aisladas del mismo.
- 15 9. Procedimiento para marcar o detectar una enzima Btk *in vitro*, comprendiendo dicho procedimiento de marcado la puesta en contacto de células o tejidos que expresan la enzima Btk con una sonda de actividad de la Btk según la reivindicación 1, o comprendiendo dicho procedimiento de detección la separación de las proteínas marcadas por una sonda de actividad de la Btk según la reivindicación 1 por electroforesis y la detección de la sonda de actividad de la Btk por fluorescencia.
- 20



Compuesto 1



Compuesto 2

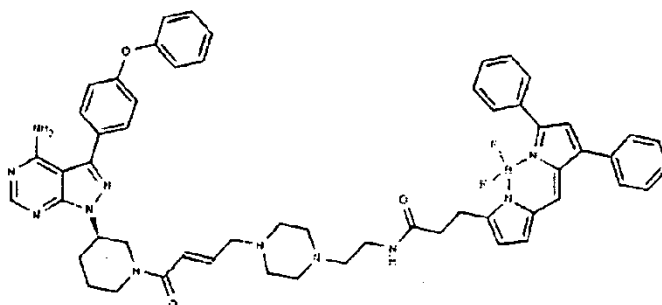


Núcleo

Conector

Bodipy FL

Compuesto 3



Núcleo

Conector

Bodipy FL

Compuesto 4

FIGURA 1

↓

Btk	RPIFIITEYMAN GCL LINYLREMRHR	Q06187
Bmx	YPLYLVTEYLSNG CL LINIRSHGKG	NM_203281.1
Tec	KPIYIVTEFME RGC LINFLRQRQGH	NM_003215.1
Tyk	KPLYIVTEFMEN GCL LINYLRENKGG	NM_003328.1
Itk	APICLVFEFME HC LSDYLRTRCRL	D13720.1
EGFR	STVQLITQLMP FGCL IDYVREHKDN	NM_005228.3
Erb2	STVQLVTQLMP YGCL IDHVRENRR	NM_004448.2
Erb4	PTIQLVTQLMP HGCL IYVVEHKDN	NM_005235.1
Jak3	PELRLVMEYIP SGCL RDFLQRHRAR	U70065.1
Blk	EPIYIVTEYMA RCCL IDFLKTDECS	P51451

FIGURA 2(a)

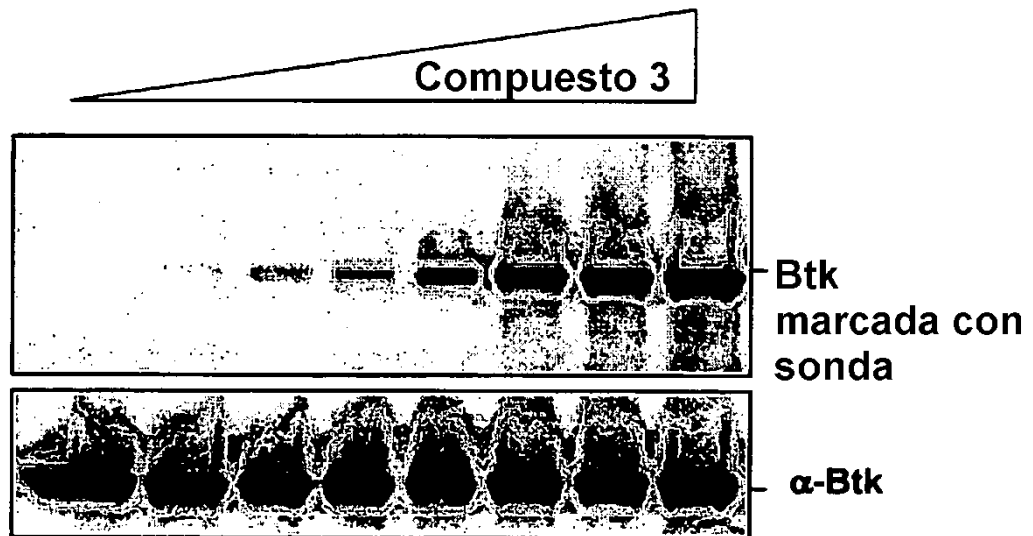


FIGURA 2(b)

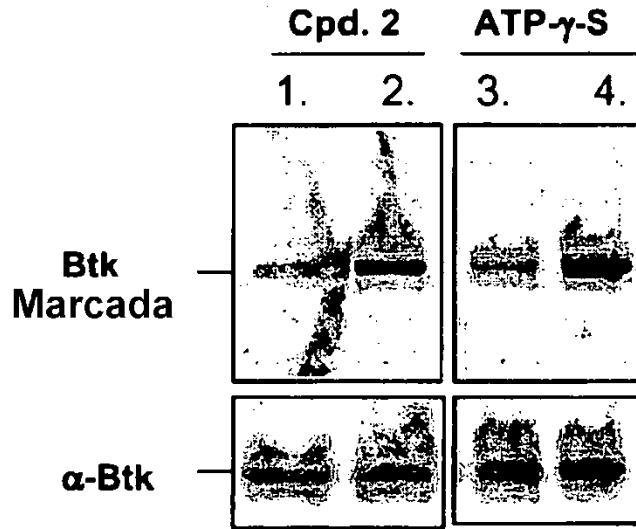


FIGURA 2(c)

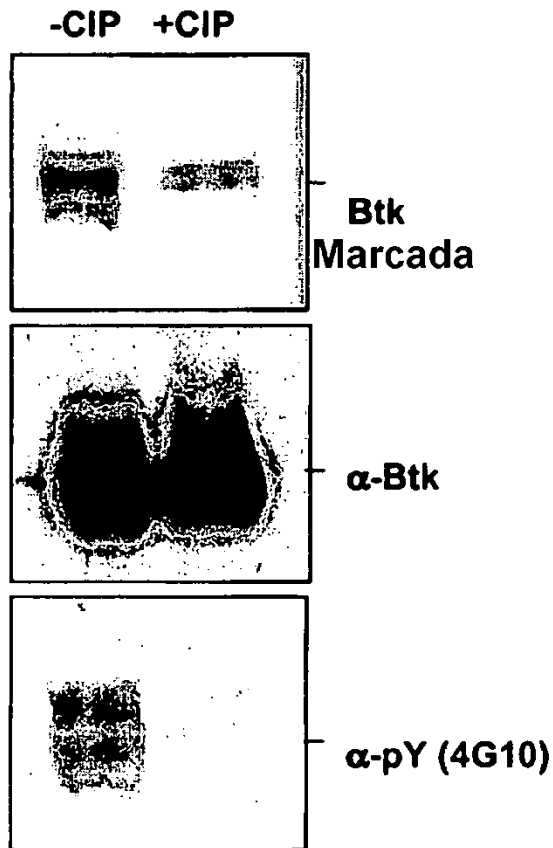


FIGURA 2(d)

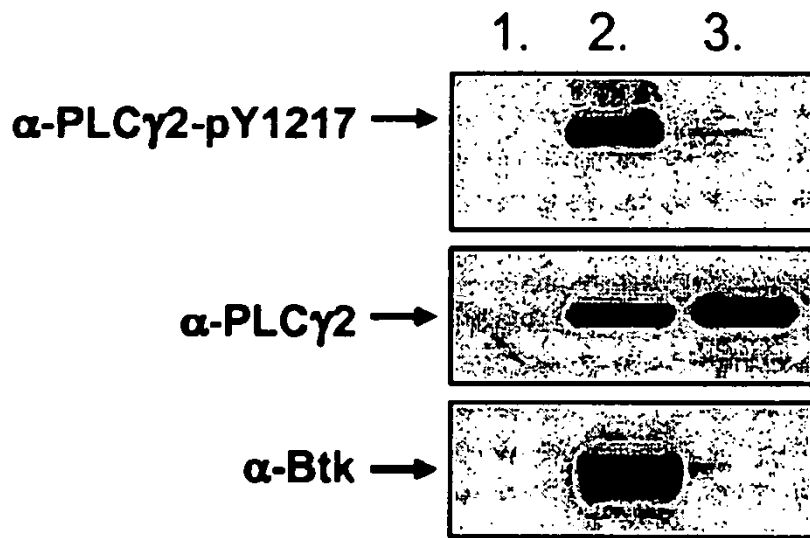


FIGURA 3 (a)

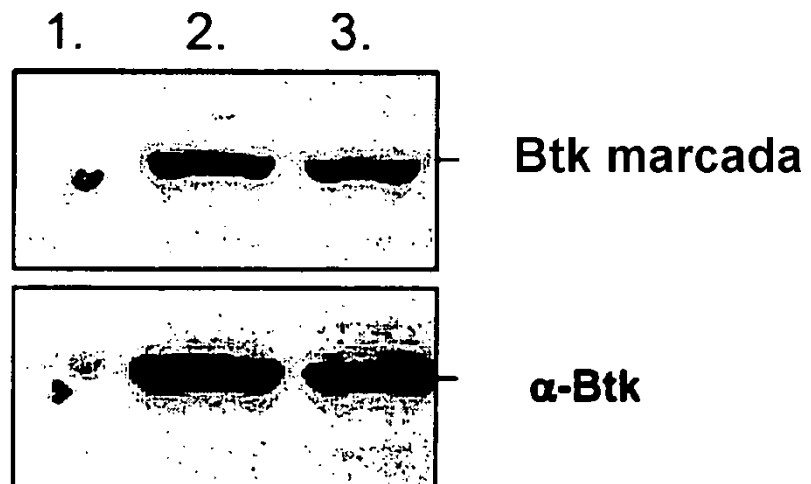


FIGURA 3(b)

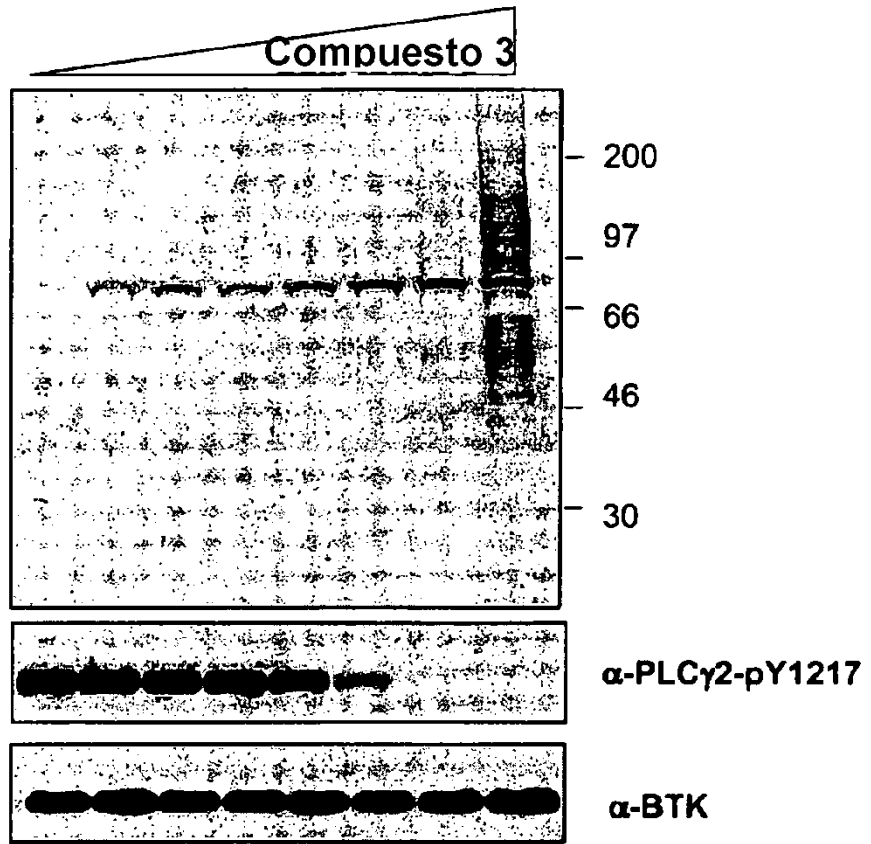


FIGURA 3(c)

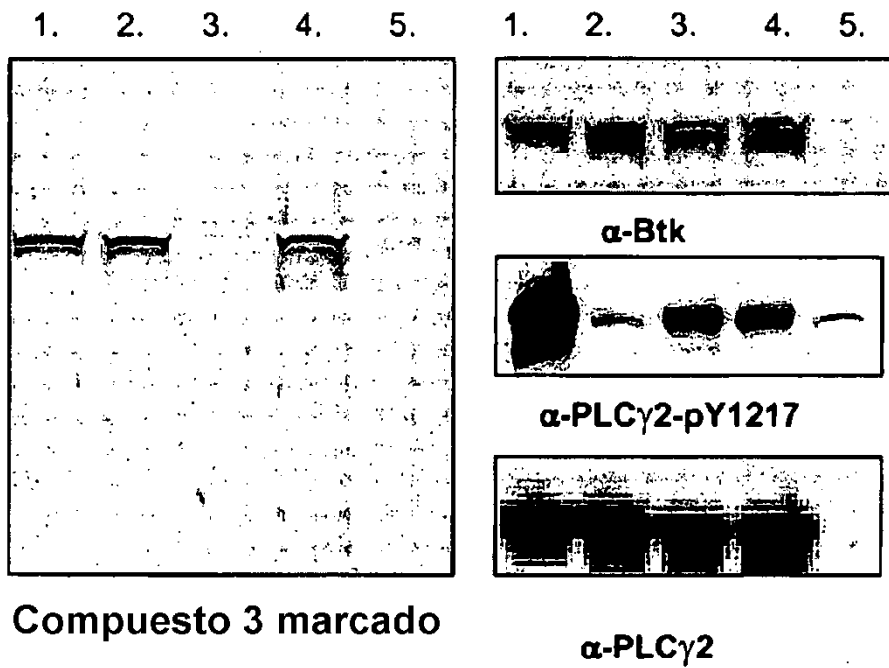


FIGURA 3(d)

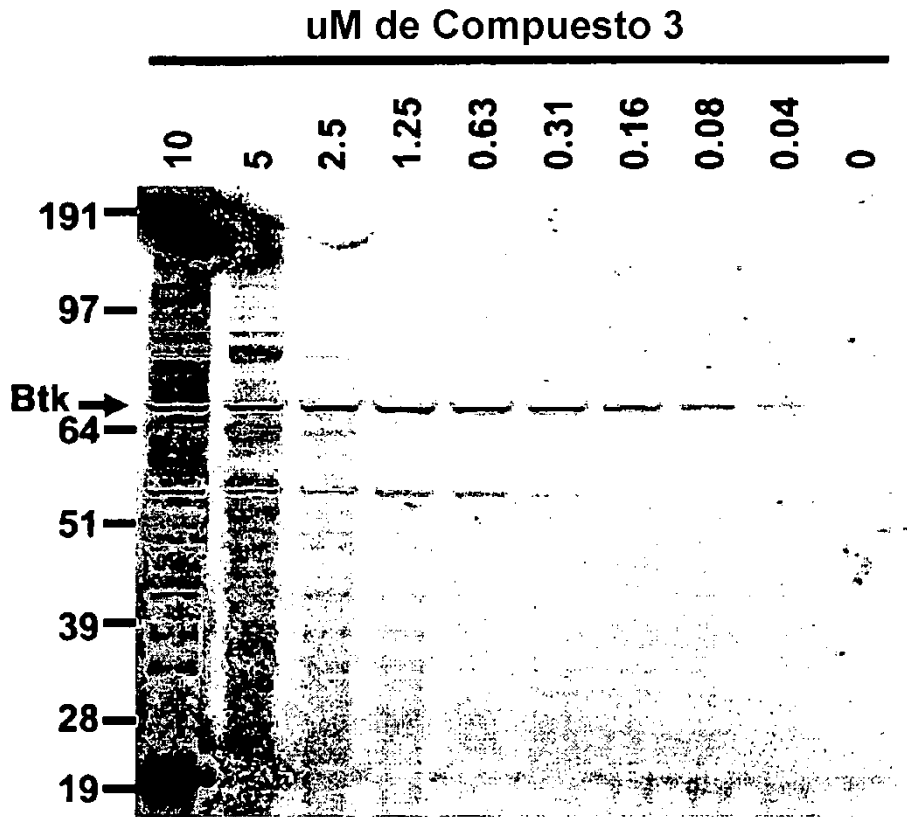


FIGURA 4(a)

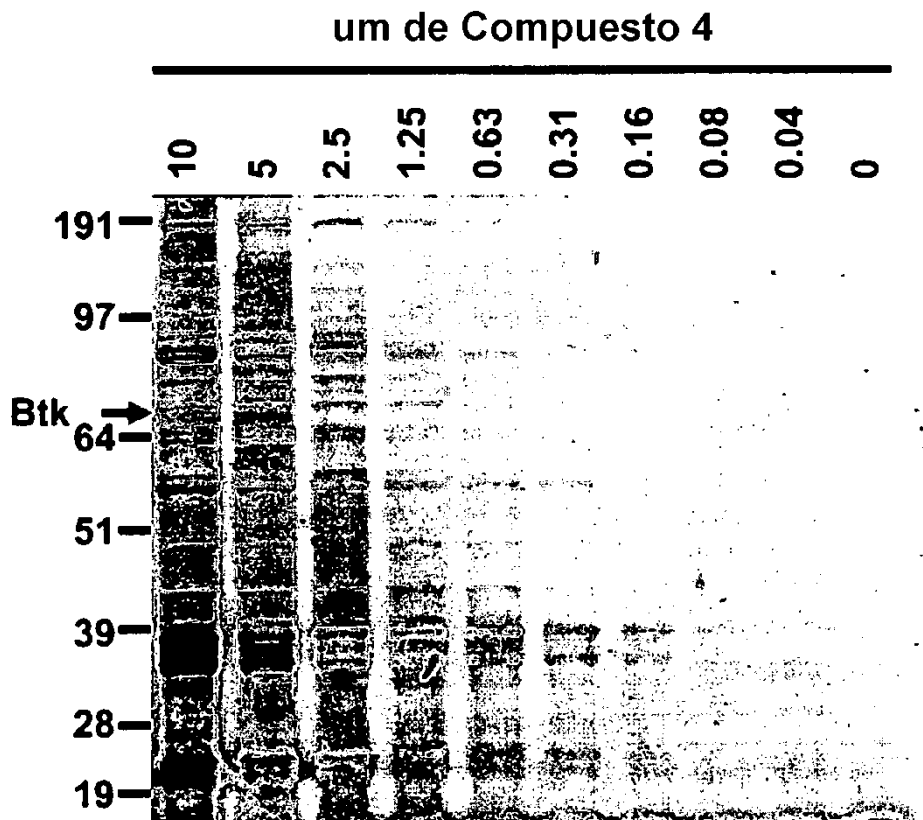


FIGURA 4(b)

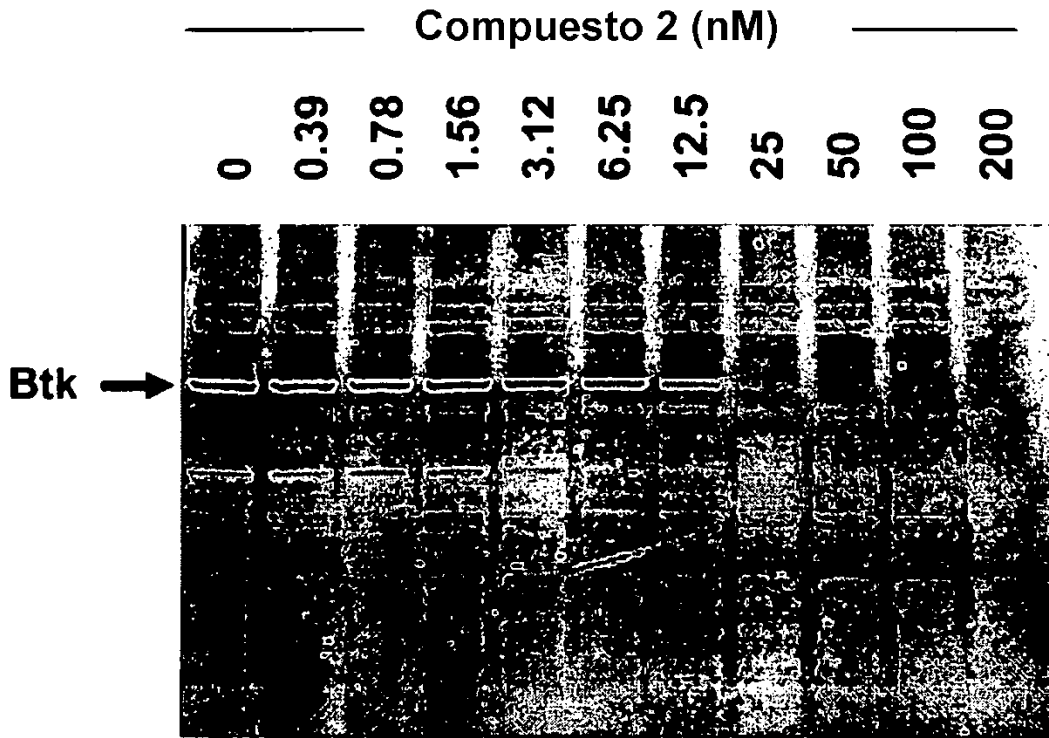


FIGURA 4(c)

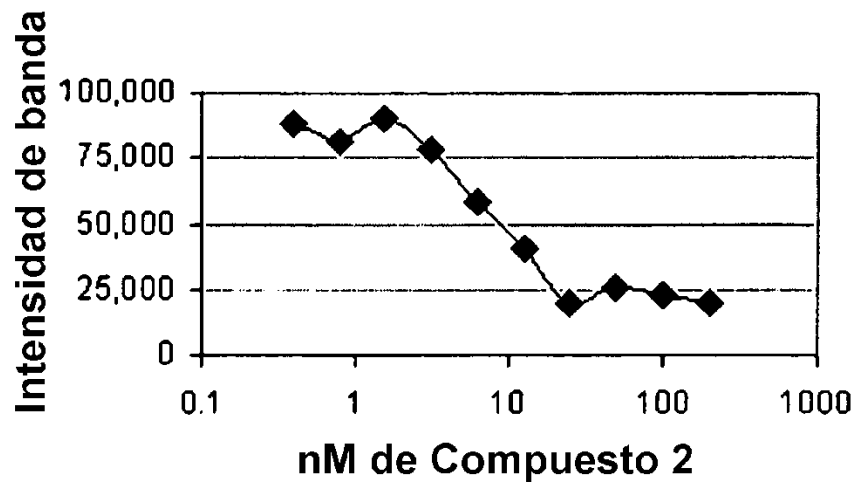


FIGURA 4(d)

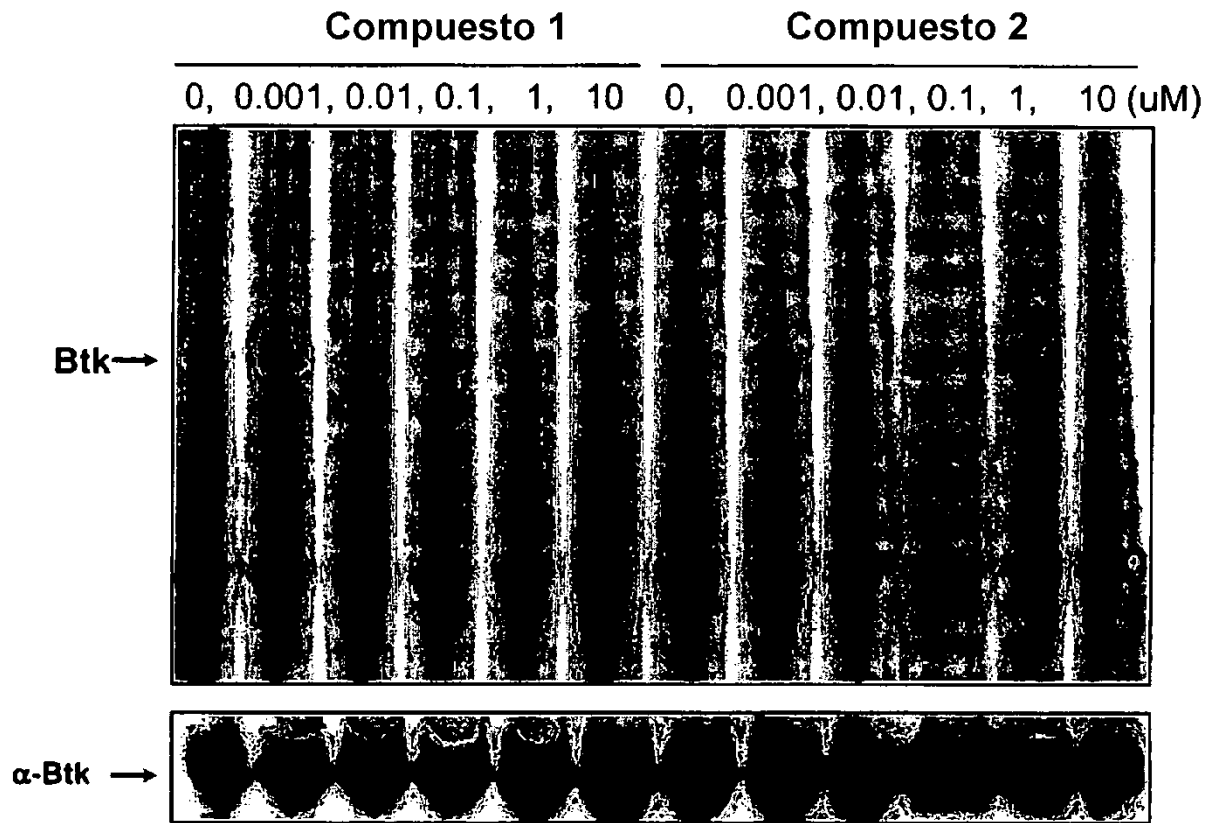


FIGURA 5(a)

FIGURA 5(b)

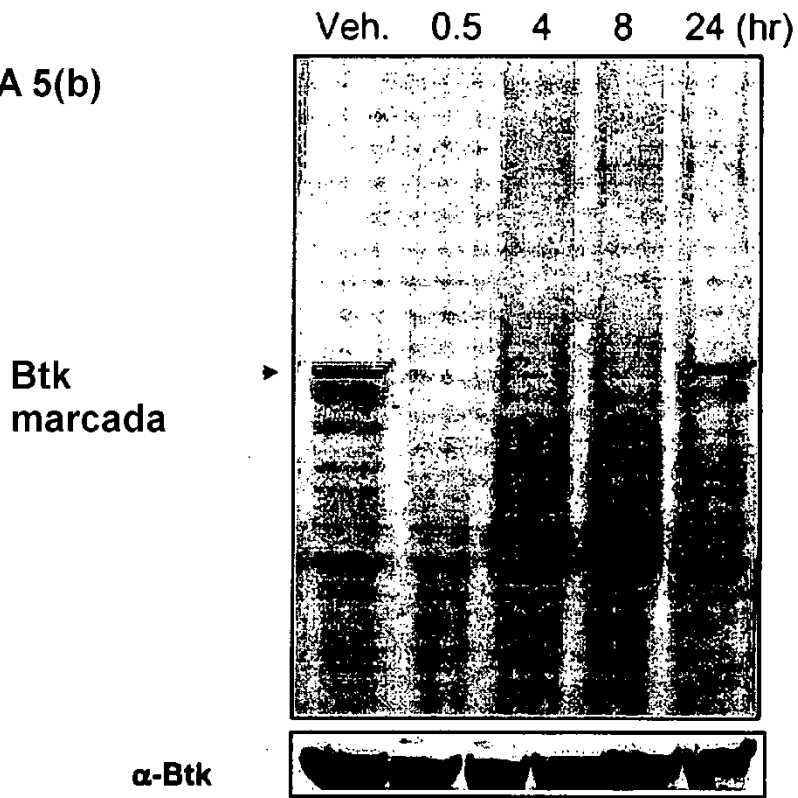


FIGURA 5(c)

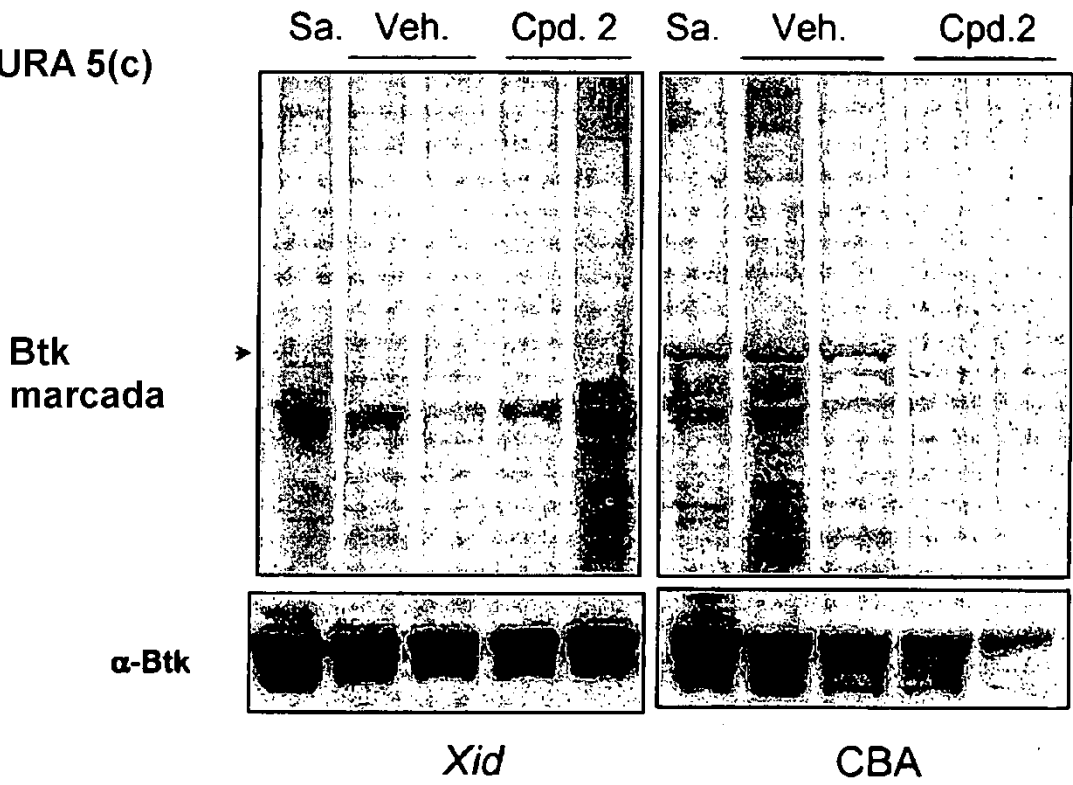


FIGURA 6(a)

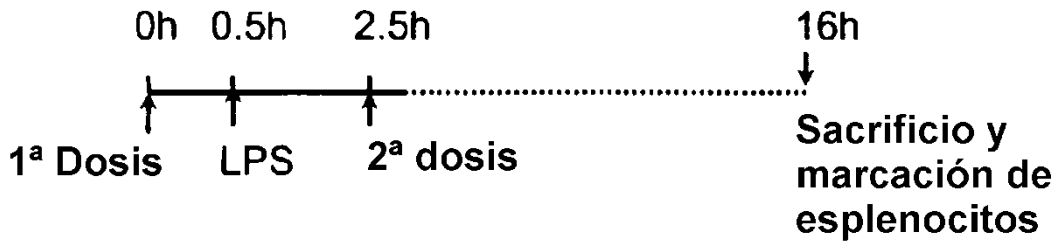


FIGURA 6(b)

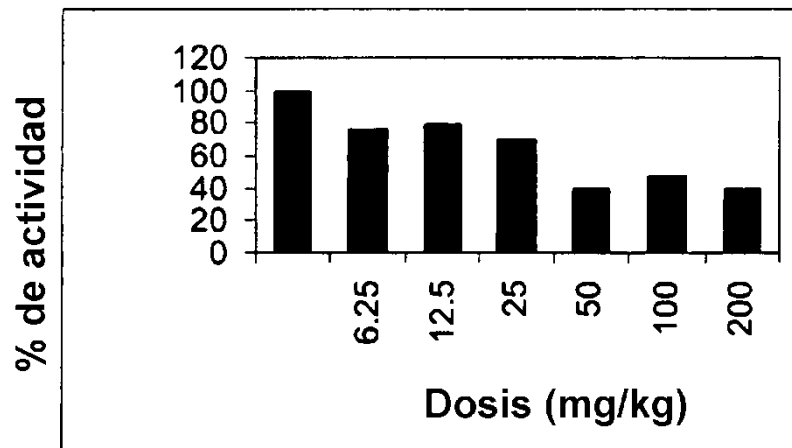
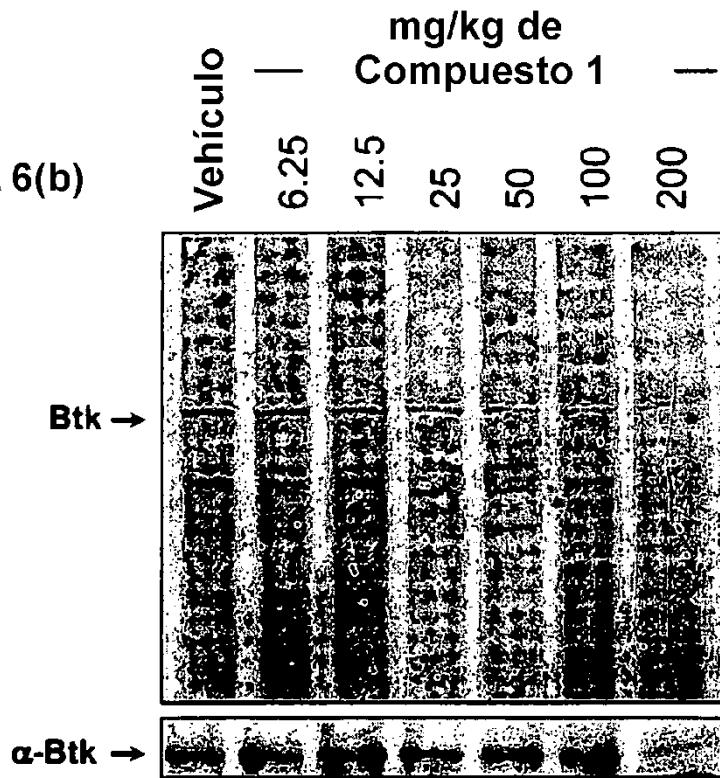
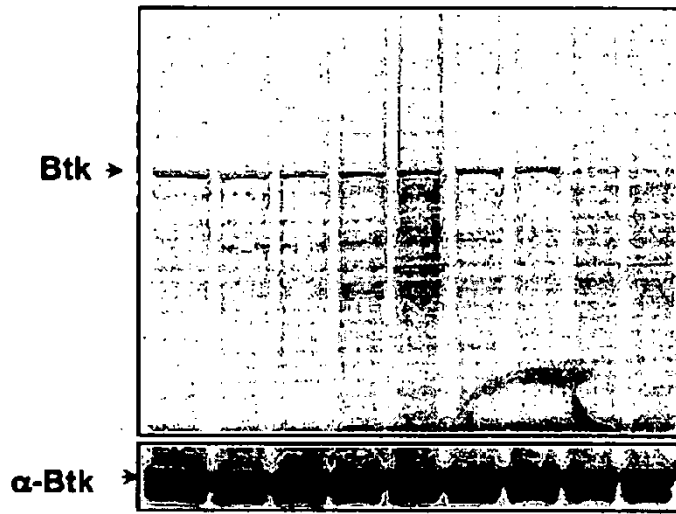


FIGURA 6(c) Sa. Veh. 0.1 1 10 (mg/kg)



Veh. Sa. 10 30 (mg/kg)

