

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 241**

51 Int. Cl.:

C07D 401/14 (2006.01)
C07D 403/12 (2006.01)
C07D 413/12 (2006.01)
C07D 413/14 (2006.01)
C07D 417/12 (2006.01)
C07D 417/14 (2006.01)
A61K 31/505 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2006 E 06836890 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 1948193**

54 Título: **Aminopirimidinas útiles como inhibidores de cinasas**

30 Prioridad:

03.11.2005 US 732951 P
04.11.2005 US 733557 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.04.2015

73 Titular/es:

VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED
(100.0%)
50 Northern Avenue
Boston, MA 02210 , US

72 Inventor/es:

BINCH, HAYLEY;
MORTIMORE, MICHAEL;
FRAYSSE, DAMIEN;
DAVIS, CHRIS;
O'DONNELL, MICHAEL;
EVERITT, SIMON;
ROBINSON, DANIEL;
PINDER, JOANNE y
MILLER, ANDREW

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 533 241 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

Aminopirimidinas útiles como inhibidores de cinasas.

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a compuestos útiles como inhibidores de proteínas cinasas Aurora. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden los compuestos de la invención, que se pueden utilizar en el tratamiento de varios trastornos.

Antecedentes de la invención

Las proteínas Aurora son una familia 0a de tres serina/treonina-cinasas relacionadas (denominadas Aurora-A, -B y -C) que son esenciales para el avance a través de la fase mitótica del ciclo celular. Específicamente, Aurora-A desempeña una función crucial en la maduración y la segregación del centrosoma, la formación del huso mitótico y la segregación fiable de cromosomas. Aurora-B es una proteína pasajera cromosómica que desempeña una función central en la regulación del alineamiento de cromosomas en la placa metafásica, el punto de verificación del ensamblaje del huso y para la ejecución correcta de la citocinesis.

Se ha observado sobreexpresión de Aurora-A, -B o -C en varios cánceres humanos que incluyen los adenocarcinomas colorrectales, ováricos, gástricos y ductales infiltrantes.

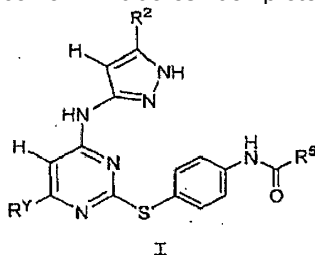
Varios estudios han demostrado que la reducción o la inhibición de Aurora-A o -B en líneas celulares de cáncer humano mediante ARNip, anticuerpos negativos dominantes o anticuerpos neutralizantes interrumpe el avance a través de la mitosis con consecuente acumulación de células con ADN 4N y, en algunos casos, esto va seguido de la endorreproducción y la muerte celular.

El documento WO 2004/000833 describe pirimidinas sustituidas y derivados de pirimidina útiles como inhibidores de cinasas Aurora y para su uso en el tratamiento de afecciones o enfermedades mediados por Aurora.

Las cinasas Aurora son dianas especialmente atractivas debido a su asociación con numerosos cánceres humanos y las funciones que desempeñan en la proliferación de estas células cancerosas. Sería deseable disponer de un inhibidor de cinasas Aurora con propiedades típicas de fármacos favorables, tales como la capacidad para inhibir la proliferación celular. Por consiguiente, se necesitan compuestos que inhiban cinasas Aurora y también exhiban propiedades típicas de fármacos favorables.

Compendio de la invención

Esta invención proporciona compuestos y composiciones farmacéuticamente aceptables de estos que son útiles como inhibidores de proteínas cinasas Aurora. Estos compuestos son representados por la fórmula I:

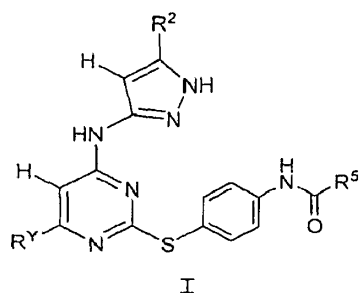


o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, donde las variables son como se definen en la presente.

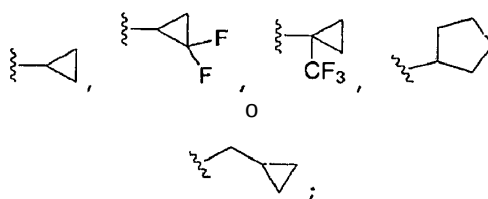
Estos compuestos y sus composiciones farmacéuticamente aceptables son útiles para inhibir cinasas *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*. Tales usos incluyen tratar o prevenir trastornos mieloproliferativos y trastornos proliferativos tales como un melanoma, mieloma, leucemia, linfoma, neuroblastoma y cáncer. Otros usos incluyen el estudio de cinasas en fenómenos biológicos y patológicos; el estudio de los sistemas de transducción de señales intracelulares mediados por tales cinasas; y la evaluación comparativa de nuevos inhibidores de cinasas.

Descripción detallada de la invención

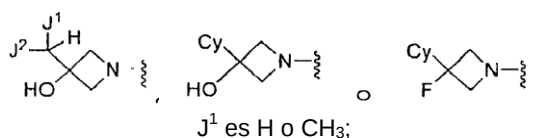
La presente invención proporciona un compuesto de fórmula I:



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, donde: R^2 es ciclopropilo o alquilo C_{1-3} ; R^b es CH_2CH_3 , CH_2CF_3 , $CH_2CH_2CF_3$,



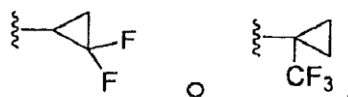
R^Y es



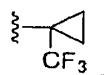
J^2 es alquilo C_{1-4} ; y

Cy es cicloalquilo C_{3-5} .

En algunos aspectos de esta invención, R^b se selecciona entre CH_2CF_3 , $CH_2CH_2CF_3$,

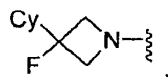
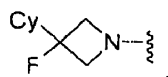
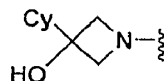


En otras realizaciones, R^5 se selecciona entre CH_2CF_3 o



En otras realizaciones adicionales, R^5 es CH_2CF_3 .

En otros aspectos de esta invención, R^Y es

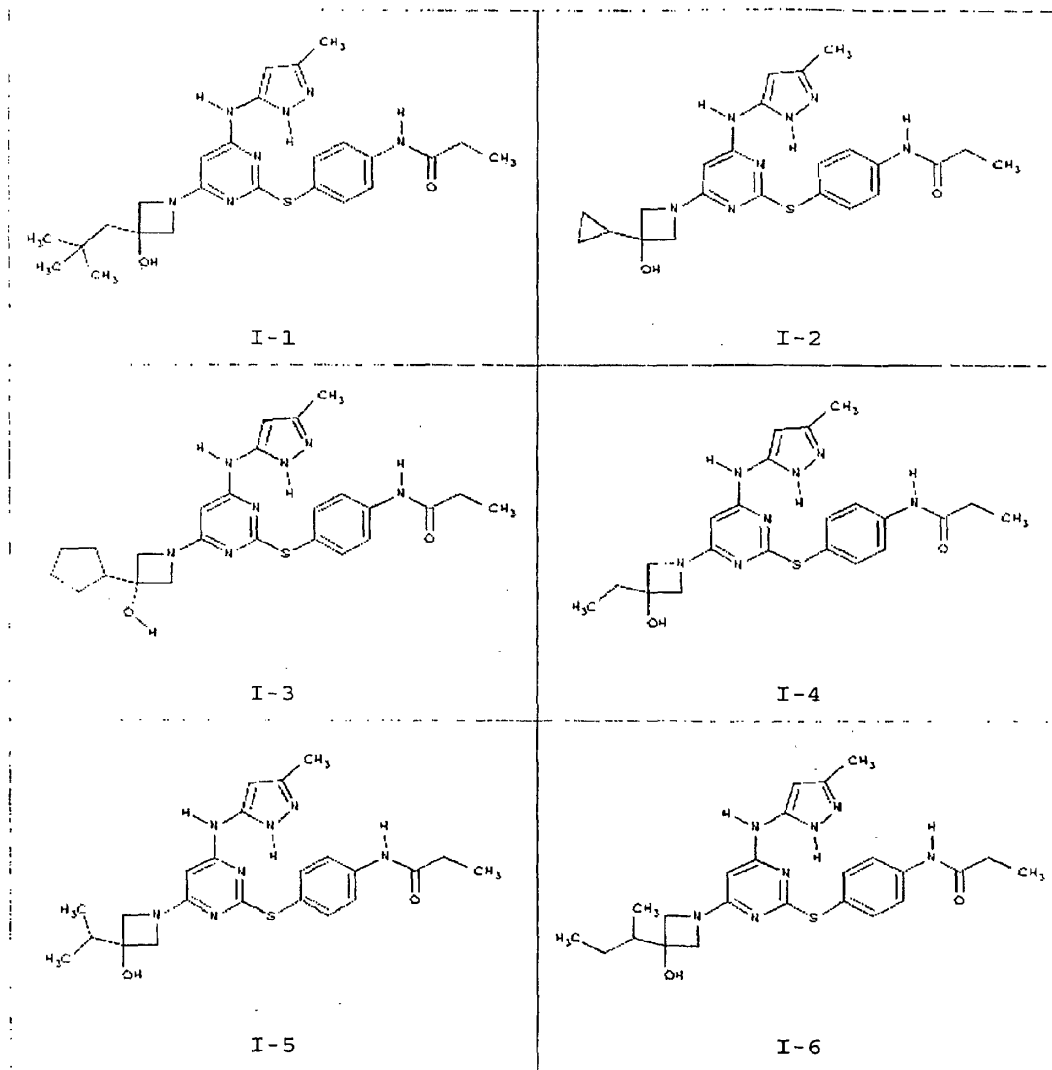


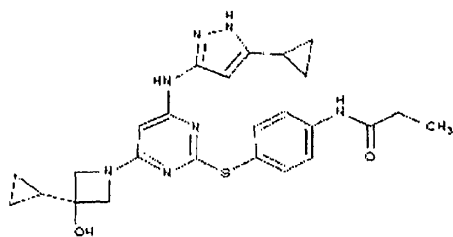
En algunas realizaciones, Cy es ciclopropilo.

En otros aspectos de esta invención, R² es metilo.

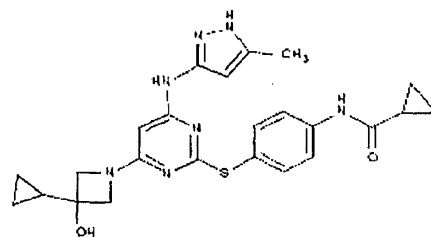
Un aspecto proporciona un compuesto seleccionado de la Tabla 1 (o una de sus sales farmacéuticamente aceptables):

5

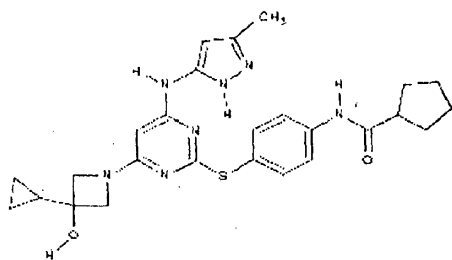




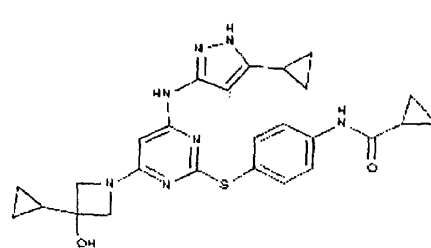
I-7



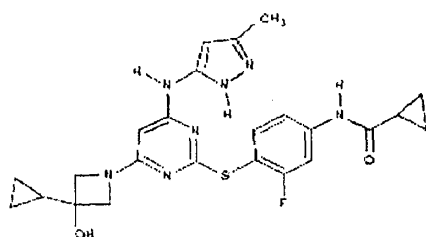
I-8



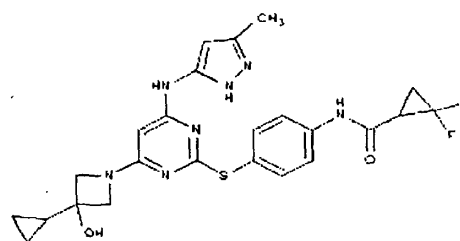
I-9



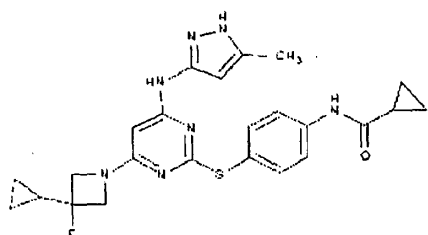
I-10



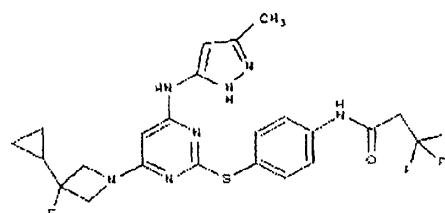
I-11



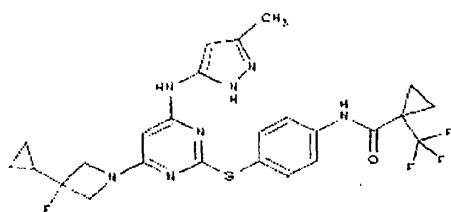
I-12



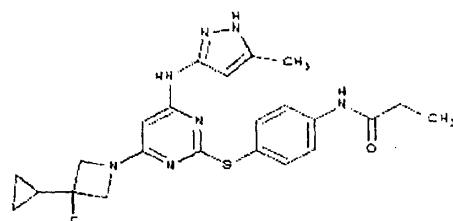
I-13



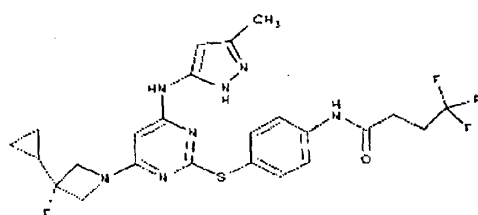
I-14



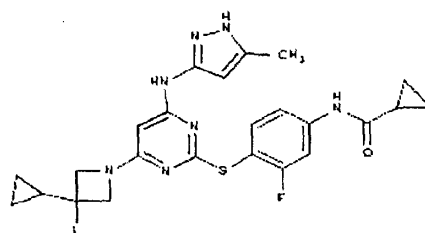
I-15



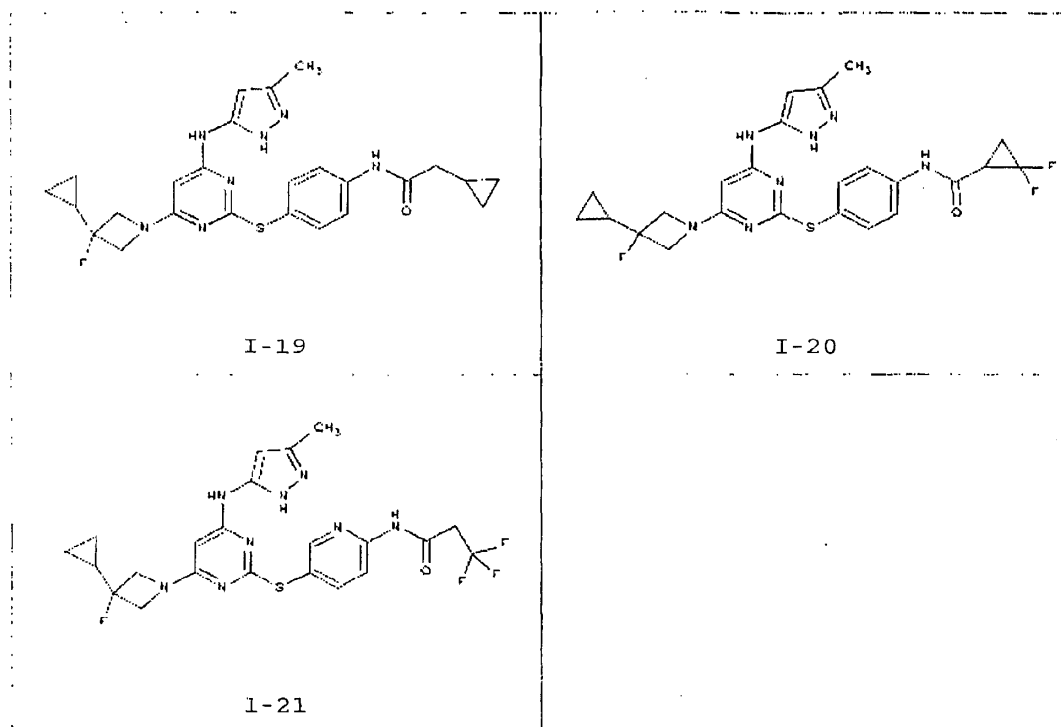
I-16



I-17



I-18



A efectos de esta invención, los elementos químicos se identifican de acuerdo con la Tabla periódica de los elementos, versión CAS, "Handbook of Chemistry and Physics", 75.^a ed. Además, los principios generales de química orgánica se describen en textos con los que estarán familiarizados los expertos en la técnica que incluyen, por ejemplo, "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999 y "March's Advanced Organic Chemistry", 5.^a ed., Ed.: Smith, M.B. y March, J., John Wiley & Sons, Nueva York: 2001.

Un rango de átomos especificado, tal como se describe en la presente, incluye cualquier número entero comprendido en tal rango. Por ejemplo, un grupo que contenga 1-4 átomos podría tener 1, 2, 3 o 4 átomos.

Los compuestos de la invención, tal como se describen en la presente, pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes como los que se han ilustrado de forma general anteriormente o como los representados por clases, subclases y especies particulares de la invención. Se apreciará que la frase "opcionalmente sustituido" y la frase "sustituido o no sustituido" se emplean de forma indistinta. En general, el término "sustituido", ya sea precedido o no por el término "opcionalmente", se refiere al reemplazo de radicales de hidrógeno en una estructura determinada por el radical de un sustituyente especificado. A menos que se indique lo contrario, un grupo opcionalmente sustituido puede tener un sustituyente en cada posición sustituible del grupo y, cuando se pueda sustituir más de una posición en una estructura determinada con más de un sustituyente seleccionado de un grupo especificado, el sustituyente puede ser el mismo o diferente en cada posición. Las combinaciones de sustituyentes previstas por esta invención son preferentemente aquellas que dan lugar a la formación de compuestos estables o químicamente viables.

El término "estable", tal como se utiliza en la presente, se refiere a compuestos que no se alteran sustancialmente cuando se someten a condiciones adecuadas para su producción, detección y preferentemente su recuperación, purificación y uso para uno o más de los fines descritos en la presente. En algunas realizaciones, un compuesto estable o un compuesto químicamente viable es aquel que no se altera sustancialmente cuando se mantiene a una temperatura menor o igual a 40 °C, en ausencia de humedad o en otras condiciones reactivas desde un punto de vista químico, durante al menos una semana.

El término "alquilo", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal, ramificada o no ramificada, que está completamente saturado y que tiene un único punto de unión con el resto de la molécula. Los ejemplos específicos de grupos alquilo incluyen, sin carácter limitante, metilo, etilo, isopropilo, *n*-propilo y *sec*-butilo.

El término "cicloalquilo" se refiere a un hidrocarburo monocíclico que está completamente saturado y que tiene un único punto de unión con el resto de la molécula. Los grupos cicloalquilo adecuados incluyen, sin carácter limitante, ciclopropilo, ciclobutilo y ciclopentilo.

El término "insaturado", tal como se utiliza en la presente, quiere decir que un resto tiene una o más unidades de insaturación.

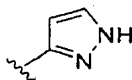
El término "haloalquilo" se refiere a un alquilo sustituido con uno o más átomos halógenos. Este término incluye grupos alquilo perfluorados tales como CF₃.

5 El término "halógeno" quiere decir F, Cl, Br o I.

El término "grupo protector", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un agente utilizado para bloquear temporalmente uno o más sitios reactivos deseados en un compuesto multifuncional. En ciertas realizaciones, un grupo protector tiene una o más de las siguientes características, o preferentemente todas ellas: a) reacciona selectivamente con un buen rendimiento para proporcionar un sustrato protegido que es estable frente a las reacciones que tienen lugar en uno o más de los demás sitios reactivos; y b) se puede eliminar selectivamente con un buen rendimiento utilizando reactivos que no atacan al grupo funcional regenerado. En el libro de Greene, T.W., Wuts, P. G titulado "Protective Groups in Organic Synthesis", tercera edición, John Wiley & Sons, Nueva York: 1999 y en otras ediciones de este libro se describen detalladamente grupos protectores ilustrativos. La expresión "grupo protector de nitrógeno", tal como se utiliza en la presente, se refiere a agentes utilizados para bloquear temporalmente uno o más sitios reactivos correspondientes a nitrógeno deseados en un compuesto multifuncional. Los grupos protectores de nitrógeno preferidos también poseen las características indicadas anteriormente y también se describen ciertos grupos protectores de nitrógeno ilustrativos en el capítulo 7 del libro de Greene, T.W., Wuts, P. G titulado "Protective Groups in Organic Synthesis", tercera edición, John Wiley & Sons, Nueva York: 1999.

20 A menos que se indique lo contrario, también se pretende que las estructuras representadas en la presente incluyan todas las formas isoméricas (p. ej., enantioméricas, diastereoméricas y geométricas (o conformacionales)) de la estructura; por ejemplo, las configuraciones *R* y *S* para cada centro asimétrico, los isómeros de doble enlace (*Z*) y (*E*), y los isómeros conformacionales (*Z*) y (*E*). Por ello, tanto los isómeros estereoquímicos únicos como las mezclas enantioméricas, diastereoméricas y geométricas (o conformacionales) de los presentes compuestos quedan incluidos dentro del alcance de la invención.

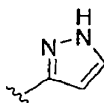
25 A menos que se indique lo contrario, todas las formas tautoméricas de los compuestos de la invención quedan incluidas dentro del alcance de la invención. Cómo sobreentenderá un experto, un grupo pirazol se puede representar de varias formas. Por ejemplo, una estructura dibujada como



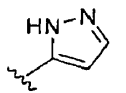
representa otros tautómeros posibles, tales como



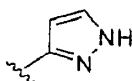
Asimismo, una estructura dibujada como



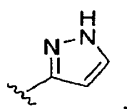
también representa otros tautómeros posibles, tales como



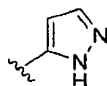
35 A menos que se indique lo contrario, un sustituyente puede girar libremente en torno a cualesquiera enlaces rotables. Por ejemplo, un sustituyente dibujado como



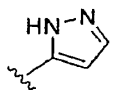
también representa



Asimismo, un sustituyente dibujado como



también representa



5

Los compuestos de esta invención se pueden preparar teniendo en cuenta la memoria descriptiva mediante pasos con los que estarán familiarizados los expertos en la técnica. Estos compuestos se pueden analizar mediante métodos conocidos que incluyen, sin carácter limitante, LCMS (cromatografía de líquidos combinada con espectrometría de masas) y RMN (resonancia magnética nuclear). Se sobreentenderá que las condiciones específicas que se indican a continuación son únicamente ejemplos y que no se pretende que limiten el alcance de las condiciones que se pueden utilizar para sintetizar los compuestos de esta invención. En cambio, esta invención también incluye condiciones que serán evidentes para los expertos en la técnica en vista de esta memoria descriptiva a la hora de sintetizar los compuestos de la invención. A menos que se indique lo contrario, todas las variables en los siguientes esquemas son como se definen en la presente.

15 Se emplean las siguientes abreviaturas:

DIPEA es diisopropiletilamina

DMF es dimetilformamida

n-BuOH es *n*-butanol

t-BuOH es *tert*-butanol

20 EtOH es etanol

MeOH es metanol

EtOAc es acetato de etilo

TFA es ácido trifluoroacético

DMSO es sulfóxido de dimetilo

25 t_R es tiempo de retención

DCM es diclorometano

MeCN es acetonitrilo

THF es tetrahidrofurano

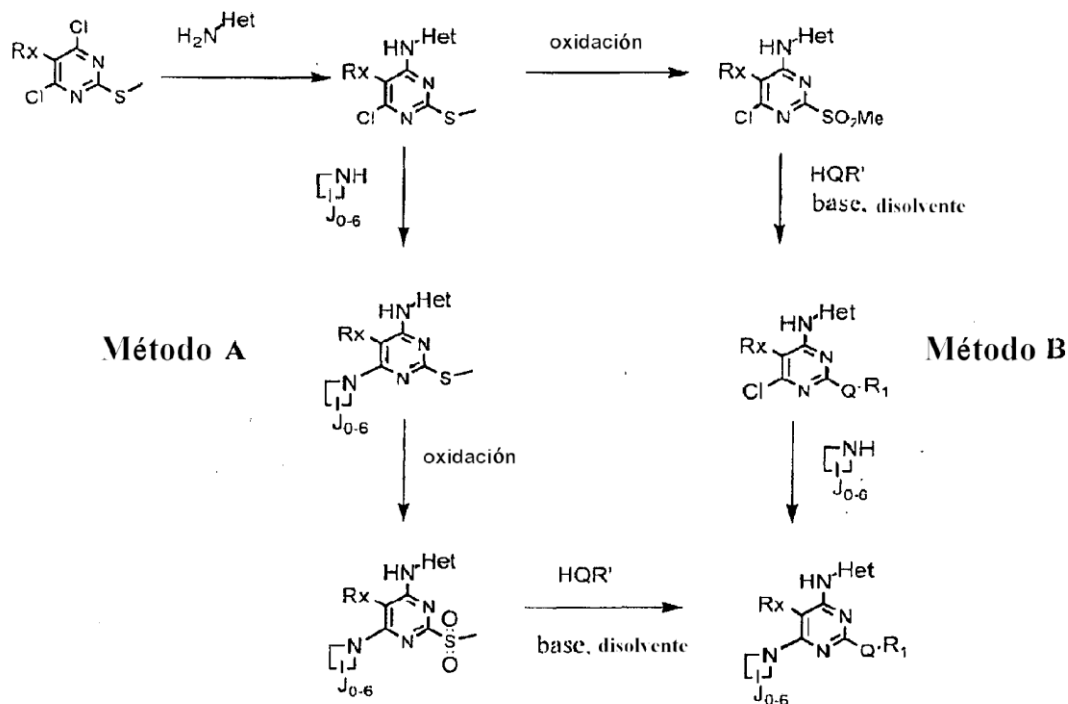
TBTU es tetrafluoroborato de 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio

30 HPLC es cromatografía de líquidos de alta resolución

LCMS es cromatografía de líquidos combinada con espectrometría de masas

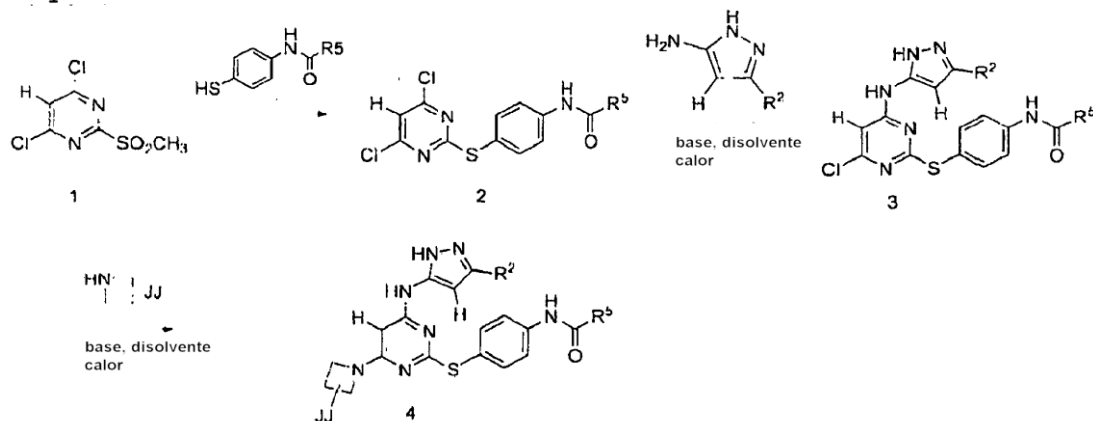
^1H RMN es resonancia magnética nuclear

Esquema general



esquema general anterior muestra algunos métodos para sintetizar compuestos de esta invención.

Esquema I



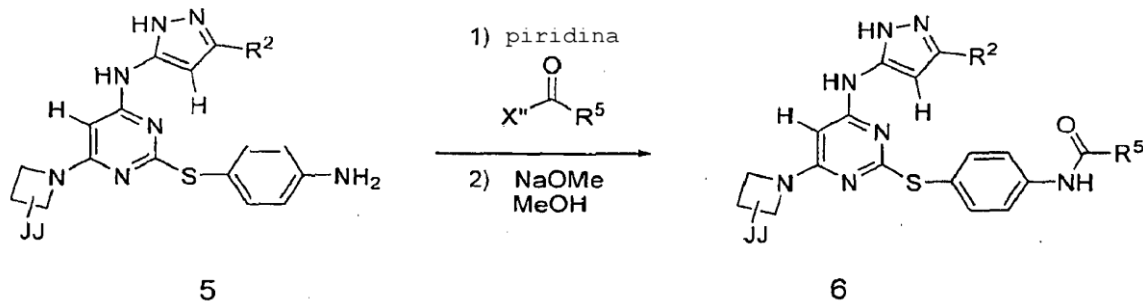
5

El Esquema I anterior muestra una ruta general para sintetizar compuestos de fórmula 4 (en el Esquema I), donde JJ corresponde a las sustituciones en la azetidina tal como se describen en la presente y donde R^2 y R^5 son como se definen en la presente. La pirimidina diclorada de fórmula 1 se combina con HQR^1 para formar un compuesto de fórmula 2. En algunas realizaciones, los dos compuestos se calientan en presencia de un disolvente adecuado (p. ej., *t*-BuOH) durante 16 horas. En otras realizaciones, los dos compuestos se mezclan a 0 °C en presencia de acetonitrilo y trietilamina durante 1 hora. El compuesto de fórmula 2 se calienta posteriormente en presencia de un disolvente adecuado (p. ej., DMF) y una base adecuada (p. ej., DIPEA/NaI) con un aminopirazol opcionalmente

10

sustituido para formar un compuesto de fórmula 3, que se calienta en presencia de un derivado de azetidina en presencia de un disolvente adecuado (p. ej., *n*-BuOH) para formar un compuesto de fórmula 4.

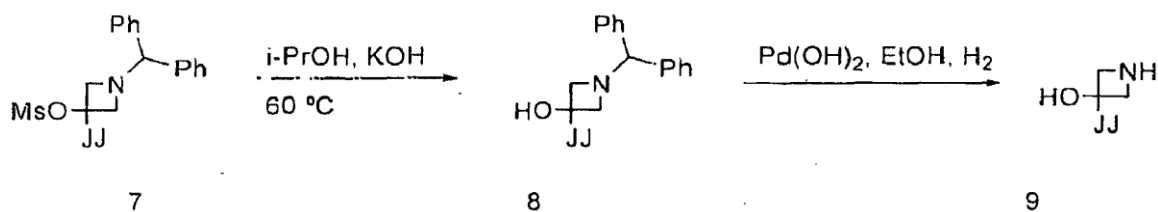
Esquema II



- El Esquema II anterior muestra una ruta general para sintetizar compuestos de fórmula 6 (en el Esquema II), donde JJ corresponde a las sustituciones en la azetidina tal como se describen en la presente y donde R^2 y R^5 son como se definen en la presente. El compuesto de fórmula 5 se combina con un cloruro de acilo adecuado (en el que X'' es Cl) en presencia de piridina para formar un compuesto intermedio que, al mezclarlo en presencia de metóxido de sodio y metanol, forma un compuesto de fórmula 6. En algunas realizaciones, X'' puede ser OH, en cuyo caso se utiliza un reactivo de acoplamiento de ácido adecuado para acoplar el ácido con la amina. Los ejemplos de reactivos de acoplamiento de ácido adecuados incluyen, sin carácter limitante, EDC, DCI y HOBt. Los disolventes adecuados para estas reacciones de acoplamiento incluyen, sin carácter limitante, THF, CH_2Cl_2 y dioxano.

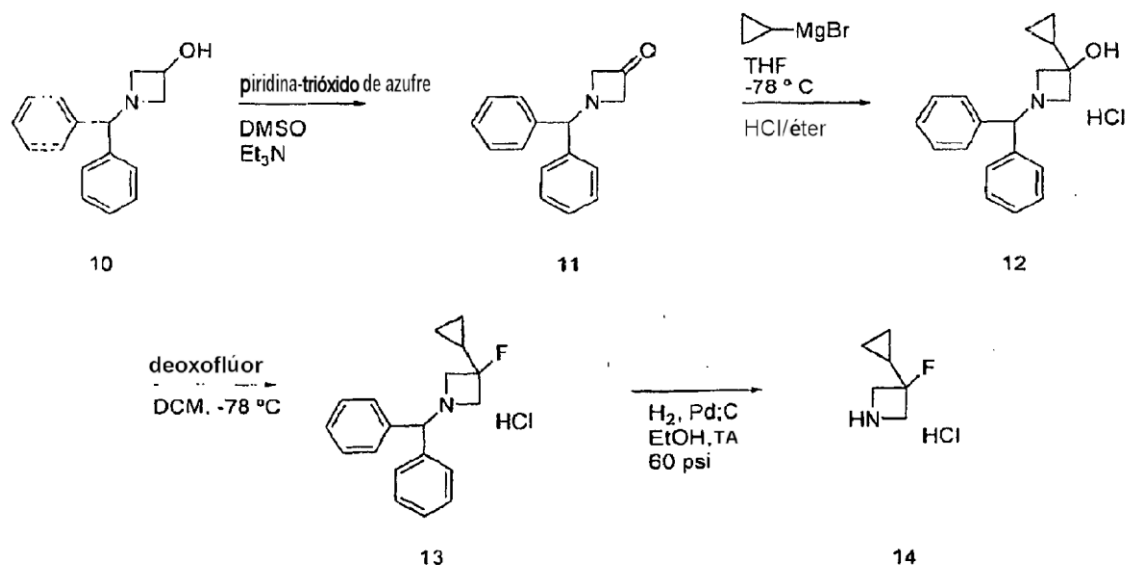
Los siguientes esquemas describen métodos para sintetizar varios tipos de azetidinas. Estas azetidinas se pueden utilizar para formar compuestos de esta invención de acuerdo con los métodos descritos en la presente.

Esquema A



- El Esquema A anterior muestra una ruta general para la síntesis de azetidinas sustituidas con OH en las que JJ es - CHJ^1J^2 o Cy.

Esquema B



El Esquema B representa una ruta general para la síntesis de azetidinas sustituidas con ciclopropilo y fluoro. El compuesto 10 se oxida en condiciones adecuadas para formar el compuesto 11, que, en condiciones de Grignard adecuadas, se combina con ciclopropil-MgBr para formar la azetidina sustituida con ciclopropilo 12. El compuesto 12 se fluora posteriormente en condiciones de fluoración adecuadas para formar 13, que se hidrogena en condiciones de Pd/C para formar la azetidina libre desprotegida 14.

Por consiguiente, esta invención se refiere a procesos para preparar los compuestos de esta invención.

En la técnica se dispone de métodos para evaluar la actividad de los compuestos de esta invención (p. ej., ensayos de cinasas) y estos también se describen en los ejemplos expuestos.

La actividad de los compuestos como inhibidores de proteínas cinasas se puede evaluar *in vitro*, *in vivo* o en una línea celular. Los ensayos *in vitro* incluyen ensayos que determinan la inhibición de la actividad cinasa o la actividad ATPasa de la cinasa activada. En cambio, los ensayos *in vitro* cuantifican la capacidad del inhibidor para unirse a la proteína cinasa y esta se puede medir marcando radioactivamente el inhibidor antes de la unión, aislando el complejo de inhibidor/cinasa y determinando la cantidad de radiomarcador unido, o realizando un experimento competitivo en el que los nuevos inhibidores se incuban con la cinasa unida a radioligandos conocidos.

Otro aspecto de la invención se refiere a la inhibición de la actividad cinasa en una muestra biológica, este método comprende poner en contacto dicha muestra biológica con un compuesto de fórmula I o una composición que comprende dicho compuesto. La expresión "muestra biológica", tal como se utiliza en la presente, se refiere a una muestra *in vitro* o *ex vivo* que incluye, sin carácter limitante, los cultivos celulares o extractos de estos; el material de una biopsia obtenido de un mamífero o extractos de este; y sangre, saliva, orina, heces, semen, lágrimas u otros fluidos corporales, o extractos de estos.

La inhibición de la actividad cinasa en una muestra biológica es útil para diversos fines con los que estará familiarizado un experto en la técnica. Los ejemplos de tales fines incluyen, sin carácter limitante, una transfusión sanguínea, trasplante de órganos, almacenamiento de especímenes biológicos y ensayos biológicos.

La inhibición de la actividad cinasa en una muestra biológica también es útil para el estudio de cinasas en fenómenos biológicos y patológicos; el estudio de los sistemas de transducción de señales intracelulares mediados por dichas cinasas; y la valoración comparativa de nuevos inhibidores de cinasas.

Los inhibidores de proteínas cinasas Aurora o sus sales farmacéuticas se pueden formular en composiciones farmacéuticas para su administración a animales o seres humanos. Estas composiciones farmacéuticas, que comprenden una cantidad de un inhibidor de proteínas Aurora efectiva para tratar o prevenir una afección mediada por Aurora y un portador farmacéuticamente aceptable, constituyen otra realización de la presente invención.

La expresión "afección mediada por Aurora" o "enfermedad mediada por Aurora", tal como se utiliza en la presente, se refiere a toda enfermedad u otra afección perjudicial en la que se sabe que Aurora (Aurora A, Aurora B y Aurora

C) interviene. Tales afecciones incluyen, sin carácter limitante, el cáncer, trastornos proliferativos y trastornos mieloproliferativos.

Los ejemplos de trastornos mieloproliferativos incluyen, sin carácter limitante, policitemia vera, trombocitemia, metaplasia mieloide con mielofibrosis, leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia mielomonocítica crónica, síndrome hipereosinofílico, leucemia mielomonocítica juvenil y mastocitosis sistémica.

El término "cáncer" también incluye, sin carácter limitante, los siguientes cánceres: carcinomas epidermoides bucales: de la cavidad bucal, labios, lengua, boca, faringe; tumores cardíacos: sarcoma (angiosarcoma, fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, liposarcoma), mixoma, rabdomioma, fibroma, lipoma y teratoma; carcinomas broncopulmonares: carcinoma broncogénico (escamocelular o epidermoide, microcítico indiferenciado, de células grandes indiferenciadas, adenocarcinoma), carcinoma alveolar (bronquioalveolar), adenoma bronquial, sarcoma, linfoma, hamartoma condromatoso, mesotelioma; cánceres gastrointestinales: de esófago (carcinoma escamocelular, de laringe, adenocarcinoma, leiomioma, linfoma), estómago (carcinoma, linfoma, leiomioma), páncreas (adenocarcinoma ductal, insulinoma, glucagonoma, gastrinoma, tumores carcinoides, vipoma), intestino delgado (adenocarcinoma, linfoma, tumores carcinoides, sarcoma de Kaposi, leiomioma, hemangioma, lipoma, neurofibroma, fibroma), intestino grueso (adenocarcinoma, adenoma cubular, adenoma vellosos, hamartoma, leiomioma), colon, colon-recto, colorrectal, recto; del sistema genitourinario: riñón (adenocarcinoma, tumor de Wilm [nefroblastoma], linfoma, leucemia), vejiga y uretra (carcinoma escamocelular, carcinoma de células de transición, adenocarcinoma), próstata (adenocarcinoma, sarcoma), testículos (seminoma, teratoma, carcinoma embrionario, teratocarcinoma, coriocarcinoma, sarcoma, carcinoma de células intersticiales, fibroma, fibroadenoma, tumores adenomatoides, lipoma); de hígado: hepatoma (carcinoma hepatocelular), colangiocarcinoma, hepatoblastoma, angiosarcoma, adenoma hepatocelular, hemangioma, vías biliares; de huesos: sarcoma osteogénico (osteosarcoma), fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, linfoma maligno (sarcoma de células reticulares), mieloma múltiple, tumor de células gigantes maligno, cordoma, osteocronfoma (exostosis osteocartilaginosa), condroma benigno, condroblastoma, condromixofibroma, osteoma osteoide y tumores de células gigantes; del sistema nervioso: cráneo (osteoma, hemangioma, granuloma, xantoma, osteítis deformante), meninges (meningioma, meningiosarcoma, gliomatosis), cerebro (astrocitoma, meduloblastoma, glioma, ependimoma, germinoma

[pinealoma], glioblastoma multiforme, oligodendroglioma, schwannoma, retinoblastoma, tumores congénitos), neurofibroma de la médula espinal, meningioma, glioma, sarcoma); ginecológicos: de útero (carcinoma endometrial), cuello uterino (carcinoma cervical, displasia cervical pretumoral), ovarios (carcinoma ovárico [cistadenocarcinoma seroso, cistadenocarcinoma mucinoso, carcinoma no clasificado], tumores de células de la granulosa-teca, tumores de células de Sertoli-Leydig, disgerminoma, teratoma maligno), vulva (carcinoma escamocelular, carcinoma intraepitelial, adenocarcinoma, fibrosarcoma, melanoma), vagina (carcinoma de células claras, carcinoma escamocelular, sarcoma botrioide (rabdomiosarcoma embrionario), trompas de Falopio (carcinoma), mama; hematológicos: sangre (leucemia mieloide [aguda y crónica], leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, enfermedades mieloproliferativas, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico), enfermedad de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano [linfoma maligno], tricoleucemia; trastornos linfoides; cutáneos: melanoma maligno, carcinoma basocelular, carcinoma escamocelular, sarcoma de Kaposi, queratoacantoma, nevo displásico, lipoma, angioma, dermatofibroma, queloides, psoriasis, de la glándula tiroides: carcinoma tiroideo papilar, carcinoma tiroideo folicular; carcinoma tiroideo medular, cáncer tiroideo indiferenciado, neoplasia endocrina múltiple del tipo 2A, neoplasia endocrina múltiple del tipo 2B, cáncer tiroideo medular familiar, feocromocitoma, paraganglioma; y de las glándulas suprarrenales: neuroblastoma. Por tanto, la expresión "célula cancerosa", tal como se contempla en la presente, incluye una célula afectada por una de las afecciones indicadas anteriormente. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona entre el cáncer colorrectal, tiroideo o de mama.

En algunas realizaciones, los compuestos de esta invención son útiles para tratar el cáncer, tal como el cáncer colorrectal, tiroideo, de mama y broncopulmonar; y trastornos mieloproliferativos, tales como la policitemia vera, trombocitemia, metaplasia mieloide con mielofibrosis, leucemia mielógena crónica, leucemia mielomonocítica crónica, síndrome hipereosinofílico, leucemia mielomonocítica juvenil y mastocitosis sistémica.

En algunas realizaciones, los compuestos de esta invención son útiles para tratar trastornos hematopoyéticos, en particular, la leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia promielocítica aguda (LPA) y leucemia linfocítica aguda (LLA).

Además de los compuestos de esta invención, se pueden emplear derivados o profármacos farmacéuticamente aceptables de los compuestos de esta invención en composiciones para tratar o prevenir los trastornos identificados anteriormente.

Los compuestos de esta invención pueden existir en forma libre para el tratamiento, o cuando proceda, como una sal farmacéuticamente aceptable.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", tal como se utiliza en la presente, se refiere a sales de un compuesto que son, dentro del marco de un juicio médico razonable, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de los seres humanos y animales inferiores sin dar lugar a toxicidad, irritación, respuesta alérgica o una reacción similar excesiva, y se ajustan a una relación beneficio/riesgo razonable.

5 La sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de esta invención incluyen aquellas derivadas de bases y ácidos orgánicos e inorgánicos adecuados. Estas sales se pueden preparar *in situ* durante el aislamiento final y la purificación de los compuestos. Las sales de adición de ácidos se pueden preparar 1) haciendo reaccionar el compuesto purificado en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado y 2) aislando la sal formada de este modo.

10 Los ejemplos de sales de adición de ácidos adecuadas incluyen acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, camforato, camforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, formiato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, glicolato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oxalato, palmoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, salicilato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, tosilato y undecanoato. Otros ácidos, tales como el oxálico, aunque no son farmacéuticamente aceptables de por sí, se pueden emplear en la preparación de sales útiles como intermedios para obtener los compuestos de la invención y sus sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables.

20 Las sales de adición de bases se pueden preparar 1) haciendo reaccionar el compuesto purificado en su forma ácida con una base orgánica o inorgánica adecuada y 2) aislando la sal formada de este modo.

La sales derivadas de bases adecuadas incluyen las sales de metales alcalinos (p. ej., sodio y potasio), metales alcalinotérreos

25 (p. ej., magnesio), amonio y N^4 (alquilo C_{1-4})₄. Esta invención también contempla la cuaternización de cualesquiera grupos que contengan nitrógeno básico de los compuestos descritos en la presente. Mediante dicha cuaternización se pueden obtener productos solubles o dispersables en agua o aceite.

30 La sales de adición de bases también incluyen las sales de metales alcalinos o alcalinotérreos. Las sales de metales alcalinos o alcalinotérreos representativas incluyen sales de sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen, cuando proceda, sales de cationes de amonio atóxicos, amonio cuaternario y amónicos formadas utilizando contraiones tales como haluro, hidróxido, carboxilato, sulfato, fosfato, nitrato, sulfonato de alquilo inferior y sulfonato de arilo. Otros ácidos y bases, aunque no sean farmacéuticamente aceptables de por sí, se pueden emplear para preparar sales útiles como intermedios en la obtención de los compuestos de la invención y sus sales de adición de ácidos o bases farmacéuticamente aceptables.

35 Los portadores farmacéuticamente aceptables que se pueden utilizar en estas composiciones farmacéuticas incluyen, sin carácter limitante, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como la albúmina sérica humana, sustancias tamponantes tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato potásico, cloruro sódico, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliacrilatos, ceras, polímeros en bloque de polietileno-polioxiopropileno, polietilenglicol y lanolina.

40 Las composiciones de la presente invención se pueden administrar por vía oral, parenteral, mediante un espray de inhalación, por vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o mediante un reservorio implantado. El término "parenteral", tal como se utiliza en la presente, incluye las técnicas de infusión o inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intraperitoneal, intrahepática, intralesional e intracraneal.

45 Las formas inyectables estériles de las composiciones de esta invención pueden ser suspensiones acuosas u oleaginosas. Estas suspensiones se pueden formular mediante técnicas conocidas en la técnica utilizando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. El preparado inyectable estéril también puede ser una solución o una suspensión inyectable estéril en un disolvente o diluyente parenteralmente aceptable atóxico, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear se encuentra el agua, solución de Ringer y solución de cloruro sódico isotónica. Además, habitualmente se emplean aceites fijos estériles como disolvente o medio de suspensión. Con este fin, se puede emplear un aceite fijo suave que incluya mono- o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos tales como el ácido oleico y sus derivados glicéridos son útiles en la preparación de composiciones inyectables, ya que son aceites farmacéuticamente aceptables naturales, tales como el aceite de oliva o aceite de ricino, en especial en sus versiones polioxiethyladas. Estas soluciones o suspensiones de aceite también pueden contener un alcohol de cadena larga como diluyente o

dispersante, tal como la carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares que se utilizan habitualmente en la formulación de formas farmacéuticas farmacéuticamente aceptables, incluidas emulsiones y suspensiones. También se pueden utilizar otros surfactantes utilizados habitualmente, tales como Tween, Span, y otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad que se utilizan habitualmente en la elaboración de formas farmacéuticas sólidas, líquidas o de otro tipo farmacéuticamente aceptables a efectos de su formulación.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar por vía oral en cualquier forma farmacéutica oralmente aceptable que incluye, sin carácter limitante, cápsulas, comprimidos, suspensiones o soluciones acuosas. En el caso de los comprimidos de uso oral, los portadores de uso habitual pueden incluir lactosa y almidón de maíz. También se pueden añadir agentes lubricantes tales como el estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsulas, los diluyentes útiles pueden incluir lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se requieren suspensiones acuosas para el uso oral, el principio activo se puede combinar con agentes emulsionantes o de suspensión. Si se desea, también se pueden añadir ciertos agentes edulcorantes, saborizantes o colorantes.

Como alternativa, las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar en forma de supositorios para la administración rectal. Estos se pueden preparar mezclando el agente con un excipiente no irritante adecuado que sea sólido a temperatura ambiente pero líquido a la temperatura rectal y que, por lo tanto, se derretirá en el recto para liberar el fármaco. Tales materiales pueden incluir manteca de cacao, cera de abejas y polietilenglicoles.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención también se pueden administrar por vía tópica, especialmente cuando la diana del tratamiento incluya zonas u órganos a los que se puede acceder fácilmente mediante la aplicación tópica, entre estas dianas se encuentran las enfermedades de los ojos, la piel o el tubo digestivo bajo. Se pueden preparar formulaciones tópicas adecuadas para cada una de estas zonas u órganos.

La aplicación tópica en el tubo digestivo bajo se puede conseguir mediante una formulación en forma de supositorio rectal (véase más arriba) o en una formulación en forma de enema adecuada. También se pueden utilizar parches transdérmicos tópicos.

Para las aplicaciones tópicas, las composiciones farmacéuticas se pueden formular en una pomada adecuada que contenga el componente activo suspendido o disuelto en uno o más portadores. Los portadores para la administración tópica de los compuestos de esta invención pueden incluir, sin carácter limitante, aceite mineral, petrolato líquido, petrolato blanco, propilenglicol, un compuesto polioxietilénico, polioxipropilénico, cera emulsionante y agua. Como alternativa, las composiciones farmacéuticas se pueden formular en una loción o crema adecuada que contenga los componentes activos suspendidos o disueltos en uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Los portadores aceptables pueden incluir, sin carácter limitante, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

Para el uso oftálmico, las composiciones farmacéuticas se pueden formular como suspensiones micronizadas en solución salina estéril con pH regulado isotónica o como soluciones en solución salina estéril con pH regulado isotónica, ya sea con o sin un conservante tal como cloruro de benzalconio. Como alternativa, para los usos oftálmicos, las composiciones farmacéuticas se pueden formular en una pomada tal como petrolato.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención también se pueden administrar mediante un aerosol nasal o por inhalación. Tales composiciones se pueden preparar como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes, promotores de la absorción para incrementar la biodisponibilidad, fluorocarburos y/u otros agentes lubricantes o dispersantes adecuados.

La cantidad de inhibidor de cinasas que se puede combinar con los materiales portadores para producir una única forma farmacéutica variará dependiendo del huésped que se haya de tratar, la vía de administración particular y la indicación. En una realización, las composiciones se deben formular de modo que se pueda administrar una dosis comprendida entre 0,01-100 mg/kg de peso corporal/día del inhibidor a un paciente que reciba estas composiciones. En otra realización, las composiciones se deben formular de modo que se pueda administrar una dosis comprendida entre 0,1-100 mg/kg de peso corporal/día del inhibidor a un paciente que reciba estas composiciones.

También se sobreentenderá que una dosis y un régimen de tratamiento específicos para un paciente particular dependerán de diversos factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos y el criterio del médico terapeuta y la gravedad de la enfermedad particular que se esté tratando. La cantidad de inhibidor también dependerá del compuesto particular que contenga la composición.

Los compuestos de la invención se pueden utilizar en métodos para tratar o prevenir el cáncer, un trastorno proliferativo o un trastorno mieloproliferativo que comprenden el paso de administrar a un paciente uno de los compuestos o las composiciones farmacéuticas que se describen en la presente.

El término "paciente", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un animal e incluye un ser humano.

En algunas realizaciones, dicho método se utiliza para tratar o prevenir un trastorno hematopoyético tal como la leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia promielocítica aguda (LPA), leucemia mielógena crónica (LMC) o leucemia linfocítica aguda (LLA).

- 5 En otras realizaciones, dicho método se utiliza para tratar o prevenir trastornos mieloproliferativos, tales como la policitemia vera, trombocitemia, metaplasia mieloide con mielofibrosis, leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia mielomonocítica crónica, síndrome hipereosinofílico, leucemia mielomonocítica juvenil y mastocitosis sistémica.

10 En otras realizaciones adicionales, dicho método se utiliza para tratar o prevenir el cáncer, tal como los cánceres de mama, colon, próstata, piel, páncreas, cerebro, sistema genitourinario, sistema linfático, estómago, laringe y pulmón, incluidos el adenocarcinoma de pulmón, el carcinoma microcítico de pulmón y el carcinoma no microcítico de pulmón.

Otra realización proporciona un método para tratar o prevenir el cáncer que comprende el paso de administrar a un paciente un compuesto de fórmula I o una composición que comprende dicho compuesto.

- 15 Los compuestos de la invención se pueden utilizar para inhibir la actividad cinasa en un paciente, dicho método comprende administrar al paciente un compuesto de fórmula I o una composición que comprende dicho compuesto. En algunas realizaciones, dicha cinasa es una cinasa Aurora (Aurora A, Aurora B, Aurora C), Abl, Abl (T315I), Arg, FLT-3, JAK-2, MLK1, PLK4, Tie2 o TrkA.

20 Dependiendo de las afecciones particulares que se deseen tratar o prevenir, se pueden administrar fármacos adicionales junto con los compuestos de esta invención. En algunos casos, estos fármacos adicionales normalmente se administran para tratar o prevenir la misma afección. Por ejemplo, se pueden combinar agentes quimioterápicos u otros agentes antiproliferativos con los compuestos de esta invención para tratar enfermedades proliferativas.

25 Otro aspecto de esta invención se refiere a un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesite, que comprende la administración secuencial o conjunta de un compuesto de esta invención o una sal farmacéuticamente aceptable de este y otro agente terapéutico. En algunas realizaciones, dicho agente terapéutico adicional se selecciona entre un agente anticanceroso, un agente antiproliferativo o un agente quimioterápico.

En algunas realizaciones, dicho agente terapéutico adicional se selecciona entre camptotecina, el inhibidor de MEK: U0126, un inhibidor de KSP (proteína cinesina del huso), adriamicina, interferones y derivados del platino, tales como cisplatino.

- 30 En otras realizaciones, dicho agente terapéutico adicional se selecciona entre taxanos; inhibidores de bcr-abl (tales como Gleevec, dasatinib y nilotinib); inhibidores de EGFR (tales como Tarceva e Iressa); agentes que dañan el ADN (tales como cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, inhibidores de topoisomerasas y antraciclinas); y antimetabolitos (tales como AraC y 5-FU).

35 En otras realizaciones más, dicho agente terapéutico adicional se selecciona entre camptotecina, doxorubicina, idarubicina, cisplatino, taxol, taxotere, vincristina, tarceva y el inhibidor de MEK, U0126, un inhibidor de KSP, vorinostat, Gleevec, dasatinib y nilotinib.

- 40 En otra realización, dicho agente terapéutico adicional se selecciona entre inhibidores de Her-2 (tales como Herceptin); inhibidores de HDAC (tales como vorinostat), inhibidores de VEGFR (tales como Avastin), inhibidores de c-KIT y FLT-3 (tales como sunitinib), inhibidores de BRAF (tales como BAY 43-9006 de Bayer), inhibidores de MEK (tales como PD0325901 de Pfizer); y venenos del huso (tales como epotilonas y partículas de paclitaxel unidas a proteínas (tales como Abraxane^b).

45 Otras terapias o agentes anticancerosos que se pueden utilizar combinados con los agentes anticancerosos novedosos de la presente invención incluyen cirugía, radioterapia (pero en algunos ejemplos, radiación gamma, radioterapia con haz de neutrones, radioterapia con haz de electrones, terapia con protones, braquiterapia, isótopos radiactivos sistémicos, entre otros), terapia endocrina, modificadores de la respuesta biológica (interferones, interleucinas y el factor de necrosis tumoral (TNF), entre otros), hipertermia y crioterapia, agentes que atenúan los posibles efectos adversos (p. ej., antieméticos), y otros fármacos quimioterápicos autorizados que incluyen, sin carácter limitante, fármacos alquilantes (mecloretamina, clorambucilo, ciclofosfamida, melfalán, ifosfamida), antimetabolitos (metotrexato), antagonistas purínicos y antagonistas pirimidínicos (6-mercaptopurina, 5-fluorouracilo, citarabina, gemcitabina), venenos del huso (vinblastina, vincristina, vinorelbina, paclitaxel), podofilotoxinas (etopósido, irinotecán, topotecán), antibióticos (doxorubicina, bleomicina, mitomicina), nitrosoureas (carmustina, lomustina), iones inorgánicos (cisplatino, carboplatino), enzimas (asparaginasa) y hormonas (tamoxifeno, leuprolida, flutamida y megestrol), GleevecTM, dexametasona y ciclofosfamida.

- Un compuesto de la presente invención también puede ser útil para tratar el cáncer combinado con uno de los siguientes agentes terapéuticos: abarelix (Plenaxis depot[®]); aldesleucina (Prokine[®]); aldesleucina (Proleukin[®]); alemtuzumab (Campath[®]); alitretinoína (Panretin[®]); alopurinol (Zyloprim[®]); altretamina (Hexalen[®]); amifostina (Ethyo[®]); anastrozol (Arimidex[®]); trióxido arsénico (Trisenox[®]); asparaginasa (Elspar[®]); azacitidina (Vidaza[®]); bevacuzimab (Avastin[®]); cápsulas de bexaroteno (Targretin[®]); bexaroteno en gel (Targretin[®]); bleomicina (Blenoxane[®]); bortezomib (Velcade[®]); busulfano intravenoso (Busulfex[®]); busulfano oral (Myleran[®]); calusterona (Methosarb[®]); capecitabina (Xeloda[®]); carboplatino (Paraplatin[®]); carmustina (BCNU[®], BiCNU[®]); carmustina (Gliadel[®]); carmustina con implante de polifeprosán 20 (Gliadel Wafer[®]); celecoxib (Celebrex[®]); cetuximab (Erbix[®]); clorambucilo (Leukeran[®]); cisplatino (Platinol[®]); cladribina (Leustatin[®], 2-CdA[®]); clofarabina (Clolar[®]); ciclofosfamida (Cytoxan[®], Neosar[®]); ciclofosfamida (Cytoxan Injection[®]); ciclofosfamida (Cytoxan Tablet[®]); citarabina (Cytosar-U[®]); citarabina liposomal (DepoCyt[®]); dacarbazina (DTIC-Dome[®]); dactinomicina, actinomicina D (Cosmegen[®]); darbepoetina alfa (Aranesp[®]); daunorrubicina liposomal (DanuoXome[®]); daunorrubicina, daunomicina (Daunorubicin[®]); daunorrubicina, daunomicina (Cerubidine[®]); Denileucina difitox (Ontak[®]); dexrazoxano (Zinecard[®]); docetaxel (Taxotere[®]); doxorubicina (Adriamycin PFS[®]); doxorubicina (Adriamycin[®], Rubex[®]); doxorubicina (Adriamycin PFS Injection[®]); doxorubicina liposomal (Doxil[®]); propionato de dromostanolona (dromostanolone[®]); propionato de dromostanolona (masterone injection[®]); solución B de Elliot (Elliott's B Solution[®]); epirubicina (Ellence[®]); epoetina alfa (epogen[®]); erlotinib (Tarceva[®]); estramustina (Emcyt[®]); fosfato de etopósido (Etopophos[®]); etopósido, VP-16 (Vepesid[®]); exemestano (Aromasin[®]); filgrastim (Neupogen[®]); floxuridina (intraarterial) (FUDR[®]); fludarabina (Fludara[®]); fluorouracilo, 5-FU (Adrucil[®]); fulvestrant (Faslodex[®]); gefitinib (Iressa[®]); gemcitabina (Gemzar[®]); gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg[®]); acetato de goserelina (Zoladex Implant[®]); acetato de goserelina (Zoladex[®]); acetato de histrelina (Histrelin implant[®]); hidroxiurea (Hydrea[®]); Ibritumomab Tiuxetan (Zevalin[®]); idarrubicina (Idamycin[®]); ifosfamida (IFEX[®]); mesilato de imatinib (Gleevec[®]); interferón alfa 2a (Roferon A[®]); interferón alfa-2b (Intron A[®]); irinotecán (Camptosar[®]); lenalidomida (Revlimid[®]); letrozol (Femara[®]); leucovorina (wellcovorin[®], Leucovorin[®]); acetato de leuprolida (Eligard[®]); levamisol (Ergamisol[®]); lomustina, CCNU (CeeBU[®]); mecloretamina, mostaza nitrogenada (Mustargen[®]); acetato de megestrol (Megace[®]); melfalán, L-PAM (Alkeran[®]); mercaptopurina, 6-MP (Purinethol[®]); mesna (Mesnex[®]); mesna (Mesnex tabs[®]); metotrexato (Methotrexate[®]); metoxsaleno (Uvadex[®]); mitomicina C (Mutamycin[®]); mitotano (Lysodren[®]); mitoxantrona (Novantrone[®]); fenpropionato de nandrolona (Durabolin-50[®]); nelarabina (Arranon[®]); Nofetumomab (Verluma[®]); oprelvecina (Neumega[®]); oxaliplatino (Eloxatin[®]); paclitaxel (Paxene[®]); paclitaxel (Taxol[®]); partículas de paclitaxel unidas a proteínas (Abraxane[®]); palifermina (Kepivance[®]); pamidronato (Aredia[®]); pegademasa (Adagen (Pegademase Bovine[®]); pegaspargasa (Oncaspar[®]); Pegfilgrastim (Neulasta[®]); pemetrexed disódico (Alimta[®]); pentostatina (Nipent[®]); pipobromán (Vercyte[®]); plicamicina, mitramicina (Mithracin[®]); porfimer sódico (Photofrin[®]); procarbazona (Matulane[®]); quinacrina (Atabrine[®]); rasburicasa (Elitek[®]); Rituximab (Rituxan[®]); sargramostim (Leukine[®]); sargramostim (Prokine[®]); sorafenib (Nexavar[®]); estreptozocina (Zanosar[®]); maleato de sunitinib (Sutent[®]); talco (Sclerosol[®]); tamoxifeno (Nolvadex[®]); temozolomida (Temodar[®]); tenipósido, VM-26 (Vumon[®]); testolactona (Teslac[®]); tioguanina, 6-TG (Thioguanine[®]); tiotepa (Thiopex[®]), topotecán (Hycamtin[®]); toremifeno (Fareston[®]); tositumomab (Bexxar[®]); tositumomab/I-131 tositumomab (Bexxar[®]); trastuzumab (Herceptin[®]); tretinoína, ATRA (Vesanoid[®]); mostaza de uracilo (Uracil Mustard Capsules[®]); valrubicina (Valstar[®]); vinblastina (Velban[®]); vincristina (Oncovin[®]); vinorelbina (Navelbine[®]); zoledronato (Zometa[®]) y vorinostat (Zolinza[®]).
- Para consultar un análisis más completo sobre las terapias contra el cáncer actualizadas remítase a <http://www.nci.nih.gov/>, una lista de los fármacos oncológicos autorizados por la FDA en <http://www.fda.gov/cder/cancer/druglistframe.htm> y el Manual de Merck, 17.^a Ed. 1999.

Otra realización proporciona un uso simultáneo, independiente o secuencial de un preparado combinado.

- Estos agentes adicionales se pueden administrar por separado, como parte de un régimen multidosis, respecto al compuesto o la composición que contiene el inhibidor de cinasas. Como alternativa, estos agentes pueden formar parte de una única forma farmacéutica, mezclados con el inhibidor de cinasas en una única composición.

Para comprender mejor esta invención, se exponen los siguientes ejemplos preparativos y de ensayo. Estos ejemplos son a efectos meramente ilustrativos.

Ejemplos

- El término "t_R (min)", tal como se utiliza en la presente, se refiere al tiempo de retención de HPLC, en minutos, asociado con el compuesto. A menos que se indique lo contrario, el método de HPLC empleado para obtener el tiempo de retención indicado es el siguiente:

Columna: Columna C8 de ACE, 4,6 x 150 mm

Gradiente: 0-100% de acetonitrilo+metanol 60:40 (Tris fosfato 20 mM)

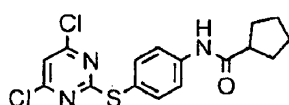
Flujo: 1,5 mL/minuto

Detección: 225 nm.

Las muestras de espectrometría de masas se analizaron en un microespectrómetro de masas MicroMass Quattro que operaba en modo MS simple con ionización por electronebulización. Las muestras se introdujeron en el espectrómetro de masas mediante cromatografía. La fase móvil para todos los análisis por espectrometría de masas consistió en acetato de amonio 10 mM pH 7 y una mezcla 1:1 de acetonitrilo-metanol, las condiciones del gradiente de la columna fueron un 5%-100% de acetonitrilo-metanol con una duración del gradiente de 3,5 min y un tiempo de análisis de 5 min en una columna ACE C8, 3,0 x 75 mm. El flujo fue de 1,2 mL/min.

Los espectros de ^1H -RMN se registraron a 400 MHz con un equipo Bruker DPX 400. Los siguientes compuestos de fórmula I se prepararon y se analizaron como se indica a continuación.

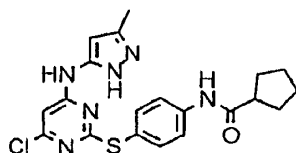
Ejemplo 1



N-(4-(4,6-dicloropirimidin-2-iltio)fenil)ciclopentanocarboxamida

Una solución de 4,6-dicloro-2-(metilsulfonil)pirimidina (1,96 g, 8,69 mmol) y *N*-(4-mercaptofenil)ciclopentanocarboxamida (2,06 g, 8,69 mmol) en acetonitrilo (40 mL) se enfrió hasta 0 °C. Se añadió trietilamina (0,88 g, 8,69 mmol, 1,21 mL) gota a gota y la solución se agitó durante 10 min a 0 °C durante 10 min y a continuación a temperatura ambiente durante 2 h. Se añadió agua (15 mL) y la suspensión se filtró, se lavó con agua (30 mL) y después se secó para obtener el compuesto del título como un sólido de color amarillo claro (1,87 g, 49%). ^1H RMN (DMSO- d_6) 1,50- 1,61 (2H, m), 1,65 – 1,78 (4H, m), 1,82 – 1,93 (2H, m), 2,76 – 1,82 (1H, m), 7,52 (2H, d), 1,70 – 1,75 (3H, m), 10,08 (1H, s). ES^+ 368.

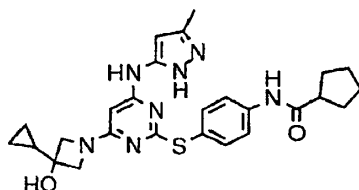
Ejemplo 2



N-(4-(4-(3-metil-1H-pirazol-5-ilamino)-6-cloropirimidin-2-iltio)fenil)ciclopentanocarboxamida

A una solución de 3-metil-1H-pirazol-5-amina (160 mg, 1,63 mmol) y *N*-(4,6-dicloropirimidin-2-iltio)fenil)ciclopentanocarboxamida (600 mg, 1,63 mmol) en dimetilformamida (10 mL) se añadió diisopropiletilamina (248 mg, 1,96 mmol, 0,34 mL). A continuación la mezcla se calentó hasta 80 °C durante 18 h y se dejó enfriar hasta TA. Se añadió EtOAc (40 mL), se lavó con salmuera, se secó (MgSO_4) y se concentró al vacío. El producto crudo se purificó posteriormente mediante cromatografía flash con 7:3 de EtOAc:hexano Δ EtOAc Δ 5% de MeOH:EtOAc para obtener el compuesto del título como un sólido blanquecino (431 mg, 62%). ^1H RMN (DMSO- d_6) 1,50 – 1,55 (2H, m), 1,61 – 1,78 (4H, m), 1,79 – 1,85 (2H, m), 1,90 (3H, sa), 2,72 – 1,81 (1H, m), 5,21 (1H, sa), 6,46 (1H, sa), 7,52 (2H, d), 7,78 (2H, d), 10,11 (1H, s), 10,18 (1H, sa), 11,95 (1H, sa). ES^+ 429.

Ejemplo 3



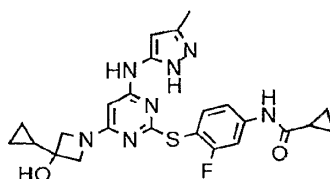
N-(4-((4-(3-metil-1H-pirazol-5-ilamino)-6-(3-ciclopropil-3-hidroxiazetidín-1-il)pirimidin-2-il)sulfanil)fenil)ciclopentanocarboxamida (I-9)

- 5 A una suspensión de *N*-(4-(4-(3-metil-1*H*-pirazol-5-ilamino)-6-cloropirimidin-2-iltio)fenil)ciclopentanocarboxamida (200 mg, 0,47 mmol) y clorhidrato de 3-ciclopropilazetidin-3-ol (70 mg, 0,47 mmol) en *n*-BuOH (5 mL) se añadió diisopropiletilamina (239 mg, 1,88 mmol, 0,30 mL). La mezcla se calentó hasta 100 °C durante 16 h, después se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se diluyó con EtOAc (30 mL) y NaHCO₃ sat. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. Posteriormente el producto crudo se purificó mediante cromatografía flash con EtOAc Δ 5% de MeOH:EtOAc para obtener el compuesto del título como un sólido blanquecino (70 mg, 30%). ¹H RMN (DMSO-*d*₆) 0,30 - 0,35 (2H, m), 0,39 - 0,44 (2H, m), 1,16 1,21 (1H, m), 1,56 - 1,75 (6H, m), 1,83 - 1,90 (2H, m), 2,00 (3H, s), 2,76 - 2,82 (1H, m), 3,65 (4H, dd), 5,35 (1H, s), 5,58 (1H, s), 7,47 (2H, d), 7,72 (2H, d), 9,19 (1H, s), 10,06 (1H, s), 11,65 (1H, s). ES⁺ 506.
- 10 La Tabla 2 que se presenta a continuación muestra datos de ciertos compuestos ilustrativos sintetizados de acuerdo con el método descrito en el Esquema I y los Ejemplos 1-3. Los números de los compuestos corresponden a los compuestos representados en la Tabla 1.

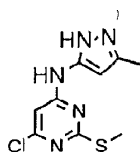
Tabla 2

N. ^o de compuesto	M+1 (obs)	¹ H RMN	t _R (min)
I-1	496,00	(DMSO- <i>d</i> ₆): 0,98 (9H, s), 1,10 (3H, t), 1,66 (2H, sa), 1,98 (3H, sa), 2,34 (2H, c), 3,69 (2H, d), 3,83 (2H, d), 5,35 (1H, sa), 5,70 (1H, s), 5,75 (1H, sma), 7,46 (2H, d), 7,70 (2H, d), 9,18 (1H, sa), 10,08 (1H, s), 11,68 (1H, sa)	8,93
I-2	466,00	(DMSO- <i>d</i> ₆): 0,29-0,33 (2H, m), 0,40-0,49 (2H, m), 1,10 (3H, t), 1,18-1,21 (1H, m), 1,99 (3H, sa), 2,34 (2H, c), 3,63 (2H, d), 3,68 (2H, d), 5,36 (1H, s), 5,60 (1H, s), 7,47 (2H, d), 7,70 (2H, d), 9,21 (1H, sa), 10,08 (1H, s), 11,67 (1H, sa),	7,63
I-3	494,50	(DMSO- <i>d</i> ₆): 1,15 (311,t), 1,3-1,4 (2H,m), 1,5-1,8 (6H,m), 2,02 (3H,s), 2,17-2,23 (1H,m), 2,42 (2H,q), 3,68 (2H,d), 3,82 (2H,d), 5,5 (1H,s), 5,65 (111,s), 5,72 (1H,brs), 7,52 (2H,d), 7,78 (2H,d), 9,22 (1H,brs), 10,12 (1H,s), 11,7 (1H,brs)	8,9
I-4	454,00	(DMSO- <i>d</i> ₆): 0,89 (3H, t), 1,10 (3H, t), 1,65 (2H, ca), 1,99 (3H, sa), 2,35 (211, c), 3,64 (2H, d), 3,75 (2H, d), 5,38 (1H, sa), 5,51 (1H, s), 5,62 (1H, sma), 7,47 (2H, d), 7,70 (2H, d), 9,16 (1H, sa), 10,05 (1H, sa), 11,65 (1H, sa)	7,87
I-5	468,00	(DMSO- <i>d</i> ₆): 0,87 (6H, d), 1,10 (3H, t), 1,81 (111, sep), 1,99 (311, sa), 2,34 (2H, c), 3,61 (2H, d), 3,81 (211, d), 5,37 (1H, sa), 5,47 (1H, sa), 5,63 (1H, sma), 7,47 (2H, d), 7,70 (2H, d), 9,17 (1H, sa), 10,05 (1H, s), 11,65 (111, sa)	8,35
I-6	482,49	(DMSO- <i>d</i> ₆): 0,90-0,83 (6 H, m), 1,12-1,08 (4H, m), 1,54-1,46 (2 H, m), 2,02 (3 H, s), 2,35 (2 H, c), 3,14 (1 H, ma), 3,68 (2 H, t), 3,88 (2 H, t), 5,40 (1 H, s), 5,61 (1 H, sa), 7,50 (2 H, d), 7,72 (2 11, d), 9,63 (1 H, sa), 10,14 (1 H, s),	8,830
I-7	492,84	(DMSO- <i>d</i> ₆): 0,32 (2H, d), 0,41 (2H, d), 0,53 (2H, d), 0,82 (2H, d), 1,08 (3H, t), 1,20 (111, m), 1,70 (111, m), 2,34 (211, c), 3,65 (4H, c), 5,34 (1H, s), 5,68 (1H, sa), 7,52 (211, d), 7,71 (2H, d), 9,33 (1H, s), 10,04 (1H, s)	8,402
I-8	478,78	(DMSO- <i>d</i> ₆): 0,34 (2H, d), 0,40 (2H, d), 0,81 (4H, d), 1,19 (1H, m), 1,81 (1H, m), 2,01 (3H, s), 3,66 (4H, c), 5,40 (1H, s), 5,61 (1H, sa), 7,48 (2H, d), 7,71 (2H, d), 9,37 (1H, s), 10,39 (1H, s)	8,229
I-9	506,00	(DMSO- <i>d</i> ₆): 0,30 - 0,35 (2H, m), 0,39 - 0,44 (2H, m), 1,16 - 1,21 (1H, m), 1,56 - 1,75 (6H, m), 1,83 - 1,90 (2H, m), 2,00 (3H, s), 2,76 - 2,82 (1H, m), 3,65 (4H, dd), 5,35 (1H, s), 5,58 (1H, s), 7,47 (2H, d), 7,72 (2H, d), 9,19 (1H, s), 10,06 (1H, s), 11,65 (1H, s)	8,938
I-10	504,83	(DMSO- <i>d</i> ₆): 0,32 (2H, d), 0,42 (2H, d), 0,55 (2H, m), 0,82 (611, m), 1,19 (1H, m), 1,70 (1H, m), 1,80 (1H, m), 3,65 (4H, c), 5,43 (1H, s), 5,65 (1H, sa), 7,47 (2H, d), 7,69 (2H, d), 9,68 (1H, s), 10,42 (1H, s)	8,544

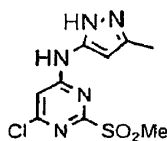
N.º de compuesto	M+1 (obs)	¹ H RMN	t _R (min)
I-12	514,80	(DMSO- <i>d</i> ₆): 0,35-0,41 (2H, m), 0,45-0,51 (2H, m), 1,2-1,28 (2H, s), 2,1-2,15 (5H, m), 2,8-2,9 (1H, m), 3,68-3,75 (4H, m), 5,45 (1H, s), 5,65 (1H, sa), 7,58 (2H, d), 7,78 (2H, d), 9,23 (1H, sa), 10,7 (1H, s), 11,7 (1H, sa)	8,18
I-13	480,00	(MeOD): 0,40-0,45 (2H, m), 0,57-0,62 (2H, m), 0,80-0,85 (2H, m), 0,90-0,95 (2H, m), 1,30-1,40 (1H, m), 1,80-1,85 (1H, m), 2,05-2,10 (1H, s), 3,80-4,00 (4H, m), 5,40-5,50 (2H, m), 7,50-7,55 (2H, d), 7,65-7,70 (2H, d)	9,148
I-14	522,00	(MeOD): 0,40-0,45 (2H, m), 0,60-0,65 (2H, m), 1,3-1,4 (1H, m), 2,05 (2H, s), 3,25-3,40 (2H, m), 3,85-3,40 (4H, m), 5,40-5,50 (2H, m), 7,50-7,55 (2H, d), 7,65-7,70 (2H, d)	9,235
I-15	548,00	(MeOD): 0,35-0,40 (2H, m), 0,55-0,60 (2H, m), 1,25-1,35 (6H, m), 2,0 (3H, m), 3,80-3,90 (4H, m), 5,35-5,40 (2H, m), 7,45-7,50 (2H, d), 7,60-7,65 (2H, d)	9,715
I-16	468,40	CD ₃ OD: 0,80 (2H, m), 1,10 (2H, d), 1,65 (3H, t), 1,90 (1H, m), 2,50 (3H, s), 2,88 (2H, c), 4,40 (4H, m), 5,94 (2H, m), 7,49 (2H, d), 8,10 (2H, d)	9,035
I-17	536,36	(DMSO- <i>d</i> ₆): 0,42-0,46 (2H, m), 0,60-0,63 (2H, m), 1,4(1H, m), 1,98 (3H, s), 2,59-2,68 (4H, m), 3,80-3,93 (4H, m), 5,36 (1H, sa), 5,75 (1H, sa), 7,50-7,52 (2, d), 7,69-7,71 (2H, d), 9,37 (1H, s), 10,31 (1H, s) y 11,75 (1H, sa)	9,58

Ejemplo 4

N-(4-((4-(3-metil-1H-pirazol-5-ilamino)-6-(3-ciclopropil-3-hidroxiazetidin-1-il)pirimidin-2-il)sulfanil)-3-fluorofenil)ciclopropanocarboxamida (I-11)

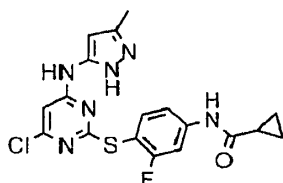
**6-Chloro-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-2-(metiltio)pirimidin-4-amina**

A una solución agitada de 4,6-dicloro-2-(metiltio)pirimidina (25 g, 0,128 mol) en DMF (100 mL) se añadió diisopropilamina (19,8 g, 0,154 mol) seguida de 3-amino-5-metilpirazol (13,7 g, 0,154 mol) en porciones en 10 minutos. La solución se calentó hasta 50 °C durante 16 horas, periodo tras el cual todo el material de partida había reaccionado (por análisis de LC/MS). La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente y se vertió en agua (250 mL). El precipitado se filtró y el sólido húmedo se suspendió en éter dietílico (300 mL). El sólido se volvió a filtrar de nuevo y se volvió a suspender en metanol (100 mL). El producto filtrado se secó al aire sobre el filtro sinterizado y a continuación se secó aún más al vacío. De este modo se obtuvo el compuesto del título como un sólido blanquecino (22,1g, 66% de rendimiento). ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ 2,22 (3H, s, CH₃), 3,31 (3H, s, CH₃), 6,00-7,50 (2H, a, CH), 10,17 (1H, s, NH), 12,10 (1H, s, NH); MS ES⁺ 256,08, ES⁻ 254,25.



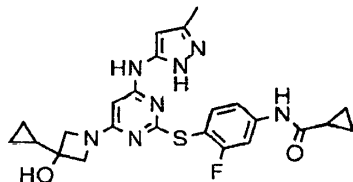
6-Cloro-*N*-(3-metil-1*H*-pirazol-5-il)-2-(metilsulfonil)pirimidin-4-amina

A una suspensión agitada de 6-cloro-*N*-(3-metil-1*H*-pirazol-5-il)-2-(metilsulfonil)pirimidin-4-amina (8 g, 31,2 mmol) en metanol (200 mL) a 0 °C se añadió una suspensión de Oxone (44 g, 71,7 mmol) en agua (100 mL) en porciones en 10 minutos. La mezcla se agitó durante 30 minutos a 0 °C, y después se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas más. La mezcla de reacción se filtró y el sólido resultante se suspendió en bicarbonato sódico acuoso. La mezcla se filtró y el sólido se lavó con agua seguida de éter dietílico. El sólido se suspendió en acetato de etilo, se filtró y se secó. De este modo se obtuvo el producto del título como un sólido blanquecino (7,9 g, 88%); ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ 2,24 (3H, s), 3,35 (3H, s), 5,85 (0,5H, sa), 6,50 (0,5H, sa), 6,95 (0,5H, sa), 8,00 (0,5H, sa), 10,95 (1H, s), 12,28 (1H, s); MS ES⁺ 288,07, ES⁻ 286,25.



N-(4-(4-(3-metil-1*H*-pirazol-5-ilamino)-6-cloropirimidin-2-iltio)-3-fluorofenil)ciclopropanocarboxamida

Una solución de *N*-(3-fluoro-4-mercaptofenil)ciclopropanocarboxamida (1,0 g, 4,8 mmol) y 6-cloro-*N*-(3-metil-1*H*-pirazol-5-il)-2-(metilsulfonil)pirimidin-4-amina (1,4 g, 4,8 mmol) en *t*-butanol (10 mL) se calentó a 70 °C durante 18 h. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente, después se diluyó con EtOAc (60 mL), se lavó con solución saturada de NaHCO₃ (30 mL) y salmuera (30 mL), se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en sílice (20-60% de EtOAc/éter de petróleo) para obtener el compuesto del título como un sólido blanco (800 mg, 40%). ES⁺ 419.



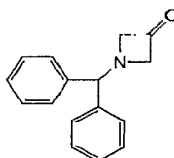
N-(4-((4-(3-metil-1*H*-pirazol-5-ilamino)-6-(3-ciclopropil-3-hidroxiazetidín-1-il)pirimidin-2-il)sulfanil)-3-fluorofenil)ciclopropanocarboxamida (I-11)

Una mezcla de *N*-(4-(4-(3-metil-1*H*-pirazol-5-ilamino)-6-cloropirimidin-2-iltio)-3-fluorofenil)ciclopropanocarboxamida (160 mg, 0,38 mmol), clorhidrato de 3-cicloropilazetidín-3-ol (70 mg, 0,49 mmol) y DIPEA (0,20 mL) en *n*-butanol (1,5 mL) se calentó en un microondas a 130 °C durante 1 h. A continuación la mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente, se diluyó con EtOAc (20 mL), se lavó con solución saturada de NaHCO₃ (10 mL), agua (2 x 10 mL) y salmuera (10 mL), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en sílice (30-80% de EtOAc/éter de petróleo) para obtener el compuesto del título como un sólido blanco (55 mg, 29%). ¹H RMN (DMSO-*d*₆) 0,33-0,36 (2 H, m), 0,42-0,48 (2 H, m), 0,82-0,86 (4 H, m), 1,21-1,24 (2 H, m), 1,85-1,89 (1 H, m), 2,08 (3 H, s), 2,10-2,15 (1 H, m), 3,66-3,75 (4 H, m), 5,42 (1 H, sa), 5,67 (1 H, 1 H, s), 5,8 (1 H, sa), 7,42 (1 H, d), 7,52-7,58 (1 H, m), 7,75 (1 H, d), 9,27 (1 H, s), 10,65 (1 H, s), 11,9 (1 H, sa). ES⁺ 496,90.

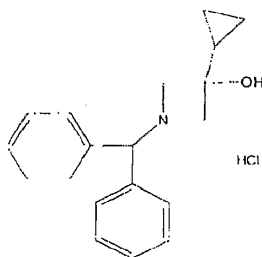
La Tabla 3 que se presenta a continuación muestra datos de ciertos compuestos representativos sintetizados de acuerdo con el método descrito en el Esquema general (Método B) y en el Ejemplo 6. Los números de los compuestos corresponden a los compuestos representados en la Tabla 1.

Tabla 3

N.º de compuesto	M+1 (obs)	¹ H RMN	t _R (min)
I-11	496,90	(DMSO- <i>d</i> ₆): 0,33-0,36 (2H, m), 0,42-0,48 (2H, m), 0,82-0,86 (4H, m), 1,21-1,24 (2H, m), 1,85-1,89 (1H, m), 2,08 (3H, s), 2,10-2,15 (1H, m), 3,66-3,75 (4H, m), 5,42 (1H, sa), 5,67 (1H, s), 5,8 (1H, sa), 7,42 (1H, d), 7,52-7,58 (1H, m), 7,75 (1H, d), 9,27 (1H, s), 10,65 (1H, s), 11,9 (1H, sa)	8,52
I-19	494,58	(DMSO- <i>d</i> ₆): 0,20 (2H, m), 0,42-0,51 (4H, m), 0,59 (2H, m), 1,07 (1H, m), 1,40 (1H, m), 1,99 (3H, m), 2,24 (2H, m), 3,81-3,94 (4H, m), 5,36 (1H, s), 5,70 (1H, sa), 7,47 (2, m), 7,72 (2H, m), 9,27 (1H, s), 9,99 (1H, s), 11,65 (1H, sa)	9,304

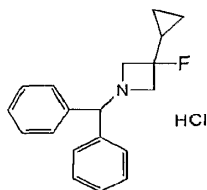
Ejemplo 5**N-Benzhidrilazetidín-3-ona**

- 5 A una suspensión agitada de 1-(difenilmetil)-3-hidroxiazetidina (30 g, 0,126 mol) en trietilamina (63 g, 0,628 mol) se añadió una solución de complejo de trióxido de azufre-piridina (60 g, 0,376 mol) en DMSO anhidro (300 mL) gota a gota en 30 minutos. La mezcla resultante se calentó hasta 50 °C durante 30 minutos. La mezcla de reacción se enfrió posteriormente hasta temperatura ambiente y se vertió en una mezcla de agua (1 L) y acetato de etilo (800 mL). La capa orgánica se separó y la acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 200 mL). A continuación las
- 10 soluciones orgánicas combinadas se lavaron con agua (3 x 200 mL) y después con salmuera saturada (200 mL), se secaron (sulfato de magnesio), se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó en gel de sílice, eluyendo con un 5-10% de acetato de etilo/éter de petróleo. Se obtuvo el producto como un sólido blanco (26,2 g, 86%); ¹H RMN CDCl₃ δ 4,07 (4H, s), 4,62 (1H, s), 7,20-7,39 (6H, m), 7,53 (4H, d).

**15 Clorhidrato de 1-benzhidril-3-ciclopropilazetidín-3-ol**

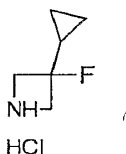
- Una solución de bromuro de ciclopropilmagnesio en THF (0,5 M, 600 mL, 0,5 mol) se enfrió hasta -78 °C en atmósfera de nitrógeno. Se comenzó a observar precipitación a esta temperatura. Se añadió una solución de N-benzhidrilazetidín-3-ona (24,2 g, 0,102 mol) en THF anhidro (130 mL) gota a gota en 30 minutos. La mezcla se agitó durante 90 minutos más a -78 °C después de lo cual se añadieron solución saturada de bicarbonato de sodio (400 mL) y agua (100 mL) lentamente. A continuación, la mezcla se diluyó con acetato de etilo (1 L) y se dejó calentar hasta temperatura ambiente. Posteriormente la fase orgánica se separó (la capa acuosa era una emulsión de sales de magnesio pero se pudo separar fácilmente de la capa orgánica) y la acuosa se extrajo con acetato de etilo (3x300 mL). Las soluciones orgánicas combinadas se lavaron a continuación con salmuera saturada (300 mL), se secaron (sulfato de magnesio), se filtraron y se concentraron para obtener un aceite de color amarillo pálido. El crudo se purificó en gel de sílice eluyendo con un 20-30% de acetato de etilo/éter de petróleo. El alcohol resultante (28,3 g) se disolvió en éter (350 mL) y la solución se enfrió hasta 0 °C. A continuación se añadió una solución de HCl en éter (2 M, 130 mL) gota a gota en 15 minutos. La sal clorhídrica precipitó en la solución. La suspensión densa resultante se agitó a 0 °C durante 10 minutos más y después se filtró. La masa retenida en el filtro se lavó con éter (2x100 mL) y el sólido se secó al vacío. De este modo se obtuvo el producto como un sólido blanco (28,2 g, 88%); ¹H RMN

DMSO- d_6 δ 0,31-0,50 (4H, m), 1,35 (0,3H, m), 0,51 (0,7H, m), 3,41-4,10 (5H, m), 5,88 (0,3H, d), 6,05 (0,7H, d), 6,35 (1H, sa), 7,30-7,50 (6H, m), 7,61-7,82 (4H, m); ES^+ 280,71.



Clorhidrato de 1-benzhidril-3-ciclopropil-3-fluoroazetidina

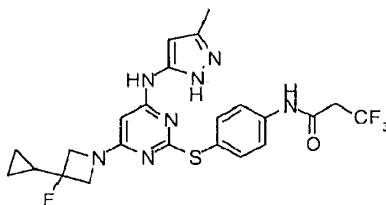
- 5 Se añadió $NaHCO_3$ saturado (100 mL) a una suspensión de clorhidrato de 1-benzhidril-3-ciclopropilazetidina-3-ol (7,78 g, 24,50 mmol) en acetato de etilo (100 mL). La mezcla se transfirió a un embudo de separación y se agitó vigorosamente hasta que todo el sólido se disolvió. La capa orgánica se separó y la acuosa se extrajo posteriormente con acetato de etilo (50 mL). Los extractos orgánicos combinados se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron para obtener un aceite. El aceite se disolvió en diclorometano (100 mL) y se enfrió hasta $-78^\circ C$. Se
10 añadió trifluoroetilo de [bis(2-metoxietil)amino]azufre (5,98 g, 27,05 mmol, 5,0 mL) gota a gota, la solución se agitó durante 30 min a $-78^\circ C$, y después se calentó hasta $0^\circ C$ y se agitó durante 1 h más. La reacción se desactivó con $NaHCO_3$ saturado (50 mL) y salmuera (50 mL), y la capa acuosa se extrajo con diclorometano (50 mL). Los extractos orgánicos combinados se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron para obtener un aceite amarillo. El crudo se purificó en gel de sílice, eluyendo con un 5% de acetato de etilo/éter de petróleo. El alcohol resultante se disolvió en
15 éter (100 mL) y la solución se enfrió hasta $0^\circ C$. A continuación se añadió una solución de HCl en éter (2 M, 25 mL) gota a gota en cinco minutos. La sal clorhídrica precipitó en la solución. La suspensión densa resultante se agitó a $0^\circ C$ durante 10 minutos más y después se filtró. La masa retenida en el filtro se lavó con éter (20 mL) y el sólido se secó al vacío. De este modo se obtuvo el producto como un sólido blanco (4,71 g, 61%). 1H RMN MeOH- d_4 δ 0,30-0,52 (4H, m), 1,22 (1H, sa), 4,01-4,23 (4H, m), 5,50-5,60 (1H, sa), 7,13-7,46 (10H, m); ES^+ 282.



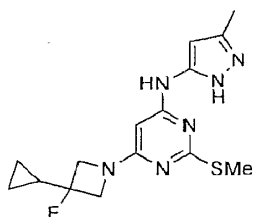
Clorhidrato de 3-ciclopropil-3-fluoroazetidina

- A paladio sobre carbón al 10% (catalizador de Degussa) en atmósfera de nitrógeno se añadió etanol (100 mL). Se añadió una solución de clorhidrato de 1-benzhidril-3-ciclopropil-3-fluoroazetidina (6,74 g, 21,23 mmol) en etanol (50 mL) al catalizador y la mezcla se hidrogenó a 60 psi en el hidrogenador Parr Shaker durante 5 h. La reacción se
25 filtró a través de Celite y se concentró para obtener un aceite. Se añadió éter (50 mL), y la mezcla se enfrió hasta $0^\circ C$ y se agitó hasta que se formó un precipitado. La suspensión se filtró, la masa retenida en el filtro se lavó con éter (20 mL) y el sólido se secó al vacío. De este modo se obtuvo el producto como un sólido blanquecino (3,00 g, 93%). 1H RMN DMSO- d_6 δ 0,52-0,56 (2H, m), 0,59-0,64 (2H, m), 1,35-1,40 (1H, m), 3,91-4,10 (4H, m), 4,01-4,23 (4H, m), 9,50 (1H, sa), 9,63 (1H, sa).

30 Ejemplo 6

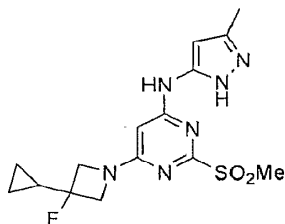


N-(4-(4-(3-Metil-1H-pirazol-5-ilamino)-6-(3-ciclopropil-3-fluoroazetidina-1-il)pirimidin-2-iltio)fenil)-3,3,3-trifluoropropanamida (Compuesto I-14)



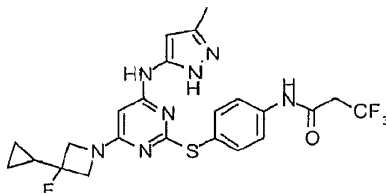
6-(3-Ciclopropil-3-fluoroazetidin-1-il)-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-2-(metiltio)pirimidin-4-amina

A una mezcla de 6-cloro-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-2-(metiltio)pirimidin-4-amina (150 g, 0,58 mol) y clorhidrato de 3-ciclopropil-3-fluoroazetidina (132,2 g, 0,87 mol) se añadieron diisopropiletilamina (208 g, 1,61 mol) e isopropanol (1,125 L), y después se calentó a reflujo durante 23 horas. La reacción se enfrió para obtener una solución ligeramente turbia hasta 85 °C y se filtró, y la solución homogénea se concentró hasta un volumen mínimo. Se añadió EtOAc (1 L) y se concentró hasta un volumen mínimo. Se añadieron EtOAc (1 L) y H₂O (1 L), y las capas se separaron (comenzó a cristalizar producto en la capa orgánica durante la extracción). La capa acuosa se extrajo de nuevo con EtOAc (500 mL). Se concentró la primera capa orgánica a sequedad para obtener un sólido blanco. Se añadió hexano (750 mL) al segundo extracto orgánico, y la suspensión densa se agitó a temperatura ambiente y después se enfrió hasta 0 °C durante 30 min. Se filtró y se lavó con una gran cantidad de heptano. La masa retenida en el filtro se secó al vacío. La masa retenida en el filtro y el sólido blanco de la primera extracción se combinaron para obtener 155,1 g del producto deseado. (155,1 g, 77 %). ¹H RMN (DMSO, 400 MHz) 0,44 (2H, m), 0,60 (2H, m), 1,38-1,43 (1H, m), 2,18 (3H, s), 2,42 (3H, s), 3,89-3,97 (4H, m), 5,92 (1H, sa), 6,04 (1H, sa), 9,23 (1H, s), 11,86 (1H, s). ES⁺ 335.



6-(3-Ciclopropil-3-fluoroazetidin-1-il)-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-2-(metilsulfonil)pirimidin-4-amina

Una solución de 6-(3-ciclopropil-3-fluoroazetidin-1-il)-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-2-(metiltio)pirimidin-4-amina (130 g, 389 mmol) en MeOH (5,2 L) se enfrió hasta 0 °C. Se añadió lentamente una solución de Oxone (526 g, 855 mmol) en H₂O (5,2 L) a la suspensión densa manteniendo la temperatura por debajo de 5 °C. Tras la adición, la reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente durante toda la noche. A continuación, se añadieron una solución al 10% de NaHSO₃ (325 mL) y una solución al 10% de K₂CO₃ (2,6 L) para neutralizar la mezcla de reacción, la solución se filtró y la masa retenida en el filtro se lavó con H₂O (3,3 L). El sólido se suspendió en H₂O (2,6 L), la solución se filtró y la masa retenida en el filtro se lavó con H₂O (3,3 L). El sólido se secó al vacío (72,3 g, 51 %). ¹H RMN (DMSO): 0,47 (2H, m), 0,60 (2H, m), 1,43-1,46 (1H, m), 2,20 (3H, s), 3,25 (3H, s), 3,97-4,11 (4H, m), 5,93 (1H, sa), 6,47 (1H, sa), 9,88 (1H, s), 12,01 (1H, sa). ES⁺ 367.



N-(4-(4-(3-Metil-1H-pirazol-5-ilamino)-6-(3-ciclopropil-3-fluoroazetidin-1-il)pirimidin-2-iltio)fenil)-3,3,3-trifluoropropanamida (Compuesto I-14)

Una suspensión de 6-(3-ciclopropil-3-fluoroazetidin-1-il)-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-2-(metilsulfonil)pirimidin-4-amina (61 g, 170 mmol) y 3,3,3-trifluoro-N-(4-mercaptofenil)propanamida (41 g, 175 mmol) en CH₃CN (1300 mL) se calentó a reflujo durante 1,5 horas. Durante este tiempo, la suspensión se transformó pasando de ser fluida y amarillenta a espesa y de color blanco intenso. A continuación, la mezcla se enfrió hasta 0 °C y se agitó a esta temperatura durante 15 min. Se filtró y se lavó con CH₃CN frío (650 mL). El sólido resultante se secó durante 20 horas a 38 °C con una trompa de vacío. El sólido blanco se introdujo en un reactor adecuado con EtOAc (1300 mL) y NaHCO₃ (sat.) (1300 mL). La mezcla se agitó hasta que todo el sólido se disolvió. A continuación, las capas se separaron y se

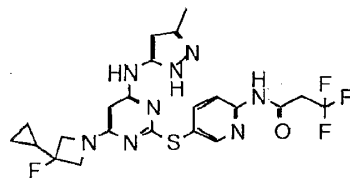
lavó la capa acuosa con EtOAc (390 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron con MgSO_4 , se filtraron, se lavaron con EtOAc (130 mL) y se concentraron hasta un volumen mínimo en un rotavapor. La mezcla resultante se recrystalizó con EtOAc y hexano para obtener el producto deseado como un sólido blanco (56,2 g, 72%). ^1H RMN (MeOD, 400 MHz): 0,40-0,45 (2H, m), 0,60-0,65 (2H, m), 1,3-1,4 (1H, m), 2,05 (2H, s), 3,25-3,40 (2H, m), 3,85-3,40 (4H, m), 5,40-5,50 (2H, m), 7,50-7,55 (2H, d), 7,65-7,70 (2H, d). ES+ 522.

La Tabla 4 que se presenta a continuación muestra datos de ciertos compuestos representativos sintetizados de acuerdo con el método descrito en el Esquema general (Método A) y en el Ejemplo 6. Los números de los compuestos corresponden a los compuestos representados en la Tabla 1.

Tabla 4

N.º de compuesto	M+1 (obs)	^1H RMN	t_R (min)
I-14	522,00	(MeOD): 0,40-0,45 (2H, m), 0,60-0,65 (2H, m), 1,3-1,4 (1H, m), 2,05 (2H, s), 3,25-3,40 (2H, m), 3,85-3,40 (4H, m), 5,40-5,50 (2H, m), 7,50-7,55 (2H, d), 7,65-7,70 (2H, d),	9,235
I-18	498,70	(DMSO- d_6): 6,45-0,48 (2H,m), 0,6-0,63 (2H, m), 0,87-0,92 (4H, m), 1,45 (1H, sa), 1,82-1,85 (1H, m), 2,02 (3H, s), 3,8-3,95 (4H,m), 5,3 (1H, sma), 5,75 (1H, sa), 7,4 (1H, d), 7,52-7,55 (1H, m), 7,8 (1H, d), 9,4 (1H, sa), 10,7 (1H, sa), 11,7 (1H, sa)	9,2
I-20	516,60	(DMSO- d_6): 0,22-0,25 (2H, m), 0,42-0,45 (2H, m), 1,20-1,26 (1H, m), 1,75-1,9 (511, m), 2,6-2,7(1H, m), 3,65-3,8 (4H, m), 5,1 (1H, sa), 5,4 (1H, sma), 7,3 (2H, d), 7,52 (2H, d), 9,1 (1H, sa), 10,4 (1H,s), 11,5 (1H, sa)	9,34

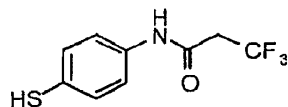
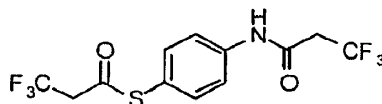
Ejemplo 7



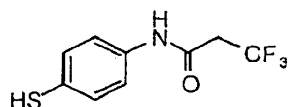
***N*-(5-(4-(3-Metil-1*H*-pirazol-5-ilamino)-6-(3-ciclopropil-3-fluoroazetidin-1-il)pirimidin-2-iltio)piridin-2-il)-3,3,3-trifluoropropanamida (I-21)**

A una solución de 2-(6-aminopiridin-3-iltio)-6-(3-ciclopropil-3-fluoroazetidin-1-il)-*N*-(3-metil-1*H*-pirazol-5-il)pirimidin-4-amina (300 mg, 0,7 mmol) y BOC_2O (220 mg, 1 mmol) en solución de hidróxido de sodio 4,5 M (0,470 mL) y DCM (10 mL) se añadió DMAP (5 mg). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 h y después se lavó con solución saturada de NaHCO_3 y salmuera, se secó (MgSO_4), se filtró y se evaporó al vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash (12 g de SiO_2 , EtOAc/éter de petróleo) para obtener el intermedio deseado (60 mg, 17%). ES⁺ 513. Este intermedio (60 mg, 0,12 mmol) se disolvió en piridina (2 mL), se añadió cloruro de 3,3,3-trifluoropropanoilo (34 mg, 0,23 mmol) gota a gota y después se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Se añadieron 3 gotas más de cloruro de 3,3,3-trifluoropropanoilo para obtener una conversión completa en el producto tras agitar durante 30 min más. Posteriormente, la mezcla de reacción se concentró al vacío, el residuo se redisolvió en DCM (2 mL)/TFA (1 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla se concentró al vacío, y el producto crudo se purificó mediante LCMS preparativa y se liofilizó (MeCN/ H_2O /TFA) para obtener el compuesto del título como un sólido blanco y la sal trifluoroacética (25 mg, 33%). ^1H RMN (DMSO- d_6) 0,20-0,21 (2 H, m), 0,36-0,38 (2 H, m), 1,15-1,20 (1 H, m), 1,77 (3 H, s), 3,40-3,50 (2 H, m), 3,57-3,72 (4 H, m), 5,10-5,15 (12 H, s), 7,75-7,80 (1 H, d), 7,92-7,97 (1 H, d), 8,22 (1 H, s), 9,20 (1 H, s), 10,91 (1 H, s). ES+ 523.

Los experimentos que se presentan a continuación describen la preparación de algunos de los compuestos empleados en los ejemplos descritos en la presente.

Compuesto a**3,3,3-Trifluoro-N-(4-mercaptofenil)propanamida****5 3,3,3-Trifluoropropanotioato de S-4-(3,3,3-trifluoropropanamido)fenilo**

Se derritió 4-aminotiofenol y se introdujo en un matraz. Se añadió EtOAc desgasificado (1950 mL). Se añadió una solución de K₂CO₃ (92 g, 670 mmol) en H₂O desgasificada (1300 vol). La solución se enfrió hasta 0 °C y se añadió lentamente el cloruro de 3,3,3-trifluoropropanoilo (55,2 g, 600 mmol) para mantener la temperatura por debajo de 10 °C. La reacción se calentó hasta TA. La capa orgánica se separó y se lavó con salmuera (1300 mL). A continuación se concentró en el evaporador rotatorio. El sólido se suspendió en heptano/EtOAc (390 mL/390 mL) durante 30 min. Se añadió heptano (780 mL) y la suspensión densa se enfrió hasta 0 °C durante 30 min. La suspensión densa se filtró. La masa retenida en el filtro se secó al vacío para obtener el compuesto deseado (51,3 g, 87,2%).

**3,3,3-Trifluoro-N-(4-mercaptofenil)propanamida**

Se introdujeron 3,3,3-trifluoropropanotioato de S-4-(3,3,3-trifluoropropanamido)fenilo (44,8 g, 189 mmol) y EtOH (70 mL) en un matraz. Se añadió HCl concentrado (22,5 mL) lentamente para mantener la temperatura por debajo de 30 °C. Posteriormente, la mezcla de reacción se calentó hasta 50 °C durante 17,5 h. Se redujo el volumen de la mezcla de reacción hasta 41 mL mediante destilación al vacío a 50 °C. La reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se añadió H₂O (51 mL). La suspensión se filtró y la masa retenida en el filtro se lavó con H₂O (3 x 35 mL). El sólido se secó al vacío para obtener el compuesto deseado (19,9 g, 58%).

Ejemplo 9: Ensayo de inhibición de Aurora-2 (Aurora A)

Los compuestos se evaluaron para determinar su capacidad para inhibir Aurora-2 utilizando un ensayo enzimático acoplado estándar (Fox *et al.*, *Protein Sci.*, (1998) 7, 2249). Los ensayos se realizaron en una mezcla de HEPES 100 mM (pH 7,5), MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, NaCl 25 mM, fosfoenolpiruvato 2,5 mM, NADH 300 µM, 30 µg/mL de piruvato-cinasa y 10 µg/mL de lactato-deshidrogenasa. Las concentraciones finales de sustrato en el ensayo son 400 µM para el ATP (Sigma Chemicals) y 570 µM para el péptido (Kemptide, American Peptide, Sunnyvale, CA). Los ensayos se realizaron a 30 °C en presencia de Aurora-2 4 nM.

Se preparó una solución patrón de tampón de ensayo que contenía todos los reactivos enumerados anteriormente, salvo Aurora-2 y el compuesto de ensayo de interés. 55 µL de la solución patrón se introdujeron en una placa de 96 pocillos y a continuación se añadieron 2 µL de patrón de DMSO que contenía diluciones en serie del compuesto de ensayo (normalmente partiendo de una concentración final de 7,5 µM). La placa se preincubó durante 10 minutos at 30 °C y la reacción se inició añadiendo 10 µL de Aurora-2. Las tasas de reacción iniciales se determinaron con un lector de placas SpectraMax Plus de Molecular Devices a lo largo de un período de 10 minutos. Los datos de CI₅₀ y Ki se calcularon a partir del análisis de regresión no lineal utilizando el paquete informático Prism (GraphPad Prism, versión 3.0cx para Macintosh, GraphPad Software, San Diego California, EE. UU.).

Ejemplo 10: Ensayo (radiométrico) de inhibición de Aurora-1 (Aurora B)

Se preparó una solución de tampón de ensayo que consistía en HEPES 25 mM (pH 7,5), MgCl₂ 10 mM, BSA al 0,1% y glicerol al 10%. Se preparó una solución de Aurora-B 22 nM, que también contenía DTT 1,7 mM y Kemptide (LRRASLG) 1,5 mM en tampón de ensayo. A 22 µL de la solución de Aurora-B en una placa de 96 pocillos se añadieron 2 µL de una solución patrón del compuesto en DMSO y se dejó que la mezcla se equilibrara durante 10 minutos a 25 °C. La reacción enzimática se inició mediante la adición de 16 µL de solución patrón de [γ-³³P]-ATP (~20 nCi/µL) preparada en tampón de ensayo, hasta una concentración de ensayo final de 800 µM. La reacción se

detuvo 3 horas después mediante la adición de 16 μL de ácido fosfórico 500 mM y los niveles de incorporación de ^{33}P en el sustrato peptídico se determinaron mediante el siguiente método.

- 5 Una placa de 96 pocillos de fosfoclulosa (Millipore, n.º de cat. MAPHNOB50) se pretrató con 100 μL de ácido fosfórico 100 mM antes de añadir la mezcla de reacción enzimática (40 μL). Se dejó que la solución impregnara la membrana de fosfoclulosa durante 30 minutos y la placa se lavó posteriormente cuatro veces con 200 μL de ácido fosfórico 100 mM. A cada pocillo de la placa seca se añadieron 30 μL de cóctel de centelleo líquido Optiphase 'SuperMix' (Perkin Elmer) antes de realizar un conteo de centelleo (contador de centelleo líquido 1450 Microbeta, Wallac). Los niveles de radiactividad de fondo no catalizada enzimáticamente se determinaron añadiendo 16 μL del ácido fosfórico 500 mM a pocillos de control, que contenían todos los componentes del ensayo (que actúa para desnaturalizar la enzima), antes de añadir la solución de $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$. Los niveles de incorporación de ^{33}P catalizada enzimáticamente se calcularon sustrayendo la media de los conteos de fondo de los medidos en cada concentración de inhibidor. Para cada determinación de K_i , se obtuvieron 8 datos, que normalmente abarcaban un rango de concentración de 0-10 μM del compuesto, por duplicado (se prepararon patrones de DMSO a partir de un patrón de compuesto inicial de 10 mM con diluciones en serie posteriores con un factor de dilución de 1:2,5). Los valores de K_i se calcularon a partir de los datos de las tasas iniciales mediante una regresión no lineal utilizando el programa informático Prism (Prism 3.0, Graphpad Software, San Diego, CA).

Ejemplo 11: Ensayo de inhibición de Itk: Ensayos basados en la radioactividad

Los compuestos de la presente invención se evaluaron como inhibidores de la cinasa Itk humana utilizando un ensayo basado en la radioactividad.

- 20 Los ensayos se realizaron en una mezcla de MOPS 20 mM (pH 7,0), MgCl_2 , 10mM, 0,1% de BSA y DTT 1mM. Las concentraciones finales de sustrato en el ensayo fueron 7,5 μM para el $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ (400 μCi ^{33}P ATP/ μmol ATP, Amersham Pharmacia Biotech / Sigma Chemicals) y 3 μM para el péptido (proteína SAM68 Δ 332-443). Los ensayos se realizaron a 25 °C en presencia de Itk 50 nM. Se preparó una solución patrón de tampón de ensayo que contenía todos los reactivos enumerados anteriormente, salvo ATP y el compuesto de ensayo de interés. 50 μL de la solución patrón se colocaron en una placa de 96 pocillos y a continuación se añadieron 2 μL de patrón de DMSO que contenía diluciones en serie del compuesto de ensayo (normalmente partiendo de una concentración final de 50 μM con diluciones en serie con un factor de dilución de 2) por duplicado (concentración final de DMSO = 2%). La placa se preincubó durante 10 minutos a 25 °C y la reacción se inició mediante la adición de 50 μL de $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ (concentración final = 7,5 μM).
- 30 La reacción se detuvo 10 minutos después mediante la adición de 100 μL de ácido fosfórico 0,2 M + 0,01% de TWEEN 20. Se pretrató una placa de 96 pocillos con un filtro de fosfoclulosa multipantalla (Millipore, n.º de cat. MAPHNOB50) con 100 μL de ácido fosfórico 0,2 M + 0,01% de TWEEN 20 antes de añadir 170 μL de la mezcla de ensayo detenida. La placa se lavó con 4 x 200 μL de ácido fosfórico 0,2 M + 0,01% de TWEEN 20. Tras secar, se añadieron 30 μL de cóctel de centelleo líquido Optiphase 'SuperMix' (Perkin Elmer) al pocillo antes de realizar el conteo de centelleo (contador de centelleo líquido 1450 Microbeta, Wallac).

35 Los datos de $K_i(\text{ap})$ se calcularon a partir de un análisis de regresión no lineal de los datos de las tasas iniciales utilizando el paquete informático Prism (GraphPad Prism, versión 3.0cx para Macintosh, GraphPad Software, San Diego California, EE. UU.).

Ejemplo 12: Ensayo de inhibición de JAK-3

- 40 Los compuestos se evaluaron para determinar su capacidad para inhibir JAK utilizando el ensayo que se muestra a continuación. Las reacciones se llevaron a cabo en un tampón para cinasas que contenía HEPES 100 mM (pH 7,4), DTT 1 mM, MgCl_2 10 mM, NaCl 25 mM y 0,01% de BSA. Las concentraciones de sustrato en el ensayo fueron ATP 5 μM (200 uCi/ μmol de ATP) y poli(Glu) $_4$ Tyr 1 μM . Las reacciones se llevaron a cabo a 25 °C y en presencia de JAK-3 1 nM.
- 45 A cada pocillo de una placa de 96 pocillos de policarbonato se añadieron 1,5 μL de un candidato a inhibidor de JAK-3 junto con 50 μL de tampón para cinasas que contenía poli(Glu) $_4$ Tyr 2 μM y ATP 10 μM . A continuación, se mezcló y se añadieron 50 μL de tampón para cinasas que contenía enzima JAK-3 2 nM para iniciar la reacción. Después de 20 minutos a temperatura ambiente (25 °C), la reacción se detuvo con 50 μL de ácido tricloroacético al 20% (TCA) que también contenía ATP 0,4 mM. A continuación, el contenido completo de cada pocillo se transfirió a una placa con filtro de fibra de vidrio de 96 pocillos utilizando un cosechador celular TomTek. Tras lavar, se añadieron 60 μL de líquido de centelleo y la incorporación de ^{33}P se detectó en un contador TopCount de Perkin Elmer.

Ejemplo 13: Ensayo de inhibición de JAK-2

Los ensayos son como se han descrito anteriormente en el Ejemplo 13, salvo que se utilizó la enzima JAK-2, la concentración final de poli(Glu)₄Tyr fue de 15 µM y la concentración final de ATP fue de 1,2 µM.

Ejemplo 14: Ensayo de inhibición de FLT-3

- 5 Los compuestos se evaluaron para determinar su capacidad para inhibir la actividad de FLT-3 utilizando un ensayo de unión a un filtro radiométrico. Este ensayo monitoriza la incorporación de ³³P en un sustrato poli(Glu, Tyr) 4:1 (pE4Y). Las reacciones se llevaron a cabo en una solución que contenía HEPES 100 mM (pH 7,5), MgCl₂ 10 mM, NaCl 25 mM, DTT 1 mM, 0,01% de BSA y 2,5% de DMSO. Las concentraciones finales del sustrato en el ensayo fueron de 90 µM para el ATP y 0,5 mg/mL para pE4Y (ambos de Sigma Chemicals, St Louis, MO). La concentración
- 10 final de un compuesto de la presente invención estuvo comprendida en general entre 0,01 y 5 µM. Normalmente, se realizó una valoración de 12 puntos preparando diluciones en serie a partir de un patrón de DMSO 10 mM del compuesto de ensayo. Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

- Se prepararon dos soluciones de ensayo. La solución 1 contiene HEPES 100 mM (pH 7,5), MgCl₂ 10 mM, NaCl 25 mM, 1 mg/mL de pE4Y y ATP 180 mM (que contenía 0,3 mCi de [γ-³³P]ATP para cada reacción). La solución 2
- 15 contiene HEPES 100 mM (pH 7,5), MgCl₂ 10 mM, NaCl 25 mM, DTT 2 mM, 0,02% de BSA y FLT-3 3 nM. El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos mezclando en cada uno 50 µL de la Solución 1 y 2,5 mL de los compuestos de la presente invención. La reacción se inició con la Solución 2. Tras incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente, la reacción se detuvo con 50 µL de TCA al 20% que contenía 0,4 mM de ATP. A continuación, se transfirió el volumen de reacción completo a una placa con filtro y se lavó con TCA al 5% mediante un cosechador 9600 de
- 20 TOMTEC (Hamden, CT). La cantidad de incorporación de ³³P en pE4y se analizó mediante un contador de centelleo para microplacas Packard Top Count (Meriden, CT). Los datos se ajustaron con el software Prism para obtener la Cl₅₀ o Ki.

Ejemplo 15: Ensayo de estabilidad microsomal

- Se monitorizó la estabilidad microsomal mediante la generación de perfiles de agotamiento frente al tiempo en
- 25 microsomas de un rango de especies (1 ratón CD-1 macho, una rata Sprague-Dawley macho, un perro Beagle macho, un mono cinomólogo macho y un grupo de seres humanos de ambos sexos). Se prepararon soluciones de adición del compuesto diluyendo la solución patrón del compuesto en DMSO (normalmente 10 mM) para obtener una solución en acetonitrilo (0,5 mM). El compuesto (para obtener una concentración final de 5 µM) se incubó con una mezcla de reacción final (1000 µL) que consistía en proteína microsomal hepática (1 mg/mL) y un sistema
- 30 regenerador (RGS) de β-fosfato del dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma reducida (NADPH) [constituido por β-fosfato del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADP) 2 mM, ácido isocítrico 20,5 mM, 0,5 U de isocitrato-deshidrogenasa/mL, cloruro de magnesio 30 mM y tampón fosfato (PB) 0,1 M de pH 7,4] en presencia de PB 0,1 M (pH 7,4).

- La reacción se inició mediante la adición (250 µL) de RGS preincubado a la mezcla preincubada de
- 35 microsoma/VRT/PB (la preincubación en ambos casos fue de 10 minutos a 37 °C). Las muestras se incubaron dentro de viales Eppendorf (1,5 mL) en un agitador-calentador (DPC Micromix 5 (ajustes; forma 20, amplitud 4) modificado para calentarlo hasta 37 °C, mediante dos calentadores de placas fijados a la plataforma y controlados por un calentador manual Packard) acoplado a un manipulador de líquidos automático Multiprobe II HT Ex. El manipulador de líquidos se programó (software WinPREP) para tomar muestras de la mezcla de incubación
- 40 microsomal tras 0, 2, 10, 30 y 60 minutos de incubación y para transferir una alícuota (100 µL) a un bloque de parada (bloque de 96 pocillos) que contenía 100 µL de metanol frío. El % de materia orgánica en la mezcla de parada se optimizó para el análisis mediante la adición de volúmenes adecuados de disolvente acuoso/orgánico (normalmente 100 µL de metanol:agua (50:50)).

- Antes del análisis, el bloque de parada se colocó en un agitador (DPC Micromix 5; 10 min, forma 20, amplitud 5) para separar las proteínas por precipitación. A continuación, el bloque se centrifugó (Jouan GR412; 2000 rpm, 15 min, 4 °C). Posteriormente se transfirió una alícuota de la muestra (200 µL) a un bloque de análisis y el bloque se
- 45 centrifugó de nuevo (Jouan GR412; 2000 rpm, 5 min, 4 °C) antes de enviarlo para su análisis. Los perfiles de agotamiento se determinaron monitorizando la desaparición de VRT mediante cromatografía de líquidos combinada con espectrometría de masas en tandem (LC-MS/MS). Las muestras se inyectaron (20 µL; sistema cromatográfico para líquidos Agilent 1100 equipado con un automuestreador) en una columna analítica. La fase móvil consistía en
- 50 agua + 0,05% (v/v) de ácido fórmico (A) y metanol + 0,05% (v/v) de ácido fórmico (B).

Aplicando un método de gradiente optimizado para el compuesto de interés se consiguió eluir el compuesto de la columna analítica. El tiempo de análisis total fue de 6 minutos con un flujo de 0,35 mL/min. Todo el efluente de la columna entró en la fuente de ionización por electronebulización (modo positivo) de un espectrómetro de masas en

tándem Micromass Quattro LC en un momento comprendido entre los 0,5 y 5,9 min del análisis. La espectrometría de masas se optimizó para el compuesto de interés. Todas las incubaciones se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron como el % original remanente ya sea los 30 minutos o 60 minutos en relación con la muestra a los 0 minutos.

5 **Ejemplo 16: Análisis de la proliferación y la viabilidad celulares**

Los compuestos se evaluaron para determinar su capacidad para inhibir la proliferación celular y sus efectos sobre la viabilidad celular utilizando células Colo205 obtenidas de ECACC y utilizando el ensayo que se muestra a continuación.

10 Se sembraron células Colo205 en placas de 96 pocillos y se añadió el compuesto diluido en serie a los pocillos por duplicado. Los grupos de control incluían células sin tratar, el diluyente del compuesto (0,1% de DMSO solamente) y medio de cultivo sin células. Las células se incubaron a continuación durante 72 o 96 h a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂/95% de humedad.

15 Para medir la proliferación, 3 h antes del final del experimento se añadieron 0,5 µCi de 3H-timidina a cada pocillo. Posteriormente se recogieron las células y se realizó un conteo de la radioactividad incorporada en un lector de microplacas beta de Wallac. La viabilidad celular se evaluó utilizando Promega CellTiter 96AQ para medir la conversión de MTS. Las curvas de respuesta a la dosis se calcularon utilizando el software Prism 3.0 (GraphPad) o SoftMax Pro 4.3.1 LS (Molecular Devices).

Ejemplo 17: Ensayo de inhibición de la actividad de la cinasa Abl y determinación de la constante de inhibición K_i

20 Se evaluaron los compuestos para determinar su capacidad para inhibir la actividad de la cinasa Abl truncada en el extremo N (Δ 27) utilizando un sistema enzimático acoplado estándar (Fox *et al.*, *Protein Sci.*, 7, pág. 2249 (1998)). Las reacciones se llevaron a cabo en una solución que contenía HEPES 100 mM (pH 7,5), MgCl₂ 10 mM, NaCl 25 mM, NADH 300 µM, DTT 1 mM y 3% de DMSO. Las concentraciones finales del sustrato en el ensayo fueron de 110 µM para el ATP (Sigma Chemicals, St Louis, MO) y 70 µM para el péptido (EAIYAAPFAKKK, American Peptide, Sunnyvale, CA). Las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C y en presencia de la cinasa Abl 21 nM. Las concentraciones finales de los componentes del sistema enzimático acoplado fueron de 2,5 mM para el fosfoenolpiruvato, 200 µM para el NADH, 60 µg/mL de piruvato-cinasa y 20 µg/mL de lactato-deshidrogenasa.

30 Se preparó una solución patrón de tampón de ensayo que contenía todos los reactivos enumerados anteriormente, salvo ATP y el compuesto de ensayo de interés. La solución patrón de tampón de ensayo (60 µL) se incubó en una placa de 96 pocillos con 2 µL del compuesto de ensayo de interés en concentraciones finales normalmente comprendidas entre 0,002 µM y 30 µM a 30 °C durante 10 min. Normalmente, se preparó una valoración de 12 puntos mediante diluciones en serie (a partir de patrones de los compuestos 1 mM) con DMSO de los compuestos de ensayo en placas secundarias. La reacción se inició mediante la adición de 5 µL de ATP (concentración final = 110 µM). Las tasas de reacción se obtuvieron utilizando un lector de placas Spectramax de Molecular Devices (Sunnyvale, CA) en 10 min a 30 °C. Los valores de K_i se determinaron a partir de los datos de las tasas residuales en función de la concentración de inhibidor utilizando una regresión no lineal (Prism 3.0, Graphpad Software, San Diego, CA).

Ejemplo 18: Ensayo de inhibición de la actividad de la cinasa Abl mutante (T315I) y determinación de la constante de inhibición CI₅₀

40 Los compuestos se evaluaron para determinar su capacidad para inhibir la forma mutante T315I de la Abl humana en soluciones de señalización celular Upstate (Dundee, R.U.). En un volumen de reacción final de 25 µL, la forma mutante T315I de la Abl humana (5-10 mU) se incubó con MOPS 8 mM, pH 7,0, EDTA 0,2 mM, EAIYAAPFAKKK 50 µM, acetato de Mg 10 mM, [γ-³³P-ATP] (actividad específica de aprox. 500 cpm/pmol, concentración final de ensayo = 10 mM) y el compuesto de ensayo de interés en concentraciones finales comprendidas entre 0 y 4 µM. La reacción se inició mediante la adición de la mezcla MgATP. Tras incubar durante 40 minutos a temperatura ambiente, la reacción se detuvo mediante la adición de 5 µL de una solución de ácido fosfórico al 3%. 10 µL de la reacción se depositaron posteriormente sobre un filtro Filtermat P30 y se lavó tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secar y realizar un conteo de centelleo. Los valores de CI₅₀ de la inhibición se determinaron a partir de un análisis de regresión no lineal de las actividades enzimáticas residuales como una función de la concentración de inhibidor (Prism 3.0, Graphpad Software, San Diego, CA).

Ejemplo 19: Ensayo de inhibición de Plk4

Los compuestos se evaluaron para determinar su capacidad para inhibir P1k4 utilizando un ensayo de incorporación de fosfato radioactivo. Los ensayos se realizaron en una mezcla de MOPS 8 mM (pH 7,5), MgCl₂ 10 mM, 0,1% de BSA y DTT 2 mM. Las concentraciones de sustrato finales fueron de 15 µM para [γ-33P] ATP (227 mCi de 33P ATP/mmol de ATP, Amersham Pharmacia Biotech / Sigma Chemicals) y 300 µM para el péptido (KKKMDATFADQ). Los ensayos se llevaron a cabo a 25 °C en presencia de Plk4 25 nM. Se preparó una solución patrón de tampón de ensayo que contenía todos los reactivos enumerados anteriormente, salvo ATP y el compuesto de ensayo de interés. Se colocaron 30 µL de la solución patrón en una placa de 96 pocillos y a continuación se añadieron 2 µL de patrón de DMSO que contenía diluciones en serie del compuesto de ensayo (normalmente partiendo de una concentración final de 10 µM con diluciones en serie con un factor de dilución de 2) por duplicado (concentración final de DMSO = 5%). La placa se preincubó durante 10 minutos a 25 °C y la reacción se inició mediante la adición de 8 µL de [γ-33P] ATP (concentración final = 15 µM). La reacción se detuvo 180 minutos después mediante la adición de 100 µL de ácido fosfórico 0,14 M. Se pretrató una placa de 96 pocillos con un filtro de fosfoclulosa multipantalla (Millipore, n.º de cat. MAPHNOB50) con 100 µL de ácido fosfórico 0,2 M antes de añadir 125 µL de la mezcla de ensayo detenida. La placa se lavó con 4 x 200 µL de ácido fosfórico 0,2 M. Tras secar, se añadieron 100 µL de cóctel de centelleo líquido Optiphase 'SuperMix' (Perkin Elmer) al pocillo antes de realizar el conteo de centelleo (contador de centelleo líquido 1450 Microbeta, Wallac). Tras sustraer los valores de fondo medios para todos los datos puntuales, los datos de Ki(ap) se calcularon a partir de un análisis de regresión no lineal de los datos de las tasas iniciales utilizando el paquete informático Prism (GraphPad Prism, versión 3.0cx para Macintosh, GraphPad Software, San Diego, California, EE. UU.).

Ejemplo 20: Ensayo de inhibición de FGFR1, MLK1, Tie2 y TrkA

Los compuestos se evaluaron para determinar su capacidad para inhibir Arg (Abl-2), FGFR1, MLK1, Tie2 y TrkA utilizando métodos de cribado con los que estará familiarizado un experto en la técnica. Todas las enzimas anteriores se evaluaron con concentraciones de ATP iguales o próximas a la K_m del ATP.

La Tabla 5 que se presenta a continuación muestra los valores de CI₅₀ obtenidos en el Ejemplo 20:

Tabla 5

N.º de compuesto	CI ₅₀ de Arg (uM)	CI ₅₀ de FGFR1 (uM)	CI ₅₀ de MLK1 (uM)	CI ₅₀ de Tie2 (uM)	CI ₅₀ de TrkA (uM)
I-14	0,014	0,121	0,027	0,089	0,018
I-17	0,21	0,088	-	-	-
I-18	0,053	0,022	-	-	-
I-19	0,13	0,035	-	-	-

La Tabla 6 que se presenta a continuación muestra los valores de Ki obtenidos en el Ejemplo 20:

Tabla 6

N.º de compuesto	CI ₅₀ de Arg (uM)	CI ₅₀ de FGFR1 (uM)	CI ₅₀ de MLK1 (uM)	CI ₅₀ de Tie2 (uM)	CI ₅₀ de TrkA (uM)
I-14	0,0033	0,065	0,014	0,047	0,005

La Tabla 7 que se presenta a continuación muestra datos de los Ejemplos 9, 10 y 16 que se han descrito anteriormente.

Tabla 7

N.º de compuesto	Ki de Aurora A (uM)	Ki de Aurora B (uM)	Cl ₅₀ de la incorporación de 3H-Thy en Colo205 inhib. después de 72 h (uM)	Cl ₅₀ de la incorporación de 3H-Thy en Colo205 inhib. después de 96 h (uM)
I-1	0,00040	0,007	-	0,047
I-2	0,00039	0,0076	0,026	0,026
I-3	0,00067	0,0065	0,002	0,004
I-4	0,0017	0,015	-	0,092
I-5	0,0012	0,014	-	0,033
I-6	0,00077	0,0062	-	0,024
I-7	0,00036	<0,006	-	0,022
I-8	0,00087	0,0071	0,04	0,033
I-9	0,00043	<0,006	-	0,016
I-10	0,00042	0,007	-	0,042
I-11	0,00041	0,009	-	0,028
I-12	0,00035	0,003	0,019	-
I-13	0,0011	0,022	0,072	0,039
I-14	0,00035	0,0068	0,006	0,006
I-15	0,00040	0,0096	0,026	
I-16	0,0010	0,024	0,051	
I-17	0,00062	0,012	0,026	0,019
I-18	0,00035	0,018	0,027	
I-19	0,00044	0,021	0,05	
I-20	0,00077	0,018	0,012	
I-21	0,00044	0,0095	0,02	

La Tabla 8 que se presenta a continuación muestra datos de los Ejemplos 12-14 y 17-18.

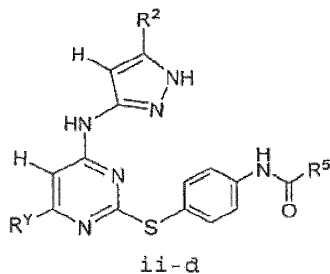
Tabla 8

N.º de compuesto	Ki de FLT-3 (uM)	Ki de JAK-2 (uM)	Ki de JAK-3 (uM)	Ki de Abl (T3151) (uM)	Ki de Abl (natural) (uM)
I-1	-	-	-	0,43	-
I-2	0,036	0,026	0,16	-	0,064
I-3	0,026	0,034	0,15	-	0,030
I-4	-	-	-	-	-
I-5	0,021	0,026	0,1	-	-
I-6	0,048	0,044	0,19	-	-
I-7	0,023	0,023	0,037	-	-
I-8	0,028	0,041	0,14	-	0,030
I-9	0,11	0,022	0,15	-	-
I-10	0,0025	0,054	0,051	-	-
I-11	0,02	0,015	0,056	-	-
I-12	0,015	0,0029	0,028	-	-
I-13	0,043	0,11	0,29	0,21	0,088
I-14	0,065	0,011	0,077	0,033	0,023
I-15	-	-	-	0,2	0,057
I-16	-	-	-	0,18	0,17
I-17	-	-	-	0,053	0,022
I-18	0,16	0,36	0,22	-	-
I-19	0,14	0,13	0,62	-	-
I-20	0,072	0,051	0,11	-	-
I-21	0,12	0,028	0,1	-	-

Aunque hemos descrito varias realizaciones de esta invención, es evidente que nuestros ejemplos básicos se pueden alterar para proporcionar otras realizaciones de esta invención. Por tanto, se apreciará que el alcance de esta invención ha de ser definido por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

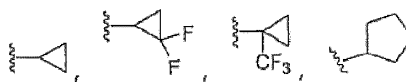
1. Un compuesto de fórmula ii-d



5 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, donde:

R² es alquilo C₁₋₃ o ciclopropilo;

R⁵ es CH₂CH₃, CH₂CF₃, CH₂CH₂CF₃,

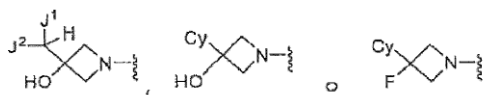


o



10

R⁴ es

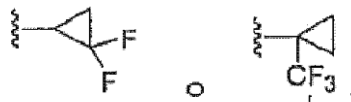


J¹ es H o CH₃;

J² es alquilo C₁₋₄; y

15 Cy es C₃; cicloalquilo.

2. El compuesto de la reivindicación 1, donde R⁵ se selecciona entre CH₂CF₃, CH₂CH₂CF₃,



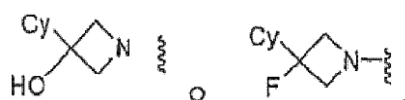
3. El compuesto de la reivindicación 2, donde R⁵ se selecciona entre CH₂CF₃ o



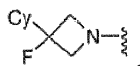
20

4. El compuesto de la reivindicación 3, donde R⁵ es CH₂CF₃.

5. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde R⁴ es



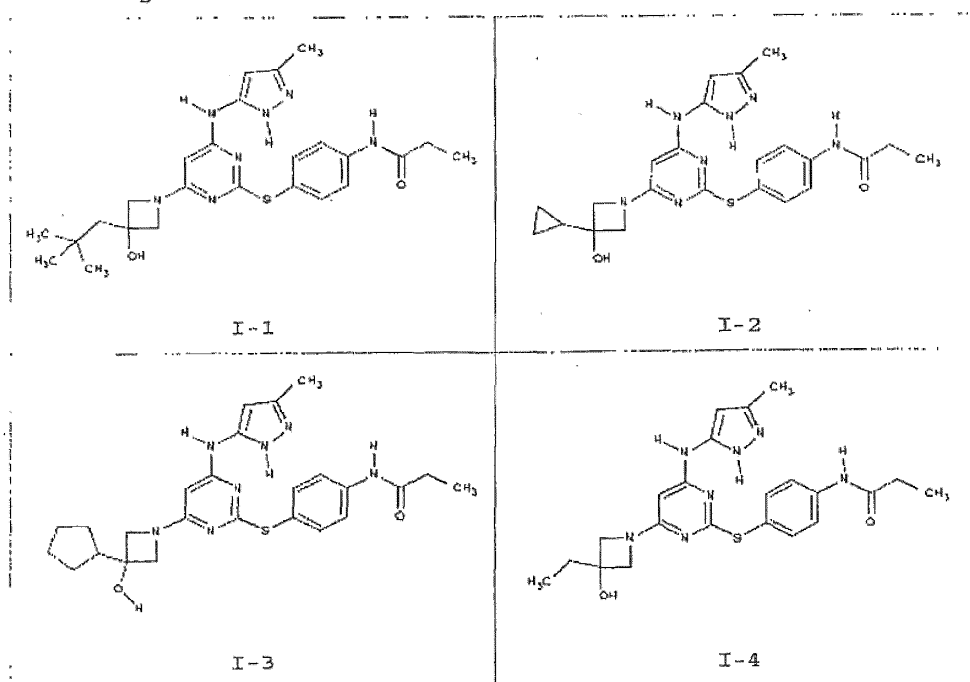
6. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, donde R^Y es

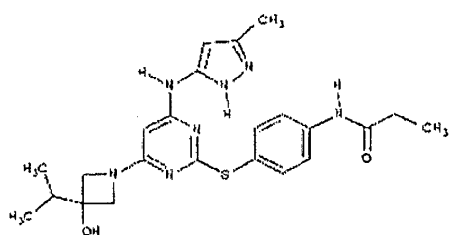


7. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 6, donde Cy es ciclopropilo.

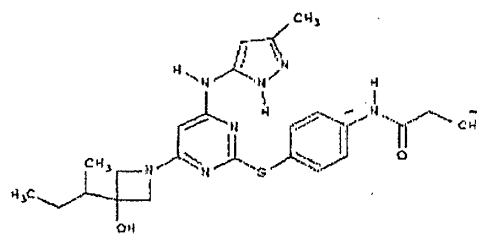
5 8. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde R^2 es metilo.

9. Un compuesto seleccionado entre los siguientes:

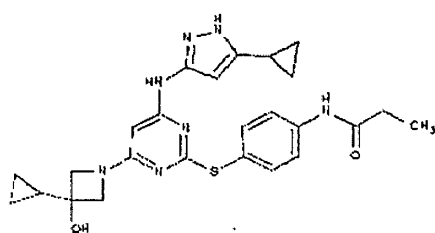




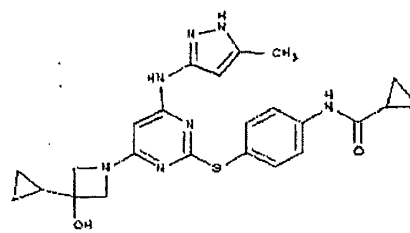
I-5



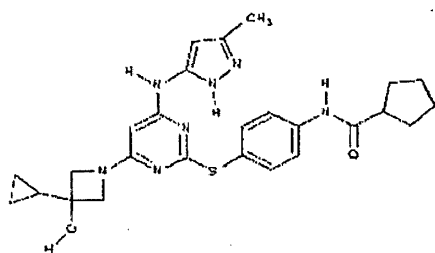
I-6



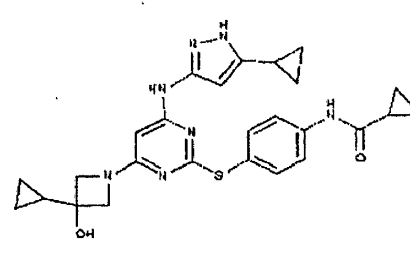
I-7



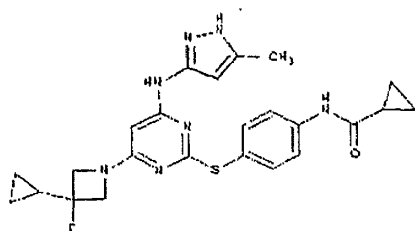
I-8



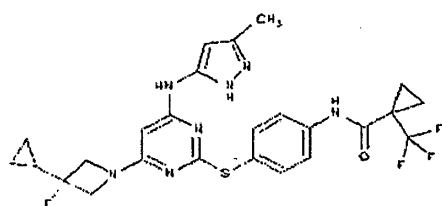
I-9



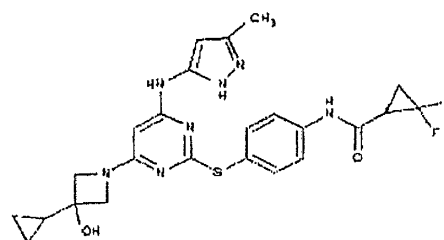
I-10



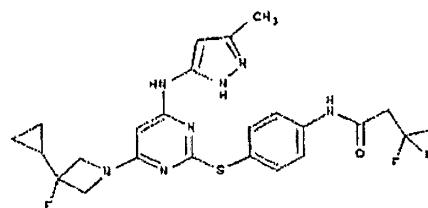
I-13



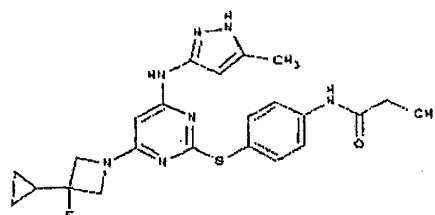
I-15



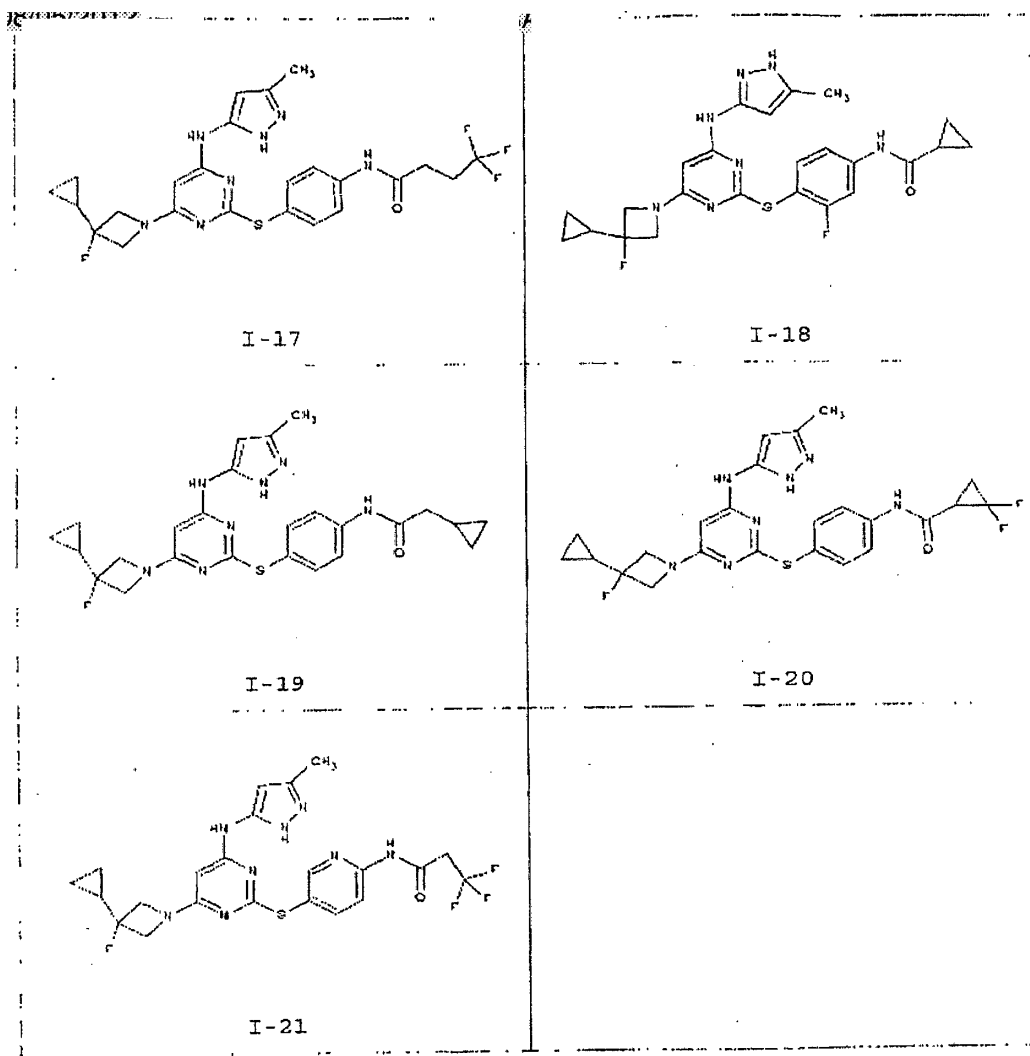
I-12



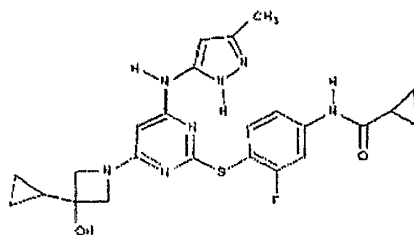
I-14



I-16



10. Un compuesto de la siguiente fórmula:



I-11

5 11. Una composición que comprende un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable.

12. Un método para inhibir la actividad de la proteína cinasa Aurora en una muestra biológica que comprende poner en contacto dicha muestra biológica con un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

13. Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para su uso en el tratamiento de un trastorno proliferativo en un paciente.

14. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 13, donde dicho trastorno proliferativo se selecciona entre melanoma, mieloma, leucemia, linfoma, neuroblastoma o un cáncer seleccionado entre cáncer de colon, mama, gástrico, ovárico, cervical, broncopulmonar, sistema nervioso central (SNC), renal, de próstata, vejiga, pancreático, cerebral (gliomas), buccinofaringolarígeo, riñón, hígado, melanoma, sarcoma o cáncer de tiroides en un paciente que lo necesite.
15. Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y otro agente terapéutico para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite, donde dicho compuesto o sal de este y el agente terapéutico se administran de forma secuencial o se administran de forma conjunta.
16. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 15, donde dicho agente terapéutico se selecciona entre taxanos, inhibidores de bcr-abl, inhibidores de EGFR, agentes que dañan el ADN y antimetabolitos, o donde dicho agente terapéutico se selecciona entre Paclitaxel, Gleevec, dasatinib, nilotinib, Tarceva, Iressa, cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, antraciclinas, AraC y 5-FU, o donde dicho agente terapéutico se selecciona entre camptotecina, doxorubicina, idarrubicina, cisplatino, taxol, taxotere, vincristina, tarceva, el inhibidor de MEK, U0126, un inhibidor de KSP, vorinostat, Gleevec, dasatinib y nilotinib.