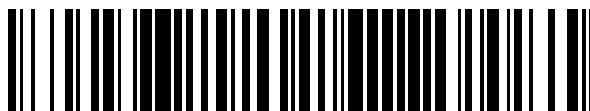


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 459 297**

51 Int. Cl.:

C07D 241/20 (2006.01) **C07D 407/14** (2006.01)

C07D 401/04 (2006.01) **C07D 409/14** (2006.01)

C07D 401/14 (2006.01)

C07D 403/12 (2006.01)

C07D 417/14 (2006.01)

A61K 31/497 (2006.01)

A61K 31/4965 (2006.01)

A61K 31/5415 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2009 E 09706385 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2014 EP 2252597**

54 Título: **Derivados de pirazina y su uso como inhibidores de las proteínas quinasas**

30 Prioridad:

01.02.2008 SE 0800250

04.04.2008 US 123039 P

21.05.2008 SE 0801185

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.05.2014

73 Titular/es:

AKINION PHARMACEUTICALS AB (100.0%)

Karolinska Institutet Science Park

171 77 Stockholm, SE

72 Inventor/es:

JENMALM JENSEN, ANNIKA;

LEHMANN, FREDRIK;

NILSSON, BJÖRN, M.;

NORDLING, ERIK y

PARROW, VENDELA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 459 297 T3

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

DESCRIPCIÓN

Derivados de pirazina y su uso como inhibidores de las proteínas quinasas

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a compuestos de pirazina *N*3-1*H*-indol-5-il-5-piridin-4-ilpirazina-2,3-diamina que actúan como inhibidores de las proteínas quinasas, especialmente la tirosina quinasa de tipo fms 3 (FLT3). La invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden este compuesto, y al uso del compuesto para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de las neoplasias hematológicas de tipo LMA, LLM, LLA-T, LLA-B y LMMC, trastornos mieloproliferativos, otros trastornos proliferativos como el cáncer, trastornos autoinmunes, y trastornos cutáneos como la psoriasis y la dermatitis atópica.

15 **Antecedentes de la técnica**

Las proteínas quinasas están implicadas en la regulación del metabolismo, de la proliferación, de la diferenciación y de la supervivencia celular. Las proteínas quinasas fosforilan proteínas en restos de serina/treonina o de tirosina. La activación de una clase de quinasa, por lo general, conduce a la activación de más de una vía de señalización a través de la diafonía de la señalización. Las tirosina quinasas que actúan como receptores (RTK) son un tipo importante de receptores de la superficie celular, donde la parte intracelular del receptor tiene un dominio quinasa. Los ligandos activadores son hormonas peptídicas/proteicas, como el ligando FL, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), la insulina, etc. La unión de un ligando al dominio extracelular de un RTK produce la dimerización del receptor y un cambio conformacional que activa el sitio de quinasa en el dominio intracelular. La actividad de la quinasa conduce a una cascada de transducción de señales mediante la fosforilación de otras proteínas que regula la fisiología celular y los patrones de la expresión génica (para una revisión, véase Schlessinger, J. (2000) *Cell* 103: 211-225; y Blume-Jensen P. y Hunter T. (2001) *Nature* 411: 355-365). Las proteínas de señalización intracelular activadas en la cascada de señalización pueden ser otras quinasas y/o proteínas implicadas en la transcripción y la traducción. Hay varias familias de quinasas intracelulares. La familia de tirosina quinasas de las quinasas de Janus (JAK) (JAK1, 2, 3 y Thyl) se activan a través de la interacción con otras proteínas (véase O'Shea, J. J. *et al.* (2002) *Cell* 109 (Suplemento) 121-131 y referencias del mismo). Las serina/treonina quinasas tales como la familia de isoenzimas de la proteína quinasa C (PKC) y las quinasas activadas por mitógenos (familia de las MAP quinasas) también participan en la regulación de la supervivencia, de la proliferación y de la diferenciación celular. Las isoenzimas PKC son activadas por el calcio, y el diacilglicerol es un activador alostérico de algunos de los miembros de la familia de PKC (α , β , γ). Las quinasas intracelulares interactúan con otras proteínas y, a menudo, son trasladadas a otros compartimentos tras la activación (véase Manning, G. *et al.* (2002) *Science* 298: 1912-1934; Martin, P. M. y Hussaini I. M. (2005) *Expert Opin. Ther. Targets* 9(2) 299-313 y sus referencias). La asociación a la membrana se puede regular por miristilación, como en el caso de las isoenzimas PKC. Se ha descrito la asociación nuclear para varias clases diferentes de quinasas. Las MAP quinasas son activadas por otras proteínas, pudiéndose trasladar al núcleo, donde se fosforilan las proteínas implicadas en la transcripción, y los reguladores del ciclo y de la diferenciación celular.

El documento US 2006/0148824 desvela compuestos basados en un armazón de pirazina disustituido que son inhibidores de las proteínas quinasa. El armazón de pirazina carece de sustituyente de piridina.

Durante el desarrollo y la diferenciación normales, se regula estrechamente tanto la activación como la desactivación de las quinasas. Las mutaciones oncogénicas, que conducen a quinasas constitutivamente activas, pueden transformar las células normales en células cancerosas. Una mutación de activación puede ser el resultado de una translocación cromosómica que dé lugar a una proteína de fusión, como ocurre, por ejemplo, en la leucemia mieloide crónica, en la que el dominio tirosina quinasa ABL se fusiona con la proteína BCR (para una revisión, véase Östman, A. (2007) *Helix Review Series Oncology* 2: 2-9; y Deininger, M. *et al.* (2005) *Blood* 105: 2640-2653).

Durante la hematopoyesis normal, FLT3 está activa en la fase mieloblástica, pero, después, la actividad de FLT3 se desactiva tras la diferenciación hematopoyética normal en las células sanguíneas maduras (Gilliand, D. G., y Griffin, J. D. (2002) *Blood* 100: 1532-1542; Weisel, K. C. *et al.* (2007) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1106: 190-196). En la leucemia mieloide aguda (LMA), la expresión de FLT3 es alta en la mayoría de los pacientes (70-90 %) (Carow, C. E. *et al.* (1996) *Blood* 87 (3): 1089-1096; y Rosnet, O. *et al.* (1993) *Crit. Rev. Oncogenesis* 4: 595-613). Es más, la actividad de la quinasa FLT3 está regulada positivamente en un tercio de los pacientes debido a una duplicación en tándem interna en la posición de la yuxtamembrana (FLT3-ITD), lo que se traduce en una dimerización del receptor independiente del ligando y una quinasa constitutivamente activa. FLT3-ITD es un marcador de pronóstico, con una reducción estadísticamente significativa de la supervivencia en la población de los pacientes portadores de la mutación, especialmente si ambos alelos se ven afectados. También hay mutaciones puntuales activadoras (FLT3-PM) de FLT3 descritas en los pacientes con LMA. Estas mutaciones activadoras se pueden encontrar en el bucle de activación del dominio quinasa (mutaciones AL) o en el dominio yuxtamembrana (mutaciones JM). Para una revisión, véase Carow, C. E. *et al.* (1996) *Blood* 87 (3): 1089-1096; Tickenbrock, L. *et al.* (2006) *Expert Opin. Emerging Drugs* 11 (1): 153-165; Anjali S. y Advani, A. S. (2005) *Current Pharmaceutical Design* 11: 3449-3457; Lee

B. H. *et al.* (2007) *Cancer Cell* 12: 367-380); Stam, R. W. *et al.* (2005) *Blood* 106 (7): 2484-2490; y las referencias de los mismos. Además, se han encontrado FLT3-ITD o FLT3-PM en subgrupos de pacientes con otras neoplasias linfoides o mieloides tales como LLM, LLA-T y LMMC, y se ha descrito una alta actividad de FLT3 en la LLA-B (para una revisión, véase Lee, B. H. *et al.* (2007) *Cancer Cell* 12: 367-380.

5 Sin embargo, la actividad de FLT3 forma parte de la hematopoyesis normal. Si se desregula la proliferación de los blastocitos inmaduros en la médula ósea, por una sobreestimulación de las quinasas de tipo FLT3, se podría generar un agotamiento de otras células hematopoyéticas. Luego, son los blastocitos los que entrarían en el torrente sanguíneo, en lugar de las células diferenciadas maduras. El estado leucémico agudo produce anemia y neutropenia. Por lo tanto, el bloqueo de la actividad quinasa desfavorable podría reducir la proliferación de los blastocitos, reduciendo el estado leucémico. Se han probado varios inhibidores de la quinasa FLT3 en modelos de LMA y en las indicaciones clínicas en las que participa la FLT3 (Cheng, Y. y Paz, K. (2008) *IDrugs* 11(1): 46-56; Kiyoi, H. *et al.* (2007) *Clin. Cancer Res.* 13(15): 4575-4582; Roboz, G. J. *et al.* (2006) *Leukemia* 20: 952-957; Tse, K-F. *et al.* (2002) *Leukemia* 16: 2027-2036; Smith, B. D. *et al.* (2004) *Blood* 103: 3669-3676; Knapper, S. *et al.* (2006) *Blood* 108 (10): 3494-3503; y Furukawa, Y. *et al.* (2007) *Leukemia* 21: 1005-1014). La línea celular de LMA MV4-11 porta la FLT3-ITD. Esta línea celular es muy sensible en los ensayos de viabilidad/proliferación a los inhibidores de la actividad de FLT3. Sin embargo, en las células de pacientes *ex vivo* también existe una diafonía entre las vías de señalización, las moléculas activadas secuencia abajo del receptor FLT3 también pueden ser activadas por otras quinasas. Knapper *et al* 2006 demostraron que, a pesar de que la autofosforilación de FLT3 estaba regulada negativamente en las células de los pacientes tras la exposición a los inhibidores de FLT3, el estado de fosforilación de los efectores STAT y ERK secuencia abajo no se había reducido, posiblemente debido a la desregulación de otras vías de señalización, aparte de fosforilación de FLT3.

25 La actividad de FLT3 y otro RTK se regula mediante la autofosforilación y la internalización, y la fosforilación del receptor es retirada después por fosfatasas específicas que también se someten a una regulación. Una regulación insuficiente del proceso de internalización y desfosforilación de las fosfatasas también podría tener un impacto en la actividad de RTK y, por lo tanto, alterar la viabilidad y la proliferación de las células. Como hay varios órdenes de regulación, un inhibidor de quinasa necesita tener un determinado perfil en cuanto a su especificidad por la diana y el modo de acción para inhibir eficazmente la proliferación y la viabilidad en el cáncer o un trastorno proliferativo.

30 **Divulgación de la invención**

La presente invención se refiere, en general, a un determinado compuesto de pirazina que puede actuar como inhibidor del receptor tirosina quinasa FLT3, y a composiciones farmacéuticas y métodos relacionados.

35 Sin el deseo de quedar ligados a teoría alguna, se cree que el compuesto descrito en el presente documento se puede usar, por ejemplo, para el tratamiento o la prevención de neoplasias hematológicas tales como leucemia mieloide aguda (LMA); leucemia de linaje mixto (LLM); leucemia linfocítica aguda de tipo linfocitos T (LLA-T); leucemia linfocítica aguda de tipo linfocitos B (LLA-B); leucemia mielomonocítica crónica (LMMC); trastornos mieloproliferativos; otros trastornos proliferativos tales como el cáncer; trastornos autoinmunes; y trastornos cutáneos tales como psoriasis y dermatitis atópica.

45 El compuesto se puede usar además en combinación con un agente dirigido molecularmente, tal como un agente citotóxico convencional o un compuesto usado tras la quimioterapia, terapia de mantenimiento dirigida a células madre y leucemia linfoblástica aguda infantil con reordenamiento del gen MLL.

La invención se refiere a la *N3-1H-indol-5-il-5-piridin-4-ilpirazina-2,3-diamina*.

50 En un aspecto, la presente invención se refiere al compuesto *N3-1H-indol-5-il-5-piridin-4-ilpirazina-2,3-diamina* para su uso en terapia, especialmente para su uso en el tratamiento o la profilaxis de un trastorno relacionado con FLT3. Los ejemplos de trastornos relacionados con FLT3 incluyen la leucemia mieloide aguda (LMA); leucemia de linaje mixto (LLM); leucemia linfocítica aguda de tipo linfocitos T (LLA-T); leucemia linfocítica aguda de tipo linfocitos B (LLA-B); leucemia mielomonocítica crónica (LMMC). La presente invención también se refiere al compuesto *N3-1H-indol-5-il-5-piridin-4-ilpirazina-2,3-diamina* para su uso en el tratamiento o la profilaxis de trastornos hematológicos relacionados con la mala regulación de la actividad quinasa, tales como los trastornos mieloproliferativos; otros trastornos proliferativos tales como el cáncer; trastornos autoinmunes; y trastornos cutáneos tales como la psoriasis y la dermatitis atópica.

60 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende el compuesto *N3-1H-indol-5-il-5-piridin-4-ilpirazina-2,3-diamina* como principio activo, en combinación con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable, especialmente para su uso en el tratamiento o la profilaxis de un trastorno relacionado con FLT3.

65 En un aspecto, la presente invención se refiere al compuesto para su uso en un método para tratar a un sujeto humano o animal que padece un trastorno relacionado con FLT3. En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al compuesto para su uso en un método para tratar a un sujeto humano o animal que padece neoplasias

- hematológicas tales como leucemia mieloide aguda (LMA); leucemia de linaje mixto (LLM); leucemia linfocítica aguda de tipo linfocitos T (LLA-T); leucemia linfocítica aguda de tipo linfocitos B (LLA-B); leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), y otros trastornos hematológicos como trastornos mieloproliferativos; otros trastornos proliferativos, tales como el cáncer; trastornos autoinmunes; y trastornos cutáneos tales como psoriasis y dermatitis atópica. El método puede incluir la administración a un sujeto (por ejemplo, un ser humano o un animal, perro, gato, caballo, vaca) en necesidad de la misma de una cantidad eficaz de los compuestos *N3-1H*-indol-5-il-5-piridin-4-ilpirazina-2,3-diamina, sus sales o composiciones que contienen los compuestos o las sales.
- Los métodos definidos en el presente documento incluyen aquellos en los que el sujeto se identifica como aquel en necesidad de un tratamiento indicado en particular. La identificación de un sujeto en necesidad de dicho tratamiento puede ser a juicio de un sujeto o de un profesional de atención sanitaria, y puede ser subjetiva (por ejemplo, opinión) u objetiva (por ejemplo, medible mediante un ensayo o un método de diagnóstico).
- En otros aspectos, la invención proporciona el compuesto *N3-1H*-indol-5-il-5-piridin-4-ilpirazina-2,3-diamina para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que padece o es susceptible de padecer un trastorno o una enfermedad relacionados con FLT3, que comprende administrar a dicho sujeto en necesidad de ello, una cantidad eficaz del compuesto *N3-1H*-indol-5-il-5-piridin-4-ilpirazina-2,3-diamina o una composición farmacéutica del mismo, de modo que dicho sujeto sea tratado de dicho trastorno o enfermedad.
- En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso del compuesto *N3-1H*-indol-5-il-5-piridin-4-ilpirazina-2,3-diamina (por ejemplo, como un medicamento) para el tratamiento de una enfermedad, un trastorno o una afección relacionados con la actividad no deseada de la quinasa FLT3 según lo descrito en el presente documento.
- En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del compuesto *N3-1H*-indol-5-il-5-piridin-4-ilpirazina-2,3-diamina en la fabricación de un medicamento que contiene un compuesto de fórmula I para el tratamiento de una enfermedad, un trastorno o una afección relacionados con la actividad no deseada de la quinasa FLT3 según lo descrito en el presente documento.
- Un aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de una combinación del inhibidor del receptor tirosina quinasa FLT3 *N3-1H*-indol-5-il-5-piridin-4-ilpirazina-2,3-diamina y otro agente dirigido molecularmente, preferentemente un agente citotóxico convencional o un compuesto usado tras la quimioterapia, terapia de mantenimiento dirigida a células madre y leucemia linfoblástica aguda infantil con reordenamiento del gen MLL; y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- Otro aspecto de la invención proporciona el compuesto *N3-1H*-indol-5-il-5-piridin-4-ilpirazina-2,3-diamina para su uso en un método de prevención o tratamiento de neoplasias hematológicas, trastorno mieloproliferativo, otros trastornos proliferativos, trastornos autoinmunes y trastornos cutáneos, que comprende administrar a un sujeto humano o animal en necesidad de ello el inhibidor del receptor tirosina quinasa FLT3 *N3-1H*-indol-5-il-5-piridin-4-ilpirazina-2,3-diamina simultánea o secuencialmente con otro agente dirigido molecularmente, preferentemente un agente citotóxico convencional, o un compuesto usado tras la quimioterapia, terapia de mantenimiento dirigida a células madre y leucemia linfoblástica aguda infantil con reordenamiento del gen MLL; en cantidades suficientes para proporcionar un efecto terapéutico.
- Otro aspecto más de la invención proporciona el uso del inhibidor del receptor tirosina quinasa FLT3 *N3-1H*-indol-5-il-5-piridin-4-ilpirazina-2,3-diamina junto con otro agente dirigido molecularmente, tal como un agente citotóxico convencional, o un compuesto usado tras la quimioterapia, terapia de mantenimiento dirigida a células madre y leucemia linfoblástica aguda infantil con reordenamiento del gen MLL; para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de neoplasias hematológicas, trastorno mieloproliferativo, otros trastornos proliferativos, trastornos autoinmunes y trastornos cutáneos.
- Otro aspecto de la invención proporciona un proceso para la preparación de una composición farmacéutica, en el que el inhibidor del receptor tirosina quinasa FLT3 *N3-1H*-indol-5-il-5-piridin-4-ilpirazina-2,3-diamina y otro agente dirigido molecularmente, tal como un agente citotóxico convencional, o un compuesto usado tras la quimioterapia, terapia de mantenimiento dirigida a células madre y leucemia linfoblástica aguda infantil con reordenamiento del gen MLL; en una cantidad terapéutica combinada se mezcla íntimamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- Otro aspecto más de la invención proporciona un producto que contiene el inhibidor del receptor tirosina quinasa FLT3 *N3-1H*-indol-5-il-5-piridin-4-ilpirazina-2,3-diamina que comprende además otro agente dirigido molecularmente, tal como un agente citotóxico convencional, o un compuesto usado tras la quimioterapia, terapia de mantenimiento dirigida a células madre y leucemia linfoblástica aguda infantil con reordenamiento del gen MLL; como una preparación combinada para un uso simultáneo, separado o secuencial en la terapia de neoplasias hematológicas, trastorno mieloproliferativo, otros trastornos proliferativos, trastornos autoinmunes y trastornos cutáneos.
- Otro aspecto de la presente invención es un proceso para la preparación del compuesto *N3-1H*-indol-5-il-5-piridin-4-ilpirazina-2,3-diamina de la invención que comprende hacer reaccionar 2-amino-3,5-dibromo-pirazina y la amina apropiada, para realizar después un acoplamiento de Suzuki. Más concretamente, el proceso para la preparación del

compuesto *N3-1H*-indol-5-il-5-piridin-4-ilpirazina-2,3-diamina de la invención que comprende una o más de las siguientes etapas: se disuelven 2-amino-3,5-dibromo-pirazina (3 equiv) y la amina apropiada en 4 ml de agua y se calienta la mezcla resultante hasta 195 °C durante 1 hora. Se añaden agua y acetato de etilo, y se separan las fases. Se extrae la fase acuosa una vez más con acetato de etilo. Se lavan las fases orgánicas combinadas (agua y salmuera) y se concentran, produciendo una mezcla en bruto de producto y amina sin reaccionar o alcohol. Esta mezcla en bruto se usa sin mayor purificación ni caracterización en la siguiente reacción de Suzuki, que se realiza de acuerdo a los protocolos de Suzuki convencionales publicados en la bibliografía.

Los productos químicos usados en las rutas de síntesis definidas en el presente documento pueden incluir, por ejemplo, disolventes, reactivos, catalizadores, y reactivos de protección y desprotección de grupos. Los métodos descritos anteriormente también pueden incluir además etapas, bien anteriores o posteriores a las etapas descritas específicamente en el presente documento, para agregar o retirar los grupos protectores adecuados con el fin de permitir, en última instancia, la síntesis de los compuestos. Además, se pueden realizar varias etapas de síntesis en una secuencia o un orden alternativo para que den los compuestos deseados. Las transformaciones de química sintética útiles en la síntesis de los compuestos aplicables se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, las descritas en R. Larock, "Comprehensive Organic Transformations", VCH Publishers (1989); L. Fieser y M. Fieser, "Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis", John Wiley and Sons (1994); y L. Paquette, ed., "Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis", John Wiley and Sons (1995) y las ediciones posteriores de los mismos.

Los métodos para llevar a cabo las reacciones descritas anteriormente son bien conocidos por los expertos en la materia. Los materiales de partida necesarios para la preparación del compuesto *N3-1H*-indol-5-il-5-piridin-4-ilpirazina-2,3-diamina bien son conocidos o se pueden preparar en analogía a la preparación de compuestos conocidos. El compuesto *N3-1H*-indol-5-il-5-piridin-4-ilpirazina-2,3-diamina puede poseer uno o más átomos de carbono quirales y, por lo tanto, se pueden obtener en forma de isómeros ópticos, por ejemplo, como un enantiómero puro o como una mezcla de enantiómeros (racemato) o como una mezcla que contenga diastereómeros. La separación de mezclas de isómeros ópticos para obtener enantiómeros puros es bien conocida en la técnica y se puede realizar, por ejemplo, mediante cristalización fraccionada de sales con ácidos ópticamente activos (quirales) o mediante separación cromatográfica en columnas quirales. Todas las formas isoméricas posibles (enantiómeros puros, diastereómeros, tautómeros, mezclas racémicas y mezclas desiguales de dos enantiómeros) para el compuesto definido están dentro del alcance de la invención.

El compuesto *N3-1H*-indol-5-il-5-piridin-4-ilpirazina-2,3-diamina se puede usar como tal o, en su caso, como sales farmacológicamente aceptables (ácidas) del mismo. Las sales de adición farmacológicamente aceptables mencionadas anteriormente pretenden comprender las formas de sales de adición de ácido y base no tóxicas terapéuticamente activas que los compuestos son capaces de formar. Los compuestos que tienen propiedades básicas se pueden convertir en sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables mediante el tratamiento de la forma de base con un ácido apropiado. Los ácidos de ejemplo incluyen ácidos inorgánicos tales como cloruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, yoduro de hidrógeno, ácido sulfúrico, ácido fosfórico; y ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propanoico, ácido hidroxiacético, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido glicólico, ácido maleico, ácido malónico, ácido oxálico, ácido bencenosulfónico, ácido toluenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido trifluoroacético, ácido fumárico, ácido succínico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido salicílico, ácido *p*-aminosalicílico, ácido pamoico, ácido benzoico, ácido ascórbico y similares. La expresión "sal de adición" como se usa en el presente documento también comprende solvatos que los compuestos y las sales de los mismos son capaces de formar, tales como, por ejemplo, hidratos, alcoholatos y similares.

Para un uso clínico, el compuesto de la invención se formula en formulaciones farmacéuticas para la administración oral, rectal, parenteral u otro modo de administración. Las formulaciones farmacéuticas se preparan normalmente mediante la mezcla de la sustancia activa, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, con excipientes farmacéuticos convencionales. Los ejemplos de excipientes son agua, gelatina, goma arábiga, lactosa, celulosa microcristalina, almidón, glicolato de almidón de sodio, hidrógeno-fosfato de calcio, estearato de magnesio, talco, dióxido de silicio coloidal, y similares. Dichas formulaciones también pueden contener otros agentes farmacológicamente activos y aditivos convencionales, tales como estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, agentes aromatizantes, tampones, y similares. Por lo general, la cantidad de compuestos activos está entre 0,1-95 % en peso de la preparación, preferentemente entre 0,2-20 % en peso en preparaciones para un uso parenteral y, más preferentemente, entre 1-50 % en peso en preparaciones para la administración oral.

Las formulaciones se pueden preparar además mediante métodos conocidos tales como granulación, compresión, microencapsulación, recubrimiento por pulverización, etc. Las formulaciones se pueden preparar mediante métodos convencionales en la forma de dosificación de comprimidos, cápsulas, gránulos, polvos, jarabes, suspensiones, supositorios o inyecciones. Las formulaciones líquidas se pueden preparar disolviendo o suspendiendo la sustancia activa en agua u otros vehículos adecuados. Los comprimidos y gránulos se pueden recubrir de una forma convencional.

El nivel de dosis y la frecuencia de dosificación del compuesto específico variará dependiendo de varios factores incluyendo la potencia del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de acción de ese compuesto, la edad del paciente, el peso corporal, el estado de salud general, el género, la dieta, el modo y

momento de administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad de la afección que se vaya a tratar y el paciente sometido a terapia. La dosis diaria puede, por ejemplo, variar de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal, administrada en una sola dosis o en múltiples dosis, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1.000 mg cada una. Normalmente, dicha dosis se administra oralmente, pero también se puede seleccionar la administración parenteral.

Definiciones

Las siguientes definiciones se aplicarán a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas.

Las expresiones "trastorno relacionado con FLT3" y "trastorno o afección relacionados con la actividad no deseada de FLT3" se han usado indistintamente en el presente documento para denotar cualquier trastorno o síntoma en el que FLT3 participe en el proceso o la presentación del trastorno o del síntoma. Por lo tanto, los trastornos relacionados con FLT3 incluyen, por ejemplo, pero sin limitación, neoplasias hematológicas tales como leucemia mieloide aguda (LMA); leucemia de linaje mixto (LLM); leucemia linfocítica aguda de tipo linfocitos T (LLA-T); leucemia linfocítica aguda de tipo linfocitos B (LLA-B) y leucemia mielomonocítica crónica (LMMC).

A menos que se especifique o indique lo contrario, la expresión "alquilo C₁₋₆" denota un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos de dicho alquilo C₁₋₆ incluyen metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo, *n*-butilo, *iso*-butilo, *sec*-butilo, *t*-butilo, y pentilo y hexilo de cadena lineal y ramificada. Para las partes del intervalo de "alquilo C₁₋₆", se contemplan todos los subgrupos del mismo tales como alquilo C₁₋₅, alquilo C₁₋₄, alquilo C₁₋₃, alquilo C₁₋₂, alquilo C₂₋₆, alqueno C₂₋₅, alquilo C₂₋₄, alquilo C₂₋₃, alquilo C₃₋₆, alquilo C₄₋₅, etc. Del mismo modo, "arilalquilo C₁₋₆" significa un grupo alquilo C₁₋₆ sustituido con un grupo arilo. Los ejemplos incluyen bencilo, 2-feniletilo, 1-feniletilo y 1-naftilmetilo.

A menos que se especifique o indique lo contrario, la expresión "alcoxi C₁₋₃" denota un grupo alcoxi lineal o ramificado que tiene de 1 a 3 átomos de carbono. Los ejemplos de dicho alcoxi C₁₋₃ incluyen metoxi, etoxi, *n*-propoxi, *iso*-propoxi. Para las partes del intervalo "alcoxi C₁₋₃", se contemplan todos los subgrupos del mismo tales como alcoxi C₁₋₂ y alcoxi C₂₋₃.

A menos que se especifique o indique lo contrario, el término "alcoxi C₁₋₃-carbonilo" denota un grupo alcoxi lineal o ramificado que tiene de 1 a 3 átomos de carbono conectados a un grupo carbonilo. Los ejemplos de dicho alcoxi C₁₋₃-carbonilo incluyen metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, *iso*-propoxicarbonilo. Para las partes del intervalo "alcoxi C₁₋₃-carbonilo", se contemplan todos los subgrupos del mismo tales como alcoxi C₁₋₂-carbonilo y alcoxi C₂₋₃-carbonilo.

"Farmacéuticamente aceptable" significa que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica y no indeseable biológicamente ni desde otro punto de vista, e incluye ser útil para un uso veterinario, así como para un uso farmacéutico humano.

"Tratamiento" como se usa en el presente documento incluye la profilaxis del trastorno o de la afección nombrada, o la mejora o eliminación del trastorno una vez que se ha establecido.

"Una cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto que confiere un efecto terapéutico sobre el sujeto tratado. El efecto terapéutico puede ser objetivo (es decir, medible mediante algún ensayo o marcador) o subjetivo (es decir, el sujeto da una indicación de o siente un efecto). La expresión "formas de profármaco" significa un derivado farmacológicamente aceptable, tal como un éster o una amida, cuyo derivado se biotransforma en el organismo para formar el fármaco activo. Se hace referencia a Goodman y Gilman's, "The Pharmacological basis of Therapeutics", VIII ed., Mc-Graw-Hill, Int. Ed. 1992, "Biotransformation of Drugs", pág. 13-15; y "The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action" por Richard B. Silverman. Capítulo 8, pág. 352. (Academic Press, Inc. 1992. ISBN 0-12-643730-0).

Las combinaciones de sustituyentes y variables previstas por la presente invención solo son las que generan la formación de compuestos estables. El término "estable", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos que poseen estabilidad suficiente para permitir la fabricación y que mantienen la integridad del compuesto durante un período suficiente de tiempo para que sea útil para los fines detallados en el presente documento (por ejemplo, la administración terapéutica a un sujeto para el tratamiento de un trastorno o una enfermedad relacionados con FLT3 [incluyendo los definidos en el presente documento], por ejemplo, neoplasias hematológicas tales como leucemia mieloide aguda (LMA); leucemia de linaje mixto (LLM); leucemia linfocítica aguda de tipo linfocitos T (LLA-T); leucemia linfocítica aguda de tipo linfocitos B (LLA-B) y leucemia mielomonocítica crónica (LMMC)).

La enumeración de una lista de grupos químicos en cualquier definición de una variable del presente documento incluye las definiciones de esa variable como cualquier grupo solo o una combinación de grupos de la lista. La enumeración de una realización para una variable del presente documento incluye esa realización como cualquier realización sola o en combinación con cualquier otra realización o parte de la misma.

A continuación, se ilustrará la invención adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes. Los ejemplos específicos que se presentan a continuación se deben interpretar como meramente ilustrativos y no limitantes del resto de la divulgación en modo alguno. Sin mayor elaboración, se cree que un experto en la materia puede, basándose en la descripción del presente documento, utilizar la presente invención en toda su extensión definida por el alcance de las reivindicaciones.

Las estructuras descritas en el presente documento pueden contener ciertos grupos -NH-, -NH₂ (amino) y -OH (hidroxilo) en los que no aparezca/n explícitamente el/los átomo/s de hidrógeno correspondiente/s; sin embargo, se han de leer como -NH-, -NH₂ o -OH, según el caso.

Métodos

La resonancia magnética nuclear de ¹H (RMN) y la RMN de ¹³C se registraron en un espectrómetro Bruker Avance DPX 400 a 400,1 MHz y 100,6 MHz, respectivamente. Todos los espectros se registraron usando disolvente o tetrametilsilano (TMS) residual como patrón interno. Los espectros de masas de ionización por electronebulización de baja resolución (LRESIMS) se obtuvieron usando un espectrómetro de masas Agilent MSD o un espectrómetro de masas Waters ZQ. Los espectros de masas de ionización por electronebulización de alta resolución (HRESIMS) se obtuvieron en un Agilent LC/MSD TOF conectado a un sistema LC Agilent 1100, Fuente iónica: ESI, polaridad iónica: positiva, datos: modo de perfil, intervalo de barrido: 100-1.100 Da, parámetros de MS: Fragmentor 215 V, Skimmer 560 V och OCT RF (varillas octpole) 250 V; Masas de referencia 121,050873 y 922,009798 (Mezcla de referencia Agilent); LC: A: acetato de amonio 15 mM; B: MeCN 100; flujo: 400 µl/min isocrático. La cromatografía ultrarrápida se realizó sobre gel de sílice Merck 60 (malla 230-400). Las irradiaciones de microondas se llevaron a cabo usando el creador u optimizador Smith (Personal Chemistry) usando 0,5-2 ml o 2-5 ml de viales para el Proceso de Smith dotados de tapas de aluminio y septos. Los compuestos se nombraron automáticamente usando ACD/NAME 6.0 (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Canadá).

Los datos analíticos de LCMS se obtuvieron con:

Sistema A: espectrómetro de masas Agilent MSD; sistema Agilent 1100; columna ACE 3 C8 (50 x 3,0 mm); se usaron TFA al 0,1 % que contenía agua y acetonitrilo como fases móviles a un caudal de 1 ml/min con tiempos de gradiente de 3,0 min (gradiente de acetonitrilo al 10-97 %); o

Sistema B: espectrómetro de masas Agilent MSD; sistema Agilent 1100; Columna YMC ODS-AQ (33 x 3,0 mm); se usaron TFA al 0,1 % que contenía agua y acetonitrilo como fases móviles a un caudal de 1 ml/min con tiempos de gradiente de 3,0 min (gradiente de acetonitrilo al 10-97 %); o

Sistema C: espectrómetro de masas Waters ZQ; detector PAD Waters 996 (DAD 215-395 nm); columna ACE C8 (3 µm) (30 x 3,0 mm) (desde ACT); se usaron acetato de amonio 10 mM que contenía agua (pH = 7) y acetonitrilo como fases móviles a un caudal de 1 ml/min con tiempos de gradiente de 3,2 min (gradiente de acetonitrilo al 5-100 %).

La HPLC preparativa se realizó en sistema Gilson dotado de

Sistema D: columna ACE C8 3 µm (21,2 x 50 mm). Se usaron TFA al 0,1 % que contenía agua y acetonitrilo como fases móviles a un caudal de 25 ml/min con tiempos de gradiente de 6 min; o

Sistema E: columna XTerra Prep MS C18 5 µm (19 x 50 mm). Se usaron NH₄HCO₃ 50 mM que contenía agua (pH = 10) y acetonitrilo como fases móviles a un caudal de 25 ml/min con tiempos de gradiente de 6 min; o columna XTerra MS C18 5 µm (30 x 100 mm). Se usaron NH₄HCO₃ 50 mM que contenía agua (pH = 10) y acetonitrilo como fases móviles a un caudal de 40 ml/min con tiempos de gradiente de 8,5 min; o

Sistema F: columna YMC ODS-AQ 10 µm (30 x 150 mm). Se usaron TFA al 0,1 % que contenía agua y acetonitrilo como fases móviles a un caudal de 45 ml/min con tiempos de gradiente de 8,5 min.

Se han usado las siguientes abreviaturas:

DMSO significa dimetilsulfóxido;

HPLC significa cromatografía líquida de alto rendimiento;

TFA significa ácido trifluoroacético;

HRMS significa espectrometría de masas de alta resolución

Ejemplos

Procedimiento A:

Procedimiento general para S_NAr en 2-amino-3,5-dibromo-pirazina

Se disolvieron 2-amino-3,5-dibromo-pirazina, trietilamina (3 equivalentes) y la amina o el alcohol apropiado (3 equiv) en 4 ml de agua y se calentó la mezcla resultante hasta 195 °C durante 1 hora. Se añadieron agua y acetato de etilo

y se separaron las fases. Se extrajo la fase acuosa una vez más con acetato de etilo. Se lavaron las fases orgánicas combinadas (agua y salmuera) y se concentraron, proporcionando una mezcla en bruto de producto y amina o alcohol sin reaccionar. Esta mezcla en bruto se usó sin purificación ni caracterización adicional en la reacción de Suzuki posterior.

5

Procedimiento B:

Procedimiento general para el acoplamiento de Suzuki

10 Se calentó una mezcla del bromuro de pirazinilo del procedimiento A (1 equiv), el ácido borónico apropiado (1 equiv), K_2CO_3 (3 equiv) y $Pd(dppf)Cl_2 \cdot CH_2Cl_2$ (0,1 equiv) en 4 ml de dioxano/agua (4:1) hasta 150 °C durante 15 min. Se filtró la mezcla a través de un lecho corto de sílice y se concentró. El producto bruto se purificó por HPLC preparativa (columna ACE C8; fase móvil: TFA al 0,1 %- CH_3CN), dando el compuesto del título como un sólido blanco en forma de su sal de trifluoroacetato correspondiente.

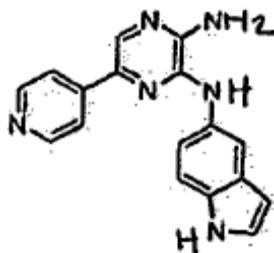
15

Producto intermedio 1

5-Bromo-N3-1H-indol-5-il-pirazin-2,3-diamina

20 Usando el procedimiento A: 2-amino-3,5-dibromo-pirazina (100 mg) y 5-aminoindol (200 mg) produjeron 150 mg de una mezcla 1:1 de 5-aminoindol y el producto deseado MS m/z 303 $[M + H]^+$, que se usó sin mayor purificación ni caracterización.

EJEMPLO 1

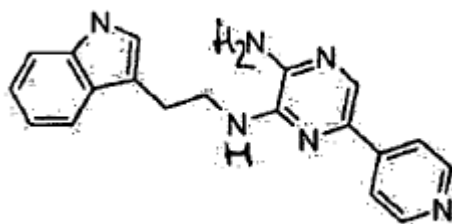


25

Trifluoroacetato de N3-1H-indol-5-il-5-piridin-4-ilpirazin-2,3-diamina

30 Usando el procedimiento B: 5-bromo-N3-1H-indol-5-il-pirazin-2,3-diamina (20 mg) y ácido 4-piridil-borónico (12 mg) produjeron 1,7 mg del compuesto del título. MS m/z 303 $[M + H]^+$. RMN de 1H (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 6,48 (d, $J = 3,01$ Hz, 1H), 7,26-7,33 (m, 1H), 7,33-7,50 (m, 2H), 7,92 (d, $J = 1,25$ Hz, 1H), 8,37 (s, 1H), 8,45 (d, $J = 7,03$ Hz, 2H), 8,64 (d, $J = 7,03$ Hz, 2H).

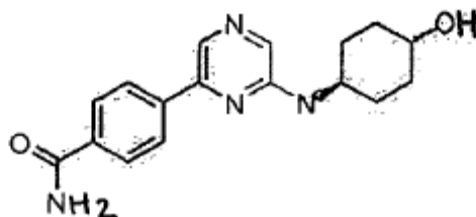
EJEMPLO 15



Trifluoroacetato de N3-[2-(1H-Indol-3-il)etil]-5-piridin-4-ilpirazin-2,3-diamina

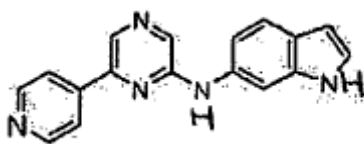
40 Usando el procedimiento B: 5-bromo-N3-[2-(1H-indol-3-il)etil]pirazin-2,3-diamina (25 mg) y ácido 4-piridinil-borónico (14 mg) produjeron 2,4 mg del compuesto del título. HRMS calculada para $C_{19}H_{18}N_6$: 330,1593; encontrada: 330,1602. RMN de 1H (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 3,20 (t, $J = 7$ Hz, 2H), 3,95 (t, $J = 7$ Hz, 2H), 6,92-7,19 (m, 3H), 7,32 (d, $J = 8$ Hz, 1H), 7,58 (d, $J = 8$ Hz, 1H), 8,18 (s, 1H), 8,41 (d, $J = 6$ Hz, 2H), 8,62 (d, $J = 6$ Hz, 2H).

EJEMPLO DE REFERENCIA 20

**Trifluoroacetato de 4-{6-[(*trans*-4-hidroxiciclohexil)amino]pirazin-2-il}benzamida**

- 5 Se disolvieron 2,6-dicloropirazina (500 mg), *trans*-4-amino-ciclohexanol (380 mg) y trietilamina (500 mg) en 4 ml de acetonitrilo/1 ml de agua, y se calentó la mezcla de reacción hasta 150 °C durante 15 min. Se añadieron agua y diclorometano a la mezcla y se separaron las fases. Se extrajo la fase acuosa una vez más con diclorometano. Se lavaron las fases orgánicas combinadas (agua y salmuera) y se evaporaron, produciendo 750 mg del producto intermedio 6-cloro-*N*-(*trans*-4-hidroxiciclohexil)pirazin-2-amina con una pureza del 85 %. Se disolvieron una porción
- 10 de este material (30 mg), carbonato de potasio (55 mg), ácido 4-benzamida-borónico (26 mg) y Pd(tetraquis(trifenilfosfina)) (5 mg) en 4 ml de dioxano y 1 ml de H₂O, y se calentó la mezcla de reacción hasta 100 °C durante una noche. Se añadieron NaOH (ac) 1 M y diclorometano a la mezcla y se separaron las fases. Se extrajo la fase acuosa con diclorometano. Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera y se concentraron. El producto bruto se purificó mediante HPLC preparativa (columna ACE C8; fase móvil: TFA al 0,1 %-CH₃CN), dando el compuesto del título (5,0 mg) como un sólido de color blanco en forma de su sal de trifluoroacetato correspondiente. HRMS calculada para C₁₇H₂₀N₄O₂: 312,1586; encontrada: 312,1585.

EJEMPLO DE REFERENCIA 24

**20 N-(6-piridin-4-ilpirazin-2-il)-1H-indol-6-amina**

- Se calentó una mezcla de 2,6-dicloropirazina (0,150 g, 1,006 mmol), 6-aminoindol (0,200 g, 1,51 mmol), BINAP (0,0137 g, 0,02215 mmol), butóxido terciario de sodio (0,136 g, 1,409 mmol) y acetato de paladio (0,005 g, 0,02215 mmol) en tolueno (8 ml) hasta 85 °C durante 16 h bajo nitrógeno. Se añadió CH₂Cl₂, se filtró la mezcla de reacción a
- 25 través de Celite y se evaporó el disolvente. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (metanol al 5 % en CH₂Cl₂ como eluyente), dando 0,070 g (33 %) del producto intermedio (6-cloropirazin-2-il)-(1H-indol-6-il)-amina. RMN de ¹H (CDCl₃) δ 8,36 (sa, 1H, NH), 8,08 (s, 1H), 7,92 (s, 1H), 7,64-7,59 (m, 2H), 7,23 (s, 1H), 7,01-6,98 (d, J = 8,37 Hz, 1H), 6,87 (s, 1H, NH), 6,56 (s, 1H); MS (API-ES/Positivo); m/z: 245 (M+H)⁺.
- 30 Se calentó a reflujo durante 20 h una mezcla de (6-cloro-pirazin-2-il)-(1H-indol-6-il)-amina (0,070 g, 0,2868 mmol), ácido piridin-4-borónico (0,042 g, 0,344 mmol), carbonato de sodio (0,150 g, 1,43 mmol) y tetraquis(trifenilfosfin)paladio (0) (0,0165 g, 0,0143 mmol) in DME:agua (3:2, 5 ml). Se concentró la mezcla de reacción a una presión reducida y se extrajo el residuo obtenido con diclorometano. Se lavó la capa orgánica con agua y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. El producto en bruto se purificó mediante
- 35 cromatografía ultrarrápida (metanol al 5 % en CH₂Cl₂ como eluyente), proporcionando *N*-(6-piridin-4-ilpirazin-2-il)-1H-indol-6-amina (0,030 g, 36,5 %) en forma de un sólido de color amarillo. RMN de ¹H (CD₃OD) δ 8,73-8,72 (d, J = 5,68 Hz, 2H), 8,51 (s, 1H), 8,23-8,20 (m, 4H), 7,56-7,54 (d, J = 8,46 Hz, 1H), 7,22 (d, J = 2,99 Hz, 1H), 7,14 (dd, J = 10,18; 1,74 Hz, 1H), 6,45 (d, J = 2,75 Hz, 1H); MS (API-ES/Positiva); m/z: 288 (M+H)⁺.

40 Métodos biológicos

- La capacidad del compuesto de la invención para inhibir FLT3 se puede determinar usando ensayos *in vitro* e *in vivo* conocidos en la técnica. Se han descrito varios ensayos de quinasas *in vitro* para la inhibición de FLT3 en la bibliografía usando el dominio quinasa clonado y midiendo la fosforilación de un sustrato peptídico. Además, se han
- 45 usado líneas celulares que expresan FLT3 para medir el efecto sobre la viabilidad y la proliferación en un ensayo celular.

Ensayo de inhibición enzimática

- 50 Se evaluó la capacidad para inhibir FLT3 de los compuestos de acuerdo con la invención mediante el siguiente método:

Ensayo de quinasa FLT3 *in vitro*

5 Se estableció un ensayo de inhibición enzimática para el dominio tirosina quinasa de FLT3 usando una técnica de polarización de la fluorescencia, la polarización de la fluorescencia basada en la afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAP) de Molecular Devices.

10 En resumen, se mide la actividad quinasa mediante la incubación de un sustrato peptídico fluorescente con el dominio quinasa. Una vez finalizada la reacción de la quinasa, se añade un tampón de unión. Tras la fosforilación del sustrato, el péptido fluorescente adquiere la capacidad de unirse a una nanopartícula recubierta de metal. Cuando el sustrato se une a la nanopartícula, se reduce la velocidad de rotación del péptido y, por lo tanto, la polarización de la fluorescencia (PF) se eleva. Los compuestos que inhiben la actividad quinasa de la enzima darán lugar a un bajo grado de sustrato fosforilado y una señal de PF baja.

15 Reactivos

Kit de tampón para IMAP con sistema de unión progresiva (Molecular Devices, N° R8124): Tampón de reacción: Tris-HCl 10 mM, pH 7,2 con MgCl₂ 10 mM, NaN₃ al 0,05 % y Tween 20 al 0,01%. Antes de usarlo, se añadió DTT hasta una concentración final de DTT de 1 mM (tampón de reacción completo).

20 La solución de unión se preparó a partir del kit de tampón de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes. El reactivo de unión se diluyó 1:1.500 en tampón de unión A al 40 % y tampón de unión B al 60 %.

25 La enzima FLT3 usada fue FLT3 humana recombinante de Upstate (N° 14-500), 7,2 U/ml, marcada con GST N-terminal, aminoácidos 564-final.

Sustrato peptídico usado: FAM-CSKtide de Molecular Devices (N° R7269) 20 μM, 5FAM-KKKKKEEYFFFG-NH₂. Solución madre de ATP 10 Mm. Solución madre de DTT 100 mM.

30 Diluciones del compuesto: Tween 20 al 0,01 % + DMSO al 1 % en tampón de reacción. Los reactivos se diluyeron en tampón de reacción completo hasta obtenerse las soluciones de trabajo.

Condiciones del ensayo

35 Concentraciones finales:

FLT3: 0,0125 U/ml (dependiente del lote)
FAM-CSKtide: 100 nM
ATP: 100 μM.

40 Respuesta a la dosis de compuesto: dilución 1:3 de once etapas, intervalo de concentraciones 25.000 a 0,42 nM, 5.000 a 0,085 nM, respectivamente, 500 a 0,0085 nM dependiendo de la potencia del compuesto.

Protocolo

45 I. Establecimiento de la reacción de la quinasa en un volumen de 20 μl durante 1 h:

Pipetear en una placa negra de ½ de superficie de 96 pocillos:

50 5 μl de dilución de compuesto o vehículo
5 μl de sustrato peptídico (400 nM)
5 μl de enzima (0,05 U/ml) o tampón de reacción completo para el fondo inespecífico (NSB)
5 μl de ATP (400 μM).
Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente con agitación suave.

55 II. Incubación de unión durante 2 h (tiempo mínimo):

Añadir 60 μl de solución de unión.
Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente con agitación suave.

60 III. Análisis de polarización de la fluorescencia:

Medir la fluorescencia usando un lector de placas (Analyst AD), longitud de onda de excitación de 485 y longitud de onda de emisión de 530, lectura con tiempo de integración de 0,1 s. (Como alternativa, Victor² V Wallac 485/535 nm).

65

- Se prepararon concentraciones de reserva de los compuestos de ensayo a 10 mM en DMSO al 100 %. En el ensayo, los compuestos se ensayaron en un solo punto a 10 y 1 micromolar, diluidos en tampón de reacción como se ha descrito anteriormente. Los compuestos con una actividad inhibidora superior al 60 % de inhibición a 1 micromolar se ensayaron posteriormente en respuestas a la dosis para la determinación de las CI_{50} , usando un intervalo de dilución de once puntos con etapas de dilución 1:3 (por lo general, de 25.000 nM a 0,42 nM, y los compuestos más potentes se sometieron a ensayo de 500 nM a 0,0085 nM). Los valores de CI_{50} se obtuvieron mediante la ecuación $(A + ((B-A)/1 + ((C/x)^D)))$, donde A equivale a mín., B equivale a máx., C equivale a CI_{50} y D equivale a la pendiente de la curva.
- 10 Los compuestos de acuerdo con la invención pueden mostrar valores de CI_{50} de entre 1 nM y 2 μ M (por ejemplo, entre 1 nM y 1 μ M, entre 1 nM y 500 nM, entre 1 nM y 100 nM, entre 1 nM y 25 nM, entre 1 nM y 10 nM).

Ensayos celulares

- 15 La línea celular MV4-11 de LMA porta la duplicación en tándem interna de FLT3. Esta línea celular se ha usado ampliamente para evaluar el efecto de los inhibidores de la quinasa FLT3 sobre la viabilidad y la proliferación.
- En resumen, se siembran las células a una densidad baja en placas de 96 pocillos. Se añade la dilución en serie de los compuestos y se incuban las células durante 72 horas. Una vez finalizado el tratamiento, se mide el número total de células viables usando citometría de flujo, y se calcula el efecto de los compuestos como el % de inhibición en comparación con las células tratadas con vehículo.
- 20

Células y condiciones de cultivo

- 25 Todas las células se cultivaron en condiciones convencionales de cultivo celular, a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % y 90 % de humedad.
- La línea celular MV4-11 de LMA se cultivó en DMEM de alto contenido en glucosa con Glutamax (4.500 g/l de glucosa) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS) de Invitrogen. Las células se subcultivaron dos veces débilmente, y crecieron hasta una densidad de aproximadamente 2 millones de células por ml antes del subcultivo.
- 30

Ensayo de viabilidad y proliferación

- 35 Para la determinación de la viabilidad, se sembraron 3.000-5.000 células en 50 microlitros de medio de cultivo en una placa de 96 pocillos. Se prepararon diluciones en serie 1:3 de los compuestos a partir de la solución madre de DMSO 1 mM en medio de cultivo exento de suero suplementado con penicilina y estreptomycin. Se añadieron 50 microlitros de las diluciones en serie a la suspensión celular. La concentración final de los compuestos fue de 5 micromolar a 0,8 nM, o de 500 nM a 0,08 nM, respectivamente. La concentración de DMSO se mantuvo constante al 0,05 %.
- 40 Una vez finalizado el tratamiento, se añadieron 100 microlitros de reactivo de viabilidad (ViaCount de Guava) a cada pocillo, y se determinaron el número de células y la viabilidad usando citometría de flujo (ensayo ViaCount de 96 pocillos de Guava). Por lo general, las células de la línea celular tratada con vehículo (DMSO al 0,05 %) se duplicaron tres veces durante el experimento. Al final del experimento, se calculó el % de supervivencia en comparación con las células tratadas con vehículo. Los valores de CE_{50} se determinaron usando la ecuación $(A + ((B-A)/1 + ((C/x)^D)))$, donde A equivale a mín., B equivale a máx., C equivale a CE_{50} y D equivale a la pendiente de la curva.
- 45

Resultados

50

Tabla 1: Valores típicos de CI_{50} media (n = 4-8) determinados en el ensayo de quinasa FLT3

| Ejemplo | CI_{50} (nM) |
|---------|----------------|
| 15 | 60 |
| 20 | 159 |
| 24 | 560 |

55

Tabla 2: Valores de CE_{50} determinados en la línea de células de LMA

| Ejemplo | Datos de células MV4-11 (nM) |
|---------|------------------------------|
| 15 | 184 |
| 20 | 178 |
| 24 | 373 |

Ensayo in vitro para las combinaciones de inhibidor de FLT3 y quimioterapia

- 5 El ensayo de las actividades sinérgicas dependientes de la secuencia de los compuestos de fórmula (I) y los agentes quimioterapéuticos convencionales usados en el tratamiento de la LMA se lleva a cabo según lo descrito en Brown *et al.* (2006) "Leukemia" 20: 1368-1376, y los resultados se analizan mediante el programa informático Calcsyn de acuerdo con los principios de Chou y Talalay (1981) *Eur. J. Biochem.*

10

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que es:
 - 5 *N*3-1*H*-indol-5-il-5-piridin-4-ilpirazin-2,3-diamina o una sal farmacológicamente aceptable de la misma.
2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en terapia.
3. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el tratamiento de neoplasias hematológicas; trastornos mieloproliferativos; cáncer; trastornos autoinmunes; o trastornos cutáneos.
 - 10
4. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 2 en la profilaxis de neoplasias hematológicas; trastornos mieloproliferativos; cáncer; trastornos autoinmunes; o trastornos cutáneos.
5. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el tratamiento de neoplasias hematológicas.
 - 15
6. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la profilaxis de neoplasias hematológicas.
7. Un compuesto para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 5 o 6, en el que el trastorno hematológico es seleccionado de entre leucemia mieloide aguda (LMA); leucemia de linaje mixto (LLM); leucemia linfocítica aguda de tipo linfocitos T (LLA-T); leucemia linfocítica aguda de tipo linfocitos B (LLA-B); o leucemia mielomonocítica crónica (LMMC).
 - 20
8. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la neoplasia hematológica es leucemia mieloide aguda (LMA).
 - 25
9. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el tratamiento de un trastorno cutáneo.
10. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el trastorno cutáneo es psoriasis o dermatitis atópica.
 - 30
11. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en combinación con otro agente dirigido molecularmente.
12. Una preparación que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 y otro agente dirigido molecularmente para su uso en el tratamiento de neoplasias hematológicas, en donde el compuesto como se ha definido en la reivindicación 1 es administrado simultánea o secuencialmente con dicho agente dirigido molecularmente.
 - 35
13. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11 o una preparación de acuerdo con la reivindicación 12, en la que el otro agente dirigido molecularmente es un agente citotóxico convencional, o un compuesto usado tras la quimioterapia, en la terapia de mantenimiento dirigida a células madre y en la leucemia linfoblástica aguda infantil con reordenamiento del gen MLL.
 - 40
14. Una preparación de acuerdo con la reivindicación 12, en la que la neoplasia hematológica es leucemia mieloide aguda (LMA).
 - 45