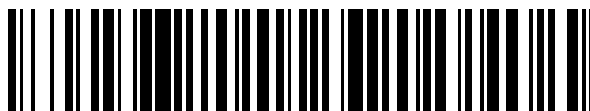


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 302**

51 Int. Cl.:

C07D 403/12 (2006.01)
C07D 401/14 (2006.01)
C07D 213/74 (2006.01)
C07D 401/12 (2006.01)
C07D 239/42 (2006.01)
C07D 241/20 (2006.01)
C07D 253/07 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2004 E 10010746 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014 EP 2277865**

54 Título: **Heterociclos con 6 anillos de nitrógeno fenilsustituídos como inhibidores de la polimerización de microtúbulos**

30 Prioridad:

03.12.2003 AU 2003906680

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

06.02.2015

73 Titular/es:

**YM BIOSCIENCES AUSTRALIA PTY LTD (100.0%)
2nd Floor 499 St Kilda Road
Melbourne, VIC 3004, AU**

72 Inventor/es:

**BURNS, CHRISTOPHER, JOHN;
WILKS, ANDREW, FREDERICK;
HARTE, MICHAEL, FRANCIS;
SIKANYIKA, HARRISON;
FANTINO, EMMANUELLE y
SIMS, COLETTE, GLORIA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 528 302 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

Heterociclos con 6 anillos de nitrógeno fenilsustituídos como inhibidores de la polimerización de microtúbulos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a compuestos para su uso en métodos de supresión del crecimiento de cánceres y otras enfermedades proliferativas mediante la administración de dichos compuestos que actúan mediante la unión a tubulina y a compuestos heterocíclicos novedosos adecuados para dicha administración.

10

Antecedente de la invención

Existen muchas enfermedades humanas y veterinarias que surgen de procesos celulares descontrolados o anómalos. La más importante entre estas enfermedades es el cáncer, el nombre genérico proporcionado a un amplio conjunto de neoplasias celulares caracterizadas por un crecimiento sin regular y una ausencia de diferenciación. La psoriasis es otra enfermedad que está caracterizada por una proliferación celular descontrolada o anómala. La psoriasis es una enfermedad cutánea común crónica caracterizada por la presencia de costras y placas psoriáticas. La enfermedad es el resultado de la hiperproliferación de la epidermis y de la diferenciación incompleta de queratinocitos. La psoriasis implica a menudo el cuero cabelludo, codos, rodillas, espalda, nalgas, uñas, cejas, y regiones genitales, y pueden variar en gravedad desde leve a extremadamente debilitante, dando como resultado la artritis psoriática, psoriasis pustular, y dermatitis psoriática exfoliativa. En la actualidad no existe cura terapéutica general para la psoriasis. Aunque los casos más leves se tratan a menudo con corticoesteroides tópicos, la mayor parte de los casos graves se pueden tratar con agentes antiproliferativos, tales como el antimetabolito metotrexato, el inhibidor de la síntesis del ADN hidroxiurea, y el disruptor de los microtúbulos colchicina.

25

Otras enfermedades asociadas con un nivel anómalamente elevado de proliferación celular incluyen la restenosis, en la que están implicada las células vasculares del músculo liso; patologías inflamatorias, en las que están implicadas células endoteliales, células inflamatorias y células glomerulares; infarto de miocardio, en el que están implicadas las células vasculares del músculo cardíaco; nefritis glomerular, en el que están implicadas células renales; rechazo de trasplante, en el que están implicadas células endoteliales; y enfermedades infecciosas tales como infección por VIH y malaria, en las que están implicadas determinadas células inmunes y/u otras células infectadas.

30

La inhibición de la proliferación celular lograr mediante varios mecanismos, incluyendo; agentes alquilantes; inhibidores de la topoisomerasa; análogos de nucleótidos; antibióticos; antagonistas de hormonas; y agentes que ocasionan daños en el ácido nucleico; *entre otros*. Un mecanismo farmacológicamente importante para inhibir la proliferación celular es mediante la unión a la tubulina. La tubulina es un dímero asimétrico compuesto de subunidades alfa y beta, que polimeriza para formar los componentes estructurales del citoesqueleto denominados microtúbulos. Los microtúbulos deben ser muy dinámicos a fin de llevar a cabo muchas funciones. En determinados estadios del ciclo celular, o en tipos u orgánulos celulares concretos, se requieren microtúbulos estables, tal como para el transporte en el interior de los axones o para movimientos ciliares y flagelares. Los microtúbulos se ensamblan durante la fase G2 del ciclo celular, y participan en la formación del huso mitótico que facilita la segregación de cromátidas hermanas durante el proceso de división celular. El papel esencial de los microtúbulos en la división celular y la capacidad de los fármacos que interactúan con la tubulina para interferir el ciclo celular han hecho de la tubulina una diana satisfactoria para las aplicaciones que incluyen fármacos anticancerosos, fungicidas, y herbicidas. Los ligandos usuales de la tubulina tales como colchicina, paclitaxel, el alcaloide de la *Vinca* como vinblastina, los epotilonos, las halicondrinas, benomil y mebendazol inhiben directamente la división celular uniéndose a la tubulina, lo que conduce a la detención del ciclo celular en el límite G2/M de la mitosis. Este mecanismo es la base del valor terapéutico de los compuestos de este tipo, tal como el tratamiento de la gota con colchicina, restenosis con paclitaxel, cáncer con paclitaxel, vinblastina, epotilonos y halicondrinas, las infecciones fúngicas con benomilo y la malaria y helmintos con mebendazol.

50

La actuación sobre la dinámica o la estabilidad de los microtúbulos pueden inhibir la división celular de diversas maneras. Tanto la estabilización de los microtúbulos como la inhibición de su polimerización evitará la reestructuración del citoesqueleto que se requiere en diversos momentos del ciclo celular y conduce a una detención de la progresión de la célula desde un estadio en el ciclo celular al siguiente. Se han identificado tres tipos principales de fármacos de unión a tubulina, concretamente análogos de colchicina, alcaloides de la *Vinca*, y los taxanos, cada uno de los cuales tiene un sitio de unión específico en la molécula β -tubulina. Paclitaxel (Taxol™) y los taxanos relacionados representan un tipo de fármacos que estabilizan microtúbulos, un proceso que conduce de forma última a la "congelación" de las estructuras de tal manera que no se pueden reestructurar (Jordan M A. y Wilson L., 1998). La posterior detención en la mitosis induce el mecanismo apoptótico que produce la muerte celular. Numerosos análogos de colchicina, así como algunos otros compuestos que se unen al mismo sitio de la β -tubulina que la colchicina perturban la polimerización de la tubulina y perturban la formación de microtúbulos. Vinblastina y algunos otros fármacos relacionados con la vinca se unen en un sitio que es distinto del sitio de la colchicina. Los compuestos que se unen en el sitio de la Vinca evitan la formación de microtúbulos y desestabilizan los microtúbulos (Jordan et al, 1986; Rai y Wolff (1996). La presente invención se dirige por tanto a compuestos que potencialmente modulan la dinámica mediante su unión a la tubulina.

60

65

Se conocen compuestos similares a los descritos en el presente documento en la técnica anterior:

Los siguientes documentos se refieren a:

- 5 Vishwakarma, J.N.; Apparao, S.; Ila, H.; Junjappa, H.; IJSBDB; Indian Journal of Chemistry, Sección B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry; English; 24; 1985; 466-471;
Wendelin, Winfried; Schermanz, Karl; JHTCAD; Journal of Heterocyclic Chemistry; English; 21; 1; 1984; 65 - 69;
Sedova, V. F.; Mustafina, T. Yu; Mamaev, V. P.; CHCCL; Chemistry of Heterocyclic Compounds (Nueva York, NY, Estados Unidos); English; 17; 11; 1981; 1105-1112;
- 10 Krasnovskaya et al.; JGCHA4; J. Gen. Chem. USSR (Engl. Transl.); 42; 1972; 2276,2279;
Ding, Sheng; Gray, Nathanael S.; Wu, Xu; Ding, Qiang; Schultz, Peter G.; JACSAT; Journal of the American Chemical Society; English; 124; 8; 2002; 1594-1596.

15 El documento WO 2004/052868 (fecha de publicación internacional 24 de junio de 2004) describe una serie de compuestos que son útiles para tratar patologías o trastornos relacionados con la hiperproliferación. El documento WO 03/099796 (publicado el 4 de diciembre de 2003) describe una serie de compuestos y su uso en el tratamiento de patologías asociadas a las proteínas quinasas. El documento WO 03/031406 describe métodos para la síntesis de diversos heteroarilos sustituidos. El documento WO 03/026661 describe derivados de pirimidina considerados muy eficaces para promover la secreción de insulina, aumentar el contenido de insulina, y evitar la disminución de los niveles de azúcar en sangre. El documento WO 02/060492 describe métodos para inhibir JAK usando un grupo de compuestos basados tanto en una estructura principal de 2-amino-6-carbapirazina disustituida o una estructura principal de 2-amino-6-carbapiridina disustituida.

25 Por consiguiente, la presente invención reivindica proporcionar compuestos que son directa o indirectamente tóxicos que dividen activamente las células y que son útiles en el tratamiento del cáncer, infecciones víricas y bacterianas, restenosis vascular, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, o psoriasis. La presente invención se dirige también a composiciones terapéuticas para tratar dichas dolencias. Los compuestos y composiciones son también útiles en métodos para destruir activamente células proliferativas, tales como células cancerosas, bacterianas, o epiteliales, y tratar todos los tipos de cánceres, infecciones, y dolencias generalmente inflamatorias y proliferativas. Los compuestos y composiciones son también útiles en los métodos para tratar otras dolencias médicas caracterizadas por la presencia de células que proliferan rápidamente, tales como la psoriasis y otros trastornos de la piel.

35 En una realización, los compuestos o composiciones se usan en el tratamiento de sarcomas, carcinomas y/o leucemias. Los trastornos ilustrativos para los cuales los compuestos o composiciones sujeto se pueden usar solos o como parte de un régimen de tratamiento incluyen: fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomas, rhabdomiomas, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma espinocelular, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello de útero, tumores testiculares, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, y retinoblastoma.

50 En determinadas realizaciones, los compuestos o composiciones se van a usar para tratar trastornos tales como carcinomas que se forman a partir del tejido de la mama, próstata, riñón, vejiga o colon.

Los compuestos o composiciones son también útiles para tratar trastornos hiperplásicos o neoplásicos que surgen en el tejido adiposo, tales como tumores en células adiposas, por ejemplo, lipomas, fibrolipomas, lipoblastomas, lipomatosis, hibemomas, hemangiomas y/o liposarcomas.

55 Los agentes infecciosos y parasíticos (por ejemplo, bacterias, tripanosomas, hongos, etc.) también pueden controlarse usando las composiciones y los compuestos sujeto.

Sumario de la invención

60 Los presentes inventores han encontrado que un grupo de compuestos basados en una estructura principal heterocíclica sustituida inhiben el crecimiento y la proliferación de cánceres celulares. Los presentes inventores han mostrado además que estos compuestos pueden unirse a la tubulina. Dichos compuestos serían también útiles en el tratamiento de otros trastornos relacionados con la hiperproliferación.

65 La presente invención proporciona un compuesto seleccionado entre los compuestos de la Tabla 1 o una de sus sales, hidratos, solvatos, formas cristalinas o diastereómeros farmacéuticamente aceptables.

La presente invención proporciona también una composición que comprende un portador y al menos un compuesto como se ha definido anteriormente.

5 La presente invención proporciona también los anteriores compuestos y composiciones para su uso en un método para tratar un trastorno relacionado con la hiperproliferación en un sujeto, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto o composición como se ha definido anteriormente.

10 Los compuestos de la presente invención incluyen todos los isómeros conformacionales (por ejemplo, isómeros cis y trans). Los compuestos de la presente invención tienen centros asimétricos y existen por tanto en diferentes formas enantioméricas y diastereoméricas. La presente invención se refiere a compuestos para su uso, donde el uso incluye todos los isómeros y estereoisómeros de los compuestos de la presente invención, y sus mezclas, y todas las composiciones farmacéuticas e incluye el uso en los métodos de tratamiento. Los compuestos pueden existir también como tautómeros. La presente invención se refiere al uso de los mencionados tautómeros y sus mezclas.

15 Los compuestos de la invención que tienen grupos amino, amido, hidroxilo o carboxílicos libres se pueden convertir en profármacos. Los profármacos incluyen compuestos donde un resto aminoácido, o una cadena polipeptídica de dos o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) restos de aminoácidos que se unen covalentemente mediante enlaces peptídicos a grupos amino, hidroxilo y de ácido carboxílico libres de los compuestos de la invención. Los restos aminoácidos incluyen los 20 aminoácidos que se producen naturalmente comúnmente designados por tres símbolos tipográficos y también incluyen, 4-hidroxiprolina, hidroxilisina, demosina, isodemosina, 3-metil histidina, norvalina, beta-alanina, ácido gamma-aminobutírico, citrulina, homocisteína, homoserina, ornitina y metionina sulfona. Los profármacos incluyen también compuestos en los que carbonatos, carbamatos, amidas y alquil ésteres se unen covalentemente a los anteriores sustituyentes a través de la cadena secundaria del profármaco del carbono carbonilo. Los profármacos incluyen también derivados de fosfato de los compuestos de la invención (tales como ácidos, sales de ácidos, o ésteres) unidos a través de un enlace fósforo-oxígeno unido a un hidroxilo libre de los compuestos de la invención. Los profármacos incluyen también compuestos donde los restos aciloxialquilo o fosfonoxialquilo se unen covalentemente a los compuestos de la invención que poseen un grupo hidroxilo libre. Los restos aciloxialquilo o fosfonoxialquilo pueden unirse covalentemente a los compuestos de la invención que poseen un anillo de piridilo mediante la formación de una sal de N-(aciloxialquil)-piridinio o N-(fosfonoxialquil)-piridinio.

30 El compuesto se puede usar como un isómero purificado o como una mezcla de cualquier relación de isómeros. Se prefiere sin embargo que la mezcla comprenda al menos un 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o 99 % del isómero preferido.

35 La presente invención proporciona un compuesto seleccionado entre los compuestos de la Tabla 1; las composiciones que comprenden un portador y uno o más compuestos de la Tabla 1; y, dichos compuestos o composiciones para su uso en un método de tratamiento de un trastorno relacionado con la hiperproliferación en un sujeto, comprendiendo el método administrar al menos uno de los compuestos de la Tabla 1.

40 Más preferentemente, el trastorno relacionado con la hiperproliferación se puede tratar mediante la modulación de la polimerización de microtúbulos.

45 Los compuestos de la Tabla 1 se pueden usar en un método de modular la polimerización de microtúbulos en un sujeto, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto seleccionado entre los compuestos de la Tabla 1.

50 La presente invención proporciona que los compuestos de la invención se puedan administrar para el tratamiento de trastornos relacionados con la hiperproliferación. Preferentemente, el trastorno relacionado con la hiperproliferación se puede tratar mediante la modulación de la polimerización de microtúbulos. En una realización preferida, el trastorno o patología relacionado con la hiperproliferación se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer, tales como fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomioma, rhabdomioma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma epinocelular, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello de útero, tumores testiculares, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, y retinoblastoma, y carcinomas que se forman a partir de tejido de la mama, próstata, riñón, vejiga o colon, y trastornos neoplásicos que surgen en el tejido adiposo, tales como tumores en células adiposas, por ejemplo, lipomas, fibrolipomas, lipoblastomas, lipomatosis, hibemomas, hemangiomas y/o liposarcomas; enfermedades infecciosas tales como infecciones víricas, infecciones de malaria y bacterianas; restenosis vascular; enfermedades inflamatorias, tales como enfermedades autoinmunes, infarto de miocardio debido a nefritis glomerular y psoriasis.

65

Los compuestos de la invención se pueden usar también en el tratamiento de un trastorno o patología relacionado con la hiperproliferación o una patología y/o un trastorno relacionado con la proteína quinasa o una patología seleccionada entre el grupo que consiste en atopia, tal como asma alérgica, dermatitis atópica (eczema), y rinitis alérgica; hipersensibilidad mediada por células, tal como dermatitis de contacto alérgica, y neumonitis por hipersensibilidad; enfermedades reumáticas, tales como lupus sistémico eritematoso (LSE), artritis reumatoide, artritis juvenil, síndrome de Sjogren, escleroderma, polimiositis, espondilitis anquilosante, artritis psoriática; otras enfermedades autoinmunes tales como diabetes de tipo I, trastornos tiroideos autoinmunes, y enfermedad de Alzheimer; enfermedades víricas, tales como el virus de Epstein Barr (VEB), hepatitis B, hepatitis C, VIH, HTLV 1, virus de la varicela-zoster (VVZ), virus del papiloma humano (VPH).

En el tratamiento o la prevención de los trastornos relacionados con la hiperproliferación y/o los trastornos relacionados con las proteínas quinasas, un nivel de dosificación adecuado será generalmente de aproximadamente 0,01 a 500 mg por kg de peso corporal del paciente por día que se puede administrar en dosis simples o múltiples.

Preferentemente, el nivel de dosificación será aproximadamente de 0,1 a aproximadamente 250 mg/kg por día; de forma más preferente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100 mg por día. Un nivel de dosificación adecuado será de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 250 mg/kg por día, aproximadamente 0,05 a 100 mg/kg por día, o aproximadamente 0,1 a 50 mg/kg por día. En este intervalo la dosificación puede ser de 0,05 a 0,5, 0,5 a 5 o 5 a 50 mg/kg por día. Para administración oral, las composiciones se proporcionan preferentemente en la forma de comprimidos que contienen 1,0 a 1000 miligramos del principio activo, particularmente 1,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 50,0, 75,0, 100,0, 150,0, 200,0, 250,0, 300,0, 400,0, 500,0, 600,0, 750,0, 800,0, 900,0, y 1000,0 miligramos del principio activo para el ajuste sintomático de la dosificación al paciente que se va a tratar. Los compuestos se pueden administrar con una pauta de 1 a 4 veces al día, preferentemente una o dos veces al día.

Deberá entenderse, sin embargo, que puede variarse el nivel de dosis específico y la frecuencia de la dosificación de cualquier paciente individual concreto y dependerá de varios factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción del compuesto, la edad, peso corporal, estado de salud general, sexo, dieta, modo y hora de administración, tasa de excreción, combinación de fármacos, la gravedad de la dolencia concreta, y el tratamiento al que se está sometiendo el hospedador.

Además de los primates, tales como seres humanos, se puede tratar otros varios mamíferos de acuerdo con el método descrito en el presente documento. Por ejemplo, se pueden tratar especies de mamíferos que incluyen pero sin limitación, vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, cobayas, ratas u otros bovinos, ovinos, equinos, cánidos, felinos, roedores o murinos. Sin embargo, el método se puede practicar también en otras especies, tales como especies de aves (por ejemplo, pollos).

Las enfermedades y dolencias asociadas con la inflamación y la infección se pueden tratar usando los compuestos y composiciones de la presente invención. En una realización preferida, la enfermedad o dolencia es una en la que las acciones de los eosinófilos y/o los linfocitos deben inhibirse o estimularse para modular la respuesta inflamatoria.

Los sujetos tratados en los anteriores métodos, en los que se desea la inhibición del crecimiento celular, son mamíferos, incluyendo, pero sin limitación, vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, cobayas, ratas u otros bovinos, ovinos, equinos, cánidos, felinos, roedores o murinos, y preferentemente un ser humano, masculino o femenino.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad de la composición del sujeto que estimulará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano que es deseada por un investigador, veterinario, doctor en medicina u otro especialista clínico.

Debe entenderse que los términos "administración de" y/o "administrar un" compuesto significan proporcionar un compuesto de la invención al individuo que necesita el tratamiento.

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden al menos uno de los compuestos de la invención que pueden tratar un trastorno relacionado con la hiperproliferación en una cantidad eficaz, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones de la presente invención pueden contener también otros agentes terapéuticos que se describen a continuación, y se pueden formular, por ejemplo, empleando vehículos o diluyentes sólidos o líquidos convencionales, así como aditivos farmacéuticos de un tipo adecuado al modo de administración deseado (por ejemplo, excipientes, aglutinantes, conservantes, estabilizantes, aromatizantes, etc.) de acuerdo con técnicas tales como las bien conocidas en el campo de la formulación farmacéutica.

Los compuestos de la invención se pueden administrar por cualquiera de los medios adecuados, por ejemplo, por vía oral, tal como en forma de comprimidos, cápsulas, gránulos o polvos; por vía sublingual; bucal; parenteral, tal como mediante inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, o intracisternal o técnicas de infusión (por ejemplo, como soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas inyectables estériles); nasalmente tal como mediante pulverización por inhalación; por vía tópica, tal como en forma de una crema o pomada; o por vía rectal tal como en forma de supositorios; en formulaciones farmacéuticas unitarias que contienen, vehículos o diluyentes no tóxicos

5 farmacéuticamente aceptables. Los compuestos pueden, por ejemplo, administrarse en una forma adecuada para la liberación inmediata o la liberación extendida. La liberación inmediata o la liberación extendida se pueden conseguir mediante el uso de composiciones farmacéuticas adecuadas que comprenden los presentes compuestos, o, particularmente en el caso de la liberación extendida, mediante el uso de dispositivos tales como implantes subcutáneos o bombas osmóticas.

10 Se pretende que el término "composición" abarque un producto que comprenda los ingredientes especificados en las cantidades especificadas, así como cualquier producto que sea el resultado, directa o indirectamente, de la combinación de los ingredientes especificados en las cantidades especificadas. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que el vehículo, diluyente o excipiente debe ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial para su destinatario.

15 Las composiciones farmacéuticas para administración de los compuestos de la presente invención pueden presentarse convenientemente en una forma farmacéutica unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de asociar el principio activo con el vehículo que constituye uno o más ingredientes auxiliares. En general, las formulaciones se preparan asociando de forma uniforme e íntima los principios activos con un portador líquido o un portador sólido finamente dividido o ambos, y después, si es necesario, conformando el producto en la formulación deseada. En la composición farmacéutica, el compuesto objeto activo se incluye en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado sobre el proceso o dolencia, de enfermedades. Como se usa en el presente documento, se pretende que el término "composición" abarque un producto que comprende los ingredientes especificados en las cantidades especificadas, así como cualquier producto que sea el resultado, directa o indirectamente, de la combinación de los ingredientes especificados en las cantidades especificadas.

25 Las composiciones farmacéuticas que contienen el principio activo pueden estar en forma adecuada para su uso oral, por ejemplo, como comprimidos, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires. Se pueden preparar composiciones previstas para uso oral de acuerdo con cualquier método conocido en la materia para la fabricación de composiciones farmacéuticas y dichas composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados entre el grupo que consiste en agentes endulzantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes conservantes a fin de proporcionar preparaciones sabrosas y farmacéuticamente elegantes. Los comprimidos contienen el principio activo en una premezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes de granulación y desintegrantes, por ejemplo, almidón de maíz, o ácido algínico; agentes aglutinantes, por ejemplo, almidón, gelatina o acacia, y agentes lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden estar sin revestir o pueden estar revestidos mediante técnicas conocidas para retrasar la desintegración y la adsorción en el tracto gastrointestinal y proporcionar por tanto una acción sostenida durante un periodo más largo. Por ejemplo, se puede emplear un material con retraso temporal tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. Puede también revestirse para formar comprimidos terapéuticos osmóticos para la liberación del control.

40 Se pueden presentar también formulaciones para uso oral como cápsulas de gelatina dura donde el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato cálcico, fosfato de calcio o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda donde el principio activo se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo, aceite de cacahuete, parafina líquida, o aceite de oliva.

45 Las suspensiones acuosas contienen los materiales activos en premezcla con los excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes son agentes suspensores, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma acacia; los agentes dispersantes o humectantes pueden ser una fosfatida que se produce naturalmente, por ejemplo, lecitina, o los productos de condensación de un óxido de alquileno con ácidos grasos, por ejemplo, estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoxicetanol, o los productos de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de polioxietileno sorbitol, o los productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídrido de hexitol, por ejemplo, monooleato de polietileno sorbitán. Las suspensiones acuosas pueden contener también uno o más conservantes por ejemplo, etilo, o n-propilo, p-hidroxibenzoato, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes, y uno o más agentes endulzantes, tales como sacarosa o sacarina.

60 Se pueden formular suspensiones oleosas suspendiendo el principio activo en un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de araquís, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo, cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Agentes endulzantes tales como los que se muestran anteriormente, y agentes aromatizantes para proporcionar una preparación oral sabrosa. Se pueden preservar estas composiciones mediante la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico.

Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el principio activo en premezcla con un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión y uno o más conservantes. Los agentes dispersantes o humectantes adecuados y los agentes suspensores se ejemplifican mediante los ya mencionados anteriormente. Pueden estar presentes también excipientes adicionales, por ejemplo, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes y colorantes.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden estar también en la forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo aceite de oliva o aceite de araquís, o un aceite mineral, por ejemplo, parafina líquida o las mezclas de esta. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas que se producen naturalmente, por ejemplo goma acacia o goma tragacanto, fosfatidas que se producen naturalmente, por ejemplo, semillas de soja, lecitina, y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de sorbitán, y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo, monooleato de polioxietilén sorbitán. Las emulsiones también pueden contener agentes edulcorantes y aromatizantes.

Se pueden formular jarabes y elixires con agentes endulzantes, por ejemplo glicerol, propilenglicol, sorbitol o sacarosa. Dichas formulaciones pueden contener también un emoliente, un conservante y aromatizante y agentes colorantes.

La composición farmacéutica puede estar en la forma de soluciones acuosas inyectables estériles o suspensiones oleaginosas. Esta suspensión se puede formular de acuerdo con la técnica conocida utilizando los agentes de dispersión y humectación y los agentes de suspensión adecuados que se han citado anteriormente. La preparación estéril inyectable puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butano diol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear se encuentran agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, se usan convencionalmente aceites fijos estériles, en forma de un disolvente o un medio de suspensión. Para este fin se puede emplear cualquier aceite fijo suave incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, aceites grasos tales como ácido oleico en la preparación de sustancias inyectables.

Se pueden administrar también los compuestos de la presente invención en la forma de supositorios para la administración rectal del fármaco. Estas composiciones se pueden preparar mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado que sea sólido a temperaturas ordinarias pero que sea líquido a temperatura rectal y por tanto se funda en el recto para liberar el fármaco. Dichos materiales son manteca de cacao y polietilenglicoles.

Para uso tópico, se emplean cremas, pomadas, gelatinas, soluciones o suspensiones, etc., que incluyen los compuestos de la presente invención. (Para los fines de esta solicitud, la aplicación tópica deberá incluir enjuagues y colutorios).

Los compuestos de la presente invención también se pueden administrar en forma de liposomas. Como se conoce en la técnica, los liposomas por lo general se derivan de fosfolípidos y otras sustancias lipídicas. Los liposomas se forman con cristales líquidos hidratados monolamelares o multilamelares que se dispersan en un medio acuoso. Se puede usar cualquier lípido no tóxico, fisiológicamente aceptable y metabolizable capaz de formar liposomas. Las presentes composiciones en forma de liposoma pueden contener, además de un compuesto de la presente invención, estabilizantes, conservantes, excipientes y similares. Los lípidos preferidos son los fosfolípidos y las fosfatidil colinas, naturales y sintéticos. Se conocen en la materia métodos para formar liposomas.

La composición y métodos farmacéuticos descritos en el presente documento pueden comprender además otros compuestos terapéuticamente activos como se señalan en el presente documento que se aplican usualmente en el tratamiento de las dolencias patológicas anteriormente mencionadas. Una persona normalmente experta en la técnica puede llevar a cabo la selección de los agentes adecuados para su uso en el tratamiento combinado, de acuerdo con principios farmacéuticos convencionales. La combinación de agentes terapéuticos puede actuar sinérgicamente para efectuar el tratamiento o la prevención de los diversos trastornos descritos anteriormente. Usando esta solución, se puede conseguir la eficacia terapéutica con dosificaciones inferiores de cada agente, reduciendo esta manera el potencial para los efectos secundarios adversos.

Los ejemplos de otros agentes terapéuticos incluyen los siguientes:

inhibidores de la tirosina quinasa, tales como imatinib (Glivec™), y gefitinib (Iressa™) *inter alia*; ciclosporinas (por ejemplo, ciclosporina A), CTLA4-Ig, anticuerpos tales como ICAM-3, receptor de IgG dirigido contra IL-2 (Anti-Tac), anti-CD45RB, anti-CD2, anti-CD3 (OKT-3), anti-CD4, anti-CD80, anti-CD86, agentes que bloquean la interacción entre CD40 y gp39, tales como anticuerpos específicos para CD40 y/o gp39 (es decir, CD154), proteínas de fusión construidas entre CD40 y gp39 (CD401g y CD8gp39), inhibidores, tales como inhibidores de la translocación nuclear, de función NP-kappa B, tales como desoxipergualina (DSG), inhibidores de la biosíntesis del colesterol tales como HMG CoA reductasa (lovastatina y simvastatina), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID) tales como ibuprofeno, aspirina, inhibidores del acetaminofeno y de la cicloxigenasa tales como rofecoxib, esteroides tales como prednisona o dexametasona, compuestos de oro, agentes antiproliferantes tales como metotrexato, FK506 (tacrolimus, Prograf), micofenoleto mofetilo, agentes antineoplásicos tales como azatioprina,

VP-16, etopósido, fludarabina, cisplatino, doxorubicina, adriamicina, amsacrina, camptotecina, citarabina, gemcitabina, fluorodesoxiuridina, melfalan y ciclofosfamida, inhibidores de TNF- α tales tenidap, anticuerpos dirigidos contra TNF o receptor de TNF soluble, y rapamicina (sirolimus o rapamune) o sus derivados.

5 Cuando se emplean otros agentes terapéuticos junto con los compuestos de la presente invención se pueden usar, por ejemplo en las cantidades que se señalan en la Physician Desk Reference (PDR) o como se ha determinado de otra forma por una persona normalmente experta en la técnica.

10 La composición y los métodos farmacéuticos descritos en el presente documento pueden comprender además otros compuestos terapéuticamente activos como se señalan en el presente documento que son inhibidores o sustratos de sistemas de salida de fármacos o de detoxificación de fármacos y sistemas excretores. Dichos sistemas incluyen P-glicoproteína, proteínas asociadas con la resistencia a multifármacos, proteína de resistencia pulmonar y glutatión S-transferasa isoenzimas alfa, mu, pi, sigma, teta, zeta y kappa. La administración simultánea de fármacos conocidos por inhibir o reducir la actividad de estos sistemas puede aumentar la eficacia de los compuestos descritos en la presente invención aumentando a su vez la cantidad de agente terapéutico en la célula. Usando esta solución, se puede conseguir la eficacia terapéutica con dosificaciones inferiores, reduciendo esta manera el potencial para los efectos secundarios adversos. Los ejemplos de inhibidores o sustratos de estos sistemas incluyen; verapamilo, probenecid, dipiridamol, ácido etacrínico, indometacina, sulfasalazina, butionina sulfoximina, ciclosporina A y tamoxifeno.

20 En la totalidad de esta memoria descriptiva, la palabra "comprenden", o sus variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un elemento indicado, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

25 Para que la naturaleza de la presente invención se pueda entender con más claridad, sus formas preferidas se describirán ahora con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

30 Ejemplos

MATERIALES Y MÉTODOS:

Síntesis de compuestos

35 Los compuestos se preparan generalmente en un proceso en 2 etapas partiendo de un dihaloheterociclo.

La primera etapa es una sustitución aromática nucleófila para generar un intermedio monoamino-monohalo.

40 La sustitución aromática nucleófila se lleva a cabo normalmente mediante la adición de una amina primaria o secundaria al heterociclo dihalogenado en un disolvente tal como etanol, isopropanol, terc-butanol, dioxano, THF, DMF, etoxietanol, tolueno o xileno. La reacción se lleva a cabo normalmente a temperatura elevada en presencia de una amina o base nucleófila en exceso tal como trietilamina o diisopropiltilamina, o una base inorgánica tal como carbonato de potasio o carbonato de sodio.

45 Como alternativa, el sustituyente amino se puede introducir a través de una reacción de aminación catalizada por un metal de transición. Los catalizadores usuales de dichas transformaciones incluyen Pd(OAc)₂/P(t-Bu)₃, Pd₂(dba)₃/BINAP y Pd(OAc)₂/BINAP. Estas reacciones se llevan a cabo normalmente en disolventes tales como tolueno o dioxano, en presencia de bases tales como carbonato de cesio o terc-butóxido de sodio o potasio a temperaturas que varían desde temperatura ambiente a temperatura de reflujo.

50 Las aminas empleadas en la primera etapa de la síntesis de estos compuesto se obtienen comercialmente o se preparan usando métodos bien conocidos de los expertos en la materia. De particular interés son las α -alquilbencilaminas que se pueden preparar mediante la reducción de oximas. Los reductores usuales incluyen el hidruro de aluminio y litio, hidrógeno gaseoso en presencia de paladio sobre un catalizador de carbón activo, Zn en presencia de ácido clorhídrico, borohidruro de sodio en presencia de un ácido de Lewis tal como TiCl₃, ZrCl₄, NiCl₂ y MoO₃, o borohidruro de sodio junto con la resina de intercambio iónico Amberlyst H15 y LiCl.

55 Las α -alquilbencilaminas se pueden preparar también mediante aminación reductora de las correspondientes cetonas. Un método clásico para dicha transformación es la reacción de Leuckart-Wallach, mediante condiciones catalíticas (HCO₂NH₄ [(CH₃)₅C₅RhCl₂]₂) o procedimientos alternativos (por ejemplo NH₄OAc, Na(CN)BH₃).

60 Las α -alquilbencilaminas se pueden preparar también a partir de los alcoholes α -alquilbencílicos correspondientes. Dichos métodos incluyen la derivatización del hidroxilo como un mesilato o tosilato y desplazamiento con un nucleófilo de nitrógeno, tal como ftalimida o azida, que se convierte a la amina primaria usando métodos sintéticos convencionales; o, el desplazamiento del hidroxilo con un nucleófilo de nitrógeno adecuado en condiciones del tipo Mitsunobu. Se pueden preparar alcoholes α -alquilbencílicos mediante reducción de las cetonas correspondientes con

un agente reductor tal como borohidruro de sodio en un disolvente tal como metanol. Como alternativa, se pueden obtener alcoholes α -alquilbencílicos mediante la adición de una especie de metal alcalino (tal como un reactivo de Grignard) a un derivado de benzaldehído, que se lleva a cabo normalmente a temperatura ambiente o inferior en disolventes tales como tetrahidrofurano.

se pueden preparar α -alquil bencilaminas de alta pureza óptica a partir de alcoholes α -alquil bencílicos quirales usando los métodos reseñados anteriormente. Los alcoholes α -alquil bencílicos quirales se pueden obtener a través de la reducción quiral de las correspondientes cetonas. Los métodos de reducción quirales son ahora bien conocidos en la química orgánica e incluyen procesos enzimáticos, procedimientos de hidrogenación asimétrica y oxazaborolidinas quirales.

La segunda etapa de la síntesis implica normalmente el acoplamiento cruzado mediado por paladio del intermedio de monoamino-monocloro con un ligando adecuadamente funcionalizado. Los ligandos usuales son los ácidos o ésteres borónicos (acoplamiento de Suzuki: véase, por ejemplo, Miyaura, N. y Suzuki, Chem Rev. 1995, 95 2457), estannanos (acoplamiento de Stille: véase por ejemplo Stille, J.K., Angew. Chem, Int. Ed. Engl., 1986, 25, de 508), reactivos de Grignard (acoplamiento de Kumada: Kumada, M.; Tamao, K.; Sumitani, K. Org. Synth. 1988, Coll. Vol.6, 407.) o especies de organocinc (Acoplamiento de Negishi: Negishi, E.; J. Orgahomet. Chem. 2002, 653, 34).

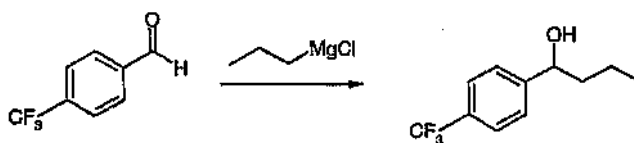
El acoplamiento de Suzuki es el método de acoplamiento preferido y se lleva a cabo normalmente en un disolvente tal como DME, THF, DMF, etanol, propanol, tolueno, o 1,4-dioxano en presencia de una base tal como carbonato de potasio, hidróxido de litio, carbonato de cesio, hidróxido de sodio, fluoruro de potasio o fosfato de potasio. La reacción se puede llevar a cabo a temperaturas elevadas y el catalizador de paladio empleado se puede seleccionar a partir de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, $\text{Pd}(\text{OAc})$, $[\text{PdCl}_2(\text{dppf})]$, $\text{Pd}_2(\text{dba})_3/\text{P}(\text{t-Bu})_3$.

Los productos formados a partir de esta secuencia de reacción de pueden derivatizar adicionalmente usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Como alternativa, la derivatización de los intermedios de mono-amino mono-halo se puede experimentar antes del desplazamiento del sustituyente halo. Esta derivatización implica normalmente la funcionalidad originalmente presente en la especie amina y emplea métodos bien conocidos por los expertos en la materia. Alternativamente, la secuencia de preparación se puede invertir comenzando con la reacción de acoplamiento cruzado mediada por paladio para proporcionar una especie mono-haloheterocíclica. Se puede experimentar a continuación el desplazamiento de la amina del sustituyente halo utilizando los procedimientos reseñados anteriormente.

Para que la naturaleza de la presente invención pueda entenderse más claramente, se describirán a continuación sus formas preferidas con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo de referencia 1

1-[4-(Trifluorometil)fenil]butan-1-ol



Una solución de cloruro de propilmagnesio 2 M en éter (4 ml, 8 mmol) se añadió a una solución del aldehído (1,14 g, 6,6 mmol) en THF seco (10 ml) enfriado a 0 °C bajo atmósfera de N_2 . La mezcla se agitó durante 16 h a temperatura ambiente, después de lo cual se añadió una solución saturada de cloruro de amonio. El producto se extrajo en acetato de etilo, y la capa de acetato de etilo se secó y concentró para proporcionar el producto puro (1,4 g, 98 %).

RMN ^1H (CDCl_3) δ 0,94 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, CH_3), 1,41 (m, 2H, CH_2), 1,75 (m, CH_2 , 2H), 4,77 (s a, 1H, CH), 7,44-7,62 (m, 4H, ArH)

Ejemplo de referencia 2*1-(1-Azidobutil)-4-(trifluorometil)benceno*

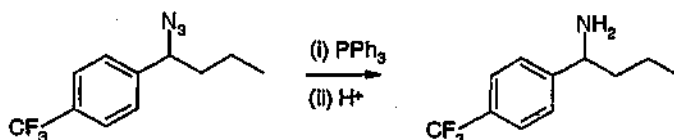
5

Una solución de 1-[4-(trifluorometil)fenil]butan-1-ol (1,4 g, 6,4 mmol) y difenilfosforil azida (2,8 ml, 12,8 mmol) en THF (6 ml) enfriado a -10 °C en N₂ se trató con DBU (1,9 ml, 12,8 mmol). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas y a continuación se diluyó con una mezcla de éter y H₂O. La fase orgánica se secó y se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna usando hexano:acetato de etilo (10:1) como eluyente para proporcionar la azida pura (0,85 g, 54 %).

10

RMN ¹H. (CDCl₃) δ 0,94 (t, 3H, J = 7,2 Hz, CH₃), 1,37 (m, 2H, CH₂), 1,75 (m, 2H, CH₂), 4,50 (t, 1H, CH), 7,42 (d, J = 7,8 Hz, 2H, ArH), 7,64 (d, 2H, J = 7,8 Hz, ArH)

15

Ejemplo de referencia 3*1-[4-(Trifluorometil)fenil]butan-1-amina*

20

Una mezcla de 1-(1-azidobutil)-4-(trifluorometil)benceno (0,84 g, 3,5 mmol) y trifenilfosfina (1,8 g, 6,9 mmol) en acetato de etilo (6 ml) y 10 % de HCl (6 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 64 h. La fase acuosa se recogió y la fase orgánica se extrajo con HCl al 10 % (3 x 5 ml). Las capas acuosas se combinaron y basificaron con NaOH 5 M, y a continuación se extrajo con acetato de etilo (5 x 15 ml). La fase orgánica se secó y se concentró para dar la amina pura (0,4 g, 54 %).

25

RMN ¹H. (CDCl₃) δ 0,91 (t, J = 7,4 Hz, 3H CH₃), 1,31 (m, 2H, CH₂), 1,62 (m, 2H, CH₂), 3,97 (m, 1H, CH), 7,43 (AA'XX', 2H, ArH), 7,58 (AA'XX', 2H, ArH)

30

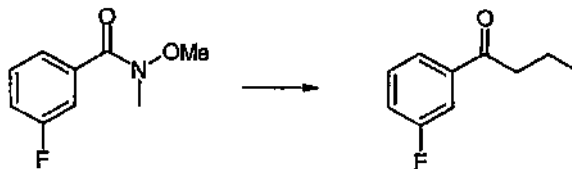
Ejemplo de referencia 4*3-Fluoro-N-metoxi-N-metilbenzamida*

35

A una suspensión de ácido 3'-fluorobenzoico (140 mg, 1 mmol) y clorhidrato de N,N-dimetilhidroxilamina (107 mg, 1,1 mmol) en diclorometano (2,5 ml) se añadió clorhidrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDC) (211 mg, 1,1 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 75 h. Los disolventes se eliminaron a vacío y el residuo se cromatografió usando acetato de hexilo-hexano (4:6) para separar el producto bruto (130 mg, 71 %).

40

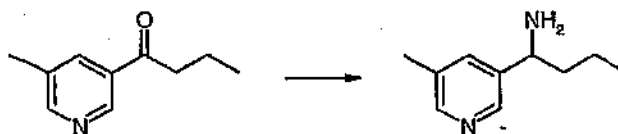
RMN ¹H. (CDCl₃): δ 3,36 (s, 3H, N-Me), 3,55 (s, 3H, N-OMe), 7,1-7,2 (m, 1H, ArH), 7,3-7,5 (m, 3H, Ar)

Ejemplo de referencia 5*1-(3-Fluorofenil)butan-1-ona*

5

A una solución de 3-fluoro-*N*-metoxi-*N*-metilbenzamida (130 mg, 0,71 mmol) en THF seco (2 ml) enfriado a -10 °C se añadió cloruro de propil magnesio (532 µl, una solución 2 M en éter, 1,1 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno. La solución se agitó a -10 °C durante 1h y a temperatura ambiente durante 75 min. La solución se vertió sobre una solución acuosa saturada de cloruro de amonio y el producto se extrajo en acetato de etilo (3 x 25 ml). La combinación de capas orgánicas se lavó con salmuera, se secó (MgSO₄) y se concentró para dar un aceite de color amarillo pálido, que se purificó mediante cromatografía usando acetato de etilo-hexano (1:9) para separar el producto puro (78 mg, 66 %).

15 RMN ¹H. (CDCl₃) δ 1,01 (t, 3H, *J* = 7,4 Hz, Me), 1,77 (m, 2H, CH₂CH₃), 2,93 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H, COCH₂), 7,15-7,30 (m, 1H, Ar), 7,35-7,50 (m, 1H, Ar), 7,60-7,70 (m, 1H, Ar), 7,70-7,80 (m, 1H, Ar).

Ejemplo de referencia 620 *1-(5-Metilpiridin-3-il)butan-1-amina*

25 A una solución de 1-(5-metilpiridin-3-il)butan-1-ona (800 mg, 4,9 mmol) y formiato de amonio (1,55 g, 24,5 mmol) en metanol (5 ml) en atmósfera de nitrógeno se añadió un dímero de dicloro(pentametilciclopentadienil)rodio (III) (45 mg, 0,074 mmol). La solución se calentó a reflujo durante 8 h, momento en el que la solución se enfrió a temperatura ambiente y se acidificó hasta temperatura ambiente y se acidificó a pH ~2 con HCl 2 M. La mezcla se lavó con diclorometano (3 x 15 ml) y la fase acuosa se basificó a continuación hasta pH ~12 mediante la adición de KOH. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 15 ml) y la combinación de capas orgánicas se lavó con salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró para obtener un producto puro (620 mg, 77 %).

30 RMN ¹H. (CDCl₃) δ 0,91 (t, 3H, *J* = 7,4 Hz, CH₂ CH₂ CH₃), 1,14-1,82 (m, 6H, 2 x CH₂, NH), 2,33 (s, 3H, CH₃), 3,91 (t, 1H, *J* = 6,8 Hz, CHNH₂), 7,47 (s, 1H, ArH), 8,32 (s a, 2H7Ar).

Ejemplo de referencia 7*(1R)-1-(4-Fluorofenil)butan-1-ol*

40

Complejo de dietilanilina-borano (2,4 ml, 13,4 mmol) se añadió gota a gota durante 5 min a una solución de (1S,2R)-1-aminoindan-2-ol (201 mg, 1,4 mmol) en THF seco (20 ml) enfriado a 0 °C con nitrógeno. Después de 40 min., se añadió una solución de la cetona en THF (40 ml) gota a gota durante 90 min. A continuación se eliminó el baño de enfriamiento y la solución se agitó a TA durante 5 h. Se añadió acetona (6 ml) y se agitó la solución resultante a TA durante 60 min antes de eliminar los disolventes a presión reducida. El residuo se disolvió en tolueno (100 ml) y se lavó sucesivamente con H₂SO₄ 1 M (4 x 50 ml), H₂O (2 x 50 ml) y salmuera (50 ml) y a continuación se secó (Na₂SO₄).

45 RMN ¹H. (CDCl₃) δ 0,93 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, CH₂ CH₂ CH₃), 1,17-1,51 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 1,58-1,82 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 4,66 (t, *J* = 6,6 Hz, CHNH₂), 6,98-7,07 (m, 2H, ArH), 7,26-7,34 (m, 2H, ArH).

Ejemplo de referencia 8*(1R)-1-Piridin-3-ilbutan-1-ol*

5



A una solución de S-(-)- α , α -difenil-2-pirrolidinmetanol (500 mg, 2 mmol) y trimetilborato (0,27 ml, 2,4 mmol) en THF (20 ml) se añadió complejo de dimetilsulfuro de borano (20 ml, 2 M en THF, 40 mmol). La mezcla se enfrió a 0 °C y se añadió 1-piridin-3-ilbutan-1-ona gota a gota durante 4 h. La solución se agitó a TA durante la noche y a continuación se trató con HCl 2 M (175 ml) y la agitación continuó durante 4 h. Se eliminaron los compuestos volátiles a presión reducida y la solución turbia resultante se basificó hasta pH 11 con solución acuosa de amoníaco. El producto se extrajo en acetato de etilo (3 x 100 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (100 ml) y se secaron (Na₂SO₄). La eliminación del disolvente a presión reducida dio como resultado ~3 g de producto.

10

15

RMN ¹H. (CDCl₃) δ 0,94 (t, 3H, $J = 7,4$ Hz, CH₂CH₂CH₃), 1,20-1,54 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 1,60-1,91 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 2,64 (s a, 1H, OH), 4,73 (t, 1H, $J = 6,6$ Hz, CHO), 7,24-7,30 (m, 1H, Ar), 7,68-7,74 (m, 1H, Ar), 8,47-8,52 (m, 2H, Ar).

Ejemplo de referencia 9*3-Amino-3-fenilpropan-1-ol*

25

A una suspensión de ácido 3-amino-3-fenilpropanoico (2,0 g, 12,1 mmol) en THF seco (45 ml) enfriado a 0 °C con N₂ se añadió LiAlH₄ sólido por partes durante 20 minutos (920 mg, 24,2 mmol). Se continuó la agitación a temperatura ambiente durante 24 h. tras lo cual se añadió Na₂SO₄·10H₂O sólido hasta que solo estuvo presente un precipitado de color blanco con agitación. La capa orgánica se diluyó con éter y se filtró a través de Celite® y se sometió el concentrado a vacío. El residuo se disolvió en acetato de etilo (50 ml) y se extrajo con HCl 1N (3 x 40 ml). Las capas acuosas se combinaron y basificaron hasta pH~12 con NaOH 5 M. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 ml) y las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron a vacío para separar el producto, que se usó sin purificación adicional (0,9 g, 49 %).

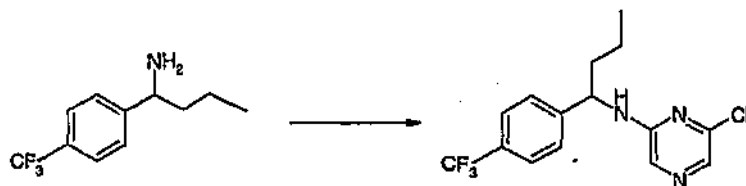
30

35

RMN ¹H. (CDCl₃) δ 1,84-1,94 (m, 2H, CH₂CH₂OH), 2,68 (s a, 1H, NH₂), 3,79 (t, 2H, $J = 5,8$ Hz, CH₁CH₂OH), 4,08-4,15 (m, 1H, CHNH₂), 4,77 (c, 1H, CH), 7,21-7,38 (m, 5H, ArH)

Ejemplo de referencia 10*6-Cloro-N-[1-(4-trifluorometil)fenil]butil]pirazin-2-amina*

40



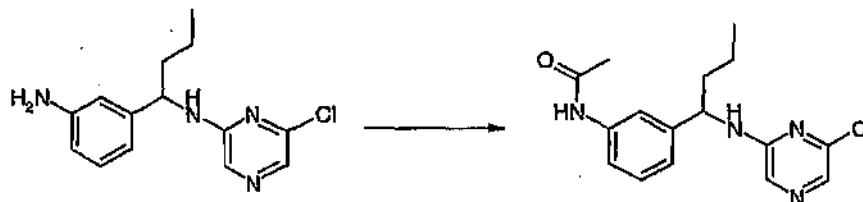
A una solución de 1-[4-(trifluorometil)fenil]butan-1-amina (0,40 g, 1,9 mmol) y 2,6-dicloropirazina (0,55 g, 3,7 mmol) en 1,4-dioxano (6 ml) se añadió carbonato de potasio anhidro (0,39 g, 2,8 mmol). La mezcla resultante se calentó a temperatura de reflujo durante 18 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se diluyó con acetato de etilo y H₂O. La fase orgánica se recogió, se secó y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida usando acetato de etilo-hexano (1:1) para separar el producto puro (0,03 g, 5 %).

45

RMN ¹H. (CDCl₃) δ 0,95 (t, 3H, *J* = 7,4 Hz, CH₃), 1,39 (m, 2H, CH₂), 1,81 (m, 2H, CH₂), 4,77 (q, 1H, CH), 5,09 (br d, 1H, NH), 7,42-7,62 (m, 5H, ArH), 7,80 (s, 1H, piraz.-H)

5 Ejemplo de referencia 11

N-(3-{1-[(6-Cloropirazin-2-il)amino]butil}fenil)acetamida

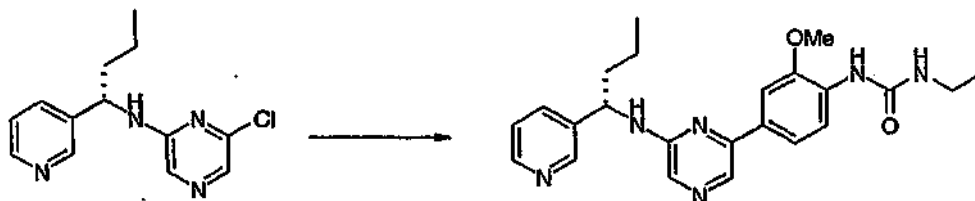


10 A una solución agitada de *N*-[1-(3-aminofenil)butil]-6-cloropirazin-2-amina (0,10 g, 0,36 mmol) y trietilamina (100 ml, 0,72 mmol) en diclorometano (3 ml) enfriada a 0 °C se añadió cloruro de acetilo (31 µl, 0,43 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. y a continuación se diluyó con diclorometano (10 ml) y se lavó con H₂O (10 ml) y salmuera (10 ml). La fase orgánica se recogió, se secó y se concentró y se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo-hexano (1:1) para dar el producto puro (94 mg, 82 %).

15 RMN ¹H. (CDCl₃) δ 0,93 (t, 3H, *J* = 7,4 Hz, Me), 1,28-1,43 (m, 2H, CH₂), 1,76-1,85 (m, 2H, CH₂), 2,16 (s, 3H, COCH₃), 4,48-4,59 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₃), 5,15 (br d, *J* = 6,8 Hz, 1H, NH), 7,06 (d, 1H, *J* = 7,4 Hz, Ar), 7,23-7,33 (m, 3H, Ar), 7,54 (s, 1H, CONH), 7,60 (s, 1H, piraz.-H), 7,77 (s, 1H, piraz.-H).

Ejemplo 12

25 *N*-[2Metoxi-4-(6-[[[(1*S*)-1-piridin-3-ilbutil]amino]pirazin-2-il]fenil]-*N'*-etilurea



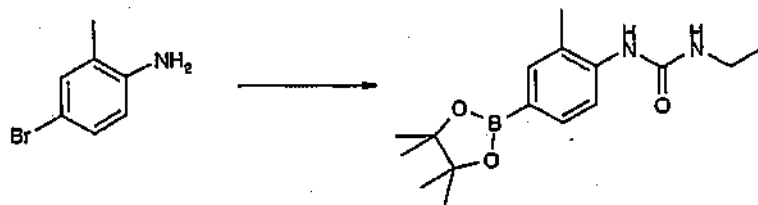
30 En una atmósfera de nitrógeno, una mezcla de 6-cloro-*N*-[(1*S*)-1-piridin-3-ilbutil]pirazin-2-amina (53 g, 0,2 mmol), pinacol diéster del ácido 4-[[[etilamino]carbonil]amino]-3-metoxifenilborónico (69 mg, 0,23 mmol), tetraquis(trifenilfosfina)paladio(0) (23 mg, 0,02 mmol) en tolueno-*n* propanol (2,6 ml, 3:1) se trató con una solución acuosa de carbonato de sodio 2 M (0,15 ml, 0,3 mmol). La mezcla resultante se agitó vigorosamente a la vez que se calentaba a 100 °C durante 22 horas. Se añadió de una vez acetato de etilo frío (10 ml) y la mezcla se lavó con H₂O (6 x 10 ml) y salmuera (10 ml) y a continuación se secó (Na₂SO₄). La eliminación del disolvente *a vacio* dio como resultado a continuación el producto bruto, que se purificó mediante cromatografía en columna utilizando una solución acuosa de diclorometano-metanol (93:7:1) como eluyente para proporcionar el producto (60 mg).

35 RMN ¹H (CDCl₃) δ 0,98 (t, 3H, *J* = 7,4 Hz, CH₃), 1,14 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, CH₃), 1,36-1,52 (m, 2H, CH₂), 1,78-1,98 (m, 2H, CH₂), 2,27 (s, 3H, CH₃), 3,23-3,37 (m, 2H, CH₂), 4,84-4,94 (m, 2H, CH, NHCONH), 5,19 (d, 1H, *J* = 6,2 Hz, CHNH), 6,31 (s, 1 H, ArNH), 7,24-7,30 (m, 1H, ArH), 7,55-7,73 (m, 4H, ArH), 7,75 (s, 1H, piraz.-H), 8,21 (s, 1H, piraz.-H), 8,49-8,52 (m, 1H, ArH), 8,69 (d, 1H, *J* = 2,0 Hz, ArH).

40

Ejemplo de referencia 13

Pinacol diéster del ácido 4-[(etilamino)carbonil]amino-3-metilfenilborónico



5

La anilina (500 mg, 2,7 mmol) se disolvió en piridina (5 ml) y a esta se añadió isocianato de etilo (424 μ l, 5,4 mmol). La solución resultante se agitó durante la noche, en cuyo momento se formó un precipitado espeso que se filtró y secó a vacío para dar la etil urea (595 mg, 86 %), RMN 1 H. (DMSO- d_6) δ 1,05 (t, 3H, $J = 7,4$ Hz, CH $_3$), 2,15 (s, 3H, CH $_3$), 3,09 (dq, 2H, $J = 7,4, 5,4$ Hz, CH $_2$), 6,55 (br t, 1H, $J = 5,4$ Hz, NH), 7,24 (dd, 1H, $J = 8,8, 2,2$ Hz, Ar-H), 7,30 (d, 1H, $J = 2,2$ Hz, Ar-H), 7,66 (s, 1H, NH), 7,82 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz, ArH).

10

A una suspensión desgasificada del bromuro de etil urea (514 mg, 2 mmol), acetato de potasio (784 mg, 8 mmol) y bis(pinacolato)diboro (508 mg, 2 mmol) en una mezcla de etanol (10 ml) y dioxano (2 ml) se añadió un aducto de dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio(II) diclorometano (44 mg, 0,06 mmol). La solución se calentó a temperatura de reflujo durante 2 h y a continuación se dejó enfriar a TA. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se disolvió en diclorometano (60 ml). Este se lavó con H $_2$ O (2 x 30 ml) y salmuera (30 ml), se secó (Na $_2$ SO $_4$) y se concentró a vacío. El residuo se cromatografió usando acetato de etilo-hexano (1:1) como eluyente para separar el producto puro como un sólido (351 mg, 58 %).

15

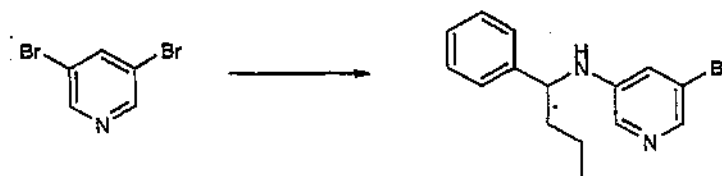
RMN 1 H. (CDCl $_3$) δ 1,12 (t, 3H, $J = 6,8$ Hz, CH $_3$), 1,34 (s, 12H, CH $_3$), 2,26 (s, 3H, CH $_3$), 3,09 (dq, 2H, $J = 6,8, 5,2$ Hz, CH $_2$), 4,69 (br t, 1H, NH), 6,06 (s, 1H, NH), 7,49 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, Ar-H), 7,67 (m, 2H, ArH).

20

Ejemplo de referencia 14

25

5-Bromo-N-(1-fenilbutil)piridin-3-amina



A una solución desgasificada de 3,5-dibromopiridina (0,4 g, 1,7 mmol), terc-butóxido de sodio (227 mg, 3,6 mmol), tris(dibencilidenoacetona)dipaladio (145 mg, 0,09 mmol) y rac-BINAP (105 mg, 0,2 mmol). en tolueno seco (10 ml) se añadió 1-fenilbutan-1-amina (0,2 ml). La mezcla se calentó a temperatura de reflujo durante 24 h y tras enfriamiento a temperatura ambiente se diluyó con éter y se lavó con salmuera (3 x 30 ml). La solución se secó (Na $_2$ SO $_4$) y se concentró y el residuo se cromatografió usando acetato de etilo-hexano (40:60) como eluyente. A partir de las fracciones iniciales se obtuvieron 97 mg del producto puro.

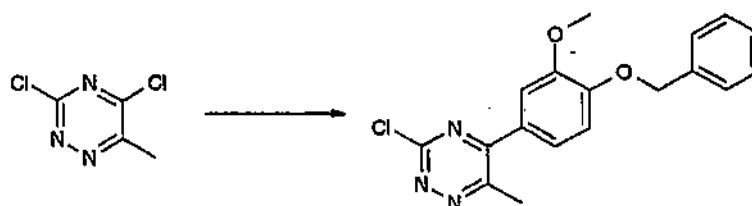
30

RMN 1 H. (CDCl $_3$) δ 0,94 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, CH $_3$), 1,21-1,53 (m, 2H, CH $_2$), 1,68-1,87 (m, 2H, CH $_2$), 4,19-4,32 (m, 2H, CH y NH), 6,86 (t, 1H, $J = 2,0$ Hz, ArH), 7,20-7,38 (m, 5H, ArH), 7,88 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, ArH), 7,92 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, ArH).

35

Ejemplo de referencia 15

5-[4-(Benciloxi)-3-metoxifenil]-3-cloro-6-metil-1,2,4-triazina



40

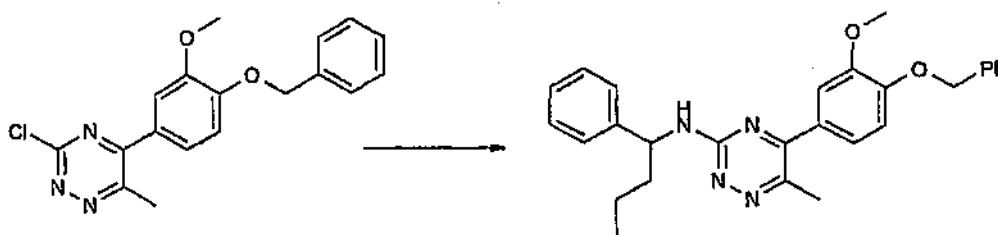
45

Una solución desgasificada de 3,5-dicloro-6-metil-1,2,4-triazina (151 mg, 0,9 mmol), 4-(benciloxi)-3-metoxibenceno borónico (236 g, 0,9 mmol), tetraquis(trifenilfosfina)paladio(0) (55 mg, 0,05 mmol) y fosfato de potasio (249 mg, 1,2 mmol) en dimetoxietano (5 ml) se calentó a temperatura de reflujo durante 24 h. Tras enfriar a temperatura ambiente la solución se diluyó con CHCl_3 y se filtró a través de Celite®. El filtrado se concentró *a vacío* y el producto se purificó mediante cromatografía en columna usando acetato de etilo:hexano (25:75) como eluyente para proporcionar (75 mg, 22 %).

RMN ^1H . (CDCl_3): δ 0,88 (s, 3H, Ar- CH_3), 3,98 (s, 3H, OCH_3), 5,26 (s, 2H, CH_2), 6,99 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz, ArH), 7,25-7,44 (m, 7H, ArH).

Ejemplo de referencia 16

5-[4-(Benciloxi)-3-metoxifenil]-6-metil-N-(1-fenilpropil)-1,2,4-triazin-3-amina

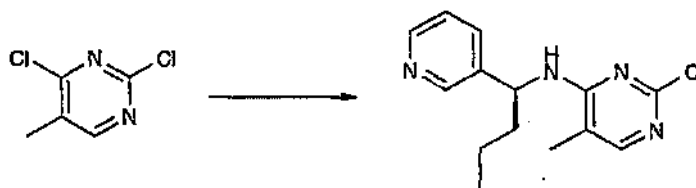


Una solución del triazeno (50 mg, 0,14 mmol) en etoxietanol (2,5 ml) se trató con diisopropilamina (50 μl , 0,28 mmol) y 1-fenilbutan-1-amina (46 μl , 0,28 mmol) y la solución resultante se calentó a 110 $^\circ\text{C}$ durante 3 días. A continuación se eliminó el disolvente *a vacío* para dar un residuo de color naranja que se cromatografió usando acetato de etilo-diclorometano (20:80) como eluyente para separar el producto como un sólido de color amarillo pálido (60 mg, 90 %).

RMN ^1H . (CDCl_3) δ 0,94 (t, 3H, CH_3), 1,21-1,53 (m, 2H, CH_2), 1,78-1,97 (m, 2H, CH_2), D.62 (s, 3H, Ar- CH_3), 3,89 (s, 3H, CH_3), 5,10 (br q, 1H, CH_2), 5,22 (s, 2H, CH_2), 5,65 (s a, 1H, NH), 6,87 (d, 1H, $J = 9,2$ Hz, ArH), 7,12-7,44 (m, 12H, Ar-H).

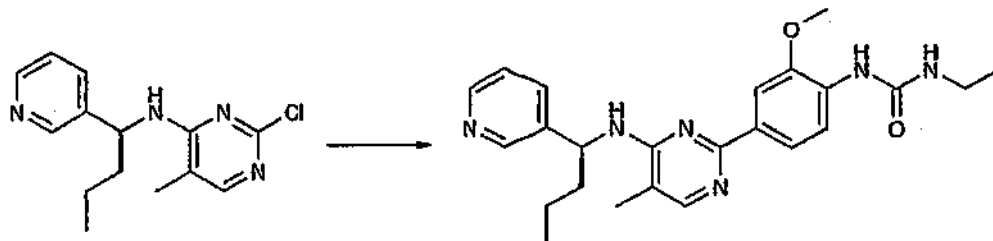
Ejemplo de referencia 17

2-Cloro-5-metil-N-[(1 S)-1-piridin-3-ilbutil]pirimidin-4-amina



A una solución de (1 S)-1-piridin-3-ilbutan-1-amina (600 mg, 4,0 mmol) en etanol (20 ml) se añadió 2,4-dicloro-5-metilpirimidina (717 mg, 4,4 mmol) y diisopropilamina (1,4 ml, 8 mmol). La solución se calentó a temperatura de reflujo durante 24h en cuyo momento se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se disolvió en acetato de etilo (30 ml) y se lavó con H_2O (2 x 15 ml), salmuera (15 ml) y se secó (Na_2SO_4). El residuo restante tras la concentración *a vacío* se cromatografió usando acetato de etilo-hexanos (9:1) como eluyente para separar el producto deseado (370 mg).

RMN ^1H . (CDCl_3) δ 0,96 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, CH_3), 1,23-1,52 (m, 2H, CH_2), 1,85-1,99 (m, 2H, CH_2), 2,03 (d, 3H, $J = 0,8$ Hz, Ar-Me), 5,03 (br d, 1H, $J = 7,2$ Hz, NH), 5,22-5,33 (m, 1H, CH), 7,24-7,30 (m, 1H, ArH), 7,65-7,71 (m, 1H, ArH), 7,81 (d, 1H, $J = 0,8$ Hz, ArH), 8,51 (dd, $J = 5,6,1,4$ Hz, 1H, ArH), 8,64 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz, ArH).

Ejemplo de referencia 18*N-Etil-N'-[2-metoxi-4-(5-metil-4-[(1S)-1-piridin-3-ilbutil]amino]pirimidin-2-il)fenil]urea*

5

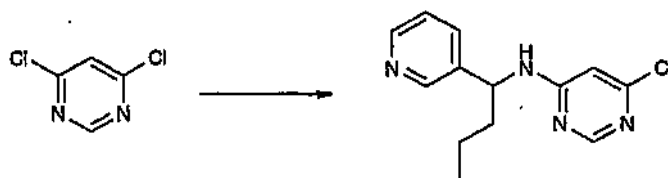
10

15

20

En una atmósfera de nitrógeno, una mezcla de 2-cloro-5-metil-N-[(1S)-1-piridin-3-ilbutil]pirimidin-4-amina (277 mg, 1,0 mmol), pinacol diéster del ácido 4-[(etilamino)carbonil]amino-3-metoxifenilborónico (416 mg, 1,3 mmol), tetraquis(trifenilfosfina)paladio(0) (116 mg, 0,1 mmol) en tolueno-n propanol (12 ml, 3:1) se trató con una solución acuosa de carbonato de sodio 2 M (750 μ l, 1,5 mmol). La mezcla resultante se agitó vigorosamente a la vez que se calentaba a 100 °C durante 17 horas. Se añadió de una vez acetato de etilo frío (25 ml) y la mezcla se lavó con H₂O (6 x 15 ml), salmuera (20 ml) y se secó (Na₂SO₄). La eliminación del disolvente *a vacío* dio como resultado a continuación el producto bruto, que se purificó mediante cromatografía en columna utilizando una solución acuosa de diclorometano-metanol-amoniaco (93:7:1) como eluyente para proporcionar el producto (110 mg, 57 %).

RMN ¹H. (CDCl₃) δ 0,99 (t, 3H, J = 7,4 Hz, CH₃), 1,18 (t, 3H, J = 7,2 Hz, CH₃), 1,33-1,60 (m, 2H, CH₂), 1,82-2,02 (m, 2H, CH₂), 2,11 (s, 3H, Ar-Me), 3,25-3,39 (m, 2H, CH₂), 3,87 (s, 3H, OMe), 4,80-4,96 (m, 2H, 2 xNH), 5,26-5,36 (m, 1H, CH), 6,98 (s a, 1H, Ar-NHCONH), 7,22-7,28 (m, 1H, ArH), 7,67-7,72 (m, 2H, ArH), 7,83-7,88 (m, 1H, ArH), 8,05 (d, 1H, J = 0,8 Hz, ArH), 8,10 (d, 1H, J = 8,2 Hz, ArH), 8,47 (dd, 1H, J = 6,6, 1,8 Hz, ArH), 8,69 (d, 1H, J = 2,0 Hz, ArH).

Ejemplo de referencia 19*6-Cloro-N-(1-piridin-3-ilbutil)pirimidin-4-amina*

25

30

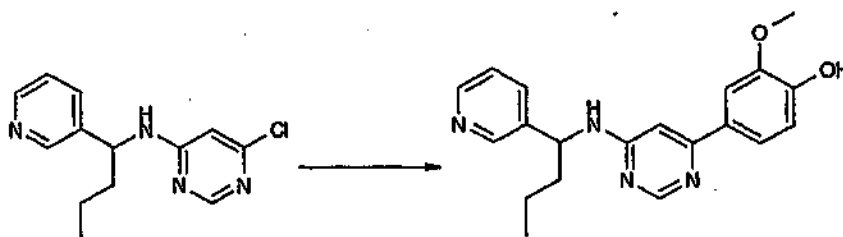
35

A una solución de 1-piridin-3-ilbutan-1-amina (100 mg, 0,67 mmol) en etanol (4 ml) se añadió 4,6-dicloro-pirimidina (109 mg, 0,73 mmol) y diisopropiltilamina (232 μ l, 1,33 mmol). La solución se agitó durante 3 días en cuyo momento el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se disolvió en acetato de etilo (25 ml) y se lavó con H₂O (3 x 15 ml), salmuera (15 ml) y se secó (Na₂SO₄). El residuo restante tras la concentración *a vacío* se cromatografió usando acetato de etilo-hexanos (4:6 - 9:1) como eluyente para separar el producto deseado (28 mg).

RMN ¹H. (CDCl₃) δ 0,96 (t, 3H, J = 7,2 Hz, CH₃), 1,22-1,51 (m, 2H, CH₂), 1,76-1,96 (m, 2H, CH₂), 4,76 (s a, 1H, CH), 5,63 (s a, 1H, NH), 6,23 (s, 1H, ArH), 7,26-7,32 (m, 1H, ArH), 7,59-7,65 (m, 1H, ArH), 8,33 (s, 1H, ArH), 8,53-8,56 (m, 1H, ArH), 8,60 (d, 1H, J = 1,8 Hz, ArH).

Ejemplo de referencia 20*2-Metoxi-4-{6-[(1-piridin-3-ilbutil)amino]pirimidin-4-il}fenol*

40



Utilizando un procedimiento análogo al que se describe en el Ejemplo 12, la reacción de 6-cloro-N-(1-piridin-3-ilbutil)pirimidin-4-amina (24 mg, 0,09 mmol) con 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenol (27 mg, 0,11 mmol) dio como resultado el producto deseado como una espuma de color marrón (12 mg).

RMN ¹H. (CDCl₃) δ 0,97 (t, 3H, J = 7,2 Hz, CH₃), 1.32-1.55 (m, 2H, CH₂), 1.83-1.95 (m, 2H, CH₂), 3,94 (s, 3H, OMe), 4,87 (s a, 1H, CH), 5,43 (s a, 1H, NH), 6,50 (s, 1H, ArH), 6,93 (d, 1H, J = 8.4 Hz, ArH), 7,25-7,31 (m, 2H, ArH), 7,55 (d, 1H, J = 2,0 Hz, ArH), 7,66-7,71 (m, 1H, ArH), 8,53 (dd, 1H, J = 4,9, 1,6 Hz, ArH), 8,58 (d, 1H, J = 1,6 Hz, ArH), 8,66 (d, 1H, J = 2,0 Hz, ArH).

CRIBADO

Dilución del compuesto

Para los fines de cribado, los compuestos se diluyeron en placas de 96 pocillos a una concentración de 20 µM. Las placas se calentaron a 37 °C durante 30 minutos antes del ensayo.

Crecimiento y mantenimiento de líneas celulares cancerosas

K562 (Leucemia mieloide crónica), PC3 (Cáncer de próstata), y DU145 (cáncer de próstata) se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC). K562 se hizo crecer en RPMI, añadiéndose FBS al 10 % con Glutamx. Se cultivaron células DU145 en DMED, añadiéndose FBS al 10 % y Glutamx y aminoácidos MEM no esenciales. Se hicieron crecer células PC3 en medio F12K, añadiéndose FBS al 10 % y Glutamx y aminoácidos MEM no esenciales. Todas las células se hicieron crecer a 37 °C en CO₂ al 5 %.

Establecimiento de líneas celulares TELJAK

La región de codificación que abarca los nucleótidos 1-487 de TEL se amplificó mediante la PCR utilizando los oligonucleótidos 5TEL (5' -GGG GGA TCC TGA TCT CTC TCG CTG TGA GAC-3') y 3TEL (5'-AGGC GTC GAC TTC TTC TTC ATG GTT CTG-3') y ARNm de U937 como plantilla. Un sitio de BamH I estaba presente en el cebador 5TEL, un sitio de Sal se incorporó en el cebador 3TEL. Las regiones que abarcan los dominios de la quinasa de JAK2 (nucleótidos 2994-3914; JAK2F 5'-ACGC GTC GAC GGT GCC TTT GAA GAC CGG GAT-3'; JAK2R 5'-ATA GTT TAG CGG CCG CTC AGA ATG AAG GTC ATT T-3') y JAK3 (nucleótidos 2520-3469; JAK3F 5'-GAA GTC GAC TAT GCC TGC CAA GAC CCC ACG ATC TT-3'; JAK3R 5'-GGA TCT AGA CTA TGA AAA GGA CAG GGA GTG GTG TTT -3') se generaron mediante la ADN polimerasa Taq (Gibco/BRL) y ARNm de U937 como plantilla. Se incorporó un sitio de Sall en el cebador directo de JAK2 y JAK3. Se incorporó un sitio de Not I en el cebador inverso de JAK2 y se añadió un sitio de Xba I al cebador inverso de JAK3.

Se generó una fusión de TEL/Jak2 mediante la digestión del producto de TELPCR con BamH I /Sal I, digestión del producto de JAK2 PCR con Sal/ Not I seguido por la ligadura y la subclonación en el vector de expresión en mamíferos pTRE 2 (Clontech) digerido con BamH I-Not I (pTLJAK2). Para JAK3, Sal I / Not I escindió el producto de la PCR del dominio de la quinasa ligado con BamH I / Sal I escindió el producto de TEL seguido por la ligadura en BaMH/Not escindió pTRE2 (pTELJAK3).

La línea celular BAF3 mielomonocítica dependiente del factor de crecimiento que soporta el plásmido pTET-off (Clontech) se transfectó tanto con pTELJAK2 o pTELJAK3 y las células seleccionadas para el crecimiento del factor independiente. Se cultivaron células BaF 3 naturales en medio DMEM con FCS al 10 %, medio acondicionado WEHI 3B al 10 %. Se cultivaron células BaF3 TELJAK en DMEM con FBS al 10 % homologado por Tet-System (sin medio acondicionado con WEHI 3B).

Los ensayos celulares se llevaron a cabo como sigue:

Se prepararon suspensiones celulares recogiendo células del cultivo. (Las células usadas en este ensayo deben encontrarse al final del crecimiento en fase log y de elevada viabilidad). Las células se diluyeron en medio de crecimiento correcto hasta 1,1 x concentración final (desde 50000 células/ml a 200.000 células/ml, dependiendo de la línea celular).

Se añadieron los compuestos a ensayar (10 µl, 10X concentración final) a una placa de 96 pocillos de fondo plano. Se añadió la suspensión celular (90 µl por pocillo), y se incubó la placa durante 40 h a 37 °C, CO₂ al 5 %. Se añadió MTT (20 µl por pocillo, 5 mg/ml en PBS) y las placas se devolvieron a la incubadora durante 6 horas. Se añadió tampón de lisis (100 µl por pocillo, SDS al 10 %, HCl 0,01 N) se añadió y la placa se almacenó en la incubadora durante la noche. A continuación, la placa se leyó a 590 nm.

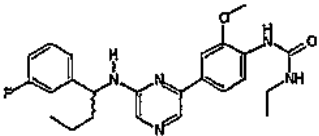
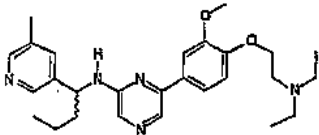
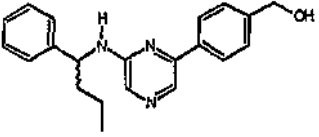
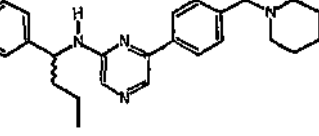
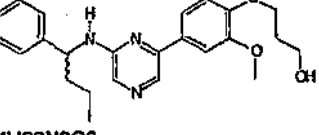
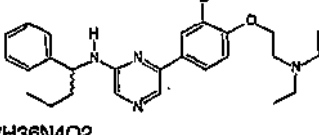
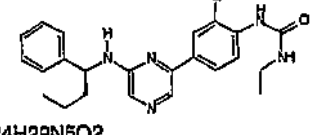
Ensayo de la tubulina

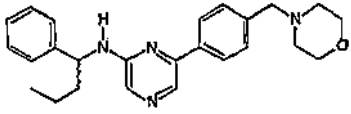
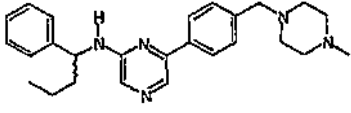
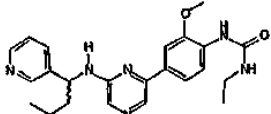
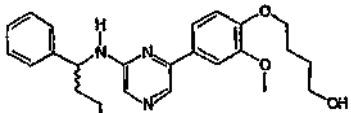
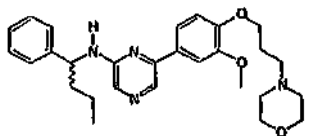
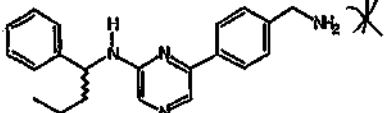
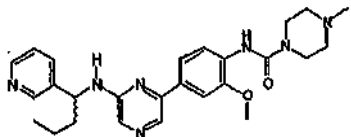
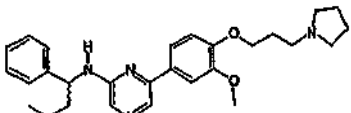
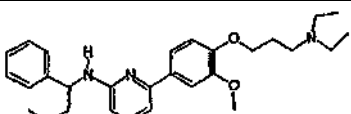
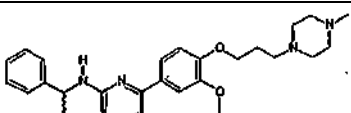
5 Se llevaron a cabo ensayos turbidimétricos de ensamblaje de microtúbulos incubando proteínas de microtúbulos en cubetas a 37 °C en un espectrofotómetro controlado termostáticamente midiendo el cambio en la absorbancia a 340 nm en el tiempo. La proteína de los microtúbulos se incubó con cada compuesto de ensayo a 0 °C y se inició la polimerización mediante la adición de GTP 1 mM, antes del calentamiento a 37 °C.

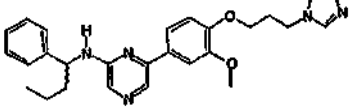
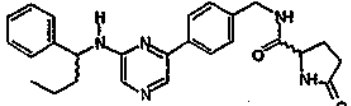
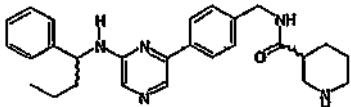
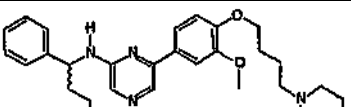
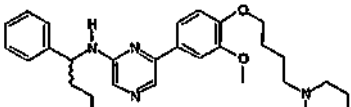
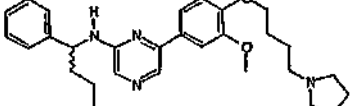
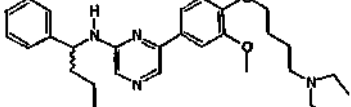
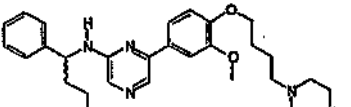
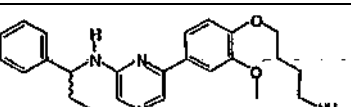
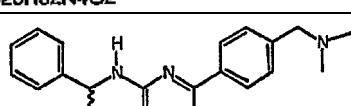
Resultados

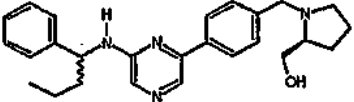
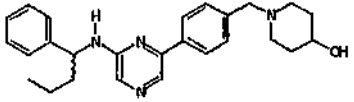
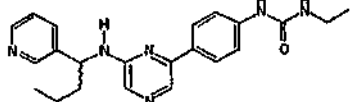
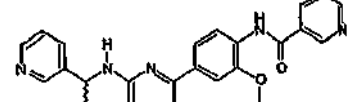
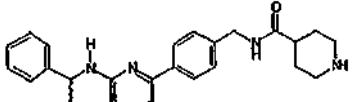
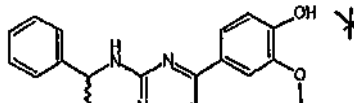
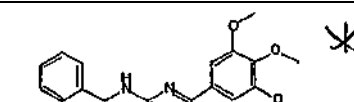
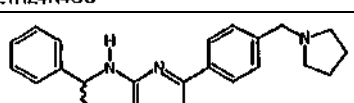
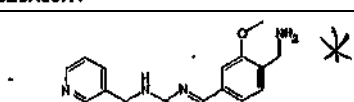
10 La actividad de una gama de compuestos se muestra en las Tablas 1 y 2. Los compuestos que presentan una capacidad de inhibir más de un 50 % del crecimiento celular a una concentración de 20 µM se designan como "+"; los compuestos que no inhiben el 50 % del crecimiento celular a 20 µM se designan como "-"; los compuestos que no se ensayaron se designan como "NT". Del mismo modo, los compuestos que inhibieron la polimerización de la tubulina en más de un 50 % a 50 µM se designan como "+"; los compuestos que no inhiben la polimerización de la tubulina en un 50 % a 50 µM se designan como "-"; y los compuestos que no se ensayaron se designan como "NT".
15 Están indicados los compuestos lejos del alcance de las presentes reivindicaciones*.

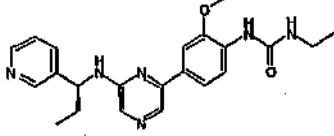
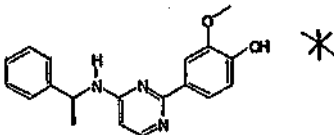
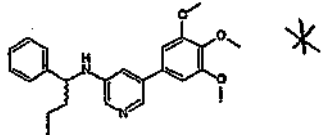
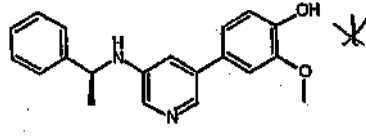
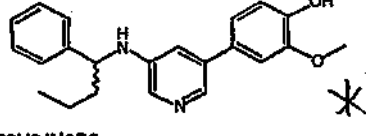
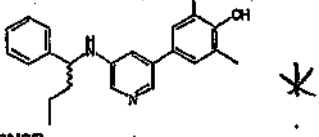
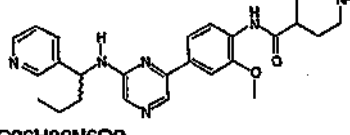
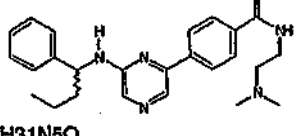
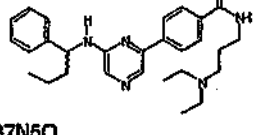
Tabla 1

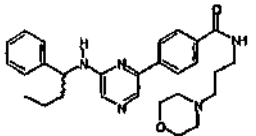
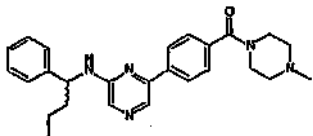
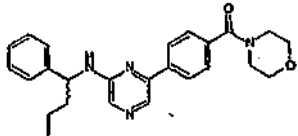
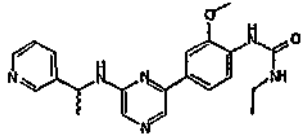
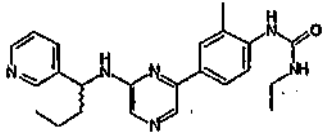
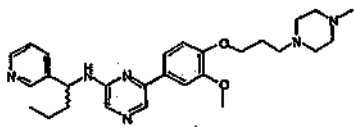
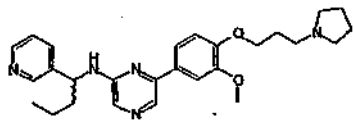
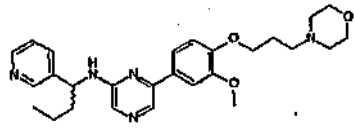
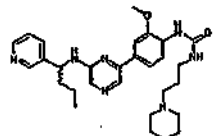
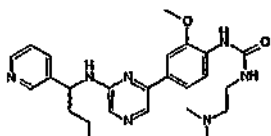
QUÍMICA	DU145	PC3	K562	TelJak2	TelJak3	Tubulina
 C24H28FN5O2	+	+	+	+	+	+
 C27H37N5O2	-	-	+	+	+	NT
 C21H23N3O	+	+	+	+	+	+
 C26H32N4	-	-	-	+	+	NT
 C24H29N3O3	+	+	+	+	+	+
 C27H36N4O2	+	+	+	+	+	+
 C24H29N5O2	+	+	+	+	+	+

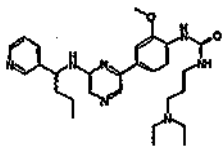
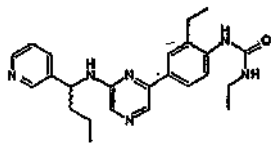
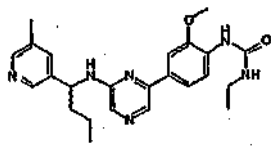
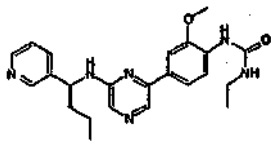
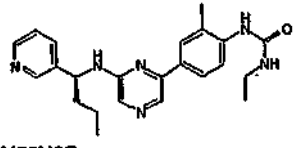
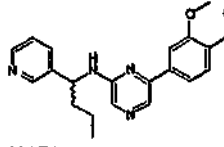
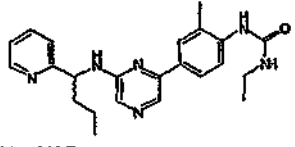
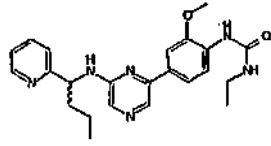
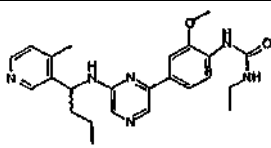
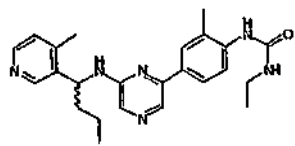
 C25H30N4O	-	-	-	+	-	NT
 C26H33N5	-	-	-	+	+	NT
 C23H28N6O2	+	+	+	+	+	+
 C25H31N3O3	+	+	+	+	+	+
 C28H36N4O3	-	+	+	+	+	NT
 C21H24N4	+	+	+	+	+	+
 C26H33N7O2	-	+	-	+	+	NT
 C28H36N4O2	+	+	+	+	+	+
 C28H38N4O2	+	+	+	+	+	+
 C29H39N5O2	+	+	+	+	+	+

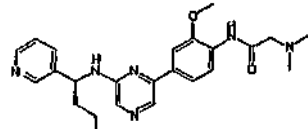
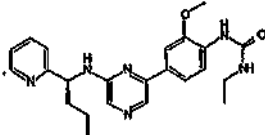
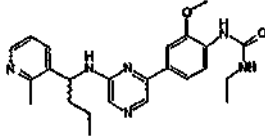
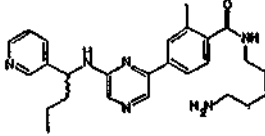
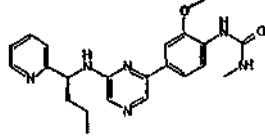
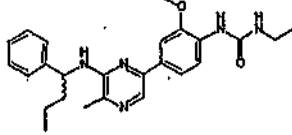
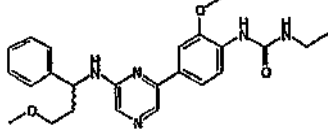
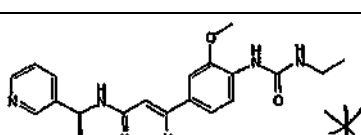
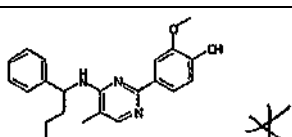
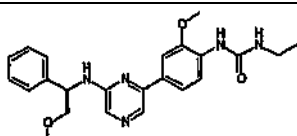
 <p>C27H31N5O2</p>	+	+	+	+	+	+
 <p>C26H29N5O2</p>	-	-	+	+	+	NT
 <p>C27H33N5O</p>	+	+	+	+	+	+
 <p>C29H38N4O3</p>	-	-	+	+	+	NT
 <p>C30H40N4O2</p>	+	+	+	+	+	+
 <p>C29H38N4O2</p>	+	+	+	+	+	+
 <p>C29H40N4O2</p>	+	+	+	+	+	+
 <p>C30H41N5O2</p>	+	+	+	+	+	+
 <p>C26H32N4O2</p>	+	+	+	+	+	+
 <p>Química 546</p>	-	-	+	+	+	NT

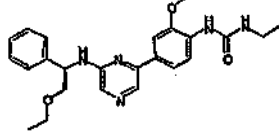
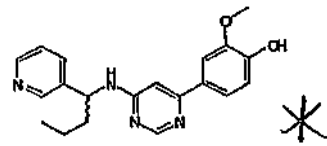
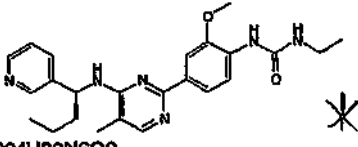
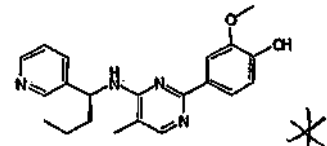
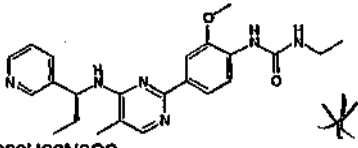
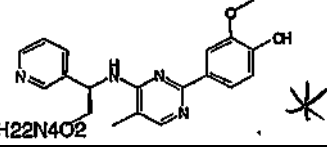
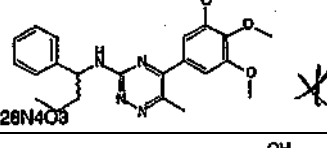
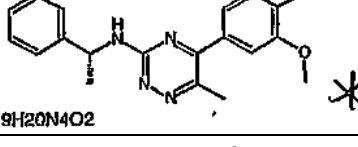
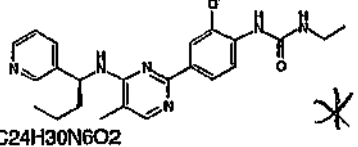
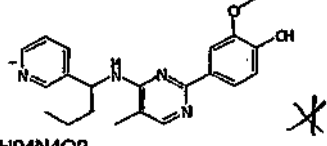
 C26H32N4O	-	-	+	+	+	NT
 C26H32N4O	-	-	+	+	+	NT
 C22H26N6O	-	-	+	+	+	NT
 C26H26N6O2	-	-	+	+	+	NT
 C27H33N5O	+	+	+	+	+	+
 C21H24N4O2	+	+	+	+	+	+
 C21H24N4O3	-	-	-	+	+	NT
 C25H30N4	+	+	+	+	+	+
 C21H25N5O	+	+	+	+	+	+

 <p>C22H26N6O2</p>	+	+	+	+	+	+
 <p>C19H19N3O2</p>	+	+	+	+	+	+
 <p>C24H28N2O3</p>	-	+	+	+	+	NT
 <p>C20H20N2O2</p>	+	+	+	+	+	+
 <p>C22H24N2O2</p>	+	+	+	+	+	+
 <p>C23H26N2O</p>	+	+	+	+	+	+
 <p>C26H32N6O2</p>	-	-	+	+	-	NT
 <p>C25H31N5O</p>	-	-	-	+	+	NT
 <p>C28H37N5O</p>	+	-	+	+	+	NT

 <p>C28H35N6O2</p>	-	-	-	+	+	NT
 <p>C26H31N5O</p>	NT	-	-	+	+	NT
 <p>C25H28N4O2</p>	NT	-	-	+	+	NT
 <p>C21H24N6O2</p>	NT	-	NT	+	+	NT
 <p>C23H28N6O</p>	+	+	+	+	+	+
 <p>C28H38N6O2</p>	-	-	-	+	+	NT
 <p>C27H35N5O2</p>	-	-	+	+	+	NT
 <p>C27H35N5O3</p>	-	-	-	+	+	NT
 <p>C28H37N7O3</p>	+	+	+	+	+	+
 <p>C26H33N7O2</p>	+	+	+	+	+	+

 C28H39N7O2	-	-	-	+	+	NT
 C24H30N6O	+	+	+	+	+	+
 C24H30N6O2	+	+	+	+	+	+
 C29H28N6O2	+	+	+	+	+	+
 C23H28N6O	+	+	+	+	+	+
 C21H24N4O2	-	-	+	+	+	NT
 C23H28N6O	+	+	+	+	+	+
 C23H28N6O2	+	+	+	+	+	+
 C24H30N6O2	+	+	+	+	+	+
 C24H30N6O	+	+	+	+	+	+

 <p>C24H30N6O2</p>	+	+	+	+	+	NT
 <p>C23H28N6O2</p>	+	+	+	+	+	+
 <p>C24H30N6O2</p>	+	+	+	+	+	+
 <p>C26H34N6O</p>	-	-	+	+	+	NT
 <p>C22H26N6O2</p>	+	+	+	+	+	+
 <p>C25H31N5O2</p>	+	+	+	+	+	+
 <p>C24H29N5O3</p>	+	+	+	+	+	+
 <p>C23H28N6O2</p>	+	+	+	+	+	+
 <p>C21H23N3O3</p>	+	-	+	+	+	NT
 <p>C23H27N5O3</p>	+	+	+	+	+	+

 C24H29N6O3	+	+	+	+	+	+
 C20H22N4O2	+	+	+	+	+	+
 C24H30N6O2	+	+	+	+	+	+
 C21H24N4O2	+	+	+	+	+	+
 C23H28N6O2	+	+	+	+	+	+
 C20H22N4O2	+	+	+	+	+	+
 C23H28N4O3	-	-	+	+	+	NT
 C19H20N4O2	-	-	+	+	+	NT
 C24H30N6O2	+	+	+	+	+	+
 C21H24N4O2	+	+	+	+	+	+

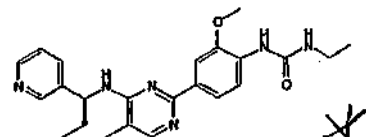
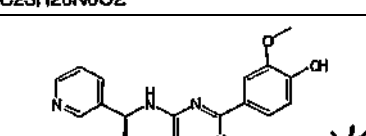
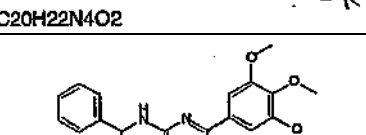
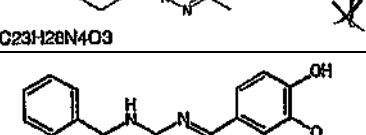
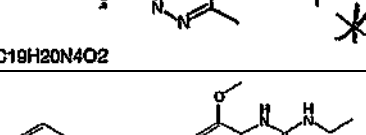
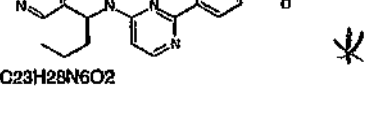
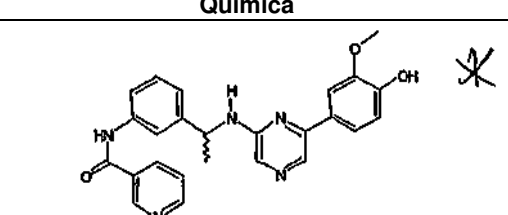
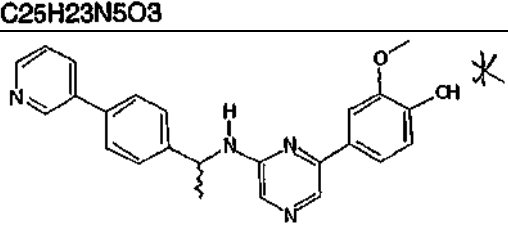
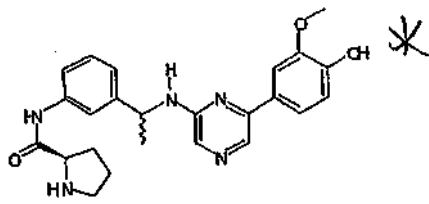
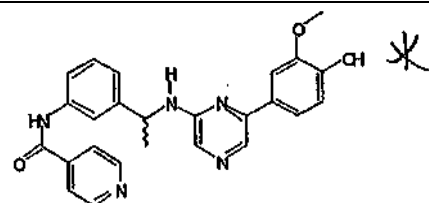
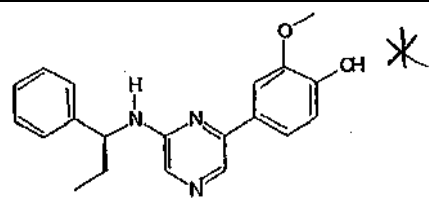
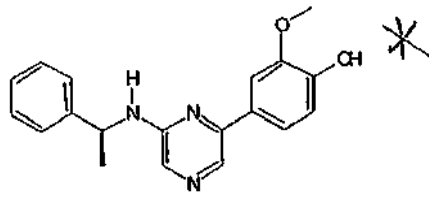
 <p>C23H28N6O2</p>	+	+	+	+	+	+
 <p>C20H22N4O2</p>	+	+	+	+	+	+
 <p>C23H28N4O3</p>	-	-	+	+	+	NT
 <p>C19H20N4O2</p>	-	,	+	+	+	NT
 <p>C23H28N6O2</p>	+	+	+	+	+	+
 <p>C19H19N3O2</p>	+	+	+	+	+	+

Tabla 2 - EJEMPLOS DE REFERENCIA

Química	TelJak2	TelJak3	DU145	Tubulina
 <p>C25H23N5O3</p>	+	+	+	+
 <p>C24H22N4O2</p>	+	+	+	+

 C24H27N5O3	+	+	+	+
 C25H23N5O3	+	+	+	+
 C20H21N3O2	+	+	+	+
 C19H19N3O2	+	+	+	+

En la totalidad de esta memoria descriptiva, la palabra "comprenden", o sus variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un elemento indicado, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

5

REFERENCIAS

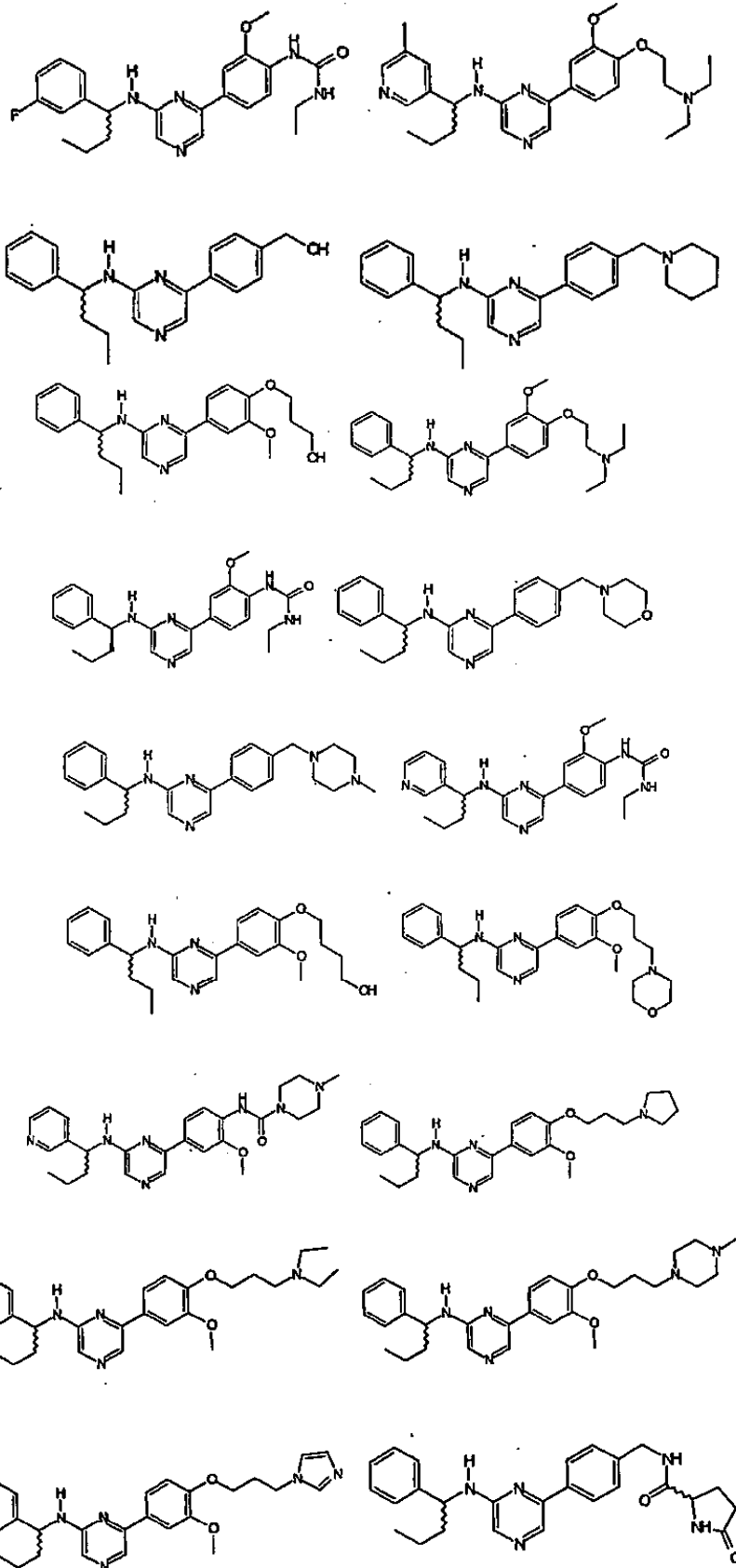
1. Jordan M A. y Wilson L. (1998) Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Curr. Op. Cell Biol.*, 10, 123-130.
2. Jordan MA, Margolis RL, Himes RH, Wilson L., (1986) Identification of a distinct class of vinblastine binding sites on microtubules. *J. Mol. Biol.* 187:61-73
3. Rai SS, y Wolff J., (1996) Localization of the vinblastine-binding site on β -tubulin. *J Biol Chem.* 271:14707-11

10

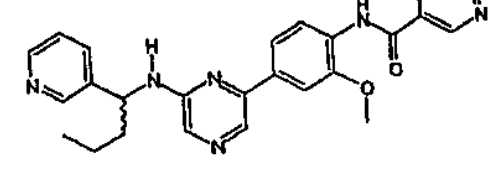
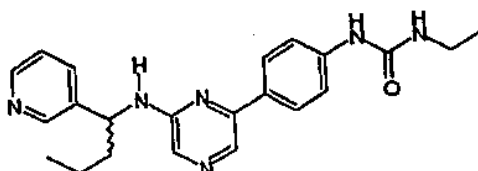
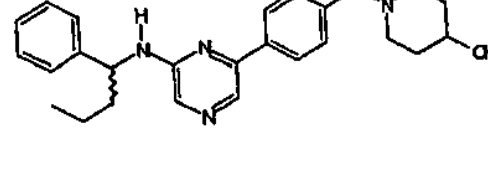
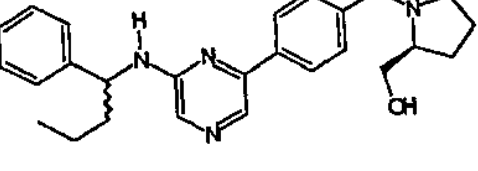
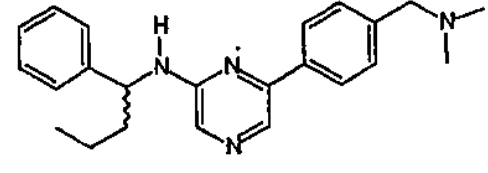
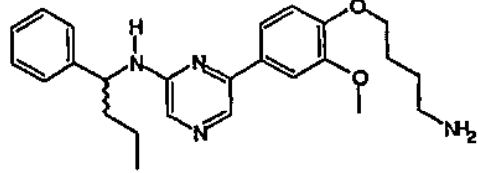
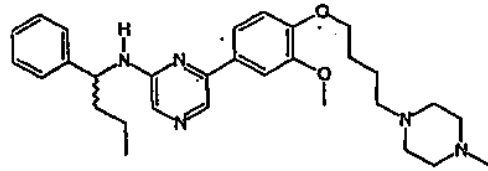
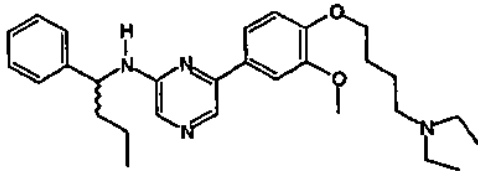
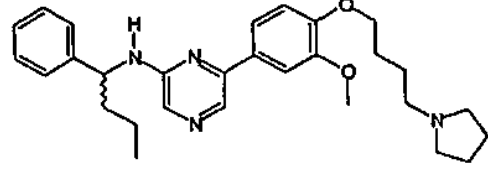
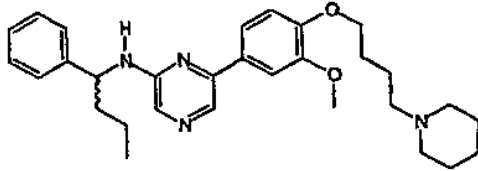
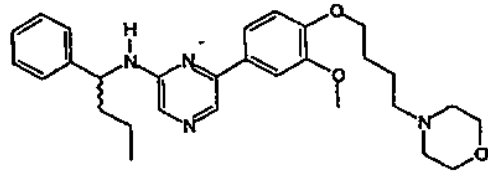
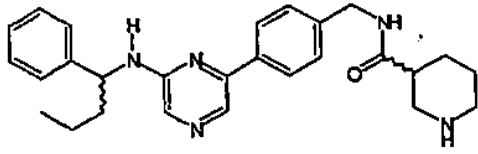
15

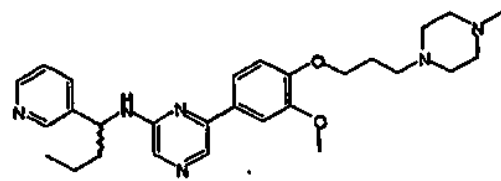
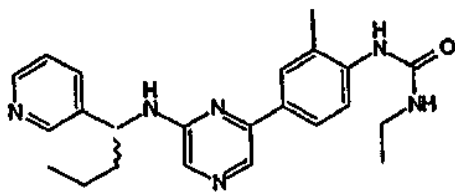
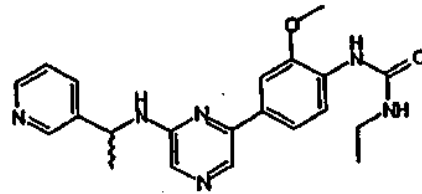
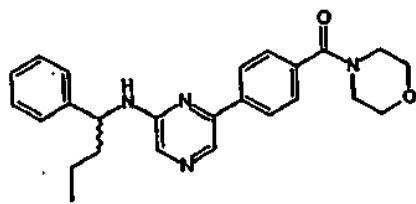
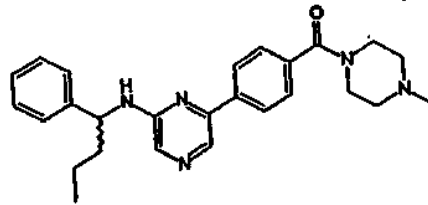
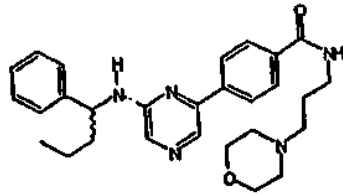
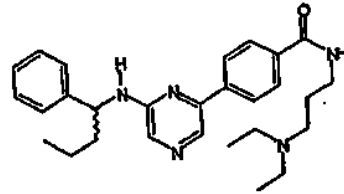
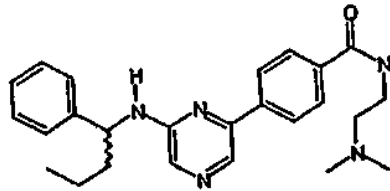
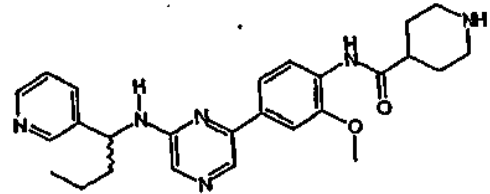
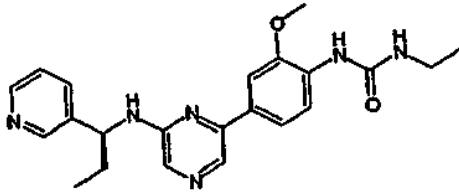
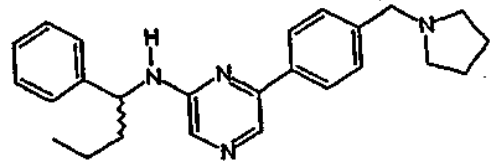
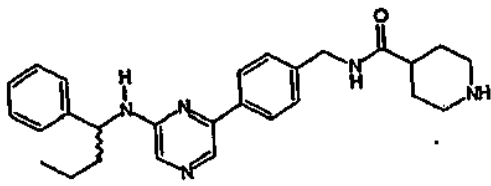
REIVINDICACIONES

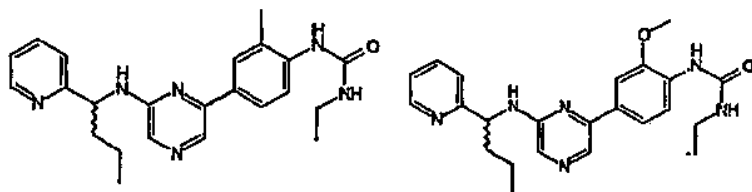
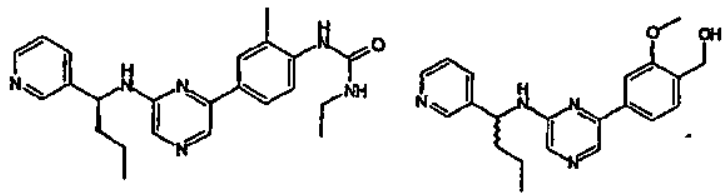
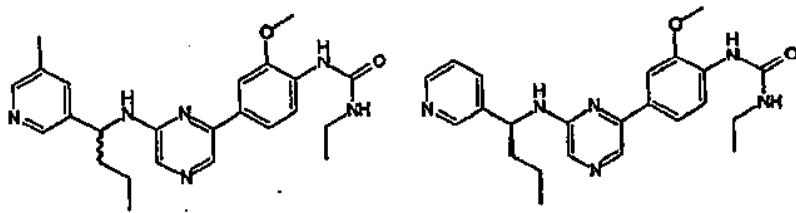
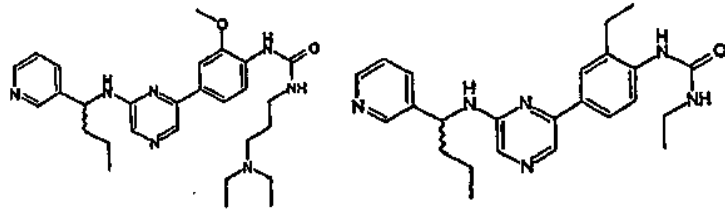
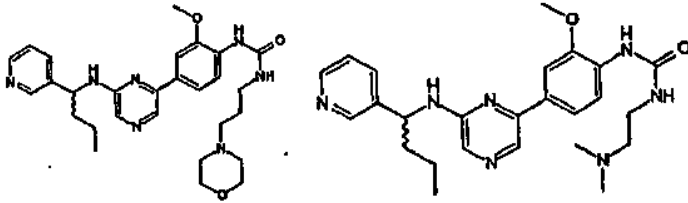
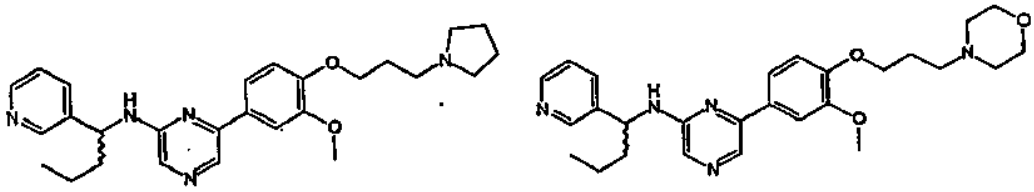
1. Un compuesto seleccionado entre grupo que consiste en

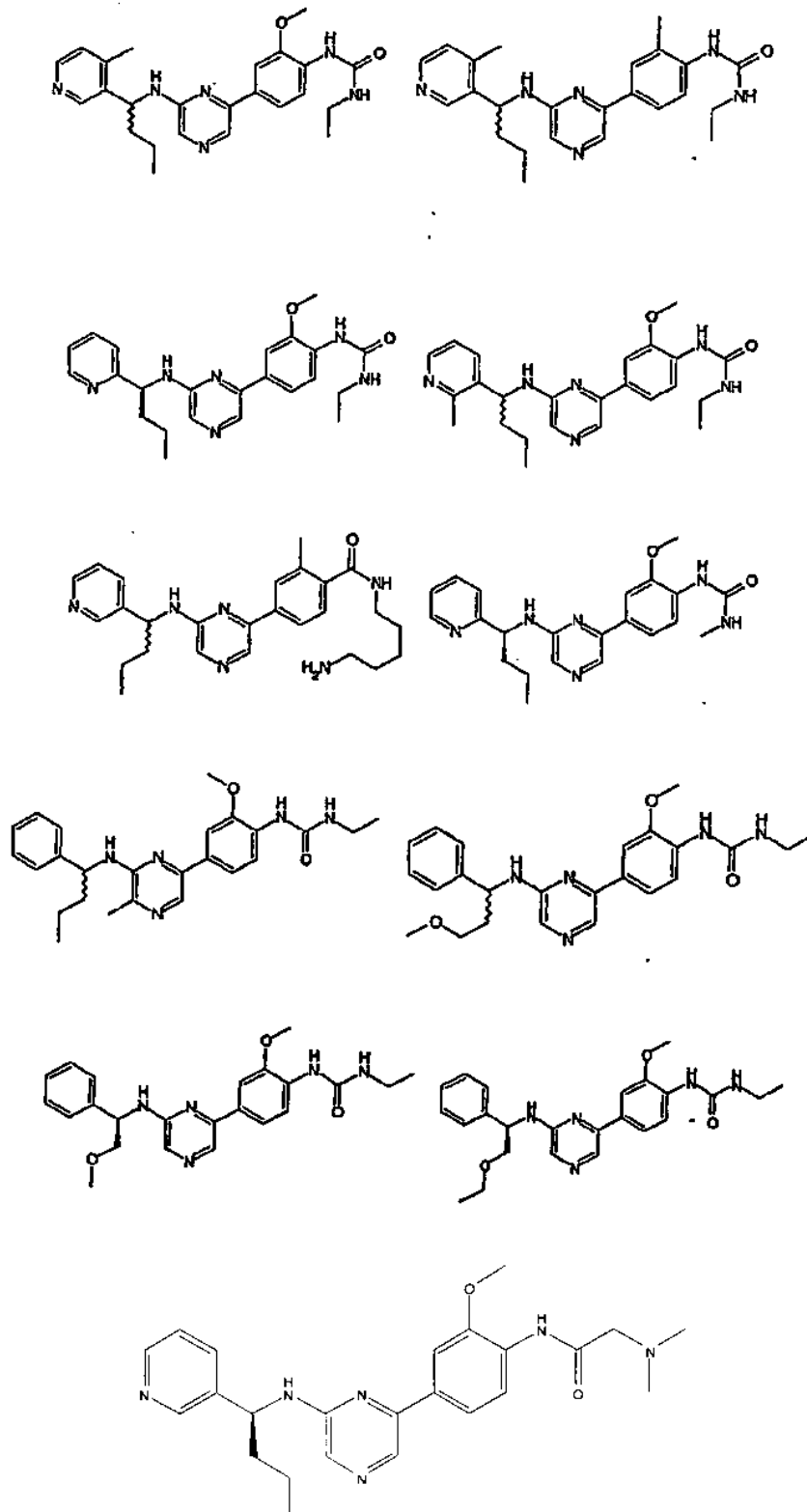


5



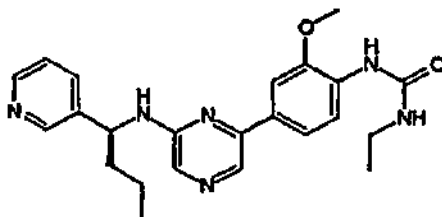






o una de sus sales, hidratos, solvatos, formas cristalinas o diastereómeros farmacéuticamente aceptables.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 de la fórmula:



o una de sus sales, hidratos, solvatos, formas cristalinas o diastereómeros farmacéuticamente aceptables.

- 5 3. Una composición farmacéutica que comprende un portador y al menos un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2.
- 10 4. Un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3 para su uso en el tratamiento de un trastorno o una patología relacionados con la hiperproliferación.
5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, donde el trastorno o la patología relacionados con la hiperproliferación se seleccionan entre el grupo que consiste en cáncer, enfermedades infecciosas, restenosis vascular y enfermedades inflamatorias.
- 15 6. Un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 o una composición de acuerdo con la reivindicación 3 para su uso en el tratamiento de un trastorno o de una patología relacionados con la proteína quinasa seleccionados entre el grupo que consiste en atopia, hipersensibilidad mediada por células, enfermedades reumáticas, otras enfermedades autoinmunes y enfermedades víricas.
- 20 7. Un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3 para su uso en el tratamiento de enfermedades y dolencias asociadas con la inflamación y la infección.