

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 426**

51 Int. Cl.:

C07D 471/04 (2006.01)

A61K 31/4462 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2011 E 11719781 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015 EP 2563789**

54 Título: **Compuestos 7-(1H-pirazol-4-il)-1,6-naftiridina como inhibidores de Syk**

30 Prioridad:

29.04.2010 GB 201007203

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

19.08.2015

73 Titular/es:

**GLAXO GROUP LIMITED (100.0%)
980 Great West Road
Brentford, Middlesex TW8 9GS, GB**

72 Inventor/es:

**ATKINSON, FRANCIS LOUIS;
BARKER, MICHAEL DAVID;
DOUAULT, CLEMENT;
GARTON, NEIL STUART;
LIDDLE, JOHN;
PATEL, VIPULKUMAR KANTIBHAI;
PRESTON, ALEXANDER GEORGE STEVEN y
WILSON, DAVID MATTHEW**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 543 426 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

Compuestos 7-(1H-pirazol-4-il)-1,6-naftiridina como inhibidores de Syk

La presente invención se refiere a nuevos compuestos químicos que tienen actividad frente a la tirosina quinasa del bazo (Syk), a procesos para su preparación, a formulaciones farmacéuticamente aceptables que los contienen y a su uso en terapia.

Syk es una tirosina quinasa no de receptor que está implicada en el acoplamiento de inmunorreceptores activados con eventos de señalización aguas abajo que median diversas respuestas celulares, incluyendo proliferación, diferenciación, y fagocitosis. Syk se expresa ampliamente en las células hematopoyéticas. Los inhibidores de Syk tienen actividades anti-inflamatorias e inmunomoduladoras potenciales. Inhiben la señalización mediada por Syk del receptor de Fc épsilon y gamma de IgG y receptor BCR, lo que resulta en la inhibición de la activación de mastocitos, macrófagos, y células B y respuestas inflamatorias relacionadas y daño tisular. De acuerdo con esto, los inhibidores de Syk han atraído el interés en varias áreas terapéuticas, incluyendo el tratamiento de artritis reumatoide, linfoma de células B y asma/rinitis.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad auto-inmune que afecta aproximadamente al 1% de la población. Se caracteriza por la inflamación de articulaciones articulares dando lugar a la destrucción debilitante del hueso y cartílago. Estudios clínicos recientes con rituximab, que causa a depleción reversible de células B, (J. C. W. Edwards *et al.* *New Eng. J. Med.*, 2004, 350, 25: 2572-2581), han mostrado que tomar como diana la función de las células B es una estrategia terapéutica apropiada en enfermedades auto-inmunes tales como AR. El beneficio clínico se correlaciona con una reducción de anticuerpos anti-reactivos (o factor reumatoide) y estos estudios sugieren que la función de las células B y de hecho la producción de auto-anticuerpos son centrales para la patología en marcha en la enfermedad.

Los estudios usando células de ratones deficientes en la Syk han demostrado un papel no redundante de esta quinasa en la función de las células B. La deficiencia en Syk se caracteriza por un bloqueo en el desarrollo de las células B (M. Turner *et al.* *Nature*, 1995, 378: 298-302 y Cheng *et al.* *Nature*, 1995, 378: 303-306). Estos estudios, junto con estudios sobre células B maduras deficientes en Syk (Kurosaki *et al.* *Immunol. Rev.* 2000, 176:19-29), demuestran que Syk se requiere para la diferenciación y activación de las células B. Por lo tanto, la inhibición de Syk en pacientes con AR probablemente bloquee la función de las células B y por lo tanto reduzca la producción del factor reumatoide. Además del papel de Syk en la función de las células B, es relevante para el tratamiento de AR, el requerimiento de la actividad Syk en la señalización del receptor Fc (FcR). Se ha sugerido que la activación de FcR por complejos inmunes en AR contribuye a la liberación de múltiples mediadores pro-inflamatorios.

La contribución de procesos dependientes de Syk a la patología de AR ha sido revisada por Wong *et al.* (*Expert Opinion Investigational Drugs*, 2004, 13 (7): 743-762).

Se han publicado los resultados de un ensayo clínico de 12 semanas para el inhibidor de Syk R788 (fostamatinib disodio, Rigel): Treatment of rheumatoid arthritis with a syk kinase inhibitor: A twelve-week, randomized, placebo-controlled trial, *Arthritis & Rheumatism*, 58(11), 2008: 3309-3318.

Los inhibidores de Syk también pueden ser útiles en la terapia del cáncer, específicamente malignidades hemo, particularmente Linfomas No de Hodgkin incluyendo linfomas folicular (FL), de células del manto, de Burkitt y difuso de células B grandes (DLBCL).

Los estudios han mostrado que Syk está desregulada por sobreexpresión y/o activación constitutiva en una variedad de tumores de linfoma B primarios y también en líneas celulares de linfoma B. Syk, a través de la ruta PI3K/AKT, la ruta PLD y señalización independiente de AKT, activa mTOR (diana de mamíferos de rapamicina) que a su vez incrementa la supervivencia y proliferación de las células B. La inhibición de Syk, *in vitro*, resulta en activación disminuida de mTOR y una reducción de la clonogenicidad en células FL. La inhibición de Syk quinasa con curcumina en un modelo murino de linfoma B (BKS-2) proporcionó una reducción significativa de carga tumoral según se mide por el número total de esplenocitos (Leseux L. *et al.* *Blood* 15 dic. 2006, 108(13): 4156-4162 y Gururajan M. *et al.* *Journal of Immunology*, 2007, 178: 111-121).

Los resultados de un ensayo clínico de Fase 2 de R788 (fostamatinib disodio) en pacientes con linfoma no de Hodgkin de células B (NHL) con recaída o refractario muestran que el compuesto se tolera bien por estos pacientes, así como un beneficio terapéutico en pacientes que padecen linfoma difuso de Células B grandes (DLBCL) y leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico pequeño (CLL/SLL). A pesar del hecho de que los pacientes incluidos en este estudio tenían enfermedad avanzada y el tratamiento con terapias comercializadas había fracasado, un número significativo de ellos fueron particularmente capaces de responder a inhibición de Syk con R788 (www.Rigel.com; Friedberg J. W. *et al.* *Blood*, 1 abril 2010; 115(13): 2578-85).

Los inhibidores de Syk también pueden ser útiles en el tratamiento de asma y rinitis ya que son importantes en la transducción de las señales celulares aguas abajo asociadas con el entrecruzamiento de receptores FcεR1 y/o FcγR1, y están posicionados temprano en la cascada de señalización. En los mastocitos, por ejemplo, la secuencia

temprana de la señalización de FcεR1 después del entrecruzamiento del alérgeno de complejos receptor-IgE implica en primer lugar a Lyn (una tirosina quinasa de la familia Src) y después Syk.

La rinitis y asma alérgicas son enfermedades asociadas con reacciones de hipersensibilidad y eventos inflamatorios que implican una multitud de tipos celulares incluyendo mastocitos, eosinófilos, células T y células dendríticas. Después de la exposición al alérgeno, los receptores de inmunoglobulina de alta afinidad para IgE (FcεR1) e IgG (FcγR1) se entrecruzan y activan procesos aguas abajo en los mastocitos y otros tipos celulares dando lugar a la liberación de mediadores pro-inflamatorios y espasmógenos de las vías aéreas. En el mastocito, por ejemplo, el entrecruzamiento del receptor de IgE por el alérgeno da lugar a la liberación de mediadores incluyendo histamina de gránulos pre-formados, así como la síntesis y liberación de mediadores lipídicos recién sintetizados incluyendo prostaglandinas y leucotrienos.

Se mostró que el inhibidor de Syk R112 (Rigel), dosificado intranasalmente en un estudio de fase I/II para el tratamiento de rinitis alérgica, proporcionaba una disminución estadísticamente significativa en PGD₂, un mediador inmune clave que está altamente correlacionado con mejoras en la rinorrea alérgica, así como es seguro a lo largo de un intervalo de indicadores, proporcionando así la primera evidencia para la seguridad y eficacia clínica de un inhibidor de Syk tópico (véase Meltzer E. O. *et al.* "An intranasal Syk kinase inhibitor (R112) improves the symptoms of seasonal allergic rhinitis in a park environment"; *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2005, 115(4): 791-796). En un estudio clínico de fase II adicional, para rinitis alérgica, se mostró sin embargo que R112 tiene una ausencia de eficacia frente a placebo (www.clinicaltrials.gov Identificador NCT0015089).

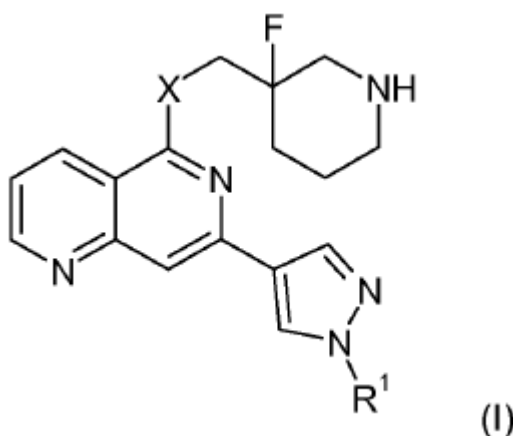
La urticaria aguda y crónica son enfermedades de la piel comunes que se piensa que afectan aproximadamente al 25% de la población total en los EEUU (véase "New concepts in chronic urticaria"; *Current Opinions in Immunology*, 2008, 20: 709-716). Aunque la urticaria puede desencadenarse por reacciones alérgicas, muchos casos tienen una etiología que no está clara. La urticaria espontánea crónica se define cuando están presentes pápulas ampliamente diseminadas durante más de 6 semanas. Existen muchas similitudes patológicas en los pacientes con urticaria crónica, en términos de la magnitud de las pápulas en la piel, con reacciones de desgranulación de mastocitos y basófilos inducidas por alérgeno mediante la activación de IgE. Aproximadamente el 40% de los pacientes con urticaria espontánea crónica contienen auto-anticuerpos IgG séricos dirigidos a IgE o el receptor de IgE (Receptor Fc Épsilon) y se piensa que éstos dirigen la liberación de la histamina y otros mediadores a través de la desgranulación de mastocitos y basófilos. Los inhibidores de Syk inhibirían la respuesta de señalización posterior a la activación de Fc Épsilon mediada por IgE e inhibirían la liberación de mediadores que se sabe que está implicada en prurito crónico en múltiples enfermedades.

WO03/057695A1 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc.) describe nuevas 1,6-naftiridinas que tienen actividad inhibidora de Syk. Éstas se describen adicionalmente en "Discovery and SAR of Novel [1,6] Naphthyridines as Potent Inhibitors of Spleen Tyrosine Kinase (SYK)" (*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13 (2003): 1415-1418). Esto ha sido seguido por dos solicitudes de patente más recientes, WO2010/015518A2 y WO2010/015520A1 (Boehringer Ingelheim International GmbH), que describen naftiridinas sustituidas con 4-dimetilamino-fenilo y naftiridinas sustituidas, respectivamente.

WO04/035604A2 (Millennium Pharmaceuticals, Inc.) describe las coordenadas estructurales de la proteína Syk humana.

Sin embargo, permanece la necesidad de identificar compuestos adicionales que son inhibidores de la tirosina quinasa del bazo (Syk).

Así, en un primer aspecto de la invención, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I):



en la que:

X es O o NH;

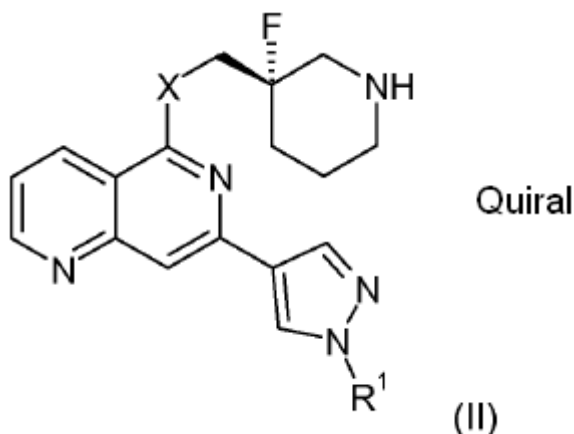
R¹ es alquilo C₂₋₄, cicloalquiloC₃₋₇, hidroxialquiloC₂₋₄, alcoxiC₁₋₂alquiloC₁₋₄, trifluorometilalquiloC₁₋₂ o bencilo;
o una sal de éste (de aquí en adelante en la presente memoria "compuestos de la invención").

En un aspecto, X es NH.

- 5 En una realización, R¹ es etilo, *iso*-propilo, *t*-butilo, ciclopentilo, metoximetilo, metoxietilo, hidroxietilo, 2,2-hidroximetilpropilo, 2,2,2-trifluoroetilo o bencilo. En otra realización, R¹ es alquiloC₂₋₄, cicloalquiloC₃₋₇ o alcoxiC₁₋₂alquiloC₁₋₄. En otra realización, R¹ es etilo, *t*-butilo, -CH₂OCH₃, -CH₂C(CH₃)₂OH, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂OCH₃, -CH(CH₃)₂, -CH₂CF₃, bencilo o ciclopentilo. En otra realización, R¹ es etilo, *t*-butilo, o metoximetilo. En otra realización, R¹ es etilo o *t*-butilo. En una realización adicional, R¹ es *t*-butilo.
- 10 Debe entenderse que la presente invención abarca todas las combinaciones de grupos sustituyentes descritos anteriormente en la presente memoria.

Se apreciará que los compuestos de fórmula (I) comprenden un centro quiral en el carbono 3 del anillo piperidinilo. Se ha encontrado que aquellos que tienen la estereoquímica absoluta *S* se prefieren generalmente, debido a mejores propiedades de desarrollo del fármaco, incluyendo mejor biodisponibilidad (según se mide en estudios farmacocinéticos predictivos en animales) y menor actividad hERG.

- 15 De acuerdo con esto, en una realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) que tiene la estereoquímica absoluta *S*. En otra realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) que tiene la estereoquímica absoluta *S*, que es un compuesto de fórmula (II):



- 20 en la que:

X y R¹ son como se han definido anteriormente en la presente memoria;

o una sal de éste.

Los compuestos de la invención incluyen los compuestos de los Ejemplos 1 a 11 y sales de éstos.

- 25 En una realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) seleccionado del grupo que consiste en:

7-(1-etil-1*H*-pirazol-4-il)-*N*-{[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}-1,6-naftiridin-5-amina;

7-[1-(1,1-dimetiletil)-1*H*-pirazol-4-il]-*N*-{[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}-1,6-naftiridin-5-amina;

N-{[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}-7-[1-[(metiloxi)metil]-1*H*-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-amina;

7-(1-etil-1*H*-pirazol-4-il)-5-({[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}oxi)-1,6-naftiridina;

- 30 1-{4-[5-({[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}amino)-1,6-naftiridin-7-il]-1*H*-pirazol-1-il}-2-metil-2-propanol;

2-{4-[5-({[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}amino)-1,6-naftiridin-7-il]-1*H*-pirazol-1-il}etanol;

N-{[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}-7-[1-[2-(metiloxi)etil]-1*H*-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-amina;

7-(1-ciclopentil-1*H*-pirazol-4-il)-*N*-[(3-fluoro-3-piperidinil)metil]-1,6-naftiridin-5-amina;

N-[(3-fluoro-3-piperidinil)metil]-7-[1-(2,2,2-trifluoroetil)-1*H*-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-amina;
N-{[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}-7-[1-(2,2,2-trifluoroetil)-1*H*-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-amina;
N-{[(3*R*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}-7-[1-(2,2,2-trifluoroetil)-1*H*-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-amina;
N-[(3-fluoro-3-piperidinil)metil]-7-[1-(fenilmetil)-1*H*-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-amina;

- 5 *N*-{[(3-fluoro-3-piperidinil)metil]-7-[1-(1-metiletil)-1*H*-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-amina;
N-{[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}-7-[1-(1-metiletil)-1*H*-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-amina; y
N-{[(3*R*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}-7-[1-(1-metiletil)-1*H*-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-amina; y
 sales de éstos.

10 En otra realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) seleccionado del grupo que consiste en:

7-(1-etil-1*H*-pirazol-4-il)-*N*-{[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}-1,6-naftiridin-5-amina;
 7-[1-(1,1-dimetiletil)-1*H*-pirazol-4-il]-*N*-{[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}-1,6-naftiridin-5-amina;
N-{[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}-7-[1-(metiloxi)metil]-1*H*-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-amina;
 7-(1-etil-1*H*-pirazol-4-il)-5-({[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}oxi)-1,6-naftiridina;

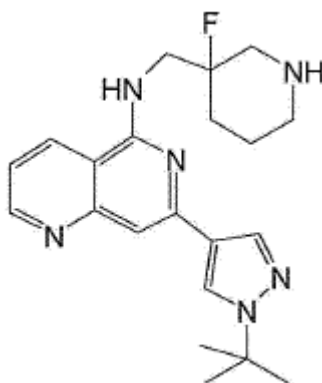
- 15 1-{4-[5-({[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}amino)-1,6-naftiridin-7-il]-1*H*-pirazol-1-il]-2-metil-2-propanol};
 2-{4-[5-({[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}amino)-1,6-naftiridin-7-il]-1*H*-pirazol-1-il}etanol;
N-{[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}-7-[1-[2-(metiloxi)etil]-1*H*-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-amina;
 7-(1-ciclopentil-1*H*-pirazol-4-il)-*N*-{[(3-fluoro-3-piperidinil)metil]-1,6-naftiridin-5-amina;
N-[(3-fluoro-3-piperidinil)metil]-7-[1-(2,2,2-trifluoroetil)-1*H*-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-amina; y
 20 *N*-[(3-fluoro-3-piperidinil)metil]-7-[1-(fenilmetil)-1*H*-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-amina; y
 sales de éstos.

En otra realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) seleccionado del grupo que consiste en:

7-(1-etil-1*H*-pirazol-4-il)-*N*-{[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}-1,6-naftiridin-5-amina; y

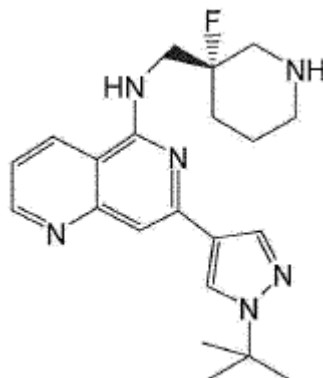
- 25 7-[1-(1,1-dimetiletil)-1*H*-pirazol-4-il]-*N*-{[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}-1,6-naftiridin-5-amina; y
 sales de éstos.

En otra realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) que es 7-[1-(1,1-dimetiletil)-1*H*-pirazol-4-il]-*N*-{[(3-fluoro-3-piperidinil)metil]-1,6-naftiridin-5-amina



- 30 o una sal de éste.

En una realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) que es 7-[1-(1,1-dimetiletil)-1*H*-pirazol-4-il]-*N*-{[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}-1,6-naftiridin-5-amina



o una sal de éste.

- 5 En el alcance de los "compuestos de la invención" están incluidos todos los solvatos (incluyendo hidratos), polimorfos, derivados radiomarcados, estereoisómeros e isómeros ópticos de los compuestos de fórmula (I) y sales de éstos.

10 Debe entenderse que las referencias en la presente memoria a los compuestos de fórmula (I) y sales de éstos, abarca los compuestos de fórmula (I) como bases libres, o como sales de éstos, por ejemplo, como sales farmacéuticamente aceptables de éstos. Así, en una realización, la invención está dirigida a compuestos de fórmula (I) como la base libre. En otra realización, la invención está dirigida a compuestos de fórmula (I) y sales de éstos. En una realización adicional, la invención está dirigida a compuestos de fórmula (I) y sales farmacéuticamente aceptables de éstos.

15 Los compuestos de la presente invención son útiles como inhibidores de Syk. Los compuestos de la presente invención presentan baja actividad en el ensayo de unión hERG, una medida clave de toxicidad cardiaca potencial. Los compuestos de la presente invención también son negativos en el Ensayo de Mutación Reversa Bacteriano, un ensayo diseñado para detectar un amplio rango de sustancias químicas que pueden producir daño genético que da lugar a mutaciones génicas (sustituciones de pares de bases y mutaciones de desplazamiento de marco).

20 Los compuestos de la presente invención son así potencialmente útiles en el tratamiento de algunas terapias de cáncer, en particular malignidades hemo, así como afecciones inflamatorias que implican las células B y/o macrófagos activados, y también enfermedades que resultan de la activación inapropiada de mastocitos, por ejemplo enfermedades alérgicas e inflamatorias.

25 Cuando se usa en la presente memoria, el término "alquilo" incluye todos los isómeros saturados de cadena lineal y ramificada. Por ejemplo, alquilo_{C1-4} significa un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada que contiene al menos 1, y como máximo 4, átomos de carbono. Los ejemplos representativos de éstos incluyen, pero no están limitados a, metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo, *n*-butilo, *sec*-butilo, *iso*-butilo y *t*-butilo.

30 Cuando se usa en la presente memoria, el término "alcoxi" incluye todos los isómeros saturados de cadena lineal y ramificada. Por ejemplo, alcoxi_{C1-2} significa un grupo alcoxi de cadena lineal que contiene al menos 1, y como máximo 2, átomos de carbono. Los ejemplos representativos de "alcoxi" tal y como se usa en la presente memoria incluyen, pero no están limitados a, metoxi y etoxi.

Cuando se usa en la presente memoria, el término "cicloalquilo" incluye, a no ser que se defina otra cosa, anillos carbocíclicos que tienen de tres a siete átomos de carbono en el anillo. Los ejemplos representativos de éstos incluyen, pero no están limitados a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo. Preferiblemente, el anillo cicloalquilo comprende cinco o seis átomos de carbono en el anillo.

35 Cuando se usa en la presente memoria, el término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones y formas de dosificación que son, en el alcance del criterio médico razonable, adecuados para uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, u otro problema o complicación, conmensurable con una proporción beneficio/riesgo razonable. El experto en la técnica apreciará que pueden prepararse sales farmacéuticamente aceptables del compuesto de la presente invención.

40 Cuando se usa en la presente memoria, el término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales que tienen la actividad biológica deseada del compuesto objeto y presentan efectos toxicológicos no deseados mínimos. Estas sales farmacéuticamente aceptables pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y purificación finales del compuesto, o haciendo reaccionar separadamente el compuesto purificado en su forma de ácido libre o base libre con una base o ácido adecuado, respectivamente. De hecho, en determinadas realizaciones de la

invención, las sales farmacéuticamente aceptables pueden preferirse sobre la base libre o ácido libre respectivo porque dichas sales confieren una mayor estabilidad o solubilidad a la molécula facilitando de esta manera la formulación en una forma de dosificación.

5 Los compuestos de fórmula (I) son básicos y de acuerdo con esto generalmente son capaces de formar sales de adición a ácido farmacéuticamente aceptables por tratamiento con un ácido adecuado. Los ácidos adecuados incluyen ácidos inorgánicos farmacéuticamente aceptables y ácidos orgánicos farmacéuticamente aceptables. Las sales de adición a ácido farmacéuticamente aceptables representativas incluyen hidrocloreto, hidrobromuro, nitrato, metilnitrato, sulfato, bisulfato, sulfamato, fosfato, acetato, hidroxiacetato, fenilacetato, propionato, butirato, isobutirato, valerato, maleato, hidroximaleato, acrilato, fumarato, malato, tartrato, citrato, salicilato, *p*-aminosalicilato, 10 glicolato, lactato, heptanoato, ftalato, oxalato, succinato, benzoato, *o*-acetoxibenzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, mandelato, tanato, formato, estearato, ascorbato, palmitato, oleato, piruvato, pamoato, malonato, laurato, glutarato, glutamato, estolato, metanosulfonato (mesilato), etanosulfonato (esilato), 2-hidroxietanosulfonato, bencenosulfonato (besilato), *p*-aminobencenosulfonato, *p*-toluenosulfonato (tosilato), y naftalen-2-sulfonato. En una realización, la presente invención proporciona una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de fórmula (I) que es la sal hidrocloreto.

15 Los compuestos de fórmula (I) contienen un centro quiral y, por lo tanto, existen como enantiómeros individuales, o como mezclas de éstos. Cuando no se especifica la estereoquímica del centro quiral, se pretende que la estructura englobe cada enantiómero y todas las mezclas de éstos. Así, los compuestos de fórmula (I) pueden usarse como modificaciones racémicas incluyendo mezclas racémicas y racematos, mezclas enantioméricamente enriquecidas, o 20 como estereoisómeros individuales enantioméricamente puros. La presente invención incluye todas estas mezclas así como los enantiómeros individuales puros. Generalmente, se prefiere usar un compuesto de fórmula (I) en la forma de un único enantiómero purificado, por ejemplo un compuesto de fórmula (II).

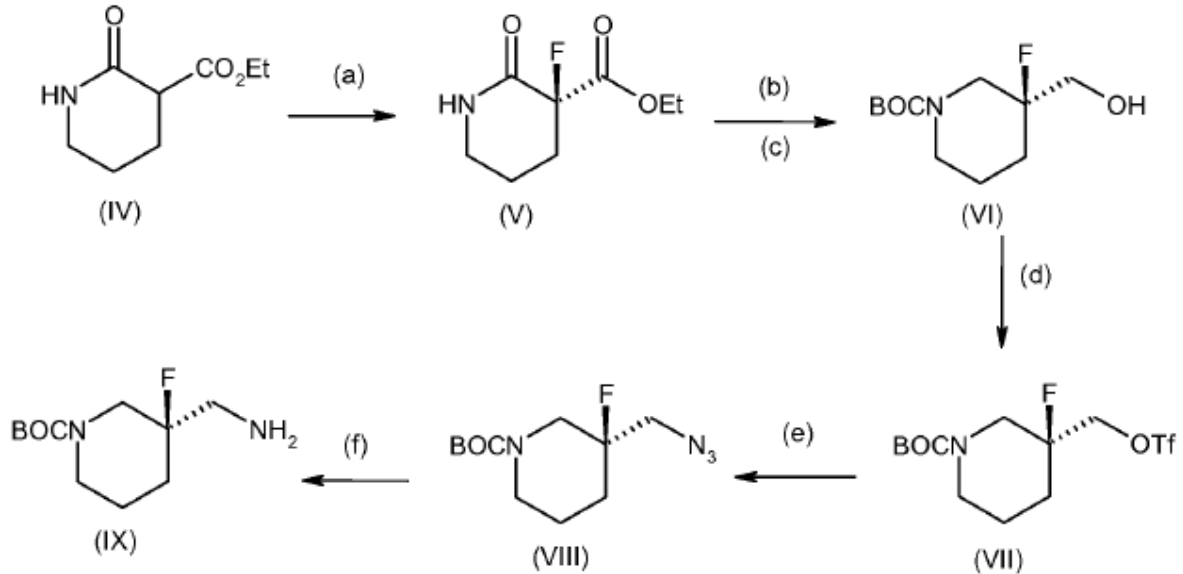
25 Los enantiómeros individuales de un compuesto de fórmula (I) pueden resolverse por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, dicha resolución puede llevarse a cabo (1) por formación de sales diastereoisoméricas, complejos u otros derivados; (2) por reacción selectiva con un reactivo específico de estereoisómero, por ejemplo por oxidación o reducción enzimática; o (3) por cromatografía gas-líquido o líquida en un entorno quiral, por ejemplo, en un soporte quiral tal como sílice con un ligando quiral unido o en presencia de un disolvente quiral. El experto en la técnica apreciará que cuando el estereoisómero deseado se convierte en otra entidad química por uno de los procedimientos de separación descritos anteriormente, se requiere una etapa 30 adicional para liberar la forma deseada. Alternativamente, pueden sintetizarse enantiómeros específicos por síntesis asimétrica usando reactivos, sustratos, catalizadores o disolventes ópticamente activos, o convirtiendo un enantiómero en el otro por transformación asimétrica.

35 Un compuesto de la presente invención puede existir en forma sólida o líquida. En el estado sólido, el compuesto de la presente invención puede existir en forma cristalina o no cristalina (amorfa), o como una mezcla de éstas. Para un compuesto de la presente invención que está en forma cristalina, el experto en la técnica apreciará que pueden formarse solvatos farmacéuticamente aceptables en los que las moléculas de disolvente se incorporan en la red cristalina durante la cristalización. Los solvatos pueden implicar disolventes no acuosos tales como, pero no limitados a, etanol, isopropanol, *n*-butanol, *i*-butanol, acetona, tetrahidrofurano, dioxano, DMSO, ácido acético, etanolamina, y acetato de etilo, o pueden implicar agua como el disolvente que se incorpora en la red cristalina. Los 40 solvatos en los que el agua es el disolvente incorporado en la red cristalina se refieren típicamente como "hidratos". Los hidratos incluyen hidratos estequiométricos así como composiciones que contienen cantidades variables de agua. La invención incluye todos estos solvatos. Además, el término solvato engloba solvatos tanto del compuesto como base libre así como cualquier sal de éste.

45 El experto en la técnica apreciará además que un compuesto de la presente invención que existe en forma cristalina, incluyendo los diferentes solvatos de éste, puede presentar polimorfismo (es decir, la capacidad de ocurrir en diferentes estructuras cristalinas). Estas diferentes formas cristalinas se conocen típicamente como "polimorfos". La invención incluye todos estos polimorfos. Los polimorfos tienen la misma composición química pero se diferencian en el empaquetamiento, disposición geométrica, y otras propiedades descriptivas del estado sólido cristalino. Los polimorfos, por lo tanto, pueden tener diferentes propiedades físicas tales como forma, densidad, dureza, 50 deformabilidad, estabilidad, y propiedades de disolución. Los polimorfos presentan típicamente diferentes puntos de fusión, espectros IR, y patrones de difracción de rayos X en polvo, que pueden usarse para identificación. El experto en la técnica apreciará que pueden producirse diferentes polimorfos, por ejemplo, cambiando o ajustando las condiciones o reactivos de la reacción, usados en la preparación del compuesto. Por ejemplo, los cambios en la temperatura, presión, o disolvente pueden resultar en polimorfos. Además, un polimorfo puede convertirse 55 espontáneamente en otro polimorfo en determinadas condiciones.

Un compuesto de fórmula (I) puede prepararse por los esquemas sintéticos generales descritos más adelante en la presente memoria.

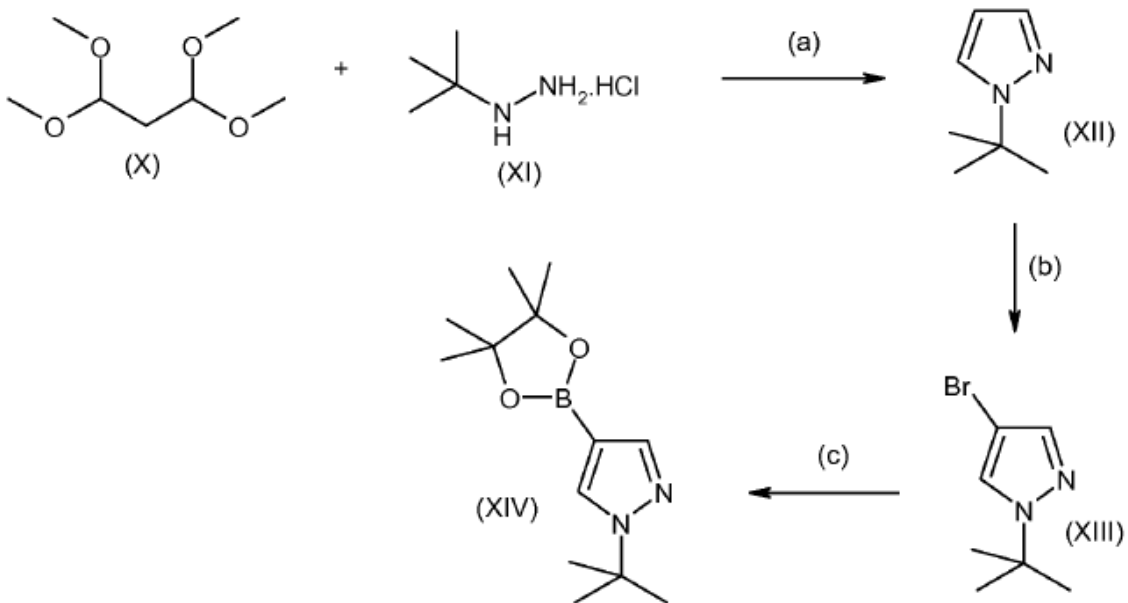
Esquema 1: Síntesis de (3*R*)-3-(aminometil)-3-fluoro-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo



a) 2,6-lutidina, 2-oxo-3-piperidinacarboxilato de etilo, triflato de [(*S*)-(-)-2,2'-bisfosfino)-1,1'-binaftil]paladio (I) dihidrato, N-fluorobencenosulfonimida, EtOH;

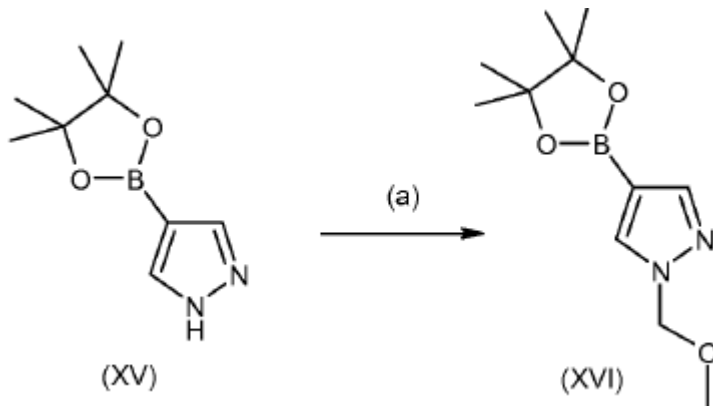
- 5 b) BH₃-THF;
 c) BOC₂O, Et₃N, DCM;
 d) Tf₂O, Et₃N, DCM;
 e) NaN₃, DMF;
 f) Pd/C, EtOH.

10 **Esquema 2:** Síntesis de 1-(1,1-dimetiletil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1*H*-pirazol



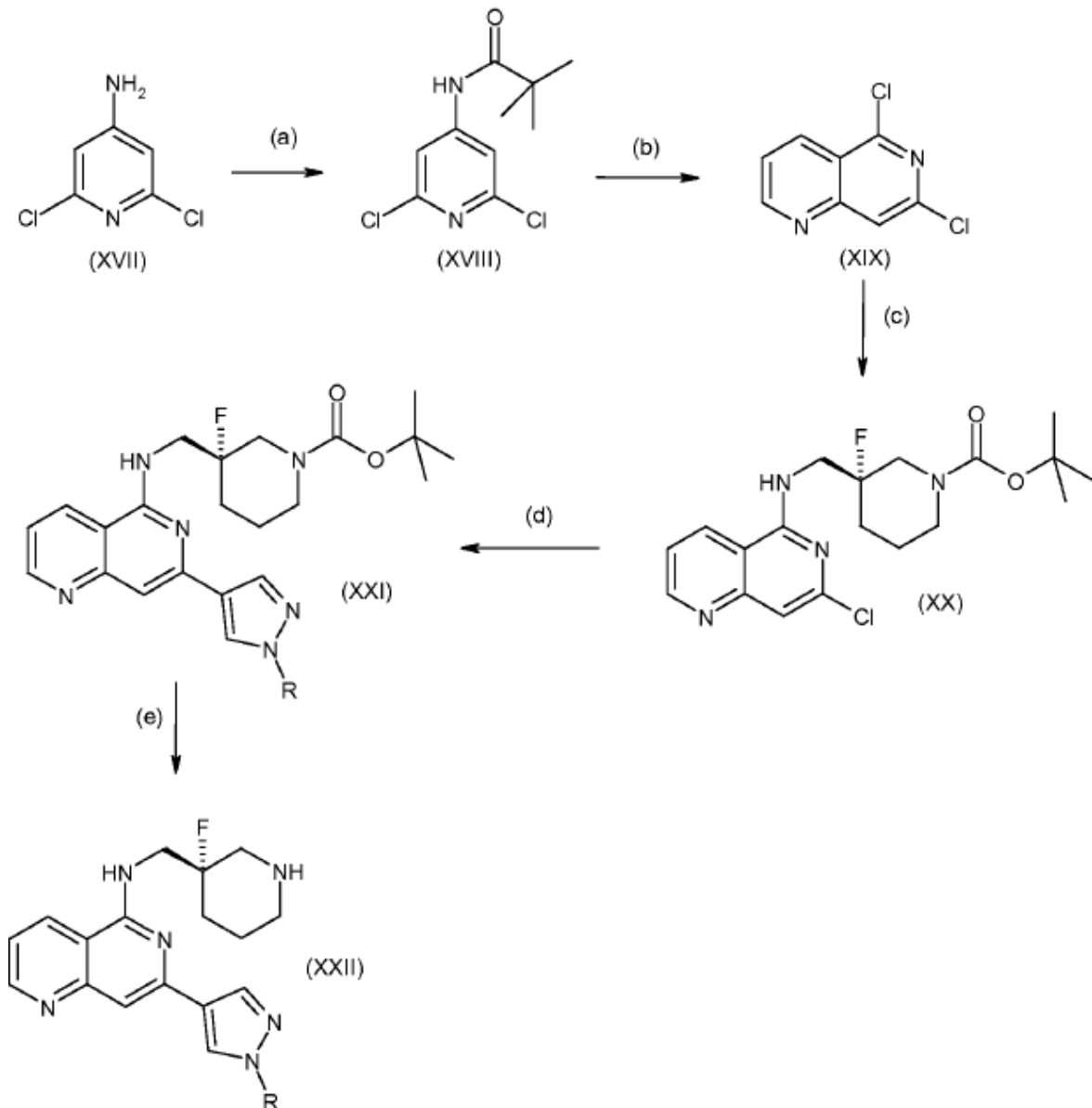
- a) HCl conc., EtOH;
 b) NBS, DCM;
 c) Bis(pinacolato)diboro, KOAc, Pd₂(dba)₃, 2-(diclohexilfosfino)-2'-4'-6'-triisopropilbifenilo, 1,4-dioxano.

Esquema 3: Síntesis de 1-[(metiloxi)metil]-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1*H*-pirazol



a) Yodometil metil éter, K_2CO_3 , acetonitrilo.

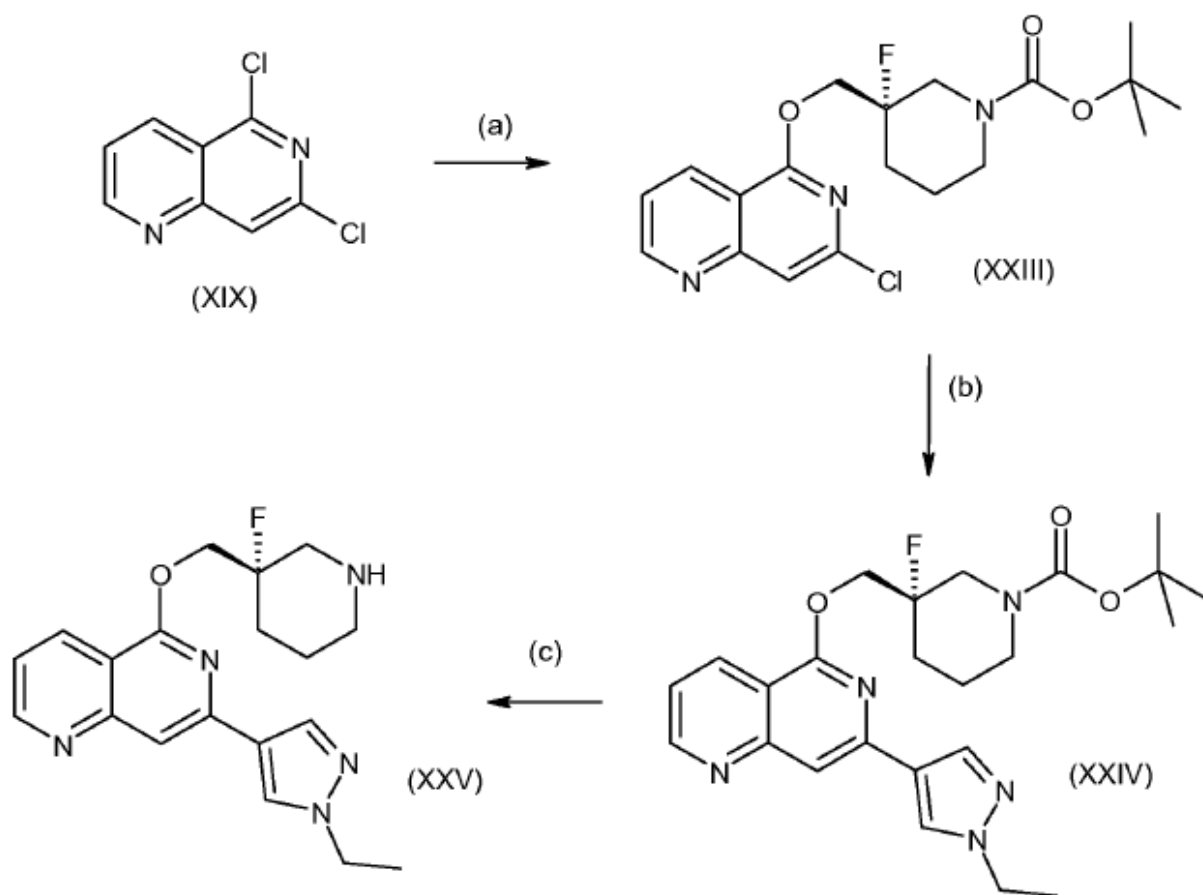
Esquema 4 (X=NH)



En el que R = Et, t-Bu, CH₂OMe

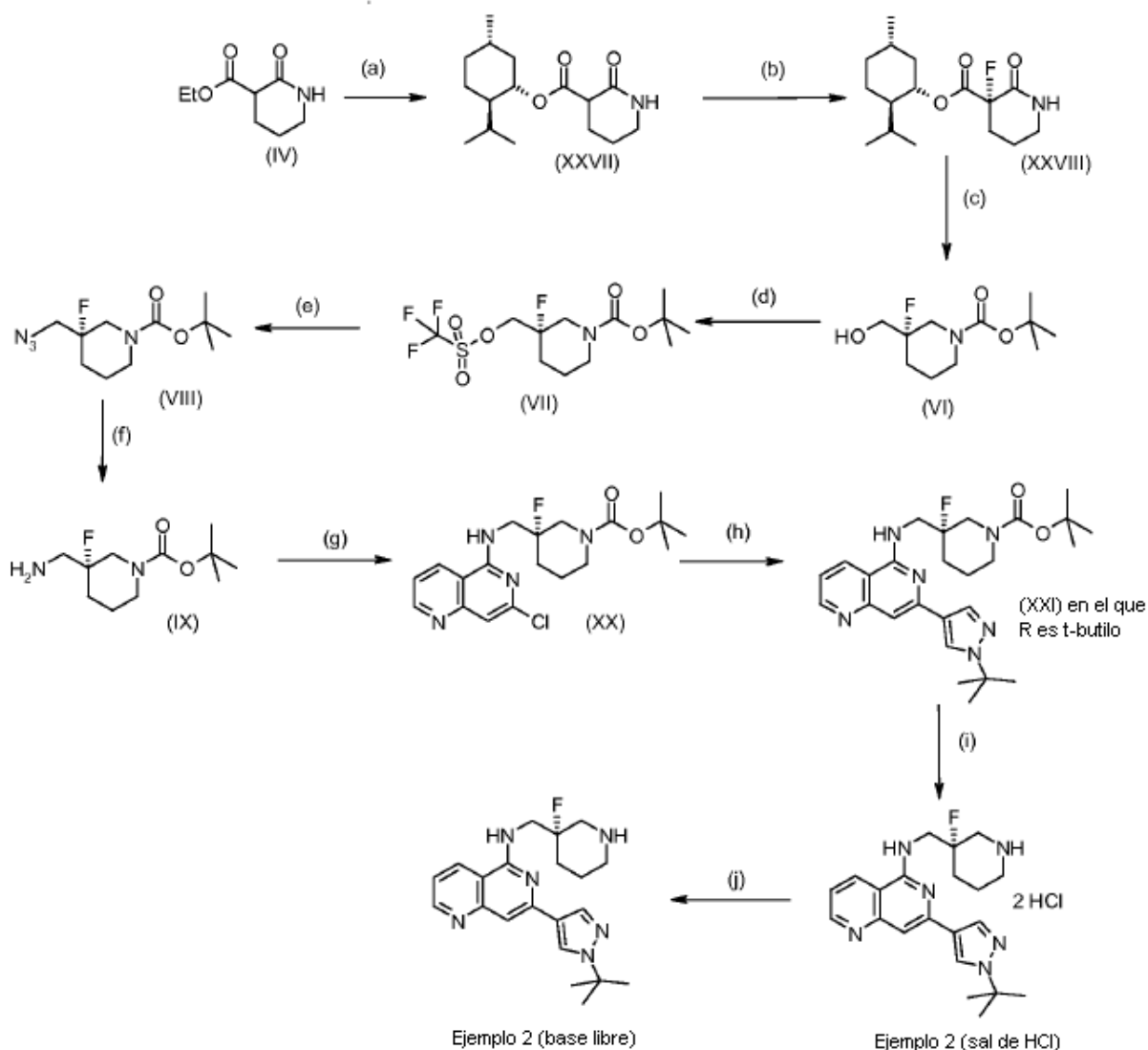
- a) 2,6-dicloro-4-piridinamina, cloruro de 2,2-dimetilpropanoilo, Et₃N, DCM
 b) nBuLi (2E)-3-(dimetilamino)-2-propenal, THF;
 c) (3R)-3-(aminometil)-3-fluoro-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo (véase el esquema 1), DIPEA, NMP;
 5 d) Pirazol éster borónico, Cs₂CO₃, Pd(PPh₃)₄, 1,4-dioxano, H₂O; o pirazol éster borónico, KOH, PEPPSI cat., DME, EtOH, H₂O;
 e) TFA, DCM.

Esquema 5 (X=O): Síntesis de 7-(1-etil-1H-pirazol-4-il)-5-(((3S)-3-fluoro-3-piperidinil]metil)oxi)-1,6-naftiridina



- 10 a) (3S)-3-fluoro-3-(hidroximetil)-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo (véase el esquema 1), NaH, DMF;
 b) 1-etil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol, Cs₂CO₃, Pd(PPh₃)₄, 1,4-dioxano, H₂O;
 c) TFA, DCM.

Esquema 6: Síntesis de 7-[1-(1,1-dimetiletil)-1H-pirazol-4-il]-N-[[3-(3S)-3-fluoro-3-piperidinil]metil]-1,6-naftiridin-5-amina



a) (+)-Mentol, DMAP, tolueno, reflujo;

5 b) [(S)BINAP]Pd(OTf)₂; (PhSO₂)₂NF; 2,6-lutidina; EtOH;

c) (i) BH₃.DMS; THF; reflujo;

(ii) Boc₂O;

(d) Tf₂O, piridina;

(e) NaN₃, DMF;

10 f) Pt/C, hidrógeno, THF, NH₃(ac);

(g) Compuesto de fórmula (XIX), DIPEA, NMP;

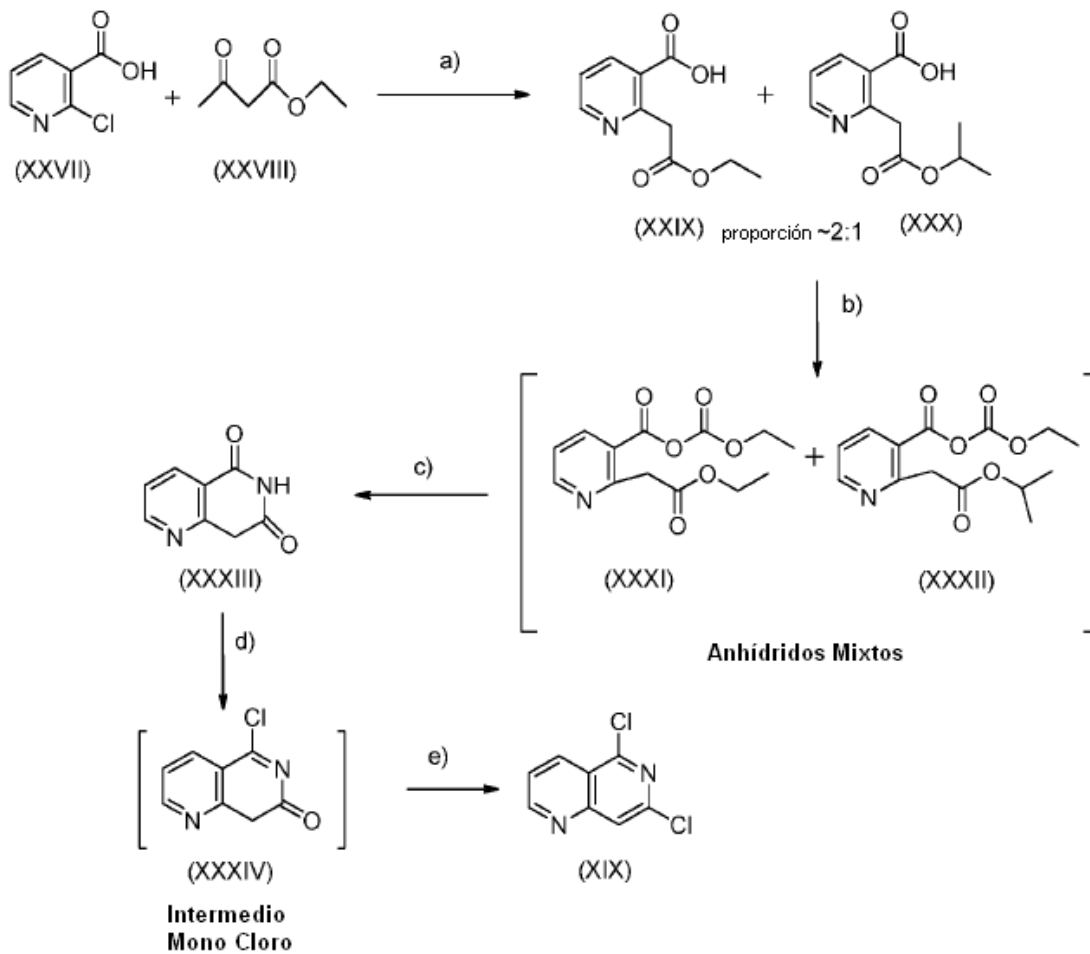
(h) Compuesto de fórmula (XIV), Pd(di-t-bpf)Cl₂, NaHCO₃, dioxano(ac);

(i) HCl/dioxano, tolueno;

(j) (i) NaOH(ac), EtOAc;

15 (ii) n-BuOAc, TBME.

Esquema 7: Síntesis de 5,7-dicloro-1,6-naftiridina



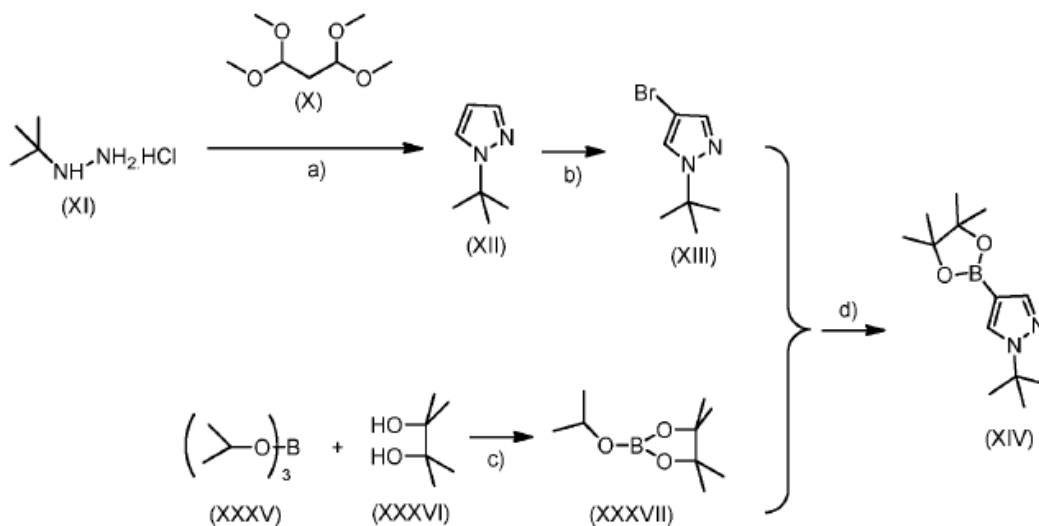
a) $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, *tert*-BuOK, IPA;

b) TEA, THF, ClCO_2Et ;

5 c) $\text{NH}_3(\text{ac})$, $\text{HCl}(\text{ac})$;

d) POCl_3 , Me_4NCl , reflujo.

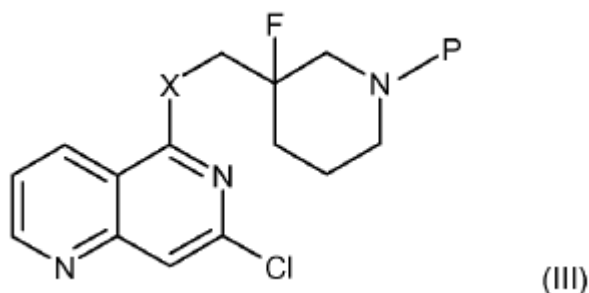
Esquema 8: Síntesis de 1-(1,1-dimetiletil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol



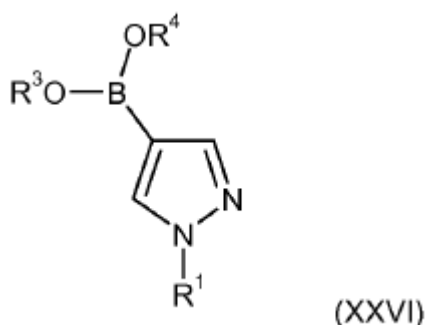
- a) EtOH, HCl, reflujo;
- b) NBS, DCM;
- c) Reflujo;
- d) BuLi, THF

5 Los compuestos de fórmulas (IV), (X), (XI), (XV), (XVII), (XXVII), (XXVIII), (XXXV) y (XXXVI) están disponibles comercialmente, por ejemplo, en Sigma-Aldrich Reino Unido.

Así, en una realización, la presente invención proporciona un proceso para preparar un compuesto de fórmula (I), proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto 1,6-naftiridina de fórmula (III):



10 en el que P es un grupo protector y X es como se ha definido anteriormente en la presente memoria; con un compuesto pirazol éster/ácido borónico de fórmula (XXVI):



15 en el que R³ y R⁴ que pueden ser el mismo o diferente, son cada uno hidrógeno, alquilo C₁₋₆ o R³ y R⁴ pueden estar unidos para formar un grupo alquilenoc₁₋₃ sustituido opcionalmente con hasta cuatro grupos metilo, por ejemplo -C(Me)₂C(Me)₂-; y

R¹ es como se ha definido anteriormente en la presente memoria;

en presencia de un catalizador, en condiciones usadas típicamente para un acoplamiento éster/ácido borónico; y posteriormente, eliminando el grupo protector P.

20 Los ejemplos de grupos protectores y los medios para su eliminación pueden encontrarse en T. W. Greene 'Protective Groups in Organic Synthesis' (J. Wiley and Sons, 1991). Los grupos protectores de amina adecuados incluyen, pero no están restringidos a, sulfonilo (tal como tosilo), acilo (tal como benciloxycarbonilo o t-butoxicarbonilo) y aralquilo (tal como bencilo), que pueden eliminarse por hidrólisis o hidrogenólisis según sea apropiado. Otros grupos protectores de amina adecuados incluyen trifluoroacetilo (-C(O)CF₃), que puede eliminarse por hidrólisis catalizada por base, o un grupo bencilo unido a resina de fase sólida, tal como grupo 2,6-dimetoxibencilo unido a resina Merrifield (conector Ellman) que puede eliminarse por hidrólisis catalizada por ácido (usando, por ejemplo, ácido trifluoroacético).

En una realización de la presente invención, el grupo protector (P) se selecciona de *tert*-butoxicarbonilo "BOC" y 9-fluorenilmetiloxycarbonilo "FMOC".

30 Se observará que, para eficiencia sintética, se obtiene un precursor que es sustancialmente enantioméricamente puro tan pronto como sea posible en la síntesis global, en este caso, en la primera etapa del Esquema I. Así, la

fluoración enantioselectiva del núcleo piperidina en la posición 3, usando un catalizador ópticamente activo (ditriflato de [(S)-(-)-2,2'-bisfosfino)-1,1'-binaftil]paladio (II) dihidrato), da lugar a un producto fluorado enantioméricamente enriquecido. Éste se resuelve adicionalmente para proporcionar un producto sustancialmente enantioméricamente puro usando, por ejemplo, HPLC preparativa quiral.

- 5 Un compuesto de fórmula (I) puede prepararse por los esquemas sintéticos generales descritos anteriormente en la presente memoria, usando la versión racémica del catalizador (ditriflato de [(-)-2,2'-bisfosfino)-1,1'-binaftil]paladio (II) dihidrato), en la primera etapa del Esquema 1, de manera que no hay enriquecimiento enantiomérico, y los intermedios racémicos se usan en todo el proceso. Un compuesto de fórmula (II) puede prepararse entonces a partir del compuesto de fórmula (I) racémico correspondiente, o un precursor con amina protegida, por métodos conocidos en la técnica para la resolución quiral, en particular HPLC quiral (preparativa). Alternativamente, la resolución puede llevarse a cabo en una etapa más temprana, si se desea, por ejemplo, en el Esquema 4, después de la etapa c), después del acoplamiento de la amina racémica al núcleo 1,6-naftiridina.

- 15 Los compuestos de la presente invención son útiles como inhibidores de Syk y así potencialmente útiles en el tratamiento de algunas terapias de cáncer, en particular malignidades hemo, así como afecciones inflamatorias que implican las células B, y también enfermedades que resultan de la activación inapropiada de células mastocitos y basófilos, por ejemplo, enfermedades alérgicas e inflamatorias tales como enfermedades cutáneas mediadas por mastocitos incluyendo urticaria aguda y crónica, mastocitosis, dermatitis atópica y enfermedades autoinmunes tales como lupus cutáneo y afecciones ampollas autoinmunes incluyendo pénfigo y penfigoide.

- 20 También pueden ser útiles en el tratamiento de afecciones agudas que implican a los mastocitos tales como íleo post operatorio.

Así, en una realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, para uso en terapia.

En una realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, para uso en la inhibición de la tirosina quinasa del bazo (Syk).

- 25 En otra realización se proporciona un método para inhibir la tirosina quinasa del bazo (Syk), que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste.

- 30 Los inhibidores de Syk pueden ser útiles en la terapia del cáncer, específicamente malignidades hemo, particularmente Linfomas No Hodgkin incluyendo folicular (FL), de células del manto, linfoma linfocítico pequeño/linfoma linfocítico crónico (SLL/CLL), linfomas de Burkitt y difuso de células B grandes (DLBCL).

De acuerdo con esto, en una realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, para uso en el tratamiento de cáncer, por ejemplo, malignidades hemo, particularmente linfomas No Hodgkin incluyendo folicular (FL), de células del manto, linfoma linfocítico pequeño/linfoma linfocítico crónico (SLL/CLL), linfomas de Burkitt y difuso de células B grandes (DLBCL).

- 35 En otra realización, se proporciona un método para tratar cáncer, específicamente malignidades hemo, particularmente Linfomas No Hodgkin incluyendo folicular (FL), de células del manto, linfoma linfocítico pequeño/linfoma linfocítico crónico (SLL/CLL), linfomas de Burkitt y difuso de células B grandes (DLBCL), método que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de éste.

- 40 En una realización adicional, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, por ejemplo, malignidades hemo, particularmente linfomas No Hodgkin incluyendo folicular (FL), de células del manto, linfoma linfocítico pequeño/linfoma linfocítico crónico (SLL/CLL), linfomas de Burkitt y difuso de células B grandes (DLBCL).

- 45 Los compuestos de la presente invención también pueden usarse en quimioterapia de cáncer en combinación con otras clases de agentes de quimioterapia del cáncer que son conocidos en la técnica. Las clases representativas de agentes para uso en dichas combinaciones para Linfomas No Hodgkin incluyen rituximab, BEXXAR (tositumomab y Yodo I 131 tositumomab), pixantrona y quimioterapia. La combinación de compuestos de la presente invención también puede usarse en combinación con el régimen de fármaco CHOP (ciclofosfamida, adriamicina, vincristina, prednisona) o CHOP más rituximab (CHOP+R).

- 50 Los compuestos de la presente invención son potencialmente útiles para tratar afecciones autoinmunes que implican células B y/o activación de macrófagos, por ejemplo Lupus Eritematoso Sistémico (SLE), Síndrome de Sjorgens, granulomatosis de Wegner y otras vasculitis, penfigoide y pénfigo ampolloso, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), arteriosis de células gigantes, glomerulonefritis, rechazo de trasplante crónico, y artritis reumatoide.

En una realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, para uso en el tratamiento de una afección autoinmune, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico (SLE), lupus discoide (cutáneo), síndrome de Sjorgens, granulomatosis de Wegner y otras vasculitis, penfigoide y pénfigo ampolloso, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), arteriosis de células gigantes, glomerulonefritis, rechazo de trasplante crónico, y artritis reumatoide. En otra realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste para uso en el tratamiento de artritis reumatoide. En una realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto que es 7-[1-(1,1-dimetiletil)-1*H*-pirazol-4-il]-*N*-{[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}-1,6-naftiridin-5-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de éste para uso en el tratamiento de artritis reumatoide.

En una realización, se proporciona un método para tratar una afección autoinmune, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico (SLE), lupus discoide (cutáneo), síndrome de Sjorgens, granulomatosis de Wegner y otras vasculitis, penfigoide y pénfigo ampolloso, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), arteriosis de células gigantes, glomerulonefritis, rechazo de trasplante crónico, y artritis reumatoide, método que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste. En otra realización, se proporciona un método para tratar artritis reumatoide, método que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de éste. En una realización adicional, se proporciona un método para tratar artritis reumatoide, método que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto que es 7-[1-(1,1-dimetiletil)-1*H*-pirazol-4-il]-*N*-{[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}-1,6-naftiridin-5-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de éste.

En una realización, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección autoinmune, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico (SLE), lupus discoide (cutáneo), síndrome de Sjorgens, granulomatosis de Wegner y otras vasculitis, penfigoide y pénfigo ampolloso, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), arteriosis de células gigantes, glomerulonefritis, rechazo de trasplante crónico, y artritis reumatoide. En otra realización, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de artritis reumatoide. En una realización adicional, la presente invención proporciona el uso de un compuesto que es 7-[1-(1,1-dimetiletil)-1*H*-pirazol-4-il]-*N*-{[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}-1,6-naftiridin-5-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de éste para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de artritis reumatoide.

Los compuestos de la presente invención son potencialmente útiles para tratar urticaria idiopática crónica con y sin estado de auto-anticuerpo (ahora conocida como urticaria espontánea crónica).

En una realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste para uso en el tratamiento de urticaria espontánea crónica. En otra realización, la presente invención proporciona un compuesto que es 7-[1-(1,1-dimetiletil)-1*H*-pirazol-4-il]-*N*-{[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}-1,6-naftiridin-5-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de éste para uso en el tratamiento de urticaria espontánea crónica.

En una realización, se proporciona un método para tratar urticaria espontánea crónica, método que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste. En otra realización se proporciona un método para tratar urticaria espontánea crónica, método que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto que es 7-[1-(1,1-dimetiletil)-1*H*-pirazol-4-il]-*N*-{[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}-1,6-naftiridin-5-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de éste.

En una realización, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de urticaria espontánea crónica. En otra realización, la presente invención proporciona el uso de un compuesto que es 7-[1-(1,1-dimetiletil)-1*H*-pirazol-4-il]-*N*-{[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}-1,6-naftiridin-5-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de éste para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de urticaria espontánea crónica.

En una realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, para uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria que implica células B.

En una realización, se proporciona un método para tratar una enfermedad inflamatoria que implica células B, método que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de éste.

En una realización, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria que implica células B.

Los compuestos de la presente invención son potencialmente útiles para tratar enfermedades que resultan de la activación inapropiada de mastocitos, por ejemplo enfermedades alérgicas e inflamatorias.

En una realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, para uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con la activación inapropiada de células mastocitos y/o basófilos, incluyendo aquellas enfermedades con manifestaciones cutáneas.

5 En una realización, se proporciona un método para tratar una enfermedad asociada con la activación inapropiada de células mastocitos y/o basófilos que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de éste. En otra realización, se proporciona un método para tratar una enfermedad asociada con la activación inapropiada de células mastocitos y/o basófilos incluyendo aquellas enfermedades con manifestaciones cutáneas, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de éste.

10 En una realización, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad asociada con la activación inapropiada de células mastocitos y/o basófilos.

15 En una realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, para uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria y/o trastorno alérgico por ejemplo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), síndrome de distrés respiratorio del adulto (ARDS), asma, asma grave, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, bronquitis, conjuntivitis, psoriasis, escleroderma, dermatitis, alergia, rinitis, lupus cutáneo, afecciones ampollas autoinmunes incluyendo pénfigo y penfigoide, mastocitosis y anafilaxis.

20 En una realización, se proporciona un método para tratar una enfermedad inflamatoria y/o trastorno alérgico, por ejemplo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), síndrome de distrés respiratorio del adulto (ARDS), asma, asma grave, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, bronquitis, conjuntivitis, psoriasis, escleroderma, dermatitis, alergia, rinitis, lupus cutáneo, afecciones ampollas autoinmunes incluyendo pénfigo y penfigoide, mastocitosis y anafilaxis, método que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste.

25 En una realización, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria y/o trastorno alérgico, por ejemplo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), síndrome de distrés respiratorio del adulto (ARDS), asma, asma grave, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, bronquitis, conjuntivitis, psoriasis, escleroderma, dermatitis, alergia, rinitis, lupus cutáneo, afecciones ampollas autoinmunes incluyendo pénfigo y penfigoide, mastocitosis y anafilaxis.

30 En una realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, para uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria que implica la activación inapropiada de mastocitos.

35 En una realización, se proporciona un método para tratar una enfermedad inflamatoria que implica la activación inapropiada de mastocitos método que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste. En otra realización, se proporciona un método para tratar una enfermedad inflamatoria que implica la activación inapropiada de mastocitos método que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste.

40 En una realización, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria que implica la activación inapropiada de mastocitos.

En una realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, para uso en el tratamiento de un trastorno alérgico que implica la activación inapropiada de mastocitos.

45 En una realización, se proporciona un método para tratar un trastorno alérgico que implica la activación inapropiada de mastocitos método que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste. En otra realización, se proporciona un método para tratar un trastorno alérgico que implica la activación inapropiada de mastocitos método que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste.

50 En una realización, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno alérgico que implica la activación inapropiada de mastocitos.

55 Las enfermedades y afecciones patológicas que se piensa están mediadas por Syk incluyen trastornos inflamatorios y alérgicos que implican la activación de mastocitos, tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), síndrome de distrés respiratorio del adulto (ARDS), asma grave, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, bronquitis,

conjuntivitis, psoriasis, escleroderma, urticaria crónica y aguda, incluyendo urticaria espontánea crónica y urticarias de contacto y físicas, dermatitis, alergia, rinitis, mastocitosis y anafilaxis.

Los compuestos de la presente invención también pueden usarse en combinación con otras clases de agentes terapéuticos, por ejemplo, seleccionados de agentes anti-inflamatorios, agentes anticolinérgicos (particularmente un antagonista del receptor $M_1/M_2/M_3$), agonistas del adrenoreceptor β_2 , agentes antiinfecciosos tales como antibióticos y antivirales, o antihistamínicos.

En otra realización, los compuestos de la presente invención también pueden usarse en combinación con otras clases de agentes terapéuticos que son conocidos en la técnica para tratar enfermedades autoinmunes, por ejemplo fármacos anti-reumáticos que modifican la enfermedad incluyendo ciclosporina, metotrexato, sulfasalacina, prednisona, leflunomida, y cloroquina/hidrocloroquina y también agentes biofarmacéuticos tales como anticuerpos monoclonales humanizados (mab), por ejemplo incluyendo bloqueantes anti-TNF alfa tales como remicade, enbrel y humira y terapias que deplecionan células B tales como rituximab y ofatumumab, y mab anti-Blys tales como beilumab.

La invención proporciona así, una combinación que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste junto con uno o más agentes terapéuticamente activos adicionales, por ejemplo seleccionados de un agente anti-inflamatorio tal como un corticosteroide o un NSAID, un agente anticolinérgico, un agonista del adrenoreceptor β_2 , un agente antiinfeccioso tal como un antibiótico o un antiviral, un antihistamínico, un agente anti-reumático que modifica la enfermedad, y un agente biofarmacéutico tal como anticuerpos monoclonales humanizados (mab), terapias que deplecionan células B y mab anti-Blys. Una realización de la invención engloba combinaciones que comprenden un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste junto con un agonista del adrenoreceptor β_2 , y/o un anticolinérgico, y/o un inhibidor de PDE-4, y/o un antihistamínico, y/o un fármaco anti-reumático que modifica la enfermedad, y/o un agente biofarmacéutico.

Una realización de la invención engloba combinaciones que comprenden uno o dos agentes terapéuticos adicionales.

Estará claro para un experto en la técnica que, cuando sea apropiado, el o los ingredientes terapéuticos adicionales pueden usarse en la forma de sales, por ejemplo, como sales de metal alcalino o amina o como sales de adición a ácido, o profármacos, o como ésteres, por ejemplo, ésteres de alquilo inferior, o como solvatos, por ejemplo, hidratos para optimizar la actividad y/o estabilidad y/o características físicas, tales como solubilidad, del ingrediente terapéutico. También estará claro que, cuando sea apropiado, los ingredientes terapéuticos pueden usarse en forma ópticamente pura.

Los ejemplos de agonistas del adrenoreceptor β_2 incluyen salmeterol (que puede ser un racemato o un único enantiómero tal como el enantiómero *R*), salbutamol (que puede ser un racemato o un único enantiómero tal como el enantiómero *R*), formoterol (que puede ser un racemato o un único estereoisómero tal como el estereoisómero *R,R*), salmefamol, fenoterol, carmoterol, etanterol, naminterol, clenbuterol, pirbuterol, flerbuterol, reproterol, bambuterol, indacaterol, terbutalina y sales de éstos, por ejemplo la sal xinafoato (1-hidroxi-2-naftalencarboxilato) de salmeterol, la sal sulfato o base libre de salbutamol o la sal fumarato de formoterol. En una realización, los agonistas del adrenoreceptor β_2 son agonistas del adrenoreceptor β_2 con larga duración, por ejemplo, compuestos que proporcionan broncodilatación efectiva durante aproximadamente 12 horas o más.

Otros agonistas del adrenoreceptor β_2 incluyen los descritos en WO02/066422, WO02/070490, WO02/076933, WO03/024439, WO03/072539, WO03/091204, WO04/016578, WO04/022547, WO04/037807, WO04/037773, WO04/037768, WO04/039762, WO04/039766, WO01/42193 y WO03/042160.

Los ejemplos de agonistas del adrenoreceptor β_2 incluyen:

3-(4-{{6-((2*R*)-2-hidroxi-2-[4-hidroxi-3-(hidroximetil)fenil]etil)amino}hexil}oxi}butil)bencenosulfonamida;

3-(3-{{7-((2*R*)-2-hidroxi-2-[4-hidroxi-3-hidroximetil]fenil]etil)-amino}heptil}oxi}propil)bencenosulfonamida;

4-{{(1*R*)-2-[(6-{2-[(2,6-dichlorobencil)oxi]etoxi}hexil)amino]-1-hidroxietil}-2-(hidroximetil)fenol};

4-{{(1*R*)-2-[(6-{4-[3-(ciclopentilsulfonil)fenil]butoxi}hexil)amino]-1-hidroxietil}-2-(hidroximetil)fenol};

N-[2-hidroxil-5-[(1*R*)-1-hidroxi-2-[[2-4-[[2*R*]-2-hidroxi-2-feniletil]amino]fenil]etil]amino]etil]fenil]formamida;

N-2{2-[4-(3-fenil-4-metoxifenil)aminofenil]etil}-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2(1*H*)-quinolinon-5-il)etilamina; y

5-[(*R*)-2-(2-{4-[4-(2-amino-2-metil-propoxi)-fenilamino]-fenil}-etilamino)-1-hidroxi-etil]-8-hidroxi-1*H*-quinolin-2-ona.

El agonista del adrenoreceptor β_2 puede estar en la forma de una sal formada con un ácido farmacéuticamente aceptable seleccionado de ácido sulfúrico, clorhídrico, fumárico, hidroxinaftoico (por ejemplo, 1- ó 3-hidroxi-2-naftoico), cinámico, cinámico sustituido, trifenilacético, sulfámico, sulfanílico, naftalenacrílico, benzoico, 4-metoxibenzoico, 2- ó 4-hidroxibenzoico, 4-clorobenzoico y 4-fenilbenzoico.

Los ejemplos de corticosteroides pueden incluir los descritos en WO02/088167, WO02/100879, WO02/12265, WO02/12266, WO05/005451, WO05/005452, WO06/072599 y WO06/072600.

5 Los corticosteroides anti-inflamatorios son muy conocidos en la técnica. Los ejemplos representativos incluyen propionato de fluticasona (por ejemplo, véase patente US 4.335.121), furoato de fluticasona (por ejemplo, véase
 10 patente U.S. 7.101.866), beclometasona éster 17-propionato, beclometasona éster 17,21-dipropionato, dexametasona o un éster de ésta, mometasona o un éster de ésta (por ejemplo, furoato de mometasona), ciclesonida, budesonida, flunisolida, metil prednisolona, prednisolona, dexametasona y éster S-cianometílico del ácido
 15 $6\alpha,9\alpha$ -difluoro- 11β -hidroxi- 16α -metil-3-oxo- 17α -(2,2,3,3-tetrameticiclopropilcarbonil)oxi-androsta-1,4-dieno- 17β -carbotioico. Los ejemplos adicionales de corticosteroides anti-inflamatorios se describen en WO02/088167, WO02/100879, WO02/12265, WO02/12266, WO05/005451, WO05/005452, WO06/072599 y WO06/072600.

Los compuestos no esteroideos que tienen agonismo glucocorticoide que pueden poseer selectividad para transrepresión sobre transactivación y que pueden ser útiles en terapia de combinación incluyen los abarcados en las solicitudes de patente publicadas y patentes siguientes: WO03/082827, WO98/54159, WO04/005229, WO04/009017, WO04/018429, WO03/104195, WO03/082787, WO03/082280, WO03/059899, WO03/101932, WO02/02565, WO01/16128, WO00/66590, WO03/086294, WO04/026248, WO03/061651, WO03/08277, WO06/000401, WO06/000398, WO06/015870, WO06/108699, WO07/000334 y WO07/054294.

Los ejemplos de agentes anti-inflamatorios incluyen fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAID).

20 Los ejemplos de NSAID incluyen cromoglicato de sodio, nedocromil de sodio, inhibidores de fosfodiesterasa (PDE) (por ejemplo, teofilina, inhibidores de PDE4 o inhibidores mixtos de PDE3/PDE4), antagonistas de leucotrieno, inhibidores de la síntesis de leucotrienos (por ejemplo, montelukast), inhibidores de iNOS, inhibidores de triptasa y elastasa, antagonistas de integrina beta-2 y agonistas o antagonistas del receptor de adenosina (por ejemplo, agonistas de adenosina 2a), antagonistas de citoquinas (por ejemplo, antagonistas de quimioquinas, tales como antagonista de CCR3), o inhibidores de la síntesis de citoquinas, o inhibidores de 5-lipooxigenasa. Un iNOS (inhibidor de óxido nítrico sintasa inducible) es preferiblemente para administración oral. Los ejemplos de inhibidores
 25 de iNOS incluyen los descritos en WO93/13055, WO98/30537, WO02/50021, WO95/34534 y WO99/62875. Los ejemplos de inhibidores de CCR3 incluyen los descritos en WO02/26722.

Los ejemplos de inhibidores de PDE4 incluyen ácido *cis*-4-ciano-4-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)ciclohexan-1-carboxílico, 2-carbometoxi-4-ciano-4-(3-ciclopropilmetoxi-4-difluorometoxifenil)ciclohexan-1-ona y *cis*-[4-ciano-4-(3-ciclopropilmetoxi-4-difluorometoxifenil)ciclohexan-1-ol]. También, ácido *cis*-4-ciano-4-[3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil]ciclohexano-1-carboxílico (también conocido como cilomilast) y sus sales, ésteres, pro-fármacos o formas físicas (por ejemplo, véase patente U.S. 5.552.438).

Otros compuestos incluyen AWD-12-281 de Elbion (Hofgen, N. et al. 15th EFMC Int Simp Med Chem (septiembre 6-10, Edimburgo) 1998, Abst P.98; No de referencia CAS. 247584020-9); un derivado 9-benciladenina denominado NCS-613 (INSERM); D-4418 de Chiroscience y Schering-Plough; un inhibidor de PDE4 benzodiazepina identificado como CI-1018 (PD-168787) y atribuido a Pfizer; un derivado benzodioxol descrito por Kyowa Hakko en WO99/16766; K-34 de Kyowa Hakko; V-11294A de Napp (Landells, L.J. et al. Eur Resp J [Annu Cong Eur Resp Soc (sep 19-23, Génova) 1998] 1998, 12 (Supl. 28): Abst P2393); roflumilast (No de referencia CAS 162401-32-3) y una ptalazinona (por ejemplo, véase WO99/47505) de Byk-Gulden; Pumafentrina, (-)-p-[(4aR*,10bS*)-9-etoxi-1,2,3,4,4a,10b-hexahidro-8-metoxi-2-metilbenzo[c][1,6]naftiridin-6-il]-N,N-diisopropilbenzamida que es un inhibidor mixto de PDE3/PDE4 que se ha preparado y publicado por Byk-Gulden, ahora Altana; arofilina en desarrollo por Almirall-Prodesfarma; VM554/UM565 de Vernalis; o T-440 (Tanabe Seiyaku; Fuji, K. et al. J Pharmacol Exp Ther, 1998, 284(1): 162), y T2585.

Compuestos adicionales se describen en la solicitud de patente internacional publicada WO04/024728 (Glaxo Group Ltd), WO04/056823 (Glaxo Group Ltd) y WO04/103998 (Glaxo Group Ltd).

45 Los ejemplos de agentes anticolinérgicos son aquellos compuestos que actúan como antagonistas en los receptores muscarínicos, en particular aquellos compuestos que son antagonistas de los receptores M₁ o M₃, antagonistas duales de los receptores M₁/M₃ o M₂/M₃, o antagonistas generales de los receptores M₁/M₂/M₃. Los compuestos ejemplares para administración mediante inhalación incluyen ipratropio (por ejemplo, como el bromuro, CAS 22254-24-6, vendido con el nombre Atrovent), oxitropio (por ejemplo, como el bromuro, CAS 30286-75-0) y tiotropio (por ejemplo, como el bromuro, CAS 136310-93-5, vendido con el nombre Spiriva). También tienen interés revatropato (por ejemplo, como el hidrobromuro, CAS 262586-79-8) y LAS-34273 que se describe en WO01/04118. Los compuestos ejemplares para administración oral incluyen pirenzepina (CAS 28797-61-7), darifenacina (CAS 133099-04-4, o CAS 133099-07-7 para el hidrobromuro vendido con el nombre Enablex), oxibutinina (CAS 5633-20-5, vendido con el nombre Ditropan), terodilina (CAS 15793-40-5), tolterodina (CAS 124937-51-5, o CAS 124937-52-6 para el tartrato, vendido con el nombre Detrol), otilonio (por ejemplo, como el bromuro, CAS 26095-59-0, vendido con el nombre Spasmomen), cloruro de trospio (CAS 10405-02-4) y solifenacina (CAS 242478-37-1, o CAS 242478-38-2 para el succinato también conocido como YM-905 y vendido con el nombre Vesicare).

Otros agentes anticolinérgicos incluyen compuestos que se describen en la solicitud de patente US 60/487981 incluyendo, por ejemplo:

- bromuro de (3-*endo*)-3-(2,2-di-2-tieniletetil)-8,8-dimetil-8-azoniabicyclo[3.2.1]octano;
- bromuro de (3-*endo*)-3-(2,2-difeniletetil)-8,8-dimetil-8-azoniabicyclo[3.2.1]octano;
- 4-metilbencenosulfonato de (3-*endo*)-3-(2,2-difeniletetil)-8,8-dimetil-8-azoniabicyclo[3.2.1]octano;
- bromuro de (3-*endo*)-8,8-dimetil-3-[2-fenil-2-(2-tienil)etenil]-8-azoniabicyclo[3.2.1]octano; y
- 5 bromuro de (3-*endo*)-8,8-dimetil-3-[2-fenil-2-(2-piridinil)etenil]-8-azoniabicyclo[3.2.1]octano.
- Los agentes anticolinérgicos adicionales incluyen compuestos que se describen en la solicitud de patente US 60/511.009 incluyendo, por ejemplo:
- yoduro de (*endo*)-3-(2-metoxi-2,2-di-tiofen-2-il-etil)-8,8-dimetil-8-azoniabicyclo[3.2.1]octano;
- 3-((*endo*)-8-metil-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propionitrilo;
- 10 (*endo*)-8-metil-3-(2,2,2-trifenil-etil)-8-aza-bicyclo[3.2.1]octano;
- 3-((*endo*)-8-metil-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propionamida;
- ácido 3-((*endo*)-8-metil-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propiónico;
- yoduro de (*endo*)-3-(2-ciano-2,2-difenil-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octano;
- bromuro de (*endo*)-3-(2-ciano-2,2-difenil-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octano;
- 15 3-((*endo*)-8-metil-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propan-1-ol;
- N*-bencil-3-((*endo*)-8-metil-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propionamida;
- yoduro de (*endo*)-3-(2-carbamoil-2,2-difenil-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octano;
- 1-bencil-3-[3-((*endo*)-8-metil-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-urea;
- 1-etil-3-[3-((*endo*)-8-metil-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-urea;
- 20 *N*-[3-((*endo*)-8-metil-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-acetamida;
- N*-[3-((*endo*)-8-metil-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-benzamida;
- 3-((*endo*)-8-metil-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-di-tiofen-2-il-propionitrilo;
- yoduro de (*endo*)-3-(2-ciano-2,2-di-tiofen-2-il-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octano;
- N*-[3-((*endo*)-8-metil-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-bencenosulfonamida;
- 25 [3-((*endo*)-8-metil-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-urea;
- N*-[3-((*endo*)-8-metil-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-metanosulfonamida; y
- bromuro de (*endo*)-3-{2,2-difenil-3-[(1-fenil-metanoil)-amino]-propil}-8,8-dimetil-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octano.
- Los compuestos adicionales incluyen:
- yoduro de (*endo*)-3-(2-metoxi-2,2-di-tiofen-2-il-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octano;
- 30 yoduro de (*endo*)-3-(2-ciano-2,2-difenil-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octano;
- bromuro de (*endo*)-3-(2-ciano-2,2-difenil-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octano;
- yoduro de (*endo*)-3-(2-carbamoil-2,2-difenil-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octano;
- yoduro de (*endo*)-3-(2-ciano-2,2-di-tiofen-2-il-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octano; y
- bromuro de (*endo*)-3-{2,2-difenil-3-[(1-fenil-metanoil)-amino]-propil}-8,8-dimetil-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octano.
- 35 En una realización, la invención proporciona una combinación que comprende un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, junto con un antagonista de H1. Los ejemplos de antagonistas de H1 incluyen, sin limitación, metapirileno, desloratadina, amexanox, astemizol, azatadina, azelastina, acrivastina, bromfeniramina, cetirizina, levocetirizina, efletirizina, clorfeniramina, clemastina, ciclizina, carebastina, ciproheptadina, carbinoxamina, descarboetoxiloratadina, doxilamina, dimetindeno, ebastina, epinastina, efletirizina,
- 40 fexofenadina, hidroxizina, ketotifen, loratadina, levocabastina, mizolastina, mequitazina, mianserina, noberastina,

meclizina, norastemizol, olopatadina, picumast, pirlamina, prometazina, terfenadina, tripelenamina, temelastina, trimeprazina y triprolidina, particularmente cetirizina, levocetirizina, efletirizina y fexofenadina. En una realización adicional, la invención proporciona una combinación que comprende un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, junto con un antagonista de H3 (y/o agonista inverso). Los ejemplos de antagonistas de H3 incluyen por ejemplo, aquellos compuestos descritos en WO2004/035556 y en WO2006/045416. Otros antagonistas del receptor de histamina que pueden usarse en combinación con los compuestos de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, incluyen antagonistas (y/o agonistas inversos) del receptor H4, por ejemplo, los compuestos descritos en Jablonowski *et al.*, *J. Med. Chem.* 46:3957-3960 (2003).

En una realización, se proporciona una combinación que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, junto con un corticosteroide. En otra realización, se proporciona una combinación que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste junto con un NSAID. En otra realización, se proporciona una combinación que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste junto con un anticolinérgico. En otra realización, se proporciona una combinación que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste junto con un agonista de adrenoceptor β_2 . En otra realización, se proporciona una combinación que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste junto con un antiinfeccioso. En otra realización, se proporciona una combinación que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste junto con un antihistamínico. En otra realización, se proporciona una combinación que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste junto con un fármaco anti-reumático que modifica la enfermedad. En una realización adicional, se proporciona una combinación que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste junto con un agente biofarmacéutico.

Un compuesto de la presente invención se formulará normalmente, pero no necesariamente, en composiciones farmacéuticas antes de la administración a un paciente. De acuerdo con esto, en una realización, la invención está dirigida a composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En otra realización, la invención está dirigida a una composición farmacéutica que comprende 7-[1-(1,1-dimetiletil)-1H-pirazol-4-il]-N-[(3S)-3-fluoro-3-piperidinil]metil]-1,6-naftiridin-5-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de éste y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden prepararse y envasarse en forma a granel en la que una cantidad segura y efectiva de un compuesto de la invención puede extraerse y proporcionarse al paciente, tal como con polvos o jarabes. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden prepararse y envasarse en forma de dosificación unitaria en la que cada unidad físicamente discreta contiene una cantidad segura y efectiva de un compuesto de la invención. Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden prepararse y envasarse en una forma de dosificación sub-unitaria en la que dos o más formas de dosificación sub-unitarias proporcionan la forma de dosificación unitaria. Cuando se preparan en forma de dosificación unitaria, las composiciones farmacéuticas de la invención contienen típicamente de aproximadamente 0,1 a 99,9% en peso de un compuesto de la invención, dependiendo de la naturaleza de la formulación.

Además, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender además opcionalmente uno o más compuestos farmacéuticamente activos.

Tal y como se usa en la presente memoria, "excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable implicado en proporcionar forma o consistencia a la composición farmacéutica. Cada excipiente debe ser compatible con los demás ingredientes de la composición farmacéutica cuando se mezclan, de manera que se evitan las interacciones que reducirían sustancialmente la eficacia del compuesto de la invención cuando se administra a un paciente y resultarían en composiciones farmacéuticamente inaceptables. Además, cada excipiente debe tener por supuesto una pureza lo suficientemente alta para hacerlo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones de la presente invención que comprenden un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de éste y el excipiente o excipientes farmacéuticamente aceptables se proporcionarán típicamente como una forma de dosificación adaptada para administración al paciente por la ruta de administración deseada. Por ejemplo, las formas de dosificación incluyen aquellas adaptadas para: (1) administración oral, tales como comprimidos, cápsulas, comprimidos ovalados, píldoras, tabletas, polvos, jarabes, elixires, suspensiones, disoluciones, emulsiones, sobres, y sellos; (2) administración dérmica tópica, tal como cremas, pomadas, lociones, disoluciones, pastas, pulverizadores, espumas, y geles, (3) inhalación, tal como aerosoles y disoluciones; (4) administración intranasal, tal como disoluciones o pulverizadores; y (5) administración parenteral, tal como disoluciones estériles, suspensiones, y polvos para reconstitución y.

Se apreciará que las formas de dosificación adaptadas para administración oral se usan comúnmente para tratar enfermedades autoinmunes incluyendo artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico; cáncer incluyendo malignidades hemo; y urticaria espontánea crónica. Las formas de dosificación adaptadas para administración tópica en la piel se usan comúnmente para tratar dermatitis atópica, psoriasis y afecciones de urticaria espontánea crónica

y aguda, y afecciones ampollosas autoinmunes incluyendo pénfigo y penfigoide. Las formas de dosificación adaptadas para administración por inhalación u oral se usan comúnmente para tratar COPD y asma; mientras las formas de dosificación adaptadas para administración intranasal se usan comúnmente para tratar rinitis alérgica.

5 Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados variarán dependiendo de la forma de dosificación particular elegida. Además, los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados pueden elegirse para una función particular para la que pueden servir en la composición. Por ejemplo, determinados excipientes farmacéuticamente aceptables pueden elegirse por su capacidad de facilitar la producción de formas de dosificación uniformes. Determinados excipientes farmacéuticamente aceptables pueden elegirse por su capacidad de facilitar la producción de formas de dosificación estables. Determinados excipientes farmacéuticamente aceptables pueden elegirse por su capacidad de facilitar el vehiculado o transporte del compuesto de la presente invención una vez administrado al paciente de un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano, o parte del cuerpo. Determinados excipientes farmacéuticamente aceptables pueden elegirse por su capacidad de aumentar el seguimiento por parte del paciente.

15 Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen los tipos siguientes de excipientes: diluyentes, materiales de relleno, aglutinantes, disgregantes, lubricantes, deslizantes, agentes de granulación, agentes de recubrimiento, agentes humectantes, disolventes, co-disolventes, agentes de suspensión, emulsionantes, edulcorantes, agentes saporíferos, agentes que enmascaran el sabor, agentes colorantes, agentes antitortá, humectantes, agentes quelantes, plastificantes, agentes que incrementan la viscosidad, antioxidantes, conservantes, estabilizadores, tensioactivos y agentes tamponadores. El experto en la técnica apreciará que determinados excipientes farmacéuticamente aceptables pueden servir para más de una función y pueden servir para funciones alternativas dependiendo de cuánto excipiente está presente en la formulación y qué otros ingredientes están presentes en la formulación.

25 Los expertos en la técnica poseen el conocimiento y experiencia en la técnica para permitirles seleccionar excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados en cantidades apropiadas para uso en la invención. Además, existen varios recursos que están disponibles para el experto en la técnica que describen excipientes farmacéuticamente aceptables y pueden ser útiles para seleccionar excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados. Los ejemplos incluyen Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (Lippincott Williams & Wilkins), The Handbook of Pharmaceutical Additives (Gower Publishing Limited), y The Handbook of Pharmaceutical Excipients (la American Pharmaceutical Association y la Pharmaceutical Press).

30 Las composiciones farmacéuticas de la invención se preparan usando técnicas y métodos conocidos para los expertos en la técnica. Algunos de estos métodos usados comúnmente en la técnica se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company).

35 Las formas de dosificación sólidas orales tales como comprimidos comprenderán típicamente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, que pueden, por ejemplo, ayudar a conferir características satisfactorias de procesamiento y compresión, o proporcionar características físicas adicionales deseables al comprimido. Dichos excipientes farmacéuticamente aceptables pueden seleccionarse de diluyentes, aglutinantes, deslizantes, lubricantes, disgregantes, colorantes, saporíferos, agentes edulcorantes, polímeros, ceras u otros materiales que modulan la solubilidad.

40 Las formas de dosificación para administración tópica en la piel pueden estar, por ejemplo, en la forma de pomadas, cremas, lociones, pomadas oculares, gotas oculares, gotas óticas, vendajes impregnados, y aerosoles, y pueden contener aditivos convencionales apropiados, incluyendo, por ejemplo, conservantes, disolventes para ayudar a la penetración del fármaco, y emolientes en pomadas y cremas. Dichas formulaciones tópicas también pueden contener vehículos convencionales compatibles, por ejemplo bases de crema o pomada, y etanol o alcohol olefílico para las lociones. Dichos vehículos pueden constituir de aproximadamente 1% a aproximadamente 98% en peso de la formulación; más habitualmente constituirán hasta aproximadamente 80% en peso de la formulación.

50 Las formas de dosificación para administración parenteral comprenderán generalmente fluidos, particularmente fluidos intravenosos, es decir, disoluciones estériles de químicos simples tales como azúcares, aminoácidos o electrolitos, que pueden ser transportados fácilmente por el sistema circulatorio y asimilarse. Dichos fluidos se preparan típicamente con agua para inyección USP. Los fluidos usados comúnmente para uso intravenoso (IV) se describen en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (Lippincott Williams & Wilkins). El pH de dichos fluidos IV puede variar, y típicamente será de 3,5 a 8, como se conoce en la técnica.

Las formas de dosificación para administración nasal o inhalada pueden formularse convenientemente como aerosoles, disoluciones, gotas, geles o polvos secos.

55 Las formas de dosificación para administración tópica en la cavidad nasal (administración nasal) incluyen formulaciones en aerosol presurizadas y formulaciones acuosas administradas en la nariz por bomba presurizada. Las formulaciones que no están presurizadas y adaptadas para administración nasal son particularmente interesantes. Las formulaciones adecuadas contienen agua como el diluyente o vehículo para este propósito. Las formulaciones acuosas para administración en la nariz pueden proporcionarse con excipientes convencionales tales

como agentes tamponadores, agentes que modifican la tonicidad y semejantes. Las formulaciones acuosas también pueden administrarse en la nariz por nebulización.

Las formas de dosificación para administración nasal se proporcionan en un dispositivo de dosis medida. La forma de dosificación puede proporcionarse como una formulación en fluido para administrar a partir de un dispensador de fluido que tiene una tobera de dispensación u orificio de dispensación a través del que se dispensa una dosis medida de la formulación de fluido después de la aplicación de una fuerza aplicada por el usuario a un mecanismo de bomba del dispensador de fluido. Dichos dispensadores de fluido se proporcionan generalmente con un reservorio de múltiples dosis medidas de la formulación de fluido, siendo las dosis dispensables después de actuaciones secuenciales de la bomba. La tobera u orificio de dispensación puede configurarse para inserción en los orificios nasales del usuario para dispensar por pulverización la formulación de fluido en la cavidad nasal. En una realización, el dispensador de fluido es del tipo general descrito e ilustrado en WO2005/044354A1. El dispensador tiene una carcasa que alberga un dispositivo de descarga de fluido que tiene una bomba de compresión montada en un contenedor para contener una formulación de fluido. La carcasa tiene al menos una leva lateral operable con un dedo que se puede mover hacia dentro respecto a la carcasa para comprimir el contenedor hacia arriba en la carcasa para causar que la bomba comprima y bombee una dosis medida de la formulación fuera de un vástago de bomba a través de una tobera nasal de la carcasa. Un dispensador de fluido particularmente preferido es del tipo general ilustrado en las Figuras 30-40 de WO2005/044354A1.

Las composiciones en aerosol, por ejemplo, para administración inhalada, pueden comprender una disolución o suspensión fina de la sustancia activa en un disolvente acuoso o no acuoso farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones en aerosol pueden presentarse en cantidades de única dosis o múltiples dosis en forma estéril en un contenedor sellado, que puede tener la forma de un cartucho o desechable para uso con un dispositivo o inhalador que atomiza. Alternativamente, el contenedor sellado puede ser un dispositivo de dispensación unitaria tal como un inhalador nasal de dosis unitaria o un dispensador en aerosol equipado con una válvula de medida (inhalador de dosis medida) que se pretende para desecho una vez que los contenidos del contenedor se han agotado.

Cuando la forma de dosificación comprende un dispensador en aerosol, contiene preferiblemente un propelente adecuado bajo presión tal como aire comprimido, dióxido de carbono o un propelente orgánico tal como hidrofluorocarbono (HFC). Los propelentes HFC adecuados incluyen 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano y 1,1,1,2-tetrafluoroetano. Las formas de dosificación en aerosol también pueden tener la forma de una bomba-atomizador. El aerosol presurizado puede contener una disolución o una suspensión del compuesto activo. Esto puede requerir la incorporación de excipientes adicionales, por ejemplo, co-disolventes y/o tensioactivos para mejorar las características de dispersión y homogeneidad de las formulaciones en suspensión. Las formulaciones en disolución también pueden requerir la adición de co-disolventes tal como etanol. Otros modificadores excipientes también pueden incorporarse para mejorar, por ejemplo, la estabilidad y/o sabor y/o características de masa de partícula fina (cantidad y/o perfil) de la formulación.

Para composiciones farmacéuticas adecuadas y/o adaptadas para administración inhalada, se prefiere que la composición farmacéutica sea una composición inhalable en polvo seco. Dicha composición puede comprender una base de polvo tal como lactosa, glucosa, trehalosa, manitol o almidón, el compuesto de fórmula (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste (preferiblemente en forma de tamaño de partícula reducido, por ejemplo, en forma micronizada), y opcionalmente un modificador del rendimiento tal como L-leucina u otro aminoácido, octaacetato de celobiosa y/o sales metálicas de ácido esteárico tales como estearato de magnesio o de calcio. Preferiblemente, la composición inhalable en polvo seco comprende una mezcla de polvo seco de lactosa y el compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste. La lactosa es preferiblemente hidrato de lactosa, por ejemplo, lactosa monohidrato y/o es preferiblemente lactosa de grado de inhalación y/o grado fino. Preferiblemente, el tamaño de partícula de la lactosa se define por 90% o más (en peso o en volumen) de las partículas de lactosa siendo menor de 1.000 micrones (micrómetros) (por ejemplo, 10-1.000 micrómetros, por ejemplo, 30-1.000 micrómetros) de diámetro, y/o siendo el 50% o más de las partículas de lactosa menores de 500 micrómetros (por ejemplo, 10-500 micrómetros) de diámetro. Más preferiblemente, el tamaño de partícula de la lactosa se define por 90% o más de las partículas de lactosa siendo menor de 300 micrómetros (por ejemplo, 10-300 micrómetros, por ejemplo, 50-300 micrómetros) de diámetro y/o siendo el 50% o más de las partículas de lactosa menor de 100 micrómetros de diámetro. Opcionalmente, el tamaño de partícula de la lactosa se define por 90% o más de las partículas de lactosa siendo menor de 100-200 micrómetros de diámetro, y/o siendo el 50% o más de las partículas de lactosa menores de 40-70 micrómetros de diámetro. Lo más importante, es preferible que aproximadamente 3 a aproximadamente 30% (por ejemplo, aproximadamente 10% (en peso o en volumen) de las partículas sea menor de 50 micrómetros o menor de 20 micrómetros de diámetro. Por ejemplo, sin limitación, una lactosa de grado inhalación adecuada es lactosa E9334 (10% finos) (Borculo Domo Ingredients, Hanzeplein 25, 8017 JD Zwolle, Holanda).

Opcionalmente, en particular para composiciones inhalables en polvo seco, puede incorporarse una composición farmacéutica para administración inhalada en una pluralidad de contenedores de dosis sellados (por ejemplo, que contienen la composición en polvo seco) montados longitudinalmente en una tira o cinta en el interior de un dispositivo de inhalación adecuado. El contenedor se puede romper o abrirse por desprendimiento según se necesite y la dosis, por ejemplo, de la composición en polvo seco puede administrarse por inhalación mediante el dispositivo tal como el dispositivo DISKUS®, comercializado por GlaxoSmithKline. El dispositivo de inhalación

DISKUS® se describe por ejemplo en GB 2242134 A, y en dicho dispositivo al menos un contenedor para la composición farmacéutica en forma de polvo (siendo preferiblemente el contenedor o los contenedores una pluralidad de contenedores de dosis sellados montados longitudinalmente en una tira o cinta) se define entre dos miembros asegurados entre sí con algo que se desprende; el dispositivo comprende: un medio para definir una estación de abertura para dicho contenedor o contenedores; un medio para desprender los miembros uno de otro en la estación de abertura para abrir el contenedor; y una salida, que comunica con el contenedor abierto, a través de la que un usuario puede inhalar la composición farmacéutica en forma de polvo del contenedor abierto.

Una composición de la presente invención, para administración intranasal, también puede adaptarse para dosificación por insuflación, como una formulación en polvo seco.

Para formas de dosificación para administración inhalada, en las que el compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de fórmula (I) está presente como un polvo seco o en suspensión, se prefiere que esté en una forma de tamaño de partícula reducido. Preferiblemente, la forma de tamaño reducido se obtiene o se puede obtener por micronización. El tamaño de partícula preferible del compuesto con tamaño reducido (por ejemplo, micronizado) o sal farmacéuticamente aceptable se define por un valor D50 de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 micrómetros (por ejemplo, según se mide usando difracción láser).

Se apreciará que cuando los compuestos de la presente invención se administran en combinación con otros agentes terapéuticos administrados normalmente por la ruta inhalada, intravenosa, oral, tópica o intranasal, la composición farmacéutica resultante puede administrarse por las mismas rutas.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse convenientemente en cantidades, por ejemplo, de 1 µg a 2g. La dosis precisa dependerá por supuesto de la edad y condición del paciente y la ruta particular de administración elegida.

Métodos de ensayo biológicos

Los compuestos de la invención pueden ensayarse para actividad *in vitro* según los ensayos siguientes:

1. Actividad enzimática SYK básica

Se añadieron 3 µl de lisado de SYK diluido 16 veces en tampón de ensayo (20 mM TRIS pH 7,4, 0,01% BSA, 0,1% Pluronic F-68) a pocillos que contienen 0,1 µl de varias concentraciones de compuesto o vehículo DMSO (1,7% final) en una placa negra de 384 pocillos de bajo volumen Greiner. Después de 15 min de pre-incubación a temperatura ambiente, la reacción se inició por la adición de 3 µl de reactivo sustrato que contenía péptido Y7 Sox (Invitrogen Cat. # KNZ3071, 5 µM final), ATP (35 µM final) y MgCl₂ (10 mM final) en tampón de ensayo. La reacción se incubó a temperatura ambiente antes de medir la intensidad de fluorescencia (λ_{ex} 360/ λ_{em} 485) en un lector de placas Envision (Perkin Elmer Life Sciences, Waltham, Mass., EEUU) a 15 min y 55 min después de la adición del sustrato.

Los compuestos de los Ejemplos 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9A, 9B, 10, 11A y 11B (como la base libre) se ensayaron esencialmente como se ha descrito anteriormente y se encontró que cada uno tenía un valor CI₅₀ medio en este ensayo de <1 µM. Las sales de ácido clorhídrico de los compuestos de los Ejemplos 1, 2, 3, 4 y 6 se ensayaron esencialmente como se ha descrito anteriormente y se encontró que cada una tenía un valor CI₅₀ medio en este ensayo de <1 µM.

Los compuestos de los Ejemplos 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9A, 9B, 10, 11A y 11B (como la base libre) se ensayaron esencialmente como se ha descrito anteriormente y se encontró que cada uno tenía un valor pCI₅₀ medio en este ensayo de ≥7,0. Por ejemplo, los Ejemplos 1, 2, 3 y 4 (como la base libre) se encontró que tenían valores medios de 7,6 (n=7), 7,7 (n=10), 7,2 (n=11) y 8,1 (n=11) respectivamente. Las sales de ácido clorhídrico de los compuestos de los Ejemplos 1, 2, 3, 4 y 6 se ensayaron esencialmente como se ha descrito anteriormente y se encontró que cada una tenía un valor pCI₅₀ medio en este ensayo de ≥6,5.

Los expertos en la técnica reconocerán que los ensayos de unión *in vitro* y los ensayos basados en células para actividad funcional están sometidos a variabilidad. De acuerdo con esto, debe entenderse que los valores para los CI₅₀ y pCI₅₀ recitados anteriormente son sólo ejemplares.

Preparación de lisado de SYK

i. Preparación de lisados de células ramos

Las células B Ramos (células B humanas de linfoma de Burkitt, clon 296.4C10, ATCC) se cultivaron en suspensión en medio de crecimiento (RPMI-1640, Sigma; suplementado con 2 mM L-glutamina, Gibco; 10 mM Hepes, Sigma; 1 mM piruvato de sodio, Sigma; 10% v/v FCS inactivado con calor, Gibco). Las células se crecieron en Corning Cellstacks (6360 cm²) en 1 litro de volumen y la viabilidad y densidad celular se monitorizaron diariamente. Las células se mantuvieron a <1,5×10⁶/ml y >92% de viabilidad.

Se generaron ciclos de producción a gran escala a partir de Alicuotas de Escala Intermedia Grande (LSIA) de células Ramos congeladas ya que se encontró que esto proporcionaba mayor reproducibilidad que la producción a partir de un cultivo en crecimiento continuo de células Ramos.

Las células de ciclo de producción a gran escala se generaron en cuatro etapas:

- 5 1. Descongelar LSIA en 1 x Cellstack;
2. Expandir el cultivo en 4 x Cellstack;
3. Expandir de 4 a 12 x Cellstacks;
4. Recoger todas las 12 Cellstacks.

10 Las Cellstacks se recogieron en botellas de centrifuga de 2L usando una centrifuga Sorvall Mistral, 2.000 rpm, 10 minutos, 4°C. (2L x 2x10⁶ células/ml= 4 x 10⁹ células en total)

(Notas para el aumento de escala de las células: si la densidad celular excedía de 1,8 x 10⁶/ml o la viabilidad caía por debajo de 90%, la preparación de Syk obtenida después de la estimulación probablemente tendrá una actividad menor).

15 También, el subcultivo repetido de las células Ramos parecía tener un efecto perjudicial en la actividad Syk cuando el crecimiento celular se hizo a escala (éste no parecía ser el caso en los cultivos a pequeña escala) - se recomienda usar siempre LSIA y modular el aumento de escala para preparaciones a gran escala.

ii. Estimulación de células Ramos con anti-IgM para producir Syk y preparación de lisados

20 Las células se estimularon a 20x10⁶ células/ml usando 15 µg/ml (concentración final) de anticuerpo anti-IgM. Después de la recogida (como se ha descrito anteriormente), un total de 4x10⁹ células se resuspendieron en 180 ml de DPBS pre-calentado (37°C.) en una botella de centrifuga Corning de 500 ml. Se añadieron 20 ml de anticuerpo anti-IgM a 150 µg/ml a cada botella de centrifuga de 500 ml (la preparación madre de trabajo constituida en DPBS pre-calentada a 37°C). Las células se incubaron durante exactamente 5 min a 37°C después de la adición de anticuerpo anti IgM. Después de 5 min de estimulación, se añadieron 300 ml de DPBS enfriado en hielo a cada botella para parar la estimulación (la temperatura cae hasta ~12°C) y las células se centrifugaron a 2.000 rpm (Sorvall Legend RT+ centrifuga - pre-enfriada a 4°C). Las células se lavaron por resuspensión en DPBS enfriado en hielo y centrifugación como anteriormente. El sedimento celular se lisó en tampón de lisis enfriado en hielo que contenía 1% tritón-x-100 a una proporción de 150 µl/1x10⁷ células (es decir, 48 ml de tampón de lisis). Después de la adición de tampón de lisis, las células se pipetearon arriba y abajo y se mantuvieron en hielo durante 15 min. El lisado aclarado se obtuvo por centrifugación (Sorvall Evolution RC (rotor SLA-1500, ~20.000 g (~14.500 rpm), 45 min, 4°C).

El lisado se alicuotó, se congeló rápidamente en nieve carbónica y se almacenó a -80°C antes del ensayo.

Materiales

Células Ramos: células B humanas de linfoma de Burkitt, clon 296.4C10 (ATCC).

35 Medio de Crecimiento: 500 ml RPMI, 10% FCS inactivado con calor, 2 mM L-Glutamina, 2 mM HEPES, 1 mM piruvato de sodio.

RPMI: Sigma R0883, depósito CT5652

Suero de Ternera Fetal: Gibco 10099-141, depósito CT2509

L-Glutamina: 200 mM, Gibco 25030, depósito CT3005

HEPES: 1M, Sigma H0887, depósito CT5637

40 Piruvato de Sodio: 100 mM, Sigma S8636, depósito CT7741

Ab Anti-IgM: anti-IgM humana de cabra (fragmentos (Fab')₂) en PBS. Invitrogen, preparación personalizada (sin azida y niveles bajos de endotoxina). No. de catálogo NON0687, Lote 1411913. 2,74 mg/ml.

DPBS: Disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, Sigma D8537

45 Tampón de Lisis: 50 mM TRIS pH7,5+150 mM NaCl+1% Tritón-X-100+2 mM EGTA+1:100 de dilución de mezclas de inhibidores (conjunto de mezcla de inhibidores de fosfatasa II, calbiochem cat no. 524625 y conjunto de mezcla de inhibidores de proteasas V, calbiochem cat no. 539137)

Tritón-X-100: Roche 10 789 704 001 (GI 198233X, SC/159824). Preparado como una preparación madre al 20% en agua.

EGTA: Sigma E4378. Añadido sólido directamente al tampón.

2. Ensayos de actividad de células B

2.1. Ensayo pErk en Ramos

Principio del ensayo

- 5 Las células Ramos (células B humanas de Linfoma de Burkitt) se estimulan usando anti-IgM. Esto resulta en el reclutamiento de Syk al receptor de células B. La autofosforilación posterior de Syk da lugar al inicio de una cascada de señalización que resulta en la activación de las células B a través de la ruta MAP Quinasa Erk. Como un resultado, Erk se fosforila y después de la lisis celular se detecta por un ensayo inmune de captura.

Estimulación de células Ramos con anti-IgM

- 10 Las células se sembraron en placas a una densidad de $2,5 \times 10^5$ /pocillo en un volumen de 25 μ l de medio de ensayo (RPMI que contiene 10% suero de ternera fetal inactivado con calor, 1% L-glutamina) en placas de polipropileno de 96 pocillos. Se añadieron 25 μ l de disolución de compuesto diluida apropiadamente y la placa se incubó durante 30 min a 37°C con 5% CO₂. Las células se estimularon con 5 μ l de fragmentos Fab'₂ de anti-IgM humana de cabra (5 μ g/ml final) durante 7 min a 37°C. Las células se lisaron por la adición de 55 μ l de tampón de lisis 2x RIPA durante 15 2h a 4°C. El lisado puede congelarse en este punto a -80°C.

Ensayo MSD pErk

- Se transfirieron 50 μ l de lisado celular a una placa MSD de 96 pocillos recubierta con anticuerpo de captura anti-pErk1/2 (Thr/Tyr: 202/204; 185/187) y se incubó durante 16 horas a 4°C ó 3 horas a temperatura ambiente. La placa se lavó y se añadió un anticuerpo de detección anti-pErk (25 μ l/pocillo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Éste se retiró, se añadieron 150 μ l de tampón de lectura MSD y se midió la señal electroquimioluminiscente resultante.
- 20

Preparación del compuesto

- El compuesto se preparó como una preparación madre 10 mM en DMSO y se preparó una serie de dilución en DMSO usando 9 diluciones de 5 veces sucesivas. Esta serie de dilución se diluyó más 1:100 con medio de ensayo para proporcionar el intervalo de concentración final que se va a ensayar de 5×10^{-5} a $2,56 \times 10^{-11}$ M. Las diluciones del compuesto se prepararon usando los sistemas de pipeteo robóticos automatizados Biomek 2000 y Biomek Nx.
- 25

Los compuestos de los Ejemplos 1, 2, 3 y 4 (como las sales hidrocloreuro) se ensayaron esencialmente como se ha descrito anteriormente y se encontró que cada uno tenía un valor CI₅₀ medio en este ensayo de < 1 μ M.

- Los compuestos de los Ejemplos 1, 2, 3 y 4 (como las sales hidrocloreuro) se ensayaron esencialmente como se ha descrito anteriormente y se encontró que cada uno tenía un valor pCI₅₀ medio en este ensayo de $\geq 6,5$. Por ejemplo, se encontró que los Ejemplos 1, 2, 3 y 4 (como las sales hidrocloreuro) tenían valores medios de 7,4 (n = 2), 7,2 (n = 4), 7,0 (n = 2) y 7,5 (n = 4) respectivamente.
- 30

Los expertos en la técnica reconocerán que los ensayos de unión *in vitro* y los ensayos basados en células para actividad funcional están sometidos a variabilidad. De acuerdo con esto, debe entenderse que los valores para las CI₅₀ y pCI₅₀ recitados anteriormente son sólo ejemplares.

35 2,2 Ensayo CD69 en sangre completa

Principio del ensayo

- Se estimulan células B de sangre completa *ex vivo* usando anti-IgM. Esto resulta en el reclutamiento de Syk al receptor de células B. La autofosforilación posterior de Syk da lugar al inicio de una cascada de señalización que resulta en la activación de las células B según se indica por la expresión del marcador de activación CD69 en la superficie celular. Las células B CD20/CD69+va de sangre completa se detectan por citometría de flujo.
- 40

Estimulación de células B de sangre completa con anti-IgM

- Se añadieron 100 μ l de sangre humana heparinizada a un tubo de polipropileno de 5 ml que contenía 1 μ l de disolución de compuesto diluida apropiadamente y se incubó durante 25 min a 37°C con 5% CO₂. Las células B se estimularon con 10 μ l de fragmentos Fab'₂ de anti-IgM humana de cabra (43 μ g/ml concentración final) durante 3,5h más en las condiciones descritas previamente. Las células sanguíneas rojas se lisaron y las demás células se fijaron por la adición de 2 ml de tampón Lyse/Fix durante 10 min a temperatura ambiente.
- 45

Ensayo CD69

- Las células se tiñeron usando una mezcla de anticuerpos conjugados anti-CD20 humano de ratón con FITC y anti-CD69 humano de ratón con PE. Las células B CD20/CD69+va presentes en la muestra se detectaron por citometría de flujo.
- 50

Preparación del compuesto

El compuesto se preparó como una preparación madre 10 mM en DMSO, se diluyó más en DMSO hasta 1 mM y se preparó una serie de dilución en DMSO usando 7 diluciones de 3 veces sucesivas para proporcionar el intervalo de concentración final que se va a ensayar de 1×10^{-5} a $4,57 \times 10^{-9}$ M. Las diluciones del compuesto se prepararon usando el sistema de pipeteo robótico automatizado Biomek 2000.

Los compuestos de los Ejemplos 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9A, 9B, 10, 11A y 11B (como la base libre) se ensayaron esencialmente como se ha descrito anteriormente y se encontró que cada uno tenía un valor CI_{50} medio en este ensayo de $<1 \mu\text{M}$. Las sales de ácido clorhídrico de los compuestos de los Ejemplos 1, 2, 3, 4 y 6 se ensayaron esencialmente como se ha descrito anteriormente y se encontró que cada uno tenía un valor CI_{50} medio en este ensayo de $<1 \mu\text{M}$.

Los compuestos de los Ejemplos 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9A, 9B, 10, 11A y 11B (como la base libre) se ensayaron esencialmente como se ha descrito anteriormente y se encontró que cada uno tenía un valor pCI_{50} medio en este ensayo de $\geq 6,0$. Por ejemplo, los Ejemplos 1, 2, 3 y 4 (como la base libre) se encontró que tenían valores medios de 6,5 (n=2), 6,8 (n=2), 6,6 (n=2) y 6,8 (n=2) respectivamente. Las sales de ácido clorhídrico de los compuestos de los Ejemplos 1, 2, 3, 4 y 6 se ensayaron esencialmente como se ha descrito anteriormente y se encontró que cada uno tenía un valor pCI_{50} medio en este ensayo de $\geq 6,0$.

Los expertos en la técnica reconocerán que los ensayos de unión *in vitro* y los ensayos basados en células para actividad funcional están sometidos a variabilidad. De acuerdo con esto, debe entenderse que los valores para los CI_{50} y pCI_{50} recitados anteriormente son sólo ejemplares.

3. Actividad hERG - Ensayo de unión del ligando fluoro Cy3B dofetilida para hERG

Las potencias del compuesto se determinaron por un ensayo de polarización de fluorescencia de un fluoro-ligando[§] (Cy3b-Dofetilida).

Se incubaron membranas* de CHO-K1 que expresan hERG (60 $\mu\text{g/ml}$) con 1,0 nM fluoro-ligando[§], en tampón de ensayo (25 mM HEPES, 1,2 mM MgCl_2 , 100 mM KCl y 0,1% pluronic, pH ajustado a 7,4 usando 5M KOH). La concentración final de potasio en el ensayo fue 100 mM. Después de 70 min de mezclado a temperatura ambiente, en oscuridad, se dispensaron 10 μl en cada pocillo de una placa negra de 384 pocillos LV Greiner que contenían 0,1 μl del compuesto de ensayo en DMSO. Se dejó que las placas se equilibraran durante 2 h antes de leer en un formador de imágenes Acquest™/Analyst™. Los datos de pCI_{50} se generaron usando de una curva de inhibición de 11 puntos (concentración más alta del ensayo de 50 μM y una dilución de etapa 1:3), aplicándose un ajuste de curva de seis parámetros usando ABase y XC50 para analizar los datos y generar ajustes de curva.

Los compuestos de los Ejemplos 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9A, 9B, 10, 11A y 11B (como la base libre) se ensayaron esencialmente como se ha descrito anteriormente y se encontró que cada uno tenía un valor CI_{50} medio en este ensayo mayor de 10 μM . Las sales de ácido clorhídrico de los compuestos de los Ejemplos 1, 2, 3, 4 y 6 se ensayaron esencialmente como se ha descrito anteriormente y se encontró que cada uno tenía un valor CI_{50} medio en este ensayo mayor de 20 μM .

Los compuestos de los Ejemplos 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9A, 9B, 10, 11A y 11B se ensayaron esencialmente como se ha descrito anteriormente y se encontró que cada uno tenía un valor pCI_{50} medio en este ensayo menor de 5,0. Las sales de ácido clorhídrico de los compuestos de los Ejemplos 1, 2, 3, 4 y 6 se ensayaron esencialmente como se ha descrito anteriormente y se encontró que cada uno tenía un valor pCI_{50} medio en este ensayo menor de 5,0.

Los expertos en la técnica reconocerán que los ensayos de unión *in vitro* y los ensayos basados en células para actividad funcional están sometidos a variabilidad. De acuerdo con esto, debe entenderse que los valores para los CI_{50} y pCI_{50} recitados anteriormente son sólo ejemplares.

*Membranas CHO-K1

Se crecieron células de Ovario de Hámster Chino (CHO) que expresaban de manera estable el receptor hERG humano hasta el 80% de confluencia antes de recogerlas por tripsinización y centrifugación posterior a 500 g durante 10 min. Los sedimentos celulares se congelaron a -80°C antes de la producción de membranas. El sedimento congelado se descongeló en hielo, se resuspendió y se homogeneizó en 10 volúmenes de tampón de membrana (50 mM HEPES, pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 2×10^{-6} M Pepstatina A). La suspensión de membrana se centrifugó durante 20 min a 500 g, el sedimento se desechó y el sobrenadante se centrifugó de nuevo a 48.000 g durante 30 min. Después de la segunda centrifugación, el sedimento remanente que contenía la fracción de membrana se resuspendió en un volumen apropiado (4 ml para cada ml de sedimento celular congelado) y se ensayó para concentración de proteínas.

[§]Fluoro-ligando (octahidrobenczo[2",3"]indolizino[8",7":5',6']pirano[3',2':3,4]pirido[1,2-a]indol-5-io-2-sulfonato (Solicitud Internacional no. PCT/EP2010/050228, publicación no. WO2010/097248A1 (Glaxo Group Ltd), sal TFA descrita en J.M.C. 2007, 50(13), 2931-2941).

- Se añadió N-[4-({2-[(6-aminohexil)(2-{4-[(metilsulfonil)amino]fenil}etil)amino]etil}oxi)fenil]metanosulfonamida (1,508 mg) como una disolución en acetonitrilo (100 µl) a Cy3B-ONSu sólido (14-{2-[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxi]-2-oxoetil}-16,16,18,18-tetrametil-6,7,7a,8a,9,10,16,18-octahidrobenczo[2",3"]indolizino[8",7":5',6']pirano[3',2':3,4]pirido[1,2-a]indol-5-ilo-2-sulfonato (1,7 mg, WO9931181) en un vial silanizado de 4 ml. Se añadió una segunda parte de acetoneitrilo (100 µl) seguido de base de Hunig (0,9 µl). Se añadieron dos partes (2×50 µl) de dimetilformamida y la mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida. El residuo se redisolvió en dimetilformamida (200 µl). Se añadió base de Hunig (0,9 µl) y la mezcla se agitó con vortex durante 22 h. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad, se redisolvió en acetoneitrilo/agua/ácido acético (5/4/1, ~500 µl), se filtró y se aplicó a una columna de HPLC semi-preparativa Spherisorb ODS2 que se eluyó con el gradiente siguiente (caudal=5 ml/min, AU 5,0, 214 nm, AU 2, 256 nm, A=0,1% TFA/agua, B=90% acetoneitrilo/10% agua/0,1% TFA): t=0 min: B=5%; t=10 min: B=5%; t=30 min: B=25%; t=90 min: B=55%; t=105 min: B=100%; t=120 min: B=100%. El componente principal eluyó entre 46% y 48% B y se recogió en una fracción que se evaporó a sequedad y el sólido morado se transfirió a un vial usando metanol como disolvente. El metanol se eliminó bajo presión reducida y el sólido morado se trituró con éter seco. El sólido se secó toda la noche a 1 mbar en una pistola de secado para proporcionar el compuesto del título (1,2 mg).
- 5 N-[4-({2-[(6-aminohexil)(2-{4-[(metilsulfonil)amino]fenil}etil)amino]etil}oxi)fenil]metanosulfonamida
- Se disolvió N-[4-({2-[(6-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-2H-isoindol-2-il)hexil)(2-{4-[(metilsulfonil)amino]fenil}etil)amino]etil}oxi)fenil]metanosulfonamida cruda (142 mg) en metilamina (33% en etanol, 10 ml, 0,216) y se dejó a 22°C durante 48 h. El reactivo en exceso se evaporó bajo presión reducida y el residuo aceitoso se azeotropó con dos partes adicionales de etanol. El producto crudo se disolvió en acetoneitrilo/agua/ácido acético (5/4/1, <2 ml), se aplicó la mitad a una columna de HPLC Phenomenex Jupiter C18 y se eluyó usando el gradiente siguiente (caudal =10 ml/min, AU 20,0, 214 nm, AU 10, 256 nm, A=0,1% TFA/agua, B=90% acetoneitrilo/10% agua/0,1% TFA): t=0 min: B=5%; t=10 min: B=5%; t=100 min: B=35%; t=115 min: B=100%; t=130 min: B=100%. Las fracciones que contenían principalmente el componente con elución más lenta (>90%) se combinaron y se evaporaron para proporcionar el compuesto del título (14,9 mg). El crudo remanente se aplicó a la columna C18 pero con un gradiente modificado:
- 20 t=0 min: B=5%; t=10 min: B=5%; t=15 min: B=10%; t=95 min: B=30%; t=110 min: B=100%; t=125 min: B=100%. Las fracciones que contenían principalmente el producto deseado se combinaron y se evaporaron como antes para rendir el compuesto del título (21,3 mg ~80% pureza). El material se usó sin más purificación.
- 25 N-[4-({2-[(6-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-2H-isoindol-2-il)hexil)(2-{4-[(metilsulfonil)amino]fenil}etil)amino]etil}oxi)fenil]metanosulfonamida
- Se disolvió 2-[6-({2-[(4-aminofenil)etil]{2-[(4-aminofenil)oxi]etil}amino)hexil]-1H-isoindol-1,3(2H)-diona (108,3 mg) en DCM (5 ml) y se enfrió hasta 0-4°C en un baño de hielo. Se añadió base de Hunig (0,227 ml) seguido de la adición gota a gota de cloruro de mesilo (0,051 ml). La reacción se mantuvo a 0-4°C durante 0,5 h y después se dejó calentar lentamente hasta temperatura ambiente. Después de 3 h la mezcla de reacción se evaporó a sequedad y se usó en la etapa siguiente.
- 30 2-[6-({2-[(4-aminofenil)etil]{2-[(4-aminofenil)oxi]etil}amino)hexil]-1H-isoindol-1,3(2H)-diona
- Se disolvió 2-[6-({2-[(4-nitrofenil)etil]{2-[(4-nitrofenil)oxi]etil}amino)hexil]-1H-isoindol-1,3(2H)-diona (0,35 g) en una mezcla de etanol (40 ml), agua (5 ml) y ácido acético (5 ml) y la disolución resultante se desgaseó bajo presión reducida. Se añadió 10% paladio sobre carbón (56% pasta, 0,27 g) y la mezcla resultante se agitó vigorosamente bajo una atmósfera de hidrógeno (presión atmosférica) durante 12 h. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite™ y se lavó con etanol. El filtrado y los lavados se evaporaron a sequedad para proporcionar el compuesto del título (0,313 g) que se usó sin más purificación.
- 35 2-[6-({2-[(4-nitrofenil)etil]{2-[(4-nitrofenil)oxi]etil}amino)hexil]-1H-isoindol-1,3(2H)-diona
- Se disolvieron [2-(4-nitrofenil)etil]{2-[(4-nitrofenil)oxi]etil}amina (253 mg) y 2-(6-bromohexil)-1H-isoindol-1,3(2H)-diona (1.186 mg) en DMF (4 ml) y se basificó por la adición de DIPEA (0,665 ml). La reacción se agitó durante 120 h. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad y el residuo se disolvió en DCM, la disolución se absorbió en una almohadilla de sílice y se purificó en un cartucho de sílice (12 g) eluyendo con el gradiente siguiente: (A=DCM, B=metanol) t=0 min: B=10%; t=7,5 min: B=0%; t=22,5 min: B=5%. El producto deseado eluyó a ~15% B (isocráticamente) y la evaporación de la disolución a sequedad proporcionó el compuesto del título (0,364 g).
- 45 [2-(4-nitrofenil)etil]{2-[(4-nitrofenil)oxi]etil}amina
- Se disolvieron [[2-(4-nitrofenil)etil]amina (498,9 mg) y 111-[(2-bromoetil)oxi]-4-nitrobenceno 2-bromoetil 4-nitrofenil éter (513 mg) en DMF (5 ml) a 22°C y se añadió DIPEA (0,872 ml). La mezcla de reacción se dejó durante 60 h a 22°C, se evaporó a sequedad y el residuo se disolvió en DCM. El compuesto se absorbió en sílice y se purificó en un cartucho de sílice (12 g) en dos lotes eluyendo con un gradiente metanol/DCM (0-15%). Las fracciones que contenían el producto puro se combinaron y el disolvente se eliminó bajo presión reducida. El compuesto del título resultante se aisló como un aceite amarillo oscuro que solidificó parcialmente en alto vacío (253 mg).
- 50
- 55

4. Ensayo de cribado de mutación bacteriano (ensayo de Ames)

El ensayo de mutación bacteriano (ensayo de Ames) es un ensayo de mutación reversa a corto plazo diseñado específicamente para detectar un amplio rango de sustancias químicas que pueden producir daño genético que da lugar a mutaciones génicas (sustituciones de pares de bases y mutaciones de desplazamiento de marco).

- 5 El ensayo emplea varias cepas de *Salmonella typhimurium* dependientes de histidina y varias cepas de *Escherichia coli* dependientes de triptófano portando cada una diferentes mutaciones en varios genes en el operón de la histidina o triptófano respectivamente. Estas mutaciones actúan como puntos calientes para mutágenos que causan daño en el ADN a través de diferentes mecanismos.

10 Brevemente, las bacterias se cultivan durante 10 h antes del ensayo. El agar superior se suplementa con cantidades traza de histidina, biotina, y triptófano y se alicuota, antes de añadir el artículo de ensayo requerido, vehículo o control positivo seguido de la suspensión bacteriana apropiada, y bien un sistema de metabolismo oxidativo de mamíferos exógeno (mezcla S9) o disolución de tampón. La mezcla final se vierte sobre placas de agar mínimo que se invierten e incuban antes de contar las colonias revertantes.

15 Cuando las cepas de ensayo se crecen en una placa de agar de medio mínimo que contiene una traza de histidina o triptófano, sólo son capaces de formar colonias aquellas bacterias que revierten a independencia de histidina o triptófano. El número de colonias revertantes inducidas espontáneamente por placa es relativamente constante. Sin embargo, cuando se añade un mutágeno a la placa, el número de colonias revertantes por placa se incrementa, habitualmente de una manera relacionada con la dosis.

20 Las cepas bacterianas usadas rutinariamente son las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535 y TA1537 y *Escherichia coli* WP2 *uvrA* (pKM101).

Los ensayos se realizan en presencia y ausencia de un sistema de metabolismo oxidativo de mamíferos exógeno (mezcla S9), para mimetizar el metabolismo de mamíferos.

25 La concentración más alta ensayada es una que permite una exposición máxima de hasta 5.000 µg/placa para compuestos libremente solubles, o el límite de solubilidad o toxicidad (lo que sea menor). Si la solubilidad del compuesto es un factor limitante, la concentración máxima elegida será la concentración más baja a la que el compuesto precipita observado a simple vista en las placas de tratamiento al final del periodo de incubación.

En todos los ensayos se incluyen controles de vehículo y positivos apropiados.

30 Se lleva a cabo un ensayo de una única mutación (usando la metodología de incorporación en placa) en presencia y ausencia de mezcla S9 (que consiste en 4 placas replicadas para controles de vehículo y 2 placas replicadas para los controles positivos y artículo de ensayo).

35 Las placas se cuentan habitualmente electrónicamente para la formación de colonias bacterianas seguido de la inspección de las placas para signos de toxicidad (es decir, crecimiento reducido (disminución) de césped de fondo, la presencia de colonias como puntos pequeños/pseudorevertantes y/o una reducción en el número de colonias). Las placas también se evaluarán (a simple vista) para la precipitación del compuesto. Cuando ocurre la precipitación del compuesto, el recuento de la formación de colonias bacterianas para cada cepa parará a la concentración de tratamiento más baja a la que la precipitación del compuesto se observa en las placas de ensayo al final del periodo de incubación.

40 El número de colonias en cada placa se registra y se calculan los valores medios para cada concentración del artículo de ensayo usado. Los valores medios también pueden expresarse como una proporción del valor medio del control de vehículo concurrente (es decir, veces de incremento). Además, se documenta cualquier precipitado o toxicidad observada.

45 Si los datos para cualquier nivel de tratamiento muestran una respuesta ≥ 2 veces el valor del control de vehículo concurrente (TA98, TA100, TA102, WP2 *uvrA* (pKM101) y WP2 (pKM101)), o ≥ 3 veces el valor del control de vehículo concurrente (TA1535 y TA1537), conjuntamente con una respuesta relacionada con la dosis, el resultado se considera positivo.

Cuando los datos para cualquier cepa muestran una respuesta relacionada con la dosis, acercándose al umbral de 2 ó 3 veces como se detalla anteriormente, pero no lo excede, el resultado se considera equívoco y puede requerirse un ensayo adicional para clarificación.

50 La metodología del ensayo se basa en procedimientos establecidos para el ensayo de mutagenicidad bacteriana [Maron, 1983; Green, 1984; Ames, 1975; Garner, 1972; Green, 1976; Ames, 1973] y está de acuerdo con los principios generales de las directrices reguladoras siguientes.

Los compuestos de los Ejemplos 1, 2, 3 y 4 (como la base libre) fueron negativos en este ensayo.

COM (2000) Guidance on a Strategy for Testing of Chemicals for Mutagenicity, Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment, diciembre 2000.

5 ICH-S2A (1996) "Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals", en: Federal Register, abril 1996 (61 FR 18199).

ICH-S2B (1997) "A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals", en: Federal Register, noviembre 1997 (62 FR 62472).

10 Gatehouse, D. G., Wilcox, P., Forster, R., Rowland, I. R. y Callander, R. D. (1990) Bacterial Mutation Assays. En: D.J. Kirkland (Ed.), Basic Mutagenicity Test: UKEMS Recommended Procedures. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido, p. 13 61.

OECD (1997) "Bacterial Reverse Mutation Test", en: OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Test Guideline 471.

Intermedios y Ejemplos

General

15 Todas las temperaturas están en °C.

Bis(pinacolato)diboro se refiere a 4,4,4',4',5,5,5',5'-octametil-2,2'-bi-1,3,2-dioxaborolano

BH₃.DMS se refiere a complejo borano dimetilsulfuro

BH₃-THF se refiere a complejo borano tetrahidrofurano

BINAP se refiere a 2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaptil

20 [(S)BINAP]Pd(OTf)₂ se refiere a (S)-2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaptil bis(acetonitrilo)paladio (II) triflato

BOC se refiere a *tert*-butoxicarbonilo

BOC₂O se refiere a Di-*tert*-butil dicarbonato

BuOH se refiere a butanol

tert-BuOK se refiere a *tert*-butóxido de potasio

25 *n*-BuOAc se refiere a acetato de *n*-butilo

ClCO₂Et se refiere a clorofornato de etilo

Cs₂CO₃ se refiere a carbonato de cesio

Cu(OAc)₂ se refiere a acetato de cobre

CV se refiere a volumen de la columna

30 DCM se refiere a diclorometano

DIPEA se refiere a *N,N*-diisopropiletilamina

DMAP se refiere a 4-dimetilaminopiridina

DME se refiere a dimetoxietano

DMSO se refiere a dimetilsulfóxido.

35 DMF se refiere a *N,N*-dimetilformamida

Et₃N se refiere a trietilamina

Et₂O o Éter se refiere a dietil éter

EtOAc se refiere a acetato de etilo

EtOH se refiere a etanol

40 Fmoc se refiere a 9-fluorenilmetiloxycarbonilo

- h se refiere a horas
- HCl se refiere a ácido clorhídrico
- H₂O se refiere a agua
- HPLC se refiere a cromatografía líquida de alto rendimiento
- 5 IPA se refiere a *iso*-propanol
- K₂CO₃ se refiere a carbonato de potasio
- KOAc se refiere a acetato de potasio
- KOH se refiere a hidróxido de potasio
- LCMS se refiere a cromatografía líquida-espectroscopía de masa
- 10 MDAP se refiere a autoprep dirigida a masa
- Me₄NCl se refiere a cloruro de tetrametilamonio
- MeOD se refiere a metanol deuterado
- min se refiere a minutos
- n*BuLi se refiere a *N*-butil litio
- 15 NBS se refiere a *N*-bromosuccinimida
- NaHCO₃ se refiere a bicarbonato de sodio
- Na₂SO₄ se refiere a sulfato de sodio
- NaN₃ se refiere a azida de sodio
- NMP se refiere a *N*-metilpirrolidona
- 20 (PhSO₂)₂NF o NFSI se refiere a *N*-fluorobencenosulfonimida
- Pd/C se refiere a paladio sobre carbón
- PdCl₂.dppf se refiere a [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio
- Pd₂(dba)₃ se refiere a tris(dibencilidenacetona)dipaladio (0)
- Pd(PPh₃)₄ se refiere a tetraquis(trifenilfosfina) paladio (0)
- 25 Pd(di-*t*-bpf)Cl₂ se refiere a dicloruro de 1,1'-bis(di-*terc*-butilfosfino)ferroceno paladio
- PEPPSI se refiere a Estabilización e Iniciación de Preparaciones con Precatalizador Mejorado con Piridina
- POCl₃ se refiere a oxiclورو de fósforo
- Pt/C se refiere a platino sobre carbón
- r.t. se refiere a temperatura ambiente
- 30 Rt se refiere a tiempo de retención
- TBME se refiere a *tert*-butil metil éter
- TEA se refiere a trietilamina
- TFA se refiere a ácido trifluoroacético
- Tf₂O se refiere a anhídrido triflico
- 35 THF se refiere a tetrahidrofurano
- Los espectros ¹H RMN se registraron usando un Bruker DPX 400MHz, referenciado a tetrametilsilano.

5 La LC/MS (Método A) se llevó a cabo en una columna C18 Acquity UPLC BEH (50 mm×2,1 mm d.i. 1,7 µm de diámetro de empaquetamiento) a 40 grados centígrados, eluyendo con 10 mM bicarbonato de amonio en agua ajustado a pH 10 con disolución de amoniaco (Disolvente A) y acetonitrilo (Disolvente B) usando el gradiente de elución siguiente 0-1,5 min 1-97% B, 1,5-1,9 min 97% B, 1,9-2,0 min 100% B a un caudal de 1 ml/min. La detección UV fue una señal sumada de longitud de onda de 210 nm a 350 nm. Los espectros de masa se registraron en un Espectrómetro de Masa Waters ZQ usando Electropulverización Positiva y Negativa con escaneo Alternativo. Los datos de ionización se redondearon al número entero más próximo.

10 La LC/MS (Método B) se llevó a cabo en una columna C18 Acquity UPLC BEH (50 mm×2,1 mm d.i. 1,7 µm de diámetro de empaquetamiento) a 40 grados centígrados, eluyendo con 0,1% v/v disolución de Ácido fórmico en agua (Disolvente A) y 0,1% v/v disolución de ácido fórmico en acetonitrilo (Disolvente B) usando el gradiente de elución siguiente 0-1,5 min 3-100% B, 1,5-1,9 min 100% B, 1,9-2,0 min 3% B a un caudal de 1 ml/min. La detección UV fue una señal sumada de longitud de onda de 210 nm a 350 nm. Los espectros de masa se registraron en un Espectrómetro de Masa Waters ZQ usando Electropulverización Positiva y Negativa con escaneo Alternativo. Los datos de ionización se redondearon al número entero más próximo.

15 La LC/MS (Método C) se llevó a cabo en una columna C18 Acquity UPLC BEH (50 mm×2,1 mm d.i. 1,7 µm de diámetro de empaquetamiento) a 40 grados centígrados, eluyendo con 0,1% v/v disolución de ácido trifluoroacético en agua (Disolvente A) y 0,1% v/v disolución de ácido trifluoroacético en acetonitrilo (Disolvente B) usando el gradiente de elución siguiente 0-1,5 min 3-100% B, 1,5-1,9 min 100% B, 1,9-2,0 min 3% B a un caudal de 1 ml/min. La detección UV fue una señal sumada de longitud de onda de 210 nm a 350 nm. Los espectros de masa se registraron en un Espectrómetro de Masa Waters ZQ usando Electropulverización Positiva y Negativa con escaneo Alternativo. Los datos de ionización se redondearon al número entero más próximo

25 MDAP (Método A). El análisis de HPLC se llevó a cabo en una columna C18 XBridge (100 mm×30 mm d.i. 5 µm diámetro de empaquetamiento) a temperatura ambiente, eluyendo con 10 mM bicarbonato de amonio en agua ajustado a pH 10 con disolución de amoniaco (Disolvente A) y acetonitrilo (Disolvente B) usando el gradiente de elución siguiente:

Tiempo (min)	Caudal (ml/min)	%A	%B
0	40	85	15
1	40	85	15
10	40	45	55
11	40	1	99
15	40	1	99

La detección UV fue una señal promediada de longitud de onda de 210 nm a 350 nm. Los espectros de masa se registraron en un Espectrómetro de Masa Waters ZQ usando Electropulverización Positiva y Negativa con escaneo Alternativo. Los datos de ionización se redondearon al número entero más próximo.

30 MDAP (Método B). El análisis de HPLC se llevó a cabo en una columna C18 XBridge (100 mm×30 mm d.i. 5 µm diámetro de empaquetamiento) a temperatura ambiente, eluyendo con 10 mM bicarbonato de amonio en agua ajustado a pH 10 con disolución de amoniaco (Disolvente A) y acetonitrilo (Disolvente B) usando el gradiente de elución siguiente:

Tiempo (min)	Caudal (ml/min)	%A	%B
0	40	85	15
1	40	85	15
20	40	45	55
21	40	1	99
25	40	1	99

35 La detección UV fue una señal promediada de longitud de onda de 210 nm a 350 nm. Los espectros de masa se registraron en un Espectrómetro de Masa Waters ZQ usando Electropulverización Positiva y Negativa con escaneo Alternativo. Los datos de ionización se redondearon al número entero más próximo.

MDAP (Método C). El análisis de HPLC se llevó a cabo en una columna C18 Sunfire (150 mm×30 mm d.i. 5 µm diámetro de empaquetamiento) a temperatura ambiente, eluyendo con 0,1% v/v disolución de ácido trifluoroacético en agua (Disolvente A) y 0,1% v/v disolución de ácido trifluoroacético en acetonitrilo (Disolvente B) usando el gradiente de elución siguiente:

Tiempo (min)	Caudal (ml/min)	%A	%B
0	40	100	0
3	40	100	0
3,5	30	100	0
24,5	30	70	30
25	30	1	99
32	30	1	99

5

La detección UV fue una señal promediada de longitud de onda de 210 nm a 350 nm. Los espectros de masa se registraron en un Espectrómetro de Masa Waters ZQ usando Electropulverización Positiva y Negativa con escaneo Alternativo. Los datos de ionización se redondearon al número entero más próximo.

10 MDAP (Método D). El análisis de HPLC se llevó a cabo en una columna C18 Sunfire (150 mm×30 mm d.i. 5 µm diámetro de empaquetamiento) a temperatura ambiente, eluyendo con 10 mM bicarbonato de amonio en agua ajustado a pH 10 con disolución de amoniaco (Disolvente A) y acetonitrilo (Disolvente B) usando el gradiente de elución siguiente:

Tiempo (min)	Caudal (ml/min)	%A	%B
0	40	100	0
3	40	100	0
3,5	30	100	0
24,5	30	70	30
25	30	1	99
32	30	1	99

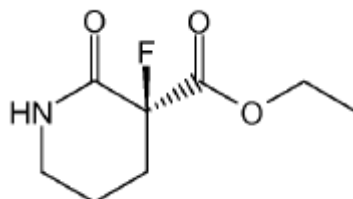
15 La detección UV fue una señal promediada de longitud de onda de 210 nm a 350 nm. Los espectros de masa se registraron en un Espectrómetro de Masa Waters ZQ usando Electropulverización Positiva y Negativa con escaneo Alternativo. Los datos de ionización se redondearon al número entero más próximo.

Las técnicas de cromatografía en sílice incluyen bien técnicas automatizadas (Flashmaster, Biotage SP4) o cromatografía manual en cartuchos pre-empaquetados (SPE) o columnas flash empaquetadas manualmente.

20 Cuando el nombre de un proveedor comercial se proporciona después del nombre de un compuesto o un reactivo, por ejemplo "compuesto X (Aldrich)" o "compuesto X/Aldrich", esto significa que el compuesto X se puede obtener de un proveedor comercial, tal como el proveedor comercial nombrado.

De manera similar, cuando una referencia bibliográfica o de patente se proporciona después del nombre de un compuesto, por ejemplo compuesto Y (EP 0 123 466), esto significa que la preparación del compuesto se describe en la referencia nombrada.

25 Los nombres de los Ejemplos mencionados anteriormente se han obtenido usando el programa de denominación de compuestos "ACD Name Pro 6.02".

Intermedio 1: (3S)-3-fluoro-2-oxo-3-piperidinacarboxilato de etilo

Se añadió gota a gota 2,6-lutidina (31,7 g, 296 mmoles) (Aldrich) durante 30 min a una suspensión de 2-oxo-3-piperidinacarboxilato de etilo (101,2 g, 591 mmoles) (Aldrich), ditriflato de [(S)-(-)-2,2'-bisfosfino)-1,1'-binaftil]paladio (II) dihidrato (3,14 g, 2,96 mmoles) (Sodeoka, M et al. *Synlett* **1997**, 463-466; Fujii, A et al. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 5450-5458) (Aldrich) y *N*-fluorobencenosulfonimida (242,0 g, 768 mmoles) (Aldrich) en etanol (500 ml) a 0°C en un baño de hielo. La temperatura se mantuvo a aproximadamente 10°C durante la adición y después se dejó calentar hasta temperatura ambiente toda la noche al fundirse el hielo. La presencia de sólido alrededor de la boca del matraz (3 L) sugiere que había ocurrido un exotermo posible durante la noche. La LCMS mostró la presencia de producto. La reacción se filtró y el sólido se lavó con etanol, después DCM (200 ml). La RMN confirmó que no había producto en el sólido. Los licores se evaporaron y se re-disolvieron en DCM (3.500 ml). Los orgánicos se lavaron con disolución de cloruro de amonio saturada (300 ml) y la acuosa se re-extrajo con DCM (2×200 ml). Los orgánicos combinados se evaporaron y se re-disolvieron en DCM (300 ml), se filtraron a través de celite y se lavaron con DCM (200 ml). La disolución orgánica se dejó permanecer toda la noche (sellada para evitar la evaporación) - apareció un precipitado fino. La mezcla se filtró a través de celite de nuevo y se lavó con DCM.

Las capas orgánicas combinadas se cargaron en una columna de sílice de 1.500 g y se purificaron en el companion XL eluyendo con gradiente 0-100% acetato de etilo en ciclohexano. Las fracciones apropiadas se identificaron por LCMS, se combinaron y el disolvente se eliminó para proporcionar el compuesto del título como un sólido amarillo, que se secó en alto vacío durante 1 h (92,2 g).

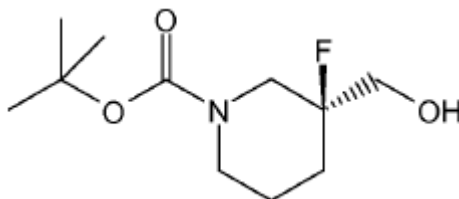
LCMS (Método B): Rt=0,52 min, MH⁺ 190

La HPLC analítica quiral (25 cm Chiralpak IA, col. no. IA00CE-MC024, 15% EtOH/C7, 1 ml/min, longitud de onda 215 nm, RT) mostró enriquecimiento del compuesto que eluyó más rápido - 44% ee. El compuesto se combinó con tres otros lotes de enriquecimiento enantiomérico variado y se purificaron 215 g del material más usando HPLC preparativa para mejorar el exceso enantiomérico del compuesto que eluyó más rápido hasta >99%.

Las muestras se prepararon en lotes según el método siguiente: se disolvió etil-3-fluoro-2-oxo-3-piperidinacarboxilato (25 g) en etanol (450 ml) con calentamiento suave y sonicación. La disolución se filtró a través de un filtro de jeringa Acrodisc Pall de 37 mm con una membrana de fibra de vidrio de 1 µm para eliminar los finos y material no disuelto. La disolución filtrada se ajustó a un volumen total de 500 ml con etanol para proporcionar una disolución con concentración nominal de 50 mg/mL.

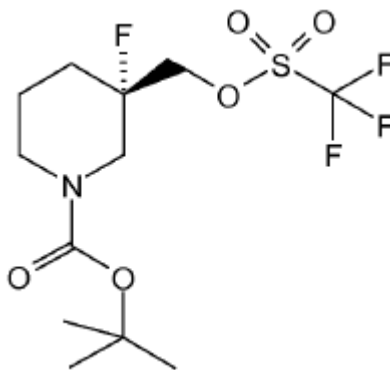
Los detalles de HPLC preparativa fueron como sigue:

Columna	Chiralpak, 330 x 50 mm, 20 µm	
Fase Móvil	A: Heptano	B: Etanol
Perfil de Gradiente	15% B Isocrático	
Tiempo de Corrida	20 min	
Caudal	473 mL/min	
Temperatura de la Columna	20°C	
Longitud de Onda	220 nm	

Intermedio 2: (3S)-3-Fluoro-3-(hidroximetil)-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo

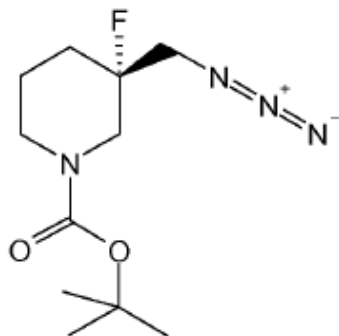
5 Se disolvió (3S)-3-fluoro-2-oxo-3-piperidinacarboxilato de etilo (50 g, 264 mmoles) en THF (100 ml) y se añadió gota a gota complejo borano-THF (793 ml, 793 mmoles, disolución 1M). La mezcla se calentó a reflujo durante 24 h, se enfrió hasta temperatura ambiente y el borano se apantalló por la adición de metanol (150 ml). Se añadió 2M HCl (200 ml) y la mezcla se calentó a reflujo durante 20 min, se enfrió y se evaporó en vacío. El residuo se suspendió en DCM (500 ml) y se añadió trietilamina (111 ml, 793 mmoles), seguido de anhídrido BOC (73,6 ml, 317 mmoles). La mezcla se agitó durante 3 h, se lavó con agua (100 ml) y 0,5M HCl (100 ml), se secó y se evaporó para proporcionar (3S)-3-fluoro-3-(hidroximetil)-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo como un sólido cristalino amarillo claro (52,85 g).

LCMS (Método B): Rt=0.80 min, MH⁺ 234

Intermedio 3: (3S)-3-fluoro-3-(((trifluorometil)sulfonyl)oxi)metil)-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo

15 Se añadió anhídrido triflico (24,06 ml, 142 mmoles) a una disolución de (3S)-3-fluoro-3-(hidroximetil)-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo (30,2 g, 129 mmoles) y trietilamina (23,46 ml, 168 mmoles) en DCM (100 ml) a -10°C durante 20 min. La mezcla se agitó durante 2 h, permitiendo que se calentara hasta 0°C, se lavó con agua y disolución salina concentrada, se secó y se evaporó para proporcionar (3S)-3-fluoro-3-(((trifluorometil)sulfonyl)oxi)metil)-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo como un aceite marrón oscuro (50,2 g).

LCMS (Método B): Rt=1,23 min, MH⁺ 366

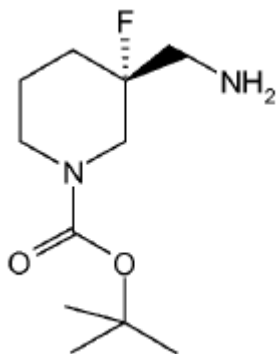
Intermedio 4: (3S)-3-(azidometil)-3-fluoro-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo

25 Se añadió azida de sodio (9,79 g, 151 mmoles) a una disolución de (3S)-3-fluoro-3-(((trifluorometil)sulfonyl)oxi)metil)-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo (50 g, 137 mmoles) en DMF (200 ml) y la mezcla se calentó hasta 80°C durante 1 h. Se tomó una muestra y se paró con agua, se extrajo con éter y la capa de éter se evaporó en vacío. El residuo se analizó por RMN mostrando el consumo completo del material de partida.

La mezcla se enfrió, se diluyó con agua (1 L) y se extrajo con EtOAc (2×300 ml). El disolvente se lavó con agua (2×300 ml), se secó y se evaporó para proporcionar (3S)-3-(azidometil)-3-fluoro-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo como un aceite ámbar (36,7 g).

LCMS (Método B): Rt=1,12 min, MH⁺ 259

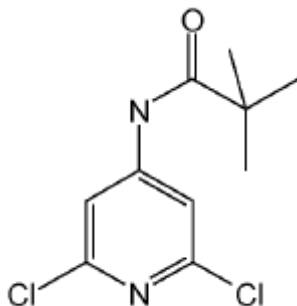
5 **Intermedio 5: (3R)-3-(Aminometil)-3-fluoro-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo**



10 Se disolvió (3S)-3-(azidometil)-3-fluoro-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo (36 g, 139 mmoles) en etanol (500 ml) y se añadió bajo nitrógeno a Pd/C (2,6 g, 1,222 mmoles). La mezcla se hidrogenó a presión atmosférica toda la noche. La suspensión se filtró y el filtrado se evaporó en vacío para proporcionar (3R)-3-(aminometil)-3-fluoro-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo como un aceite amarillo claro (32,7 g).

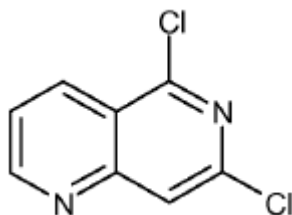
¹H RMN (CDCl₃) 3,75-3,52 ppm (2H, 2×m, 2×CH), 3,30 ppm (1H, dd, CH), 3,20 ppm (1H, m, CH), 2,90-2,73 ppm (2H, m, CH₂), 1,96-1,72 ppm (2H, 2×m, CH₂), 1,70-1,58 ppm (1H, m, CH), 1,57-1,43 ppm (10H, m+s, CH+3×CH₃), 1,32 ppm (2H, br.s, NH₂).

Intermedio 6: N-(2,6-Dicloro-4-piridinil)-2,2-dimetilpropanamida



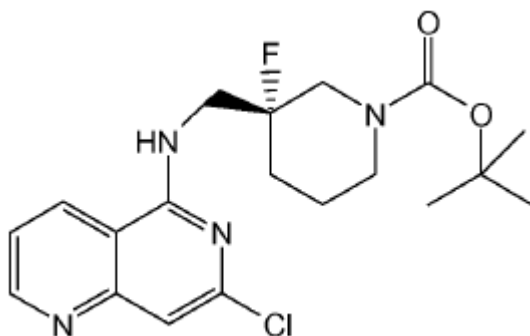
15 Se combinaron 2,6-dicloro-4-piridinamina (10 g, 61,3 mmoles) (Aldrich) y trietilamina (10,69 ml, 77 mmoles) en diclorometano (DCM) (75 ml) y se enfrió en un baño de hielo. Se añadió gota a gota cloruro de 2,2-dimetilpropanoilo (8,30 ml, 67,5 mmoles) (Aldrich) en DCM (15 ml) y la mezcla se agitó mientras se permitía que se calentara toda la noche produciendo una disolución naranja oscura clara. La LCMS mostró una buena conversión al producto. La disolución se lavó con agua y NaHCO₃ sat. (100 ml cada uno), se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró para
20 rendir un sólido naranja oscuro. El producto crudo se recogió en el mínimo de DCM y se aplicó a una columna de sílice de 320 g Companion XL y se eluyó con 0% EtOAc en ciclohexano para 2 CV, después 0-15% EtOAc en ciclohexano sobre 12 CV después se mantuvo a 15% para 2 CV. Las fracciones apropiadas se combinaron y se evaporaron para proporcionar el compuesto del título como un sólido amarillo (11,59 g).

25 LCMS (Método B): Rt=1,13 min, MH⁺ 247/249

Intermedio 7: 5,7-Dicloro-1,6-naftiridina

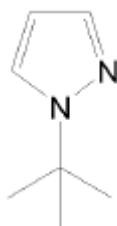
Se recogió *N*-(2,6-dicloro-4-piridinil)-2,2-dimetilpropanamida (1 g, 4,05 mmoles) en THF (10 ml) bajo nitrógeno y se enfrió hasta $<-70^{\circ}\text{C}$. Se añadió *n*-butil litio (4,05 ml, 10,12 mmoles, disolución 2,5M en hexanos) durante 30 min manteniendo la temperatura por debajo de -60°C , y se agitó por debajo de -70°C durante 1 h. Se añadió (2*E*)-3-(dimetilamino)-2-propenal (0,607 ml, 6,07 mmoles) en THF (2 ml) durante 30 min manteniendo la temperatura por debajo de -60°C . La reacción se agitó por debajo de -70°C durante 20 min y se dejó calentar hasta temperatura ambiente. La LCMS mostró que no quedaba material de partida de manera que la reacción se paró con 5M HCl (5 ml) y se puso a reflujo toda la noche. La LCMS mostró una buena conversión al producto de manera que la reacción se enfrió hasta temperatura ambiente. La mezcla de reacción se basificó con K_2CO_3 sólido y se extrajo con EtOAc (4x25 ml). Los orgánicos combinados se secaron con Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron para rendir un sólido marrón. El producto crudo se aplicó a un samplet y se pasaron por columna usando un 40+M eluyendo con 12% dietil éter en ciclohexano para 2 CV, después con 12%-63% dietil éter en ciclohexano sobre 10 CV y después se mantuvo a 63% para 5CV. Las fracciones apropiadas se combinaron y se evaporaron para proporcionar el compuesto del título como un sólido amarillo (0,42 g).

LCMS (Método B): $R_t=0,89$ min, MH^+ 199/201

Intermedio 8: (3*R*)-3-[[7-Cloro-1,6-naftiridin-5-il)amino]metil]-3-fluoro-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo

A 5,7-dicloro-1,6-naftiridina (5,01 g, 25,2 mmoles) y (3*R*)-3-(aminometil)-3-fluoro-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo (5,32 g, 22,90 mmoles) en NMP (20 ml) se añadió DIPEA (8,00 ml, 45,8 mmoles) y la mezcla se agitó a 100°C durante 72 h bajo nitrógeno. La reacción se enfrió y se repartió entre acetato de etilo y agua (200 ml cada uno). La acuosa se lavó con acetato de etilo. Los orgánicos combinados se lavaron con agua y el disolvente se eliminó. El residuo se disolvió en DCM y se cargó en una columna de sílice de 100 g SNAP y se purificó en la SP4 eluyendo con 0-50% acetato de etilo en ciclohexano sobre 17 CV. Las fracciones apropiadas se combinaron y el disolvente se eliminó para proporcionar el compuesto del título como un sólido naranja claro que se secó en alto vacío durante 2 h (7,61 g).

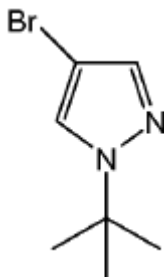
LCMS (Método B): $R_t=1,12$ min, MH^+ 395/397

Intermedio 9: 1-(1,1-Dimetiletil)-1*H*-pirazol

- Una mezcla de hidrocioruro de (1,1-dimetiletil)hidrazina (1,02 g, 8,19 mmoles) (Aldrich), 1,1,3,3-tetraquis(metiloxi)propano (1,344 g, 8,19 mmoles) (Aldrich) y ácido clorhídrico (0,672 ml, 8,19 mmoles) en etanol (10 ml) se calentó bajo reflujo. Se formó una disolución. Después de 16 h la reacción se había completado y por lo tanto se concentró en vacío para rendir el producto crudo. Éste se disolvió en metanol y se pasó a través de un cartucho de aminopropilo (20 g), eluyendo con metanol. Los filtrados combinados se concentraron en vacío para rendir el compuesto del título como una goma crema (210 mg)

LCMS (Método B): Rt=0,74 min, MH⁺=125,6

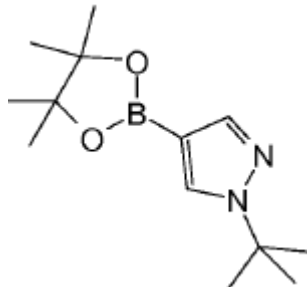
Intermedio 10: 4-Bromo-1-(1,1-dimetiletil)-1H-pirazol



- 10 A una disolución enfriada en hielo de 1-(1,1-dimetiletil)-1H-pirazol (6,1 g, 49,1 mmoles) en diclorometano (DCM) (200 ml) se añadió N-bromosuccinimida (8,74 g, 49,1 mmoles). Ésta se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 18 h. No había material de partida presente y por lo tanto la reacción se paró con tiosulfato de sodio acuoso. Los orgánicos se lavaron con agua (2×500 ml) y se pasaron a través de una frita hidrofóbica. El filtrado se concentró en vacío para rendir un aceite naranja-marrón que se volvió morado con el tiempo (7,402 g).

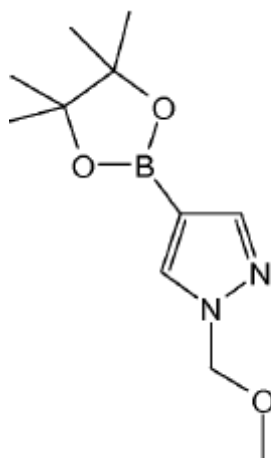
15 LCMS (Método B): Rt=1,03 min, MH⁺=203, 205

Intermedio 11: 1-(1,1-Dimetiletil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol



- 20 Una mezcla de 4-bromo-1-(1,1-dimetiletil)-1H-pirazol (2,4 g, 11,82 mmoles), 4,4,4',4',5,5,5'-octametil-2,2'-bi-1,3,2-dioxaborolano (3,00 g, 11,82 mmoles), acetato de potasio (2,90 g, 29,5 mmoles), tris(dibencilidenacetona)dipaladio (0) (0,108 g, 0,118 mmoles), 2-(díciclohexilfosfino)-2',4',6'-triisopropilbifenilo (0,225 g, 0,473 mmoles) en 1,4-dioxano (30 ml) se desgaseó con nitrógeno. La mezcla de reacción se dividió en 2 viales de microondas y se calentó a 110^oC en un microondas durante 1,5 h. No había material de partida remanente de manera que las reacciones se filtraron a través de un reservorio bond elut y el residuo se lavó con acetato de etilo. El filtrado se concentró en vacío para rendir el producto crudo. Éste se disolvió en DCM y se purificó mediante sílice (50 g) eluyendo con un gradiente 0-50% acetato de etilo en DCM. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron en vacío para rendir el compuesto del título como un sólido beige (1,68 g).

25 LCMS (Método B): Rt=1,08 min, MH⁺=250,8

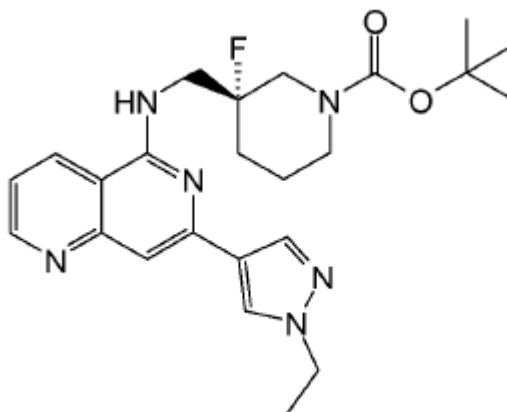
Intermedio 12: 1-[(Metiloxi)metil]-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol

5 Se disolvió 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (400 mg, 2,061 mmoles) (Aldrich) en acetonitrilo (25 ml) y se agitó durante 5 min a 35°C. Se añadieron yodometil metil éter (0,873 ml, 10,31 mmoles) y carbonato de potasio (1.424 mg, 10,31 mmoles) y la mezcla se dejó con agitación a 35°C durante 3 h.

La LCMS mostró reacción incompleta. La mezcla se dejó con agitación a 35°C durante una hora adicional. La LCMS no mostró progresión de manera que se añadieron 2 eq (349 µl) del agente alquilante y la mezcla se dejó con agitación a 35°C durante 30 min. Se añadió cloruro de amonio. La mezcla se repartió entre acetato de etilo y agua. La capa acuosa se re-extrajo con acetato de etilo y las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua, se secaron usando una frita hidrofóbica y se concentraron hasta un aceite. El aceite se purificó en 50 g de sílice usando una SP4 y se eluyó con un gradiente 0-100% acetato de etilo/ciclohexano. El producto se encontró en el desecho, que se concentró para proporcionar el compuesto del título como un aceite (260 mg).

LCMS (Método B): Rt=0,84 min, MH⁺=238,85

15 **Intermedio 13: (3R)-3-([(7-(1-Etil-1H-pirazol-4-il)-1,6-naftiridin-5-il)amino]metil)-3-fluoro-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo**



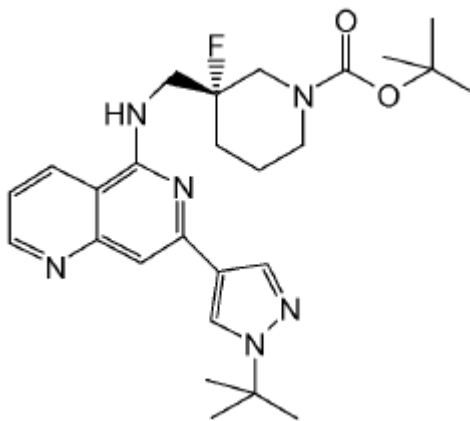
20 A un vial de microondas de 2-5 mL bajo nitrógeno se añadió carbonato de cesio (990 mg, 3,04 mmoles) y 1-etil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (292 mg, 1,317 mmoles) (Boron Molecular). Se disolvió (3R)-3-([(7-cloro-1,6-naftiridin-5-il)amino]metil)-3-fluoro-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo (400 mg, 1,013 mmoles) en 1,4-dioxano (4 ml) y agua (0,8 ml) y se añadió en una alícuota. Se burbujeó nitrógeno a través de la suspensión resultante durante ~2 min. Se añadió tetraquis(trifenilfosfino)paladio (0) (117 mg, 0,101 mmoles) en una parte y se burbujeó nitrógeno a través de la suspensión amarilla durante ~1 min más. El vial de microondas se selló y se calentó a 150°C en un reactor de microondas durante 1 h. La LCMS mostró que la reacción se había completado. La reacción se repartió entre agua (20 ml) y acetato de etilo (20 ml). La capa acuosa se extrajo más con acetato de etilo (2x20 ml) y los orgánicos combinados se lavaron disolución salina concentrada (10 ml). Los orgánicos se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron en vacío.

La reacción se repitió como anteriormente usando las mismas cantidades y condiciones de reacción. Los dos lotes crudos se combinaron y se purificaron usando una columna de sílice de 100 g Biotage y se eluyeron con un

gradiente 0-100% acetato de etilo/ciclohexano. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron en vacío para proporcionar el compuesto del título como un aceite incoloro (811 mg)

LCMS (Método B): Rt=0,88 min, MH⁺ 455

5 **Intermedio 14: (3R)-3-[[7-[1-(1,1-Dimetiletil)-1H-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-il]amino]metil]-3-fluoro-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo**

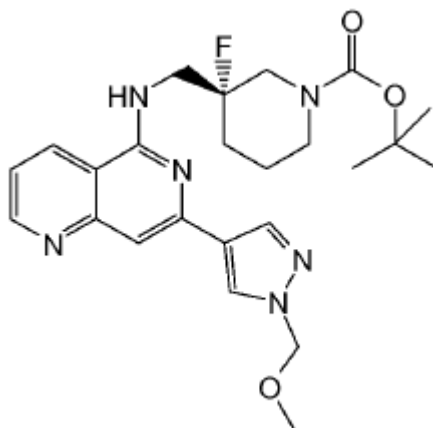


10 A una disolución de (3R)-3-[[7-(7-cloro-1,6-naftiridin-5-il)amino]metil]-3-fluoro-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo (1,300 g, 3,29 mmoles) en 1,4-dioxano (10 ml) se añadió 1-(1,1-dimetiletil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (0,906 g, 3,62 mmoles), carbonato de cesio (2,145 g, 6,58 mmoles), tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0) (0,114 g, 0,099 mmoles) y agua (2 ml). La mezcla de reacción se calentó en el microondas a 130°C durante 2 h. La LCMS muestra un pico principal de producto sin material de partida. La mezcla de reacción se filtró a través de 10 g de celite y se repartió entre acetato de etilo y agua (100 ml×2). La capa orgánica se lavó con disolución salina concentrada (100 ml), se evaporó el disolvente y se disolvió en una cantidad mínima de DCM. Éste se cargó en una columna de sílice de 100 g y se purificó en SP4 eluyendo con 20-90% acetato de etilo en ciclohexano sobre 22 CV.

15 Las fracciones apropiadas se recogieron y el disolvente se evaporó. El producto se secó en alto vacío toda la noche para proporcionar el compuesto del título como un sólido cristalino amarillo (1,586 g).

LCMS (Método B): Rt=1,00 min, MH⁺ 483

Intermedio 15: (3R)-3-Fluoro-3-[[7-[1-[(metiloxi)metil]-1H-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-il]amino]metil]-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo

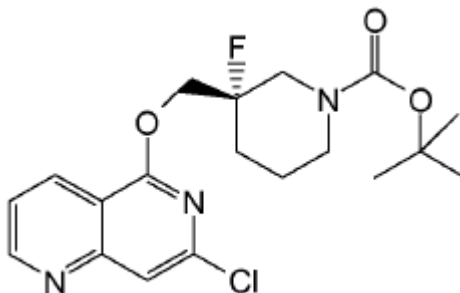


20 A (3R)-3-[[7-(7-cloro-1,6-naftiridin-5-il)amino]metil]-3-fluoro-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo (650 mg, 1,646 mmoles) en DME (5 ml), agua (2,5 ml), etanol (5,00 ml) se añadió 1-[(metiloxi)metil]-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (1,03 g 4,33 mmoles), hidróxido de potasio (3,95 ml, 3,95 mmoles, disolución acuosa 1M) y PEPPSI (112 mg, 0,165 mmoles). La reacción se puso a reflujo a 130°C bajo nitrógeno durante 4 noches. La LCMS mostró un pico principal como producto. La mezcla de reacción se filtró a través de celite y el disolvente se eliminó. El residuo se disolvió en DCM y se cargó en una columna de sílice de 25 g y se purificó en la SP4 eluyendo con un gradiente 50-100% acetato de etilo en ciclohexano. Las fracciones apropiadas se combinaron y el disolvente se eliminó para proporcionar un aceite amarillo que se secó en alto vacío toda la noche para proporcionar el compuesto del título como un sólido/película amarillo (813 mg).

25

LCMS (Método B): Rt=0,86 min, MH⁺ 471

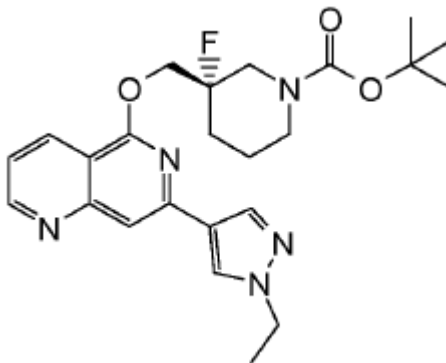
Intermedio 16: (3S)-3-[[7-(Cloro-1,6-naftiridin-5-il)oxi]metil]-3-fluoro-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo



5 A una disolución enfriada en hielo de (3S)-3-fluoro-3-(hidroximetil)-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo (1,406 g, 6,03 mmoles) en DMF (20 ml) se añadió hidruro de sodio (0,313 g, 7,84 mmoles) (dispersión al 60% en aceite mineral). Ésta se agitó durante 15 min antes de añadir 5,7-dicloro-1,6-naftiridina (1,2 g, 6,03 mmoles). Éste se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 4 h. La reacción se había completado y por lo tanto se paró cuidadosamente con cloruro de amonio acuoso antes de repartirlo entre cloruro de amonio acuoso y acetato de etilo. Las capas se separaron y la acuosa se re-extrajo con acetato de etilo. Los orgánicos combinados se lavaron con disolución salina concentrada y se concentraron en vacío para proporcionar el producto crudo. Éste se disolvió en DCM y se purificó a través de sílice (50 g), eluyendo con un gradiente de 0-50% acetato de etilo en DCM. Las fracciones apropiadas se concentraron en vacío para rendir el compuesto del título como una goma espumosa crema (1,91 g).

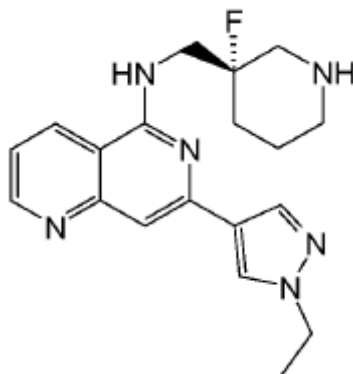
LCMS: Rt=1,18 min, MH⁺=395,85

15 **Intermedio 17: (3S)-3-[[7-(1-Etil-1H-pirazol-4-il)-1,6-naftiridin-5-il]oxi]metil]-3-fluoro-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo**



20 Una mezcla de (3S)-3-[[7-(cloro-1,6-naftiridin-5-il)oxi]metil]-3-fluoro-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo (1,1 g, 2,78 mmoles), 1-etil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (0,679 g, 3,06 mmoles) y carbonato de cesio (2,263 g, 6,95 mmoles) en 1,4-dioxano (16 ml) y agua (3 ml) se desgaseó con nitrógeno antes de añadir tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0) (0,096 g, 0,083 mmoles). Ésta se calentó bajo reflujo durante 18 h. La reacción se repartió entre acetato de etilo y cloruro de amonio acuoso. La acuosa se re-extrajo con acetato de etilo y los orgánicos combinados se lavaron con disolución salina concentrada, se pasaron a través de una frita hidrofóbica y se concentraron en vacío para proporcionar producto crudo. Éste se disolvió en DCM y se purificó mediante sílice (20 g) eluyendo con un gradiente de acetato de etilo en DCM. El producto eluyó en acetato de etilo sólo. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron en vacío para rendir el compuesto del título como una espuma crema rosada (1,10 g).

LCMS: Rt=1.21 min, MH⁺=456,09

Ejemplo 1. 7-(1-Etil-1H-pirazol-4-il)-N-[[[(3S)-3-fluoro-3-piperidinil]metil]-1,6-naftiridin-5-amina

A una disolución de (3R)-3-[[[7-(1-etil-1H-pirazol-4-il)-1,6-naftiridin-5-il]amino]metil]-3-fluoro-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo (811 mg, 1,784 mmoles) en DCM (6,1 ml) se añadió ácido trifluoroacético (3,16 ml, 41,0 mmoles) y éste se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Después de este tiempo, la reacción se había completado y por lo tanto se concentró en vacío para rendir el producto crudo. Éste se disolvió en metanol y se cargó en un cartucho SCX (70 g) y se eluyó con metanol (3 volúmenes de columna) y 2M amoniaco en metanol.

El filtrado de las fracciones de amoniaco se concentró en vacío para proporcionar un aceite amarillo (653 mg). La base libre (553 mg) se purificó por MDA preparativa de alto pH (Método A). Los viales apropiados se combinaron y se concentraron en vacío para rendir el compuesto del título como un sólido amarillo (265 mg).

¹H RMN (d6-DMSO) 8,65 ppm (1H, dd, CH), 8,70 ppm (1H, br.d, CH), 8,33 ppm (1H, s, CH), 8,05 ppm (1H, s, CH), 7,77 ppm (1H, br.t, NH), 7,37 ppm (1H, dd, CH), 7,25 ppm (1H, s, CH), 4,19 ppm (2H, q, CH₂), 3,95 ppm (2H, m, CH₂), 2,85-2,50 ppm (4H, 3×m, 2×CH₂), 1,90-1,54 ppm (4H, 2×m, 2×CH₂), 1,42 ppm (3H, t, CH₃).

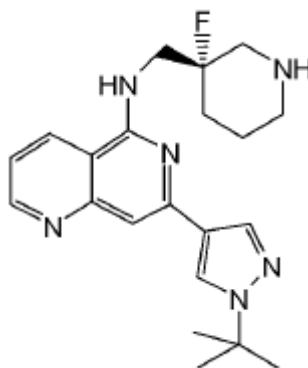
HPLC (columna: Luna 3u C18(2), #409663-12, tiempo de corrida 8 minutos a 1 ml/min, eluyente: 0-95% gradiente de 0,05% TFA/Acetonitrilo en 0,05% TFA/Agua, longitud de onda 220 nm): Rt=2,49 min

Rotación óptica=-25,9 (c. 1.1 en metanol, T=23,6C)

Preparación de la sal HCl:

Se disolvieron 100 mg de la base libre en DCM (1 ml) y a esto se añadió HCl (1,0M en Et₂O) (0,357 mL, 0,357 mmoles). Inmediatamente precipitó un sólido naranja. Los disolventes residuales se purgaron y el sólido naranja resultante se secó en vacío para rendir el compuesto del título como la sal HCl (120 mg), como un sólido naranja.

LCMS (Método B): Rt=0,45 min, MH⁺ 355

Ejemplo 2. 7-[1-(1,1-Dimetiletil)-1H-pirazol-4-il]-N-[[[(3S)-3-fluoro-3-piperidinil]metil]-1,6-naftiridin-5-amina

Se disolvió (3R)-3-[[[7-[1-(1,1-dimetiletil)-1H-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-il]amino]metil]-3-fluoro-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo (1,586 g, 3,29 mmoles) en DCM (5 ml) y se añadió ácido trifluoroacético (5,06 ml, 65,7 mmoles). La reacción se agitó durante 20 min a 20°C. La LCMS mostró un pico principal de producto. La mezcla de reacción se cargó en un cartucho SCX de 20 g y se lavó con metanol. El compuesto se eluyó con 2M amoniaco metanólico. El disolvente de las fracciones de amoniaco se evaporó y se mantuvo en alto vacío durante 2 h para proporcionar un sólido cristalino amarillo (1,171 g). La base libre (1,12 g) se purificó por MDAP preparativa de

alto pH (Método B). Las fracciones apropiadas se combinaron, se concentraron en vacío y se mantuvieron a alto vacío toda la noche para proporcionar el compuesto del título como un sólido cristalino amarillo (688,1 mg).

LCMS (Método B): Rt=0,52 min, MH⁺ 383

5 ¹H RMN (MeOD) 8,80 ppm (1H, dd, CH), 8,58 ppm (1H, dd, CH), 8,32 ppm (1H, s, CH), 8,08 ppm (1H, s, CH), 7,39 ppm (1H, dd, CH), 7,25 ppm (1H, s, CH), 4,24 ppm (1H, dd, CH), 3,82 ppm (1H, dd, CH), 2,95-2,63 ppm (4H, 2×m, 2×CH₂), 2,00-1,69 ppm (4H, 3×m, 2×CH₂), 1,65 ppm (9H, s, 3×CH₃).

Preparación de la Sal HCl:

10 Se disolvieron 50 mg de la base libre en diclorometano (DCM) (1 ml) y a esto se añadió HCl (1,0M en Et₂O) (0,13 ml). Los disolventes se eliminó toda la noche y el producto resultante se secó en vacío durante 1 h para proporcionar el compuesto del título como la sal HCl (56,6 mg), como un sólido naranja.

LCMS (Método B): Rt=0,53 min, MH⁺ 383

Ejemplo 2. 7-[1-(1,1-Dimetiletil)-1H-pirazol-4-il]-N-[[3S]-3-fluoro-3-piperidinil]metil]-1,6-naftiridin-5-amina - Preparación Alternativa

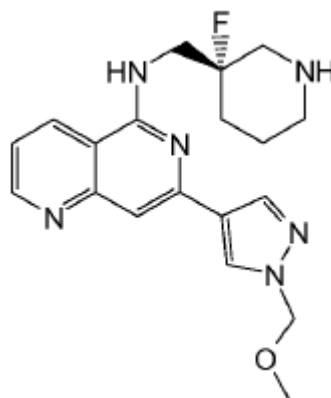
15 A una disolución de (3R)-3-[[7-[1-(1,1-dimetiletil)-1H-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-il]amino]metil]-3-fluoro-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo (2,24 g, 4,64 mmoles) en DCM (14 ml) se añadió TFA (8,22 ml, 107 mmoles) y esto se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Después de este tiempo, la reacción se había completado y por lo tanto se concentró en vacío para rendir el producto crudo. Éste se disolvió en metanol y se cargó en un cartucho SCX (50 g). Se eluyó con metanol (3 CV) y el producto eluyó como la base libre con 2M amoniaco en metanol. El filtrado de las fracciones de amoniaco se concentró en vacío para rendir una espuma amarilla (1,55 g).

20 Una parte de ésta (305 mg) se purificó adicionalmente por MDAP de alto pH para rendir el compuesto del título (265 mg)

LCMS (Método C): Rt=0,56 min, MH⁺ 383

Rotación Óptica=-34,2 (c. 1,01 en metanol, T=23,6°C).

Ejemplo 3. N-[[3S]-3-Fluoro-3-piperidinil]metil]-7-[1-[(metiloxi)metil]-1H-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-amina



25 A (3R)-3-fluoro-3-[[7-[1-[(metiloxi)metil]-1H-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-il]amino]metil]-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo (813 mg, 1,728 mmoles) en DCM (10 ml) se añadió ácido trifluoroacético (2 ml, 26,0 mmoles) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La LCMS mostró el producto como el pico principal. El disolvente se eliminó y se disolvió en metanol y se cargó en un cartucho SCX de 50 g pre-equilibrado. Se lavó con metanol y se eluyó con 2M amoniaco metanólico. El disolvente de las fracciones de amoniaco se eliminó y el residuo se secó en alto vacío toda la noche. El residuo se purificó en MDAP de alto pH a gran escala (Método D). Las fracciones apropiadas se combinaron y el disolvente se eliminó. El producto resultante se secó en alto vacío durante 1 h para proporcionar el compuesto del título como un sólido amarillo (349 mg).

30 LCMS (Método B): Rt=0,43 min, MH⁺ 371

35 ¹H RMN (MeOD) 8,84 ppm (1H, br.d, CH), 8,60 ppm (1H, br.d, CH), 8,44 ppm (1H, s, CH), 8,18 ppm, (1H, s, CH), 7,44 ppm (1H, dd, CH), 7,31 ppm (1H, s, CH), 5,49 ppm (2H, s, CH₂), 4,25-3,87 ppm (2H, 2×dd, CH₂), 3,38 ppm (3H, s, CH₃), 3,21-2,75 ppm (4H, 3×m, 2×CH₂), 2,10-1,75 ppm (4H, 2×m, 2×CH₂).

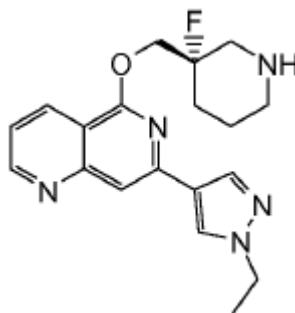
Rotación óptica =-27,7 (c. 0,74 en metanol, T=23,6°C)

Preparación de la sal HCl:

Se disolvieron 47 mg de la base libre en diclorometano (DCM) (1 ml) y una pequeña cantidad de metanol y se añadió HCl (1,0M en Et₂O) (0,127 mL, 1 eq). El disolvente se eliminó y el residuo se secó en alto vacío toda la noche para proporcionar el compuesto del título como la sal HCl (48,5 mg), como un sólido naranja/amarillo claro

5 LCMS (Método B): Rt=0,43 min, MH⁺ 371

Ejemplo 4. 7-(1-Etil-1H-pirazol-4-il)-5-(((3S)-3-fluoro-3-piperidinil]metil)oxi)-1,6-naftiridina



10 A una disolución de (3S)-3-(((7-(1-etil-1H-pirazol-4-il)-1,6-naftiridin-5-il)oxi)metil)-3-fluoro-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo (1,1 g, 2,415 mmoles) en DCM (3 ml) se añadió ácido trifluoroacético (3 ml, 38,9 mmoles) y esto se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La reacción se había completado y por lo tanto se concentró en vacío para rendir el producto crudo. La sal TFA se disolvió en metanol y se cargó en un cartucho SCX (20 g). Las impurezas se eluyeron con metanol, y el producto se eluyó con 2M amoniaco en metanol. El filtrado se concentró en vacío para rendir un sólido gomoso crema (620 mg). Éste se purificó por MDAP a gran escala (Método C). Los viales apropiados se combinaron y se concentraron en vacío para proporcionar el producto como la sal TFA. Para formar la base libre, ésta se disolvió en metanol y se purificó mediante un cartucho SCX (20 g) eluyendo con metanol. El producto se eluyó con 2M amoniaco en metanol. El filtrado se concentró en vacío para rendir el compuesto del título como un vidrio claro (500 mg).

15 LCMS (Método C): Rt=0,51 min, MH⁺=355,9

20 ¹H RMN (MeOD) 8,92 ppm (1H, dd, CH), 8,57 ppm (1H, br.d, CH), 8,30 ppm (1H, s, CH), 8,10 ppm (1H, s, CH), 7,58 ppm (1H, s, CH), 7,51 ppm (1H, dd, CH), 4,68 ppm (2H, m, CH₂), 4,26 ppm (2H, q, CH₂), 3,30-2,60 ppm (4H, 3×m, 2×CH₂), 2,20-1,62 ppm (4H, 3×m, 2×CH₂), 1,52 ppm (3H, t, CH₃).

Rotación óptica =-7,6 (c. 0,79 en metanol, T=23,6⁰C)

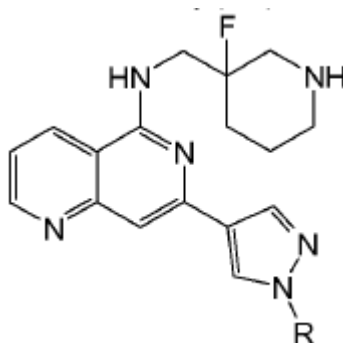
Preparación de la sal HCl:

25 Se disolvieron 115 mg de la base libre en DCM (2 ml) y a esto se añadió 1M HCl en dietil éter (0,32 ml). Éste se eliminó bajo nitrógeno y se secó en vacío para rendir el compuesto del título como la sal HCl (74 mg), como un sólido crema.


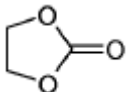
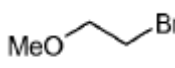
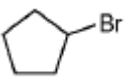

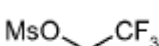
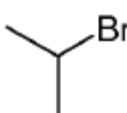
LCMS (Método C): Rt=0,51 min, MH⁺=356

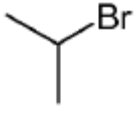
Ejemplos 5 a 11

Los ejemplos adicionales siguientes se prepararon de manera similar:



30

Nombre	R-	Agente alquilante ^s para formar éster borónico	Estereoquímica	LCMS MH ⁺	LCMS Rt (min)
Ej 5: 1-{4-[5-(((3S)-3-fluoro-3-piperidinil)metil)amino]-1,6-naftiridin-7-il]-1H-pirazol-1-il}-2-metil-2-propanol	-CH ₂ C(Me) ₂ OH		homoquiral	399	0,42 (Método B)
Ej 6: 2-{4-[5-(((3S)-3-fluoro-3-piperidinil)metil)amino]-1,6-naftiridin-7-il]-1H-pirazol-1-il}etanol	-CH ₂ CH ₂ OH		homoquiral	371	0,38 (Método B)
Ej 7: N-(((3S)-3-fluoro-3-piperidinil)metil)-7-{1-[2-(metiloxi)etil]-1H-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-amina	-CH ₂ CH ₂ OMe		homoquiral	385	0,43 (Método B)
Ej 8: 7-(1-ciclopentil-1H-pirazol-4-il)-N-((3-fluoro-3-piperidinil)metil)-1,6-naftiridin-5-amina	-ciclopentilo		racémico	395	0,59 (Método C)
Ej 9 Enantiómero A: N-((3-fluoro-3-piperidinil)metil)-7-[1-(2,2,2-trifluoroetil)-1H-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-amina	-CH ₂ CF ₃		homoquiral	409	0,50 (Método B)
Ej 9 Enantiómero B: N-((3-fluoro-3-piperidinil)metil)-7-[1-(2,2,2-trifluoroetil)-1H-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-amina	-CH ₂ CF ₃		homoquiral	409	0,51 (Método B)
Ej 10: N-((3-fluoro-3-piperidinil)metil)-7-[1-(fenilmetil)-1H-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-amina	-bencilo	No sintetizado-éster borónico disponible comercialmente (Aldrich)	racémico	417	0,6 (Método C)
Ej 11 Enantiómero A: N-((3-fluoro-3-piperidinil)metil)-7-[1-(1-metiletil)-1H-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-amina	CH(Me) ₂		homoquiral	369	0,46 (Método B)

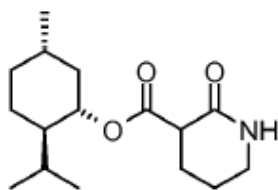
Nombre	R-	Agente alquilante [§] para formar éster borónico	Estereoquímica	LCMS MH ⁺	LCMS Rt (min)
Ej 11 Enantiómero B: <i>N</i> -{[3-fluoro-3-piperidinil]metil}-7-[1-(1-metiletil)-1 <i>H</i> -pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-amina	CH(Me) ₂		homoquiral	369	0,47 (Método B)

* El Ejemplo 11 se preparó usando una piperidina protegida con Fmoc, en lugar de la piperidina protegida con BOC y la separación de los enantiómeros en la fórmula (I) protegida con Fmoc.

[§]-Agentes alquilantes están disponibles comercialmente, por ejemplo, en Sigma-Aldrich Reino Unido (Aldrich).

Descripción del Proceso para el Esquema 6

5 Etapa a): Preparación de 2-oxo-3-piperidinacarboxilato de (1*S*,2*R*,5*S*)-5-metil-2-(1-metiletil)ciclohexilo

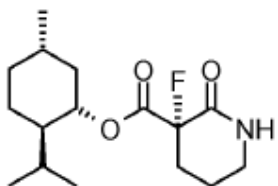


10 Se disuelven/suspenden 4-dimetilaminopiridina (0,35 peso), (+)-mentol (0,95 peso) y 2-oxo-3-piperidinacarboxilato de etilo (1 peso) en tolueno (10 vol). La mezcla se calienta a reflujo y se agita durante siete días con destilación periódica de disolvente y reposición con tolueno fresco. La mezcla de reacción se enfría hasta 25^oC y se lava con dos partes de 5% p/p HCl acuoso (4 vol) y después agua (4 vol). La fase orgánica se concentra bajo presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un aceite incoloro.

Preparación de ditriflato de [(*S*)-2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftil]bis(acetonitrilo)paladio(II), catalizador para la etapa b)

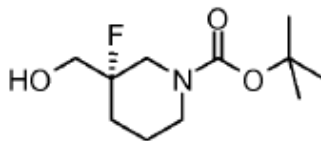
15 Se disuelve acetato de paladio (1 peso) en acetonitrilo (4 vol) y se agita a 20±3^oC durante 1 h. La mezcla de reacción se enfría hasta 0±3^oC y se añade ácido trifluorometanosulfónico (0,75 vol, 1,9 eq) lentamente durante 30 min. Después de agitar durante 15 min a 0±3^oC, la mezcla de reacción se calienta hasta 20±3^oC y se agita durante 30 min adicionales. Se añade (*S*)-BINAP (2,77 peso, 1 eq) seguido de un lavado de acetonitrilo (0,6 vol) y la mezcla se agita a 20±3^oC durante 2,5 h. Se añade lentamente diisopropil éter (10 vol) para proporcionar una suspensión de sólidos que se envejece durante 30 min. El sólido se retira por filtración bajo succión y se lava con acetoneitrilo:diisopropil éter (1:3, 8 vol) y diisopropil éter (8 vol). El producto se seca en vacío a 20±3^oC hasta temperatura de sonda constante.

Etapa b) Preparación de (3*S*)-3-fluoro-2-oxo-3-piperidinacarboxilato de (1*S*,2*R*,5*S*)-5-metil-2-(1-metiletil)ciclohexilo

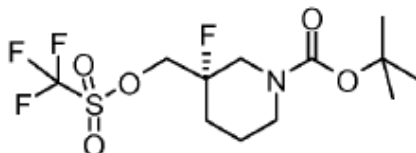


25 Se disuelve 2-oxo-3-piperidinacarboxilato de (1*S*,2*R*,5*S*)-5-metil-2-(1-metiletil)ciclohexilo (1 peso) en etanol (1,5 vol) y se añade *N*-fluorobencenosulfonimida (NFSI) (1,07 peso), seguido de [(*S*)-BINAP]Pd(CH₃CN)₂(OTf)₂ (0,038 peso) a 20^oC. El NFSI residual y el catalizador se lavaron con etanol (3 vol). La cubierta se enfría hasta 0^oC y se carga lentamente 2,6-lutidina (0,21 vol), manteniendo la temperatura por debajo de 20^oC. La temperatura de la cubierta se eleva a 20^oC. La mezcla de reacción se agita durante 24 h, se enfría hasta 0^oC y se agita durante 2 h adicionales.

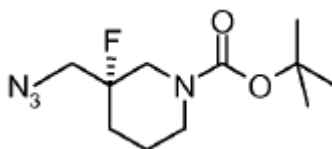
30 Los sólidos se aíslan por filtración, lavando con etanol (3 vol) y se secan en vacío a 40^oC. El sólido crudo seco se carga en un reactor, y se añade diclorometano (5 vol). La fase de diclorometano se lava secuencialmente con 2*M* NaOH acuoso (3 vol), agua (3 vol), 5% p/p HCl acuoso (3 vol) y agua (3 vol). El extracto de diclorometano se transfiere a un evaporador giratorio y el disolvente se intercambia con *n*-heptano bajo presión reducida para proporcionar una suspensión de sólidos móvil y un volumen final de aproximadamente 11 vol. El producto se aísla por filtración, se lava con heptano (3 vol) y se seca en vacío a 40^oC.

Etapas c): Preparación de (3S)-3-fluoro-3-(hidroximetil)-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo

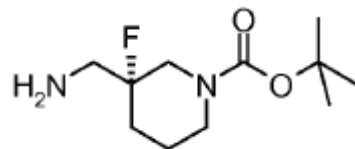
Se suspende (3S)-3-fluoro-2-oxo-3-piperidinacarboxilato de (1S,2R,5S)-5-metil-2-(1-metiletil)ciclohexilo (1 eq, 1 peso) en THF anhidro (6 vol) y se trata con complejo borano sulfuro de dimetilo (6 eq, 1,9 vol). La disolución resultante se agita a 63-66°C durante 40-46 h. La mezcla de reacción se enfría hasta 0±5°C y se añade lentamente a metanol frío (0±5°C) (3 vol) durante 30-90 min, manteniendo la temperatura interna por debajo de 15°C. Se observa evolución de gas vigorosa y espumación. Se añade ácido clorhídrico 2M (4 vol) durante 10-15 min, manteniendo la temperatura interna por debajo de 15°C. La mezcla se agita a reflujo (60-65°C) durante 30-90 min y se enfría hasta 20-25°C. Se añade tolueno (4 vol), la mezcla se agita durante 15 min y se filtra. El filtrado se separa y la fase acuosa ácida inferior se retira. La torta del filtro se lava con 2M ácido clorhídrico (2 vol) y el lavado se usa durante una segunda extracción de la fase de tolueno. La fase acuosa ácida inferior se retira, se combina con la primera acuosa ácida y se enfría hasta 5±5°C. La disolución se trata con hidróxido de sodio (5 eq, 0,668 peso) y se agita a 10-20°C, hasta que el sólido se disuelve. Se añade una disolución de di-*tert*-butil-dicarbonato (1,1 eq, 0,802 peso) en diclorometano (2 vol) y se lava con más diclorometano (2 vol). La mezcla de dos fases se agita vigorosamente durante 15 h, se filtra y la torta del filtro se lava con diclorometano (2 vol). La fase orgánica inferior se retira. La torta del filtro se lava con diclorometano (2 vol) y este lavado se usa para extraer la fase acuosa. Los extractos de diclorometano se lavan con agua (4 vol) y se concentran en vacío. El aceite residual se seca en el Buchi a 40°C. Se añade heptano (4 vol) y la mezcla se concentra en vacío. Hacia el final de la evaporación la mezcla se siembra con el compuesto del título (0,001 peso), la suspensión de sólidos resultante se concentra hasta un volumen pequeño y se diluye con heptano (4 vol). La suspensión de sólidos se rota en Buchi a 40°C durante 20-36 min, se enfría y se rota a 20±5°C durante 1 h. El sólido se recoge bajo succión, se lava con heptano (2×1 vol) y se seca en vacío a 35±5°C.

Etapas d): Preparación de (3S)-3-fluoro-3-(((trifluorometil)sulfonil)oxi)metil)-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo

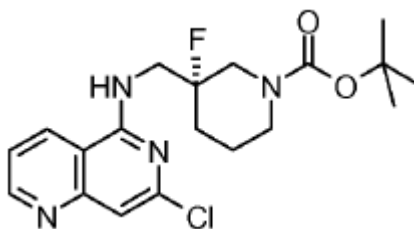
Se disuelve (3S)-3-fluoro-3-(hidroximetil)-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo (1 peso) en piridina (3 vol) a 20°C bajo una atmósfera de nitrógeno. La disolución resultante se enfría hasta -10°C, se añade anhídrido triflico (0,80 vol) a una velocidad tal que se mantiene la temperatura interna por debajo de 5°C. La mezcla de reacción se agita a -10°C durante 4 h, se monitoriza para la finalización por TLC. El lote se calienta hasta 0°C, se añade acetato de isopropilo (8 vol), seguido de una disolución de ácido cítrico acuoso (5,8 peso ácido cítrico en 5,8 vol de agua). La mezcla se agita a 20°C durante 15 min, se separan las capas. La capa orgánica se lava secuencialmente a 20°C con otra disolución de ácido cítrico acuosa (5,8 peso ácido cítrico en 5,8 vol de agua), seguido de disolución de bicarbonato de sodio acuosa (0,35 peso NaHCO₃ en agua 4,65 vol) y agua (5 vol). La fase orgánica se evapora a sequedad en un evaporador giratorio para proporcionar el compuesto del título como un aceite naranja.

Etapas e): Preparación de (3S)-3-(azidometil)-3-fluoro-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo

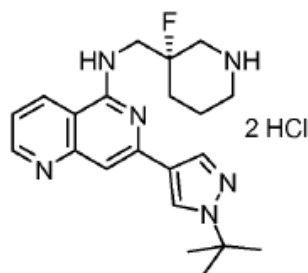
Se disuelve (3S)-3-fluoro-3-(((trifluorometil)sulfonil)oxi)metil)-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo (1 peso) en *N,N*-dimetilformamida (3 vol) a 20°C y se añade azida de sodio (1,1 eq, 0,20 peso). La suspensión resultante se agita a 20-30°C durante 6 h. Se añaden TBME (5 vol) y agua (9 vol). La mezcla se agita durante 5 min y las capas se separan. La fase acuosa se extrae con TBME (5 vol) y las fases de TBME se combinan. Los orgánicos combinados se lavan con agua (2×5 vol), se filtran y se concentran bajo presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un aceite naranja.

Etapas f): Preparación de (3R)-3-(aminometil)-3-fluoro-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo

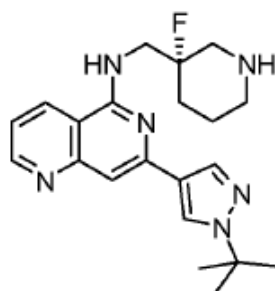
El recipiente de hidrogenación se purga con nitrógeno. Se disuelve (3S)-3-(azidometil)-3-fluoro-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo (1 peso) en THF (11 vol) y se carga en el recipiente, lavando con THF (2 vol).
 5 Se añade disolución concentrada de amoníaco acuoso (~33% peso disolución, 2 vol), seguido de 10% platino sobre carbón (tipo Johnson Matthey 128; ~50% húmedo, 8,3% peso). El recipiente se evacúa y se purga con nitrógeno 3 veces. El recipiente de reacción se purga con hidrógeno, empieza la agitación y la hidrogenación se lleva a cabo a presión atmosférica manteniendo una temperatura interna de 20°C durante 38,5 h (reacción completa por LCMS). El recipiente se evacúa y se purga con nitrógeno tres veces, y los contenidos se pasan a través de un filtro CUNO Zetacarbon (R55SP). El recipiente se lava con THF (3 vol) y esto se pasa a través del filtro usado previamente. Los orgánicos combinados se concentran a sequedad en el evaporador giratorio.

Etapas g): Preparación de (3R)-3-[[7-cloro-1,6-naftiridin-5-il)amino]metil]-3-fluoro-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo

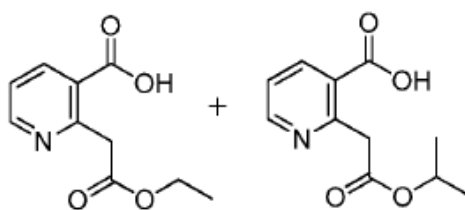
Una mezcla de 5,7-dicloro-1,6-naftiridina (1 eq, 1 peso), (3R)-3-(aminometil)-3-fluoro-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo (1,1 eq, 1,28 peso), y diisopropiletilamina (2 eq, 1,75 vol) en NMP (6 vol) se agita a 110±5°C durante 17 h. La disolución se enfría hasta 70-75°C y se añade agua (6 vol) durante 47 min a 65-75°C. La mezcla se envejece a 65-75°C durante 50 min, se enfría hasta 45°C para proporcionar una suspensión de sólidos. La mezcla se enfría lentamente hasta 20-25°C y se envejece durante 2,25 h. El sólido se recoge bajo succión. La torta del filtro se lava con 1:2 v/v NMP/agua (2 vol) después agua (2×4 vol) y se seca en vacío a 40±5°C. Como el sólido todavía contiene NMP significativo (16,2% p/p) se vuelve a suspender en 1:1 v/v NMP/agua (7,3 vol). La suspensión de sólidos se calienta hasta 65°C y se agita a 65-66°C durante 1 h. La suspensión de sólidos se enfría hasta 20-25°C y se envejece durante 3 días. El sólido se recoge bajo succión. La torta del filtro se lava con 1:2 v/v NMP/agua (2 vol) después agua (2×4 vol) y se seca en vacío a 40±5°C.

Etapas h) e i): Preparación de dihidrocloruro de 7-[1-(1,1-dimetiletil)-1H-pirazol-4-yl]-N-[[3S)-3-fluoro-3-piperidinil]metil]-1,6-naftiridin-5-amina (Sal hidrocloreto del Ejemplo 2)

Se disuelven/suspenden (3R)-3-[[7-cloro-1,6-naftiridin-5-il)amino]metil]-3-fluoro-1-piperidinacarboxilato de 1,1-dimetiletilo (1 peso), 1-(1,1-dimetiletil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (0,76 peso), bicarbonato de sodio (0,64 peso) y dicloruro de 1,1'-bis(di-*terc*-butilfosfino)ferroceno paladio (0,00825 peso) en 1,4-dioxano (8 vol) y agua (2 vol). La mezcla se calienta a reflujo y se agita durante 3 h. La mezcla se enfría hasta 20±3°C para formar una suspensión. El sólido se elimina por filtración en vacío. El filtrado se concentra hasta 2 vol mediante destilación en vacío. Se añade tolueno (10 vol). La disolución se lava con agua (5 vol) se agita con gel de sílice Silicycle derivatizada con Si-Tiol (1 peso) a 60-65°C durante 2 h. La mezcla se filtra a 60-65°C y la torta se lava con tolueno (2 vol). El filtrado orgánico se calienta hasta 60-63°C y se añade cloruro de hidrógeno 4M en 1,4-dioxano (2,9 vol) durante 30 min. La mezcla se agita a 60-63°C durante 5 h. La suspensión de sólidos resultante se enfría hasta 20±3°C y se envejece durante 15,5 h. El sólido se retira por filtración bajo succión y se lava con tolueno (2×2 vol). El producto se seca en vacío a 40±3°C hasta temperatura de sonda constante.

Etapa j): Preparación de 7-[1-(1,1-dimetiletil)-1H-pirazol-4-il]-N-[[3-(3S)-3-fluoro-3-piperidinil]metil]-1,6-naftiridin-5-amina (Ejemplo 2)

5 Se disuelve/suspende dihidrocloruro de 7-[1-(1,1-dimetiletil)-1H-pirazol-4-il]-N-[[3-(3S)-3-fluoro-3-piperidinil]metil]-1,6-naftiridin-5-amina (1 peso) en agua (10 vol) y se lava con acetato de etilo (2×5 vol). La fase acuosa ácida se basicifica con 32% NaOH (0,6 vol) hasta pH 10 y se extrae con acetato de etilo (2×5 vol). Los extractos se lavan con 5% p/v cloruro de sodio en agua (5 vol). Los extractos combinados se concentran en el Buchi hasta un sólido. El residuo se suspende en acetato de n-butilo (2,8 vol) y se calienta hasta 73-78°C hasta la disolución completa. La disolución se filtra en línea a través de un filtro de 5 µM domnick hunter, con un lavado en línea de 0,2 vol. La disolución se enfría hasta 45-50°C y se siembra con el compuesto del título (0,001 peso). La mezcla se enfría hasta 40-45°C y se envejece durante 50 min. La suspensión de sólidos se diluye con TBME (3 vol) durante 30 min a 40-45°C y se envejece a 40-45°C durante 1 h. La suspensión de sólidos se enfría hasta 20-23°C y se envejece durante 16 h. El sólido se filtra, se lava con 1:1 v/v acetato de n-butilo/TBME (1 vol) seguido de TBME (2×2 vol) y se seca en vacío a 40±5°C hasta temperatura de sonda constante.

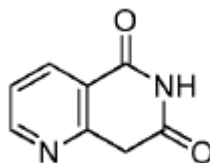
15 Descripción del proceso para el Esquema 7**Etapa a): Preparación de ácido 2-(2-etoxi-2-oxoetil)nicotínico y ácido 2-(2-isopropoxi-2-oxoetil)nicotínico**

proporción ~2:1

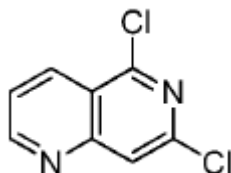
20 El reactor se carga con *tert*-butóxido de potasio (3 eq) seguido de iso-propanol (9 vol) bajo atmósfera de nitrógeno a 30±5°C. La mezcla se agita para disolver. Después de enfriar hasta ~30°C, se añade lentamente acetoacetato de etilo (2 eq) bajo atmósfera de nitrógeno a <40°C. Después de agitar durante 1-2 h se carga acetato de cobre (0,1 eq) a 35±5°C, seguido de ácido 2-cloronicotínico (1 eq). Esto se sigue de un lavado de isopropil alcohol (1 vol). La mezcla de reacción se calienta hasta 78±3°C bajo atmósfera de nitrógeno durante al menos 4 h y se muestrea. Tras obtener un resultado de una muestra exitosa, la reacción se enfría hasta 30±5°C y se para con agua, seguido de HCl diluido para ajustar el pH hasta 6-7.

25 La mezcla de reacción se concentra por destilación en vacío a <50°C hasta 4-5 volúmenes. Se añade disolución al 10% de NaCl seguido de acetato de etilo. Se añade más HCl diluido para ajustar el pH hasta 2,5-3,0. La mezcla bifásica se filtra a través de un lecho de celite y la torta se lava con acetato de etilo (dos veces). Las capas de acetato de etilo y acuosa se separan y la capa acuosa se extrae de nuevo con acetato de etilo (dos veces). La fase de acetato de etilo se lava con agua y disolución ac. al 5% de NaCl. La fase orgánica se destila hasta 1-2 volúmenes en vacío a <50°C. Se añade tolueno y la mezcla se destila de nuevo hasta 1-2 volúmenes. Esta etapa de adición de tolueno/destilación se repite. La suspensión de tolueno resultante se enfría hasta 30±5°C y se trata con hexano (10 vol). La suspensión se agita durante 1-2 h a 30±5°C y se filtra. El sólido se lava con hexano (2 vol) se descarga y se seca a 52,5±2,5°C en vacío (NLT 650 mm de Hg) durante 10 h.

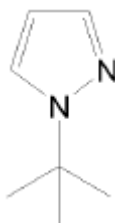
30

Etapas b) y c): Preparación de 1,6-naftiridin-5,7(6H,8H)-diona

5 Se carga tetrahidrofurano (9 vol) en el reactor seguido del éster de material de partida (1 eq) y un lavado de tetrahidrofurano (1 vol). La mezcla se enfría hasta $-2,5\pm 7,5^{\circ}\text{C}$ bajo atmósfera de nitrógeno y se trata con trietilamina (1,35 eq) y posteriormente cloroformato de etilo (1,25 eq). La reacción se agita durante 1 h a $-2,5\pm 7,5^{\circ}\text{C}$ y se muestrea. Tras obtener un resultado exitoso, la reacción se trata cuidadosamente con amoniaco ac., se agita y después se añade agua. Se añade HCl diluido a $<5^{\circ}\text{C}$ para ajustar el pH hasta 6,5-7,5. La mezcla se destila en vacío a $<40^{\circ}\text{C}$ hasta 12-14 volúmenes y se enfría hasta $7,5\pm 2,5^{\circ}\text{C}$. La suspensión se agita ~ 1 h a $7,5\pm 2,5^{\circ}\text{C}$ y se filtra. El sólido se lava con agua (1 vol), se descarga y se seca en vacío (NLT 650 mm de Hg) a $52,5\pm 2,5^{\circ}\text{C}$ durante 12,0 h.

10 Etapas d) y e): Preparación de 5,7-Dicloro-1,6-naftiridina

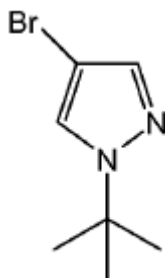
15 Se carga oxiclورو de fósforo (3 vol) en el reactor a $30\pm 5^{\circ}\text{C}$ seguido de 1,6-naftiridin-5,7(6H,8H)-diona (1 eq), cloruro de tetrametilamonio (1,05 eq) y un lavado de oxiclورو de fósforo (0,5 vol). La mezcla se calienta hasta $103,5\pm 3,5^{\circ}\text{C}$ y se agita durante un mínimo de 36 h. La reacción se enfría hasta $60\pm 5^{\circ}\text{C}$ y se muestrea. Tras obtener una muestra exitosa, se añade tolueno (4 vol) y la mezcla se concentra hasta 2-3 volúmenes por destilación en vacío (NLT 650 mm de Hg) y temperatura $<60^{\circ}\text{C}$. Se añade tolueno adicional (2 vol) y de nuevo la mezcla se destila en vacío hasta 2-3 vols. Este ciclo de adición de tolueno/destilación se repite una vez más, la mezcla se enfría hasta $47,5\pm 2,5^{\circ}\text{C}$ y se trata con tetrahidrofurano (8 vol) y acetato de etilo (8 vol). La mezcla se enfría hasta $30\pm 5^{\circ}\text{C}$ y se vierte en carbonato de sodio ac. al 15% (15 vol) que se ha pre-enfriado hasta $5,0\pm 5,0^{\circ}\text{C}$. Se añade tetrahidrofurano adicional (3 vol) junto con acetato de etilo (3 vol) con el fin de lavar el recipiente de reacción inicial. Todavía a $5\pm 5^{\circ}\text{C}$, la mezcla se trata lentamente con disolución de carbonato de sodio acuosa al 15% adicional (5 vol) y se agita durante 15-30 min. La temperatura se incrementa hasta $22,5\pm 2,5^{\circ}\text{C}$ y el pH se ajusta hasta 7-8 por la adición bien de disolución de carbonato de sodio acuosa al 15% o HCl diluido. Se añade acetato de etilo (5 vol) seguido de celite. La mezcla se agita y se filtra. El lecho de celite se lava con acetato de etilo (2x2 vol). El filtrado se destila a $<55^{\circ}\text{C}$ en vacío (NLT 650 mm de Hg) hasta 30 ± 5 volúmenes. Se añade agua (2 vol) y se destila de nuevo hasta ~ 30 vols. Este ciclo de adición de agua/destilación se repite hasta que el contenido de tetrahidrofurano, tolueno y acetato de etilo es cada uno NMT 3,0% por GC (% p/p). En este punto, se añade agua (10 vol) y la mezcla se calienta hasta $42,5\pm 2,5^{\circ}\text{C}$ y se agita durante 30-60 min. El producto se aísla por filtración a $42,5\pm 2,5^{\circ}\text{C}$ y se lava con agua (2x3 vol). La torta se seca por succión, se descarga y se carga en un reactor separado. Se añade agua (20 vol) y la suspensión se calienta hasta $42,5\pm 2,5^{\circ}\text{C}$ y se agita durante 30-60 min a $42,5\pm 2,5^{\circ}\text{C}$. El producto se filtra y se lava con agua (2x3 vol), se seca por succión, se transfiere a un horno de vacío y se seca adicionalmente a $52,5\pm 2,5^{\circ}\text{C}$ en vacío (NLT 650 mm de Hg) durante 8 ± 2 h.

Descripción del proceso para el Esquema 8**Etapas a): Preparación de 1-(1,1-Dimetiletil)-1H-pirazol (Intermedio 9)**

35 A una mezcla de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (3,82 kg, 23,27 moles) e hidrocloreuro de *tert*-butilhidrazina (2,9 kg, 23,27 moles) en etanol (24,54 kg), se añade HCl conc. (4,72 kg, 46,55 moles), manteniendo la temperatura por debajo de 50°C . La mezcla de reacción se calentó rápidamente a reflujo. Después de aproximadamente 2 h la reacción se muestreó y se analizó por RMN. Los criterios de paso fueron $<3,0\%$ de material de partida remanente.

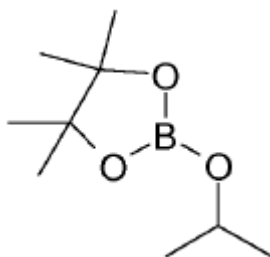
- Tras obtener un resultado de paso la disolución se enfría, se diluye con agua (8,29 kg) y se evapora en vacío ($T < 50^{\circ}\text{C}$, $p < -0,08$ MPa) hasta que aproximadamente todo el etanol original se eliminó. La disolución se basificó con 10M NaOH(ac), se extrajo con EtOAc (11,11 kg \times 2) y la fase orgánica se lavó con disolución saturada de cloruro de amonio (4,3 ml/g \times 2) y disolución salina concentrada (4,3 ml/g), y se evaporó para proporcionar el compuesto del título (2,08 kg, rendimiento 72%) como un líquido marrón (pureza por GC 99,70% a/a).

Etapa b): Preparación de 4-Bromo-1-(1,1-dimetiletil)-1H-pirazol (Intermedio 10)



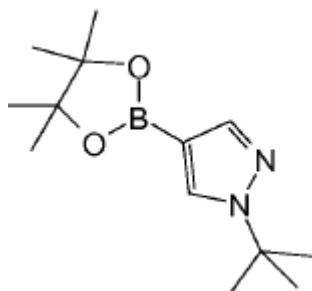
- A disolución enfriada en hielo (0°C a 10°C) de 1-(*terc*-butil)pirazol (1,75 kg, 14,09 moles) en diclorometano (12,9 kg) se añadió NBS (2,63 kg, 14,79 moles) por partes. La disolución se agitó a 0°C hasta que el contenido de 1-(*terc*-butil)pirazol $< 30\%$ (GC), se calentó hasta RT y se agitó hasta que la muestra tomada muestra $< 1,0\%$ por GC. Tras obtener el resultado de paso, se añadió bisulfito de sodio acuoso al 10% a la mezcla de reacción hasta que el KI-almidón no se volvía azul. La fase orgánica se lavó con disolución de NaCl al 5% y disolución salina concentrada en secuencia, y se evaporó para proporcionar el compuesto del título como un líquido marrón (2,67 kg, rendimiento 93,4%; pureza por GC 99,1% a/a).

Etapa c): Preparación de *iso*-Propil pinacol borato



- A una botella de cuatro bocas de 20 L se añadieron borato de tri-isopropilo (261,0 g, 1,388 moles) y pinacol (142,5 g, 1,207 moles) y se calentó hasta $\sim 90^{\circ}\text{C}$ durante 12-16 h. El criterio para la finalización de la reacción es pinacol $< 4,0\%$ por GC. Después de la finalización, la reacción se convirtió a destilación, y se recogieron las fracciones del producto (hirviendo a $174-178^{\circ}\text{C}$). Así, el producto del título se obtuvo como un aceite incoloro en un intervalo de rendimiento de 80-90% en los seis lotes de 20 L que se operaron. GC registra una pureza de 87-96%, pero ^1H RMN muestra que el producto es muy puro. [discrepancia debida a la inestabilidad del producto en las condiciones de GC].

Etapa d): Preparación de 1-(1,1-Dimetiletil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (Intermedio 11)

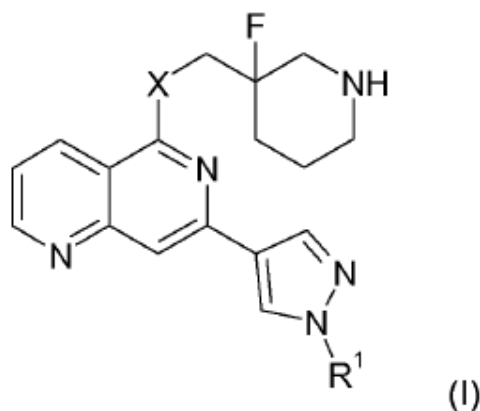


A una botella de cuatro bocas de 20 L se añadieron 4-bromo-(*terc*-butil)pirazol (1,15 kg, 5,66 moles) y THF (9,2 L), la mezcla se enfrió hasta entre -78°C y -85°C y se trató con nBuLi (6,23 moles) gota a gota a esa temperatura. Después de la adición, la disolución se agitó a la misma temperatura durante 1 h y se añadió gota a gota *iso*propil

5 pinacol borato (1,47 kg, 7,92 moles). La reacción se completó después de agitar durante ~3 h (material de partida <1,0% a/a por GC), se añadió agua (2,3 L) para parar la reacción; y el pH se ajustó hasta 8-9 por la adición de 3,45 kg de 1M HCl. La fase acuosa se extrajo con TBME (3,45 L×2), y la fase orgánica combinada se lavó con 5% NaCl (3,45 L×2) y agua (3,45 L) en secuencia. La fase orgánica se evaporó para proporcionar el producto crudo. Después de recristalización posterior de heptanos el producto puro se obtuvo como un sólido blanco (pureza por GC 99,7% a/a) con un rendimiento global del 63,5%. (Se corrieron dos reacciones de 20 L, después se combinaron en la recristalización de heptano).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):



en la que:

5 X es O o NH;

R¹ es alquilo C₂₋₄, cicloalquiloC₃₋₇, hidroxialquiloC₂₋₄, alcoxiC₁₋₂alquiloC₁₋₄, trifluorometilalquiloC₁₋₂ o bencilo; o una sal de éste.

2. Un compuesto o sal de éste según la reivindicación 1 en el que X es NH.

10 3. Un compuesto o sal de éste según la reivindicación 1 ó 2 en el que R¹ es alquilo C₂₋₄, cicloalquiloC₃₋₇ o alcoxiC₁₋₂alquiloC₁₋₄.

4. Un compuesto o sal de éste según la reivindicación 1 en el que R¹ es etilo, *t*-butilo, -CH₂OCH₃, -CH₂C(CH₃)₂OH, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂OCH₃, -CH(CH₃)₂, -CH₂CF₃, bencilo o ciclopentilo.

5. Un compuesto o sal de éste según la reivindicación 4 en el que R¹ es *t*-butilo.

6. Un compuesto o sal de éste según la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en:

15 7-(1-etil-1*H*-pirazol-4-il)-*N*-{[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}-1,6-naftiridin-5-amina;

7-[1-(1,1-dimetiletil)-1*H*-pirazol-4-il]-*N*-{[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}-1,6-naftiridin-5-amina;

N-{[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}-7-[1-(metiloxi)metil]-1*H*-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-amina;

7-(1-etil-1*H*-pirazol-4-il)-5-({[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}oxi)-1,6-naftiridina;

1-{4-[5-({[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}amino)-1,6-naftiridin-7-il]-1*H*-pirazol-1-il]-2-metil-2-propanol};

20 2-{4-[5-({[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}amino)-1,6-naftiridin-7-il]-1*H*-pirazol-1-il}etanol;

N-{[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}-7-[1-[2-(metiloxi)etil]-1*H*-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-amina;

7-(1-ciclopentil-1*H*-pirazol-4-il)-*N*-[(3-fluoro-3-piperidinil)metil]-1,6-naftiridin-5-amina;

N-[(3-fluoro-3-piperidinil)metil]-7-[1-(2,2,2-trifluoroetil)-1*H*-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-amina;

N-{[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}-7-[1-(2,2,2-trifluoroetil)-1*H*-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-amina;

25 *N*-{[(3*R*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}-7-[1-(2,2,2-trifluoroetil)-1*H*-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-amina;

N-[(3-fluoro-3-piperidinil)metil]-7-[1-(fenilmetil)-1*H*-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-amina;

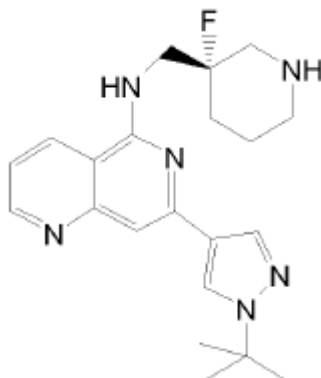
N-{[(3-fluoro-3-piperidinil]metil}-7-[1-(1-metiletil)-1*H*-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-amina;

N-{[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}-7-[1-(1-metiletil)-1*H*-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-amina; y

N-{[(3*R*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}-7-[1-(1-metiletil)-1*H*-pirazol-4-il]-1,6-naftiridin-5-amina; y

30 sales de éstos.

7. Un compuesto según la reivindicación 1 que es 7-[1-(1,1-dimetiletil)-1*H*-pirazol-4-il]-*N*-{[(3*S*)-3-fluoro-3-piperidinil]metil}-1,6-naftiridin-5-amina



o una sal de éste.

- 5 8. Un compuesto o sal de éste según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la sal es una sal farmacéuticamente aceptable.
9. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, como se define en la reivindicación 8, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 10 10. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, como se define en la reivindicación 8, para uso en terapia.
11. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de éste como se define en la reivindicación 8, para uso en el tratamiento de una afección autoinmune.
12. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de éste para uso según la reivindicación 11, en el que la afección autoinmune es artritis reumatoide.
- 15 13. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de éste como se define en la reivindicación 8, para uso en el tratamiento de urticaria espontánea crónica.
14. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de éste como se define en la reivindicación 8, para uso en el tratamiento de cáncer.
- 20 15. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de éste para uso según la reivindicación 14, en el que el cáncer se selecciona de malignidades hemo, particularmente Linfomas No Hodgkin incluyendo folicular (FL), de células del manto, linfoma linfocítico pequeño/linfoma linfocítico crónico (SLL/CLL), linfomas de Burkitt y difuso de células B grandes (DLBCL).
16. El uso de un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de éste como se define en la reivindicación 8, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección autoinmune.
- 25 17. El uso de un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de éste como se define en la reivindicación 8, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.
18. El uso de un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de éste como se define en la reivindicación 8, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria y/o trastorno alérgico.