

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 318**

51 Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)

A61K 31/4985 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2007 E 07842207 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013 EP 2094708**

54 Título: **Una pirrolopirazina como inhibidor de Syk-quinasa**

30 Prioridad:

11.09.2006 US 825168 P

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

10.01.2014

73 Titular/es:

**SANOFI (100.0%)
54, rue La Boétie
75008 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**GILLESPIE, TIMOTHY A.;
EYNOTT, PAUL;
ALLEN, ELIZABETH M.;
YU, KIN T. y
ZILBERSTEIN, ASHER**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 437 318 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

Una pirrolopirazina como inhibidor de Syk-quinasa

CAMPO DE LA INVENCION

5 Esta invención se refiere a azaindoles sustituidos, a su preparación, a composiciones farmacéuticas que contienen estos compuestos y a su uso farmacéutico en el tratamiento de patologías que pueden modularse por la inhibición de las proteína quinasa.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Las proteína quinasa participan en los eventos de señalización que controlan la activación, crecimiento y diferenciación de las células en respuesta a mediadores extracelulares y a cambios en el medio. En general, estas quinasa se clasifican dentro de varios grupos; las que fosforilan preferentemente restos de serina y/o treonina y los que fosforilan preferentemente restos de tirosina [S. K. Hanks y T. Hunter, FASEB. J., 1995, 9, páginas 576-596]. Las serina/treonina quinasa incluyen, por ejemplo, isoformas de proteína quinasa C [A. C. Newton, J. Biol. Chem., 1995, 270, páginas 28495-28498] y un grupo de quinasa dependientes de ciclina tales como cdc2 [J. Pines, Trends in Biochemical Sciences, 1995, 18, páginas 195-197]. Las tirosina quinasa incluyen los receptores de factores de crecimiento que atraviesan la membrana tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico [S. Iwashita y M. Kobayashi, Cellular Signalling, 1992, 4, páginas 123-132], y las quinasa no receptoras citosólicas tales como las quinasa p56lck, p59fyn, ZAP-70 y csk [C. Chan et. al., Ann. Rev. Immunol., 1994, 12, páginas 555-592].

20 Una actividad quinasa inapropiadamente elevada se ha implicado en muchas enfermedades debidas a una función celular anómala. Esto podría surgir de forma directa o indirecta, por ejemplo por el fallo de los mecanismos de control adecuados para la quinasa, relacionados, por ejemplo, con la mutación, sobreexpresión o activación inadecuada de la enzima; o por una sobre- o infraproducción de citoquinas o factores de crecimiento que también participan en la transducción de señales corriente arriba o corriente abajo de la quinasa. En todos estos casos, sería de esperar que la inhibición selectiva de la acción de la quinasa tuviera un efecto beneficioso.

25 Syk es una proteína tirosina quinasa citoplasmática de 72 kDa que se expresa en una diversidad de células hematopoyéticas, y es un elemento esencial en varias cascadas que acoplan receptores de antígenos a respuestas celulares. Así, Syk desempeña un papel fundamental en la señalización del receptor de IgE de elevada afinidad, FcεR1, en mastocitos y en la señalización de antígenos de receptores en los linfocitos T y B. Las rutas de transducción de señales presentes en mastocitos, células T y células B tienen características comunes. El dominio de unión al ligando del receptor carece de actividad tirosina quinasa intrínseca. Sin embargo, interactúan con subunidades de transducción que contienen motivos de activación basados en tirosina de inmunorreceptores (ITAM) [M.Reth, Nature, 1989, 338, páginas 383-384]. Estos motivos están presentes tanto en las subunidades β como γ de FcεR1, en la subunidad ξ del receptor de células T (TCR) y en las subunidades Igα y Igβ del receptor de células B (BCR). [N.S. van Oers y A. Weiss, Seminars in Immunology, 1995, 7, páginas 227-236] Tras la unión del antígeno y la multimerización, los residuos de ITAM son fosforilados por las proteína tirosina quinasa de la familia Src. Syk pertenece a una clase única de tirosina quinasa que tienen dos dominios de homología al dominio 2 de Src (SH2) en tándem y un dominio catalítico C terminal. Estos dominios SH2 se unen con una afinidad elevada a los ITAMs, y esta asociación mediada por SH2 de Syk con un receptor activado estimula la actividad quinasa de Syk y localiza Syk en la membrana plasmática.

40 En ratones deficientes en Syk, se inhibe la desgranulación de mastocitos, lo que sugiere que es una diana importante para el desarrollo de agentes estabilizadores de mastocitos [P.S.Costello, Oncogene, 1996, 13, páginas 2595-2605]. Ciertos estudios similares han demostrado un papel crítico para Syk en la señalización de BCR y TCR [A.M.Cheng, Nature, 1995, 378, páginas 303-306, (1995) y D.H.Chu et al., Immunological Reviews, 1998, 165, páginas 167-180]. Syk también parece estar implicado en la supervivencia de eosinófilos en respuesta a IL-5 y GM-CSF [S. Yousefi et al., J. Exp. Med., 1996, 183, páginas 1407-1414]. A pesar del papel clave de Syk en la señalización de mastocitos, BCR y células T, se sabe poco sobre el mecanismo por medio del cual Syk transmite efectores corriente abajo. Se ha demostrado que dos proteínas adaptadoras, BLNK (proteína enlazadora de células B, SLP-65) y SLP-76 son sustratos de Syk en células B y en mastocitos respectivamente, y se ha postulado que conectan Syk con efectores corriente abajo [M. Ishiai et al., Immunity, 1999, 10, páginas 117-125 y L. R. Hendricks-Taylor et al., J. Biol. Chem, 1997, 272, páginas 1363-1367]. Además, Syk parece jugar un papel importante en la ruta de señalización de CD40, que juega un papel importante en la proliferación de células B [M. Faris et al., J.Exp. Med., 1994, 179, páginas 1923-1931].

Syk está implicada además en la activación de plaquetas estimulada por el receptor de IgG de baja afinidad (Fc gamma-RIIA) o estimulada por colágeno [F. Yanaga et al., Biochem. J., 1995, 311, (Pt. 2) páginas 471-478].

55 La quinasa de adhesión focal (FAK) es una tirosina quinasa no asociada con receptores en las rutas de transducción de señales mediadas por integrina. FAK se colocaliza con las integrinas en sitios de contacto focal y en muchos tipos celulares se ha demostrado que la activación de FAK y su fosforilación de tirosina es dependiente de la unión de las integrinas a sus ligandos extracelulares. Los resultados de varios estudios confirman la hipótesis de que los inhibidores de FAK podrían ser útiles en el tratamiento de cánceres. Por ejemplo, las células con deficiencias en

FAK migran de manera deficiente en respuesta a señales quimiotácticas y la sobreexpresión del dominio C-terminal de FAK bloquea la propagación celular así como la migración quimiotáctica (Sieg et al, J. Cell Science, 1999, 112, 2677-2691; Richardson A. y Parsons T., Cell, 1997, 97, 221-231) ; además, las células tumorales tratadas con oligonucleótidos antisentido FAK pierden su unión y experimentan apoptosis (Xu et al, Cell Growth Differ. 1996, 4, 413-418). Se ha notificado que FAK se sobreexpresa en cánceres de próstata, mama, tiroides, colon y pulmón. El nivel de expresión de FAK está correlacionado directamente con tumores, demostrando el fenotipo más agresivo.

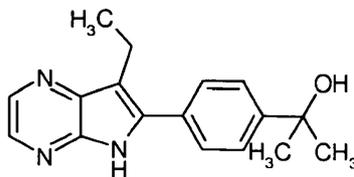
La angiogénesis o la formación de nuevos vasos sanguíneos que crecen a partir de la vasculatura preexistente tiene una importancia central en el desarrollo embrionario y la organogénesis. Se observa una neovascularización aumentada anómala en la artritis reumatoide, retinopatía diabética y durante el desarrollo tumoral (Folkman, Nat. Med., 1995, 1, 27-31.). La angiogénesis es un proceso complejo de múltiples etapas que incluye la activación, migración, proliferación y supervivencia de las células endoteliales. Ciertos estudios exhaustivos en el campo de la angiogénesis tumoral en las últimas dos décadas han identificado varios agentes terapéuticos que incluyen quinasas, proteasas e integrinas, que han tenido como resultado el descubrimiento de muchos agentes anti-angiogénicos nuevos, incluyendo inhibidores de KDR de los que algunos están actualmente en evaluación clínica (Jekunen, et al Cancer Treatment Rev. 1997, 23, 263-286). Los inhibidores de la angiogénesis pueden usarse en situaciones de primera línea, adyuvantes e incluso preventivas para la aparición o reaparición de malignidades.

Se han identificado varias proteínas implicadas en la segregación cromosómica y el ensamblaje del huso mitótico en levaduras y en drosophila. La ruptura de estas proteínas tiene como resultado una segregación errónea de los cromosomas y husos mitóticos monopolares o rotos. Entre estas quinasas se encuentran las quinasas Ipl1 y aurora de *S. cerevisiae* y *drosophila* respectivamente, que son necesarias para la separación del centrosoma y la segregación cromosómica. Recientemente se ha clonado e identificado un homólogo humano de Ipl1 de levadura por diferentes laboratorios. Esta quinasa, denominada Aurora2, STK15 o BTAK pertenece a la familia de serina/treonina quinasas. Bischoff et al. demostraron que Aurora2 es oncogénica y está amplificada en cánceres colorrectales humanos (EMBO J, 1998, 17, 3052-3065). También se ha ejemplificado en cánceres que implican tumores epiteliales tales como cáncer de mama.

Se ha descubierto un nuevo azaindol sustituido que tiene propiedades farmacéuticas valiosas, en particular, la capacidad de inhibir proteína quinasas y, más particularmente, la capacidad de inhibir selectivamente la quinasa Syk. Este compuesto de azaindol está relacionado con los descritos en la Patente de Estados Unidos 6.770.643, pero no se describe específicamente en esta patente.

30 COMPENDIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I:



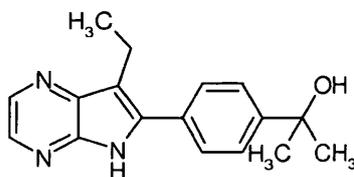
(I)

o un N-óxido o un profármaco correspondiente; o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de dicho compuesto; y el N-óxido y el profármaco de la sal y el solvato.

35 La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula I, y al compuesto de fórmula I para uso en el tratamiento de una afección fisiológica relacionada con Syk en un paciente.

También se describe un proceso para preparar un compuesto que es un intermedio útil para preparar un compuesto de fórmula I.

40 En otro aspecto, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos de fórmula general (I):



(I)

el N-óxido correspondiente y el profármaco; y una sal farmacéuticamente aceptable y solvato (por ejemplo, hidrato) de dicho compuesto; y el N-óxido y el profármaco; junto con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 FIGURA 1: Esquema de reacción para preparar un compuesto de Fórmula I.

FIGURA 2: Diámetro medio de la articulación del tobillo de ratas a las que se les ha inyectado colágeno de tipo II de origen nasal bovino en adyuvante incompleto de Freund y tratadas con A003397769, el compuesto de Fórmula I (3,0, 10 ó 30 mg/kg b.i.d.) desde el día 6 al día 21. Diámetros medios de la articulación del tobillo de ratas LEW hembra sensibilizadas por inyección intradérmica de colágeno en adyuvante incompleto de Freund (400 µg/400 µl/rata) los días 0 y 7. Los animales recibieron la dosificación los días 6 - 21.

FIGURA 3: Análisis de erosión del hueso (relación entre superficie ósea y volumen óseo) en el calcáneo de ratas CIA tratadas con A003397769 (3,0, 10 ó 30 mg/kg).

FIGURA 4: Diámetro medio de la articulación del tobillo de ratas a las que se les ha inyectado colágeno de tipo II de origen nasal bovino en adyuvante incompleto de Freund y tratadas con A003397769 (3,0 mg/kg) solo o en combinación con Metotrexato (0,1 ó 0,2 mg/kg) desde el día 6 al día 20 ó 21 y en comparación con los animales que han recibido la dosis de vehículo. Efectos del inhibidor de SYK, A003397769 (3,0 mg/kg b.i.d.), como monoterapia o en combinación con Metotrexato sobre rata CIA.

FIGURA 5: Diámetro medio de la articulación del tobillo de ratas a las que se les ha inyectado colágeno de tipo II de origen nasal bovino en adyuvante incompleto de Freund y tratadas con A003397769 (10 mg/kg) solo o en combinación con Metotrexato (0,1 ó 0,2 mg/kg) desde el día 6 al día 20 ó 21 y en comparación con los animales que han recibido la dosis de vehículo. Efectos del inhibidor de SYK, A003397769 (10 mg/kg b.i.d.), como monoterapia o en combinación con Metotrexato sobre rata CIA.

FIGURA 6: Análisis de erosión del hueso (relación entre la superficie del hueso y el volumen óseo) en el calcáneo de ratas CIA tratadas con A003397769 (3,0 ó 10 mg/kg) solo o en combinación con Metotrexato (0,1 ó 0,2 mg/kg).

FIGURA 7: Diámetro medio de la articulación del tobillo de ratas a las que se les ha inyectado colágeno de tipo II de origen nasal bovino en adyuvante incompleto de Freund y tratadas terapéuticamente con A003397769A (10 y 30 mg/kg b.i.d) desde el día 12 al día 21. Diámetros medios de la articulación del tobillo de ratas Lewis hembra sensibilizadas por inyección intradérmica de colágeno en adyuvante incompleto de Freund (400 µg/400 µl/rata) los días 0 y 7. Media de las dos patas.

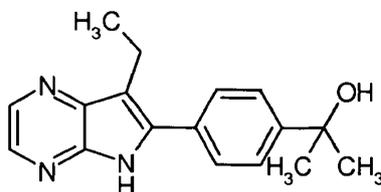
FIGURA 8: Análisis de erosión del hueso (relación entre la superficie ósea y el volumen óseo) en el calcáneo de ratas CIA tratadas terapéuticamente con A003397769A (10 ó 30 mg/kg b.i.d.).

FIGURA 9: Efectos del compuesto de Fórmula I sobre el peso de la rata.

FIGURA 10: Efectos del compuesto de Fórmula I sobre la concentración de hemoglobina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

35 Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula general (I):



(I)

que también puede conocerse como: 2-[4-(7-Etil-5H-pirrolo[2,3-b]pirazin-6-il)-fenil]-propan-2-ol.

40 En la presente memoria descriptiva, la expresión "compuesto de la invención", y expresiones equivalentes, pretende incluir un compuesto de fórmula general (I) como se ha descrito anteriormente en este documento, incluyendo dicha expresión los profármacos, las sales farmacéuticamente aceptable y los solvatos, por ejemplo, hidratos, cuando el contexto lo permita. Análogamente, la referencia a intermedios, reivindicados o no por sí mismos, pretende incluir sus sales y solvatos, cuando el contexto lo permita. Por claridad, en algunas ocasiones se indican en el texto casos

particulares en los que el contexto lo permite, pero estos casos son puramente ilustrativos y no pretenden excluir otros casos cuando el contexto lo permita.

Abreviaturas usadas en este documento:

ATP adenosina trifosfato

5 DTT ditioneitol

PBS disolución salina tamponada con fosfato

Como se ha usado anteriormente y se usa a lo largo de la descripción de la invención, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique otra cosa, tienen los siguientes significados:

El término "paciente" incluye seres humanos y otros mamíferos.

10 El término "profármaco" se refiere a un compuesto que puede convertirse in vivo por medios metabólicos (por ejemplo, por hidrólisis) en un compuesto de fórmula (I), incluyendo N-óxidos del mismo. Por ejemplo, un éster de un compuesto de fórmula (I) que contiene un grupo hidroxilo puede convertirse por hidrólisis in vivo en la molécula parental. Como alternativa, un éster de un compuesto de fórmula (I) que contiene un grupo carboxilo puede convertirse por hidrólisis in vivo en la molécula parental.

15 Los ésteres adecuados de los compuestos de fórmula (I) que contienen un grupo hidroxilo son, por ejemplo, acetatos, citratos, lactatos, tartratos, malonatos, oxalatos, salicilatos, propionatos, succinatos, fumaratos, maleatos, metileno-bis-β-hidroxinaftoatos, gentisatos, isetionatos, di-p-toluoiltartratos, metanosulfonatos, etanosulfonatos, bencenosulfonatos, p-toluenosulfonatos, ciclohexilsulfamatos y quinatos.

20 Una clase especialmente útil de ésteres de los compuestos de fórmula (I) que contienen un grupo hidroxilo se puede formar a partir de restos ácidos seleccionados de los descritos en Bundgaard et al., J. Med. Chem., 1989, 32, páginas 2503-2507, e incluyen (aminometil)benzoatos sustituidos, por ejemplo dialquilaminometilbenzoatos, en los que los dos grupos alquilo pueden unirse entre sí y/o estar interrumpidos por un átomo de oxígeno o por un átomo de nitrógeno opcionalmente sustituido, p.ej. un átomo de nitrógeno alquilado, más especialmente (morfolinmetil)benzoatos, p.ej. 3- o 4-(morfolinmetil)benzoatos, y (4-alkilpiperazin-1-il)benzoatos, p.ej. 3- o 4-(4-alkilpiperazin-1-il)benzoatos.

25 Algunos de los compuestos de la presente invención son básicos, y tales compuestos son útiles en forma de la base libre o en forma de una sal de adición de ácidos farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 Las sales de adición de ácidos son una forma de uso más conveniente; y en la práctica, el uso de la forma de sal equivale intrínsecamente al uso de la forma de base libre. Los ácidos que se pueden usar para preparar las sales de adición de ácido incluyen preferiblemente aquellos que producen, cuando se combinan con la base libre, sales farmacéuticamente aceptables, es decir, sales cuyos aniones son atóxicos para el paciente en las dosis farmacéuticas de las sales, de forma que los efectos inhibitorios beneficiosos inherentes a la base libre no se invalidan por efectos secundarios atribuibles a los aniones. Aunque se prefieren sales farmacéuticamente aceptable de dichos compuestos básicos, todas las sales de adición de ácidos son útiles como fuentes de la forma de base libre incluso si la sal particular, per se, se desea sólo como producto intermedio como, por ejemplo, cuando la sal se forma únicamente para fines de purificación e identificación, o cuando se usa como intermedio para preparar una sal farmacéuticamente aceptable por procedimientos de intercambio iónico. Las sales farmacéuticamente aceptables dentro del alcance de la invención incluyen aquellas derivadas de ácidos minerales y ácidos orgánicos, e incluyen los hidroháluros, p.ej. hidrocloruros e hidrobromuros, sulfatos, fosfatos, nitratos, sulfamatos, acetatos, citratos, lactatos, tartratos, malonatos, oxalatos, salicilatos, propionatos, succinatos, fumaratos, maleatos, metileno-bis-β-hidroxinaftoatos, gentisatos, isetionatos, di-p-toluoiltartratos, metano-sulfonatos, etanosulfonatos, bencenosulfonatos, p-toluenosulfonatos, ciclohexilsulfamatos y quinatos.

35 Además de ser útiles por sí mismas como compuestos activos, las sales de los compuestos de la invención son útiles para los fines de purificación de los compuestos, por ejemplo por explotación de las diferencias de solubilidad entre las sales y los compuestos parentales, productos secundarios y/o materiales de partida por técnicas bien conocidas por los especialistas en la técnica.

40 Los compuestos de la invención muestran una actividad farmacológica útil y, por consiguiente, se incorporan en composiciones farmacéuticas y se usan en el tratamiento de pacientes que padecen ciertos trastornos médicos. Por lo tanto, la presente invención proporciona, de acuerdo con un aspecto adicional, compuestos de la invención y composiciones que contienen compuestos de la invención para uso en terapia.

50 Los compuestos dentro del alcance de la presente invención inhiben o bloquean la actividad catalítica de la quinasa de acuerdo con los ensayos descritos en la bibliografía y procedimientos in vitro que se describen a continuación en este documento, y donde se cree que los resultados de dichos ensayos están correlacionados con la actividad farmacológica en seres humanos y otros mamíferos. Por lo tanto, en una realización adicional, la presente invención

proporciona compuestos de la invención y composiciones que contienen compuestos de la invención para uso en el tratamiento de un paciente que padece, o sometido a, afecciones que pueden mejorarse por la administración de inhibidores de proteína quinasas (por ejemplo, Syk, FAK, KDR o Aurora2). Por ejemplo, los compuestos de la presente invención son útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, por ejemplo, asma: dermatosis inflamatorias (por ejemplo, psoriasis, dermatitis herpetiformis, eccema, vasculitis necrotizante y cutánea, enfermedad bulosa); rinitis alérgica y conjuntivitis alérgica; inflamación de las articulaciones, incluyendo artritis, artritis reumatoide y otras afecciones artríticas tales como espondilitis reumatoide, artritis gotosa, artritis traumática, artritis por rubeola, artritis psoriásica y osteoartritis. Los compuestos son útiles también en el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), sinovitis aguda, diabetes autoinmunitaria, encefalomiелitis autoinmunitaria, colitis, aterosclerosis, enfermedad vascular periférica, enfermedad cardiovascular, esclerosis múltiple, reestenosis, miocarditis, linfomas de células B, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de injerto contra hospedador y otros sucesos de rechazo asociados a trasplantes, cánceres y tumores (tales como los cánceres colorrectal, de próstata, mama, tiroides, colon y pulmón), y enfermedad inflamatoria intestinal. Además, los compuestos son útiles como agentes anti-angiogénicos tumorales. Y además, los compuestos de la invención son útiles como agentes para controlar las células tumorales.

Una realización especial de la presente invención es un compuesto de la invención para uso en el tratamiento de inflamación de articulaciones.

Otra realización especial de la presente invención es un compuesto de la invención para uso en el tratamiento de inflamación de artritis reumatoide.

Una realización especial de la presente invención es un compuesto de la invención para uso en el tratamiento de cánceres, tumores y otros trastornos proliferativos.

Los compuestos de la presente invención se pueden usar en el tratamiento de cánceres que implican tumores líquidos.

Otra realización especial de la presente invención es un compuesto de la invención para uso en el tratamiento del linfoma de las células del manto.

Incluso otra realización especial de la presente invención es un compuesto de la invención para uso en el tratamiento de trastornos por inhibición de angiogénesis.

Debe entenderse que las referencias de este documento al tratamiento incluyen terapia profiláctica así como tratamiento de afecciones establecidas.

La presente invención también incluye dentro de su alcance composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención en asociación con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un compuesto de la invención puede administrarse por cualquier medio adecuado. En la práctica, un compuesto de la presente invención puede administrarse en general por vía parenteral, tópica, rectal, oral o por inhalación; especialmente por la vía oral o por inhalación.

Las composiciones de acuerdo con la invención pueden prepararse de acuerdo con los métodos convencionales, usando uno o más adyuvantes o excipientes farmacéuticamente aceptable. Los adyuvantes comprenden, entre otros, diluyentes, medios acuosos estériles y los diversos disolventes orgánicos atóxicos. Las composiciones pueden presentarse en forma de comprimidos, píldoras, gránulos, polvos, disoluciones o suspensiones acuosas, disoluciones inyectables, elixires o jarabes, y pueden contener uno o más agentes que se eligen del grupo que comprende edulcorantes, aromatizantes, colorantes o estabilizantes para obtener preparaciones farmacéuticamente aceptables. La elección del vehículo y el contenido de la sustancia activa en el vehículo se determinan en general de acuerdo con las propiedades químicas y de solubilidad del compuesto activo, la vía de administración particular y las disposiciones a observar en la práctica farmacéutica. Por ejemplo, para preparar comprimidos pueden usarse excipientes tales como lactosa, citrato sódico, carbonato cálcico, fosfato dicálcico y agentes disgregantes tales como almidón, ácidos alginicos y ciertos silicatos complejos combinados con lubricantes tales como estearato magnésico, laurilsulfato sódico y talco. Para preparar una cápsula, es ventajoso usar lactosa y polietilenglicoles de alto peso molecular. Cuando se usan suspensiones acuosas, éstas pueden contener agentes emulsionantes o agentes que facilitan la suspensión. También pueden usarse diluentes tales como sacarosa, etanol, polietilenglicol, propilenglicol, glicerol y cloroformo o mezclas de los mismos.

Para la administración por vía parenteral se utilizan emulsiones, suspensiones o soluciones de los productos de acuerdo con la invención en aceite vegetal, por ejemplo aceite de sésamo, aceite de cacahuete o aceite de oliva, o soluciones acuosas-orgánicas, tales como agua y propilenglicol, ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo, así como soluciones acuosas estériles de las sales farmacéuticamente aceptables. Las soluciones de las sales de los productos de acuerdo con la invención son especialmente útiles para la administración por inyección intramuscular o subcutánea. Las soluciones acuosas, que también comprenden soluciones de las sales en agua pura destilada, pueden usarse para administración intravenosa, con la condición de que su pH se ajuste

adecuadamente, que estén juiciosamente tamponadas, que se conviertan en isotónicas con una cantidad suficiente de glucosa o cloruro sódico y que se esterilicen por calentamiento, irradiación o microfiltración.

5 Para administración tópica, pueden usarse geles (basados en agua o alcohol), cremas o pomadas que contienen compuestos de la invención. Los compuestos de la invención también pueden incorporarse en un gel o matriz base para aplicación en un parche, que permitiría una liberación controlada del compuesto a través de la barrera transdérmica.

Para administración por inhalación, los compuestos de la invención pueden disolverse o suspenderse en un vehículo apropiado para usar en un nebulizador o un aerosol de suspensión o disolución, o pueden absorberse o adsorberse en un vehículo sólido apropiado para uso en un inhalador de polvo seco.

10 Las composiciones sólidas para administración rectal incluyen supositorios formulados de acuerdo con métodos conocidos y que contienen al menos un compuesto de la invención.

15 El porcentaje de ingrediente activo en las composiciones de la invención puede variar, pero es necesario que constituya una proporción de forma que se obtenga una dosificación adecuada. Obviamente, pueden administrarse diversas formas de dosificación unitaria aproximadamente al mismo tiempo. La dosis empleada se determinará por el médico y depende del efecto terapéutico deseado, la vía de administración, la duración del tratamiento y el estado del paciente. En el adulto, las dosis son en general de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 50, preferiblemente de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal al día por inhalación, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100, preferiblemente de 0,1 a 70 y más especialmente de 0,5 a 10 mg/kg de peso corporal al día por administración oral, y de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 10, preferiblemente de 0,01 a 1 mg/kg de peso corporal al día por administración intravenosa. En cada caso concreto, las dosis se determinarán de acuerdo con los factores diferenciados del sujeto que se va a tratar, como la edad, peso, estado de salud general y otras características que pueden influir en la eficacia del producto medicinal.

25 Los compuestos de acuerdo con la invención pueden administrarse con tanta frecuencia como sea necesario, con el fin de obtener el efecto terapéutico deseado. Algunos pacientes pueden responder rápidamente a una dosis mayor o menor y pueden considerarse adecuadas dosis de mantenimiento mucho más débiles. Para otros pacientes, puede ser necesario tener tratamientos a largo plazo al ritmo de 1 a 4 dosis por día, de acuerdo con los requerimientos fisiológicos de cada paciente particular. En general, el producto activo puede administrarse por vía oral de 1 a 4 veces al día. Por supuesto, para algunos pacientes, será necesario prescribir no más de una o dos dosis al día.

30 Los compuestos de la invención pueden prepararse mediante la aplicación o adaptación de métodos conocidos, y esto significa los métodos utilizados hasta la fecha o descritos en la bibliografía, por ejemplo, los descritos por R.C. Larock en *Comprehensive Organic Transformations*, VCH publishers, 1989.

35 En las reacciones que se describen a continuación en este documento, puede ser necesario proteger grupos funcionales reactivos, por ejemplo grupos hidroxilo, amino, imino, tio o carboxi, en los casos en los que se desean en el producto final, para evitar su participación indeseada en las reacciones. Pueden usarse grupos protectores convencionales de acuerdo con la práctica convencional, por ejemplo véase T.W. Greene y P. G. M. Wuts en "Protective Groups in Organic Chemistry" John Wiley and Sons, 1991.

40 Se apreciará que los compuestos de la invención pueden contener centros asimétricos. Estos centros asimétricos pueden estar, independientemente, en la configuración R o S. Para los especialistas en la técnica será evidente que ciertos compuestos de la invención también pueden mostrar isomería geométrica. Debe apreciarse que la presente invención incluye isómeros y estereoisómeros geométricos individuales y sus mezclas, incluyendo mezclas racémicas, de los compuestos de la fórmula (I) definidos anteriormente en este documento. Tales isómeros pueden separarse de sus mezclas mediante la aplicación o adaptación de métodos conocidos, por ejemplo técnicas cromatográficas y técnicas de recristalización, o se preparan por separado a partir de los isómeros apropiados de sus compuestos intermedios.

45 De acuerdo con un aspecto más de la invención, las sales de adición de ácidos de los compuestos de esta invención pueden prepararse por reacción de la base libre con el ácido apropiado, por aplicación o adaptación de métodos conocidos. Por ejemplo, las sales de adición de ácidos de los compuestos de esta invención pueden prepararse disolviendo la base libre en agua o una disolución alcohólica acuosa u otros disolventes adecuados que contienen el ácido apropiado y aislando la sal al evaporar la disolución, o haciendo reaccionar la base libre y el ácido en un disolvente orgánico, en cuyo caso la sal se separa directamente, o puede obtenerse por concentración de la disolución.

50 Las sales de adición de ácidos de los compuestos de esta invención pueden regenerarse a partir de las sales por aplicación o adaptación de métodos conocidos. Por ejemplo, los compuestos parentales de la invención pueden regenerarse a partir de sus sales de adición de ácido por tratamiento con un álcali, por ejemplo, disolución acuosa de bicarbonato sódico o disolución acuosa de amoníaco.

55

Los compuestos de esta invención pueden regenerarse a partir de sus sales de adición de bases mediante la aplicación o adaptación de métodos conocidos. Por ejemplo, los compuestos parentales de la invención pueden regenerarse a partir de sus sales de adición de bases con un ácido, por ejemplo, ácido clorhídrico.

5 Los compuestos de la presente invención pueden prepararse o formarse convenientemente durante el proceso de la invención, en forma de solvatos (por ejemplo, hidratos). Se pueden preparar hidratos de compuestos de la presente invención, convenientemente, mediante recristalización en una mezcla de disolventes acuosa/orgánica, utilizando disolventes orgánicos, tales como dioxano, tetrahidrofurano o metanol.

10 De acuerdo con otro aspecto de la invención, las sales de adición de bases de los compuestos de esta invención pueden prepararse mediante la reacción del ácido libre con la base apropiada, mediante la aplicación o adaptación de métodos conocidos. Por ejemplo, las sales de adición de bases de los compuestos de esta invención pueden prepararse disolviendo el ácido libre en agua o en una disolución acuosa de alcohol o en otros disolventes adecuados que contienen la base apropiada y aislando la sal por evaporación de la disolución, o haciendo reaccionar el ácido libre y la base en un disolvente orgánico, en cuyo caso la sal se separa directamente o puede obtenerse por concentración de la disolución.

15 Los materiales de partida e intermedios pueden prepararse por la aplicación o adaptación de métodos conocidos, por ejemplo métodos con los que se describen en el Ejemplo o sus equivalentes químicos obvios.

La presente invención se ejemplifica adicionalmente, pero sin limitación, mediante el siguiente Ejemplo ilustrativo.

20 Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) ^1H a 300 MHz se registraron en instrumentos Varian Mercury. En los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN), los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm en relación con tetrametilsilano. Las abreviaturas tienen los siguientes significados: s = singlete; d = doblete; t = triplete; m = multiplete; c = cuadruplete; dd = doblete de dobletes; ddd = doblete de dobles dobletes.

25 Los experimentos de Cromatografía Líquida de Alta Presión - Espectrometría de Masas (LCMS) para determinar los tiempos de retención (R_T) e iones de máximos asociados se realizan usando el siguiente método. Los Espectros de Masas (MS) se registran usando un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo Micromass LCT. El método es ionización de electronebulización positiva, explorando la masa m/z de 100 a 1000. La cromatografía líquida se realiza en un Agilent™ 1100 Series Binary Pump & Degasser; fase estacionaria: columna Phenomenex Synergi™ 2 μ Hydro-RP 20 x 4,0 mm, fase móvil: A = ácido fórmico (FA) al 0,1% en agua, B = FA al 0,1% en acetonitrilo. Volumen de inyección de 5 μl por CTC Analytical PAL System. El flujo es de 1 ml/minuto. El gradiente es 5% de B a 90% de B en 3 minutos y 90% de B a 100% de B en 2 minutos. Los detectores auxiliares son: detector UV Agilent 1100 Series, longitud de onda = 220 nm y temperatura del detector Sedere SEDEX™ 75 Evaporative Light Scattering (ELS) = 46 C, presión de nitrógeno = 4 bar.

Los valores R_F de la cromatografía de capa fina (TLC) se determinaron usando placas de sílice Merck™.

EJEMPLO 1

2-[4-(7-Etil-5H-pirrolo[2,3-b]pirazin-6-il)-fenil]-propan-2-ol

35 Un total de 6,0 g de 2-[4-(7-etil-5H-pirrolo[2,3-b]pirazin-6-il)fenil]propan-2-ol (compuesto 1) se preparó en dos etapas a partir de n-propilpirazina (compuesto 2) y 4-acetilbenzonitrilo (compuesto 3).

40 La síntesis del compuesto 1 se realizó como se indica a continuación. El acoplamiento de n-propilpirazina (compuesto 2) y 4-acetilbenzonitrilo (compuesto 3) con bis(trimetilsilil)amida sódica en tetrahidrofurano a 40°C dio el compuesto intermedio 4 con un rendimiento de 30%. La reacción del compuesto 4 con cloruro de metilmagnesio en tetrahidrofurano a 0°C dio el compuesto deseado 1 con un rendimiento de 74% después de la recristalización en 2-propanol. La síntesis se muestra en la Figura 1.

PARTE EXPERIMENTAL

45 2-[4-(7-Etil-5H-pirrolo[2,3-b]pirazin-6-il)fenil]jetanona (compuesto 4). Una disolución de n-propilpirazina (compuesto 2, 912 mg, 7,46 mmol) en tetrahidrofurano (5 ml) se añadió gota a gota, durante un periodo de siete minutos, a una disolución de bis(trimetilsilil)amida sódica (solución 2 M en THF; 13 ml, 26 mmol, 3,5 equiv) a 20°C. Se obtuvo una disolución de color púrpura-rojo oscuro y la temperatura cayó hasta 16,4°C. Se añadió una disolución de 4-acetilbenzonitrilo (compuesto 3, 1,08 g, 7,4 mmol) en tetrahidrofurano (5 ml) durante un periodo de 18 minutos a 13,3°C. La temperatura cayó hasta 12,6°C y se produjo una solución parda. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una hora, se calentó a aproximadamente 35°C durante seis horas y después se dejó en agitación a temperatura ambiente durante aproximadamente 60 horas. La mezcla se vertió en bicarbonato sódico acuoso saturado (200 ml) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 150 ml). El acetato de etilo se lavó con agua (100 ml) y se concentró en el Buchi a una temperatura del baño de 40°C y de 80 a 10 torr para dar un sólido de color amarillo oscuro. El sólido se trituró con éter dietílico (25 ml), se filtró y se lavó con éter (25 ml). El sólido se secó al aire para dar 600 mg (30,3%) del compuesto 4 como un sólido amarillo: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , figura 1) δ 8,5 (1H, d, J=2

Hz), 8,15 (2H, d, J=8 Hz), 8,1 (1H, d, J=3 Hz), 7,9 (2H, d, J=8 Hz), 3,1 (2H, q, J=9 Hz), 2,7 (3H, s), 1,4 (3H, t, J=9 Hz).

5 1-[4-(7-Etil-5H-pirrol[2,3-b]pirazin-6-il)fenil]propan-2-ol (compuesto 1). A una solución enfriada de (~5°C) de cloruro de metilmagnesio (3 M en THF; 81,3 ml, 244 mmol, 10 equiv.) en tetrahidrofurano (116 ml) se le añadió gota a gota una solución del compuesto 4 (6,5 g, 24,4 mmol) en tetrahidrofurano (348 ml), durante noventa minutos, manteniendo la temperatura a aproximadamente 0°C mediante la velocidad de adición. Se observó una disolución amarilla brillante después de la adición. Después de una hora, el análisis por TLC (1/1 de acetato de etilo/n-heptano) demostró que no quedaba material de partida y una nueva mancha que se movía a un R_f menor. La extracción se inactivó mediante la adición cuidadosa de una disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico (aproximadamente 660 ml). Apareció una masa espesa y a la mezcla se la añadieron acetato de etilo (250 ml) y agua (250 ml). La capa acuosa se retiró y se extrajo de nuevo con acetato de etilo (2 x 250 ml). Las fracciones de acetato de etilo se combinaron, se lavaron con agua (2 x 200 mL) y se concentraron en el Buchi a una temperatura de baño de 40 °C y de 80 a 10 torr, para proporcionar 7,5 g (109%) de 1 como un sólido beis claro: ¹H NMR (DMSO-d₆, figura 2) δ 12,0 (1H, s), 8,35 (1H, d, J=3,5 Hz), 8,2 (1H, d, J=3,5 Hz), 7,6 (4H, s), 5,1 (1H, s), 2,9 (2H, q, J=8 Hz), 1,5 (6H, s), 1,3 (3H, t, J=8 Hz).

15 Este material se combinó con el material de un experimento anterior. El material combinado (8,5 g) se calentó a reflujo con 2-propanol (150 ml) para dar una disolución parda, clara, transparente, que se filtró mientras permanecía caliente a través de un embudo Buchner caliente, al vacío. Se formó un precipitado en el matraz de filtro y la mezcla se calentó hasta el punto de ebullición para dar una disolución transparente. El material se dejó enfriar a temperatura ambiente con agitación, para dar un sólido amarillo claro, que se filtró, se lavó con 2-propanol frío y se secó en la estufa de vacío a 50°C para dar 6,0 g (71%) del compuesto 1 en forma de un sólido amarillo claro: LCMS: R_T = 2,55 minutos, MS: 282 (M+H); ¹H NMR (DMSO-d₆, figura 3) δ 12,0 (1H, s), 8,35 (1H, d, J=3 Hz), 8,2 (1H, d, J=3 Hz), 7,6 (4H, s), 5,1 (1H, s), 2,9 (2H, q, J=9 Hz), 1,5 (6H, s), 1,3 (3H, t, J=9 Hz).

20 El análisis elemental del compuesto 1 se muestra en la TABLA 1.

25 TABLA 1

PORCENTAJE TEÓRICO POR ELEMENTO:	C 72,57%, H 6,81%, N 14,93%, O 5,69%
EXPERIMENTAL 1:	C 72,46%, H 7,05%, N 15,07%

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO IN VITRO PARA SYK

Nombre del Ensayo:	Tirosina (Y) Quinasa de Bazo
Nombre Corto:	Syk
Formato de Ensayo:	Fosforilación de Sustrato
Formato de Detección:	FlashPlate con estreptavidina
Modulación:	Inhibición

30 Se diseñan microplacas FlashPlate Plus con estreptavidina de PerkinElmer Life Sciences™ para ensayos radiométricos en placa. El interior de cada pocillo se recubre permanentemente con una capa fina de material de centelleo basado en poliestireno seguido de la unión covalente de estreptavidina. Estas placas son adecuadas para una amplia diversidad de aplicaciones de ensayo que utilizan moléculas de captura biotiniladas. Poly (Glu,Tyr) 4:1 (PGT) es un copolímero aleatorio que puede actuar como sustrato para proteína quinasas con especificidad por tirosinas. El ensayo mide la fosforilación de un sustrato de PGT-Biotina por Syk. La enzima transfiere el [γ³³P]-fosfato desde [γ³³P]-ATP al sustrato polimérico. El ensayo se realizó en disolución en una placa de 384 pocillos sin unión. Después de detener la reacción usando ácido fosfórico, la mezcla de reacción se transfirió a una Flashplate con estreptavidina de 384 pocillos. El sustrato biotinilado se capturó en la placa y se retiraron por lavado otros reactivos incluyendo ATP caliente. Después se contó la radiactividad en cada pocillo.

40 La reacción enzimática se realizó en una placa sin unión de 384 pocillos. La concentración final de reactivo/pocillo fue: Syk 7,77 nM, sustrato de PGT-Biotina 15,5 nM, 0,1 μCi de ³³P-ATP, Tris 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, MnCl₂ 3 mM, DTT 1 mM y 0,1 mg/ml de γ-Globulinas. El volumen de reacción fue: 22 μl. Tiempo de reacción: 120 minutos Temperatura: Temperatura ambiente. La reacción se detuvo por medio de la adición de 20 μl de ácido fosfórico al

9% y se transfirieron 30 µl de la mezcla de reacción a una Flashplate con estreptavidina de 384 pocillos. Después de 90 minutos de incubación a temperatura ambiente, la placa se lavó con 0,02% de Tween-20 en Tris 50 mM, pH 7,5. La radiactividad se contó en un contador de centelleo Top Count™.

La dilución enzimática se preparó y se mantuvo en hielo antes del uso.

- 5 Se añadieron MnCl₂ y DTT preparados recientemente al tampón de ensayo antes de uso.

En la tabla 2 se muestran materiales para el ensayo.

TABLA 2

Materiales	Proveedor	Número de Catálogo	P.mol.	Función
Tris 1 M, pH 7,5	Fisher	BP1757-500		Tampón
MgCl ₂ 1 M	Sigma	M-1028	95.2	Cofactor enzimático
MnCl ₂ 1 M	Sigma	M-1787	125.8	Cofactor enzimático
DTT	Sigma	D-5545	154.2	Antioxidante
γ-Globulinas	Sigma	G-5009		Estabilizador de Proteínas
DMSO	Sigma-Aldrich	15,493-9		Disolvente
Estaurosporina	Sigma	S-4400	466.5	Inhibidor de Referencia
Ácido fosfórico (al 85%)	Sigma	P-6560	98.0	Solución de parada
1 mCi [³² P]-ATP	PerkinElmer	NEG6xx		Sustrato
10 x PBS, pH 7,4	Fisher	BP399-1		Tampón de lavado
Tween 20	Fisher	BP337-500	1227.54	Detergente
placa de polipropileno de 384 pocillos	Corning	3657		Placa de compuestos
Placa de 384 pocillos sin unión	Corning	3652		Placa de reacción
Flashplate con estreptavidina de 384 pocillos	PerkinElmer	SMP-410 (A)		Placa de captura
Película de sellado Top Seal A	Packard	6005185		Sellado de Placa
Lavador automático E1x405	Bio-Tek			Lavador de placas
Top Count	Packard			Contador
FX Station	Beckman			Manipulador de líquidos
Beckman 2000	Beckman			Manipulador de líquidos

Enzima:

- 10 Se produjo Syk marcada (0,184 mg/ml, PM = 35.531,81 Da) y se purificó por métodos conocidos en la técnica.

Sustrato

Se adquirió Poli (Glu,Tyr) 4:1 conjugado con biotina en Cisbio international™ (nº de catálogo 61GT0BLB, lote nº 16).

En la Tabla 3 se muestran las soluciones de ensayo usadas.

TABLA 3

Reactivo	Productos químicos	Disolvente	Concentración
Tampón de Ensayo	Tris, pH 7,5	H ₂ O	50 mM
MnCl ₂ y DTT recién añadido	MnCl ₂		3 mM
	MgCl ₂		10 mM
	DTT		1 mM
	γ-globulinas		0,1%
Solución de Enzima & Sustrato	Syk	Tampón de Ensayo	7,77 nM
Mantener en placas sin unión	Sustrato de PGT-Biotina		15,5 nM
Solución de ATP / ³³ P-ATP	ATP/ ³³ P-ATP	Tampón de Ensayo	0,1 µCi/pocillo
Solución de parada	Ácido fosfórico	H ₂ O	9%
Tampón de lavado	Tween -20	1 x PBS, pH 7,4	0,02%

5

Dilución del compuesto:

1. Los compuestos se recibieron como 10 µl/pocillo de concentración 10 mM en DMSO al 100% en una placa de polipropileno de fondo en U de 96 pocillos con la fila H vacía. Se añadieron 90 µl/pocillo de DMSO al 100% para producir 100 µl de compuesto 1 mM, y la placa se volvió a cerrar y se almacenó a temperatura ambiente en la oscuridad.
2. Preparación de la placa de destino del compuesto: En una placa de polipropileno de fondo redondo de 384 pocillos (placa de almacenamiento Corning), se añadieron 23 µl/pocillo de H₂O a las columnas 3 y 13, y 20 µl/pocillo de DMSO al 30% a las columnas 4 a 12 y a las columnas 14 a 22 (dejando vacías las filas O y P).
3. Preparación de diluciones de compuestos (10 diluciones, 300 µM, 100 µM, 30 µM, etc) en Biomek 2000™ usando el programa Kinase Profiling: Usando puntas de 20 µl de las que se había retirado la octava (fila H), se transfirieron 10 µl/pocillo de compuesto 1 mM desde la columna 1 de la placa de procedencia a la columna 3 de la placa de destino para obtener la primera dilución 300 µM. Después de esto, en la placa de destino, se mezclaron y transfirieron 10 µl/pocillo de una dilución 300 µM de la columna 3 a la 4 para obtener una dilución 100 µM. Se mezcló y se transfirieron 10 µl/pocillo de la dilución 100 µM de la columna 4 a la 5 para obtener la dilución 30 µM, --- etc. Se realizaron diluciones por duplicado para cada compuesto, por ejemplo, se transfirieron 10 µl/pocillo de compuesto de A1 en la placa de procedencia a A3 y B3 en la placa de destino. Se repitió la mezcla y la transferencia. Después, se transfirieron 10 µl/pocillo de compuesto 1 mM desde la columna 2 en la placa de procedencia a la columna 13 de la placa de destino para obtener una dilución 300 µM. Después de esto, en la placa de destino se mezclaron y se transfirieron 10 µl/pocillo de una dilución 300 µM desde la columna 13 a la 14 para obtener la dilución 100 µM --- etc. Con una placa de procedencia de 96 pocillos llena con la fila H vacía pueden prepararse hasta seis placas de destino de compuesto.
4. Preparación de la placa parental de compuesto patrón: se añadieron 5 µl/pocillo de solución de Roscovitine 10 mM en DMSO al 100% a H1 y H2 en una placa de polipropileno de fondo en U de 96 pocillos, y después se diluyeron hasta una solución 1 mM con 45 µl/pocillo de DMSO al 100%.
5. Preparación de la placa de destino con compuesto patrón: En una placa de polipropileno de fondo redondo de 384 pocillos (placa de almacenamiento Corning™), se añadieron 23 µl/pocillo de H₂O a las columnas 3 y 13, y 20 µl/pocillo de DMSO al 30% a las columnas 4 a 12 y a las columnas 14 a 22 (sólo las filas O y P).

30

6. Preparación de diluciones de compuesto patrón (10 diluciones, 300 µM, 100 µM, 30 µM, --- etc) en Biomek 2000™ usando el programa Profiling Standard: Usando una sola punta de 20 µl se transfirieron 10 µl/pocillo de compuesto patrón 1 mM desde H1 en la placa parental a O1 en la placa de destino para obtener la primera dilución 300 µM. Después de esto, en la placa de destino, se mezclaron y transfirieron 10 µl/pocillo de una dilución 300 µM de la columna O3 a la O4 para obtener una dilución 100 µM. Se mezcló y se transfirieron 10 µl/pocillo de la dilución 100 µM de la columna O4 a la O5 para obtener la dilución 30 µM, --- etc. Se realizaron diluciones por duplicado para cada compuesto patrón, por ejemplo, se transfirieron 10 µl/pocillo de compuesto de H1 en la placa parental a O3 y P3 en la placa de destino. Se repitió la mezcla y la transferencia. Después, se transfirieron 10 µl/pocillo de compuesto 1 mM desde H2 en la placa parental a O13 en la placa de destino para obtener una dilución 300 µM. Después de esto, en la placa de destino, se mezclaron y transfirieron 10 µl/pocillo de una dilución 300 µM de la columna O13 a la O14 para obtener una dilución 100 µM --- etc.

7. En la placa de destino de compuesto patrón, se añadieron 20 µl/pocillo de DMSO al 30% (control elevado) a A a H y 20 µl/pocillo de H₃PO₄ al 45% (control bajo) a I a J en la columna 23.

Procedimiento de ensayo:

1. A la placa de ensayo (placa de 384 pocillos sin unión Corning™) se le añadieron 10 µl de solución de enzima y sustrato y 2 µl de compuesto de ensayo, y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min (etapa de preincubación de enzima/compuesto).
2. La reacción se inició añadiendo 10 µl de solución de ATP/ ³³P-ATP.
3. Se incubó a temperatura ambiente durante 120 min.
4. La reacción se detuvo por la adición de 20 µl de tampón de parada.
5. Se transfirieron 30 µl de mezcla de reacción a una Flashplate con estreptavidina de 384 pocillos.
8. Se incubó a temperatura ambiente durante 90 min.
9. Se lavó la Flashplate de estreptavidina 2 veces con 100 µl/pocillo de tampón de lavado usando un lavador automático Eix405.
10. La placa se cerró herméticamente y se leyó (40 s/pocillo) en un contador de centelleo Top Count™.

*El ensayo se realizó desde la etapa 1 a la etapa 5 usando la estación Biomek™ FX.

Ecuación para ajuste de la curva en la determinación del valor de CI₅₀:

$$Y = \text{Inferior} + (\text{Superior} - \text{Inferior}) / (1 + 10^{((\text{LogCI}_{50} - X) * \text{Pendiente de la curva})})$$

X es el logaritmo de la concentración.

Y es la respuesta.

Y empieza en la parte inferior y va hasta la parte superior con una forma sigmoidea.

Esto es idéntico a la ecuación "logística de cuatro parámetros".

El compuesto de Fórmula I produjo un valor de CI₅₀ de 1,7 nanoMolar con este ensayo.

ENSAYO DE VIABILIDAD DE LÍNEAS CELULARES MALIGNAS HEMATOLÓGICAS USANDO REACTIVO MTS

1. OBJETIVO

Este método pretende determinar la viabilidad de una línea de células de tumor líquido después del tratamiento con un compuesto de ensayo. Las células tumorales se mantienen en suspensión en crecimiento en fase logarítmica. El día de uso, las células se resuspenden a una densidad de 0,05 a 0,1 millones/ml y las células se incuban en una placa de 96 pocillos con los compuestos de ensayo durante 96 horas. La viabilidad de las células se midió incubando las células con reactivo MTS de Promega. La viabilidad de las células es proporcional al cambio de absorbancia a 490 nm. Comparando la absorbancia entre las células de control y las células tratadas con compuesto, el impacto de los compuestos de ensayo sobre la viabilidad celular se determina como un porcentaje de la viabilidad de las células de control.

45

2. PROCEDIMIENTO

A. Materiales

1. Células:

5 Se obtienen líneas de células de tumor líquido de la American Tissue Culture Collection o de DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH).

2. Medio de cultivo:

10 RPMI completo: Medio RPMI-1640 con HEPES (ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinaetanosulfónico) 25 mM y L-glutamina (Gibco/Invitrogen™, N° de Cat. 22400-089) + suero bovino fetal (FBS) inactivado con calor al 10% (Gibco/Invitrogen™, N° Cat. 16140-071) + 1x Penicilina/Estreptomicina (Gibco/ Invitrogen, N° Cat. 15070-063) + 50 µg/ml de Plasmocin (Invivogen™, N° Cat. ant-mpt)

cRPMI sin rojo de fenol: Medio RPMI-1640 sin rojo de fenol, L-glutamina (Gibco/ Invitrogen™, N° Cat. Gibco/ Invitrogen, 11835-030) + suero bovino fetal (FBS) inactivado con calor al 10% (Gibco/ Invitrogen, N° Cat. 16140-071) + 1x Penicilina/estreptomicina (Gibco/ Invitrogen™, N° Cat. 15070-063)

3. Otros reactivos líquidos:

15 Reactivo MTS de Promega™ (Cell Titer 96 Aqueous N° Cat. G358B)

Sulfóxido de dimetilo (DMSO) (Sigma™, N° Cat. D2650)

4. Consumibles:

Placas transparentes estériles de poliestireno de 96 pocillos tratadas con cultivo de tejidos con tapa (Falcon™, N° Cat. 3072)

20 5. Equipo:

Lector de placas, 96 pocillos (SpectraMAX GeminiEM™, Molecular Devices, Estados Unidos)

B. Método

Día 1: Preparación de compuestos de ensayo

Disolver y diluir en serie los compuestos de ensayo en DMSO a una concentración 1000x.

25 Diluir los compuestos de ensayo 1:100 en cRPMI sin rojo de fenol en placas estériles de cultivo de tejidos de poliestireno de 96 pocillos

Usar una pipeta de 12 canales para transferir 10 µl de solución de compuesto diluida a la placa de 96 pocillos vacía a usar para la incubación de células

Después de la adición de 100 µl de cultivos celulares, la concentración final de compuestos de ensayo sería 1x.

30 Día 1: Preparación de células de tumor líquido para el tratamiento con compuesto

Recoger las células en RPMI completo en cultivos en fase logarítmica a densidades de aproximadamente 0,3-0,7 millones/ml. Contar las células y ajustar a 0,1 millones/ml en cRPMI sin rojo de fenol (para las células de crecimiento rápido con un tiempo de duplicación igual o menor de 24 horas, por ejemplo, K562, usar 0,05 millones/ml en lugar de evitar el exceso de crecimiento).

35 Transferir triplicados de 100 µl de células a los pocillos de placas transparentes de 96 pocillos para un total de 10000 células/pocillo. Obsérvese que cada pocillo ya contiene 10 µl de compuesto de ensayo concentrado 10x preparado como se ha indicado anteriormente.

Incubación de células

Incubar las células durante 72-96 horas a 37°C en un incubador de cultivo de tejidos que contiene 5% de CO₂.

40 C- Medición: Determinación de la viabilidad celular

1. Descongelar el reactivo MTS de Promega y añadir 20 µl a cada pocillo con una pipeta de repetición.

2. Mezclar el reactivo en el pocillo sacudiendo la placa y poner la placa en un incubador de cultivo de tejidos de CO₂ a 37°C.

3. Preparar el control blanco "sin células" añadiendo el reactivo MTS a una fila de pocillos que contienen 100 µl de cRPMI sin rojo de fenol solo.

4. Incubar a 37°C hasta que la absorbancia a 490 nm para las células de control sea >1,5.

5. Mezclar el cultivo de células sacudiendo para asegurar que el color es uniforme en los pocillos, asegurándose de que no hay burbujas de aire. Si hay burbujas, centrifugar la placa a 1000 x g en una centrífuga de sobremesa para eliminar las burbujas de aire.

6. Leer la absorbancia en el lector de placas de 96 pocillos Molecular Devices.

D-Análisis de resultados:

1. Copiar y pasar los datos de texto a una hoja de cálculo Excel

10 2. Calcular la media de los datos del blanco "sin células" y restar este valor de la absorbancia de cada pocillo que contiene células.

3. Calcular la media de los datos de los pocillos por triplicado corregidos con respecto al blanco y calcular la desviación típica para la variación de la réplica.

4. Calcular la media de los datos de las células de control:

15 5. Calcular la media de los datos de las células tratadas con compuesto como un porcentaje de la media de los datos de las células de control como se indica a continuación:

$$(\text{Valor tratado con compuesto/valor control}) \times 100 = \% \text{ de valor de control}$$

Resultados:

20 Se ha determinado la actividad anti-proliferación del compuesto de Fórmula I. Como se muestra en la Tabla 4, el compuesto de Fórmula I es consistentemente activo en el ensayo de dos líneas de células MCL de Jeko-1 y Granta-519. Además, el compuesto de Fórmula I parece ser inhibidor de un espectro relativamente amplio de líneas de células malignas hematológicas (6 de 15).

Tabla 4: Efectos del compuesto Syk sobre la viabilidad de líneas de células de tumor líquido (ensayo de MTS)

		CI50 (µM)	% de Inhibición a conc. máx. (10 µM)
Enfermedad	Línea celular	A003397769	A003397769
		N = 4	N = 4
AML	HL-60	3,7, 8,1, >10, >10	35
AML	KG-1	1.9	91
AML	ML-2	> 10	28
B-ALL	Nalm-6	5.5	84
B-CLL	JVM-2	3,5, 3,6, 7,7, >10	60
B-CLL	JVM-2	6,8, 7,0, 8,4, >10	59
B-NHL	DLCL-2	1,4, >10, >10, >10	0
B-NHL	DOHH-2	4.5	75
CML	Jurl-MK1	1,2, >10, >10, >10	28
CML	K562	3,9, >10, >10, >10	21
MCL	Jeko-1	3.1	97

		CI50 (μ M)	% de Inhibición a conc. máx. (10 μ M)
MCL	Granta-519	3.4	67
MM	I-363	5.5	61
MM	RPM18226	> 10	36
T-ALL	Jurkat	6,8, >10, >10, >10	43

INHIBICIÓN DE ARTRITIS INDUCIDA POR COLÁGENO EN RATA

Introducción

5 La artritis inducida por colágeno (CIA) es un modelo bien caracterizado de artritis reumatoide (RA) humana que puede inducirse en roedores genéticamente susceptibles después de la inmunización con colágeno de tipo II (cII) en adyuvante. Tanto CIA como RA presentan una hinchazón/inflamación severa de las articulaciones, hiperplasia sinovial y erosión del cartilago y erosión del hueso. Esta artritis inflamatoria crónica inducida por inmunización con cII comprende tanto un componente de células T, como se demuestra por la CIA atenuada en ratones deficientes en células T, como un componente de células B. Los ratones deficientes en células B, los ratones xid o los ratones con una mutación null en CXCR5 no pueden desarrollar CIA.

Métodos:

Inmunización y exposición: Se inmunizaron ratas Lewis hembra el día 0 y se expusieron el día 7 a cII de origen nasal bovino mezclado con adyuvante incompleto de Freund a una concentración final de colágeno de 1,0 mg/ml. A los animales se les inyectaron en la base de la cola 400 μ g de cII.

15 Régimen de dosificación profiláctico: El compuesto de Fórmula I (3,0, 10 y 30 mg/kg) se dosificó por vía oral (p.o.) dos veces al día (b.i.d.) empezando el día 6 y continuando hasta el día 21.

Régimen de dosificación de combinación: A ratas se les dosificó el compuesto de Fórmula I (3,0 y 10 mg/kg, p.o., b.i.d.) o Metotrexato (MTX, 0,1 y 0,2 mg/kg, p.o., q.d.) como monoterapia o en combinaciones consistentes en cada dosis del compuesto de Fórmula I con cada dosis de MTX empezando el día 6 y continuando hasta el día 21

20 Régimen de dosificación terapéutica: El compuesto de Fórmula I (10 y 30 mg/kg, p.o., b.i.d.) se administró por vía oral empezando el día 12 y continuando hasta el día 21.

25 Patología de las articulaciones: Se midió la hinchazón de la articulación del tobillo con una aproximación de 0,01 mm usando calibres electrónicos digitales. Las mediciones se realizaron 7 veces a lo largo del estudio empezando el día 6 y terminado el día 21. Los pesos corporales se registraron en los mismos días. El día 21, se retiraron las patas traseras en el nacimiento del pelo justo por encima del tobillo y se fijaron en formalina tamponada neutra al 10%.

Análisis MicroCT: Las articulaciones del tobillo se examinaron usando un escáner cone-beam μ CT. Primero se obtuvo una exploración por selección del volumen de examen de las muestras, seguido de la colocación, medición y reconstrucción informática. En las articulaciones del tobillo, se analizó la relación entre la superficie del hueso y el volumen óseo, que describe la complejidad de la superficie del hueso en un cierto volumen.

30 Análisis estadístico: Para la hinchazón/inflamación de la articulación, los datos se analizaron usando el software Everstat v.5 y un ANOVA de medición repetido de 2 vías con ensayo post de Dunnett. Los datos MicroCT se analizaron por Everstat usando un ANOVA de 1 vía y un ensayo de comparación múltiple de Newman-Keuls. Los datos se presentan como la media \pm SEM y los valores de p de <0,05 se consideran significativos.

Resultados:

35 Dosificación Profiláctica:

Medición con calibre digital de hinchazón/inflamación de la articulación (Figura 2).

- El compuesto de Fórmula I (3,0 mg/kg) redujo significativamente la hinchazón/inflamación del tobillo en comparación con ratas tratadas con vehículo el día 12 únicamente.

40 • El compuesto de Fórmula I (10 mg/kg) redujo significativamente la hinchazón/inflamación del tobillo en comparación con ratas tratadas con vehículo los días 12 a 19.

- El compuesto de Fórmula I (30 mg/kg) redujo significativamente la hinchazón/inflamación del tobillo en comparación con ratas tratadas con vehículo del día 12 al día 21.

Análisis MicroCT (Figura 3).

- El compuesto de Fórmula I (3, 10 ó 30 mg/kg, b.i.d.) demostró reducciones significativas en la erosión del hueso cuando se comparó con las ratas tratadas con vehículo (medido por la proporción entre superficie ósea y volumen óseo).

Dosificación de Combinación:

Mediciones con Calibre Digital de la hinchazón/inflamación de las articulaciones (Figura 4, 5).

- El compuesto de Fórmula I (10 mg/kg) redujo significativamente la hinchazón/inflamación del tobillo en comparación con ratas tratadas con vehículo del día 15 al 21.

- La terapia de combinación del compuesto de Fórmula I (10 mg/kg) más MTX (0,2 ó 0,1 mg/kg) demostró una reducción significativa en la hinchazón/inflamación del tobillo del día 15 – día 21 en comparación con la observada en ratas dosificadas con el compuesto de Fórmula I (10 mg/kg) o MTX (0,2 ó 0,1 mg/kg) como monoterapia.

- El compuesto de Fórmula I (3,0 mg/kg) como monoterapia o como terapia de combinación con MTX (0,1 mg/kg) no pudo impactar significativamente sobre la gravedad de la enfermedad como se mide por la hinchazón/inflamación de la articulación.

- El compuesto de Fórmula I (3,0 mg/kg) como terapia de combinación con MTX (0,2 mg/kg) demostró una reducción significativa en la hinchazón/inflamación de las articulaciones superior a la observada cuando se dosificó cualquier fármaco como monoterapia en las medidas tomadas desde los días 18 a 21.

Análisis MicroCT (Figura 6):

- Las imágenes tridimensionales demostraron una erosión del hueso/destrucción significativa en las articulaciones de ratas tratadas con vehículo.

- La dosificación de las ratas con los compuestos de Fórmula I (10 mg/kg, po, bid) produjo una reducción significativa en la erosión del hueso frente a las ratas tratadas con vehículo. No se observó una reducción significativa en las ratas que recibieron 3 mg/kg del compuesto de Fórmula I.

- La monoterapia con MTX (0,2 mg/kg, po, qd) produjo una reducción significativa en la erosión del hueso. Este efecto no se vio en las ratas que recibieron 0,1 mg/kg de MTX.

- Cuando se trataron con combinaciones del compuesto de Fórmula I y MTX, todos los grupos demostraron una reducción significativa en la relación entre la superficie ósea y el volumen óseo en comparación con las ratas tratadas con vehículo.

- La terapia de combinación del compuesto de Fórmula I (10 mg/kg, bid, po) con MTX (0,2 mg/kg, qd) produjo una protección aditiva de la erosión del hueso frente a la observada en ratas que recibieron monoterapia con el compuesto de Fórmula I o MTX.

35 Dosificación Terapéutica

Medición con calibre digital de hinchazón/inflamación de la articulación (Figura 7).

- Incluso cuando se administró en un régimen terapéutico en el que la dosificación se retrasó hasta que la artritis fue visualmente evidente, el compuesto de Fórmula I (10 y 30 mg/kg, p.o., b.i.d.) redujo significativamente la hinchazón/inflamación del tobillo desde el día 15 – 21

40 Análisis MicroCT (Figura 8):

- En comparación con las ratas tratadas con vehículo, las ratas CIA que recibieron la dosis terapéutica del compuesto de Fórmula I (10 mg/kg ó 30 mg/kg) presentaron una reducción significativa en la erosión del hueso como se mide por la relación entre superficie ósea y volumen óseo.

Sumario:

- Estos estudios confirman que la inhibición de la quinasa syk por el compuesto de Fórmula I puede retrasar significativamente tanto el inicio como la progresión de CIA en rata como se mide por una reducción en la hinchazón/inflamación de las articulaciones y erosión del hueso. De manera importante, se observó una inhibición

5 significativa de la progresión de la enfermedad y de la gravedad en ratas en las que la dosificación se retrasó hasta que fueron evidentes signos visibles de artritis. Normalmente, las nuevas terapias clínicas para RA se administran en combinación con MTX. Nuestros datos en un modelo de roedor de artritis demuestran efectos aditivos cuando el compuesto de Fórmula I se dosifica en combinación con MTX, lo que indica que la terapia de combinación del compuesto de Fórmula I y MTX podría producir efectos clínicos sinérgicos en pacientes con RA.

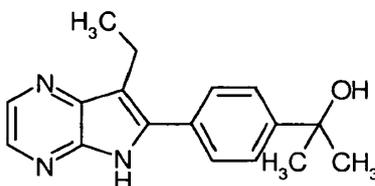
ENSAYO DE ANGIOGÉNESIS

10 Se anestesiaron ratas Lewis hembra (5 semanas de edad, 150-175 g) usando xilazina (4 mg/kg) y ketamina (80 mg/kg). Después se implantaron esponjas de celulosa (diámetro 10 mm, Vivoxid Ltd.™, Turku, Finlandia) que contenían 50 µl de disolución de FGF-2 (factor de crecimiento de fibroblastos 2) (que contenía 400 ng de FGF-2) o vehículo (solución fisiológica salina, albúmina de suero bovino 0,08%) por vía subcutánea en el lomo de los animales. Durante los dos días siguientes, se indujo la angiogénesis adicionalmente por medio de la inyección diaria a través de la piel y dentro de las esponjas de 50 µl de disolución de FGF-2 o vehículo (condiciones basales). Una semana después de la implantación de las esponjas, los animales se sacrificaron usando una sobredosis de pentobarbital y las esponjas se extrajeron por disección. Después, las esponjas se cortaron y se homogeneizaron en tampón de lisis (NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton X100 1%, desoxicolato sódico al 0,5%, NaF 10 mM, Tris/HCl 30 mM pH 7,8 que contenía un cóctel de inhibidor de proteasa (P8340, Sigma-Aldrich™, St Louis, Estados Unidos)) usando tubos D Lysing Matrix (MP Biomedicals™, Illkirch, Francia) en un homogeneizador Fastprep (Qbiogene™, Illkirch, Francia). La concentración de hemoglobina, que indica el volumen vascular, se determinó usando el ensayo Drabkin (Pierce Biotechnology™, Rockford, Illinois, Estados Unidos). Los compuestos se administraron por sonda oral como una suspensión en disolución acuosa de metilcelulosa al 0,6%, Tween 80 al 0,5%.

20 En la Figura 9 se muestran los efectos del compuesto de Fórmula I con respecto al peso de la rata. En la Figura 10 se muestran los efectos del compuesto de Fórmula I sobre la concentración de hemoglobina (mg/ml).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):



(I)

- 5 o un N-óxido o un profármaco correspondiente; o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de dicho compuesto; y el N-óxido y el profármaco de la sal y el solvato.
2. Una composición farmacéutica, que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, junto con al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
3. Un compuesto según la reivindicación 1 para el uso en el tratamiento de la inflamación de las articulaciones.
4. Un compuesto según la reivindicación 1 para el uso en el tratamiento de la artritis reumatoide.
- 10 5. Un compuesto según la reivindicación 3, en donde el tratamiento comprende además metotrexato.
6. Un compuesto según la reivindicación 4, en donde el tratamiento comprende además metotrexato.
7. Un compuesto según la reivindicación 1 para el uso en el tratamiento de un tumor.
8. Un compuesto según la reivindicación 1 para el uso en el tratamiento del linfoma de las células del manto.
9. Un compuesto según la reivindicación 1 para el uso en el tratamiento de la angiogénesis.
- 15 10. El compuesto según la reivindicación 1, en donde la sal se selecciona de: hidrocloreuro, hidrobromuro, sulfato, fosfato, nitrato, sulfamato, acetato, citrato, lactato, tartrato, malonato, oxalato, salicilato, propionato, succinato, fumarato, maleato, metilen-bis-b-hidroxinaftoato, gentisato, isetionato, di-p-toluilitartrato, metano-sulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato, ciclohexilsulfamato y quinato.
11. El compuesto según la reivindicación 1, en donde la sal es hidrocloreuro.
- 20 12. El compuesto según la reivindicación 1, en donde la sal es acetato.
13. El compuesto según la reivindicación 1, en donde la sal es citrato.

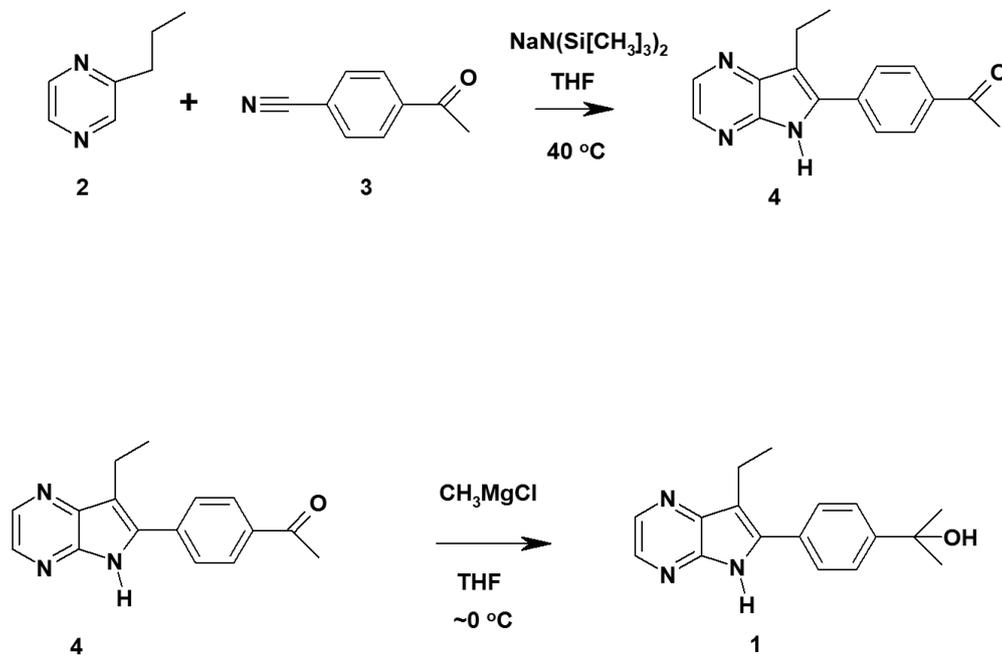


FIGURA 1

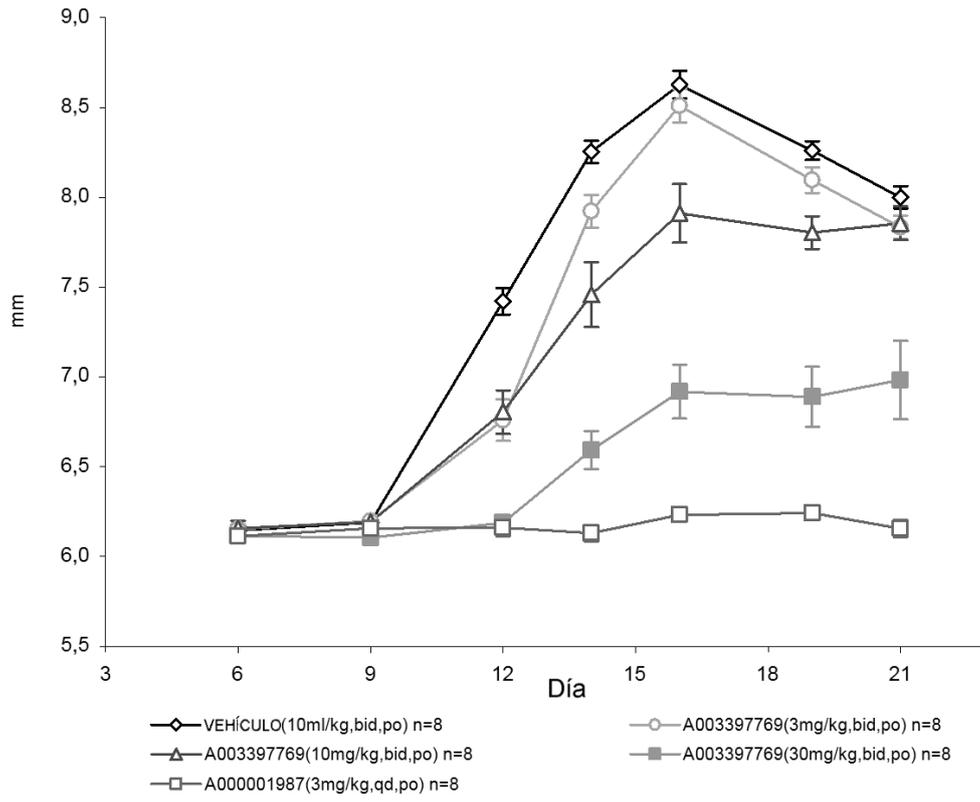
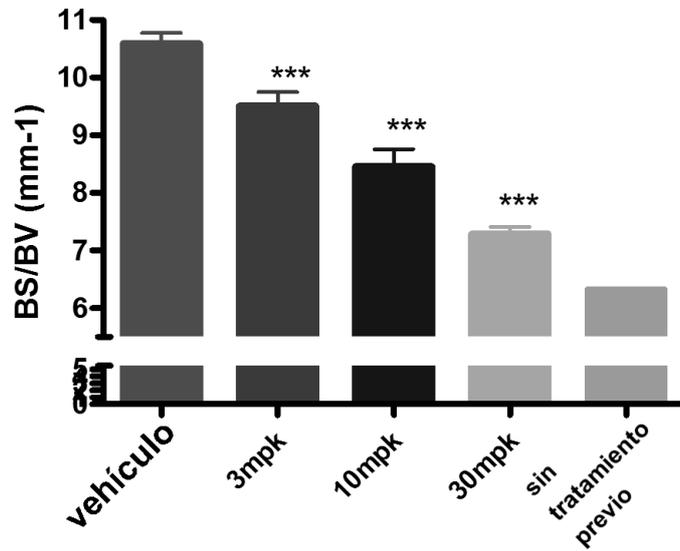


FIGURA 2

Relación entre superficie ósea y volumen óseo



***p<0,001 en comparación con el grupo de vehículo

FIGURA 3

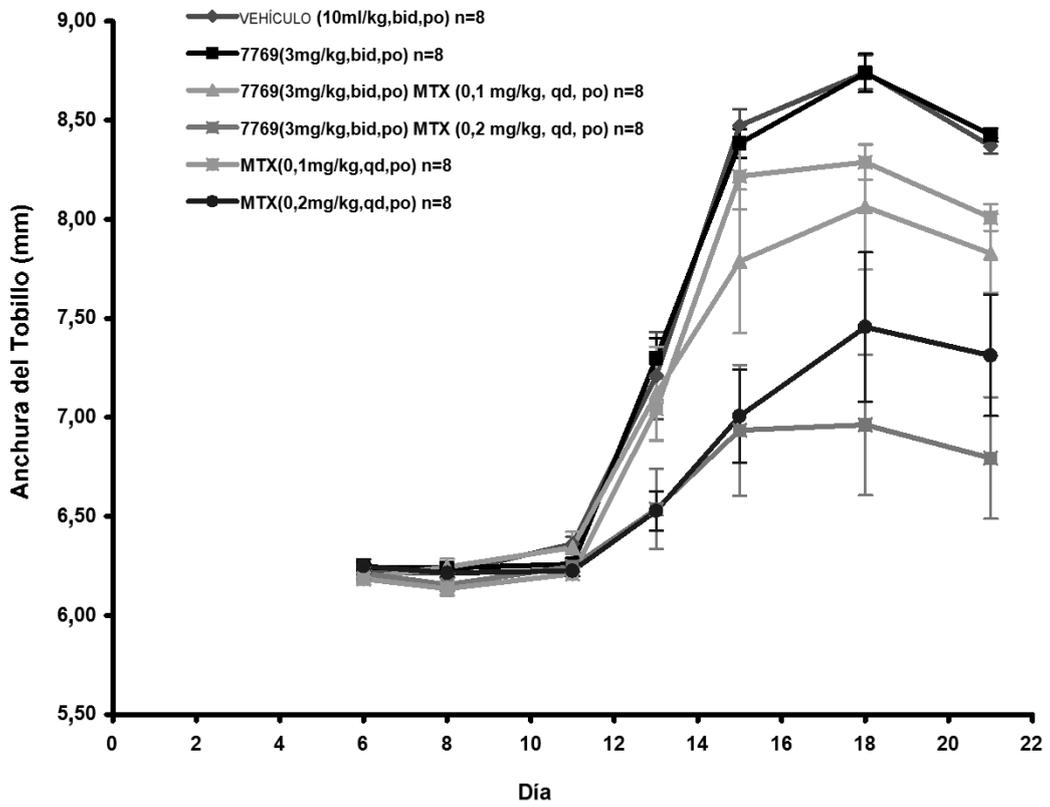


FIGURA 4

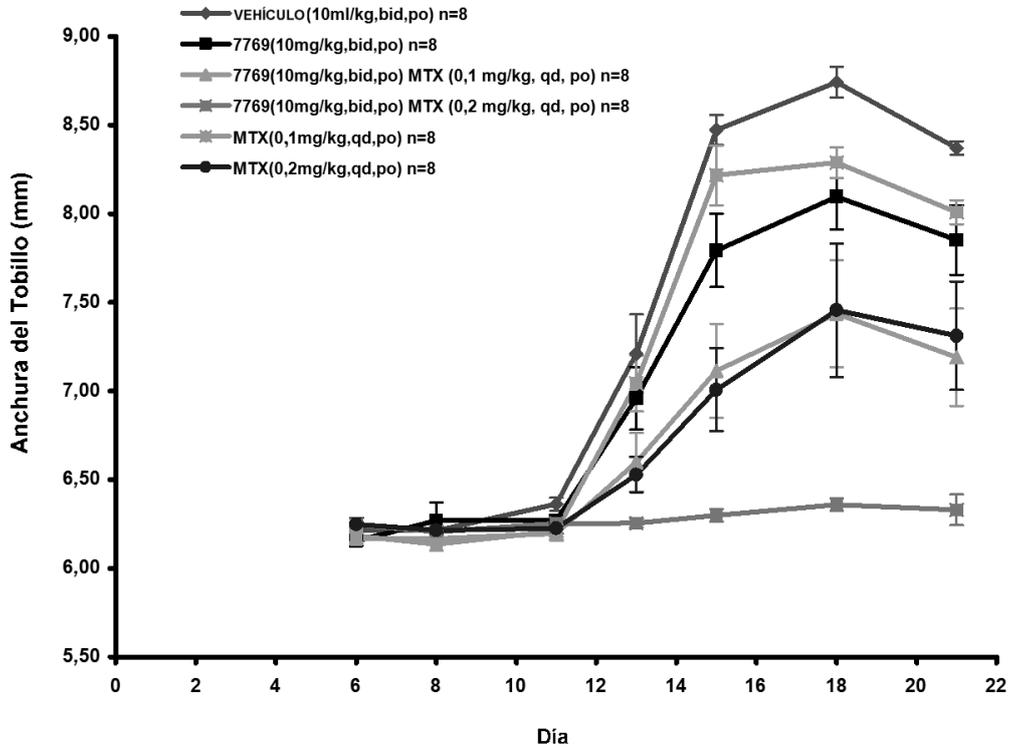
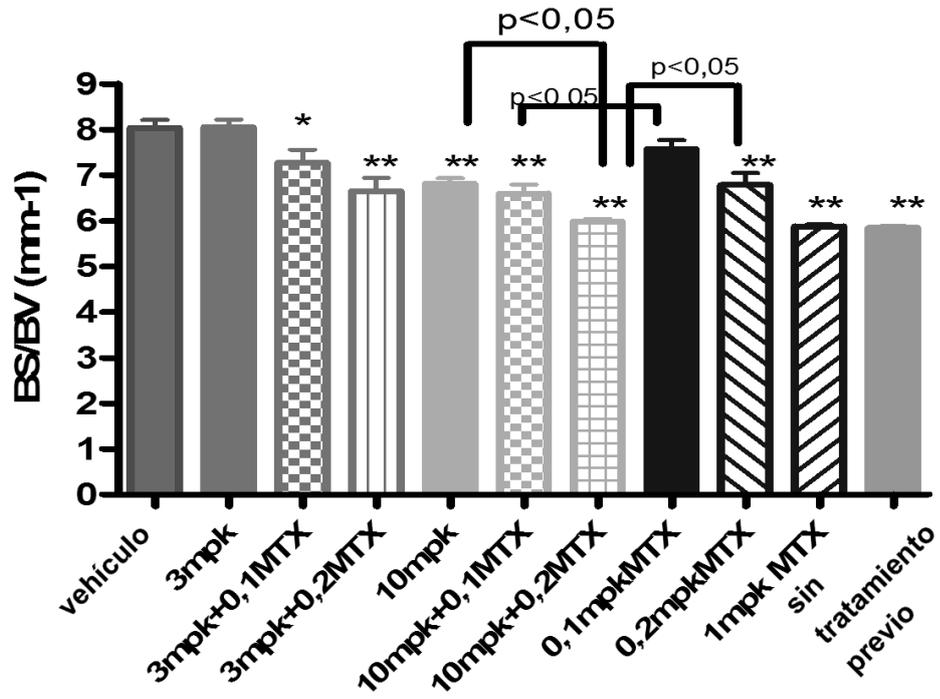


FIGURA 5

Relación entre superficie ósea y volumen óseo en tobillos de ratas CIA tratadas con A003397769



* P<0,05 ** P<0,001 en comparación con el grupo de vehículo

FIGURA 6

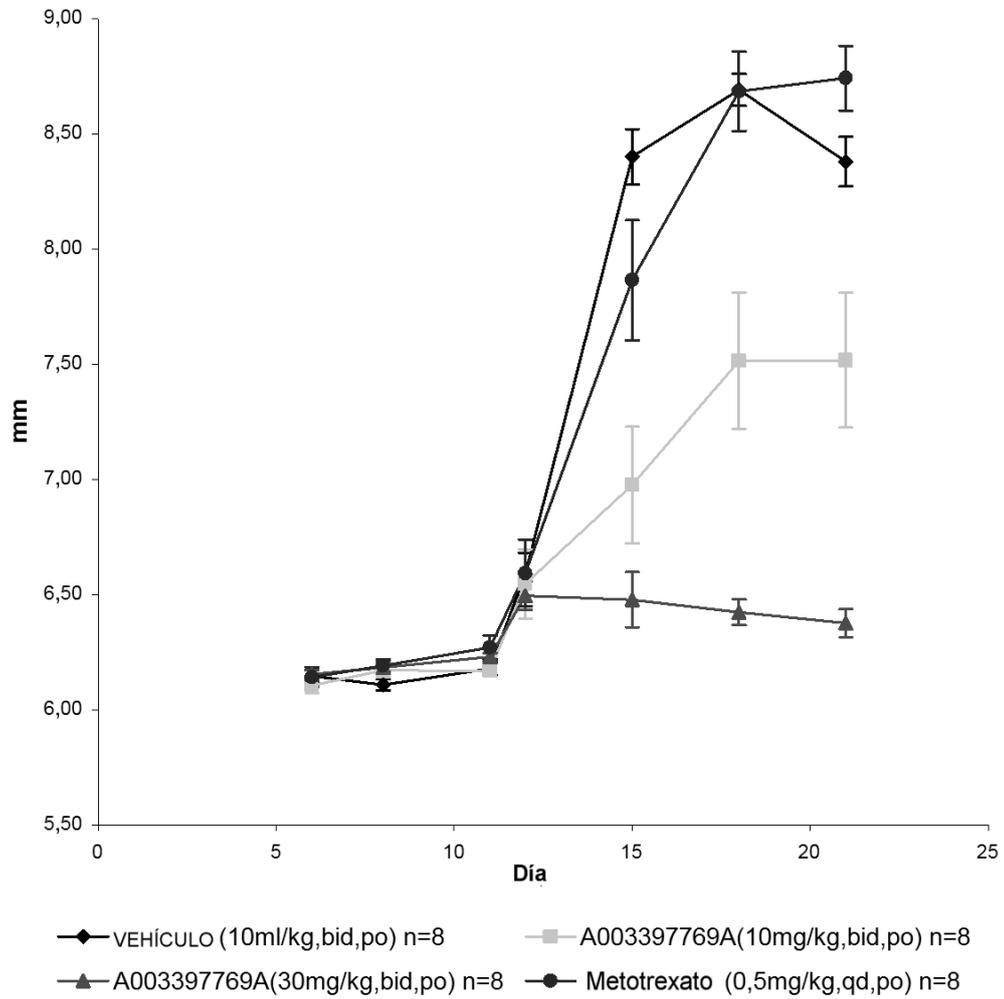
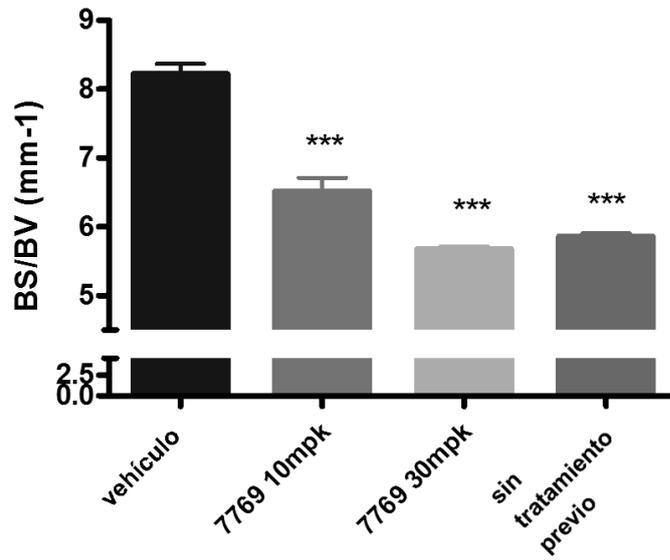


FIGURA 7

Relación entre superficie ósea y volumen óseo



***p<0,001 en comparación con el grupo de vehículo

FIGURA 8

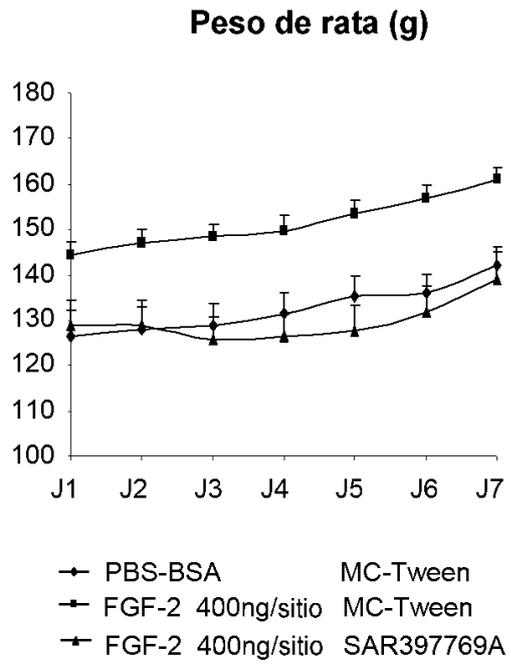


FIGURA 9

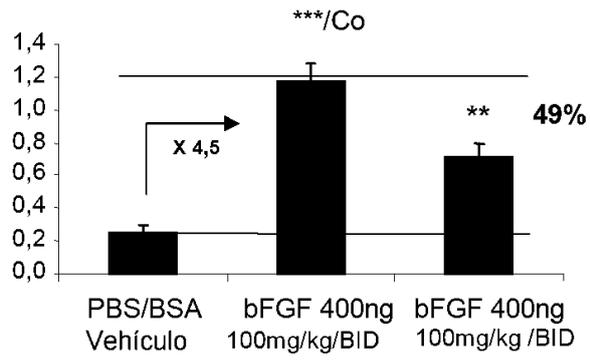


FIGURA 10