

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 798**

51 Int. Cl.:

C07D 401/14 (2006.01)

A61K 31/517 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2009 E 09775477 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2013 EP 2379528**

54 Título: **Inhibidores de proteína cinasa**

30 Prioridad:

22.12.2008 EP 08380343

24.02.2009 US 154954 P

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

23.12.2013

73 Titular/es:

ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US

72 Inventor/es:

COATES, DAVID, ANDREW;
DE DIOS MAGANA, ALFONSO;
DE PRADO GONZALES, ANA;
DEL PRADO CATALINA, MIRIAM FILADELFA;
GARCIA PAREDES, MARIA, CRISTINA;
GELBERT, LAWRENCE, MARK;
KNOBELOCH, JOHN, MONTE;
MARTIN DE LA NAVA, EVA, MARIA;
MARTIN ORTEGA FINGER, MARIA, DOLORES;
MARTINEZ PEREZ, JOSE, ANTONIO;
MATEO HERRANZ, ANA, ISABEL;
PEREZ MARTINEZ, CARLOS y
SANCHEZ MARTINEZ, CONCEPCION

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 435 798 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

Inhibidores de proteína cinasa

5 Las cinasas dependientes de ciclina altamente homólogas (Cdk) CDK4 y CDK6 en combinación con la Ciclina D son reguladores clave de la transición a través del punto de restricción R entre las etapas G₁ (crecimiento) y S (replicación del ADN) del ciclo celular. Las CDK4/6 ejercen sus efectos a través de la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRb). Una vez que se ha fosforilado, la pRb pierde su efecto inhibitorio en la transcripción de genes promoviendo la entrada en la etapa S.

10 Por el contrario, la inhibición específica de la actividad cinasa de CDK4/6 mediante el modulador de proteína endógena p16^{INK4} o mediante inhibidores de molécula pequeña da como resultado una pRb hipofosforilada y parada de las células en el punto de restricción G₁. Como el mecanismo primario de regulación del punto de restricción G₁, la vía metabólica regulada por estas cinasas se altera en un amplio espectro de tumores humanos y por tanto, la inhibición de CDK4/CDK6 en estos tumores tiene beneficio terapéutico mediante la prevención de la división celular.

15 Pim-1 es una serina/treonina cinasa que regula diversas funciones biológicas, incluyendo la progresión del ciclo celular, las vías metabólicas de transducción transcripcional/de señal y la apoptosis y cuya expresión se ha relacionado con varios cánceres incluyendo tumores hematológicos, prostáticos y bucales (Bachmann, M. y T. Moroy, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2005. 37(4): págs. 726-30).

Los inhibidores de cinasa se conocen en la técnica. El documento WO 98/11095 revela una serie de 2-pirimidina aminas sustituidas y las describe como inhibidores de cinasa, en particular las cinasas p56^{lck}, ZAP-70 y proteína cinasa C. El documento WO 98/11095 no describe la inhibición de Cdk.

20 En el documento WO 03/062236 se revela una serie de 2-(piridin-2-ilamino)-pirido[2,3-d]pirimidin-7-onas descritas como que tienen actividad inhibitoria de CDK4/6. Estos compuestos se describen como útiles en el tratamiento de trastornos proliferativos celulares tales como cáncer y restenosis. Sin embargo, los compuestos son poco solubles en solución acuosa, carecen de la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y no muestran actividad inhibitoria apreciable en otras dianas cinasas (no Cdk).

25 El documento WO 2005/005426 revela polimorfos de la sal isetionato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2(5-piperazil-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona, que se describe como un inhibidor CDK4 selectivo.

30 Continúa existiendo una necesidad de proporcionar inhibidores de CDK4/6 alternativos que se puedan usar en el tratamiento de trastornos proliferativos celulares tales como el cáncer. La presente invención proporciona inhibidores de CDK4/6 alternativos. Ciertos compuestos de la presente invención son inhibidores de CDK4/6 más potentes que ciertos compuestos conocidos en la técnica.

35 Adicionalmente, existe una necesidad de proporcionar inhibidores de CDK4/6 alternativos que sean selectivos para CDK4/6 en comparación con otras Cdk y sean, por tanto, capaces de producir parada en G₁ específica cuando estén presentes en concentraciones elevadas y farmacológicamente relevantes. La presente invención proporciona inhibidores de CDK4/6 alternativos que son capaces de producir parada en G₁ específica cuando están presentes en concentraciones farmacológicamente relevantes.

También continúa la necesidad de proporcionar inhibidores de CDK4/6 alternativos con una solubilidad mejorada en solución acuosa. Ciertos compuestos de la presente invención tienen una solubilidad mejorada en solución acuosa en comparación con ciertos compuestos en la técnica.

40 Además, existe una necesidad de proporcionar inhibidores de CDK4/6 alternativos que tengan la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y puedan, por tanto, usarse para tratar trastornos que tienen lugar en el cerebro, por ejemplo, tumores cerebrales primarios y metastáticos. Ciertos compuestos de la presente invención tienen distribución mejorada en el tejido cerebral.

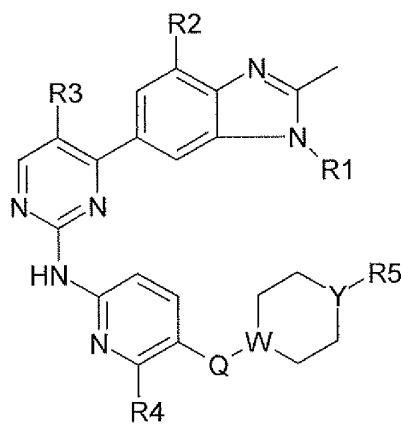
45 También existe una necesidad de proporcionar inhibidores de CDK4/6 alternativos con buenas propiedades farmacocinéticas tales como buena disponibilidad oral. Ciertos compuestos de la presente invención tienen una disponibilidad oral mejorada cuando se comparan con ciertos compuestos conocidos en la técnica.

Además, existe una necesidad de proporcionar inhibidores de cinasa alternativos que tengan actividad inhibitoria secundaria en otras cinasas no Cdk, por ejemplo, Pim-1 cinasa. Ciertos compuestos preferidos de la presente invención tienen actividad inhibitoria doble CDK4/6 y Pim-1 cinasa.

La presente invención proporciona compuestos de la fórmula:

50

Fórmula I



(I)

en la que,

R1 es alquilo C₃-C₅, cicloalquilo C₃-C₅ o ciclopropil-metilo;

5 R2 y R3 son H o flúor, en los que al menos uno de R2 o R3 es flúor;

R4 es H o CH₃;

R5 es alquilo C₁-C₆ o -NR₆R₇ en el que R₆ y R₇ son alquilo C₁-C₃;

Q es CH₂, O, S o un enlace directo;

y

10 W e Y son C o N, en los que al menos uno de W o Y sea N y en los que cuando Q es O o S, W es C;

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

La presente invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 La presente invención proporciona un compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en terapia.

La presente invención proporciona un compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en el tratamiento del cáncer. En particular de los cánceres seleccionados del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer pulmonar, especialmente cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), cáncer prostático, glioblastoma, linfoma de células de manto (MCL), leucemia mieloide crónica (CML) y leucemia mieloide aguda (AML).

20 La presente invención proporciona además un procedimiento para tratar el cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer pulmonar, especialmente cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), cáncer prostático, glioblastoma, linfoma de células de manto, leucemia mieloide crónica y leucemia mieloide aguda en un mamífero que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo a un mamífero que necesita dicho tratamiento.

25 Adicionalmente, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. En particular los cánceres se seleccionan del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer pulmonar, especialmente cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), cáncer prostático, glioblastoma, linfoma de células de manto, leucemia mieloide crónica y leucemia mieloide aguda.

30 Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para uso en terapia que comprende un compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo, diluyente, o excipiente farmacéuticamente aceptable. La invención también proporciona una formulación farmacéutica para tratar cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer pulmonar, especialmente cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), cáncer prostático, glioblastoma, linfoma de células de manto, leucemia mieloide crónica y leucemia mieloide aguda que comprende un compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo, diluyente, o excipiente farmacéuticamente aceptable.

35

Las expresiones químicas generales usadas en las anteriores fórmulas tiene sus significados habituales. Por ejemplo, la expresión "alquilo C₃-C₅" se refiere a una cadena alifática saturada, recta o ramificada, monovalente de tres a cinco átomos de carbono e incluye, aunque sin limitación, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo y *terc*-butilo.

5 La expresión cicloalquilo C₃-C₅ se refiere a un sistema de anillos de carbono saturado que contiene de tres a cinco átomos de carbono.

Los lectores especialistas entenderán que la mayoría o todos los compuestos de la presente invención son capaces de formar sales. Los compuestos de la presente invención son aminas y por consiguiente reaccionan con cualquiera de varios ácidos inorgánicos y orgánicos para formar sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables. Tales sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables y los procedimientos comunes para prepararlas se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, P. Stahl y col., HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); L. D. Bighley, S. M. Berge, D. C. Monkhouse, en "Encyclopedia of Pharmaceutical Technology". Eds. J. Swarbrick y J. C. Boylan, vol. 13, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, Basel, Hong Kong 1995, págs. 453-499; S. M. Berge y col., "Pharmaceutical Salts", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 66, N.º 1, enero de 1977. Son preferidas las sales de clorhidrato y mesilato. La sal de mesilato se prefiere especialmente.

Preferiblemente la presente invención comprende compuestos de Fórmula I en la que R1 es isopropilo, ciclopropilo, ciclopentilo o ciclopropil-metilo. Más preferiblemente, R1 es isopropilo.

20 Preferiblemente la presente invención comprende compuestos de Fórmula I en la que R2 es flúor y R3 es hidrógeno. Preferiblemente la presente invención comprende compuestos de Fórmula I en la que R2 es hidrógeno y R3 es flúor. Lo más preferiblemente, tanto R2 como R3 son flúor.

Preferiblemente la presente invención comprende compuestos de Fórmula I en la que R4 es hidrógeno. En una alternativa, R4 preferiblemente es metilo. Lo más preferiblemente R4 es hidrógeno.

25 Preferiblemente la presente invención comprende compuestos de Fórmula I en la que R5 es alquilo C₁-C₃ o -NR₆R₇, en el que R₆ y R₇ son alquilo C₁-C₃. Más preferiblemente, R₆ y R₇ son etilo. Más preferiblemente R5 es alquilo C₁-C₃. Lo más preferiblemente R5 es etilo.

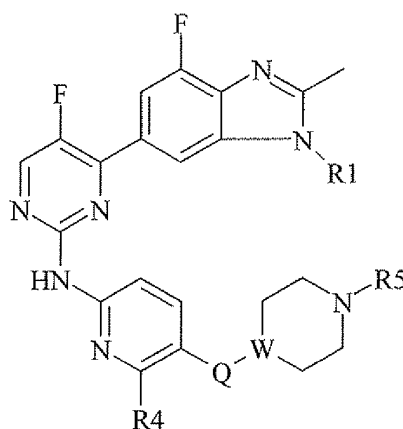
Preferiblemente la presente invención comprende compuestos de Fórmula I en la que Q es CH₂ o un enlace directo. Más preferiblemente Q es CH₂.

Preferiblemente la presente invención comprende compuestos de Fórmula I en la que Y es N.

30 Preferiblemente la presente invención comprende compuestos de Fórmula I en la que W es N.

Preferiblemente la presente invención comprende compuestos de Fórmula I en la que tanto W como Y son N.

Los compuestos preferidos de la invención incluyen los de la fórmula:



35 **Fórmula II**

en la que:

R1 es isopropilo, ciclopropilo, ciclopentilo o ciclopropil-metilo;

R4 es H o CH₃;

40 R5 es alquilo C₁-C₃;

Q es CH₂, O o un enlace directo;

y

W es C o N en los que cuando Q es O, W es C;

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

- 5 Son especialmente preferidos los compuestos ilustrados en el presente documento o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Más especialmente preferido es el compuesto [5-(4-Etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. [5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina se puede llamar en la alternativa 2-pirimidinamina, N-[5-(4-etil-piperazinil)metil]-2-piridinil]-[5-fluoro-4-(4-fluoro-2-metil-(1-(1-metiletil)-1H-benzoimidazol-6-il)-

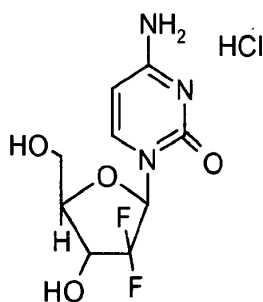
10 Se prefiere particularmente la forma cristalina III de [5-(4-Etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, caracterizada por un patrón de difracción de rayos X en polvo (radiación CuK α , $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$) que comprende un pico en 21,29 ($2\theta \pm 0,1^\circ$) y opcionalmente uno o más picos seleccionados del grupo que comprende 11,54, 10,91 y 12,13 ($2\theta \pm 0,1^\circ$). La forma cristalina III de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina puede estar adicionalmente caracterizada por un espectro de RMN de ¹³C que comprende picos de cambio químico $\nu(F1)$ [ppm] a 112,7, 127,3 y 129,4.

15 Los compuestos de la presente invención son inhibidores específicos de CDK4 y CDK6 y por lo tanto, son útiles en el tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizado por proliferación celular anormal. En particular, los compuestos de la presente invención son útiles en el tratamiento del cáncer.

20 CDK4 y CDK6 modulan sus efectos en el ciclo celular mediante la fosforilación de pRb. Se espera que los compuestos de la presente invención, que son inhibidores potentes de la actividad de CDK4/6 y por tanto, de la fosforilación de pRb, inhiban la proliferación celular (y por lo tanto el crecimiento del tumor) en cualquier tipo de cáncer en que las células están proliferando y contienen un gen Rb1 funcional e intacto (que codifica pRb). Por lo tanto, los compuestos de la invención son útiles en el tratamiento de cánceres pRb⁺ tales como cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer pulmonar, cáncer prostático, leucemia mieloide crónica, leucemia mieloide aguda (Fry, D. W. y col. Mol. Cancer Ther. (2004), 3(11), 1427), linfoma de células de manto (Marzec, M. y col., Blood (2006), 108(5), 1744), cáncer ovárico (Kim, T. M. y col., Cancer Research (1994), 54, 605), cáncer pancreático (Schutte, M. y col. Cancer Research (1997), 57, 909) en mamíferos. También se espera que los compuestos de la invención sean útiles en el tratamiento de rhabdomyosarcoma (Saab, R. y col., Mol. Cancer Ther. (2006), 5(5), 1299) y mieloma múltiple (Baughn, L. B. y col., Cancer Res. (2006), 66(15), 7661) en mamíferos. Se prefiere que el mamífero que se trate sea un ser humano.

35 Adicionalmente, los compuestos preferidos de la presente invención exhiben la propiedad ventajosa de que tienen distribución mejorada en el tejido cerebral. Por ejemplo, cuando se administran en un modelo de rata, la proporción de exposición cerebro:plasma del compuesto del Ejemplo 16 (determinada usando el área bajo la curva (AUC) o la concentraciones máximas plasmáticas y cerebrales (C_{máx}), véase Tabla 6c) es aproximadamente 1, indicando que el compuesto del Ejemplo 16 se distribuye bien dentro del cerebro. En contraste, los autores de la presente invención han determinado que un compuesto preferido del documento WO 03/062236 (6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazil-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona) presenta proporciones de distribución cerebro:plasma de 0,17 (AUC) y 0,1 (C_{máx}), indicando que el compuesto se distribuye de forma relativamente pobre en tejido cerebral en este modelo. Los compuestos preferidos en la presente invención son por lo tanto capaces de penetrar en el cerebro y son así útiles en el tratamiento de tumores cerebrales primarios y metastáticos donde las células están proliferando y contienen un gen Rb1 intacto, funcional. Ejemplos de tales tumores cerebrales pRb⁺ incluyen glioblastoma así como meduloblastoma y astrocitoma (Lee, W.- H. y col., Science (1987), 235, 1394). Temozolomida es un agente alquilante de ADN, citotóxico usado para el tratamiento de tumores cerebrales incluyendo glioblastoma y astrocitoma (Friedman, H. S. y col. (2000), Clin. Cancer Res. 6(7): 2585-97) incluyendo metástasis cerebrales de melanoma, cáncer de mama y NSCLC (Siena, S. y col. (2009), Annals of Oncology, doi: 10.1093(annonc/mdp343). Temozolomida interacciona con ADN causando modificación química/daño (Marchesi, F., y col., (2007), Pharmacol. Res. 56(4): 275-87). Los compuestos de la presente invención se pueden usar en combinación con temozolomida para el tratamiento de tumores cerebrales pRb⁺ primarios y metastáticos tales como glioblastoma y astrocitoma, por ejemplo donde tales metástasis se derivan de melanoma, cáncer de mama o NSCLC.

55 Gemcitabina HCl, un análogo nucleosídico que presenta actividad antitumoral, es monoclorhidrato de 2'-deoxi-2',2'-difluorocitidina (β -isómero), también conocido como monoclorhidrato de 2',2'-difluoro-2'-deoxicidina, o como 1-(4-amino-2-oxo-1H-pirimidin-1-il)-2-desoxi-2',2'-difluororribosa. Gemcitabina HCl se describe en la Patente de los EE.UU. 5.464.826. La fórmula estructural se representa a continuación:



Gemcitabina HCl es efectiva en el tratamiento de cáncer de células pulmonares no pequeñas (NSCLC) (Sandler, A. y Ettinger, D.S., (1999), *The Oncologist*, 4, 241), cáncer pancreático (Pino, S.M., y col. (2004), *Current Gastroenterology Reports*, 6, 119), cáncer ovárico (Pfisterer, J. y col., (2006), *Journal of Clinical Oncology*, 24(29), 4699) y cáncer de mama metastático (Chan, S. y cols., (2009), *Journal of Clinical Oncology*, 27(11), 1753). Los compuestos de la presente invención se pueden usar con gemcitabina HCl para el tratamiento de NSCLC, cáncer pancreático, cáncer ovárico y cáncer de mama metastático.

Los compuestos de la presente invención se pueden usar en un procedimiento para tratar cáncer, en particular los cánceres descritos anteriormente, en un mamífero que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención a un mamífero que necesita dicho tratamiento. En una realización preferida, los compuestos de la presente invención se pueden usar en un procedimiento para tratar el cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer colorrectal, linfoma de células de manto, cáncer de mama, glioblastoma, leucemia mieloide aguda y cáncer pulmonar, especialmente NSCLC. En otra realización preferida, los compuestos de la presente invención se pueden usar en un procedimiento de tratar un cáncer seleccionado del grupo constituido por cáncer colorrectal, glioblastoma, leucemia mieloide aguda y cáncer pulmonar. En otra realización preferida, un compuesto de la presente invención se puede usar en un procedimiento para tratar glioblastoma o astrocitoma en un mamífero, que comprende administrar una combinación terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención y temozolomida a un mamífero que necesita dicho tratamiento. En otra realización preferida, un compuesto de la invención se puede usar en un procedimiento para tratar NSCLC, cáncer pancreático, cáncer ovárico o cáncer de mama metastático en un mamífero, que comprende administrar una combinación terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención y gemcitabina HCl.

Los compuestos de la presente invención se pueden usar para el tratamiento del cáncer, en particular, los cánceres descritos anteriormente. En una realización preferida, los compuestos de la presente invención se pueden usar para el tratamiento de un cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer colorrectal, linfoma de células de manto, cáncer de mama, glioblastoma, leucemia mieloide aguda y cáncer pulmonar, especialmente NSCLC. En una realización preferida, los compuestos de la presente invención se pueden usar para el tratamiento de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer colorrectal, glioblastoma, leucemia mieloide aguda y cáncer pulmonar. En otra realización preferida, la invención proporciona un compuesto de la presente invención para usar en combinación simultánea, separada o secuencial con temozolomida en el tratamiento de glioblastoma o astrocitoma. En otra realización preferida, la invención proporciona un compuesto de la presente invención para usar en combinación simultánea, separada o secuencial con gemcitabina HCl en el tratamiento de NSCLC, cáncer pancreático, cáncer ovárico o cáncer de mama metastático.

Además, los compuestos de la presente invención se pueden usar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, en particular, los cánceres descritos anteriormente. En una realización preferida, los compuestos de la presente invención se pueden usar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer colorrectal, glioblastoma, leucemia mieloide aguda y cáncer pulmonar, especialmente NSCLC. En otra realización preferida, se pueden usar los compuestos de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer colorrectal, glioblastoma, leucemia mieloide aguda y cáncer pulmonar. En otra realización preferida, la invención proporciona el uso de un compuesto de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de glioblastoma o astrocitoma, en el que el medicamento también comprende temozolomida o se administra simultáneamente, separadamente o secuencialmente con temozolomida. En otra realización preferida, la invención proporciona el uso de un compuesto de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de NSCLC, cáncer pancreático, cáncer ovárico o cáncer de mama metastático, en el que el medicamento también comprende gemcitabina HCl o se administra simultáneamente, separadamente o secuencialmente con gemcitabina HCl.

También se proporciona una formulación farmacéutica para tratar el cáncer, en particular, los cánceres descritos anteriormente que comprende un compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo conjuntamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización preferida, también se proporciona una formulación farmacéutica para tratar un cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer colorrectal, linfoma de células de manto, cáncer de mama, glioblastoma, leucemia mieloide aguda y cáncer pulmonar, especialmente NSCLC, que comprende un compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo conjuntamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización preferida, se proporciona también una formulación farmacéutica para tratar un cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer colorrectal, glioblastoma, linfoma de células de manto y cáncer pulmonar, que comprende un compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo conjuntamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización preferida, la invención proporciona

una formulación farmacéutica para tratar glioblastoma o astrocitoma, que comprende un compuesto de la invención y temozolomida, conjuntamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización preferida, la invención proporciona una formulación farmacéutica para tratar un NSCLC, cáncer pancreático, cáncer ovárico o cáncer de mama metastático, que comprende un compuesto de la invención y gemcitabina HCl, conjuntamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona una formulación farmacéutica, que comprende un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y temozolomida, conjuntamente con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona una formulación farmacéutica, que comprende un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y gemcitabina HCl, conjuntamente con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona además una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo conjuntamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos.

Además, los compuestos ilustrados preferidos también son inhibidores de Pim-1. Como se ha indicado anteriormente, Pim-1 es una serina/treonina cinasa que está involucrada en la regulación de diversas funciones biológicas, incluyendo progresión del ciclo celular, vías metabólicas de transducción transcripcional/de señal y apoptosis y cuya expresión se ha relacionado con varios cánceres. En particular, la inhibición de Pim-1 por el inhibidor K00135 de molécula pequeña ha demostrado que perjudica la supervivencia y el crecimiento clonogénico de un grupo de células humanas de leucemia aguda (Progacic, V. y col., *Cáncer Res.* (2007). 67(14): págs. 6916-24). Adicionalmente, Pim-1 ha demostrado que se expresa en la neointima de arterias carótidas de rata lesionadas por balón y en aortas torácicas y arterias coronarias humanas que muestran engrosamiento de la íntima. Además, la inhibición específica de la función de Pim-1 suprimió notablemente la formación de neointima después de la lesión por balón y también la proliferación de células musculares lisas vasculares cultivadas (VSMC), indicando que Pim-1 juega un papel crucial en la proliferación de tales células. La proliferación de VSMC ha estado implicada en la patogenia de enfermedades vasculares obstructivas tales como arterioesclerosis y restenosis y por lo tanto, se espera que la inhibición de Pim-1 suprima la proliferación de VSMC y de este modo sea útil en el tratamiento de enfermedades vasculares obstructivas (Katakami N. y col., *JBC* (2004), 279(52), 54742-54749).

Por consiguiente, los compuestos preferidos de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se pueden usar en un procedimiento para tratar una enfermedad vascular obstructiva tal como arterioesclerosis o restenosis en un mamífero, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención a un mamífero que necesita dicho tratamiento. Los compuestos preferidos de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se pueden usar en el tratamiento de una enfermedad vascular obstructiva tal como arterioesclerosis o restenosis. Además, los compuestos preferidos de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se pueden usar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad vascular obstructiva tal como arterioesclerosis o restenosis. También se proporciona una composición farmacéutica para tratar una enfermedad vascular obstructiva tal como arterioesclerosis o restenosis, que comprende un compuesto preferido de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Como se usa en el presente documento, "h" se refiere a hora u horas, "min" se refiere a minuto o minutos, "Cdk" se refiere a cinasa dependiente de ciclina, "pRb" se refiere a proteína del retinoblastoma, "MCL" se refiere a linfoma de células de manto, "AML" se refiere a leucemia mieloide aguda, "CML" se refiere a leucemia mieloide crónica, "Boc" se refiere a N-terc-butoxicarbonilo, "AE" se refiere a acetato de etilo, "DCM" se refiere a diclorometano, "DMSO" se refiere a sulfóxido de dimetilo, "DMA" se refiere a dimetilacetamida, "THF" se refiere a tetrahidrofurano, "MtBE" se refiere a éter metil terbutílico, "TEA" se refiere a trietil amina, "FBS" se refiere a suero fetal bovino, "PBS" se refiere a solución salina tamponada con fosfato, "BSA" se refiere a albúmina de suero bovino, "TA" se refiere a temperatura ambiente, "mpk" significa miligramos por kilogramo, "po" se refiere a *per os* (vía oral), "qd" significa dosificación una vez al día, "q2d" significa una dosis única cada 2 días, "q2dx10" significa una dosis única cada 2 días 10 veces, "VSMC" se refiere a célula muscular lisa vascular y "XRD" se refiere a difracción de rayos X.

Los compuestos de Fórmula I se pueden preparar por un especialista en la técnica siguiendo técnicas y procedimientos reconocidos en la técnica. Más específicamente, se pueden preparar compuestos de Fórmula I como se expone en los esquemas, procedimientos y ejemplos expuestos más adelante. Un especialista en la técnica reconocerá que las etapas individuales en los siguientes esquemas se pueden variar para proporcionar los compuestos de Fórmula I. Los reactivos y materiales de partida están fácilmente disponibles para un especialista en la técnica. Todos los sustituyentes, a menos que se especifique otra cosa, son los que se han definido previamente.

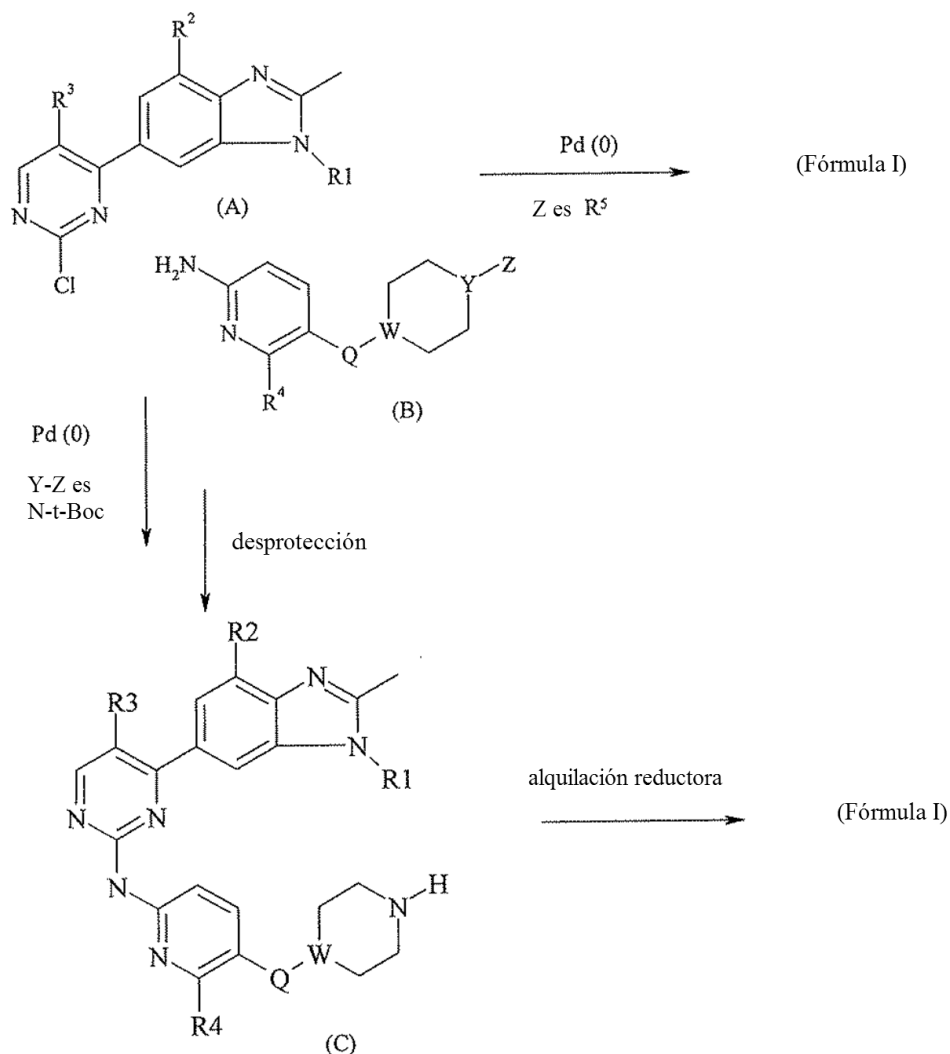
Los nombres de compuesto de las siguientes preparaciones y ejemplos se generan usando ChemDraw® Ultra 5.0.

Esquemas

La síntesis de compuestos de fórmula I se ilustra en las preparaciones, ejemplos y esquemas, donde R¹, R², R³, R⁴, R⁵, Q, W e Y son como se han definido anteriormente.

Esquema 1

Los compuestos de fórmula I se preparan por reacciones de acoplamiento de paladio (0) como se muestra en el esquema I:

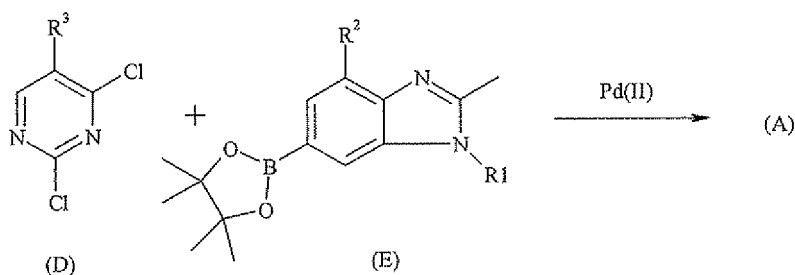


5 En la reacción superior del esquema 1 y cuando Z = R⁵, un cloruro de pirimidinil-bencimidazol (A) se hace reaccionar con una piridinil amina (B) en una reacción de acoplamiento catalizada con paladio para formar compuestos de fórmula I directamente.

En la reacción inferior del esquema 1 y cuando Y-Z es N-*terc*-butoxicarbonilo (Boc), también se acopla un haluro de piridinidilo (A) con una piridinil amina (B), pero el grupo Boc se retira en ácido fuerte para producir la amina libre (C). Finalmente, la amina (C) se alquila en condiciones reductoras para producir compuestos de fórmula I.

Esquema 2

10 **Preparación de pirimidinil-bencimidazoles (A)**

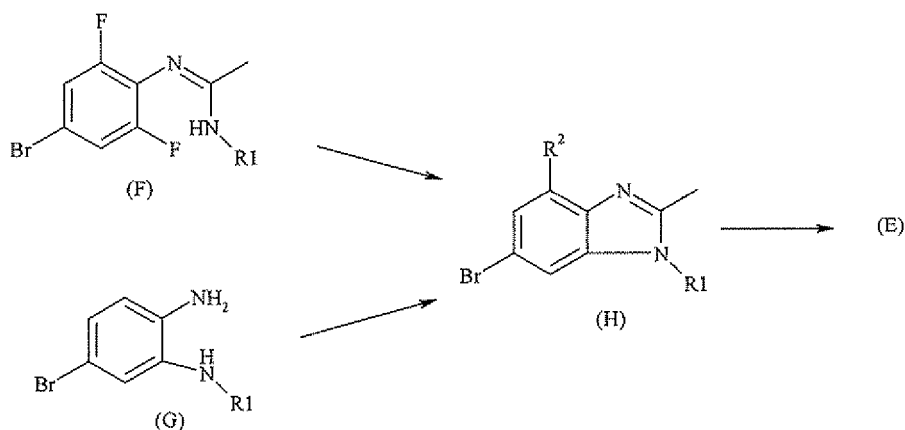


Se preparan pirimidinil-bencimidazoles (A) con reacciones de acoplamiento catalizadas con paladio (II) de dicloruros

de pirimidinilo disponibles en el mercado (D) y boronatos de bencimidazol (E).

Esquema 3

Preparación de boronatos de bencimidazol (E)

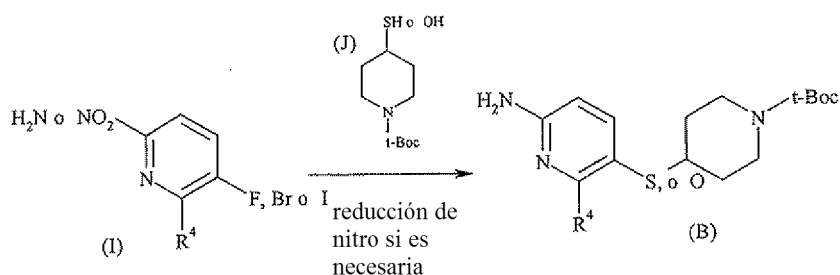


5 se preparan boronatos de bencimidazol (E) mediante boronilación catalizada con Pd (II) del bromuro en bencimidazoles (H) con *bis*(pinacolato)diboro. A su vez, los bencimidazoles (H) se preparan por ciclación de las amidinas (F) con *t*-butóxido potásico o condensación de las bencenodiaminas (G) con ortoacetato de trietilo/ácido acético.

10 Las amidinas (F) se preparan como se conoce por un especialista en la técnica de la síntesis orgánica por condensación de 4-bromo-2,6-difluoro-fenilamina con el derivado de mono-acetamida de aminas R¹-NH₂ en presencia de cloruro de fosforilo. Las bencenodiaminas (G) se preparan en dos etapas como se conoce por un especialista en la técnica de la síntesis orgánica por el desplazamiento del bromo de la posición 2 en 2,4-dibromo-nitrobenceno con aminas R¹-NH₂ seguido de reducción del grupo nitro a un grupo amina.

Esquema 4

15 **Preparación de piridinil aminas (B), donde Q es S u O y W es C**

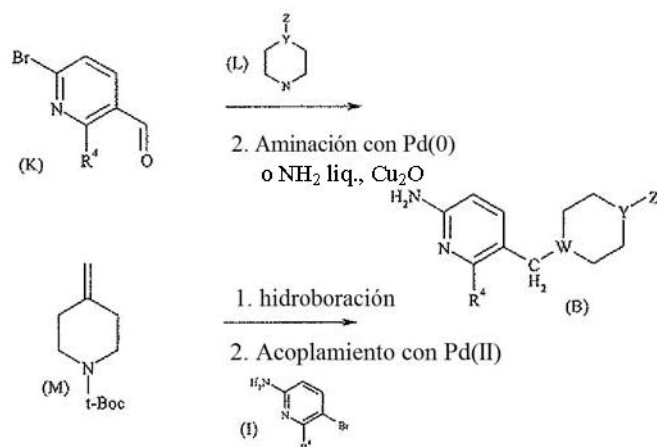


20 La síntesis de piridinil aminas (B) donde Q es S u O y W es C se consigue por desplazamiento de un 5-haluro en piridina (I) mediante el tiol o alcohol disponible en el mercado (J). Si se necesita una nitropiridina (I), el producto de desplazamiento experimenta adicionalmente una etapa de reducción de nitro para producir (B). Debe apreciarse que los compuestos (I) son reactivos versátiles a lo largo de estos esquemas, pero solo algunos están disponibles en el mercado como piridinil aminas y algunos como nitropiridinas. Sin embargo, el compuesto (I) disponible en el mercado puede convertirse por reacciones de oxidación de amina o reducción de nitro conocidas en la técnica para las secuencias descritas en el presente documento y a continuación.

25

Esquema 5

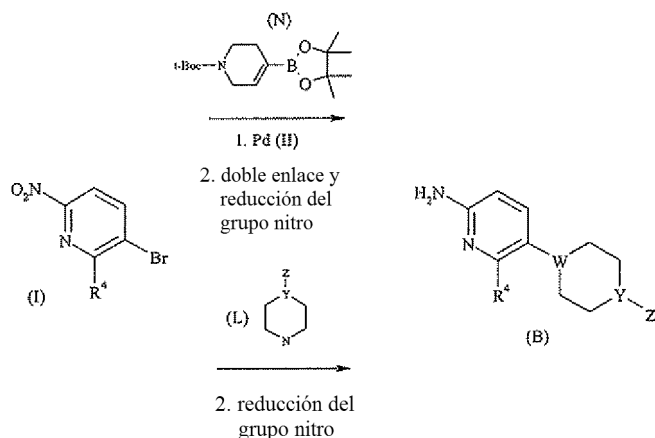
Preparación de piridinil aminas (B), donde Q es CH₂



- 5 La síntesis de piridinil aminas (B) en las que Q es CH₂ se consigue de dos formas: 1) los carbaldehídos (K) disponibles en el mercado experimentan una aminación reductora con la amina libre (L) seguida de reemplazo del bromuro de piridina por aminación catalizada con Pd(0) con 1,1,1,3,3,3-hexametil-disilazano de litio. 2) El ácido 1-piperidinacarboxílico, 4-metileno-, éster 1,1-dimetiletilico (M) disponible en el mercado experimenta una hidrobioración seguido de acoplamiento con Pd (II) con piridil amina (I).

Esquema 6

Preparación de piridinil aminas (B), en las que Q es un enlace directo



- 10 La síntesis de piridinil aminas (B) donde Q es un enlace directo se consigue de dos formas: 1) el ácido 1(2H)-piridinacarboxílico, 3,6-dihidro-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-, éster 1,1-dimetiletilico (N) disponible en el mercado experimenta el acoplamiento con paladio (II) con nitropiridina (I) seguido de reducción del grupo nitro y del doble enlace. 2) El bromuro de la nitropiridina (I) se desplaza con la amina libre (L) seguido de reducción del grupo nitro.

15 Preparación 1

Éster *tert*-butílico del ácido 4-(6-amino-piridin-3-ilsulfanil)-piperidina-1-carboxílico

- 20 Añadir tolueno seco (6,06 ml) a una mezcla de 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina (76,52 mg), yoduro de cobre (I) (69,27 mg), *tert*-butóxido sódico (475,59 mg), éster *tert*-butílico del ácido 4-mercapto-piperidina-1-carboxílico (583,5 mg), magnesio (49,10 mg) y 2-amino-5-yodopiridina (550 mg). Hacer burbujear nitrógeno en la mezcla con ultrasonidos y agitar la suspensión a 110°C en un tubo cerrado herméticamente durante 24 h. Enfriar y filtrar a través de celite. Lavar con tolueno y retirar el disolvente al vacío. Añadir hexano/AE (1/1) y filtrar a través de una capa de celite/gel de sílice, lavando dos veces con hexano/AE (1/1) y después AE. Retirar el disolvente al vacío. Purificar por cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con hexano/AE (50-75%) para proporcionar 630 mg del compuesto del título. EM (ES⁺): m/z = 310 (M+H)⁺

25 Preparación 2

5-Fluoro-2-nitro-piridina

- 5 Añadir a ácido sulfúrico (46 ml) a 0°C peróxido de hidrógeno al 25% (26,98 ml) en un recipiente abierto al aire. Después de 5 min, añadir gota a gota una solución fría de 2-amino-5-fluoropiridina (9 g) en ácido sulfúrico concentrado (46 ml) con un embudo de adición. Agitar la solución oscura resultante a 0°C a TA en el baño durante una noche. Verter sobre 200 ml de hielo-agua y extraer con DCM. Lavar las fases orgánicas combinadas con una solución acuosa al 5% de bisulfito sódico y secar sobre sulfato sódico anhidro. Retirar el disolvente al vacío y purificar por cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con DCM para proporcionar 7,5 g del compuesto del título. EM (ES⁺): m/z = 143 (M+H)⁺.

Preparar lo siguiente esencialmente como se ha descrito para 5-fluoro-2-nitro-piridina usando la amina correspondiente:

Preparación	Compuesto	EM (ES ⁺): m/z (M+H) ⁺
3	3-bromo-2-metil-6-nitro-piridina	218

10

Preparación 4

1-Isopropil-4-(2-metil-6-nitro-piridin-3-il)-piperazina

- 15 Agitar 3-bromo-2-metil-6-nitro-piridina (2,46 g), 1-isopropil-piperazina (2,74 g), yoduro de tetra-*n*-butil amonio (418,69 mg) y carbonato potásico (1,72 g) en dimetilsulfóxido (DMSO, 20 ml) a 65°C durante una noche. Añadir AE y agua, separar las fases, secar la fase orgánica sobre sulfato de magnesio y retirar el disolvente al vacío. Purificar con un cartucho de intercambio catiónico fuerte eluyendo con metanol y después metanol-NH₃ 2 N para proporcionar 2,58 g del compuesto del título. EM (ES⁺): m/z = 265 (M+H)⁺.

Preparar los siguientes intermedios esencialmente como se ha descrito para 1-isopropil-4-(2-metil-6-nitro-piridin-3-il)-piperazina usando el derivado de bromo correspondiente:

Preparación	Compuesto	EM (ES ⁺): m/z (M+H) ⁺
5	Ester <i>tert</i> -butílico del ácido (2'-metil-6'-nitro-3,4,5,6-tetrahidro-2H-[1,3']bipiridinil-4-il)-carbámico	337
6	Ester <i>tert</i> -butílico del ácido (6'-nitro-3,4,5,6-tetrahidro-2H-[1,3']bipiridinil-4-il)-carbámico	323

20

Preparación 7

5-(4-isopropil-piperazin-1-il)-6-metil-piridin-2-ilamina

- 25 Agitar 1-isopropil-4-(2-metil-6-nitro-piridin-3-il)-piperazina (2,52 g) y paladio sobre carbono al 10% (600 mg) en metanol (38 ml) y AE (38 ml) en atmósfera de H₂ (balón) durante una noche. Filtrar sobre una capa de celite y retirar el disolvente al vacío. Purificar por cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con DCM/metanol (0-10%) para proporcionar 2,23 g del compuesto del título. EM (ES⁺): m/z = 143 (M+H)⁺.

Preparar los siguientes intermedios esencialmente como se ha descrito para 5-(4-isopropil-piperazin-1-il)-6-metil-piridin-2-ilamina usando el derivado de nitro correspondiente:

Preparación	Compuesto	EM (ES ⁺): m/z (M+H) ⁺
8	Ester <i>tert</i> -butílico del ácido (6'-amino-2'-metil-3,4,5,5-tetrahidro-2H-[1,3']bipiridinil-4-il)-carbámico	307
9	Ester <i>tert</i> -butílico del ácido (6'-amino-3,4,5,5-tetrahidro-2H-[1,3']bipiridinil-4-il)-carbámico	293

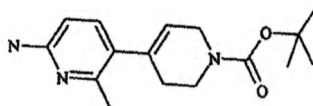
30 Preparación 10

Éster *tert*-butílico del ácido 4-(6-nitro-piridin-3-iloxi)-piperidina-1-carboxílico

- 35 Añadir *tert*-butóxido potásico (4,84 g) a una solución de 4-hidroxi-1-piperidina-carboxilato de *tert*-butilo (8,76 g) en dimetilacetamida (DMA, 39 ml) a 0°C en atmósfera de nitrógeno. Agitar durante 1 h y añadir gota a gota una solución de 5-fluoro-2-nitro-piridina (5 g) en DMA (78 ml). Dejar la reacción en agitación a TA durante una noche. Añadir agua y dejar en reposo durante 1 h. Filtrar, lavar con agua. Purificar por cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con DCM/AE (0-15%) para proporcionar 5,65 g del compuesto del título. EM (ES⁺): m/z = 324 (M+H)⁺.

Preparación 11**Éster *tert*-butílico del ácido 4-(6-amino-piridin-3-iloxi)-piperidina-1-carboxílico**

5 Añadir paladio sobre carbono al 10% (0,6 g) a una suspensión de éster *tert*-butílico del ácido 4-(6-nitro-piridin-3-iloxi)-piperidina-1-carboxílico (5,65 g) en una mezcla de tetrahidrofurano (THF)/metanol (30/30 ml/ml). Hidrogenar en un aparato Parr a 202649,99 pascales (2 atm) durante una noche. Filtrar a través de una capa de celite; lavar con DCM y metanol. Purificar por cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con DCM/metanol (10%/amoníaco (1%) para proporcionar 5 g del compuesto del título. EM (ES⁺): m/z = 294 (M+H)⁺.

Preparación 12**Éster *tert*-butílico del ácido 6-amino-2-metil-3',6'-dihidro-2'H-[3,4']bipiridinil-1'-carboxílico**

10
15 Hacer burbujear nitrógeno en una mezcla de éster *tert*-butílico del ácido 4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-3,6-dihidro-2H-piridina-1-carboxílico (2,46 g) y 5-bromo-6-metil-piridin-2-ilamina (1,49 g) en 1,4-dioxano (31,82 ml) durante 5 min y después añadir N-hidrato de fosfato potásico tribásico (5,07 g), acetato de paladio (35,72 mg), dicitohexil-(2',6'-dimetoxi-bifenil-2-il)-fosfano (134,69 mg), agua (7,96 ml) y agitar a 90°C durante 3 h. Diluir con DCM y lavar con agua. Secar sobre sulfato sódico y retirar el disolvente al vacío. Purificar por cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con DCM/etanol al 5%/NH₃ al 0,1%, seguido de un cartucho de intercambio catiónico fuerte (SCX) eluyendo con metanol y después metanol-NH₃ 2 M para proporcionar 2,12 g del compuesto del título. EM (ES⁺): m/z = 292 (M+H)⁺.

Preparación 13**Éster *tert*-butílico del ácido 6-amino-2-metil-3',4',5',6'-tetrahidro-2'H-[3,4']bipiridinil-1'-carboxílico**

25 Agitar una mezcla de éster *tert*-butílico del ácido 6-amino-2-metil-3',6'-dihidro-2'H-[3,4']bipiridinil-1'-carboxílico (2,12 g) y paladio sobre carbono al 10% húmedo (330 mg) en metanol (29,30 ml) en atmósfera de H₂ (310,26 kPa (45 psi)) durante 48 h. Filtrar sobre una capa de celite y retirar el disolvente al vacío para proporcionar 2,07 g del compuesto del título. EM (ES⁺): m/z = 292 (M+H)⁺.

Preparación 14**Éster *tert*-butílico del ácido 6-nitro-3',6'-dihidro-2'H-[3,4']bipiridinil-1'-carboxílico**

30 Hacer burbujear nitrógeno en una mezcla de éster *tert*-butílico del ácido 4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-3,6-dihidro-2H-piridina-1-carboxílico (19,6 g), 5-bromo-2-nitropiridina (12,87 g), carbonato sódico 2 M en agua (63,39 ml) y cloruro de *bis*(trifenilfosfina)paladio (II) (4,45 g) en 1,4-dioxano (316,94 ml) durante 5 min y agitar a 80°C durante 5 h. Diluir con DCM y lavar con agua. Secar sobre sulfato de magnesio y retirar el disolvente al vacío. Purificar por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con DCM/AE (0-40%) para proporcionar 8,72 g del compuesto del título. EM (ES⁺): m/z = 306 (M+H)⁺.

Preparación 15**Éster *tert*-butílico del ácido 6-amino-3',4',5',6'-tetrahidro-2'H-[3,4']bipiridinil-1'-carboxílico**

35 Disolver éster *tert*-butílico del ácido 6-nitro-3',6'-dihidro-2'H-[3,4']bipiridinil-1'-carboxílico (1,89 g) en etanol (123,80 ml). Hidrogenar con paladio sobre carbono (instrumento H-Cube, 7000000 pascales (70 bar), 50°C, 1 ml/min) para proporcionar 1,72 g del compuesto del título. EM (ES⁺): m/z = 278 (M+H)⁺.

Preparación 16**Éster *tert*-butílico del ácido 4-(6-amino-piridin-3-ilmetil)-piperidina-1-carboxílico**

40 Agitar durante 5 min éster *tert*-butílico del ácido 4-metileno-piperidina-1-carboxílico (5,10 g) en atmósfera de nitrógeno y añadir una solución 0,5 M en THF de 9-borabicyclo[3.3.1]nonano (77,49 ml). Agitar a 75°C en atmósfera de nitrógeno durante 1 h. Enfriar y añadir 2-amino-5-bromopiridina (3,8 g), carbonato potásico (3,87 g) y cloruro de 1,1'-*bis*(difenilfosfino)ferroceno)paladio (II) (538,10 mg) y una mezcla desgasificada de DMF (47,83 ml) y agua (4,78 ml). Agitar a 60°C durante 4 h y después a TA durante el fin de semana. Añadir agua y AE. Separar y extraer la fase acuosa con AE. Combinar las fases orgánicas y secar sobre sulfato sódico y retirar el disolvente al vacío. Purificar por cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyendo con DCM/metanol (al 1%/amoníaco (al 0,1%) a DCM/metanol (al 3%/amoníaco (al 0,3%). Triturar el residuo con AE para proporcionar 1,85 g del compuesto del título. EM (ES⁺): m/z = 292 (M+H)⁺.

50 Preparar lo siguiente esencialmente como se ha descrito para éster *tert*-butílico del ácido 4-(6-amino-piridin-3-ilmetil)-piperidina-1-carboxílico usando el derivado de bromo correspondiente:

Preparación	Compuesto	EM (ES ⁺): m/z (M+H) ⁺
17	Ester <i>terc</i> -butilico del ácido 4-(6-amino-2-metil-piridina-3-ilmetil)-piperidina-1-carboxílico	306

Preparación 18**1-(6-Bromo-piridin-3-ilmetil)-4-etil-piperazina**

5 Añadir 1-etilpiperazina pura (221,44 ml) a una mezcla de 6-bromo-piridina-3-carbaldehído (300 g) y DCM (5000 ml). Después, añadir en porciones triacetoxiborohidruro sódico (372,09 g) y agitar a TA durante 12 h. Añadir DCM (1000 ml) y una solución acuosa de hidróxido sódico 2 N (1500 ml). Separar las fases y extraer dos veces la fase acuosa con DCM (600 ml). Combinar las fases orgánicas, retirar el disolvente al vacío, añadir AE y evaporar para proporcionar 451,3 g del compuesto del título. EM (ES⁺): m/z = 285 (M+H)⁺.

10 Preparar lo siguiente esencialmente como se ha descrito para 1-(6-bromo-piridin-3-ilmetil)-4-etil-piperazina usando la amina correspondiente:

Preparación	Compuesto	EM (ES ⁺): m/z (M+H) ⁺
19	Ester <i>terc</i> -butilico del ácido 4-(6-bromo-piridina-3-ilmetil)-piperazina-1-carboxílico	357

Preparación 20**5-(4-Etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-ilamina**

15 Añadir lentamente 1,1,1,3,3,3-hexametil-disilazano de litio (1055 ml) a una mezcla desgasificada de 1-(6-bromo-piridin-3-ilmetil)-4-etil-piperazina (250 g), dicitclohexilfosfino)bifenilo (18,50 g), *tris*(dibencilidenoacetona)dipaladio (24,17 g) y THF (250 ml) a 50°C. Calentar la mezcla a 65°C durante una noche. Enfriar a 37°C y añadir agua (500 ml). Retirar la mitad del disolvente al vacío y añadir DCM (2,5 l). Filtrar sobre una capa de celite y retirar parte del disolvente. Añadir metanol (300 ml) y éter metil-*terc*-butilico (MtBE, 600 ml) a la mezcla y enfriar en un baño de hielo. Después, añadir ácido clorhídrico 2 M en éter etílico (800 ml) y una solución acuosa al 32% de ácido clorhídrico (100 ml). Retirar la fase orgánica y añadir una solución acuosa de hidróxido sódico 2 M (2500 ml). Extraer tres veces la fase acuosa con DCM y retirar el disolvente al vacío. Resolver en 90 ml de tolueno a 50°C hasta que se complete la disolución y después añadir 80 ml de MtBE. Agitar durante una noche a TA. Añadir más cantidad de MtBE (100 ml) para completar la precipitación. Filtrar el sólido y secar para proporcionar 108,24 g del compuesto del título. EM (ES⁺): m/z = 221 (M+H)⁺.

25 Preparar lo siguiente esencialmente como se ha descrito para 5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-ilamina usando el derivado de 2-bromo-piridina correspondiente:

Preparación	Compuesto	EM (ES ⁺): m/z (M+H) ⁺
21	Ester <i>terc</i> -butilico del ácido 4-(6-amino-piridina-3-ilmetil)-piperazina-1-carboxílico	293

Preparación 22**2,4-Dibromo-1-nitro-benceno**

30 Añadir gota a gota ácido nítrico fumante (101,40 ml) a una solución de 1,3-dibromo benceno (102,51 ml) en ácido sulfúrico concentrado (322,79 ml) y agua (62,39 ml) a 0°C. Calentar a TA y agitar durante 12 h. Verter la reacción sobre hielo-agua (1500 ml). Filtrar el sólido de color amarillo resultante al vacío y secar para proporcionar 178,46 g del compuesto del título. EM (ES⁺): m/z = 281 (M+H)⁺.

Preparación 23**35 (5-Bromo-2-nitro-fenil)-ciclopentil-amina**

40 Añadir ciclopentanamina (32 ml) a una solución de 2,4-dibromo-1-nitro-benceno (20 g) en 1-butanol (160 ml). Calentar la mezcla a 100°C durante una noche. Retirar el disolvente al vacío, añadir agua y extraer con AE. Lavar secuencialmente la fase orgánica con una solución saturada acuosa de bicarbonato sódico y después con agua. Secar sobre sulfato de magnesio y retirar el disolvente al vacío para proporcionar 22 g del compuesto del título. EM (ES⁺): m/z = 286 (M+H)⁺.

Preparación 24**4-Bromo-N2-ciclopentil-benceno-1,2-diamina**

5 Añadir ditionito sódico (107,47 g) a una solución de 5-bromo-2-nitro-fenil-ciclopentil-amina (22 g), THF (150 ml), agua (150 ml) e hidróxido de amonio (30 ml). Agitar la mezcla a TA durante una noche. Extraer dos veces con AE, secar sobre sulfato de magnesio y retirar el disolvente al vacío para proporcionar 14,80 g del compuesto del título. EM (ES⁺): m/z = 256 (M+H)⁺.

Preparación 25**6-Bromo-1-ciclopentil-2-metil-1H-benzoimidazol**

10 Calentar una mezcla de 4-bromo-N2-ciclopentil-benceno-1,2-diamina (10,6 g), ortoacetato de trietilo (9,5 ml) y ácido acético (6,3 ml) a 100°C durante 2,5 h. Diluir con DCM y verter en una solución saturada acuosa de bicarbonato sódico. Secar sobre sulfato sódico y retirar el disolvente al vacío. Purificar por cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyendo con DCM/etanol-NH₃ al 10% (al 0-3%) para proporcionar 10,67 g del compuesto del título. EM (ES⁺): m/z = 280 (M+H)⁺.

Preparación 26**15 N-Isopropil-acetamida**

20 Añadir TEA (23,58 ml) a una solución de 2-propanamina (10 g) en DCM (100 ml) a 0°C. Después, añadir cuidadosamente gota a gota ácido acético anhídrido (16,15 ml). Agitar a TA durante una noche. Retirar el disolvente al vacío, diluir con éter etílico (éter) y filtrar el sólido. Retirar el disolvente al vacío. Diluir el aceite con éter, añadir carbonato potásico y agitar durante una noche a TA. Filtrar el sólido y retirar el disolvente al vacío para proporcionar 15,62 g del compuesto del título. RMN (CDCl₃) 4,06 (m, 1H), 1,94 (s, 3H), 1,14 (d, 6H).

Preparar las siguientes amidas esencialmente como se ha descrito para N-isopropil-acetamida usando la amina correspondiente:

Preparación	Compuesto
27	N-ciclopropil-acetamida
28	N-ciclopropilmetil-acetamida
29	N-ciclopentil-acetamida

Preparación 30**25 N-(4-Bromo-2,6-difluoro-fenil)-N'-isopropil-acetamidina**

30 Añadir TEA (10,05 ml) a una mezcla de 4-bromo-2,6-difluoro-fenilamina (10,0 g), N-isopropil acetamida (9,73 g) y cloruro de fosforilo (6,70 ml) en tolueno (150 ml). Calentar la mezcla a la temperatura de reflujo durante 3 h. Enfriar la mezcla y retirar el disolvente al vacío. Disolver el producto en bruto en DCM y lavar varias veces con una solución saturada acuosa de bicarbonato sódico para retirar todas las cantidades que quedan de ácido. Secar sobre sulfato sódico y retirar el disolvente al vacío para proporcionar 14 g del compuesto del título. EM (ES⁺): m/z = 292 (M+H)⁺.

Preparar los siguientes intermedios esencialmente como se ha descrito para N-(4-bromo-2,6-difluoro-fenil)-N'-isopropil-acetamidina usando la acetamida correspondiente:

Preparación	Compuesto	EM (ES ⁺): m/z (M+H) ⁺
31	N-(4-bromo-2,6-difluoro-fenil)-N'-ciclopropil-acetamidina	290
32	N-(4-bromo-2,6-difluoro-fenil)-N'-ciclopropilmetil-acetamidina	304
33	N-(4-bromo-2,6-difluoro-fenil)-N'-ciclopentil-acetamidina	318

Preparación 34**35 6-Bromo-4-fluoro-1-isopropil-2-metil-1H-benzoimidazol**

40 Añadir *tert*-butóxido potásico (811,43 mg) a una solución de N-(4-bromo-2,6-difluoro-fenil)-N'-isopropil-acetamidina (2 g) en N-metil formamida (20 ml). Calentar la mezcla a 100°C durante 2 h. Enfriar a TA, añadir DCM (150 ml), lavar tres veces con cloruro sódico saturado acuoso (salmuera, 300 ml), secar sobre sulfato de magnesio y retirar el disolvente al vacío. Añadir hexano y agitar con ultrasonidos durante unos minutos. Filtrar el sólido, repetir la adición de hexano/filtración dos veces para proporcionar 1,86 g del compuesto del título. EM (ES⁺): m/z = 272 (M+H)⁺.

Preparar los siguientes intermedios esencialmente como se ha descrito para 6-bromo-4-fluoro-1-isopropil-2-metil-1H-benzoimidazol usando la acetamida correspondiente:

Preparación	Compuesto	EM (ES ⁺): m/z (M+H) ⁺
35	6-bromo-1-ciclopropil-4-fluoro-2-metil-1H-benzoimidazol	270
36	6-bromo-1-ciclopropilmetil-4-fluoro-2-metil-1H-benzoimidazol	284
37	6-bromo-1-ciclopentil-4-fluoro-2-metil-1H-benzoimidazol	298

Preparación 38

5 4-Fluoro-1-isopropil-2-metil-6-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-benzoimidazol

Hacer burbujear nitrógeno en una mezcla de 6-bromo-4-fluoro-1-isopropil-2-metil-1H-benzoimidazol (30,0 g), *bis*(pinacolato)diboro (42,15 g), triciclohexilfosfina (5,43 g), acetato potásico (32,58 g) y DMSO (200 ml). Añadir acetato de paladio (2,8 g) y calentar en un baño de aceite pre-calentado a 90°C durante 1 h. Diluir con AE (200 ml) y filtrar sobre una capa de celite. Lavar la mezcla con salmuera (100 ml), secar sobre sulfato sódico y retirar el disolvente al vacío. Triturar con hexano y filtrar el sólido para proporcionar 27 g del compuesto del título. EM (ES⁺): m/z = 319 (M+H)⁺.

Preparar los siguientes intermedios esencialmente como se ha descrito para 4-fluoro-1-isopropil-2-metil-6-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-benzoimidazol usando los derivados de 6-bromo-benzoimidazol correspondientes:

Preparación	Compuesto	EM (ES ⁺): m/z (M+H) ⁺
39	1-ciclopropil-4-fluoro-2-metil-6-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolano-2-il)-1H-benzoimidazol	317
40	1-ciclopentil-2-metil-6-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolano-2-il)-1H-benzoimidazol	327
41	1-ciclopropilmetil-4-fluoro-2-metil-6-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolano-2-il)-1H-benzoimidazol	331
42	1-ciclopentil-4-fluoro-2-metil-6-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolano-2-il)-1H-benzoimidazol	345

Preparación 43

6-(2-Cloro-5-fluoro-pirimidin-4-il)-4-fluoro-1-isopropil-2-metil-1H-benzoimidazol

Hacer burbujear nitrógeno en una mezcla de 2,4-dicloro-5-fluoro-pirimidina (12,7 g), cloruro de *bis*(trifenilfosfina)paladio (II) (4,9 g), carbonato sódico 2 M en agua (103,7 ml) y 1,2-dimetoxietano (120 ml). Calentar en un baño de aceite pre-calentado a 80°C y añadir gota a gota una solución de 4-fluoro-1-isopropil-2-metil-6-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-benzoimidazol (22 g) en 1,2-dimetoxietano (200 ml). Agitar la mezcla a 84°C durante 1 h. Enfriar a TA, añadir AE (800 ml) y lavar dos veces con salmuera (100 ml). Secar sobre sulfato de magnesio y retirar el disolvente al vacío. Triturar con acetonitrilo para proporcionar 14,4 g del compuesto del título. EM (ES⁺): m/z = 323 (M+H)⁺.

Preparar los siguientes intermedios esencialmente como se ha descrito para 6-(2-cloro-5-fluoro-pirimidin-4-il)-4-fluoro-1-isopropil-2-metil-1H-benzoimidazol usando los derivados de dicloro-pirimidina y boronato correspondientes:

Preparación	Compuesto	EM (ES ⁺): m/z (M+H) ⁺
44	6-(2-cloro-5-fluoro-pirimidina-4-il)-1-ciclopropil-4-fluoro-2-metil-1H-benzoimidazol	321
45	6-(2-cloro-5-fluoro-pirimidina-4-il)-1-ciclopentil-2-metil-1H-benzoimidazol	331
46	6-(2-cloro-5-fluoro-pirimidina-4-il)-1-ciclopropilmetil-4-fluoro-2-metil-1H-benzoimidazol	335

(continuación)

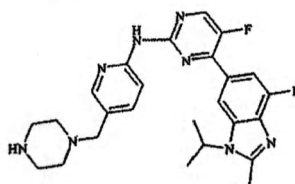
Preparación	Compuesto	EM (ES ⁺): m/z (M+H) ⁺
47	6-(2-cloro-pirimidina-4-il)-1-ciclopentil-4-fluoro-2-metil-1H-benzoimidazol	331
48	6-(2-cloro-pirimidina-4-il)-4-fluoro-1-isopropil-2-metil-1H-benzoimidazol	305

5 Preparar los siguientes intermedios esencialmente como se ha descrito para [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina a continuación usando los derivados de amina y cloro-pirimidina correspondientes:

Preparación	Compuesto	EM (ES ⁺): m/z (M+H) ⁺
49	Ester <i>tert</i> -butílico del ácido 4-{6-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidina-2-ilamino]-piridina-3-ilmetil}piperazina-1-carboxílico	579
50	Ester <i>tert</i> -butílico del ácido 4-{6-[4-(3-ciclopropil-7-fluoro-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-5-fluoro-pirimidina-2-ilamino]-piridina-3-ilmetil}piperidina-1-carboxílico	576
51	Ester <i>tert</i> -butílico del ácido 4-{6-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidina-2-ilamino]-2-metil-piridina-3-ilmetil}piperidina-1-carboxílico	592
52	Ester <i>tert</i> -butílico del ácido 6-[4-(3-ciclopentil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-5-fluoro-pirimidina-2-ilamino]-3',4',5',6'-tetrahidro-2'H-[3,4']bipiridinil-1'-carboxílico	572
53	Ester <i>tert</i> -butílico del ácido 6-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidina-2-ilamino]-2-metil-3',4',5',6'-tetrahidro-2'H-[3,4']bipiridinil-1'-carboxílico	578
54	Ester <i>tert</i> -butílico del ácido 4-{6-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidina-2-ilamino]-piridina-3-iloxi}piperazina-1-carboxílico	580
55	Ester <i>tert</i> -butílico del ácido {6'-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidina-2-ilamino]-2'-metil-3,4,5,6-tetrahidro-2H-[1,3']bipiridinil-4-il}-carbámico	593
56	Ester <i>tert</i> -butílico del ácido {6'-[4-(3-ciclopentil-7-fluoro-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidina-2-ilamino]3,4,5,6-tetrahidro-2H-[1,3']bipiridinil-4-il}-carbámico	587
57	Ester <i>tert</i> -butílico del ácido 4-{6-[4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidina-2-ilamino]-piridina-3-ilsulfanil}piperidina-1-carboxílico	578

Preparación 58

[5-Fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-[5-piperazin-1-ilmetil-piridin-2-il]-amina



10

A una mezcla de éster *tert*-butílico del ácido 4-{6-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-ilamino]-piridina-3-ilmetil}piperazina-1-carboxílico (150 mg) en DCM (10 ml) y metanol (10 ml), añadirle cloruro de hidrógeno 4 M en dioxano (194 μ l). Agitar 10 min y retirar el disolvente al vacío. Purificar con un

cartucho de intercambio catiónico fuerte (SCX) eluyendo con metanol y después con metanol-NH₃ 2 M seguido de cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con DCM/metanol-NH₃ 2 M (al 3%) para proporcionar 120 mg del compuesto del título. EM (ES⁺): m/z = 479 (M+H)⁺.

- 5 Preparar los siguientes intermedios esencialmente como se ha descrito para [5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-(5-piperazin-1-ilmetil-piridin-2-il)-amina:

Preparación	Estructura	Nombre del compuesto	EM (ES ⁺): m/z (M+H) ⁺
59		[4-(3-ciclopropil-7-fluoro-2-metil-3H-benzimidazol-5-il)-5-fluoro-pirimidina-2-il]-(5-piperidina-4-ilmetil-piridina-2-il)-amina	476
60		[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzimidazol-5-il)-pirimidina-2-il]-(6-metil-5-piperidina-4-ilmetil-piridina-2-il)-amina	492
61		[4-(3-ciclopentil-2-metil-3H-benzimidazol-5-il)-5-fluoro-pirimidina-2-il]-(1',2',3',4',5',6'-hexahidro-[3,4']bipiridinil-6-il)-amina	472
62		[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzimidazol-5-il)-pirimidina-2-il]-(2-metil-1',2',3',4',5',6'-hexahidro-[3,4']bipiridinil-6-il)-amina	478
63		[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzimidazol-5-il)-pirimidina-2-il]-(5-(piperidina-4-iloxi)-piridina-2-il)-amina	480

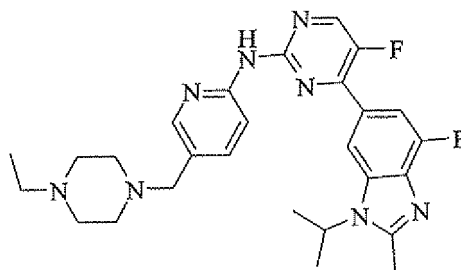
(continuación)

Preparación	Estructura	Nombre del compuesto	EM (ES ⁺): m/z (M+H) ⁺
64		N6'-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidina-2-il]-2'-metil-3,4,5,6-tetrahidro-2H-[1,3']bipiridinil-4,6'-diamina	493
65		N6'-[4-(3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidina-2-il]-3,4,5,6-tetrahidro-2H-[1,3']bipiridinil-4,6'-diamina	487
66		[4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidina-2-il]-[5-(piperidina-4-ilsulfanil)-piridina-2-il]-amina	478

Ejemplo 1

[5-(4-Etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina

5



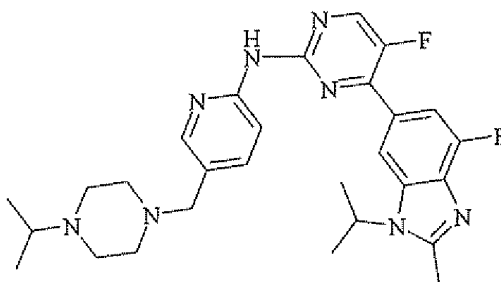
10 Hacer burbujear nitrógeno en una mezcla de 6-(2-cloro-5-fluoro-pirimidin-4-il)-4-fluoro-1-isopropil-2-metil-1H-benzoimidazol (15,9 g), 5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-ilamina (10,85 g), carbonato de cesio (32,10 g), *tris*(dibencilidenoacetona)dipaladio (1,82 g) y 4,5-*bis*(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno (2,35 g) en 1,4-dioxano (197,06 ml). Calentar la mezcla en un baño de aceite pre-calentado a 110°C durante 2 h. Enfriar a TA, diluir con DCM y filtrar sobre una capa de celite. Retirar el disolvente al vacío y purificar por cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyendo con DCM/metanol (al 2%) y después con DCM/metanol-NH₃ 2 M al 2% proporcionando 22,11 g del compuesto del título. EM (ES⁺): m/z = 507 (M+H)⁺.

Preparar los siguientes ejemplos esencialmente como se ha descrito para [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina usando los derivados de amina y cloro-pirimidina correspondientes:

Ejemplo	Estructura	Nombre del compuesto	EM (ES ⁺): m/z (M+H) ⁺
2		[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidina-2-il]-[5-(4-isopropil-piperazina-1-il)-6-metil-piridina-2-il]-amina	521
3		[4-(3-ciclopropilmetil-7-fluoro-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-5-fluoro-pirimidina-2-il]-[5-(4-isopropil-piperazina-1-il)-6-metil-piridina-2-il]-amina	533

5 Ejemplo 4

[5-Fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-[5-(4-isopropil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-amina



10

Añadir triacetoxiborohidruro sódico (299,9 mg) a una mezcla de [5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-[5-(4-isopropil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-amina (130 mg), acetona (31,6 μ l), 1,2-dicloroetano (9 ml) y ácido acético (163 μ l). Calentar a 60°C durante 1 h. Retirar el disolvente al vacío. Purificar con un cartucho de intercambio catiónico fuerte (SCX) eluyendo con metanol y después con metanol-NH₃ 2 M seguido de cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con DCM/metanol-NH₃ 2 M (al 3%) proporcionando 115 mg del compuesto del título. EM (ES⁺): m/z = 521 (M+H)⁺.

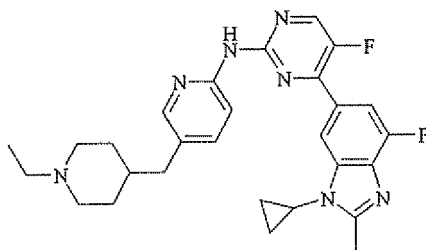
15

Preparar los siguientes ejemplos esencialmente como se ha descrito para [5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-[5-(4-isopropil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-amina usando las aminas correspondientes:

Ejemplo	Estructura	Nombre del compuesto	EM (ES ⁺): m/z (M+H) ⁺
5		[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidina-2-il]-[6-metil-5-(1-metil-piperidina-4-ilmetil)-piridina-2-il]-amina	506
6		[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidina-2-il]-[5-(1-isopropil-piperidina-4-ilmetil)-6-metil-piridina-2-il]-amina	534
7		[4-(3-ciclopentil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-5-fluoro-pirimidina-2-il]-[1'-isopropil-1',2',3',4',5',6'-hexahidro-[3,4']bipiridinil-6-il]-amina	514
8		[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidina-2-il]-[5-(1-isopropil-piperidina-4-iloxi)-piridina-2-il]-amina	522

Ejemplo 9

4-(3-Ciclopropil-7-fluoro-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-5-fluoro-pirimidin-2-il-[5-(1-etil-piperidin-4-ilmetil)-piridin-2-il]-amina



5

Añadir triacetoxiborohidruro sódico (720 mg) a una mezcla de [4-(3-ciclopropil-7-fluoro-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-5-fluoro-pirimidin-2-il]-[5-(1-etil-piperidin-4-ilmetil)-piridin-2-il]-amina (110 mg), 1,2 dicloroetano (1,14 ml) y ácido acético (2709 µl). Calentar a 60°C durante 1 h. Retirar el disolvente al vacío. Purificar con un cartucho de intercambio catiónico fuerte (SCX) eluyendo con metanol y después con metanol-NH₃ 2 M seguido de cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con DCM/metanol-NH₃ 2 M (al 3%) proporcionando 80 mg del compuesto del título. EM

10

(ES⁺): m/z = 504 (M+H)⁺.

Preparar los siguientes ejemplos esencialmente como se ha descrito para [4-(3-ciclopropil-7-fluoro-2-metil-3H-benzimidazol-5-il)-5-fluoro-pirimidin-2-il]-[5-(1-etil-piperidin-4-ilmetil)-piridin-2-il]-amina usando las aminas correspondientes:

5

Ejemplo	Estructura	Nombre del compuesto	EM (ES ⁺): m/z (M+H) ⁺
10		[5-(1-etil-piperidina-4-ilmetil)-6-metil-piridina-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzimidazol-5-il)-pirimidina-2-il]-amina	520
11		(1'-etil-2-metil-1',2',3',4',5',6'-hexahidro-[3,4']bipiridinil-6-il)-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzimidazol-5-il)-pirimidina-2-il]-amina	506
12		[5-(1-etil-piperidina-4-iloxi)-piridina-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzimidazol-5-il)-pirimidina-2-il]-amina	508
13		N ⁴ ,N ⁴ -dietil-N6'-[5-fluoro-7-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzimidazol-5-il)-pirimidina-2-il]-2'-metil-3,4,5,6-tetrahidro-2H-[1,3']bipiridinil-4,6'-diamina	549
14		N6'-[4-(3-ciclopentil-7-fluoro-2-metil-3H-benzimidazol-5-il)-pirimidina-2-il]-N4,N4-dietil-3,4,5,6-tetrahidro-2H-[1,3']bipiridinil-4,6'-diamina	543
15		[5-(1-etil-piperidina-4-ilsulfanil)-piridina-2-il]-[4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzimidazol-5-il)-pirimidina-2-il]-amina	506

Ejemplo 16

Metanosulfonato de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina

- 5 Añadir ácido metanosulfónico (63,59 ml) a una solución de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina (17,3 g) en una mezcla de DCM (100 ml) y metanol (100 ml). Agitar la solución durante 1 h y retirar el disolvente al vacío. Triturar con MtBE y filtrar el sólido proporcionando 20,4 g del compuesto del título. EM (ES⁺): m/z- 507 (M+H)⁺.

Preparar los siguientes ejemplos esencialmente como se ha descrito para metanosulfonato de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina:

Ejemplo	Compuesto	EM (ES ⁺): m/z (M+H) ⁺
17	Metanosulfonato de [5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidina-2-il]-[5-(4-isopropil-piperazina-1-il)-6-metil-piridina-2-il]-amina	521
18	Metanosulfonato de [4-(3-ciclopropilmetil-7-fluoro-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-5-fluoro-pirimidina-2-il]-[5-(4-isopropil-piperazina-1-il)-6-metil-piridina-2-il]-amina	533
19	Metanosulfonato de [5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidina-2-il]-[5-(4-isopropil-piperazina-1-ilmetil)-piridina-2-il]-amina	521
20	Metanosulfonato de [5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidina-2-il]-[6-metil-5-(1-metil-piperidina-4-ilmetil)-piridina-2-il]-amina	506
21	Metanosulfonato de [5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidina-2-il]-[5-(1-isopropil-piperidina-4-ilmetil)-6-metil-piridina-2-il]-amina	534
22	Metanosulfonato de [4-(3-ciclopentil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-5-fluoro-pirimidina-2-il]-[1'-isopropil-1',2',3',4',5',6'-hexahidro-[3,4']bipiridinil-6-il]-amina	514
23	Metanosulfonato de [5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidina-2-il]-[5-(1-isopropil-piperidina-4-iloxi)-piridina-2-il]-amina	522
24	Metanosulfonato de [4-(3-ciclopropil-7-fluoro-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-5-fluoro-pirimidina-2-il]-[5-(1-etil-piperidina-4-ilmetil)-piridina-2-il]-amina	504
25	Metanosulfonato de [5-(1-etil-piperidina-4-ilmetil)-6-metil-piridina-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidina-2-il]-amina	520
26	Metanosulfonato de (1'-etil-2-metil-1',2',3',4',5',6'-hexahidro-[3,4']bipiridinil-6-il)-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidina-2-il]-amina	506
27	Metanosulfonato de [5-(1-etil-piperidina-4-iloxi)-piridina-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidina-2-il]-amina	508
28	Metanosulfonato de N4,N4-dietil-N6'-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidina-2-il]-2'-metil-3,4,5,6-tetrahidro-2H-[1,3']bipiridinil-4,6'-diamina	549
29	Metanosulfonato de N6'-[4-(3-ciclopentil-7-fluoro-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidina-2-il]-N4,N4-dietil-3,4,5,6-tetrahidro-2H-[1,3']bipiridinil-4,6'-diamina	543
30	Metanosulfonato de [5-(1-etil-piperidina-4-ilsulfanil)-piridina-2-il]-[4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidina-2-il]-amina	506

Ejemplo 31

[5-(4-Etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina**Forma cristalina I**

- 5 Mezclar 102,1 mg de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina amorfa con 2 ml de acetona. Aislar el sólido precipitado por filtración al vacío, proporcionando una torta de color amarillo claro y secar en lugar del aparato de filtración durante 30 min, dando 72,1 mg de un sólido. Situar el sólido en una estufa de vacío a 100°C durante 3 h.

Picos representativos de XRD de forma I se muestran en la Tabla 1.

Ejemplo 32

- 10 **[5-(4-Etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina**

Forma cristalina III

- 15 Mezclar 208 mg de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina amorfa con 4 ml de acetona. Suspender la suspensión durante 2 h a 60°C mientras se agita a 1000 rpm y después aislar el sólido por filtración al vacío, proporcionando una torta de color amarillo claro. Secar en lugar del aparato de filtración durante 30 min, dando 112 mg de un sólido (rendimiento del 54%). Colocar en una estufa de vacío a 80°C durante 3 h.

Picos representativos de XRD de forma III se muestran en la Tabla 2. Las posiciones de los picos se verificaron usando un estándar externo.

20 Difracción de Rayos X en Polvo

- Los patrones de XRD de los cristales se obtienen en un difractómetro de rayos X en polvo Bruker D8 Advance, equipado con una fuente de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$) y un detector Vantec, que funciona a 50 kV y 40 mA. Cada muestra se explora entre 4 y 40° en 2θ , con un tamaño de etapa de 0,02° en 2θ y una velocidad de exploración de 9,0 segundos/etapa y con rendijas de divergencia y recepción de 1 mm y una rendija detectora de 0,1 mm. El polvo seco se envasa en un soporte para muestras de carga superior con ranuras y se obtiene una superficie lisa usando un portaobjetos de vidrio. Los patrones de difracción de la forma cristalina se recogen a temperatura y humedad relativa ambiente. Se retira el fondo para el cristal de Forma III antes de la elección del pico mientras que no se retira el fondo para la Forma I.

- 30 En la técnica de cristalografía se conoce bien que, para cualquier forma cristalina dada, pueden variar las intensidades relativas de los picos de difracción debido a la orientación preferida que se produce como resultado de factores tales como la morfología y el hábito del cristal. Cuando están presentes los efectos de la orientación preferida, las intensidades de pico se alteran, pero las posiciones de los picos característicos del polimorfo no cambian. Véase, por ejemplo, The United States Pharmacopeia N.º 23, National Formulary N.º 18, págs. 1843-1844, 1995. Además, también se conoce bien en la técnica de cristalografía que para cualquier forma cristalina dada las posiciones de picos angulares pueden variar ligeramente. Por ejemplo, las posiciones de picos se pueden desplazar debido a una variación en la temperatura o humedad a la que se analiza una muestra, al desplazamiento de la muestra o a la presencia o ausencia de un patrón interno. En el presente caso, una variabilidad de posición de picos de $\pm 0,1$ en 2θ tendrá en cuenta estas variaciones potenciales sin obstaculizar la identificación inequívoca de la forma cristalina indicada.

- 40 La confirmación de una forma cristalina se puede realizar basándose en cualquier combinación única de picos distintivos (en unidades de $^\circ 2\theta$), típicamente los picos más prominentes. Por lo tanto, una muestra preparada de la forma cristalina I de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina se caracteriza por un patrón XRD usando radiación $\text{CuK}\alpha$ como que tiene picos de difracción (valores de 2θ) como los descritos en la Tabla 1 a continuación y en particular, que tiene picos a 4,51 en combinación con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste en 13,09, 16,31 y 18,82; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,1 grados.

Tabla 1: Picos de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina I de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina.

Angulo $^\circ 2\theta$	Valor d Ángstrom	Intensidad %
4,51	19,60	100
5,89	15,00	4
8,98	9,84	1,5
11,20	7,89	2,3
12,57	7,04	1,9

(continuación)

Angulo ° 2θ	Valor d Ángstrom	Intensidad %
13,09	6,76	7
15,93	5,56	3
16,31	5,43	4,4
17,01	5,21	1,9
18,58	4,77	3,1
18,82	4,71	3,6
20,86	4,26	1,5
21,90	4,06	2,2
23,12	3,84	2,4
23,53	3,78	3,7
26,71	3,33	2,4
26,85	3,32	2

5 Una muestra preparada de la forma cristalina III de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina se caracteriza por un patrón XRD usando radiación CuK α como que tiene picos de difracción (valores 2- θ) como los descritos en la Tabla 2 a continuación y en particular, que tiene picos a 21,29 en combinación con uno o más de los picos a 11,54, 10,91 y 12,13; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,1 grados.

Tabla 2: Picos de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina III de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina.

Angulo ° 2θ	Valor d Ángstrom	Intensidad %
7,44	11,87	8
10,91	8,11	19
11,54	7,66	38
12,13	7,29	18
13,89	6,37	25
14,91	5,94	20
15,63	5,67	27
16,06	5,52	11
18,59	4,77	21
18,94	4,68	26
20,43	4,34	21
21,29	4,17	100
21,91	4,05	37
22,13	4,01	12

(continuación)

Angulo ° 2θ	Valor d Ángstrom	Intensidad %
22,45	3,96	8
23,12	3,84	6
23,42	3,80	9
25,95	3,43	17
29,42	3,03	9

RMN de ¹³C en el estado sólido

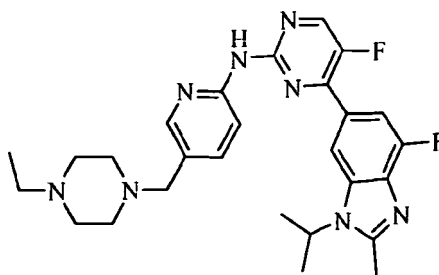
5 Los espectros de RMN de polarización cruzada/giro de ángulo mágico (CP/MAS) (RMN en el estado sólido o SSRMN) se obtienen con un espectrómetro de RMN de calibre ancho Bruker Advance III 400 que opera a frecuencias de ¹H y ¹³C de 400,131 y 10,623 MHz, respectivamente y usando una sonda de resonancia doble. La velocidad de MAS se ajusta a 5 o 10 kHz usando un controlador de MAS-I; las velocidades de giro se mantienen dentro de 2 Hz con respecto al punto de ajuste. El desacoplamiento SPINAL64 en una frecuencia de nutación protónica de 100 kHz se usa para desacoplamiento nuclear. Las bandas laterales de giro se eliminan por una secuencia de supresión de bandas laterales total (TOSS) de cinco puntos. El tiempo de contacto de CP transfiriendo magnetización de protones a carbonos se ajusta a 4 ms y se usa un aumento de energía lineal desde 93,5 a 49,6 kHz en el canal de ¹H potenciando eficiencia de CP. El tiempo de adquisición se ajusta a 34 ms y se adquieren espectros a lo largo de una anchura espectral de 30 kHz con un retardo de reciclaje de 5 segundos. La temperatura de muestra se regula a 297 ± 1°K con el fin de minimizar el calentamiento friccional causado por el giro de las muestras. Los cambios químicos están referenciados externamente (± 0,05 ppm) al pico de ¹³C sometido a desacoplamiento protónico de tetrametilsilano (líquido) puro por medio de la resonancia de campo alto de adamantino (δ = 29,5 ppm).

Una lista de picos de cambios químicos para forma III cristalina de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina es como sigue:

20 RMN de ¹³C: ν(F1) (ppm) 11,7, 12,9, 20,05, 48,6, 52,5, 59,4, 108,9, 110,0, 112,7, 127,3, 129,4, 135,5, 136,4, 148,8, 150,1, 152,2, 154,5, 156,3.

Ejemplo 33**[5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina**

25 **Forma III cristalina-Ruta B**

**a. 1-(6-bromo-piridin-3-ilmetil)-4-etil-piperazina**

30 Añadir 1-etilpiperazina pura (5,6 kg) a una mezcla de 6-bromo-piridina-3-carbaldehído (8,3 kg) y DCM (186 kg). Después, añadir tetraborohidruro de sodio (10,9 kg) en porciones y agitar a 20-30°C durante 12 horas. Desactivar la reacción en una mezcla de DCM (36 kg) y solución acuosa de hidróxido de sodio 2 N (46 kg). Separar las fases y extraer dos veces la fase acuosa con DCM (24 x 2 kg). Combinar las fases orgánicas, lavar con salmuera (50 x 2 kg) y eliminar el disolvente al vacío proporcionando 11,5 kg del compuesto del título. EM (ES⁺): m/z = 285 (M+H)⁺.

b. 5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-ilamina

35 Añadir amoniaco líquido (50,0 kg) a una mezcla desgasificada de 1-(6-bromo-piridin-3-ilmetil)-4-etil-piperazina (14,2 kg), óxido cuproso (200 g) y MeOH (57 kg) a T ≤ 40°C. Calentar la mezcla 67-75°C durante una noche. Enfriar a 20-30°C y filtrar sobre una capa de Celite®. Concentrar el filtrado ya añadir DCM (113 kg) y ajustar el pH a 12-14 con

hidróxido sódico 2 N (23 kg) separar las fases y lavar la fase orgánica con DCN (58 x 2 kg) y combinar las fases orgánicas. Filtrar la mezcla a través de Celite® y concentrar. Disolver el residuo en tolueno (9,7 kg) y cristalizar por la adición de MtBE (8,3 kg) dando 6,0 kg del compuesto del título. Obtener purificación adicional a través de una recristalización de tolueno. EM (ES⁺): m/z = 221 (M+H)⁺.

5 **c. N-isopropil-acetamida**

Añadir carbonato de potasio (28 kg) a una solución de 2-propanamina (12 kg) en acetato de etilo (108 kg) a < 20°C. Enfriar la mezcla a 5 ~ 0°C y añadir cloruro de acetilo (16,7 kg) a aproximadamente 2-3 kg/hora. Agitar hasta completar por cromatografía de gases. Desactivar la reacción con agua (0,8 kg) y filtrar la mezcla de reacción y concentrar proporcionando 13,4 kg del compuesto del título. RMN (CDCl₃) 4,06 (m, 1H), 1,94 (s, 3H), 1,14 (d, 6H).

10 **d. N-(4-bromo-2,6-difluoro-fenil)-N'-isopropil-acetamidina**

15 Añadir cloruro de fosforilo (16,0 kg) a una mezcla de 4-bromo-2,6-difluoro-fenilamina (14,5 kg), N-isopropilacetamida (8,5 kg), TEA (10,6 kg) en tolueno (115 kg) a < 20°C. Agitar a 10-20°C hasta completar por HPLC. Eliminar el disolvente al vacío y añadir MtBE (64 kg). Ajustar el pH de la mezcla con carbonato de sodio acuoso al 10% (250 kg). Filtrar la mezcla y desactivar la torta con MtBE (11 x 2 kg). Separar las fases y lavar la fase acuosa con MtBE (22 x 2 kg). Combinar las fases acuosas y concentrar, filtrar y lavar con ciclohexano (0,6 kg) y secar proporcionando 17,2 kg del compuesto del título. EM (ES⁺): m/z = 292 (M+H)⁺.

e. 6-bromo-4-fluoro-1-isopropil-2-metil-1H-benzoimidazol

20 Añadir terc-butóxido de potasio (6,9 kg) en porciones a una solución de N-(4-bromo-2,6-difluoro-fenil)-N'-isopropil-acetamidina (16,2 kg) en N-metilformamida (76 kg) manteniendo mientras la temperatura a T < 30°C. Calentar la mezcla a 70-75°C hasta completar por HPLC. Eliminar a 20-30°C y desactivar añadiendo en agua (227 kg) después extraer con MtBE (37 x 4 kg). Lavar las fases orgánicas combinadas con salmuera (49 x 2 kg) y concentrar a 25-30 l, añadir n-hexano (64 kg) y filtrar la suspensión dando 11 kg del compuesto del título. EM (ES⁺): m/z = 272 (M+H)⁺.

Obtener purificación adicional disolviendo el compuesto en bruto en DCM y filtrar a través de un gel de sílice y una capa de Celite® seguido por aislamiento a partir de una mezcla de MtBE/hexano.

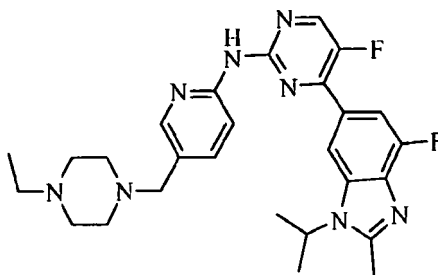
25 **f. 4-fluoro-1-isopropil-2-metil-6-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-benzoimidazol**

30 Hacer burbujear nitrógeno en una mezcla de 6-bromo-4-fluorop-1-isopropil-2-metil-1H-benzoimidazol (600 g), bis(pinacolato)diboro (843 g), triciclohexilfosfina (106 g), acetato de potasio (652 g) y DMSO (3,6 l). Añadir acetato de paladio (49 g) y calentar a 100°C hasta completar por HPLC. Enfriar la mezcla de reacción y diluir con agua (18 l), después filtrar aislando el sólido. Disolver el material en bruto en 1,2-dimetoxietano (450 ml) y filtrar a través de Celite®. Usar el filtrado directamente en la parte g.

g. 6-(2-cloro-5-fluoro-pirimidin-4-il)-4-fluoro-1-isopropil-2-metil-1H-benzoimidazol

35 Hacer burbujear nitrógeno en una mezcla de 6-dicloro-5-fluoro-pirimidina (517 g), carbonato de sodio (586 g) en agua (1,7 l) y 1,2-dimetoxietano (3,4 l). Añadir cloruro de bis(trifenilfosfina)paladio (II) (4,9 g) y calentar la reacción a 80 ± 3°C y añadir gota a gota una solución de 4-fluoro-1-isopropil-2-metil-6-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-benzoimidazol en 1,2-dimetoxietano a partir de la parte f (5,1 l). Agitar la mezcla a 80 ± 3°C hasta completar por HPLC. Enfriar a TA y diluir con agua fría (2,1 l, 5°C). Agitar durante 1 hora después aislar el sólido en bruto por filtración. Lograr purificación adicional del sólido por trituración con IPA dando 472 g del compuesto del título. EM (ES⁺): m/z = 323 (M+H)⁺.

40 **h. Forma cristalina III de [5-(4-Etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina**



45 Hacer burbujear nitrógeno en una mezcla de 6-(2-cloro-5-fluoro-pirimidin-4-il)-4-fluoro-1-isopropil-2-metil-1H-benzoimidazol (465 g), 5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-ilamina (321 g), carbonato de potasio (403 g), 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno (17 g) en alcohol t-amílico (2,3 l). Calentar tris(dibencilidenoacetona) dipaladio (13,2 g) y la mezcla a 100 ± 5°C hasta completar con HPLC. Enfriar a TA, diluir con DCM (1,2 l) y filtrar sobre una capa de Celite®. Extraer el filtrado con HCl 4 M (2,3 l x 2). Combinar las fases acuosas y agitar con carbón activo (32 g). Filtrar a través de Celite®, añadir DCM (1,7 l) y ajustar pH con NaOH (ac. al 28%, 1,5 l). Recoger la fase orgánica y lavar la fase acuosa con DCM (1,7 l). Combinar fases orgánicas, lavar con salmuera (1 l) y secar sobre sulfato de magnesio. Usar un tratamiento de Si-tiol respaldado por sólido retirando paladio residual y el disolvente está intercambiado por acetona. Filtrar la suspensión y secar dando 605 g de producto en bruto como Forma I. Mezclar 605 g de Forma I y 4,3 l de acetona seca. Suspender la suspensión a 56-57°C (reflujo) durante al menos 18

horas y después a temperatura ambiente durante 4 horas. Aislar el sólido por filtración al vacío, produciendo una torta amarillo claro. Secar el sólido en un horno al vacío a 35°C hasta que se obtiene un peso constante de 570 g. Confirmar por XRPD que el material es Forma II del compuesto del título. EM (ES⁺): m/z = 507 (M+H)⁺.

- 5 Los resultados de los siguientes ensayos demuestran pruebas de que los compuestos ilustrados en el presente documento son útiles como inhibidores de CDK4/6 específicos y como agentes antineoplásicos. Como se usa en el presente documento, "CI₅₀" se refiere a la concentración de un agente que produce el 50% de la respuesta inhibitoria máxima posible para ese agente y "CE₅₀" se refiere a la concentración de un agente que produce el 50% de la respuesta máxima posible para ese agente.

Ensayo de Inhibición de CDK4

- 10 Demostrando que los compuestos incluidos dentro de la presente invención muestran afinidad por la cinasa CDK4, se realiza un ensayo de CDK4. Los ensayos funcionales proporcionan confirmación de que los compuestos de la presente invención muestran la capacidad de inhibir la actividad de la cinasa CDK4. Todos los ligandos, radiomarcadores, disolventes y reactivos empleados en los siguientes ensayos están fácilmente disponibles en fuentes comerciales o se pueden sintetizar fácilmente por un especialista en la técnica.

- 15 Se mezclan 10 µl de compuesto de ensayo en una solución de DMSO al 20%, 20 µl de 5'-trifosfato de adenosina (ATP) y Fragmento de Retinoblastoma C-Terminal (CTRF) (Upstate N.º de cat. 12-439) y 10 µl de solución de enzima en una placa de 96 pocillos. La solución de ATP y CRTF se prepara a partir de una mezcla de ATP 40 µM, [³³P]-ATP 0,16 µCi y CRTF 1 µM diluida en tampón de cinasa de ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES) 68 mM pH 7,4, MgCl₂ 6,72 mM, ditiotreitól (DTT) 6,72 mM y TRITON™ X-100 al 0,013%. La solución de enzima se prepara a partir de 8 ng de enzima CDK4 (Proqinase N.º de cat. 0142-0373-1) diluida en el tampón de cinasa descrito anteriormente. Los compuestos de ensayo se diluyen de forma seriada 1:3 en DMSO al 20% creando una curva de 10 puntos con una concentración de partida de 20 µM. Se emplea tampón de DMSO al 20% solo sin compuesto de ensayo añadido como control, se usa ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 500 mM determinando el nivel de ³³P de fondo en ausencia de actividad enzimática. Los reactivos se mezclan e incuban durante 90 min a 20°C. La reacción se termina mediante la adición de 80 µl de H₃PO₄ al 10% (v/v) y la precipitación del material sobre placas de filtro de fibra de vidrio (Millipore, MAFC NOB 50). Los pocillos se lavan cuatro veces con H₃PO₄ al 0,5% y la radiactividad incorporada se determina con un contador de escintilación de microplacas (Microbeta Trilux, Wallac).

- 30 La diferencia entre el valor de la mediana del control alto y bajo se toma como actividad del 100%. Se usa un ajuste de curva logística de cuatro parámetros generando los valores de CI₅₀ usando el software ActivityBase™ (IDBS, Alameda, CA). Todas las sales de mesilato de los compuestos ejemplificados presentan una CI₅₀ de < 10 nM en el ensayo anterior. El compuesto del Ejemplo 25 tiene una CI₅₀ de 0,003 µM en el ensayo descrito anteriormente. Esto demuestra que las sales de mesilato de los compuestos ejemplificados son inhibidores potentes de CDK4.

Ensayo de Inhibición de CDK6

- 35 Se mezclan 10 µl de compuesto de ensayo en una solución de DMSO al 20%, 20 µl de ATP y CRTF (Upstate N.º de cat. 12-439) y 10 µl de solución de enzima en una placa de 96 pocillos. La solución de ATP y CRTF se prepara dando una concentración final de ATP 100 µM, [³³P]-ATP 0,5 µCi y CRTF 0,8 µM diluido en tampón de cinasa de HEPES 68 mM pH 7,4, MgCl₂ 6,72 mM, DTT 2,64 mM y TRITON™ X-100 al 0,004%. La solución de enzima se prepara para una concentración final de 1,7 ng/µl de enzima CDK6 (Proqinase N.º de cat. 7533) diluida en el tampón de cinasa descrito anteriormente en el ensayo de inhibición de CDK4. Los compuestos de ensayo se diluyen de forma seriada 1:3 en DMSO al 20% creando una curva de 10 puntos con una concentración de partida de 20 µM. Se emplea tampón de DMSO al 20% solo sin compuesto de ensayo añadido como control, se usa EDTA 500 mM determinando el nivel de ³³P de fondo en ausencia de actividad enzimática. Los reactivos se mezclan e incuban durante 90 min a 20°C. La reacción se termina mediante la adición de 80 µl de H₃PO₄ al 10% (v/v) y la precipitación del material sobre placas de filtro de fibra de vidrio (Millipore, MAFC NOB 50). Los pocillos se lavan cuatro veces con H₃PO₄ al 0,5% y la radiactividad incorporada se determina con un contador de escintilación de microplacas (Microbeta Trilux, Wallac).

- 50 Los datos se analizan de la misma manera que para CDK4. Los compuestos ilustrados preferidos presentan una CI₅₀ de <0,03 µM. El compuesto del Ejemplo 19 tiene una CI₅₀ de 0,005 µM en el ensayo descrito anteriormente. Esto demuestra que los compuestos ilustrados preferidos son inhibidores potentes de CDK6.

Ensayo para inhibición de PIM1 Cinasa

- 55 Se incuban Pim-1 (humana, concentración final de 0,46 nM) con MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA 0,2 mM, 100 µM de un péptido sustrato apropiado (véase protocolo de ensayo de inhibición de Pim-1 cinasa según se describe en Chen, L.S. y col. (2009) Blood, DOI: 10.1182/blood-2009-03-212852), acetato de Mg 10 mM y [³³P-ATP] (actividad específica de aproximadamente 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). La reacción se inicia mediante la adición de la mezcla de MgATP y después se incuban durante 40 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detiene mediante la adición de una solución de ácido fosfórico al 3%. Después se aplican puntualmente 10 µl de la reacción sobre una tira de filtro P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes del secado y del recuento de escintilación. Para el ensayo de la inhibición de compuesto, los compuestos proporcionados como soluciones madre 10 mM en DMSO al 100% se diluyen 1:10 en DMSO al 100% dando una solución madre 50x de la concentración más alta de la curva. Después, la solución madre 50x se diluye de forma seriada 1:3 en DMSO al 100% creando una curva de respuesta a la concentración de 10 puntos y se diluye 1:50 (de 20 µM a 0,001 µM finales en una concentración final de DMSO del 2%) en la mezcla de reacción determinando la actividad del compuesto. Los pocillos de control contienen solo DMSO mientras la línea basal se establece en pocillos de control que se han detenido con ácido a los 0 minutos de tiempo. Después, el porcentaje de inhibición determinado a partir de los controles en cada placa y los datos de concentración de compuesto de diez

puntos se ajustaron a una ecuación logística de cuatro parámetros usando ACTIVITYBASE 4.0.

Los compuestos ilustrados preferidos presentan una CI_{50} de $<0,01 \mu\text{M}$. El compuesto del Ejemplo 25 tiene una CI_{50} de $<0,003 \mu\text{M}$ en el ensayo descrito anteriormente. Esto demuestra que los compuestos ilustrados preferidos son inhibidores potentes de la Pim-1 cinasa.

5 Ensayo de solubilidad

Las cantidades apropiadas de compuesto de ensayo se pesan en frascos cromatográficos separados. Se añade el volumen necesario de tampón Fosfato 0,05 M, pH 8,0 (disolver 6,7 g de Fosfato de Sodio Dibásico X $7\text{H}_2\text{O}$ en 500 ml de agua de calidad HPLC, ajustar a pH 8,0 con Ácido Fosfórico al 85%) al vial de muestra consiguiendo una concentración diana de 2,0 mg/ml. Una solución patrón apropiada en DMSO se prepara añadiendo el volumen necesario de DMSO al vial patrón consiguiendo una concentración diana de 2,0 mg/ml. Los viales se tapan de forma segura y se ponen en un dispositivo de rotación. Los viales se rotan a través de 360° durante al menos 16 horas a temperatura ambiente con una velocidad angular de aproximadamente 50 rpm. Después de la rotación se realiza una inspección visual de los viales individuales. Se filtran 250 μl de cada vial a través de un filtro de vidrio de 0,7 μm . El filtrado de muestra y el filtrado patrón se recogen en pocillos separados de placas de 96 pocillos profundos. Se prepara una serie de dilución (2000 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 2,0 $\mu\text{g/ml}$ más una muestra de DMSO en blanco) mediante la dilución en serie apropiada en DMSO de la solución patrón de 2,0 mg/ml.

Las soluciones de muestra y patrón se analizan mediante HPLC (Columna CL: XTerra EM, C18, 2,1 X 50 mm, 3,5 μm , a 50°C ; fases móviles: A – Ácido Fórmico al 0,2% en Agua; B – Ácido Fórmico al 0,2% en acetonitrilo; Gradiente: B al 5–100% en 3 min, mantener a B al 100% durante 0,5 min; caudal: 750 $\mu\text{l/min}$; volumen de inyección: 1 μl ; exploración de detector de matriz de diodos desde 200 nm hasta 400 nm. Se selecciona la longitud de onda extraída y usada para la cuantificación proporcionando la estimación más exacta de las preparaciones de muestra). El tiempo de retención usado para la asignación de picos para el compuesto de ensayo se obtiene del cromatograma de la preparación patrón de 200 $\mu\text{g/ml}$.

Los valores de solubilidad se calculan usando una curva de calibración de cuatro niveles. Se usa la línea de mejor ajuste para el área de pico de los patrones de calibración calculada mediante un sistema de gestión de datos cromatográficos usando un ajuste lineal o cuadrático pasando por cero. Los resultados de solubilidad se presentan en mg/ml. Los compuestos ilustrados preferidos presentan una solubilidad de al menos 2 mg/ml en tampón fosfato pH 8 usando el ensayo anterior. Estos datos demuestran de este modo que los compuestos ejemplificados preferidos son fácilmente solubles en una solución acuosa.

30 Ensayo de biodisponibilidad oral en ratas

Se obtienen ratas macho Sprague Dawley (intervalo de peso corporal de 250–300 g) con una cánula en la arteria femoral permanente en Charles River, Wilmington, MA 01887, Estados Unidos. Se administra el compuesto de ensayo por vía intravenosa en solución (2 ml/kg) en: N–metilpirrolidona al 10%/Captisol® al 18% en tampón fosfato 22,5 mM, pH 3. La concentración final de fármaco es de 0,25 mg/ml (equivalentes de base libre). Se obtienen muestras de sangre usando la cánula permanente en el transcurso de 24 h. Después, se administra a los animales una dosis oral de compuesto de ensayo en suspensión (5 ml/kg) en hidroxietilcelulosa al 1% p/v/polisorbato 80 al 0,25% v/v/antiespumante al 0,5% v/v en agua purificada. La concentración final de fármaco es de 0,2 mg/ml (equivalentes de base libre). Se recogen muestras de sangre adicionales a través de la cánula permanente en el transcurso de 24 h. Las muestras de plasma se obtuvieron por centrifugación y se almacenaron congeladas (-20°C) antes del análisis.

Se añade un compuesto patrón interno (para normalización) en acetonitrilo/metanol (1:1, v/v) a muestras de plasma precipitando la proteína y las muestras se centrifugan antes del análisis. Los sobrenadantes se analizan mediante inyección y elución en gradiente rápida en una columna Javelin Betasil C18 (cartucho de 20 x 2,1 mm, Fase móvil A: Agua/bicarbonato de amonio 1 M, 2000:10 v/v, Fase móvil B: MeOH/bicarbonato de amonio 1 M, 2000:10 v/v). Los analitos eluidos se detectan mediante análisis CL–EM–EM usando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Sciex API 4000. Las concentraciones de compuestos en plasma se determinan a partir de patrones preparados en condiciones idénticas.

La biodisponibilidad oral se obtiene dividiendo el área bajo la curva de concentración de plasma en el tiempo después de la administración oral entre el área bajo la curva después de la administración intravenosa (después de normalizar por la dosis administrada). Los resultados se presentan como Fracción biodisponible en relación con la dosis intravenosa (%F). Los compuestos ilustrados preferidos presentan un valor de %F de $>20\%$ en el ensayo mencionado anteriormente. El compuesto del Ejemplo 22 presenta un valor de %F del 48,5% en el ensayo mencionado anteriormente. Esto demuestra que los compuestos ilustrados preferidos tienen una buena biodisponibilidad oral.

55 Ensayo de Inhibición de la fosforilación de la proteína de retinoblastoma (pRb) y contenido de ADN

Células COLO 205 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) se siembran en placas a 2000 células/pocillo en placas de 96 pocillos Beckman Dickinson BIOCOAT™ y se incuban en medio RPMI 1640 (por ejemplo, GIBCO, N.º de catálogo 52400–025) con Suero Fetal Bovino al 10% (FBS, por ejemplo, Gibco N.º de cat. 11000–144) y piruvato de sodio al 1% (Gibco N.º de catálogo 11360–070) a 37°C , CO_2 al 5% durante 24 h. Las células se tratan añadiendo compuesto de ensayo al medio, dosificando a 10 puntos de diluciones 1:3 a lo largo del intervalo de 20 μM a 0,001 μM y con concentración final de DMSO del 0,25%. Después de una exposición durante 24 h a los compuestos, las células se fijan con el fijador PREFER™ [Anatech LTD., N.º de Cat. 414] durante 30 minutos a temperatura ambiente, después se permeabilizan con TRITON® X100 al 0,1% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 15 min a temperatura ambiente. Las células se lavan dos veces con PBS, después se digieren con ARNasa 50 $\mu\text{g/ml}$ (Ribonucleasa A, Sigma N.º de cat. R–6513) en una incubadora a 37°C durante 60 min. Las

células fijadas se bloquean con albúmina sérica bovina al 1% (BSA, Amersham N.º de cat. RPN412V) durante 30 min. Se añade anticuerpo primario, anticuerpo monoclonal de ratón purificado anti-fosfoRb (BD Pharmigen N.º de cat. 558385) a 1:2000 en PBS con BSA al 1% a las células y se incuban durante una noche a 4°C. Después de 3 lavados con PBS, las células se incuban con anticuerpo secundario marcado Alexa488, anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón Alexa 488 (Invitrogen N.º de cat. A11017) durante 1 h a temperatura ambiente. De nuevo, se lavan 3 veces con PBS y después se añade yoduro de propidio 15 µM (dilución 1:100 con PBS a partir de la solución original, Invitrogen N.º de cat. P3566) a los núcleos teñidos. Las placas de fluorescencia se exploran con un ACUMEN EXPLORER™ [citómetro de microplacas de fluorescencia de exploración por láser (compuesto por excitación por láser de iones de argón a 488 nm y detección de tubo fotomultiplicador múltiple), fabricado por TTP LABTECH LTD] midiendo la fosforilación de la proteína Rb y el contenido de ADN. El análisis por imagen se basa en señales fluorescentes celulares identificando células en diferentes subpoblaciones. Los resultados del ensayo son el porcentaje de cada subpoblación identificada, % de fosfoRb positivas, % 2 N y % 4 N. Los valores de CI_{50} y CE_{50} se determinan mediante el ajuste de la curva a una logística de cuatro parámetros para cada resultado usando ACTIVITY BASE™. Todas las sales de mesilato de los compuestos ejemplificados presentan una CI_{50} de < 200 nM en el ensayo anterior. El compuesto del Ejemplo 25 tiene una actividad de aproximadamente 100 nM en el ensayo descrito anteriormente. Esto demuestra que los compuestos ilustrados son inhibidores potentes de la actividad cinasa de CDK4/6 (medida por un nivel bajo de fosforilación de pRb) en un ensayo basado en células enteras *in vitro*.

Además, todas las sales de mesilato de los compuestos ejemplificados pueden inducir una detención específica en la fase G1 del ciclo celular aún cuando están presentes a concentraciones de al menos 2 µM. La detención específica en G1 se indica por >90% de células que tienen un genotipo 2N. La detención específica en G1 aún a concentraciones elevadas, fisiológicamente relevantes, de compuesto activo demuestra que los compuestos de la invención son inhibidores específicos de CDK4/6 y que la inhibición inespecífica de otras Cdk está minimizada, lo que daría como resultado la detención del ciclo celular en otras fases.

Modelos de xenoinjerto subcutáneo humano

Células de cáncer colorrectal humano (colo-205), células de leucemia mieloide aguda humana (AML) (MV4-11), células de glioblastoma humano (U87MG) y células de cáncer pulmonar humano (NCI H460) se expanden en cultivo (colo-25 y NCI H460 se cultivan en medio RPMI 1640 con L-glutamina, HEPES 25 mM, piruvato de Na 1 mM, FBS al 10%; MV4-11 se cultiva en medio de Dulbecco modificado por Iscove con L-glutamina, HEPES 25 mM, FBS al 10%; U87MG y calu 6 se cultivan en MEM de Eagle con Sales de Earle, L-glutamina y aminoácidos no esenciales, piruvato de Na 1 mM y FBS al 10%), se recogen (colo-205, U87-MG y NCI H460 por tratamiento con tripsina (Invitrogen catálogo 25200-056); MV4-11 por centrifugación) y se inyectan por vía subcutánea (5 millones de células/animal mezcladas 1:1 en Matrigel, BD Biosciences) en el flanco posterior de ratones desnudos atímicos. El compuesto de ensayo se prepara en un vehículo apropiado (hidroxietilcelulosa al 1%, en tampón fosfato 25 mM pH 2) y se administra por sonda oral diariamente (a 25, 50 o 100 mg/kg (mpk)) durante 21 días cuando se establecen los tumores (11-29 días después del implante). La respuesta del tumor se determina mediante la medición del volumen del tumor realizada dos veces por semana durante el ciclo de tratamiento.

El procedimiento estadístico evaluando el Retardo del Crecimiento Tumoral (TGD-procedimiento de interpolación individual) es el siguiente: para cada animal, se calcula el tiempo hasta alcanzar un volumen de tumor específico (umbral) mediante la interpolación entre la última medición antes de alcanzar el umbral y la siguiente medición. La interpolación es lineal usando el $\log_{10}(\text{volumen})$ frente al tiempo. Si un animal no alcanza nunca el umbral, su tiempo de cruce se presenta a ">T", donde T es el último día medido para ese animal. Estos tiempos de cruce se analizan como datos de "tiempo hasta el acontecimiento" con censura por la derecha usando una distribución Weibull. Se determinan una media y una desviación típica para cada grupo de tratamiento. El Retardo del Crecimiento Tumoral (TGD) es la diferencia en el tiempo de cruce medio entre un grupo tratado y el grupo control de vehículo. Se realizan ensayos T usando las medias y las desviaciones típicas del análisis de Weibull. El peso corporal se toma como una medida general de toxicidad.

Siguiendo un protocolo esencialmente como el que se ha descrito anteriormente, el compuesto del Ejemplo 16 demuestra actividad antitumoral en estos modelos, como se muestra en la Tabla 3, demostrando de este modo que los compuestos ilustrados preferidos tienen una actividad *in vivo* potente contra un intervalo de tumores Rb⁺.

Además, en los xenoinjertos de AML MV4-11, se observa regresión tumoral a una dosis de 100 mg por kg (mpk), indicativa de la actividad inhibidora de Pim-1 proapoptótica del compuesto del Ejemplo 16, véase tabla 4.

Tabla 3: Retardo del Crecimiento Tumoral en diferentes modelos de xenoinjertos humanos

Xenoinjerto	Dosis	Días de TGD (750 m ³)	SE
colo-205	100 mpk	39,9	4,6
	50 mpk	17,4	3,2
	25 mpk	15,3	3,8
MV4-11	100 mpk	28,8	1,1
	50 mpk	11,5	4,0
	25 mpk	10,4	4,7

(continuación)

Xenoinjerto	Dosis	Días de TGD (750 m ³)	SE
U87 MG	100 mpk	21,4	2,7
	50 mpk	10,0	2,2
	25 mpk	6,1	3,2
H460	100 mpk	6,7	2,7
	50 mpk	4,0	4,2
	25 mpk	1,5	1,8

Tabla 4: actividad antitumoral del compuesto del ejemplo 16 en el modelo MV4-11

Tratamiento	Volumen tumoral (mg) al comienzo del periodo de dosificación (día 28)	SE (mg)	Valor p	Volumen tumoral (mg) al final del periodo de dosificación (día 49)	SE (mg)	Valor p
Vehículo, 0,2 ml, PO, dosis qdx21/HEC al 0,1% + AF al 0,1% en PB 25 mM pH2	219,45	17,42	Ctrl	1271,15	100,9	Ctrl
Compuesto de ejemplo 16, 100 mpk, PO, dosis qdx21	225,94	26,61	NS	116,68	15,29	***

Medidas de volumen tumoral. Valor p es la significancia estadística comparada con el grupo control de vehículo (Ctrl) en el día de la medida; NS: no significativo; ***: p <= 0,001.

5 Modelo de xenoinjerto de cerebro ortópico

Modelo de tumor cerebral *in vivo*: se anestesian ratas NIH-RNU macho con un peso entre 225 y 300 g con isoflurano y se ponen en un aparato estereotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA). Se realiza una incisión en la línea media y se taladra un agujero de trepanación de 1 mm, a 2 mm lateral de la línea media y 3 mm anterior a la sutura coronaria. Una suspensión celular de 5×10^5 células tumorales de glioblastoma humano U87 MG (cultivadas en MEM de Eagle con Sales de Earle, L-glutamina y aminoácidos no esenciales, piruvato de Na 1 mM y FBS al 10%) en 10 μ l (5×10^5 células para dosificación qd y 1×10^6 para dosificación q2d) se inyecta a una profundidad de 3 mm mediante una jeringa Hamilton de 25 o 50 μ l durante un período de aproximadamente 2 min usando una bomba de jeringa montada en el estereotáxico (Nano-Injector, N.º de modelo 53310 y Stereotaxic Adapter Clamp, parte N.º 51681, Stoetling Co, Wood Dale, IL) dejando la jeringa en posición durante 1 min adicional evitando el reflujo y la jeringa se retira lentamente. El agujero se sella con cera ósea, el campo quirúrgico se lava con solución salina y la incisión se cierra con suturas o grapas para heridas.

El compuesto de ensayo se formula en vehículo (hidroxietilcelulosa al 1% p/v/polisorbato al 0,25% v/v/antiespumante en agua purificada al 0,05% v/v) y se administra cada día durante 21 días a 20, 40 y 80 mpk (qdx21) y 80 mpk q2dx10 empezando el día 4 después del implante de tumor.

La variable de resultado principal es la supervivencia. Los animales se supervisan diariamente hasta la muerte y tras consultar al personal veterinario y en adhesión a la política de implantación de tumores, se eutanasia si el animal se vuelve moribundo. Las células se implantan en el lóbulo frontal minimizando potenciales disfunciones cerebrales tales como deficiencias motoras y del control de funciones vitales. Los tumores del lóbulo frontal en seres humanos se dice que son "silentes", es decir, los síntomas de presentación más comunes incluyen cefalea, náuseas, vómitos y deficiencias cognitivas. Por lo tanto, es más probable que la morbilidad se manifieste como letargo y pérdida de peso corporal. Los datos de supervivencia se analizan mediante el procedimiento de Kaplan-Meier para análisis de la mediana de supervivencia usando JMP v6.0.2 (Instituto SAS).

Siguiendo un protocolo esencialmente como se ha descrito anteriormente, el compuesto del Ejemplo 16 dio como resultado un aumento estadísticamente significativo en la mediana de la supervivencia (cuando se compara con animales tratados con vehículo) a las siguientes dosis; 40 mpk qd, 80 mpk qd y 80 mpk q2d, (véase la Tabla 5) demostrando, por tanto, que los compuestos preferidos de la invención pueden atravesar la barrera hematoencefálica y tienen una potente actividad inhibitoria *in vivo* en un modelo de xenoinjerto de tumor de

glioblastoma ortópico.

Tabla 5: media y mediana de supervivencia (días) que resulta de la administración del compuesto de ejemplo 16

Grupo de tratamiento	Mediana de Supervivencia (días)	Error estándar (días)	valor p Rango logarítmico	Supervivencia media(días)
Vehículo	25,1	2,8	-	27
20 mg/kg PO qd	29,8	0,7	0,5	31
40 mg/kg PO qd	34,3	1,7	0,0316	37
80 mg/kg PO qd	36,9	1,3	0,0006	37
Vehículo PO q2d	23,0	3,5	-	24
80 mg/kg PO q2d	33,0	1,2	0,0295	14

5 En un experimento separado, determinando los niveles de compuesto en plasma y de exposición cerebral, se administra una dosis única del compuesto del Ejemplo 16 por vía oral a 30 mg/kg a ratas Sprague Dawley macho que no llevan el tumor. Se toman muestras en el transcurso de 48 h determinando las concentraciones en plasma y cerebro. Los animales se sacrifican y se recoge sangre completa mediante punción cardiaca y se aísla el plasma mediante centrifugación. El cerebro entero se recoge y se congela de golpe en nitrógeno líquido.

10 Se preparan muestras de cerebro por homogenización en metanol al 80%/H₂O al 20%. Se añade un compuesto patrón interno en acetonitrilo/metanol (1:1, v/v) a muestras de plasma u homogenizado de cerebro precipitando proteína y las muestras se centrifugan antes del análisis. Los sobrenadantes se analizan mediante inyección y elución en gradiente rápida en una columna Javelin Betasil C18 (cartucho de 20 x 2,1 mm, fase móvil A: Agua/NH₄HCO₃ 1 M, 2000:10 v/v, fase móvil B: MeOH/NH₄HCO₃ 1 M, 2000:10 v/v). Los analitos eluidos se detectan mediante análisis de CL-EM-EM usando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Sciex API 4000. Las concentraciones de compuestos en plasma o cerebro se determinan a partir de patrones preparados en condiciones idénticas.

15 Las concentraciones de plasma y de cerebro se determinan en este estudio a partir de un grupo de ratas en cada punto temporal (véanse Tablas 6^a y 6^b) y se usan calculando el área bajo la curva de concentración en plasma/tiempo o la curva de concentración en cerebro/tiempo de 0 a 48 horas. El examen de la proporción de la exposición en el cerebro bien usando el área bajo la curva (AUC) o las concentraciones máximas en plasma y en cerebro (C_{máx}), véase tabla 6c, demuestran que el compuesto se distribuye bien en el cerebro con una proporción cerebro/plasma de aproximadamente 1. Las concentraciones máximas (T_{máx}) se detectan en 4 horas. Estos experimentos demuestran que el compuesto de ejemplo 16 es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica y distribuirla bien en el cerebro. En contraste, los presentes inventores han determinado que un compuesto preferido a partir del documento WO 03/062236 (6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona) presenta proporciones de distribución de cerebro:plasma de 0,17 (AUC) y 0,1 (C_{máx}) en el mismo ensayo, indicando que el compuesto se distribuye de forma relativamente pobre en el tejido cerebral en este modelo.

Tabla 6a: concentraciones en plasma del compuesto de ejemplo 16 (ng/ml) determinado en ratas SD macho

Tiempo (h)	2	4	24	48
Media	1014	1504	1018	972,0
S.D.	288,0	134,8	236,2	666,0
% de CV	28,4	9,0	23,2	68,5
n	3	3	3	3

30 Tabla 6b: concentraciones en cerebro del compuesto de ejemplo 16 (ng/ml) determinado en ratas SD macho

Tiempo (h)	2	4	24	48
Media	758,5	1500	992,4	718,0
S.D.	82,38	268,9	54,83	232,0
% de CV	10,86	17,93	5,525	32,21
n	3	3	3	3

Tabla 6a: exposición media al compuesto de ejemplo 16 en plasma y cerebro determinado en ratas SD macho

Parámetro	Unidades	Plasma	Cerebro	Proporción cerebro/plasma
AUC	ng * horas/ml o ng * horas/g	52300	47900	0,92
Intervalo de AUC		(0-48 horas)	(0-48 horas)	
Cmáx	ng/ml o ng/g	1500	1500	1,0
Tmáx	horas	4,00	4,00	

Estudios de combinación con temozolomida

5 Se cultivan xenoinjertos subcutáneos de U87 MG y se miden como se describe previamente. El compuesto de ejemplo 16 se formula y administra como se describe previamente y se administra oralmente una vez al día a partir de los días 11-31. Temozolomida (Schering Corporation) se formula en hidroxietilcelulosa al 1% p/v/polisorbato 80 al 0,25% en agua purificada y se administra por inyección intraperitoneal en los días 11 y 18. Una comparación de la actividad del agente individual de temozolomida con un tratamiento de combinación con el compuesto de ejemplo 16 se muestra en la Tabla 7. El crecimiento tumoral se analiza por análisis de interacción de dos vías; los volúmenes de tumores transformados logarítmicamente se analizaron con un análisis de medidas repetidas de varianza (ANOVA) usando un modelo de correlación de energía especial en SAS, versión 9.1 (Cary, NC). Se usó una estructura factorial estimando los efectos del tratamiento y la interacción entre los dos tratamientos. El efecto de la interacción se sometió a ensayo a través de todos los puntos temporales (ensayo "general") y en cada punto temporal. La inhibición incrementada de crecimiento tumoral vista en los grupos de combinación comparada con aquellos que recibieron temozolomida sola indican que la temozolomida y el compuesto de ejemplo 16 demuestran actividad anti-tumoral *in vivo* potente en combinación en un modelo de xenoinjerto de tumor de glioblastoma.

Tabla 7: combinación de estudio de xenoinjerto U87-MG de compuesto de ejemplo 16 y temozolomida

Tratamiento	Volumen tumoral (mg) al final del periodo de dosificación (día 31)	SE (mg)	Valor p
Vehículo, 0,2 ml, PO, dosis qdx21/HEC al 0,1% + AF al 0,1% en PB 25 mM pH2	456,54	169,3	Ctrl
Temozolomida, 3 mpk, IP, q7dx2	101,88	44,16	**
Compuesto de ejemplo 16, 50 mpk, PO, qdx21/temozolomida, 3 mpk, IP, q7dx2	30,22	7,57	***

Medidas de volumen tumoral. Valor p es la significancia estadística comparada con el grupo control de vehículo (Ctrl) en el día de la medida; NS: no significativo; ***: p <= 0,001.

20 Se cultivan los xenoinjertos subcutáneos de U87 MG y los supervivientes se miden como se ha descrito anteriormente. Los grupos de animales se tratan con temozolomida (TMZ), o una combinación de ejemplo 16 (dosificación cada día o en días alternos) más temozolomida. Como se muestra en la Tabla 8, el incremento en supervivencia media en los grupos de combinación comparados con aquellos que reciben temozolomida sola indica que la temozolomida y el compuesto de ejemplo 16 tienen actividad inhibitoria *in vivo* potente en combinación en un modelo de xenotransplante tumoral de glioblastoma ortotrópico. La ausencia de mortalidad y la pérdida de peso corporal (véase Tabla 9) para los tratamientos de combinación indican que se toleran bien y que no hay toxicidades solapantes.

Tabla 8: media y mediana de supervivencia (días) que resulta de la administración del compuesto del Ejemplo 16 y temozolomida.

Grupo de tratamiento	Mediana de Supervivencia (días)	Error estándar (días)	valor p Rango logarítmico	Supervivencia media(días)
1ml/kg de vehículo PO qdx20	28,1	1,9	-	30
Temozolomida (TMZ) IP 3 mg/kg (días 6 y 13)	46,9	3,3	< 0,0001	47
40 mg/kg de compuesto de ejemplo 16 qdx20 + 3 mg/kg de TMZ IP (días 6 y 13)	60,1	3,6	0,0002	61
40 mg/kg de compuesto de ejemplo 16 qdx10 + 3 mg/kg de TMZ IP (días 6 y 13)	70,5	4,4	0,0032	70

Tabla 9: mortalidad y peso corporal de animales a partir del estudio de temozolomida/compuesto de ejemplo 16

Tratamiento	Pérdida de peso corporal máxima (%)	Animales muertos/totales
Vehículo, 0,2 ml, PO, dosis qdx21/HEC al 0,1% + AF al 0,1% en PB 25 mM pH2	0	0/8
Temozolomida, 3 mpk, IP, q7dx2	-1	0/8
Compuesto de ejemplo 16, 50 mpk, PO, qdx21/temozolomida, 3 mpk, IP, q7dx2	-1	0/8

5 Estudios de combinación con gemcitabina

Se cultivan y se miden xenoinjertos subcutáneos de calu-5 (pulmonares) como se describe anteriormente, Se formuló gemcitabina en solución salina (cloruro de sodio al 0,9% en agua purificada) y se administró por medio de inyección intraperitoneal q3dx7. Se administró el compuesto de ensayo qdx21. En la tabla 10 se muestran una comparación de actividad del agente individual de gemcitabina con tratamientos de combinación que contienen tanto gemcitabina como el compuesto de ejemplo 16. El crecimiento tumoral se analiza por análisis de interacción de dos vías. La inhibición incrementada de crecimiento tumoral vista en los grupos de combinación comparada con aquellos que recibieron gemcitabina sola indican que los fármacos demuestran actividad anti-tumoral *in vivo* potente en combinación en un modelo de xenoinjerto de tumor de cáncer pulmonar. La baja incidencia de mortalidad y la pérdida de peso corporal para los tratamientos de combinación indican que se toleran bien y sugieren que no hay toxicidades solapantes (véase tabla 11).

Tabla 10. Estudio de xenoinjerto de calu-3 en de combinación de compuesto de ejemplo 16 y gemcitabina

Tratamiento	Volumen tumoral (mg) al final del periodo de dosificación (día 38)	SE (mg)	Valor p
Vehículo, HEC al 1% en PB 25 mM pH 2, 0,2 ml, PO, qdx21/solución salina, 0,2 ml, IP, q3dx7	949,73	202,66	Ctrl
Gemcitabina, 60 mpk, IP, q3dx7	509,18	64,89	**

(cont.)

Compuesto de ejemplo 16, 50 mpk, PO, qdx21/gemcitabina, 60 mpk, IP, q3dx7	234,94	30,86	***
Medidas de volumen tumoral. Valor p es la significancia estadística comparada con el grupo control de vehículo (Ctrl) en el día de la medida; **: 0,001 < p <= 0,01; ***: p <= 0,001.			

Tabla 11: mortalidad y peso corporal de animales a partir del estudio de gemcitabina/compuesto de ejemplo 16

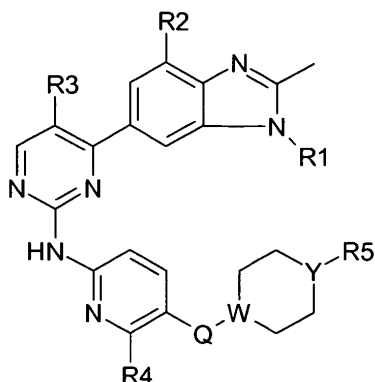
Tratamiento	Pérdida de peso corporal máxima (%)	Animales muertos/totales
Vehículo, HEC al 1% en PB 25 mM pH 2, 0,2 ml, PO, qdx2/solución salina, 0,2 ml, IP, q3dx7	0	0/7
Compuesto de ejemplo 16, 50 mpk, PO, qdx21/gemcitabina, 60 mpk, IP, q3dx7	-14	1/7
Gemcitabina, 60 mpk, IP, q3dx7	-12	0/7

5 Se prefiere la administración oral de los compuestos de la presente invención. También se prefiere la administración intravenosa de los compuestos de la presente invención. Dependiendo de las circunstancias, se pueden usar otras vías de administración o incluso preferirse. Por ejemplo, la administración transdérmica puede ser muy deseable para pacientes que son olvidadizos o a los que les irrita tomar medicinas orales. Los compuestos de la presente invención también se pueden administrar por la vía percutánea, intramuscular, intranasal o intrarrectal en circunstancias particulares. La vía de administración se puede variar de cualquier forma, con limitación de las propiedades físicas de los fármacos, la comodidad del paciente y del asistente sanitario y otras circunstancias pertinentes (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición, Mack Publishing Co. (1990)).

10

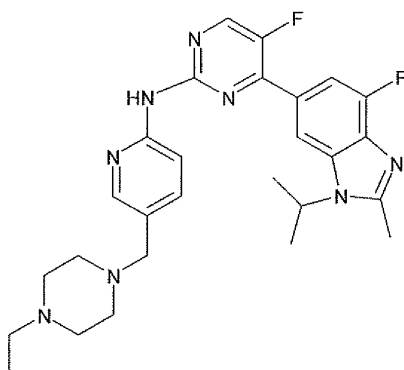
REIVINDICACIONES

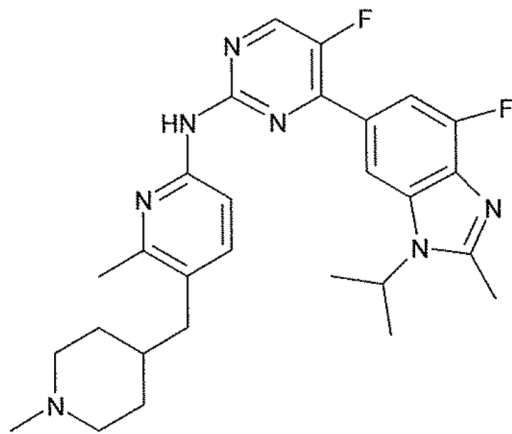
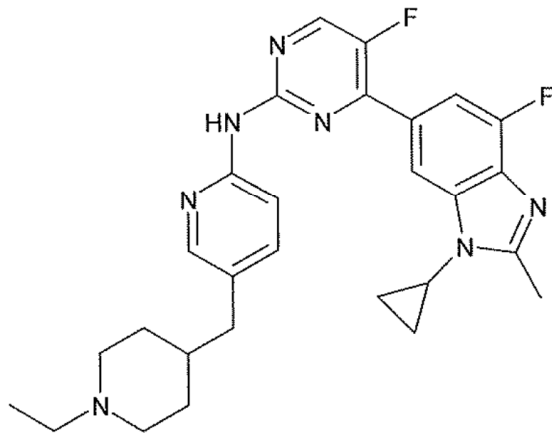
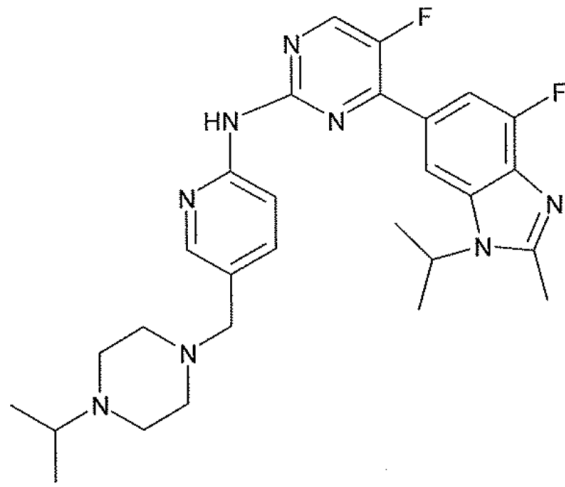
1. Un compuesto de fórmula:

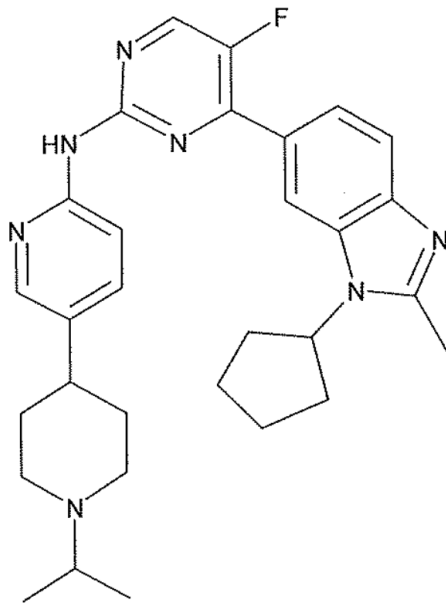
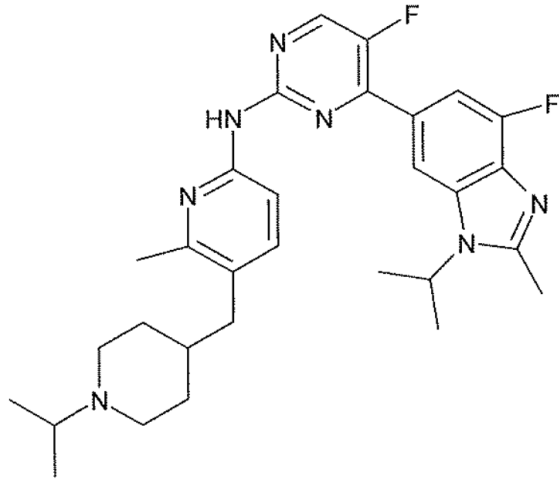
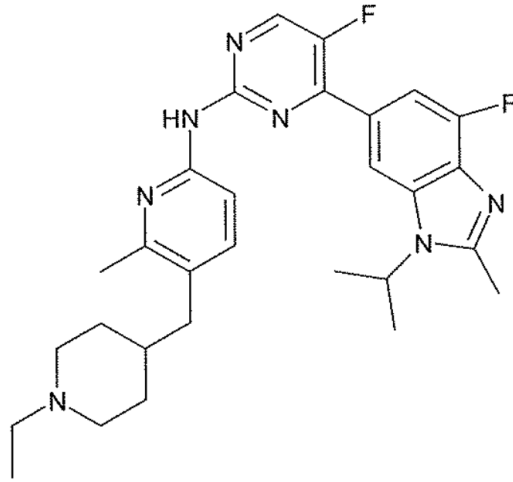


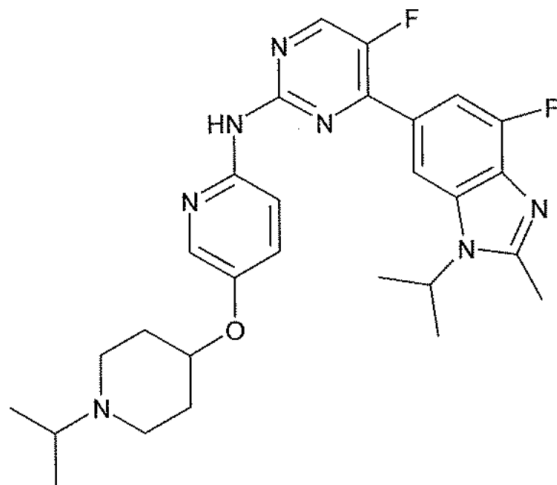
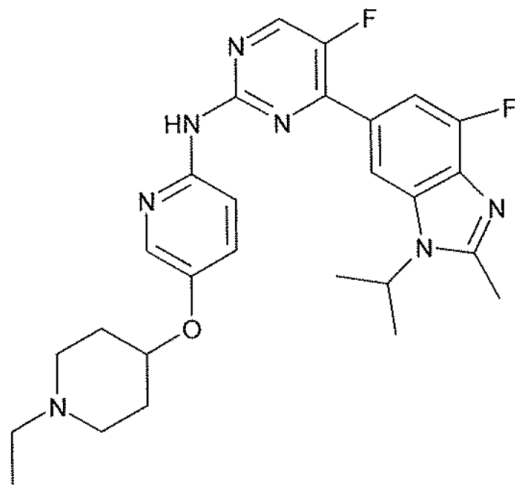
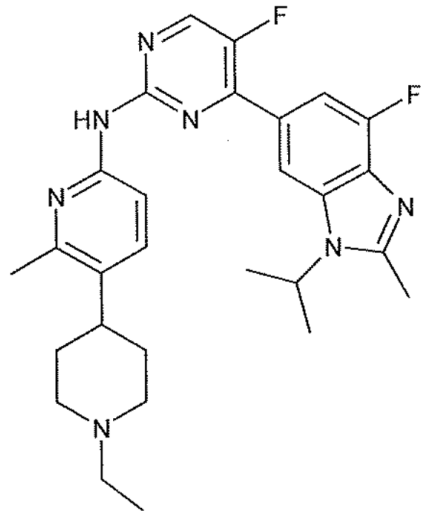
en la que,

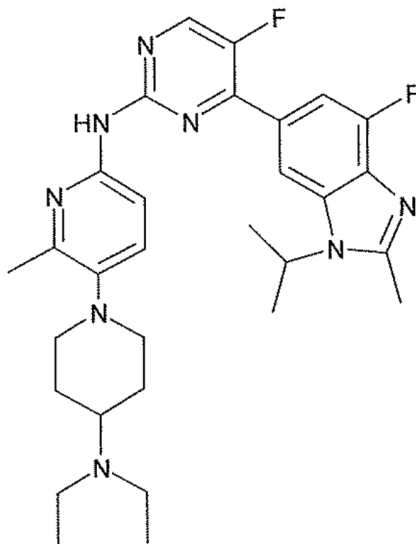
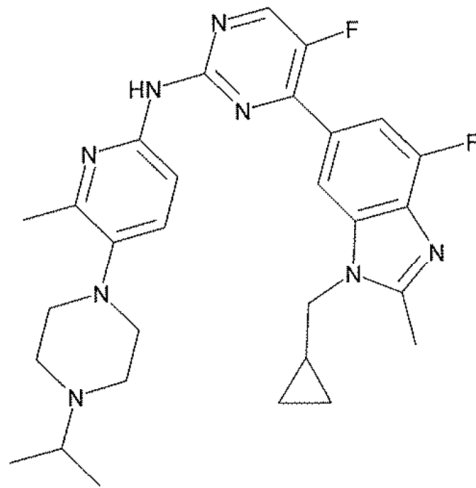
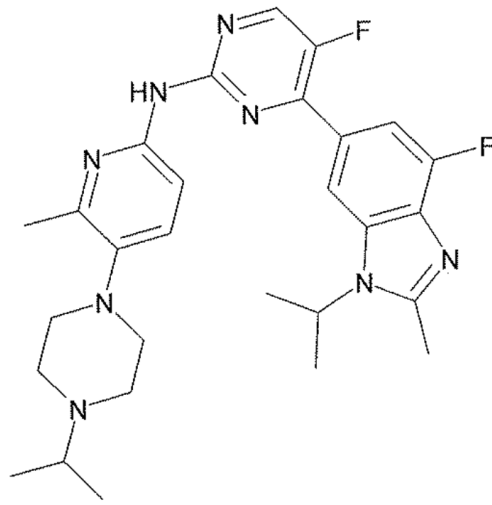
- 5 R1 es alquilo C₃-C₅, cicloalquilo C₃-C₅ o ciclopropil-metilo;
R2 y R3 son H o flúor, en los que al menos uno de R2 o R3 es flúor;
R4 es H o CH₃;
R5 es alquilo C₁-C₆ o -NR₆R₇ en el que R₆ y R₇ son alquilo C₁-C₃;
Q es CH₂, O, S o un enlace directo; y
- 10 W e Y son C o N, en los que al menos uno de W o Y es N y en los que cuando Q es O o S, W es C;
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R1 es isopropilo, ciclopropilo, ciclopentilo o ciclopropil-metilo.
3. El compuesto de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R2 y R3 son cada uno flúor
- 15 4. El compuesto de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R4 es H.
5. El compuesto de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R5 es alquilo C₁-C₃.
- 20 6. El compuesto de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que Q es CH₂.
7. El compuesto de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que W es N.
- 25 8. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, seleccionado entre:

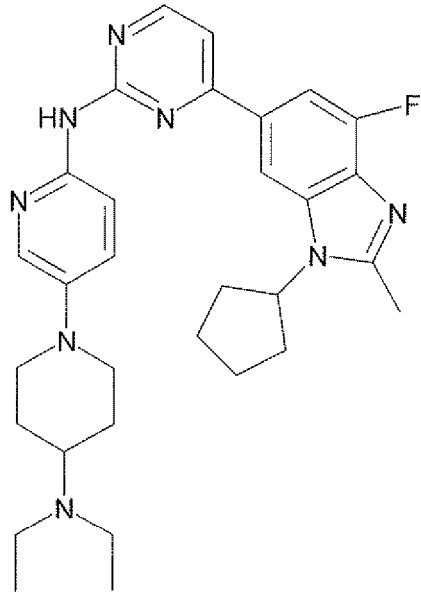




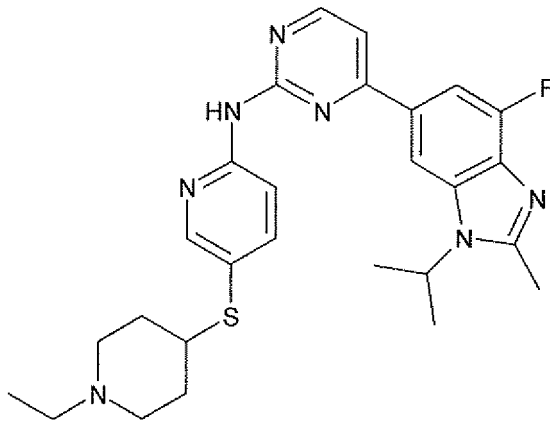




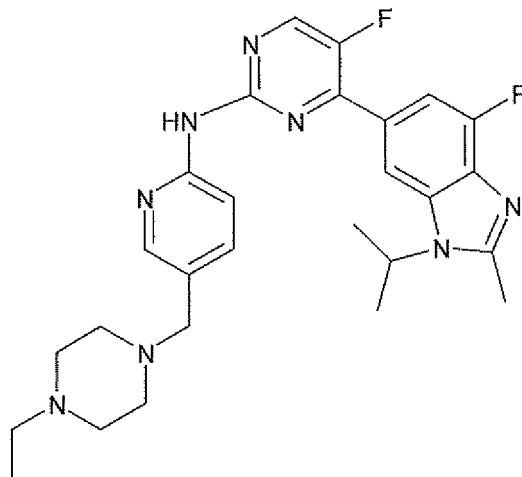




y



9. El compuesto de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que es:



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10. El compuesto de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que es la sal mesilato.

5 11. La forma cristalina III de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, **caracterizada por** un patrón de difracción de rayos X en polvo (radiación $\text{CuK}\alpha$, $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$) que comprende un pico en 2θ en $21,29$ ($2\theta \pm 0,1^\circ$) y opcionalmente uno o más picos seleccionados del grupo que comprende $11,54$, $10,91$ y $12,13$ ($2\theta \pm 0,1^\circ$).

10 12. La forma cristalina III de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, de acuerdo con la reivindicación 11, que está adicionalmente **caracterizada por** un espectro de RMN de ^{13}C que comprende picos de cambio químico $\nu(\text{F1})$ [ppm] a $112,7$, $127,3$ y $129,4$.

13. Una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 14. Una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, conjuntamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos.

15. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en terapia.

20 16. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de un cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer pulmonar, cáncer prostático, glioblastoma, linfoma de células de manto, leucemia mieloide crónica y leucemia mieloide aguda.