

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: 2 557 930

51 Int. Cl.:

C07D 413/12 (2006.01) A61K 31/505 C07D 403/12 (2006.01) A61K 31/5377 (2006.01) C07D 239/42 (2006.01) A61P 3/00 (2006.01) C07D 413/14 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01) C07D 401/12 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01) C07D 417/12 (2006.01) **A61P 9/00** (2006.01) C07D 401/14 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01) A61K 31/444 (2006.01) A61K 31/506 (2006.01)

(2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

A61K 31/541

T3

- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 12.03.2008 E 08714386 (3) (97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: 11.11.2015 EP 2152701
- (54) Título: Compuestos de fenilaminopirimidina y usos de los mismos
- (30) Prioridad:

12.03.2007 US 894264 P 21.12.2007 US 16252

45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 29.01.2016

(73) Titular/es:

YM BIOSCIENCES AUSTRALIA PTY LTD (100.0%) 2ND FLOOR-499 ST. KILDA ROAD MELBOURNE, VICTORIA 3004, AU

(72) Inventor/es:

BURNS, CHRISTOPHER JOHN; DONOHUE, ANDREW CRAIG; FEUTRILL, JOHN THOMAS; NGUYEN, THAO LIEN THI; WILKS, ANDREW FREDERICK y ZENG, JUN

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos de fenilaminopirimidina y usos de los mismos

5 Campo

La presente invención se refiere a compuestos de fenilaminopirimidina que son inhibidores de proteína-cinasas, incluyendo las cinasas JAK. En particular, los compuestos son selectivos para las cinasas JAK2. Los inhibidores de cinasas pueden utilizarse en el tratamiento de enfermedades asociadas a las cinasas tales como enfermedades inmunitarias e inflamatorias, incluyendo los trasplantes de órganos; enfermedades hiperproliferativas, incluyendo el cáncer y las enfermedades mieloproliferativas; enfermedades virales; enfermedades metabólicas y enfermedades vasculares.

Antecedentes

15

10

Las JAK son cinasas que fosforilan un grupo de proteínas llamado Transductores de Señales y Activadores de Transcripción o STAT. Cuando están fosforilados, los STAT se dimerizan, se trasladan al núcleo y activan la expresión de genes que conducen a, entre otras cosas, la proliferación celular.

El papel central que desempeña la familia de proteína-tirosina-cinasas JAK en la regulación dependiente de citocinas tanto de la proliferación como de la función final de varios tipos celulares importantes, indica que los agentes capaces de inhibir las cinasas JAK son útiles en la prevención y el tratamiento quimioterápico de patologías dependientes de estas enzimas. Los inhibidores potentes y específicos de cada uno de los cuatro miembros de la familia JAK conocidos actualmente proporcionarán un medio para inhibir la acción de las citocinas que provocan enfermedades inmunitarias e inflamatorias.

Los trastornos mieloproliferativos (TMP) incluyen, entre otros, la policitemia vera (PV), la mielofibrosis primaria, la trombocitopenia, la trombocitemia esencial (TE), la mielofibrosis idiopática (MFI), la leucemia mielógena crónica (LMC), la mastocitosis sistémica (MS), la leucemia neutrofílica crónica (LNC), el síndrome mielodisplásico (SMD) y la enfermedad mastocitaria sistémica (EMS). La JAK2 es un miembro de la familia de cinasas JAK en la que se ha descubierto una mutación específica (JAK2V617F) en el 99 % de los enfermos de policitemia vera (PV) y en el 50 % de las trombocitopenias esenciales (TE) y las mielofibrosis idiopáticas (MF). Se piensa que esta mutación activa la JAK2, dando peso a la propuesta de que un inhibidor de la JAK2 será útil en el tratamiento de estos tipos de enfermedades.

35

40

45

50

65

crónica y el enfisema.

30

El asma es un trastorno complejo que se caracteriza por la inflamación alérgica local y sistémica y la obstrucción reversible de las vías respiratorias. Los síntomas del asma, especialmente la falta de aliento, son una consecuencia de la obstrucción de las vías respiratorias y la muerte es casi invariablemente debido a la asfixia. La hiperreactividad de las vías respiratorias (HRVR) y la hipersecreción de moco por células caliciformes son dos de las principales causas de la obstrucción de las vías respiratorias en los enfermos de asma. Trabajos recientes interesantes en modelos animales experimentales de asma han subrayado la importancia de la IL-13 como un protagonista clave en la patología del asma. Mediante el uso de un bloqueante específico de la IL-13, se ha demostrado que la IL-13 actúa independientemente de la IL-4 y puede ser capaz de inducir todo el fenotipo del asma alérgica, sin la inducción de la IgE (es decir, de una manera no atópica). Este y otros modelos han señalado un importante segundo mecanismo en niveles para inducir la fisiopatología del asma, que no depende de la producción de IgE por las células B residentes o la presencia de eosinófilos. Una inducción directa de HRVR por la IL-13, representa un proceso importante que es probable que sea un objetivo excelente para la intervención mediante nuevas terapias. Un efecto contemplado de un inhibidor de la JAK2 sobre los pulmones daría como resultado la supresión de la liberación local de la producción de IgE mediada por la IL-13 y, por tanto, la reducción de la liberación de histamina por los mastocitos y los eosinófilos. Esta y otras consecuencias de la ausencia de IL-13 indican que muchos de los efectos del asma pueden aliviarse mediante la administración de un inhibidor de la JAK2 a los pulmones.

Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) es una expresión que se refiere a un grupo grande de enfermedades pulmonares que pueden interferir con la respiración normal. Las guías clínicas actuales definen la EPOC como una patología caracterizada por la limitación del flujo aéreo que no es completamente reversible. La limitación del flujo aéreo es generalmente progresiva y se asocia a una respuesta inflamatoria anormal de los pulmones a partículas y gases nocivos, en particular el humo del cigarrillo y la contaminación. Varios estudios han señalado una asociación entre el aumento de la producción de IL-13 y la EPOC, prestando apoyo a la propuesta de que el alivio potencial de los síntomas del asma mediante el uso de un inhibidor de la JAK2, también puede conseguirse en la EPOC. Los enfermos de EPOC tienen diversos síntomas que incluyen la tos, la falta de aliento y la producción excesiva de esputo. La EPOC incluye varios síndromes respiratorios clínicos incluyendo la bronquitis

La bronquitis crónica es una inflamación de los bronquios de larga duración que provoca un aumento de la producción de moco y otros cambios. Los síntomas del paciente son la tos y la expectoración de esputo. La bronquitis crónica puede conducir a infecciones respiratorias más frecuentes y graves, al estrechamiento y

obstrucción de los bronquios, a la respiración dificultosa y a la discapacidad.

20

25

30

35

40

45

50

55

El enfisema es una enfermedad pulmonar crónica que afecta a los alvéolos y/o a los extremos de los bronquios más pequeños. El pulmón pierde su elasticidad y, por tanto, estas áreas de los pulmones se agrandan. Estas áreas agrandadas atrapan el aire viciado y no lo intercambian eficazmente por aire fresco. Esto da como resultado una respiración dificultosa y puede dar como resultado que no se libere suficiente oxígeno a la sangre. El síntoma predominante en los pacientes que padecen enfisema es la falta de aliento.

Además, existen indicios de la activación de los STAT en los tumores malignos, entre ellos, el cáncer de pulmón, mama, colon, ovario, próstata e hígado, así como en el linfoma de Hodgkins, el mieloma múltiple y el carcinoma hepatocelular. Se han descrito translocaciones cromosómicas que implican fusiones de la JAK2 con Tel, Bcr y PCM1 en varias neoplasias hemáticas incluyendo la leucemia mielógena crónica (LMC), la leucemia mielógena aguda (LMA), la leucemia eosinofílica crónica (LEC), el síndrome mielodisplásico (SMD), la enfermedad mieloproliferativa (EMP) y la leucemia linfocítica aguda (LLA). Esto sugiere que está indicado el tratamiento de trastornos hiperproliferativos tales como cánceres, incluyendo el mieloma múltiple; cáncer de próstata, de mama y de pulmón; Linfoma de Hodgkin; LMC; LMA; LEC; SMD; LLA; Leucemia Linfocítica Crónica de Células B; melanoma metastásico; glioma y hepatoma, mediante inhibidores de las JAK.

Los inhibidores potentes de la JAK2, además de lo anterior, también serán útiles en las enfermedades vasculares tales como la hipertensión, la hipertrofia, la isquemia cardíaca, la insuficiencia cardíaca (incluyendo la insuficiencia cardíaca sistólica y la insuficiencia cardíaca diastólica), la migraña y los trastornos cerebrovasculares relacionados, el ictus, el fenómeno de Raynaud, el síndrome POEMS, la angina de Prinzmetal, la vasculitis, tal como la arteritis de Takayasu y la granulomatosis de Wegener, la arteriopatía periférica, la cardiopatía y la hipertensión arterial pulmonar.

La hipertensión arterial pulmonar (HAP) es una enfermedad vascular pulmonar que afecta a las arteriolas pulmonares que da como resultado una elevación en la presión arterial pulmonar y la resistencia vascular pulmonar, pero con presiones de llenado del lado izquierdo normales o solo ligeramente elevados. La HAP está causada por un conjunto de enfermedades que afectan a la vasculatura pulmonar. La HAP puede estar causada por o estar asociada a trastornos vasculares del colágeno, tales como la esclerosis sistémica (esclerodermia), la cardiopatía congénita sin corregir, la hepatopatía, la hipertensión portal, la infección por VIH, la hepatitis C, ciertas toxinas, la esplenectomía, la telangiectasia hemorrágica hereditaria y las anomalías genéticas primarias. En particular, una mutación en el receptor de tipo 2 de la proteína morfogénica ósea (un receptor del TGF-b) se ha identificado como una causa de la hipertensión pulmonar primaria familiar (HPP). Se estima que el 6 % de los casos de HPP son familiares y que el resto son "esporádicos". Se estima que la incidencia de la HPP es de aproximadamente 1 caso por cada 1 millón de habitantes. Las causas secundarias de la HAP tienen una incidencia mucho más alta. La firma patológica de la HAP es la lesión plexiforme del pulmón que consiste en la proliferación obliterante de células endoteliales y la hipertrofia de las células del músculo liso vascular en las pequeñas arteriolas pulmonares precapilares. La HAP es una enfermedad progresiva asociada a una alta mortalidad. Los pacientes que padecen HAP pueden desarrollar insuficiencia ventricular derecha (VD). El grado de insuficiencia VD predice el resultado. Recientemente se ha implicado a la vía JAK/STAT en la fisiopatología de la HAP. Las JAK son cinasas que fosforilan un grupo de proteínas llamado Transductores de Señales y Activadores de Transcripción o STAT. Cuando están fosforilados, los STAT se dimerizan, se trasladan al núcleo y activan la expresión de genes que conducen a la proliferación de las células endoteliales y las células musculares lisas y causan la hipertrofia de los miocitos cardíacos. Existen tres isoformas diferentes de JAK: JAK1, JAK2 y JAK3. Otra proteína con alta homología con las JAK se denomina Tyk2. Un conjunto de datos de reciente aparición ha demostrado que la fosforilación del STAT3, un sustrato para la JAK2, aumenta en modelos animales de HAP. En el modelo de monocrotalina en ratas, hubo un aumento de la fosforilación del factor de transcripción promitógeno STAT3. En este mismo estudio las células endoteliales arteriales pulmonares (CEAP) tratadas con monocrotalina desarrollaron una hiperactivación del STAT3. Un agente o una proteína promitógenos son un agente o una proteína que inducen o contribuyen a la inducción de la proliferación celular. Por tanto, un efecto de la inhibición de la JAK2 sería disminuir la proliferación de las células endoteliales o de otras células, tales como las células del músculo liso. Un efecto contemplado de un inhibidor de la JAK2 sería disminuir la proliferación de las células endoteliales o de otras células que obstruyan el lumen arteriolar pulmonar. Al disminuir la proliferación obstructiva de las células, un inhibidor de la JAK2 podría ser un tratamiento eficaz de la HAP.

Además, está indicado el uso de inhibidores de las cinasas JAK para el tratamiento de enfermedades virales y enfermedades metabólicas.

Aunque los otros miembros de la familia JAK son expresados por, esencialmente, todos los tejidos, la expresión de la JAK3 parece estar limitada a las células hematopoyéticas. Esto es coherente con su papel esencial en la señalización a través de los receptores para la IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15 por asociación no covalente de la JAK3 con la cadena gamma común a estos receptores multicadena. Los varones que padecen inmunodeficiencia combinada grave ligada al cromosoma X (IDCGX) tienen defectos en el gen de la cadena gamma común de receptores de citocinas (gamma c) que codifica un componente esencial compartido de los receptores de la interleucina-2 (IL-2), IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15. Se ha identificado un síndrome de IDCGX en el que los pacientes con ya

sea niveles gravemente reducidos de la proteína JAK3 o con la proteína mutada, lo que sugiere que la inmunosupresión debería ser resultado del bloqueo de la señalización a través de la vía de la JAK3. Los estudios de inactivación de genes en ratones han sugerido que la JAK3 no solo desempeña un papel crítico en la maduración de los linfocitos B y T, sino que la JAK3 es constitutivamente necesaria para mantener la función de las células T. Tomados en conjunto con los indicios bioquímicos de la participación de la JAK3 en los eventos de señalización corriente abajo del receptor de la IL-2 y la IL-4, estos estudios de mutación humana y de ratón sugieren que la modulación de la actividad inmunitaria a través de la inhibición de la JAK3 podría resultar útil en el tratamiento de los trastornos proliferativos de las células T y de las células B tales como el rechazo de trasplantes y las enfermedades autoinmunes. Por el contrario, la inhibición no deseada de la JAK3 podría tener un efecto devastador sobre el estado inmunitario de un individuo tratado con el fármaco.

Aunque la inhibición de diversos tipos de proteína-cinasas, dirigida a una gama de patologías, es claramente beneficiosa, se ha demostrado hasta la fecha que la identificación de un compuesto que sea selectivo para una proteína-cinasa de interés y tenga buenas propiedades "análogas a las de los fármacos" tales como la alta biodisponibilidad oral, es una meta difícil. Además, está bien establecido que la previsibilidad de la inhibición, o de la selectividad, en el desarrollo de inhibidores de cinasas es bastante baja, independientemente del nivel de similitud de secuencia entre las enzimas a las que se dirigen.

- Los desafíos en el desarrollo de inhibidores de la JAK2 terapéuticamente adecuados para su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas a cinasas tales como enfermedades inmunitarias e inflamatorias, incluyendo el trasplante de órganos; enfermedades hiperproliferativas, incluyendo el cáncer y las enfermedades mieloproliferativas; enfermedades virales; enfermedades metabólicas; y enfermedades vasculares incluye el diseño de un compuesto con una especificidad adecuada que también tenga un buen parecido a un fármaco.
- Existe, por tanto, una continua necesidad de diseñar y/o identificar compuestos que inhiban específicamente la familia de cinasas JAK y particularmente compuestos que puedan inhibir preferentemente una de las cinasas JAK en relación con las otras cinasas JAK, particularmente la JAK2. Existe una necesidad de tales compuestos para el tratamiento de una gama de enfermedades.
- 30 Stuart Emanuel et al. *Molecular Pharmacology*, vol. 66, nº 3 (2004) págs. 635-647 desvela un compuesto inhibidor de cinasas y de tumores. 4-[4-(1-Amino-1-metiletil) fenil]-2-[4-(2-morfolin-4-il-etil)fenilamino]pirimidin-5-carbonitrilo.
 - El documento US 2006/079543 A1 desvela análogos de anilina-pirimidina para su uso como inhibidores de cinasas en el tratamiento de afecciones dependientes de cinasas tales como la inflamación o el cáncer.
- El documento US 2002/147339 A1 desvela inhibidores de cinasas para su uso en la profilaxis y el tratamiento de patologías asociadas a la angiogénesis.
- El documento WO 01/29009 A1 desvela 2-aminopirimidinas 4,5-disustituidas para su uso como inhibidores de cinasas en la profilaxis y el tratamiento de patologías asociadas a la angiogénesis.
 - El documento WO 97/19065 A1 desvela 2-anilinopirimidinas sustituidas para su uso como inhibidores de proteínacinasas en la profilaxis y el tratamiento de enfermedades en las que la acción proteína-tirosina-cinasa inadecuada desempeña un papel.
 - El documento WO 2004/041789 A1 desvela compuestos inhibidores de cinasas para su uso en el tratamiento de trastornos proliferativos, trastornos cardíacos, trastornos neurodegenerativos, trastornos psicóticos, trastornos mediados inmunitariamente, enfermedades virales y trastornos óseos.
- 50 El documento WO 02/46171 A2 desvela derivados de anilinopirimidina para su uso como inhibidores selectivos.
 - El documento WO 2004/041810 A1 desvela compuestos útiles como inhibidores de las JAK para su uso en el tratamiento de trastornos mediados por proteína-cinasas.
- El documento WO 2005/012262 A1 desvela inhibidores de cinasas para el tratamiento de trastornos proliferativos, trastornos virales, trastornos del SNC, un ictus, la alopecia y la diabetes.

Sumario

10

15

35

45

60 Las realizaciones de la presente invención se exponen en las reivindicaciones independientes adjuntas. Las subrealizaciones de la presente invención se exponen en las reivindicaciones dependientes adjuntas. En un primer aspecto, se proporcionan compuestos de fórmula lb:

$$\mathbb{R}^{8}$$
 \mathbb{R}^{1}
 \mathbb{R}^{1}
 \mathbb{R}^{1}
 \mathbb{R}^{1}

en donde

10

15

5 Z se selecciona independientemente entre N y CH;

R¹ se selecciona independientemente entre H, halógeno, OH, CONHR², CON(R²)₂, CF₃, R²OR², CN, morfolino, tiomorfolinilo, 1,1-dióxido de tiomorfolino, piperidinilo sustituido o no sustituido, piperazinilo sustituido o no sustituido, piperazinilo sustituido o no sustituido, piperazinilo sustituido o no sustituido y alquileno C₁-₄ en donde los átomos de carbono están opcionalmente reemplazados por NRY y/u O sustituidos con morfolino, tiomorfolinilo, 1,1-dióxido de tiomorfolino, piperidinilo sustituido o no sustituido, piperazinilo sustituido o no sustituido, imidazolilo o pirrolidinilo sustituido o no sustituido; R² es alquilo C₁-₄ sustituido o no sustituido;

RY es H o alquilo C₁₋₄ sustituido o no sustituido:

R8 es RXCN:

R^X es alquileno C₁₋₄ sustituido o no sustituido en donde hasta 2 átomos de carbono pueden estar opcionalmente reemplazados por CO, NSO₂R¹, NR^y, CONR^y, SO, SO₂ u O; R¹¹ es H o alquilo C₁₋₄,

o un enantiómero de los mismos, un profármaco de los mismos o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

20 En un segundo aspecto, se proporciona un proceso para la preparación del compuesto de fórmula Ib definido anteriormente que comprende la etapa de acoplar un compuesto de fórmula II

25 en donde

R¹¹ es como se ha definido anteriormente y X es cloro que después se convierte en yodo antes del acoplamiento con los compuestos de fórmulas III y IV

$$R^8$$
 NH_2
 IV

30 III

en donde

35

Z, R¹ y R⁸ son como se han definido anteriormente; y M es B o un metal tal como Sn, Zn o Mg.

Los compuestos de fórmula Ib son inhibidores de cinasas, preferentemente inhibidores de las JAK, más preferentemente inhibidores de la JAK2. Estos compuestos son útiles en el tratamiento de enfermedades asociadas

a cinasas tales como enfermedades inmunitarias e inflamatorias, incluyendo los trasplantes de órganos; enfermedades hiperproliferativas, incluyendo el cáncer y las enfermedades mieloproliferativas; enfermedades virales; enfermedades metabólicas y enfermedades vasculares.

5 En un tercer aspecto, se proporciona un agente farmacéutico o metabolitos del mismo que comprenden el compuesto de fórmula lb definido anteriormente.

Además se proporciona el compuesto de fórmula lb definido anteriormente para su uso como un agente farmacéutico o metabolitos del mismo.

10

En un cuarto aspecto, se proporciona un inhibidor de cinasas que comprende el compuesto de fórmula lb definido anteriormente.

Además se proporciona el compuesto de fórmula Ib definido anteriormente para su uso como un inhibidor de cinasas.

En un quinto aspecto, se proporciona un compuesto de fórmula 1b definido anteriormente para su uso como un agente farmacéutico o metabolitos del mismo, preferentemente un inhibidor de cinasas, más preferentemente un inhibidor de cinasas JAK, mucho más preferentemente un inhibidor selectivo de la JAK2.

20

El compuesto de fórmula lb también puede administrarse en forma de una composición farmacéutica junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un sexto aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula lb definido anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la composición farmacéutica comprende además uno o más agentes terapéuticos adicionales.

El compuesto de fórmula lb puede estar contenido dentro de o unido a un implante, tal como un estent liberador de fármacos. Por ejemplo, cuando el compuesto se utiliza para el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar (HAP), el compuesto puede estar contenido dentro de o unido a un estent en la arteria pulmonar, que puede actuar localmente, o liberarse del estent en la circulación pulmonar donde el compuesto ejerce su actividad terapéutica en la vasculatura pulmonar.

35 En un séptimo aspecto, se proporciona un implante que comprende el compuesto de fórmula lb definido anteriormente.

En un octavo aspecto, se proporciona un compuesto de fórmula Ib o una composición farmacéutica definida anteriormente para su uso en un método para el tratamiento de enfermedades asociadas a cinasas tales como enfermedades inmunitarias e inflamatorias, incluyendo los trasplantes de órganos; enfermedades hiperproliferativas, incluyendo el cáncer y las enfermedades mieloproliferativas; enfermedades virales; enfermedades metabólicas y enfermedades vasculares, que comprende administrar una cantidad eficaz del compuesto de fórmula Ib o una composición farmacéutica definida anteriormente a un sujeto que lo necesite.

También se proporciona el uso del compuesto de fórmula Ib o una composición farmacéutica como se ha definido anteriormente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades asociadas a cinasas tales como enfermedades inmunitarias e inflamatorias, incluyendo los trasplantes de órganos; enfermedades hiperproliferativas, incluyendo el cáncer y las enfermedades mieloproliferativas; enfermedades virales; enfermedades metabólicas y enfermedades vasculares.

50

40

Además se proporciona el compuesto de la fórmula Ib o una composición farmacéutica definida anteriormente para su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas a cinasas tales como enfermedades inmunitarias e inflamatorias, incluyendo los trasplantes de órganos; enfermedades hiperproliferativas, incluyendo el cáncer y las enfermedades mieloproliferativas; enfermedades virales; enfermedades metabólicas y enfermedades vasculares.

55

La divulgación también proporciona un método para inhibir una cinasa en una célula que comprende poner en contacto la célula con el compuesto de fórmula lb definido anteriormente.

Breve descripción de las figuras

60

65

La **Figura 1** muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de cinasas JAK seleccionadas. Las secuencias que se muestran son j2h = JAK2 (ID. SEC. Nº 1), jlh = JAK1 (ID. SEC. Nº 2), j3h = JAK3 (ID. SEC. Nº 3) y tyk2 = TYK2 (ID. SEC. Nº 4). Las secuencias se numeran comenzando por la posición 1 en el aminoácido 833 de la secuencia de la JAK2 (tomado de la secuencia de Genbank NP_004963) y termina en el aminoácido C-terminal. Las secuencias que se muestran corresponden al dominio cinasa C-terminal.

La **Figura 2** muestra un análisis de citometría de flujo de la fosforilación del STAT5 en células eritroleucémicas no tratadas (HEL 92.1.7) frente a células que han sido tratadas con el Compuesto 3 0,25, 0,5, 1 o 2 µM o DMSO/STAT5py. Después del tratamiento, las células se tiñeron con anticuerpo monoclonal de ratón anti-STAT5 (Y694) PE y se analizaron utilizando la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Los histogramas están sombreados de acuerdo con la relación de cambio en la mediana de la fluorescencia relativa al control de isotipo (carril Contlso en el esquema transparente).

La **Figura 3** muestra el efecto del compuesto 3 sobre la fosforilación del STAT5 inducida por IL-3 en células BaF3. Las células BaF3 se incubaron con el vehículo solo, con concentraciones crecientes del compuesto 3 o con un compuesto de control positivo. Las transferencias de Western se trataron con un anticuerpo fosfoespecífico del STAT5 y se expusieron a una película durante 5 minutos (mancha de transferencia superior) y 1 minuto (mancha de transferencia del medio). La mancha de transferencia inferior muestra la proteína STAT total, independientemente del estado de fosforilación. Estas manchas de transferencia muestran claramente una disminución en la fosforilación del STAT5 en las células BaF3 estimuladas con IL-3 con el aumento de las concentraciones del compuesto 3.

La Figura 4 muestra el efecto del compuesto 3 sobre la fosforilación del STAT5 en células HEL. Las células HEL se incubaron con el vehículo solo, con concentraciones crecientes del compuesto 3 o con un compuesto de control positivo. Las transferencias de Western se trataron con un anticuerpo fosfo-específico del STAT5 y se expusieron a una película durante 5 minutos (mancha de transferencia superior) y 1 minuto (mancha de transferencia del medio). La mancha de transferencia inferior muestra la proteína STAT total, independientemente del estado de fosforilación. Estas manchas de transferencia muestran claramente una disminución en la fosforilación del STAT5 en las células HEL con el aumento de las concentraciones del compuesto 3.

La **Figura 5** muestra el efecto del tratamiento con el compuesto 3 sobre las concentraciones del factor de crecimiento insulinoide 1 (IGF-1) estimulado por la hormona del crecimiento en plasma de ratón.

La **Figura 6** muestra la eficacia del compuesto 3 administrado por vía oral en un modelo de tumor subcutáneo de las células Ba/F3 TelJAK2 en ratones desnudos.

La **Figura 7** muestra gráficos de puntos que demuestran la fosforilación del STAT5 (eje y) representada frente a la expresión de CD71 (eje x) en células eritroides de la médula ósea de un paciente que padece TE *JAK2* V617F positiva, así como el efecto del compuesto 3 sobre el pYSTAT5. En este caso, el control negativo (A) muestra solo una pequeña cantidad de tinción del pYSTAT5 que aumenta significativamente después de la estimulación con eritropoyetina (B) (el control positivo). La adición de compuesto 3 causó un aumento dependiente de la dosis en la inhibición del pYSTAT5 como se ilustra en (C). Esto se presenta como el porcentaje de inhibición de la actividad del pYSTAT5 medida del control positivo en el panel izquierdo y como un desplazamiento absoluto en la intensidad de fluorescencia en toda la población eritroide en el panel derecho.

Descripción detallada

La presente invención se refiere a compuestos de fórmula Ib que inhiben cinasas, en particular las cinasas JAK tales como la JAK2 y son útiles en el tratamiento de enfermedades asociadas a las cinasas tales como enfermedades inmunitarias e inflamatorias, incluyendo los trasplantes de órganos; enfermedades hiperproliferativas, incluyendo el cáncer y las enfermedades mieloproliferativas; enfermedades virales; enfermedades metabólicas y las enfermedades vasculares

Compuestos

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

La presente invención se refiere a compuestos de fórmula lb:

55 en donde

Z se selecciona independientemente entre N y CH;

R¹ se selecciona independientemente entre H, halógeno, OH, CONHR², CON(R²)₂, CF₃, R²OR², CN, morfolino, tiomorfolinilo, 1,1-dióxido de tiomorfolino, piperidinilo sustituido o no sustituido, piperazinilo sustituido o no sustituido, piperazinilo sustituido o no sustituido, piperazinilo sustituido o no sustituido y alquileno C₁-₄ en donde los átomos de carbono están opcionalmente reemplazados por NRY y/u O sustituidos con morfolino, tiomorfolinilo, 1,1-dióxido de tiomorfolino, piperidinilo sustituido o no sustituido, piperazinilo sustituido o no sustituido, imidazolilo o pirrolidinilo sustituido o no sustituido; R² es alquilo C₁-₄ sustituido o no sustituido;

 R^Y es H o alquilo $\mathsf{C}_{1\text{--}4}$ sustituido o no sustituido;

10 R⁸ es R^XCN:

R^X es alquileno C₁₋₄ sustituido o no sustituido en donde hasta 2 átomos de carbono pueden estar opcionalmente reemplazados por CO, NSO₂R¹, NR^y, CONR^y, SO, SO₂ u O; R¹¹ es H o alquilo C₁₋₄,

o un enantiómero de los mismos, un profármaco de los mismos o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Los ejemplos de compuestos de fórmula Ib incluyen, pero no se limitan a, los compuestos 3, 23, 24, 25, 30, 31, 33, 34, 36, 44, 46, 51, 52, 55, 57, 58, 59, 66, 67, 68, 69, 72, 73, 74, 75, 79, 80, 81,82, 85, 88, 89, 90, 91 y 92 en la siguiente tabla:

20

5

	Estructura	Masa exacta	RMN ¹ H	CL-EM	Nombre	
I		404,18	RMN 'H (300 MHz, d_c -DMSO): δ 9,49 (1H, s), 8,54 (1H, d, 5,0 Hz), 8,27 (2H, d, J = 8,7 Hz), 8,10 (2H, d, J = 8,7 Hz), 7,66 (2H, d, J = 9,1 Hz), 7,38 (1H, d, J = 5,0 Hz), 6,93 (2H, d, J = 8,7 Hz), 4,35 (2H, c, J = 6,9 Hz), 3,73 (4H, m), 3,04 (4H, m), 1,34 (3H, t, J = 6,9 Hz).	<i>m/</i> z 404,3 M [⊷]	4-(2-(4-morfolinofenilamino)pirimidin-4- il)benzoato de etilo	
l l	N H C N H C	414,18	RMN 'H (300 MHz, d_e -DMSO): δ 9,46 (1H, s), 9,34 (1H, s), 8,60 (1H, s), 8,53 (1H, d, J = 5,1 Hz), 8,32 (1H, d, J = 7,8 Hz), 7,99 (1H, d, J = 7,8 Hz), 7,67 (3H, m), 7,68 (1H, d, J = 5,1 Hz), 6,92 (2H, d, J = 9,0 Hz), 4,37 (2H, sa), 3,74 (4H, m), 3,04 (4H, m).	<i>m/</i> z 414,3 M⁺	N-(cianometil)-3-(2-(4- morfolinofenilamino)pirimidin-4- il)benzamida	
ı	N H CAN H CAN	414,18	RMN 'H (300 MHz, d_2 -DMSO): δ 9,47 (1H, s), 9,32 (1H, t_i , J = 5,5 Hz), 8,54 (1H, d_i , J = 5,0 Hz), 8,27 (2H, d_i , J = 8,7 Hz), 8,02 (2H, d_i , J = 8,2 Hz), 7,67 (2H, d_i , J = 9,1 Hz), 7,41 (1H, d_i , J = 5,5 Hz), 6,93 (2H, d_i , J = 9,1 Hz), 4,36 (2H, d_i , J = 5,5 Hz), 3,75 (4H, m), 3,05 (4H, m).	<i>m/</i> z 415,3 [M+H]⁺	N-(cianometil)-4-(2-(4- morfolinofenilammo)pirimidin-4- il)benzamida	
	HOW HISTORY HOUSE	419,20	RMN 'H (300 MHz, d_c -DMSO):5 8,42 (1H, d , J = 5,2 Hz), 8,21 (2H, d , J = 8,4 Hz), 7,95 (2H, d , J = 8,4 Hz), 7,60 (2H, d , J = 9,0 Hz), 7,27 (1H, d , J = 5,2 Hz), 6,98 (2H, d , J = 9,0 Hz), 3,84 (4H, m), 3,73 (2H, t , J = 5,8 Hz), 3,11 (4H, m).	<i>m/</i> 2 419,4 M [†]	N-(2-hidroxietil)-4-(2-(4- morfolinofenilamino)pirimidin-4- il)benzamida	
l I	N N N N N N N N N N N N N N N N N N N	357,16	RMN 1 H (300 MHz, CDCl ₃): δ 8,49 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 8,37-8,36 (m, 1H), 8,28-8,25 (m, 1H), 7,78-7,75 (m, 1H), 7,63-7,61 (m, 1H), 7,57-7,54 (m, 2H), 7,09 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 7,00-6,97 (m, 2H), 3,89 (t, J = 4,5 Hz, 4H), 3,16 (t, J = 4,9 Hz, 4H).	<i>m/</i> 2 356,8 M [†]	3-(2-(4-morfolinofenilamino)pirimidin-4- il)benzonitrilo	

4-(2-(4-morfolinofenilamino)pirimidin-4- il)benzonitrilo	2-fluoro-5-(2-(4- morfolinofenilamino)pirimidin-4- il)benzonitrilo	2-fluoro-5-(2-(3,4,5- trimetoxifenilamino)pirimidin-4- il)benzonitrilo	2-hidroxi-5-(2-(4- morfolinofenilamino)pirimidin-4- il)benzonitrilo	N-(cianometil)-3-metil-4-(2-(4- morfolinofenilamino)pirimidin-4- il)benzamida
<i>m/</i> 2 356,8 M*	<i>m/</i> 2 375,0 M ⁺	<i>m/</i> 2 379,9 M [†]	<i>m/</i> 2 373,0 M ⁺	<i>m/z</i> 428,3 M*
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8,50 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 8,15 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,78 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,78 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,58-7,55 (m, 2H), 7,13-7,11 (m, 1H), 7,01-6,98 (m, 2H), 3,90 (t, J = 4,5 Hz, 4H), 3,16 (t, J = 4,2 Hz, 4H).	RMN 'H (300 MHz, CDCl ₃); δ 8,49 (d, J = 5,7 Hz, 1H), 8,36 (dd, J = 5,7,2,4 Hz, 1H), 8,29 (m, 1H), 7,54 (d, J = 9,3 Hz, 1H), 7,33 (t, J = 9,0 Hz, 1H), 7,10 (sg, 1H), 7,05 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 6,97 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 3,88 (t, J = 5,1 Hz, 4H), 3,15 (t, J = 5,4 Hz, 4H).	RMN 'H (300 MHz, CDCl ₃): δ 8,53 (d, J = 5,4 Hz, 1H), 8,44 (dd, J = 5,7 Hz, 2,1 Hz, 1H), 8,29 (m, 1H), 7,34 (t, J = 8,7 Hz, 1H), 7,19 (sa, 1H), 7,12 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 7,00 (s, 2H), 3,92 (s, 6H), 3,85 (s, 3H).	RMN 'H (300 MHz, CDCl ₃): 5 8,39 (m, 1H), 8,23 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 8,11 (dd, J = 8,7, 2,1 Hz, 1H), 7,57-7,55 (m, 2H), 7,05-7,02 (m, 2H), 7,01-6,90 (m, 2H), 3,89 (t, J = 4,5 Hz, 4H), 3,41 (m, 1H), 3,15-3,13 (m, 4H).	RMN 'H (300 MHz, CDC ₁₃): δ 8,45 (1H, d, J = 5,0 Hz), $7,72$ (1H, d, J = 1,6 Hz), $7,76$ (1H, dd, J = 1,6, 8 0 Hz), $7,72$ (3H, m), $7,14$ (1H, s), 6,91 (2H, d, J = 9,0 Hz), $6,77$ (1H, d, J = 5,0 Hz), 6,67 (1H, t, J = 5,7 Hz), 4,39 (2H, d, J = 5,7 Hz), 3,86 (4H, m), 3,11 (4H, m), 2,48 (3H, s).
357,16	375,15	380,13	373,15	428,20
				H H N N N N N N N N N N N N N N N N N N
9	7	œ	6	10

N-(cianometil)-2-metil-4-(2-(4- morfolinofenilamino)pirimidin-4- il)benzamida	2-ciano-N-(3-(2-(4- morfolinofenilamino)pirimidin-4- il)bencilo)acetamida	2-(3-(2-(4-morfolinofenilamino)pirimidin-4- il)bencilamino)acetonitrilo	2-ciano-N-(3-(2-(4- morfolinofenilamino)pirimidin-4- il)fenilo)acetamida
<i>m/</i> z 428,3 M⁺	<i>m/z</i> 428,2 M⁺	<i>m/z</i> 400,1 M [↑]	<i>m/z</i> 414,3 M⁺
RMN 'H (300 MHz, CDCI ₃ :d ₄ -MeOH 1:1): 5 8,42 (1H, d ₁ , J = 5,2 Hz), 7,99 (1H, sa), 7,96 (1H, dd, J = 1,2, 8,1 Hz), 7,62 (2H, d, J = 9,2 Hz), *7,53 (1H, d, J = 8,0 Hz), 7,19 (1H, d, J = 5,2 Hz), 6,99 (2H, d, J = 9,2 Hz), 4,33 (2H, s), 3,89 (4H, m), 3,15 (4H, m), 2,54 (3H, s). *Parcialmente oscurecido por la señal de CHCI ₃ .	RMN 'H (300 MHz, d ₀ -DMSO): 5 9,40 (1H, s), 8,78 (1H, dd, J = 5,5,5,9 Hz), 8,48 (1H, d, J = 5,5 Hz), 8,03 (2H, m), 7,67 (2H, d, J = 9,1 Hz), 7,50 (1H, t, J = 7,8 Hz), 7,43 (1H, m), 7,29 (1H, d, J = 5,0 Hz), 6,93 (2H, d, J = 9,1 Hz), 4,39 (2H, d, J = 5,9 Hz), 3,73 (4H, m), 3,71 (2H, s), 3,04 (4H, m).	RMN 'H (300 MHz, d_0 -DMSO): δ 9,41 (1H, s), 8.47 (1H, d_1 , $J = 5.0$ Hz), 8.13 (1H, sa_2), 8.02 (1H, add_1 , $J = 1.8$, 4.1 , 5.0 Hz), 7.68 (2H, d_1 , $J = 9.1$ Hz), 7.49 (2H, d_2 , $J = 4.5$ Hz), 7.31 (1H, d_1 , $J = 5.0$ Hz), 6.92 (2H, d_1 , $J = 9.1$ Hz), 7.31 (1H, d_1 , $J = 5.0$ Hz), 6.92 (2H, d_1 , $J = 9.1$ Hz), 3.85 (2H, d_1 , $J = 5.9$ Hz), 3.73 (4H, m), 3.63 (2H, d_1 , $J = 7.3$ Hz), 3.03 (4H, m).	RMN 'H (300 MHz, d_0 -DMSO): δ 10,46 (1H, s), 9,41 (1H, s), 8,53 (1H, s), 8,49 (1H, d, J = 5,5 Hz), 7,83 (1H, d, J = 7,8 Hz), 7,72 (2H, d, J = 9,1 Hz), 7,58 (1H, da, J = 8,2 Hz), 7,48 (1H, $\frac{1}{3}$
428,20	428,20	400,20	414,18
		N H H H H H H H H H H H H H H H H H H H	HALL HALL HALL HALL HALL HALL HALL HALL
=	12	13	14

2-(3-(2-(4-morfolinofenilamino)pirimidin-4- il)fenilamino)acetonitrilo	2-metoxi-4-(2-(4- morfolinofenilamino)pirimidin-4- ii)benzonitrilo	4-(2-(4-morfolinofenilamino)pirimidin-4-il)- - -	4-(2-(4-morfolinofenilamino)pirimidin-4-il)- N-(piridin-3-ilmetil)benzamida
<i>m/</i> 2 386,2 M*	<i>m/</i> 2 388,2 [M+H] [†]	<i>m/</i> 2 467,1 [M+H] [†]	<i>m/</i> z 467,1 [M+H] ⁺
RMN 'H (300 MHz, d ₀ -acetonitrilo): 5 8,42 (1H, d, J = 5,0 Hz), 7,72 (1H, a), 7,64 (2H, d, J = 9,1 Hz), 7,51-7,54 (2H, m), 7,37 (1H, dd, J = 7,8,8,2 Hz), 7,20 (1H, d, J = 5,0 Hz), 6,98 (2H, m), 6,90 (1H, m), 5,04 (1H, t, J = 6,9 Hz), 4,22 (2H, d, J = 6,9 Hz), 3,79 (4H, m).	RMN 'H (300 MHz, CDCl ₃): δ 8,50 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 7,79 (d, J = 1,2 Hz, 1H), 7,67 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,61 (dd, J = 1,4,8,0 Hz, 1H), 7,56 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,12 (sa, 1H), 7,10 (d, J = 5,4 Hz, 1H), 6,95 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 4,05 (s, 3H), 3,89 (m, 4H), 3,14 (m,4H).	RMN 'H (300 MHz, d_e -DMSO): δ 9,47 (1H, s), 9,24 (1H, t, 5,9 Hz), 8,52 (1H, d, J = 5,5 Hz), 8,51 (2H, m), 8,24 (2H, d, J = 8,2 Hz), 8,05 (2H, d, J = 8,7 Hz), 8,05 (2H, d, J = 8,7 Hz), 7,39 (1H, d, J = 5,5 Hz), 7,32 (2H, d, J = 5,9 Hz), 6,92 (2H, d, J = 9,1 Hz), 4,52 (2H, d, J = 5,9 Hz), 3,74 (4H, m), 3,04 (4H, m).	RMN 'H (300 MHz, d_{σ} -DMSO): δ 9,45 (1H, s), 9,20 (1H, t, J = 5,9 Hz), 8,57 (1H, d, J = 1,8 Hz), 8,52 (1H, d, J = 5,0 Hz), 8,46 (1H, dd, J = 1,8,5,0 Hz), 8,23 (2H, d, J = 8,7 Hz), 8,03 (2H, d, J = 8,7 Hz), 8,03 (2H, d, J = 8,7 Hz), 8,03 (2H, d, J = 8,7 Hz), 7,44 (1H, ddd, J = 1,8,2,8,7,8 Hz), 7,66 (2H, d, J = 9,1 Hz), 7,38 (1H, d, J = 5,0 Hz), 7,36 (1H, m), 6,92 (2H, d, J = 9,1 Hz), 4,52 (2H, d, J = 5,9 Hz), 3,73 (4H, m), 3,04 (4H, m).
386,19	387,17	466,21	466,21
H H N N N N N N N N N N N N N N N N N N			
15	16	17	8

2-cloro-4-(2-(4- morfolinofenilamino)pirimidin-4- ii)benzonitrilo	N-(cianometil)-4-(2-(3,4,5- trimetoxifenilamino)pirimidin-4- il)benzamida	4-(2-(4-morfolmofenilamino)pirimidin-4-il)- N-((tetrahidroffiran-2-il)metil)benzamida	4-(2-(4-morfolinofenilaminojpirimidin-4-il)- N-(1H-pirazol-3-il)benzamida
<i>m/z</i> 391,3/3 93,3 M [±]	<i>m/z</i> 420,3 [M+H] [†]	<i>m/</i> 2 460,4 [M+H]⁺	<i>m/z</i> 442,3 [M+H] [†]
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): 5 8,51 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 8,21 (s, JH), 8,02 (d, J = 9,6 Hz, 1H), 7,78 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,53 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,16 (s, J = 1,1 H), 7,09 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 6,96 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 3,88 (m, 4H), 3,15 (m, 4H).	RMN ¹H (300 MHz, d_e -DMSO): δ 9,59 (1H, s), 9,32 (1H, t, J = 5,5 Hz), 8,59 (1H, d, J = 5,0 Hz), 8,31 (2H, d, J = 8,7 Hz), 8,02 (2H, d, J = 8,7 Hz), 7,47 (1H, d, J = 5,0 Hz), 7,30 (2H, s), 4,34 (2H, d, J = 5,5 Hz), 3,80 (6H, s) 2 × Ω Me, 3,63 (2H, s) Ω Me.	RMN ¹H (300 MHz, d_0 -DMSO): δ 9,45 (1H, s), 8,63 (1H, t, J = 5,9 Hz), 8,51 (1H, d, J = 5,0 Hz), 8,21 (2H, d, J = 8,2 Hz), 7,99 (2H, d, J = 8,2 Hz), 7,65 (2H, d, J = 9,1 Hz), 7,37 (1H, d, J = 5,0 Hz), 6,92 (2H, d, J = 9,1 Hz), 3,99 (1H, m), 3,79 (1H, m), 3,73 (4H, m), 3,62 (1H, m), 3,30 (2H, m), 3,04 (4H, m), 1,97-1,76 (3H, m), 1,65-1,54 (1H, m), * Parcialmente solapada con la señal del agua del disolvente.	RMN ¹H (300 MHz, d_e -DMSO): δ 12,44 (1H, \$\mathbf{s}a\$), 10,90 (1H, \$\mathbf{s}a\$), 9,46 (1H, \$\mathbf{s}), 8,52 (1H, d_1 , J_1 = 5,0 Hz), 8,24 (2H, d_1 , J_1 = 8,2 Hz), 8,14 (2H, d_1 , J_2 = 8,7 Hz), 7,40 (1H, d_1 , J_2 = 5,0 Hz), 6,93 (2H, d_1 , J_2 = 9,1 Hz), 6,66 (1H, d_1 , J_2 = 5,0 Hz), 6,93 (2H, d_1 , J_2 = 9,1 Hz), 6,66 (1H, d_2 , J_3 = 3,74 (4H, m), 3,04 (4H, m). * Resonancias solapadas 2H d_1 y 1H m .
391,12	419,16	459,23	441,19
19	20	21	22

N-(2-cianopropan-2-il)-4-(2-(4- morfolinofenilamino)pirimidin-4- il)benzamida	N-(cianometii)-4-(2-(3- morfolinofenilamino)pirimidin-4- il)benzamida	N-(cianometil)-4-(2-(4- tiomorfolinofenilamino)pirimidin-4- il)benzamida	2-metoxi-4-(2-(4- morfolmofenilamino)pirimidin-4-il)fenol
<i>m/z</i> 443,4 [M+H]⁺	<i>m/z</i> 415,4 [M+H]⁺	<i>m/</i> 2 431,3 [M+H]⁺	<i>m/z</i> 378,4 M⁺
RMN ¹H (300 MHz, d_{σ} -DMSO): δ 9,47 (1H, s), 8,83 (1H, s), 8,53 (1H, d, J = 5,0 Hz), 8,25 (2H, d, J = 8,7 Hz), 8,01 (2H, d, J = 8,2 Hz), 7,66 (2H, d, J = 9,1 Hz), 7,39 (1H, d, J = 5,0 Hz), 6,92 (2H, d, J = 9,1 Hz), 3,73 (4H, m), 3,04 (4H, m), 1,71 (6H, s).	RMN 'H (500 MHz, d_2 -DMSO): δ 9,58 (s, 1H), 9,33 (t, J = 5,5 Hz, 1H), 8,59 (d, J = 5,0 Hz, 1H), 8,29 (d, J = 5,1 Hz, 2H), 7,63 (s, 1H), 7,47 (d, J = 5,5 Hz, 1H), 7,25 (m, 1H), 7,16 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 6,59 (dd, J = 8,0, 2,0 Hz, 1H), 6,59 (dd, J = 8,0, 4,1H), 6,59 (dd, J = 8,0, 4,1H), 6,59 (dd, J = 8,0, 4,1H), 8,36 (d, J = 5,5 Hz, 2H), 3,77 (m, 4H), 3,13 (m, 4H).	RMN 'H (300 MHz, d_c -DMSO): δ 9,48 (s, 1H), 9,32 (t, J = 5,4 Hz, 1H), 8,53 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 8,26 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,66 (d, J = 9,3 Hz, 2H), 7,40 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 6,92 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,40 (d, J = 5,7 Hz, 2H), 3,41 (m, 4H), 2,70 (m, 4H).	RMN 'H (300 MHz, CDC ₁₃): 5 8,37 (1H, d, J = 5,4 Hz), 7,74 (1H, d, J = 1,5 Hz), 7,54-7,60 (3H, m), 6,98-7,07 (3H, m), 6,93 (2H, d, J = 8,7 Hz), 5,89 (1H, sa), 4,00 (3H, s), 3,88 (4H, m), 3,13 (4H, m).
442,21	414,18	430,16	378,17
	N H N N N N N N N N N N N N N N N N N N		H N N OH
23	24	25	26

1-(4-(4-(4-amino-3-nitrofenil)pirimidin-2- ilamino)fenil)pirrolidin-3-ol	4-(2-(4-morfolinofenilamino)pirimidin-4- il)benzamida	4-(2-(4-yodofenilamino)pirimidin-4- il)benzoato de etilo	N-(cianometii)-4-(2-(4- yodofenilamino)pirimidin-4-il)benzamida
CL-IEN- EM (método B): Ja 6,4 min, m2 393,1 [M+H]†	m/z 376,1 [M+H] [†] y m/z 374,2 [M-H] [*]	m/z encontr ada 446,2 [M+H] [†]	<i>m/</i> 2 456,2 [M+H]⁺
	RMN ¹H (300 MHz, d_c -DMSO): δ 9,46 (s, 1H), 8,51 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 8,20 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 8,07 (sg, 1H), 8,01 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,66 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,47 (sg, 1H), 7,39 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 6,92 (d, J = 9,1 Hz, 2H), 3,73 (m, 4H), 3,04 (m, 4H).	RMN ¹H (500 MHz, d_{σ} -DMSO): δ 9,91 (s, 1H), 8,63 (d, J = 5,0 Hz, 1H), 8,29 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 8,11 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,70 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,64 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,51 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 4,36 (c, J = 7,0 Hz, 2H), 1,35 (t, J = 7,5 Hz, 3H).	RMN 1 H (300 MHz, d_{7} -DMSO): δ 9,88 (s, 1H), 9,61 (t, J = 5,4 Hz, 1H), 8,61 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 8,27 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 8,09 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,7 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,63 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,52 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 4,33 (d, J = 5,4 Hz, 2H).
392,16	375,17	445,03	455,02
HO NATION OF THE OWNER OF THE OWNER OF THE OWNER OF THE OWNER OWNE	NAME OF THE PARTY	N H N N	O NH
27	28	29	30

N-(cianometil)-N-(4-(2-(4- morfolinofenilamino)pirimidin-4- il)fenil)metanosulfonamida	4-(5-metil-2-(4- morfolinofenilamino)pirimidin-4- ii)bencenosulfonamida	N-(cianometil)-4-(2-(4- (morfolinometil)fenilamino)pirimidin-4- il)benzamida	N-(2-(cianometilamino)-2-oxoetil)-4-(2-(4- morfolinofenilamino)pirimidin-4- il)benzamida
m/z 465,4 [M+H] ⁺	<i>m/</i> 2 426,3 [M+H]⁺	<i>m/z</i> 429,3 [M+H]⁺	<i>m/z</i> 472,4 [M+H]⁺
RMN ¹H (300 MHz, CDC ₁₃): 5 8,46 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 8,15 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,65 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,16 (sa, 1H), 7,09 (d, J = 5,4 Hz, 1H), 6,96 (d, J = 9,3 Hz, 2H), 7,16 (sa, 1H), 7,09 (s, 2H), 3,90-3,87 (m, 4 H), 3,17-3,13 (m, 4H), 3,09 (s, 3H).	RMN ¹H (300 MHz, de-DMSO): 5 9,36 (s, 1H), 8,39 (s, 1H), 7,95 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 7,84 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 7,84 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 7,61 (m, 2H), 7,48 (s, 2H), 6,88 (m, 2H), 3,72 (m, 4H), 3,01 (m, 4H), 2,19 (s, 3H).	RMN ¹H (300 MHz, d_{σ} -DMSO): δ 9,70 (s, 1H), 9,37-9,31 (m, 1H), 8,59 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 8,29 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 8,03 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,78 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,47 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 7,24 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 4,35 (d, J = 5,7 Hz, 2H), 3,64-3,50 (m, 4H), 3,41 (s, 2H), 2,35 (sa, 4H).	RMN ¹H (300 MHz, d₂-DMSO): 5 9,49 (s, 1H), 9,00 (t, J = 6,0,1H), 8,67 (t, J = 5,4 Hz, 1H), 8,53 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 8,26 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 8,05 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,67 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,67 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,41 (d, J = 5,4 Hz, 1H), 6,94 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 4,16 (d, J = 5,4 Hz, 2H), 3,95 (d, J = 5,7 Hz, 2H), 3,78-3,72 (m, 4H), 3,08-3,02 (m, 4H).
464,16	425,15	428,20	471,20
	H, M,		
25	32	33	34

N-(4-(2-(3-hidroxífenilamino)pirimidin-4- il)-2-metoxífenil)-N- (metilsulfonil)metanosulfonamida	N-(cianometil)-4-(2-(4-(4-hidroxipiperidin- 1-il)fenilamino)pirimidin-4-il)benzamida	4-(2-(6-morfolinopiridin-3- ilamino)pirimidin-4-il)benzoato de etilo	4-(2-(4-(1H-imidazol-1- il) <u>fenijantino</u>)pirimidin-4-il)benzoato de etilo
m/z 465,2 [M+H] [†]	<i>m/z</i> 429,3 [M+H]⁺	<i>m/z</i> 406,3 [M+H]⁺	<i>m/z</i> 386,3 [M+H]⁺
RMN 'H (300 MHz, CDCl ₃ /CD ₃ OD) 5 8,46 (d, <i>J</i> = 5,1 Hz, 1H), 7,92 (d, <i>J</i> = 1,5 Hz, 1H), 7,62 (dd, <i>J</i> = 1,8, <i>J</i> = 8,1 Hz, 1H), 7,41 (d, <i>J</i> = 8,1 Hz, 1H), 7,40 (m, 1H), 7,15 (m, 2H), 7,15 (d, <i>J</i> = 5,4 Hz, 1H), 6,55 (m, 1H), 4,05 (s, 3H), 3,47 (s, 6H).	RMN 'H (300 MHz, d_{σ} -DMSO): δ 9,44 (s, 1H), 9,38-9,30 (m, 1H), 8,52 (d, J = 5,1,1H), 8,26 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 8,02 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,61 (d, J = 9,3 Hz, 2H), 7,38 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 6,91 (d, J = 9,3 Hz, 2H), 4,69 (d, J = 4,2 Hz, 1H), 4,35 (d, J = 5,4 Hz, 2H), 3,68-3,50 (m, 2H), 2,82-2,68 (m, 2H), 1,93-1,74 (m, 2H), 1,58-1,39 (m, 2H).	RMN 'H (300 MHz, d_e -DMSO): δ 9,54 (s, 1H), 8,54 (d, J = 5,7 Hz, 1H), 8,54 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 8,51 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 8,25 (4 J = 8,1 Hz, 2H), 8,10 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 7,98 (dd, J = 9,0 Hz, 2,7,1H), 7,40 (d, J = 5,4 Hz, 1H), 6,87 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 4,35 (c, J = 6,9 Hz, 2H), 3,74-3,68 (m, 4H), 3,40-3,33 (m, 4H), 1,34 (f, J = 7,5 Hz, 3H).	RMN 'H (300 MHz, d_{2} -DMSO): δ 9,98 (s, 1H), 8,65 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 8,32 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 8,17 (s, 1H), 8,12 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,97 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,68 (s, 1H), 7,60 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,52 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 7,09 (s, 1H), 4,36 (c, J = 6,6 Hz, 2H), 1,35 (t, J = 7,2,3H).
464,08	428,20	405,18	385,15
TX X		N N N N N N N N N N N N N N N N N N N	Z Z Z Z Z Z Z Z Z Z Z Z Z Z Z Z Z Z Z
35	36	37	38

N-(cianometil)-4-(2-(4-(4- (hidroximetil)piperidin-1-il)fenilamino)-5- metilpirimidin-4-il)benzamida	ácido 2-metoxi-4-(5-metil-2-(4- morfolinofenilamino)pirimidin-4- il)benzoico	N-(cianometil)-4-(2-(4-(4- (hidroximetil)piperidin-1- il)fenilamino)pirimidin-4-il)benzamida	2-ciano-N-(2-metoxi-4-(2-(4- morfolinofenilamino)pirimidin-4- il)fenil)acetamida
<i>m/z</i> 457,4 [M+H] [†]	<i>m/</i> 2 421,4 [M+H] [†]	<i>m/</i> 2 443,4 [M+H] [†]	<i>m/2</i> 445,3 [M+H] [†]
RMN 1 H (300 MHz, CDCl ₃): δ 8,30 (s, 3H), 7,89 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,73 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,48 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 6,94 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 6,94 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 6,94 (d, J = 6,1 Hz, 1H), 4,43 (d, J = 5,9 Hz, 2H), 3,63 (d, J = 12,0 Hz, 2H), 3,55 (f, J = 5,7 Hz, 2H), 2,72.2,63 (m, 2H), 2,23 (s, 3H), 1,85 (d, J = 13,2 Hz, 2H), 1,48-1,39 (m, 2H), 1,35-1,31 (m, 1H).	RMN 'H (300 MHz, $d_{\rm e}$ -DMSO): δ 9,35 (s, 1H), 8,38 (s, 1H), 7,74 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,63 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,36 (s, 1H), 7,26 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 6,88 (d, J = 9,3 Hz, 2H), 3,87 (s, 3H), 3,72 (m, 4H), 3,01 (m, 4H), 2,20 (s, 3H).	RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD): δ 8,44 (d, J = 5,4 Hz, 1H), 8,25 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,98 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,99 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,29 (d, J = 5,4 Hz, 1H), 7,03 (d, J = 9,3 Hz, 2H), 4,53 (8,6,1H), 4,56 (s, 2H), 3,68-3,60 (m, 2H), 3,46 (d, J = 6-3 Hz, 2H), 1,92-1,82 (m, 2H), 1,68-1,52 (m, 1H), 1,48-1,32 (m, 2H).	RMN 'H (300 MHz, d_e -DMSO): δ 9,78 (s, 1H), 9,37 (s, 1H), 8,46 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 8,16 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,85 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 7,76 (ad, J = 8,1, 1,8 Hz, 1H), 7,68 (d, J = 9,3 Hz, 2H), 7,35 (d, J = 5,4 Hz, 1H), 6,93 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 4,06 (s, 2H), 3,98 (s, 3H), 3,74 (m, 4H), 3,04 (m, 4H).
456,23	420,18	442,21	444,19
HO NOTE OF THE OFFI			THE WARE THE THE THE THE THE THE THE THE THE TH
39	40	42	43

	427,21	RMN 'H (300 MHz, CD ₃ OD): δ 8,46 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 8,25 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,98 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,66 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,31 (d, J = 5,4 Hz, 1H), 7,03 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 4,36 (s, 2H), 3,38-3,33 (m, 4H), 3,25-3,20 (m, 4H), 2,80 (s, 3H).	<i>m/z</i> 428,4 [M+H] [†]	N-(cianometil)-4-(2-(4-(4-metilpiperazin-1- il)fenilamino)pirimidin-4-il)benzamida
II N	444,19	RMN 'H (300 MHz, d_{σ} -DMSO): δ 9,47 (s, 1H), 8,87 (ft, $J=5,1$ Hz, 1H), 7,96 (d, $J=8,1$ Hz, 1H), 7,90 (s, 1H), 7,82 (d, $J=8,1$ Hz, 1H), 7,67 (d, $J=8,7$ Hz, 2H), 7,43 (d, $J=8,7$ Hz, 2H), 7,43 (d, $J=8,7$ Hz, 2H), 4,432 (d, $J=8,7$ Hz, 1H), 6,93 (d, $J=9,3$ Hz, 2H), 4,32 (d, $J=8,7$ Hz, 2H), 4,04 (s, 3H), 3,74 (m, 4H), 3,04 (m, 4H).	m/z 445,3 [M+H]⁺	N-(cianometil)-2-metoxi-4-(2-(4- morfolinofenilamino)pirimidin-4- il)benzamida
N N N	442,21	RMN 'H (300 MHz, CDCl ₃): δ 8,31 (s, 1H), 7,89 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,72 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,49 (d, J = 9,3 Hz, 2H), 6,94 (m, 3H), 6,60 (t, J = 5,7 Hz, 1H), 4,42 (d, J = 6,1 Hz, 2H), 3,93 (m, 2H), 3,24-3,20 (m, 2H), 3,07-3,01 (m, 4H), 2,23 (s, 3H), 1,55-2,00 (m, 2H, parcialmente oscurecida por la impureza grasa).	<i>m/</i> z 443,3 [M+H]⁺	N-(cianometil)-4-(2-(4-(3-hidroxipiperidin- 1-il)fenilamino)-5-metilpirimidin-4- il)benzamida
	458,21	RMN 'H (300 MHz, d_c -DMSO): δ 9,33 (s, 1H), 8,87 (t, J = 5,7 Hz, 1H), 8,38 (s, 1H), 7,93 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,63 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,41 (d, J = 1,2 Hz, 1H), 7,33 (d_d , J = 7,8,1,5 Hz, 1H), 6,88 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 4,32 (d, J = 5,7 Hz, 2H), 3,97 (s, 3H), 3,73 (m, 4H), 3,01 (m, 4H), 2,21 (s, 3H).	m/z 459,3 [M+H]*	N-(cianometil)-2-metoxi-4-(5-metil-2-(4- morfolinofenilamino)pirimidin-4- il)benzamida

citrato de 4-(4-amino-3,5-diclorofenil)-N- (4-morfolinofenil)pirlmidin-2-amina	N-(cianometil)-4-(5-metoxi-2-(4- morfolinofenilamino)pirimidin-4- il)benzamida	N-(cianometil)-4-(2-(4-(4-(pirrolidin-1- il)piperidin-1-carbonil)fenilamino)pirimidin- 4-il)benzamida	4-(2-(4-(1-bencilpiperidin-4- iloxi)fenilamino)pirimidin-4-il)-N- (cianometii)benzamida
<i>m/z</i> 416,2/4 18,2/ 420,2 [M+H] [†]	<i>m/z</i> 445,3 [M+H] [†]	<i>m/z</i> 510,4 [M+H]⁺	<i>m/z</i> 519,3 [M+H] [†]
RMN 1 H (300 MHz, dc-DMSO): 5 12,40 (m, 4H), 9,31 (s, 1H), 8,38 (d, J = 5,4 Hz, 1H), 8,08 (s, 2H), 7,62 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,27 (d, J = 5,4 Hz, 1H), 6,90 (d, J = 9,3 Hz, 2H), 6,07 (sg, 2H), 3,74 (m, 4H), 3,04 (m, 4H), 2,80-2,63 (m, 8H).	RMN 'H (300 MHz, CDC ₁₃): δ 8,25 (s, 1H), 8,22 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,87 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,52 (d, J = 9,2 Hz, 2H), 6,93 (d, J = 9,2 Hz, 2H), 6,88 (s, J = 9,2 Hz, 2H), 6,88 (s, J = 5,7 Hz, 1H), 4,43 (d, J = 5,8 Hz, 2H), 3,87 (t, J = 4,8 Hz, 4H), 3,87 (s, 3H), 3,12 (t, J = 4,8 Hz, 4H).	RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD): δ 8,56 (d, J = 5,4 Hz, 1H), 8,29 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 8,00 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 8,00 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,91 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,45-7,40 (m, 3H), 4,37 (s, 2H), 3,20-2,72 (m, 2H), 2,78-2,72 (m, 4H), 2,56-2,42 (m, 1H), 2,12-1,92 (m, 2H), 1,90-1,84 (m, 5H), 1,60-1,42 (m, 2H), 1,32-1,28 (§3,1H).	RMN ¹H (300 MHz, d_e -DMSO): δ 10,33 (s, 1H), 10,13 (t, J = 5,4 Hz, 1H), 9,35 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 9,07 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 8,83 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 8,49 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 8,22 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 8,16-8,02 (m, 5H), 7,73 (d, J = 9,3 Hz, 2H), 5,18 (d, J = 3,6 Hz, 2H), 5,15-5,06 (m, 1 H), 4,30 (s, 2H), 3,55-3,42 (m, 2H), 3,10-2,95 (m, 2H), 2,80-2,67 (m, 2H), 2,50-2,38 (m, 2H).
415,10	444,19	509,25	518,24
HAM CO	THE		
48	49	90	51

N-(cianometil)-4-(2-(6-morfolinopiridin-3- ilamino)pirimidin-4-il)benzamida	4-(5-cloro-2-(4- morfolinofenilamino)pirimidin-4-il)-N- (cianometil)benzamida	2-ciano-N-(2-metoxi-4-(5-metil-2-(4- morfolinofenilammo)pirimidin-4- il)fenil)acetamida	4-(2-(4-(4-acetilpiperazin-1- il)fenilamino)pirimidin-4-il)-N- (cianometil)benzamida
<i>m/z</i> 416,3 [M+H]⁺	<i>m/z</i> 449.3 [M+H] [†]	<i>m/</i> 2 459,4 [M+H] [†]	<i>m⁄z</i> 456,3 [M+H] [†]
RMN 1 H (300 MHz, d_{c} -DMSO): δ 9,50 (s, 1H), 9,38-9,32 (m, 1H), 8,54 (d, J = 5,1 Hz, 2H), 8,24 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 8,02 (d, 8,7 Hz, 2H), 7,97 (dd, J = 9,0, 2,7 Hz, 1H), 7,42 (d, J = 5,4 Hz, 1H), 6,86 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 4,35 (d, J = 5,4 Hz, 2H), 3,76-3,68 (m, 4H), 3,40-3,35 (m, 4H).	RMN 'H (300 MHz, CDCl ₃ /CD ₃ OD): 5 8,41 (s, 1H), 7,98 (m, 4H), 7,56 (d, <i>J</i> = 8,6 Hz, 2H), 6,95 (d, <i>J</i> = 8,6 Hz, 2H), 4,35 (s, 2H), 3,80 (t, <i>J</i> = 4,8 Hz, 4H), 3,08 (t, <i>J</i> = 4,8 Hz, 4H).	RMN 'H (300 MHz, d_c -DMSO): δ 9,74 (s, 1H), 9,25 (s, 1H), 8,34 (s, 1H), 8,10 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,64 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,39 (s, 1H), 7,28 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 6,87 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 4,05 (s, 2H), 3,92 (s, 3H), 3,73 (m, 4H), 3,01 (m, 4H), 2,24 (s, 3H).	RMN 1 H (300 MHz, d_{σ} -DMSO): $59,49$ (s, 1H), $9,34-9,28$ (m, 1H), $8,54$ (d, $J=5,4$ Hz, 1H), $8,26$ (d, $J=8,7$ Hz, 2H), $7,67$ (d, $J=8,7$ Hz, 2H), $7,67$ (d, $J=9,0$ Hz, 2H), $7,41$ (d, $J=5,1$ Hz, 1H), $6,96$ (d, $J=9,0$ Hz, 2H), $4,35$ (d, $J=5,4$ Hz, 2H), $3,52-3,54$ (m, 4H), $3,11-3,00$ (m, 4H), $2,04$ (s, 3H).
415,18	448,14	458,21	455,21
A MANAGEMENT OF THE PROPERTY O			
52	53	54	55

N-(cianometil)-4-(5-metil-2-(4-(4- (metilsulfonamido)piperidin-1- il)fenilamino)pirimidin-4-il)benzamida	tosilato de N-(4-(2-(4- morfolinofenilamino)pirimidin-4-il)fenil)-N- (prop-2-inil)metanesulfonamida	N-(cianometil)-4-(2-(4-(4-hidroxipipenidin- 1-il)fenilamino)-5-metilpirimidin-4- il)benzamida	N-(cianometil)-4-(2-(4-(piperidin-4- iloxi)fenilamino)pirimidin-4-il)benzamida
CL-IEN- EM (método B): ta, 5,8 min, m/z 520,3	<i>m/</i> 2 464,0 [M+H] [†]	<i>m/</i> 2 443,3 [M+H]⁺	<i>m/</i> 2 429,3 [M+H]⁺
	RMN 'H (300 MHz, d_{σ} -DMSO): δ 9,78 (§g, 1H), 8,55 (d_{τ} , J = 5,4 Hz, 1H), 8,22 (d_{τ} , J = 8,7 Hz, 2H), 7,64 (d_{τ} , J = 8,7 Hz, 2H), 7,64 (d_{τ} , J = 8,7 Hz, 2H), 7,64 (d_{τ} , J = 8,7 Hz, 1H), 7,48 (d_{τ} , J = 8,1 Hz, 1H), 7,49 (d_{τ} , J = 5,1 Hz, 1H), 7,29 (d_{τ} , J = 8,1 Hz, 2H), 7,11 (d_{τ} , J = 7,8 Hz, 2H), 4,58 (d_{τ} , J = 2,4 Hz, 2H), 3,86 (m_{τ} , 4H), 3,41 (f_{τ} , J = 2,4 Hz, 1H), 3,34 (g_{τ} , 4H), 3,13 (g_{τ} , 3H), 2,28 (g_{τ} , 3H).	RMN 1 H (300 MHz, CD ₃ OD): δ 8,27 (s, 1H), 7,95 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,75 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,52 (d, J = 9,1 Hz, 2H), 6,94 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 4,34 (s, 2H), 3,78.3,68 (m, 1H), 3,45.3,41 (m, 2H), 2,80.2,75 (m, 2H), 2,21 (s, 3H), 1,93-1,91 (m, 2H), 1,65-1,62 (m, 2H).	RMN 'H (300 MHz, d_2 -DMSO): δ 9,51 (s, 1H), 9,36-9,30 (m, 1H), 8,54 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 8,26 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 8,03 (d, J = 8,4 Hz, 2H), T ,68 (d, J = 9,0 Hz, 2H), T ,41 (d, J = 5,4 Hz, 1H), 6,93 (d, J = 10,2 Hz, 2H), 4,35 (d, J = 5,4 Hz, 2H), 4,32-4,26 (m, 1H), 3,00-1,35 (m, 9H).
519,21	463,17	442,21	428,20
	H N N N N N N N N N N N N N N N N N N N	THE PERSON NAMED IN COLUMN 1997	
56	25	58	65

N-metil-5-(4-(4- (metilsulfonamido)fenil)pirimidin-2- ilamino)-2-morfolinobenzamida	4-(4-(cianometilcarbamoil)fenil)-2-(4- morfolinofenilamino)pirimidin-5- carboxilato de etilo	4-(4-(4- (cianometilcarbamoil)fenil)pirimidin-2- ilamino)-3-metoxi-N-(1-metilpiperidin-4- il)benzamida	N-(cianometil)-4-(2-(4- morfolinofenilamino)piridin-4-il)benzamida
<i>m2</i> 483,3 [M+H]⁺	<i>m/</i> 2 487,3 [M+H] [†]	<i>m</i> /2 500,4 [M+H] [†]	<i>m/</i> 2 414,3 [M+H] [†]
RMN ¹H (300 MHz, d_0 -DMSO): δ 10,11 (1H, §3), 9,64 (1H, s), 9,27 (1H, da, J = 5,0 Hz), 8,48 (1H d, J = 5,0 Hz), 8,33 (1H, d, J = 2,8 Hz), 8,20 (2H, d, J = 8,9 Hz), 7,85 (1H, dg, J = 2,8, J = 8,7 Hz), 7,35 (3H, m), 7,22 (1H, d, J = 8,9 Hz), 3,75 (4H, m), 3,07 (3H, s), 2,87 (7H, m).	RMN 1 H (300 MHz, CDCl ₃): δ 8,97 (s, 1H), 7 ,85 (d, 1 = 8,3 Hz, 2H), 7 ,63 (d, 1 = 8,3 Hz, 2H), 7 ,763 (d, 1 = 8,3 Hz, 2H), 7 ,736 (s ₃₄ , 1H), 6 ,92 (d, 1 = 9,0 Hz, 2H), 6 ,51 (t, 1 = 5,1 Hz, 1H), 4 ,41 (d, 1 = 5,8 Hz, 2H), 4 ,48 (c, 1 = 7,2 Hz, 2H), 3 ,87 (t, 1 = 4,8 Hz, 4H), 3 ,14 (t, 1 = 4,8 Hz, 4H), 1 ,16 (t, 1 = 7,1 Hz, 3H)	RMN 'H (300 MHz, d_0 -DMSO): $5.9,33$ (t, $J=5.4$ Hz, 1H), 8.65 (d, $J=5.7$ Hz, 1H), 8.44 (d, 7.8 Hz, 1H), $8.32-8.29$ (m, 3H), 8.12 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 8.02 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), $7.60-7.53$ (m, 3H), 4.36 (d, $J=5.7$ Hz, 2H), 7.96 (s, 3H), $3.80-3.67$ (m, 1H), $2.81-2.77$ (m, 2H), 2.18 (s, 3H), $2.00-1.90$ (m, 2H), 1.80 (m, 2H), $1.67-1.53$	RMN ¹H (300 MHz, d_e -DMSO): $6.9,23$ (f, $J=5,4$ Hz, 1H), $8,86$ (s, 1H), $8,18$ (d, $J=6,0$ Hz, 1H), $8,00$ (d, $J=8,1$ Hz, 2H), $7,80$ (d, $J=8,7$ Hz, 2H), $7,53$ (d, $J=8,7$ Hz, 2H), $7,03-6,99$ (m, 2H), $6,90$ (d, $J=9,0$ Hz, 2H), $4,34$ (d, $J=5,4$ Hz, 2H), $3,76-3,72$ (m, 4H), $3,05-3,01$ (m, 4H).
482,17	486,20	499,23	413,19
THE NAME OF THE PARTY OF THE PA	TIN N		N N N N N N N N N N N N N N N N N N N
99	6	62	63

4-(5-bromo-2-(4- morfolinofenilamino)pirimidin-4-il)-N- (cianometii)benzamida	5-(4-(4- (cianometilcarbamoil)fenil)pirimidin-2- ilamino)-N,N-dimetil-2- morfolinobenzamida	N-terc-butil-5-(4-(4- (cianometilcarbamoil)fenil)pirimidin-2- ilamino)-2-morfolinobenzamida	5-(4-(4- (cianometiicarbamoil)fenil)pirimidin-2- ilamino)-N-etil-2-morfolinobenzamida
<i>m/z</i> 493,2 [M+H]⁺	<i>m/z</i> 486,4 [M+H]⁺	<i>m/z</i> 514,3 [M+H] [†]	<i>m/z</i> 486,3 [M+H] [†]
RMN 'H (300 MHz, CD ₃ OD/d ₂ -DMSO): δ 8,58 (s, 1H), 8,01 (s, 1H), 7,99 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 7,89 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,89 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 6,92 (d, J = 9,2 Hz, 2H), 4,35 (s, 2H), 3,80 (t, J = 4,8 Hz, 4H), 3,08 (t, J = 4,8 Hz, 4H)	RMN 'H (300 MHz, de-DMSO): $6.9.71$ (s, 1H), $9.38-9.33$ (m, 1H), 8.58 (d, $J=5.4$ Hz, 1H), 8.28 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 8.02 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.77 (dd, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.77 (dd, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.77 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 3.77	RMN 'H (300 MHz, d_{σ} -DMSO): δ 9,79 (s, 1H), 9,53 (s, 1H), 9,38-9,33 (m, 1H), 8,61 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 8,45 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 8,35 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 8,02 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,85 ($\frac{1}{3}$ 0, J = 8,7, J = 2,7 Hz, 1H), 7,50 (d, J = 5,4 Hz, 1H), 7,30 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 4,36 (d, J = 5,4 Hz, 2H), 3,80-3,73 (m, 4H), 2,94-2,88 (m, 4H), 1,44 (s, 9H).	RMN 'H (300 MHz, d_c -DMSO): δ 9,78 (s, 1H), 9,60-9,45 (m, 1H), 9,37-9,32 (m, 1H), 8,59 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 8,41 (d, J = 8,4 Lz, 1H), 8,35 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 8,03 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,83 (dd, J = 2,7, 8,7 Hz, 1H), 7,50 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 7,26 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 7,50 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 7,56 (d, J = 7,1 Hz, 1H), 1,10 (f, J = 7,2 Hz, 3H).
492,09	485,22	513,25	485,22
	EZ Z	N H N H N N N N N N N N N N N N N N N N	OH HIN N
89	99	29	89

N-(cianometil)-4-(2-(3-fluoro-4- morfolinofenilamino)pirimidin-4- il)benzamida	N-(2-cloro-4-(2-(4- morfolinofenilamino)pirimidin-4-il)fenil)-2- cianoacetamida	2-ciano-N-(4-(2-(4- morfolinofenilamino)pirimidin-4-il)-2- (trifluorometoxi)fenil)acetamida	N-(cianometil)-4-(2-(4-morfolino-3- (trifluorometil)fenilamino)pirimidin-4- il)benzamida
m/z 433,3 [M+H]*	<i>m/z</i> 449,3 [M+H]⁺	<i>m\z</i> 499,2 [M+H]⁺	<i>m/z</i> 483,3 [M+H]⁺
RMN 'H (300 MHz, d_e -DMSO): δ 9,77 (g_{sh} , 1H), 9,33 (t, J = 5,4 Hz, 1H), 8,60 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 8,27 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 8,04 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,78 (g_{th} , J = 15,6,2,4 Hz, 1H), 7,47-7,53 (m, 2H), 7,06-6,99 (m, 1H), 4,36 (d, J = 5,7 Hz, 2H), 3,76-3,72 (m, 4H), 2,98-2,94 (m, 4H).	RMN 'H (300 MHz, CD ₃ OD/ d_6 -DMSO): δ 8,33 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H), $8,18$ (m, 1H), $7,99$ - $7,84$ (m, 2H), $7,52$ (d, $J = 9,2$ Hz, 2H), $7,16$ (d, $J = 5,1$ Hz, 1H), $6,88$ (d, $J = 9,1$ Hz, 2H), $3,73$ (t, $J = 4,8$ Hz, 4H), $3,01$ (t, $J = 4,8$ Hz, 4H).	RMN 'H (300 MHz, d_5 -DMSO): δ 9,43 (s, 1H), 8,50 (d, $J=5$,1 Hz, 1H), 8,20 (s, 1H), 8,16 (s, 2H), 7,64 (d, $J=9$,1 Hz, 2H), 7,36 (d, $J=5$,1 Hz, 1H), 6,91 (d, $J=9$,1 Hz, 2H), 4,04 (<u>s, 3</u> , 1H), 3,74 (t, $J=4$,8 Hz, 4H), 3,45 (m, 2H, oscurecida por la señal del agua), 3,04 (t, $J=4$,8 Hz, 4H).	RMN 'H (300 MHz, d_c -DMSO): δ 10,02 (s, 1H), 9,40-9,32 (m, 1H), 8,64 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 8,46 (sa, 1H), 8,30 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 8,04 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 7,96 (dd, J = 9,3, 1,8 Hz, 1H), 7,59-7,54 (m, 2H), 4,36 (d, J = 5,4 Hz, 2H), 2,76-2,66 (m, 4H), 2,85-2,80 (m, 4H).
432,17	448,14	498,16	482,17
	THE WAY TO SEE THE WA	N N N N N N N N N N N N N N N N N N N	N N N N N N N N N N N N N N N N N N N
69	70	7.1	72

5-(4-(4-(N- (cianometil)metilsulfonamido)fenil)pirimidi n-2-ilamino)-N-(2-(dimetilamino)etil)-2- morfolinobenzamida	N-(cianometil)-N-(4-(2-(4-morfolino-3- (trifluorometil)fenilamino)pirimidin-4- il)fenil)metanosulfonamida	N-(cianomefii)-4-(2-(3- (propoximetil)fenilamino)pirimidin-4- il)benzamida	2-ciano-N-(4-(2-(4- morfolinofenilamino)pirimidin-4-il)-2- (trifluorometii)fenil)acetamida
m/z 579,4 [M+H]*	<i>m/</i> 2 533,3 [M+H] [†]	<i>m/z</i> 402,3 [M+H] [†]	<i>m/z</i> 483,3 [M+H]⁺
RMN 'H (300 MHz, d _c -DMSO): δ 9,89 (1H, t, J = 5,2 Hz), 9,77 (1H, s), 8,57 (1H, d, J = 5,5 Hz), 8,48 (1H, d, J = 2,7 Hz), 8,32 (2H, d, J = 9,1 Hz), 7,91 (1H, δ d, J = 2,7 Hz), 7,62 (2H, d, J = 9,1 Hz), 7,91 (1H, δ d, J = 2,7,8,7 Hz), 7,62 (2H, d, J = 8,7 Hz), 7,45 (1H, d, J = 5,5 Hz), 7,33 (1H, d, J = 8,7 Hz), 4,96 (2H, s), 3,80 (4H, m), 3,45 (2H, m), 3,20 (3H, s), 2.88 (4H, m), 2,45 (2H, m), 2,21 (6H, s).	RMN 'H (300 MHz, d ₅ -DMSO): 5 9,97 (1H, s), 8.62 (1H, d, J = 5,0 Hz), 8,36 (1H, d, J = 2,2 Hz), 8,26 (2H, d, J = 8,7 Hz), 8,02 (1H, dd, J = 2,3, J = 8,7 Hz), 7,63 (2H, d, J = 8,7 Hz), 7,54 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,51 (1H, d, J = 5,1 Hz), 4,97 (2H, s), 3,69 (4H, m), 3,21 (3H, s), 2,82 (4H, m).	RMN ¹H (300 MHz, d_c -DMSO): δ 9,73 (s, 1H), 9,34 (t, J = 4,8 Hz, 1H), 8,60 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 8,30 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 8,03 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,91 (s ₃ , 1H), 7,69 (s ₃ , J = 4,3 Hz, 1H), 7,49 (d, J = 5,4 Hz, 1H), 7,28 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 6,93 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 4,46 (s, 2H), 4,35 (d, J = 5,1 Hz, 2H), 3,42 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 1,56 (m, 2H), 0,88 (t, J = 7,5 Hz, 3H).	RMN 1 H (300 MHz, $_{0}$ -DMSO): 5 $_{10}$ 16 (s, 1H), 9,50 (s, 1H), 8,54 (d, $_{J}$ = 5,0 Hz, 1H), 8,52 (d, $_{J}$ = 2,5 Hz, 1H), 8,42 (dd, $_{J}$ = 8,0,2.0 Hz, 1H), 7,73 (d, $_{J}$ = 8,5 Hz, 1H), 7,63 (d, $_{J}$ = 9,0 Hz, 2H), 7,43 (d, $_{J}$ = 5,0 Hz, 1H), 6,92 (d, $_{J}$ = 9,0 Hz, 2H), 3,98 (s, 2H), 3,74 (t, $_{J}$ = 4,5 Hz, 4H), 3,04 (t, $_{J}$ = 5,0 Hz, 4H).
578,24	532,15	401,19	482,17
			THE PART OF THE PA
73	74	75	76

4-(2-(1H-indazol-5-ilamino)pirimidin-4-il)- N-(cianometil)benzamida	N-(1-cianociclopropil)-4-(2-(4- morfolinofenilamino)pirimidin-4- il)benzamida	4-(2-(3-(aliloximetil)-4- morfolinofenilamino)pirimidin-4-il)-N- (cianometil)benzamida	N-(cianometil)-4-(2-(4-(1-etilpiperidin-4- iloxi)fenilamino)pirimidin-4-il)benzamida
<i>m/z</i> 370,3 [M+H] [†]	<i>m⁄</i> 2 441,1 [M+H] [†]	<i>m/</i> 2 485,1 [M+H]⁺	<i>m/</i> 2 457,2 [M+H] [†]
RMN 'H (300 MHz, de-DMSO): δ 12,92 (s, 1H), 9,70 (s, 1H), 9,35 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 8,59 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 8,30 (d, J = 8,4 Hz, 3H), 8,04 (d, J = 8,4 Hz, 3H), 7,64 (m, 1H), 7,47 (m, 2H), 4,36 (d, J = 5,7 Hz, 2H).	RMN 'H (300 MHz, $d_{\rm c}$ -DMSO): δ 9,49 (s, 1H), 9,45 (s, 1H), 8,52 (d, J = 5 Hz, 1H), 8,24 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,98 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,98 (d, J = 5 Hz, 1H), 6,92 (d, J = 9 Hz, 2H), 7,39 (d, J = 5 Hz, 1H), 6,92 (d, J = 9 Hz, 2H), 3,74 (m, 4H), 3,04 (m, 4H), 1,58 (m, 2H), 1,31 (m, 2H).	RMN 'H (300 MHz, CDCl ₃): δ 8.49 (1H, d, J = 5.5 Hz), 8,17 (2H, d, J = 7.8 Hz), 7,89 (2H, d, J = 8.2 Hz), 7,75 (1H, d, J = 2.6 Hz), 7,65 (1H, dd, J = 8.7, 2.3 Hz), 7,23 (1H, sa), 7,15 (1H, d, J = 5.5 Hz), 7,15 (1H, d, J = 6.5 Hz), 7,15 (1H, d, J = 6.08-5.95 (1H, m), 5,37-5,30 (1H, m), 5,23-5,19 (1H, m), 4,65 (2H, s), 4,42 (2H, d, J = 6,1 Hz), 4,12 (2H, d, J = 5,3 Hz), 3,84 (4H, t, J = 4,4 Hz), 2,92 (4H, t, J = 4,6 Hz).	RMN 'H (300 MHz, d_2 -DMSO): δ 9,54 (s, 1H), 9,32 (m, 1H), 8,54 (d, J = 5,6 Hz, 1H), 8,26 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,68 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,41 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 6,92 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,41 (m, J = 5,2 Hz, 1H), 6,92 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 4,31 (m, 3H), 2,69 (m, 2H), 2,32 (m, 2H), 2,14 (m, 2H), 1,93 (m, 2H), 1,58 (m, 2H), 1,00 (m, 3H).
369,13	440,20	484,22	456,23
DE SEE			
12	78	79	08

N-(cianometil)-N-(4-(2-(3-fluoro-4- morfolinofenilamino)pirimidin-4- il)fenil)metanosulfonamida	N-(4-(2-(3-ciano-4- morfolinofenilamino)pirimidin-4-il)fenil)-N- (cianometil)metanosulfonamida	2-hidroxi-4-(2-(3- hidroxifenilamino)pirimidin-4-ii)benzoato de propilo	4-(4-amino-3-nitrofenil)-N-(6- morfolinopiridin-3-il)pirimidin-2-amina
<i>m/z</i> 483,0 [M+H]⁺	<i>m/z</i> 490,0 [M+H]⁺	<i>т/2</i> 366,3 [М+Н] [±]	<i>m/z</i> 394,1 [M+H]⁺
RMN ¹ H (300 MHz, d ₂ -DMSO): 5 9,74 (1H, s), 8,57 (1H, d, J = 5,0 Hz), 8,24 (2H, d, J = 8,7 Hz), 7,75 (1H, dd, J = 2,2,15,5 Hz), 7,63 (2H, d, J = 8,7 Hz), 7,52 (1H, dda, J = 2,0,8,7 Hz), 7,43 (1H, dd, J = 5,0 Hz), 7,02 (1H, dd, J = 8,7,9,1 Hz), 4,96 (2H, s), 3,73 (4H, m), 3,21 (3H, s), 2,94 (4H, m).	RMN ¹ H (300 MHz, <i>d_e</i> -DMSO): 5 9,88 (1H, s), 8,60 (1H, d, J = 5,5 Hz), 8,23 (2H, d, J = 8,7 Hz), 8,17 (1H, d, J = 2,7 Hz), 8,02 (1H, dd, J = 2,7, 9,1 Hz), 7,63 (2H, d, J = 8,7 Hz), 7,48 (1H, d, J = 5,5 Hz), 7,21 (1H, d, J = 9,1 Hz), 4,96 (2H, s), 3,75 (4H, m), 3,20 (3H, s), 3,06 (4H, m).	RMN 'H (CDCL ₃ /CD ₃ OD, 300 MHz): δ 8,47 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 7.98 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7.74 (d, J = 1,5 Hz, 1H), 7.74 (dd, 1.5 , J = 8,4 Hz, 1H), 7.74 (dd, J = 7,8 (dd, J = 7,9 (dd, J = 7,8 (dd, J = 7,1 Hz, 1H), J 1,15 (d, J = 7,1 (dd, J = 0,9 (dd, J =	RMN ¹ H (300 MHz, d_c -acetona): δ 8,92 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 8,57 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 8,4 (d, J = 5,3 Hz, 1H), 8,17 (dd, J = 8,9,2,2 Hz, 1H), 8,09 (dd, J = 9,1,2,8 Hz, 1H), 7,25 (d, J = 5,3 Hz, 1H), 7,18 (d, J = 8,9 Hz, 1H), 6,83 (d, J = 9,1 Hz, 1H), 3,75 (m, 4H), 3,42 (m, 4H), 3,22 (bs, 2H).
482,15	489,16	365,14	393,15
N N N N N N N N N N N N N N N N N N N	N N N N N N N N N N N N N N N N N N N	P S S S S S S S S S S S S S S S S S S S	A HIN N
20	82	83	84

2-ciano-N-(4-(2-(4- morfolinofenilamino)pirimidin-4- il)fenil)acetamida	ácido 5-(4-(4-(N- (cianometil)metilsulfonamido)fenil)pirimidi n-2-ilamino)-2-morfolinobenzoico	N-(cianometil)-4-(2-(4-(3- (dietilamino)propoxi)fenilamino)pirimidin- 4-il)benzamida	N-(cianometii)-4-(2-(4-(2- morfolinoetoxi)fenilamino)pirimidin-4- ii)benzamida
		_	_
RMN 'H (300 MHz, de-DMSO): 5 10,53 (s, 1H), 9,36 (s, 1H), 8,45 (d, J = 5,4 Hz, 1H), 8,14 (d, J = m/z 8,7 Hz, 2H), 7,69 (m, 4H), 7,28 (d, J = 5,4 Hz, 1H), 6,94 (d, J = 9,1 Hz, 2H), 3,96 (s, 2H), 3,74 [M+H]* (m, 4H), 3,05 (m, 4H)	RMN ¹H (300 MHz, d ₆ -DMSO): 5 17,23 (1H, s) m/z CO ₂ H, 9,99 (1H, s), 8,74 (1H, d, J = 2,7 Hz), 8,62 509,3 (1H, d, J = 5,0 Hz), 8,33 (2H, d, J = 8,7 Hz), 8,01 [M+H] (1H, dd, J = 2,7, 8,7 Hz), 7,69 (1H, d, J = 9,1 Hz), 7,63 (2H, d, J = 8,7 Hz), 7,52 (1H, d, J = 5,5 Hz), 7,63 (2H, d, J = 8,7 Hz), 7,52 (1H, d, J = 5,5 Hz), 8,07,4 (4H, m), 3,21 (3H, s), 3,06 (4H, [M+H]	RMM ¹H (300 MHz, d_c -DMSO): δ 9,51 (s, 1H), 9,34 (t, J = 5,5 Hz, 1H), 8,54 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 8,26 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 8,03 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,41 (d, J = 5,4 Hz, 1H), 459,4 6,90 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,41 (d, J = 5,4 Hz, 1H), 459,4 6,90 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 4,34 (d, J = 5,4 Hz, 2H), [M+H], 3,98 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 2,54 (m, 6H), 1,84 (m, 2H), 0,98 (t, J = 7,1 Hz, 6H).	RMN 1 H (300 MHz, 1 de-DMSO): 1 5 9,53 (s, 1H), 9,32 (t, 1 = 5,4 Hz, 1H), 8,55 (d, 1 = 5,4 Hz, 1H), 8,26 (d, 1 = 8,7 Hz, 2H), 7,69 (d, 1 = 8,7 Hz, 2H), 7,69 (d, 1 = 9,0 Hz, 2H), 7,42 (d, 1 = 5,4 Hz, 1H), 6,92 (d, 1 = 9,3 Hz, 2H), 4,35 (d, 1 = 5,4 Hz, 2H), 4,06 (t, 1 = 5,7 Hz, 2H), 3,58 (m, 4H), 2,69 (t, 1 = 5,8 Hz, 2H), 1,2,69 (t, 1 = 5,8 Hz, 2H), 2,48 (m, 4H, parcialmente oscurecida por la señal del DMSO).
414,18	508,15	458,24	458,21
	THE NAME OF THE PARTY OF THE PA		
88	98	87	88

N-(cianometil)-4-(2-{[4-(1,1-dioxo-1,4-tiomorfolin-4-il)fenil]amino}pirimidin-4-il)benzamida	N-(cianometil)-4-[2-{{4-[(1,1-dioxo-1,4-tiomorfolin-4-il)metil]fenil}amino)pirimidin-4-il]benzamida	N-(cianometil)-N-metil-4-(2-(4- morfolinofenilamino)pirimidin-4- il)benzamida	N-(cianometil)-4-(5-metil-2-(4- morfolinofenilamino)pirimidin-4- il)benzamida
<i>m/z</i> 463,3 [M+H]⁺	<i>m/z</i> 477,3 [M+H]⁺	<i>m/z</i> 429,3 [M+H] [†]	<i>m/</i> 2 429,4 [M+H] [†]
RMN 'H (300 MHz, d_e -DMSO): δ 9,52 (s, 1H), 9,32 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 8,54 (d, $J = 5,1$ Hz, 1H), 8,27 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 8,02 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,70 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 7,41 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H), 7,02 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H), 7,02 (d, $J = 5,4$ Hz, 2H), 4,35 (d, $J = 5,1$ Hz, 2H), 3,70 (m, 4H), 3,14 (m,4H).	RMN 'H (300 MHz, de-DMSO): δ 9,73 (s, 1H), 9,33 (t, $J = 5$,4 Hz, 1H), 8,60 (d, $J = 5$,1 Hz, 1H), 8,29 (d, $J = 8$,7 Hz, 2H), 7,80 (d, $J = 8$,7 Hz, 2H), 7,80 (d, $J = 8$,7 Hz, 2H), 7,48 (d, $J = 5$,1 Hz, 1H), 7,27 (d, $J = 8$,7 Hz, 2H), 4,36 (d, $J = 5$,4 Hz, 2H), 3,62 (s, 2H), 3,10 (m, 4H), 2,88 (m, 4H).	RMN 'H (300 MHz, de-DMSO): 5 9,46 (s, 1H), 8,52 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 8,23 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,65 (m, 4H), 7,37 (d, J = 5,4 Hz, 1H), 6,94 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 4,56 (§3, 2H), 3,74 (m, 4H), 3,04 (m, 7H).	RMN 'H (300 MHz, CDCl ₃): 5 8,31 (s, 1H), 7,90 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,73 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,51 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,51 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 6,96 (s, J H), 6,91 (d, J = 9,2 Hz, 2H), 6,56 (t, J = 5,7 Hz, 1H), 4,42 (d, J = 5,8 Hz, 2H), 3,86 (t, J = 4,8 Hz, 4H), 3,11 (t, J = 4,8 Hz, 4H), 2,23 (s, 3H).
462,15	476,16	428,20	428,20
	NH N		THE STATE OF THE S
68	06	91	92

N-(cianometil)-4-(5-fluoro-2-(4- morfolinofenilamino)pirimidin-4- il)benzamida
<i>m/z</i> 433,3 [M+H]⁺
RMN ¹ H (300 MHz, CDC ₁₃): 5 8,35 (d, <i>J</i> = 3,3 Hz, 1H), 8,22 (d, <i>J</i> = 8,1 Hz, 2H), 7,91 (d, <i>J</i> = 8,9 Hz, 2H), 7,51 (d, <i>J</i> = 9,1 Hz, 2H), 6,94 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2H), 6,45-6,44 (m, 1H), 4,43 (d, <i>J</i> = 5,7 Hz, 2H), 3,88 (t, <i>J</i> = 4,7 Hz, 4H), 3,13 (t, <i>J</i> = 4,8 Hz, 4H).
432,17
93

Las expresiones "alquilo C_{1^-6} " y "alquilo C_{1^-4} " se refieren a grupos hidrocarbonados de cadena lineal o de cadena ramificada que tienen de 1 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos incluyen etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, neopentilo y hexilo.

5 Las expresiones "alquileno C₁₋₆" y "alquileno C₁₋₄" son los equivalentes divalentes de "alquilo C₁₋₆" y "alquilo C₁₋₄".

El término "alquenilo C_{2-4} " se refiere a grupos hidrocarbonados de cadena lineal o de cadena ramificada que tiene al menos un doble enlace de estereoquímica ya sea E o Z cuando sea aplicable y de 2 a 4 átomos de carbono. Los ejemplos incluyen vinilo, 1-propenilo, 1- y 2-butenilo y 2-metil-2-propenilo.

10

El término "arilo" se refiere a residuos de hidrocarburos aromáticos simples, polinucleares, conjugados o condensados. Los ejemplos incluyen fenilo, bifenilo, terfenilo, cuaterfenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, antracenilo, dibidroantracenilo, benzantracenilo, dibenzantracenilo y fenantrenilo.

La expresión "heterociclilo insaturado de 5 o 6 miembros que contiene N" se refiere a grupos hidrocarbonados cíclicos, insaturados, que contienen al menos un nitrógeno.

Los grupos heterocíclicos que contienen N adecuados incluyen grupos heteromonocíclicos insaturados de 5 a 6 miembros que contienen de 1 a 4 átomos de nitrógeno, por ejemplo, pirrolilo, pirrolinilo, imidazolilo, pirazolilo, piridilo, pirimidinilo, pirazinilo, pirazinilo, triazolilo o tetrazolilo;

20 un grupo heteromonocíclico insaturado de 5 o 6 miembros que contiene de 1 a 2 átomos de oxígeno y de 1 a 3 átomos de nitrógeno, tal como, oxazolilo, isoxazolilo u oxadiazolilo; y

un grupo heteromonocíclico insaturado de 5 o 6 miembros que contiene de 1 a 2 átomos de azufre y de 1 a 3 átomos de nitrógeno, tales como, tiazolilo o tiadiazolilo.

25 El término "halógeno" se refiere a flúor, cloro, bromo y yodo.

alquilo, alquenilo, alquinilo o aralquilo.

El término "sustituido" se refiere a un grupo que está sustituido con uno o más grupos seleccionados entre alquilo C_{1-4} , cicloalquilo C_{3-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , alquilarilo C_{1-6} , arilo, heterociclilo, halo, haloarilo, haloheterociclilo, hidroxi, alcoxi C_{1-4} , ariloxi, carboxi, amino, alquilacilo C_{1-6} , arilacilo, heterociclilacilo, acilamino, aciloxi, alquilsulfenilo C_{1-6} , arilsulfonilo y ciano.

Los compuestos de la invención también pueden prepararse como sales que sean farmacéuticamente aceptables, pero se apreciará que las sales no farmacéuticamente aceptables también pertenecen al alcance de la presente invención, puesto que éstas son útiles como intermedios en la preparación de sales farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de cationes farmacéuticamente aceptables tales como sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, amonio y alquilamonio; sales de adición de ácido de ácidos inorgánicos farmacéuticamente aceptables tales como los ácidos clorhídrico, ortofosfórico, sulfúrico, fosfórico, nítrico, carbónico, bórico, sulfámico y bromhídrico; o sales de ácidos orgánicos farmacéuticamente aceptables tales como los ácidos acético, propiónico, butírico, tartárico, maleico, hidroximaleico, fumárico, cítrico, láctico, múcico, glucónico, benzoico, succínico, oxálico, fenilacético, metanosulfónico, trihalometanosulfónico, toluenosulfónico, bencenosulfónico, isetiónico, salicílico, sulfanílico, aspártico, glutámico, edético, esteárico, palmítico, oleico, láurico, pantoténico, tánico, ascórbico, valérico y orótico. Las sales de grupos amina también pueden comprender sales de amonio cuaternario en las que el átomo de nitrógeno del amino lleva un grupo orgánico adecuado tal como un resto

45

30

35

40

Las sales pueden formarse por medios convencionales, tales como haciendo reaccionar la forma de base libre del compuesto con uno o más equivalentes del ácido adecuado en un disolvente o medio en el que la sal sea insoluble o en un disolvente tal como el agua que se elimina al vacío o mediante liofilización o mediante el intercambio de los aniones de una sal existente por otro anión en una resina de intercambio iónico adecuada.

50

Cuando un compuesto posee un centro quiral, el compuesto puede utilizarse como un enantiómero o un diastereómero purificados o como una mezcla de cualquier relación de estereoisómeros. Sin embargo, se prefiere que la mezcla comprenda al menos el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 97,5 % o el 99 % del isómero preferido, donde el isómero preferido proporciona el nivel deseado de potencia y selectividad.

55

60

Esta invención también abarca profármacos de los compuestos de fórmula lb. La invención también abarca fármacos o profármacos de compuestos de la invención para su uso en métodos de tratamiento de trastornos que pueden tratarse mediante la inhibición de proteína-cinasas, tales como las JAK, en donde dichos métodos comprenden la administración de fármacos o profármacos de compuestos de la invención. Por ejemplo, los compuestos de fórmula lb que tienen grupos amino, amido, hidroxi o ácido carboxílico libres pueden convertirse en profármacos. Los profármacos incluyen compuestos en donde un residuo de aminoácido o una cadena polipeptídica de dos o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) residuos de aminoácidos están unidos covalentemente a través de enlaces peptídicos a los grupos amino, hidroxi y ácido carboxílico libres de los compuestos de la invención. Los residuos de aminoácidos incluyen los 20 aminoácidos de origen natural indicados habitualmente mediante símbolos de tres letras y también incluyen, 4-hidroxiprolina, hidroxilisina, demosina, isodemosina, 3-metilhistidina, norvalina, beta-alanina, ácido gamma-aminobutírico, citrulina, homocisteína, homoserina, ornitina y sulfona de metionina. Los

profármacos también incluyen compuestos en donde carbonatos, carbamatos, amidas y ésteres de alquilo están unidos covalentemente a los sustituyentes de los compuestos de la presente invención anteriores a través de la cadena lateral de carbono de carbonilo del profármaco. Los profármacos también incluyen derivados de fosfato de compuestos (tales como ácidos, sales de ácidos o ésteres) unidos a través de un enlace fósforo-oxígeno a un hidroxilo libre de los compuestos de fórmula lb. Los profármacos también pueden incluir N-óxidos y S-óxidos de átomos de nitrógeno y azufre adecuados de la fórmula lb.

Proceso

15

20

25

30

35

40

45

50

55

10 Los compuestos de fórmula general lb se preparan generalmente a partir de una dicloropirimidina.

La primera etapa del proceso normalmente comienza con una reacción de acoplamiento cruzado entre una 2,4 dicloropirimidina y un compañero de acoplamiento adecuadamente funcionalizado. Como alternativa, la dicloropirimidina puede convertirse en una diyodopirimidina, que después se acopla con un compañero de acoplamiento adecuadamente funcionalizado. Los compañeros de acoplamiento típicos son ácidos o ésteres organobóricos (acoplamiento de Suzuki: véase, por ejemplo Miyaura, N. y Suzuki, *Chem Rev.*, 1995, 95 2457), organoestananos (acoplamiento de Stille: véase, por ejemplo Stille, J. K., *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, 1986, 25, 508), reactivos de Grignard (acoplamiento de Kumada: Kumada, M.; Tamao, K.; Sumitani, K. *Org Synth.*, 1988, Vol. Col. 6, 407) o especies de organozinc (acoplamiento de Negishi: Negishi, E.; *J. Organomet. Chem.*, 2002, 653, 34). El acoplamiento de Suzuki es el método de acoplamiento preferido y se realiza normalmente en un disolvente tal como DME, THF, DMF, etanol, propanol, tolueno, acetonitrilo o 1,4-dioxano, con o sin agua añadida, en presencia de una base tal como carbonato de sodio o de potasio, hidróxido de litio, carbonato de cesio, hidróxido de sodio, fluoruro de potasio o fosfato de potasio. La reacción puede realizarse a temperaturas elevadas y el catalizador de paladio empleado puede seleccionarse entre Pd(PPh₃)₄, Pd(OAc)₂, [PdCl₂(dppf)], Pd₂(dba)₃/P(t-Bu)₃.

La segunda etapa del proceso implica una reacción de sustitución aromática nucleófila del derivado anterior con una anilina adecuadamente sustituida. La sustitución aromática nucleófila se realiza normalmente mediante la adición de la anilina al intermedio heterocíclico monohalo obtenido de la primera reacción en un disolvente tal como etanol, n-propanol, isopropanol, terc-butanol, dioxano, THF, DMF, tolueno o xileno. La reacción se realiza normalmente a temperatura elevada en presencia de un ácido tal como HCl o ácido p-toluenosulfónico o en presencia de una base tal como una base no nucleófila tal como trietilamina o diisopropiletilamina o una base inorgánica tal como carbonato de potasio o carbonato de sodio.

Como alternativa, el sustituyente anilina puede introducirse a través de una reacción de aminación catalizada por un metal de transición. Los catalizadores típicos para dichas transformaciones incluyen Pd(OAc)₂/P(t-Bu)₃, Pd₂(dba)₃/BINAP y Pd(OAc)₂/BINAP. Estas reacciones se realizan normalmente en disolventes tales como tolueno o dioxano, en presencia de bases tales como carbonato de cesio o *terc*-butóxido de sodio o de potasio a temperaturas que van desde la temperatura ambiente hasta hacer hervir a reflujo (por ejemplo, Hartwig, J. F., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1998, 37, 2046).

Las anilinas empleadas en la primera etapa de la síntesis de estos compuestos se obtienen en el mercado o se preparan utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la materia.

Los productos formados a partir de cualquiera de las etapas de reacción pueden derivatizarse adicionalmente utilizando técnicas conocidas por los expertos en la materia. Como alternativa, la derivatización del intermedio monohalo puede realizarse antes del desplazamiento del sustituyente halo. Los expertos en la materia apreciarán que el orden de las reacciones descritas para las síntesis anteriores puede cambiarse en ciertas circunstancias y que ciertos grupos funcionales pueden necesitar ser derivatizados (es decir, protegidos), en ciertos casos, para las reacciones descritas anteriormente para que transcurran con un rendimiento y eficacia razonables. Los tipos de grupos funcionales protectores son bien conocidos por los expertos en la materia y se describen por ejemplo en Greene (Greene, T., Wuts, P. (1999) *Protective Groups in Organic Synthesis*. Wiley-Interscience; 3ª edición).

El grupo saliente del compuesto de fórmula II, que es un intermedio utilizado en el proceso de la presente invención, puede ser de cualquier tipo conocido adecuado, tal como los desvelados en J. March, "Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Estructures" 4ª Edición, págs. 352-357, John Wiley & Sons, Nueva York, 1992. Preferentemente, el grupo saliente es halógeno, más preferentemente cloro o yodo.

Inhibición de las JAK

Los compuestos de fórmula Ib tienen actividad contra las proteína-cinasas, en particular las cinasas JAK y más particularmente son activos contra la JAK2. Un inhibidor de la JAK2 es cualquier compuesto que inhibe selectivamente la actividad de la JAK2. Una actividad de la JAK2 es fosforilar una proteína STAT. Por tanto, un ejemplo de un efecto de un inhibidor de la JAK2 es disminuir la fosforilación de una o más proteínas STAT. El inhibidor puede inhibir la forma fosforilada de la JAK2 o la forma no fosforilada de la JAK2.

La presente divulgación también proporciona el uso de inhibidores de cinasas tales como los inhibidores de las

cinasas JAK, en particular los inhibidores de la JAK2.

Composiciones farmacéuticas

30

35

60

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden al menos uno de los compuestos de fórmula Ib y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Que el vehículo debe ser "farmacéuticamente aceptable" significa que sea compatible con los otros ingredientes de la composición y que no sea perjudicial para un sujeto. Las composiciones de la presente invención pueden contener otros agentes terapéuticos como se describen a continuación y pueden formularse, por ejemplo, mediante el empleo de vehículos o diluyentes sólidos o líquidos convencionales, así como aditivos farmacéuticos de un tipo adecuado al modo de administración deseado (por ejemplo, excipientes, aglutinantes, conservantes, estabilizantes, sabores, etc.) de acuerdo con técnicas tales como aquellas bien conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica (Véase, por ejemplo, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21ª Ed, 2005, Lippincott Williams & Wilkins).

Los compuestos de la invención pueden administrarse por cualquier medio adecuado, por ejemplo, por vía oral, tal como en forma de comprimidos, cápsulas, gránulos o polvos; por vía sublingual; por vía bucal; por vía parenteral, tal como por inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intra(trans)dérmica o intracisternal o técnicas de infusión (por ejemplo, como soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas inyectables estériles); por vía nasal tal como mediante pulverización o insuflación para inhalación; por vía tópica, tal como en forma de una crema o pomada; por vía ocular en forma de una solución o suspensión; por vía vaginal en forma de pesarios, tampones o cremas o por vía rectal tal como en forma de supositorios; en formulaciones de dosificación unitaria que contengan vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables no tóxicos. Los compuestos pueden administrarse, por ejemplo, en una forma adecuada para la liberación inmediata o la liberación prolongada. La liberación inmediata o la liberación prolongada pueden lograrse mediante el uso de composiciones farmacéuticas adecuadas que comprendan los presentes compuestos, o, particularmente en el caso de la liberación prolongada, mediante el uso de dispositivos tales como implantes subcutáneos o bombas osmóticas.

Las composiciones farmacéuticas para la administración de los compuestos de la invención pueden presentarse convenientemente en formas de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Estos métodos generalmente incluyen la etapa de asociar el compuesto de fórmula lb con el vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones farmacéuticas se preparan asociando uniforme e íntimamente el compuesto de fórmula lb con un vehículo líquido o un vehículo sólido finamente dividido o ambos y después, si es necesario, conformando el producto en la formulación deseada. En la composición farmacéutica el compuesto activo objeto está incluido en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado sobre el proceso o afección de las enfermedades. Como se utiliza en el presente documento, se pretende que el término "composición" abarque un producto que comprende los ingredientes especificados en las cantidades especificadas, así como cualquier producto que sea resultado, directa o indirectamente, de la combinación de los ingredientes especificados en las cantidades especificadas.

40 Las composiciones farmacéuticas que contiene el compuesto de fórmula lb pueden estar en una forma adecuada para su uso oral, por ejemplo, en forma de comprimidos, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas o jarabes o elixires. Las composiciones destinadas al uso oral pueden prepararse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y dichas composiciones pueden contener uno o más agentes tales como agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes conservantes, por ejemplo, 45 para proporcionar preparaciones farmacéuticamente estables y de sabor agradable. Los comprimidos contienen el compuesto de fórmula Ib en mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Estos excipientes pueden ser por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes granulantes y 50 disgregantes, por ejemplo, almidón de maíz o ácido algínico; agentes aglutinantes, por ejemplo almidón, gelatina o goma arábiga y agentes lubricantes, por ejemplo estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden estar sin recubrir o pueden recubrirse mediante técnicas conocidas para retrasar la desintegración y la absorción en el tracto gastrointestinal y proporcionar de este modo una acción sostenida durante un periodo más largo. Por ejemplo, puede emplearse un material de retardo temporal tal como monoestearato de glicerilo o 55 diestearato de glicerilo. También pueden recubrirse para formar comprimidos terapéuticos osmóticos para la liberación controlada.

Las formulaciones para su uso oral también pueden presentarse como cápsulas de gelatina dura en donde el compuesto de fórmula lb se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda en donde el compuesto de fórmula lb se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

Las suspensiones acuosas contienen los materiales activos en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes son agentes suspensores, por ejemplo carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábiga; los agentes dispersantes o humectantes pueden ser un fosfátido de origen natural,

por ejemplo lecitina, o productos de la condensación de un óxido de alquileno con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno, o productos de la condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoxicetanol, o productos de la condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de sorbitol polioxietileno, o productos de la condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de sorbitán polietileno. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo *p*-hidroxibenzoato de etilo o de n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

Las suspensiones oleosas pueden formularse suspendiendo el compuesto de fórmula Ib en un aceite vegetal, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo cera de abejas, parafina sólida o alcohol cetílico. Pueden añadirse agentes edulcorantes tales como aquellos expuestos anteriormente y agentes aromatizantes para proporcionar una preparación oral de sabor agradable. Estas composiciones pueden conservarse mediante la adición de un antioxidante tal como el ácido ascórbico.

Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el compuesto de fórmula lb en mezcla con un agente dispersante o humectante, un agente suspensor y uno o más conservantes. Los agentes dispersantes o humectantes y agentes suspensores adecuados se ejemplifican por aquellos ya mencionados anteriormente. También pueden estar presentes excipientes adicionales, por ejemplo agentes edulcorantes, aromatizantes y colorantes.

20

25

30

35

40

45

55

60

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden estar en forma de emulsiones aceite-en-agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo aceite de oliva o aceite de cacahuete o un aceite mineral, por ejemplo parafina líquida o mezclas de éstos. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas de origen natural, por ejemplo goma arábiga o goma de tragacanto, fosfátidos de origen natural, por ejemplo soja, lecitina y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de sorbitán polioxietileno y productos de la condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo monooleato de sorbitán polioxietileno. Las emulsiones también pueden contener agentes edulcorantes y aromatizantes.

Los jarabes y elixires pueden formularse con agentes edulcorantes, por ejemplo glicerol, propilenglicol, sorbitol o sacarosa. Dichas formulaciones también pueden contener un demulcente, un conservante y agentes aromatizantes y colorantes.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una suspensión inyectable estéril acuosa u oleaginosa. Esta suspensión puede formularse de acuerdo con la técnica conocida utilizando aquellos agentes dispersantes o humectantes y agentes suspensores adecuados que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable atóxico, por ejemplo como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están el agua, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro de sodio. Además, se emplean convencionalmente aceites no volátiles estériles como un medio disolvente o suspensor. Para este fin puede emplearse cualquier aceite no volátil suave incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como el ácido oleico encuentran un uso en la preparación de formulaciones inyectables.

Para la administración a las vías respiratorias, incluida la administración intranasal, el compuesto activo puede administrarse mediante cualquiera de los métodos y formulaciones empleados en la técnica para la administración al tracto respiratorio.

Por tanto, en general, el compuesto activo puede administrarse en forma de una solución o una suspensión o como un polvo seco.

Las soluciones y suspensiones serán generalmente acuosas, por ejemplo preparadas a partir de agua sola (por ejemplo agua estéril o apirógena) o de agua y un cosolvente fisiológicamente aceptable (por ejemplo etanol, propilenglicol o polietilenglicoles tales como PEG 400).

Dichas soluciones o suspensiones pueden contener adicionalmente otros excipientes, por ejemplo, conservantes (tales como cloruro de benzalconio), agentes solubilizantes/tensioactivos tales como polisorbatos (por ejemplo, Tween 80, Span 80, cloruro de benzalconio), agentes tamponantes, agentes de ajuste de isotonicidad (por ejemplo cloruro de sodio), potenciadores de la absorción y potenciadores de la viscosidad. Las suspensiones pueden contener adicionalmente agentes suspensores (por ejemplo, celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa de sodio).

Las soluciones o suspensiones se aplican directamente en la cavidad nasal por medios convencionales, por ejemplo con un cuentagotas, pipeta o nebulizador. Las formulaciones pueden proporcionarse en forma de dosis única o de múltiples dosis. En este último caso se proporciona de forma deseable un medio de dosificación. En el caso de un

cuentagotas o pipeta esto puede conseguirse mediante la administración de un volumen predeterminado adecuado de la solución o suspensión por el sujeto. En el caso de un nebulizador esto puede conseguirse por ejemplo por medio de una bomba nebulizadora atomizadora dosificadora.

La administración en el tracto respiratorio también puede conseguirse por medio de una formulación en aerosol en la que el compuesto se proporciona en un envase presurizado con un propulsor adecuado, tal como un clorofluorocarbono (CFC), por ejemplo diclorodifluorometano, triclorofluorometano o diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. El aerosol también puede contener convenientemente un tensioactivo tal como la lecitina. La dosis de compuesto activo puede controlarse mediante el suministro de una válvula dosificadora.

10

15

Como alternativa, el compuesto activo puede proporcionarse en forma de un polvo seco, por ejemplo una mezcla en polvo del compuesto en una base en polvo adecuada tal como lactosa, almidón, derivados de almidón tales como hidroxipropilmetilcelulosa y polivinilpirrolidona (PVP). Convenientemente, el vehículo en polvo formará un gel en la cavidad nasal. La composición en polvo puede presentarse en forma de dosis unitaria, por ejemplo en cápsulas o cartuchos de por ejemplo, gelatina, o envases blíster a partir de los cuales el polvo puede administrarse por medio de un inhalador.

En las formulaciones destinadas a la administración en el tracto respiratorio, incluyendo las formulaciones intranasales, el compuesto activo por lo general tiene un tamaño de partícula pequeño, por ejemplo del orden de 5 micrómetros o menos. Un tamaño de partícula de este tipo puede obtenerse por medios conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante micronización.

Cuando se desee, pueden emplearse formulaciones adaptadas para proporcionar una liberación sostenida del compuesto activo.

25

40

45

50

20

El compuesto activo puede administrarse por inhalación oral en forma de un polvo fluido a través de un "Diskhaler" (marca comercial de Glaxo Group Ltd) o un inhalador de aerosol dosificador.

Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse en forma de supositorios para la 30 administración rectal del fármaco. Estas composiciones pueden prepararse mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado que sea sólido a temperaturas habituales pero líquido a la temperatura rectal y por tanto se funda en el recto para liberar el fármaco. Dichos materiales son la manteca de cacao y los polietilenglicoles.

Las composiciones adecuadas para la administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o pulverizaciones que contengan además del principio activo, vehículos tales como 35 los que se sabe en la técnica que son adecuados.

Para el uso tópico, se emplean cremas, pomadas, jaleas, soluciones o suspensiones, etc., que contienen los compuestos de la presente invención. (Para los fines de la presente solicitud, la aplicación tópica incluirá los enjuagues bucales y las gárgaras.)

Para la aplicación en el ojo, el compuesto activo puede estar en forma de una solución o suspensión en un vehículo estéril acuoso o no acuoso adecuado. También pueden incluirse aditivos, por ejemplo tampones, conservantes incluyendo agentes bactericidas y fungicidas, tales como acetato o nitrato fenilmercúrico, cloruro de benzalconio o clorhexidina y agentes espesantes tales como la hipromelosa.

Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse en forma de liposomas. Como se sabe en la técnica, los liposomas derivan generalmente de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas. Los liposomas están formados por cristales líquidos hidratados mono o multilamelares que se dispersan en un medio acuoso. Puede utilizarse cualquier lípido atóxico, fisiológicamente aceptable y metabolizable capaz de formar liposomas. Las presentes composiciones en forma de liposomas pueden contener, además de un compuesto de la presente invención, estabilizantes, conservantes, excipientes y similares. Los lípidos preferidos son los fosfolípidos y fosfatidilcolinas, tanto naturales como sintéticos. Los métodos para formar liposomas se conocen en la técnica.

55 La eficacia de esta clase de compuestos puede ser aplicable a estents liberadores de fármacos. Las posibles aplicaciones de los estents liberadores de fármacos con estos compuestos incluyen la estenosis de la arteria pulmonar, la estenosis de la vena pulmonar, así como la estenosis de la arteria coronaria. Los estents liberadores de fármacos también pueden utilizarse en injertos de vena safena o en injertos o conductos arteriales. Los estents liberadores de fármacos que liberan esta clase de compuestos también pueden ser aplicables al tratamiento de las 60 estenosis de la aorta o las arterias periféricas, tales como la arteria ilíaca, la arteria femoral o la arteria poplítea. El compuesto puede unirse al estent liberador de fármaco mediante cualquiera de los diversos métodos conocidos en el campo. Los ejemplos de dichos métodos incluyen los polímeros, la fosforilcolina y las cerámicas. El compuesto también puede impregnarse en un estent bioabsorbible.

Los compuestos activos también pueden presentarse para su uso en forma de composiciones veterinarias, que pueden prepararse, por ejemplo, mediante métodos que son convencionales en la técnica. Los ejemplos de dichas

composiciones veterinarias incluyen aquellas adaptadas para:

- (a) la administración oral, la aplicación externa, por ejemplo pociones (por ejemplo, soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas); comprimidos o bolos; polvos, gránulos o pellets para la mezcla con la alimentación animal; pastas para la aplicación a la lengua;
- (b) la administración parenteral por ejemplo por inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa, por ejemplo en forma de una solución o suspensión estéril; o (cuando sea adecuado) por inyección intramamaria donde se introduce una suspensión o una solución en la ubre a través del pezón;
- (c) aplicaciones tópicas, por ejemplo, en forma de una crema, pomada o pulverización aplicada a la piel; o
- (d) por vía rectal o intravaginal, por ejemplo, en forma de un pesario, crema o espuma.

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender adicionalmente otros compuestos terapéuticamente activos, como se señaló en el presente documento, que se aplican generalmente en el tratamiento de las afecciones patológicas anteriormente mencionadas. La selección de los agentes adecuados para su uso en la terapia de combinación puede realizarse por una persona con experiencia habitual en la técnica, de acuerdo con los principios farmacéuticos convencionales. La combinación de agentes terapéuticos puede actuar sinérgicamente para efectuar el tratamiento o prevención de los diversos trastornos descritos anteriormente. Utilizando este enfoque, uno puede ser capaz de conseguir la eficacia terapéutica con dosis más bajas de cada agente, reduciendo de este modo la posibilidad de efectos secundarios adversos.

20

25

30

35

5

10

15

Los ejemplos de otros agentes terapéuticos incluyen los siguientes: antagonistas de los receptores de endotelina (por ejemplo, ambrisentán, bosentán, sitaxsentán), inhibidores de la PDE-V (por ejemplo, sildenafilo, tadalafilo, vardenafilo), bloqueantes de los canales de calcio (por ejemplo, amlodipino, felodipino, verapamilo, diltiazem, mentol), prostaciclina, treprostinilo, iloprost, beraprost, óxido nítrico, oxígeno, heparina, warfarina, diuréticos, digoxina, ciclosporinas (por ejemplo, ciclosporina A), CTLA4-Ig, anticuerpos tales como ICAM-3, anti-receptor de la IL-2 (Anti-Tac), anti-CD45RB, anti-CD2, anti-CD3 (OKT-3), anti-CD4, anti-CD80, anti-CD86, agentes que bloquean la interacción entre CD40 y gp39, tales como anticuerpos específicos para CD40 y/o gp39 (es decir, CD154), proteínas de fusión construidas a partir de CD40 y gp39 (CD401g y CD8gp39), inhibidores, tales como inhibidores nucleares de la translocación, de la función NF-kappa B, tales como desoxiespergualina (DSG), inhibidores de la biosíntesis del colesterol tales como inhibidores de la HMG CoA reductasa (lovastatina y simvastatina), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) tales como ibuprofeno, aspirina, acetaminofeno, leflunomida, desoxiespergualina, inhibidores de la ciclooxigenasa, tales como celecoxib, esteroides tales como prednisona o dexametasona, compuestos de oro, los agonistas beta tales como salbutamol, ABLD tales como salmeterol, antagonistas de los leucotrienos, tales como montelukast, agentes antiproliferativos tales como metotrexato, FK506 (tacrolimus, Prograf), micofenolato de mofetilo, fármacos citotóxicos tales como azatioprina, VP-16, etopósido, fludarabina, doxorrubicina, adriamicina, amsacrina, camptotecina, citarabina, gemcitabina, fluorodesoxiuridina, melfalán y ciclofosfamida, antimetabolitos tales como metotrexato, inhibidores de topoisomerasas tales como camptotecina, agentes alquilantes de ADN tales como cisplatino, inhibidores de cinasas tales como sorafenib, tóxicos de microtúbulos tales como paclitaxel, inhibidores de TNF-α tales como tenidap, anticuerpos anti-TNF o receptor de TNF soluble, hidroxiurea y rapamicina (sirolimus o Rapamune) o derivados de los mismos.

40

Cuando otros agentes terapéuticos se emplean en combinación con los compuestos de la presente invención, pueden utilizarse por ejemplo en cantidades como se indican en el *Physician Desk Reference* (PDR) o según se determine de otra manera por un experto habitual en la técnica.

45

50

55

65

Métodos de Tratamiento

Los compuestos de fórmula lb pueden utilizarse en el tratamiento de enfermedades asociadas a cinasas incluyendo las enfermedades asociadas a las cinasas JAK tales como enfermedades inmunitarias e inflamatorias, incluyendo los trasplantes de órganos; enfermedades hiperproliferativas, incluyendo el cáncer y las enfermedades mieloproliferativas; enfermedades virales; enfermedades metabólicas y enfermedades vasculares.

En general, el término "tratamiento" significa afectar a un sujeto, tejido o célula para obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado e incluye: (a) prevenir que la enfermedad se produzca en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad, pero que aún no se ha diagnosticado que la tiene; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo o (c) aliviar o mejorar los efectos de la enfermedad, es decir, provocar la regresión de los efectos de la enfermedad.

El término "sujeto" se refiere a cualquier animal que tenga una enfermedad que requiera el tratamiento con el compuesto de fórmula lb.

Además de los primates, tales como los seres humanos, puede tratarse otros diversos mamíferos utilizando los compuestos y composiciones de la presente invención. Por ejemplo, pueden tratarse mamíferos incluyendo, pero no limitados a, vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, cobayas, ratas u otras especies bovinas, ovinas, equinas, caninas, felinas, roedoras o murinas. Sin embargo, la invención también puede practicarse en otras especies, tales como especies aviares (por ejemplo, pollos).

El término "administración" debe entenderse que significa proporcionar un compuesto de la invención a un sujeto que necesita tratamiento.

La expresión "enfermedades asociadas a cinasas" se refiere a un trastorno o trastornos que son resultado directo o indirecto o se agravan por la actividad cinasa anormal, en particular la actividad JAK, y/o que se alivian mediante la inhibición de una o más de estas enzimas cinasas.

En una realización preferida, la patología asociada a cinasas implica una o más de las cinasas JAK, JAK1, JAK2, JAK3 o TYK2. En una realización particularmente preferida, la enfermedad implica la cinasa JAK2. Dichas enfermedades incluyen, pero no se limitan a, las enumeradas en la Tabla a continuación.

10

Activación de la vía JAK/STAT en diversas patologías

		(/STAT en diversas pa		10
Tipo de enfermedad	Tipos celulares implicados	Citocinas implicadas	Cinasa JAK implicada	Características
<u>Atopia</u>				
Asma alérgica, dermatitis atópica (eccema), rinitis alérgica,	Mastocitos, eosinófilos, células T, células B,		JAK1, JAK2, JAK3, Tyk2	Activación de las células B por las células T seguida de la activación de mastocitos residentes y eosinófilos mediada por IgE
	Células T, células	11 2 11 4 11 5 11 6	JAK1,	Activación de células B
Dermatitis alérgica de contacto, neumonitis por hipersensibilidad	B, macrófagos, neutrófilos	IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IFNy, TNF, IL- 7, IL-13,		y/o Т _{DH} . Activación de macrófagos/granulocitos
Enfermedades autoinmunes				
Esclerosis múltiple, glomerulonefritis, lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide, artritis juvenil, síndrome de Sjögren, esclerodermia, polimiositis, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica Trasplante	células B, células T, monocitos, macrófagos, neutrófilos, mastocitos, eosinófilos,		JAK1, JAK2, JAK3, Tyk2	Producción de citocinas (por ejemplo TNFα/β, IL-1, CSF-1, GM-CSF), activación de células T, activación de células B, activación de JAK/STAT
Rechazo de aloinjerto EICH	Células T, células B, macrófagos	IL-13, TNF	JAK1, JAK2, JAK3	Necrosis mediada por macrófagos/células T, apoptosis mediada por células Tc, opsonización/necrosis del injerto ajeno mediada por célula B/lg
Enfermedades Virales				
Virus de Epstein Barr (VEB)	Linfocitos	Citocinas virales,	JAK1,	Mediación de JAK/STAT
Hepatitis B	Hepatocitos	IL-2,	JAK2,	
Hepatitis C	Hepatocitos		JAK3	
VIH	Linfocitos			
VLTH 1	Linfocitos			
Virus de la varicela-zoster (VVZ) Virus del Papiloma Humano (VPH)	Fibroblastos Células epiteliales			
<u>Enfermedades</u>				
hiperproliferativas – cáncer				
Leucemia	Leucocitos	Varias citocinas	JAK1,	Producción de citocinas,
Linfoma	Linfocitos	autocrinas, Activación intrínseca	JAK2,	activación de JAK/STAT
Mieloma Múltiple	Varios	Activación muniseca	JANS	
Cáncer de próstata	Varios			
Cáncer de mama	Varios			
Linfoma de Hodgkins Leucemia linfocítica crónica de	Varios Varios			
células B	v al iUS			
Cáncer de pulmón	Varios			

Hepatoma	Varios			
Glioma melanoma metastásico	Varios			
<u>Enfermedades</u>				
mieloproliferativas				
Policitemia vera (PV), mielofibrosis primaria, trombocitemia, trombocitemia esencial (TE), mielofibrosis idiopática, leucemia mielógena crónica, mastocitosis sistémica (MS), leucemia neutrofílica crónica (LNC), síndrome mielodisplásico (SMD), la enfermedad mastocitaria sistémica (EMS)		Interleucina-3, eritropoyetina, trombopoyetina	Mutación de la JAK2	Activación de JAK/STAT
Enfermedad vascular				
Hipertensión, hipertrofia, insuficiencia cardíaca, isquemia, hipertensión arterial pulmonar	células del	IL-6, angiotensina II, LIP, TNFα, serotonina, caveolina 1	JAK1, JAK2, TYK2	Activación de JAK/STAT
Enfermedad metabólica Obesidad, síndrome metabólico	Adipocitos, células pituitarias, neuronas, monocitos	Leptina	JAK2	Activación de JAK/STAT

La expresión "enfermedad inmunitaria e inflamatoria" se refiere a una enfermedad inmunitaria, inflamatoria o autoinmune, incluyendo, pero no limitada a, artritis reumatoide, poliartritis, espondilitis reumatoide, osteoartritis, gota, asma, bronquitis, rinitis alérgica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome del intestino irritable, colitis mucosa, colitis ulcerosa, colitis diabética, enfermedad de Crohn, trastornos autoinmunes de la tiroides, gastritis, esofagitis, hepatitis, pancreatitis, nefritis, psoriasis, eczema, acné vulgaris, dermatitis, urticaria, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad neurodegenerativa (enfermedad de Lou Gehrig), enfermedad de Paget, sepsis, conjuntivitis, catarro renal, artrorreumatismo crónico, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), polimiositis, dermatomiositis (DM), poliarteritis nodosa (PN), trastorno mixto del tejido conectivo (EMTC), síndrome de Sjoegren, síndrome de Crouzon, acondroplasia, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, vasculitis, displasia tanatofórica, resistencia a la insulina, diabetes de tipo I y complicaciones de la diabetes y síndrome metabólico.

10

15

20

30

La expresión "enfermedades hiperproliferativas" incluye el cáncer y las patologías mieloproliferativas tales como las patologías proliferativas celulares, incluyendo pero no limitadas a: <u>Cardíacas:</u> sarcoma (angiosarcoma, fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, liposarcoma), mixoma, rabdomioma, fibroma, lipoma y teratoma; Pulmonares: carcinoma broncogénico (células escamosas, células pequeñas indiferenciadas, células grandes indiferenciadas, adenocarcinoma), carcinoma alveolar (bronquiolar), adenoma bronquial, sarcoma, linfoma, hamartoma condromatoso, mesotelioma; Gastrointestinales: esófago (carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, leiomiosarcoma, linfoma), estómago (carcinoma, linfoma, leiomiosarcoma), páncreas (adenocarcinoma ductal, insulinorna, glucagonoma, gastrinoma, tumores carcinoides, vipoma), intestino delgado (adenocarcinoma, linfoma, tumores carcinoides, sarcoma de Kaposi, leiomioma, hemangioma, lipoma, neurofibroma, fibroma), intestino grueso (adenocarcinoma, adenoma tubular, adenoma velloso, hamartoma, leiomioma); Tracto genitourinario: riñón (adenocarcinoma, tumor de Wilms [nefroblastoma], linfoma, leucemia), vejiga y uretra (carcinoma de células escamosas, carcinoma de células transicionales, adenocarcinoma), próstata (adenocarcinoma, sarcoma), testículos (seminoma, teratoma, carcinoma embrionario, teratocarcinoma, coriocarcinoma, sarcoma, carcinoma de células intersticiales, fibroma, fibroadenoma, tumores adenomatoides, lipoma); Hepáticas: hepatoma (carcinoma hepatocelular), colangiocarcinoma, hepatoblastoma, angiosarcoma, adenoma hepatocelular, hemangioma; Óseas: sarcoma osteogénico (osteosarcoma), fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, linfoma maligno (sarcoma de células reticulares), mieloma múltiple, tumor maligno de las células gigantes, cordoma, osteocondroma (exostosis osteocartilaginosas), condroma benigno, condroblastoma, condromixofibroma, osteoma osteoide y tumores de las células gigantes, Sistema nervioso: cráneo (osteoma, hemangioma, granuloma, xantoma, osteítis deformante), meninges (meningioma, meningiosarcoma, gliomatosis), cerebro (astrocitoma,

meduloblastoma, glioma, ependimoma, germinoma [pinealoma], glioblastoma multiforme, oligodendroglioma, schwannoma, retinoblastoma, tumores congénitos), neurofibroma de la médula espinal, meningioma, glioma, sarcoma); Ginecológicas: útero (cáncer de endometrio), cuello uterino (carcinoma cervical, displasia cervical pretumoral), ovarios (carcinoma de ovario [cistadenocarcinoma seroso, cistadenocarcinoma mucinoso, carcinoma no clasificado], tumores de células granulosas tecales, tumores de células de Sertoli-Leydig, disgerminoma, teratoma maligno), vulva (carcinoma de células escamosas, carcinoma intraepitelial, adenocarcinoma, fibrosarcoma, melanoma), vagina (carcinoma de células claras, carcinoma de células escamosas, sarcoma botrioide [rabdomiosarcoma embrionario]), trompas de Falopio (carcinoma); Hematológicas: sangre (leucemia mieloide [aguda y crónica], leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico), enfermedad de Hodgkin, linfoma de no-Hodgkin [linfoma maligno; Piel: melanoma maligno, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi, lunares nevos displásicos, lipoma, angioma, dermatofibroma, queloides, psoriasis, Glándulas suprarrenales: neuroblastoma y Enfermedades mieloproliferativas tales como la policitemia vera (PV), mielofibrosis primaria, trombocitopenia, trombocitemia esencial (TE), metaplasia mieloide agnogénica (MMA), también denominada mielofibrosis idiopática (MFI), leucemia mielógena crónica (LMC), mastocitosis sistémica (MS), leucemia neutrofílica crónica (LNC), síndrome mielodisplásico (SMD) y enfermedad mastocitaria sistémica (EMC).

La expresión "enfermedades vasculares" se refiere a enfermedades incluyendo, pero no limitadas a, enfermedades cardiovasculares, hipertensión, hipertrofia, hipercolesterolemia, hiperlipidemia, trastornos trombóticos, ictus, fenómeno de Raynaud, síndrome POEMS, angina, isquemia, migraña, arteriopatía periférica, insuficiencia cardíaca, reestenosis, ateroesclerosis, hipertrofia ventricular izquierda, infarto de miocardio, enfermedades isquémicas del corazón, riñón, hígado y cerebro e hipertensión arterial pulmonar.

Las enfermedades preferida para los inhibidores selectivos de la JAK2 incluyen enfermedades inmunitarias e inflamatorias tales como enfermedades autoinmunes, por ejemplo, dermatitis atópica, asma, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, psoriasis, síndrome de Crouzon, acondroplasia, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, enfermedad mixta del tejido conectivo, vasculitis, displasia tanatofórica y diabetes; trastornos hiperproliferativos tales como el cáncer, por ejemplo, el cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de hígado tal como el hepatoma, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello tal como el glioma, cáncer de piel tal como el melanoma metastásico, leucemia, linfoma, mieloma múltiple y enfermedades mieloproliferativas tales como la policitemia vera (PV), mielofibrosis, trombocitopenia, trombocitemia esencial (TE), metaplasia mieloide agnogénica (MMA), también denominada mielofibrosis idiopática (MFI) y leucemia mielógena crónica (LMC) y enfermedades vasculares tales como la hipertensión, hipertrofia, ictus, fenómeno de Raynaud, síndrome POEMS, angina, isquemia, migraña, arteriopatía periférica, insuficiencia cardíaca, reestenosis, aterosclerosis e hipertensión arterial pulmonar.

Dosis

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad del compuesto de fórmula lb y II que desencadenará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano que esté buscando el investigador, veterinario, doctor en medicina u otro profesional clínico.

En el tratamiento o la prevención de afecciones que requieren la inhibición de cinasas, un nivel de dosificación adecuado será, generalmente, de aproximadamente 0,01 a 500 mg por kg de peso corporal del paciente por día que puede administrarse en dosis únicas o múltiples. Preferentemente, el nivel de dosificación será de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 250 mg/kg por día; más preferentemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100 mg/kg por día. Un nivel de dosificación adecuado puede ser de aproximadamente 0,01 a 250 mg/kg por día, de aproximadamente 0,05 a 100 mg/kg por día o de aproximadamente 0,1 a 50 mg/kg por día. Dentro de este intervalo la dosificación puede ser de 0,05 a 0,5, de 0,5 a 5 o de 5 a 50 mg/kg por día. Para la administración oral, las composiciones se proporcionan preferentemente en forma de comprimidos que contienen de 1,0 a 1000 miligramos del principio activo, particularmente 1,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 50,0, 75,0, 100,0, 150,0, 200,0, 250,0, 300,0, 400,0, 500,0, 600,0, 750,0, 800,0, 900,0 y 1000,0 miligramos del principio activo. La dosificación puede seleccionarse, por ejemplo a cualquier dosis dentro de cualquiera de estos intervalos, para la eficacia terapéutica y/o el ajuste sintomático de la dosificación al paciente que se trata. Los compuestos se administrarán preferentemente en una pauta de 1 a 4 veces por día, preferentemente una o dos veces por día.

Se comprenderá que el nivel de dosis y la frecuencia de dosificación específicos para cualquier paciente particular pueden variarse y dependerán de diversos factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el modo y el tiempo de administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad de la afección particular y del hospedador que recibe la terapia.

Con el fin de ejemplificar la naturaleza de la presente invención de manera que pueda entenderse más claramente, se proporcionan los siguientes ejemplos no limitantes.

65 **EJEMPLOS**

Síntesis de los compuestos

Los compuestos de la invención pueden prepararse mediante métodos bien conocidos por los expertos en la materia y como se describe en los procedimientos de síntesis y experimentales que se muestran a continuación para los compuestos seleccionados.

Definiciones:

40

PyBOP hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitripirrolidinofosfonio

10 DMF N,N-dimetilformamida DMAP 4-dimetilaminopiridina

DCM diclorometano

NMP 1-metil-2-pirorrolidinona

n-PrOH n-propanol 15 ACN acetonitrilo

EDC.HCl clorhidrato de 1-etil-3-(dimetilaminopropil)carbodiimida

HOBT *N*-hidroxibenzotriazol

TEA trietilamina
DIPEA diisopropiletilamina
20 p-TsOH ácido *p*-toluenosulfónico

HATU hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N,N-tetrametiluronio

Ejemplo 1 - Síntesis del compuesto 3

Una mezcla de ácido 4-etoxicarbonilfenilbórico (23,11 g, 119 mmol), 2,4-dicloropirimidina (16,90 g, 113 mmol), 25 tolueno (230 ml) y carbonato sódico acuoso (2 M, 56 ml) se agitó vigorosamente y se burbujeó nitrógeno a través de la suspensión durante 15 minutos. Se añadió tetraquis(trifenilfosfina)paladio[0] (2,61 g, 2,26 mmol). Se burbujeó nitrógeno a través durante otros 10 min, la mezcla se calentó a 100 °C, después a 75 °C durante la noche. La mezcla se enfrió, se diluyó con acetato de etilo (200 ml), se añadió agua (100 ml) y se separaron las capas. La capa 30 acuosa se extrajo con acetato de etilo (100 ml) y los dos extractos orgánicos se combinaron. Los extractos orgánicos se lavaron con salmuera, se filtraron a través de sulfato de sodio, se concentraron y el sólido resultante se trituró con metanol (100 ml) y se filtró. Los sólidos se lavaron con metanol (30 ml, 2 veces) y se secaron al aire. Este material se disolvió en acetonitrilo (150 ml) y diclorometano (200 ml), se agitó con resina eliminadora de paladio MP-TMT (número de pieza de Agronaut 800471) (7,5 g) durante 2 días. La solución se filtró, los sólidos se lavaron con diclorometano (100 ml, 2 veces) y el filtrado se concentró para proporcionar 4-(2-cloropirimidin-4-il)benzoato de etilo 35 en forma de un sólido de color blanquecino (17,73 g, 60 %) - el lavado adicional con diclorometano produjo 1,38 g y 0.5 g adicionales de producto. RMN 1 H (300 MHz, d_{6} -DMSO) δ 8.89 (1H, d, J = 5.0 Hz); 8.32 (2H, d, J = 8.7 Hz); 8.22 (1H, d, J = 5.5 Hz); 8,12 (2H, d, J = 8.7 Hz); 4,35 (2H, c, J = 7.1 Hz); 1,34 (3H, t, J = 7.1 Hz); CL-IEN-EM (método B): ta 7,3 min; m/z 263,0/265,0 [M+H]+.

Una mezcla de 4-(2-cloropirimidin4-il)benzoato de etilo (26,15 g, 99,7 mmol) y 4-morfolinoanilina (23,10 g, 129,6 mmol) se suspendió en 1,4-dioxano (250 ml). Se añadió monohidrato del ácido *p*-toluenosulfónico (17,07 g, 89,73 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 40 h, se enfrió a temperatura ambiente, se concentró, después el residuo se repartió entre acetato de etilo y bicarbonato de sodio saturado/agua 1:1 (total de 1 l). La fase orgánica se lavó con agua (100 ml, 2 veces) y se concentró. La fase acuosa se extrajo con diclorometano (200 ml, 3 veces). El material que precipitó durante este tratamiento se recogió por filtración y se reservó. Los extractos orgánicos líquidos se combinaron, se concentraron, se trituraron con metanol (200 ml) y se filtraron para producir un sólido de color amarillo adicional. Los sólidos se combinaron, se suspendieron en metanol (500 ml), se dejaron reposar durante la noche después se sometieron a ultrasonidos y se filtraron. Los sólidos se lavaron con metanol (50 ml, 2 veces) para proporcionar, después de secarse, 4-(2-(4-morfolinofenilamino)pirimidin-4-il)benzoato de etilo (35,39 g, 88 %). RMN ¹H (300 MHz, *d*₆-DMSO) δ 9,49 (1H, s); 8,54 (1H, d, *J* = 5,0 Hz); 8,27 (2H, d, *J* = 8,7 Hz); 8,10 (2H, d, *J* = 8,7 Hz), 7,66 (2H, d, *J* = 9,1 Hz); 7,38 (1H, d, *J* = 5,0 Hz); 6,93 (2H, d, *J* = 8,7 Hz); 4,35 (2H, c, *J* = 6,9 Hz), 3,73 (4H, m); 3,04 (4H, m); 1,34 (3H, t, *J* = 6,9 Hz); CL-IEN-EM (método B): ta 7,5 min; *m/z* 404,1 [M+H]⁺.

Una solución de 4-(2-(4-morfolinofenilamino)pirimidin-4-il)benzoato de etilo (35,39 g, 87,6 mmol) en metanol/tetrahidrofurano 3:1 (350 ml) se trató con hidróxido de litio (4,41 g, 183,9 mmol) en agua (90 ml). La mezcla se calentó a reflujo durante 2 h, se enfrió, se concentró y se acidificó con ácido clorhídrico (2 M, 92,5 ml, 185 mmol). El precipitado oscuro se filtró, se lavó con agua y se secó al vacío. El sólido se molió hasta un polvo con un mortero y una mano de mortero, se trituró con metanol (500 ml), después se filtró de nuevo para proporcionar ácido 4-(2-(4-morfolinofenilamino)pirimidin-4-il)benzoico en forma de un sólido lodoso. Este material se lavó con éter, se secó al aire durante la noche y se molió hasta un polvo fino con el mortero y la mano de mortero. Sobre la base de la recuperación de masa (34,49 g) el rendimiento se supuso que era cuantitativo. RMN ¹H (300 MHz, d₀-DMSO) δ 9,47 (1H, s); 8,53 (1H, d, *J* = 5,2 Hz); 8,24 (2H, d, *J* = 8,5 Hz); 8,08 (2H, d, *J* = 8,8 Hz), 7,66 (2H, d, *J* = 9,1 Hz); 7,37 (1H, d, *J* = 5,2 Hz); 6,93 (2H, d, *J* = 9,1 Hz); 3,73 (4H, m); 3,04 (4H, m). CL-IEN-EM (método C): ta 7,3 min; *m/z* 377,1 [M+H]⁺.

A una suspensión de ácido 4-(2-(4-morfolinofenilamino)pirimidin-4-il)benzoico (teóricamente 32,59 g, 86,6 mmol) en DMF (400 ml) se le añadió trietilamina (72,4 ml, 519,6 mmol, 6 eq.) La mezcla se sometió a ultrasonidos para asegurar la disolución. Se añadió clorhidrato de aminoacetonitrilo (16,02 g, 173,2 mmol) seguido de N-hidroxibenzotriazol (anhidro, 14,04 g, 103,8 mmol) y clorhidrato de 1-etil-3-(dimetilaminopropil)carbodiimida (19,92 g, 103,8 mmol). La suspensión se agitó vigorosamente durante la noche. El disolvente se evaporó a presión reducida, el residuo se diluyó con bicarbonato de sodio al 5 % (400 ml) y agua (300 ml), proporcionando un sólido de color amarillo, que se disolvió y se filtró. Los sólidos se lavaron varias veces con porciones de 100 ml de agua, se trituraron con metanol/diclorometano caliente (500 ml, 1:1), se concentraron a un volumen de aproximadamente 300 ml), se enfriaron y se filtraron. Los sólidos se lavaron con metanol frío (100 ml, 3 veces), éter (200 ml) y hexano (200 ml) antes de secarse para proporcionar el **Compuesto 3** (31,69 g, 88 %). P.f. 238-243 °C. Microanálisis: Encontrado C, 66,52; H, 5,41; N, 20,21. $C_{23}H_{26}N_6O_{10}S_2$ requiere C, 66,65; H, 5,35; N 20,28 %. RMN ^{13}C (75,5 MHz, d_6 -DMSO) δ 166,04, 162,34, 160,26, 159,14, 146,14, 139,87, 134,44, 132,73, 127,80, 126,84, 120,29, 117,49, 115,50, 107,51, 66,06, 49,16, 27,68.

15 Ejemplo 2 - Síntesis del Compuesto 47

10

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

A una solución de 2,4-dicloro-5-metilpirimidina (244 mg, 1,5 mmol) y 2-metoxi-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)benzoato de metilo (210 mg, 1,0 mmol) en tolueno (3 ml) se le añadieron n-propanol (1 ml), bicarbonato de sodio acuoso (2 M, 1,5 µl) y tetraquis(trifenilfosfina)paladio[0] (116 mg, 0,1 mmol). La reacción se calentó a 110 °C durante 40 h, después se repartió entre acetato de etilo y bicarbonato de sodio acuoso saturado. La capa acuosa se extrajo dos veces adicionales con acetato de etilo y las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con agua, salmuera y después se secaron (sulfato de sodio), se filtraron y se concentraron. La cromatografía en gel de sílice utilizando acetato de etilo al 30-60 %/éter de petróleo como eluyente proporcionó 4-(2-cloro-5-metilpirimidin-4-il)-2-metoxibenzoato de metilo en forma de un sólido de color crema (165 mg, 56 %); CL-IEN-EM (método B): ta 6,2 min; *m/z* 293,3/295,3 [M+H]⁺.

A una solución de 4-(2-cloro-5-metilpirimidin-4-il)-2-metoxibenzoato de metilo (165 mg, 0,56 mmol) en 1,4-dioxano (5 ml) se le añadieron 4-morfolinoanilina (96 mg, 0,54 mmol) y monohidrato del ácido p-toluenosulfónico (97 mg, 0,51 mmol). La reacción se calentó a reflujo durante 40 h, se enfrió a temperatura ambiente y se repartió entre acetato de etilo y bicarbonato de sodio acuoso saturado. La capa acuosa se extrajo dos veces más con acetato de etilo y las fracciones orgánicas combinadas se lavaron dos veces con ácido cítrico acuoso al 5 %, agua, salmuera, después se secaron (sulfato de sodio), se filtraron y se concentraron para proporcionar el producto en bruto. La trituración con metanol proporcionó 4-(2-(4-morfolinofenilamino)-5-metilpirimidin-4-il)-2-metoxibenzoato de metilo en forma de un sólido de color amarillo (77 mg, 32 %); RMN 1 H (300 MHz, d_6 -DMSO) δ 9,36 (s, 1H), 8,38 (s, 1H), 7,76 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,62 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,38 (s, 1H), 7,27 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 6,88 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 3,89 (s, 3H), 3,82 (s, 3H), 3,72 (m, 4H), 3,01 (m, 4H), 2,12 (s, 3H); CL-IEN-EM (método B): ta 6,7 min; m/z 435,3 [M+H] $^+$.

A una solución de 4-(2-(4-morfolinofenilamino)-5-metilpirimidin-4-il)-2-metoxibenzoato de metilo (70 mg, 0,16 mmol) en 1,4-dioxano (5 ml) se le añadió hidróxido de sodio acuoso (5 M, 5 ml). La reacción se calentó a reflujo durante la noche después se enfrió a temperatura ambiente. El sólido de color amarillo que precipitó se recogió por filtración y se lavó con agua para proporcionar la sal de sodio del Compuesto 40 con un rendimiento cuantitativo. La sal de sodio del ácido 4-(2-(4-morfolinofenilamino)-5-metilpirimidin-4-il)-2-metoxibenzoico (Compuesto 40) (0,16 mmol), se acidificó mediante la suspensión en acetato de etilo y la repartición con ácido cítrico acuoso al 5 %. La extracción con acetato de etilo adicional seguida de la evaporación del disolvente después proporcionó el ácido libre que se suspendió en diclorometano (3 ml). A esta solución se le añadieron trietilamina (111 µl, 0,8 mmol), clorhidrato de 1etil-3-(dimetilaminopropil)carbodiimida (58 mg, 0,3 mmol), clorhidrato de aminoacetonitrilo (61 mg, 0,4 mmol) y una cantidad catalítica de N,N- dimetilaminopiridina. Se añadió N,N-dimetilformamida (2 ml) para mejorar la solubilidad y la reacción se agitó durante 64 h. La reacción era incompleta según el análisis por TLC de modo que se añadió hexafluorofosfato O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (76 mg, 0,2 mmol) y la reacción se agitó durante 24 h adicionales antes de repartirse entre diclorometano y bicarbonato de sodio acuoso saturado. La capa acuosa se extrajo dos veces adicionales con diclorometano y los extractos orgánicos combinados se lavaron con aqua, salmuera, después se secaron (sulfato de sodio), se filtraron y se concentraron para proporcionar el producto en bruto. La cromatografía en gel de sílice utilizando metanol al 0-3 %/acetato de etilo como eluyente proporcionó, en forma de sólido de color verde/amarillo, el Compuesto 47 (13,2 mg, 18 %).

Ejemplo 3 - Síntesis del Compuesto 90

A una suspensión de ácido 4-carboxifenilbórico (5,0 g, 30 mmol) en DMF (5 ml) y diclorometano (200 ml) a 0 °C se le añadió cloruro de oxalilo (5,9 ml, 66 mmol) gota a gota. Cuando el desprendimiento de gas se redujo, se retiró el baño de hielo y la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente durante 30 min. Después, la reacción se calentó a 40 °C durante tres horas, tiempo en el que todos los sólidos se habían disuelto. El diclorometano se eliminó mediante destilación y la solución de DMF se enfrió a 0 °C. Después, se añadió gota a gota una solución de clorhidrato de aminoacetonitrilo (3,05 g, 33 mmol) en DMF (80 ml) y DIPEA (13 ml, 75 mmol). Después de que se completara la adición se retiró el baño de hielo y la solución se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 16 h. Después, la mayor parte de la DMF se retiró al vacío y la reacción se repartió entre acetato de etilo y ácido clorhídrico acuoso 2 M. La capa acuosa se extrajo dos veces adicionales con acetato de etilo y las fracciones

orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar ácido 4-(cianometilcarbamoil)fenilbórico en forma de un sólido ceroso de color amarillo pálido (5,34 g, 87 %). RMN 1 H (300 MHz, d_{6} -DMSO): 9,18 (t a., J = 5,1 Hz, 1H), 7,8-7,9 (m, 4H), 4,31 (d, J = 5,4 Hz, 2H); CL-IEN-EM (método B): ta 0,9 min; m/z 203,3 [M-H] $^{-}$.

A una solución de 2,4-dicloropirimidina (3,2 g, 0,22 mmol) y ácido 4-(cianometilcarbamoil)fenilbórico (3,0 g, 15 mmol) en tolueno (146 ml) se le añadió n-propanol (44 ml), bicarbonato de sodio acuoso (2 M, 22 ml) y tetraquis(trifenilfosfina)paladio[0] (850 mg, 0,7 mmol). La reacción se calentó a 90 °C durante 24 h, después se repartió entre acetato de etilo y agua. La capa acuosa se extrajo dos veces adicionales con acetato de etilo y las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron. La cromatografía en gel de sílice utilizando acetato de etilo al 30-70 %/éter de petróleo como eluyente proporcionó 4-(2-cloropirimidin-4-il)-*N*-(cianometil)benzamida en forma de un sólido ceroso de color amarillo pálido (1,35 g, 33 %). RMN ¹H (300 MHz, d_6 -DMSO) δ 9,40 (t, J = 5,4 Hz, 1H), 8,88 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 8,32 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 8,23 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 8,05 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 4,36 (d, J = 5,4 Hz, 2H); CL-IEN-EM (método B): ta 5,3 min; m/z 273,2/275,2 [M+H] $^+$.

Un matraz Schlenck se secó con una pistola de calor al vacío durante dos minutos y después se recargó a temperatura ambiente con nitrógeno. Se añadieron tris(dibencilidenacetona)dipaladio (9 mg, 0,01 mmol), (2bifenilil)di-terc-butilfosfina (5,7 mg, 0,02 mmol), fosfato de potasio (56 mg, 0,27 mmol), 4-(2-cloropirimidin-4-il)-N-(cianometil)benzamida (52 mg, 0,19 mmol) y 4-[(1,1-dioxidotiomorfolin-4-il)metil]anilina (40 mg, 0,17 mmol) y se mezclaron conjuntamente en el matraz en un flujo constante de nitrógeno. El matraz se selló, se evacuó a alto vacío y después se recargó con nitrógeno. La operación se repitió dos veces. Se añadió 1,2-dimetoxietano (1,9 ml) a través del septo de caucho. El matraz se selló y se inició una agitación vigorosa. Después, la mezcla se congeló con nitrógeno líquido, se desgasificó a alto vacío y después se recargó con nitrógeno (la operación se repitió dos veces). El matraz sellado después se calentó a 100 °C durante la noche. Se añadieron una pequeña cantidad de tris(dibencilidenacetona)dipaladio y (2-bifenilil)di-terc-butilfosfina, la mezcla se congeló, se desgasificó a alto vacío y se recargó con nitrógeno antes de calentarse a 100 °C durante 16 h más. Se añadió acetato de etilo y la mezcla se filtró a través de un embudo sinterizado. Después, el filtrado se concentró y se añadió acetato de etilo. Después, la mezcla resultante se lavó con una solución de ácido cítrico (2 %) y una solución saturada de cloruro de sodio. La capa orgánica se secó (sulfato de sodio), se filtró y se evaporó para proporcionar el producto en bruto que se purificó mediante cromatografía en columna utilizando éter de petróleo/acetato de etilo (1/4) para proporcionar un residuo que se trituró con metanol para proporcionar el Compuesto 90 (5,5 mg, 7 %):

Ejemplo 4 - Síntesis del Compuesto 73

10

15

20

25

30

35 Un matraz de fondo redondo se cargó con ácido 4-metanosulfonilaminofenilbórico (4.30 q. 20 mmol) y 2.4dicloropirimidina (5,97 g, 40 mmol, 2 eg.), tolueno (75 ml), n-propanol (25 ml) y solución acuosa de carbonato de sodio (2 M, 18 ml, 1,8 eq.). La mezcla de reacción se evacuó y se recargó con nitrógeno tres veces antes de añadir catalizador tetraquis(trifenilfosfina)paladio(0) (1,02 g, 4,4 mol %). La mezcla de reacción se evacuó y se recargó con 40 nitrógeno tres veces antes de calentarse a 100 °C en una atmósfera de nitrógeno durante 66 horas. La mezcla de reacción se enfrió y se agitó a temperatura ambiente durante varias horas, tiempo en el que el producto precipitó en la mezcla de reacción. El sólido fino de color amarillo (3,45 g, rendimiento del 61 %) se recogió mediante filtración al vacío, se lavó con metanol y se secó a alto vacío. Los datos de RMN ¹H y CL EM confirmaron que éste era la N-(4-(2-cloropirimidin-4-il)fenil)metanosulfonamida deseada. RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ 10,26 (1H, sa); 8,75 (1H, d, J = 5.5 Hz); 8,17 (2H, d, J = 9.1 Hz); 8,05 (1H, d, J = 5.5 Hz); 7,35 (2H, d, J = 8.7 Hz); 3,10 (3H, s). CL-IEN-EM 45 (método B): ta 5,5 min; m/z 284,2/286,1 [M+H]⁺. Se colocaron N-(4-(2-cloropirimidin-4-il)fenil)metanosulfonamida (750 mg 2,64 mmol) y carbonato de potasio (730 mg, 2 eq.) en un matraz de fondo redondo y se suspendieron en acetona (50 ml). La mezcla se agitó durante varios minutos antes de añadir bromoacetonitrilo (368 µl, 2 eq.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 h. La mezcla de reacción en bruto se concentró al vacío y el residuo se recogió en acetato de etilo (200 ml) y se lavó con aqua (100 ml, 2 veces), salmuera (100 ml) y 50 después se secó (sulfato de sodio). La fase orgánica se concentró al vacío para proporcionar N-(4-(2-cloropirimidin-4-il)fenil)-N-(cianometil)metanosulfonamida (762 mg, rendimiento del 89 %) en forma de un sólido de color pardo claro. RMN ¹H (300 MHz, d_6 -DMSO) δ 8,86 (1H, d, J = 5.0 Hz); 8,28 (2H, d, J = 8.7 Hz); 8,18 (1H, d, J = 5.5 Hz); 7,66 (2H, d, J = 8.7 Hz); 4,97 (2H, s); 3,22 (3H, s). CL-IEN-EM (método B): ta 5,9 min; m/z 323,2/325,2 [M+H]⁺. Se suspendieron N-(4-(2-cloropirimidin-4-il)fenil)-N-(cianometil)metanosulfonamida (171 mg, 0,53 mmol), ácido 5-amino-55 2-morfolinobenzoico (142 mg, 1,2 eq.) y monohidrato del ácido p-toluenosulfónico (98 mg, 0,98 eq.) en 1,4-dioxano (8 ml) y se calentaron a 100 °C durante la noche. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se concentró al vacío. El residuo se recogió en acetato de etilo (80 ml) y se lavó con agua (20 ml) y salmuera (20 ml). Después, la fase orgánica se secó y se concentró al vacío. El residuo se trituró de forma repetida con metanol (5 ml, 60 3 ml) para proporcionar, en forma de un sólido de color crema, ácido (cianometil)metilsulfonamido)fenil)pirimidin-2-ilamino)-2-morfolinobenzoico (101 mg, 37 %). RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ 17,23 (1H, s) CO₂H; 9,99 (1H, s); 8,74 (1H, d, J = 2,7 Hz); 8,62 (1H, d, J = 5,0 Hz); 8,33 (2H, d, J = 8,7 Hz); 8,01 (1H, dd, J = 2.8, J = 8.7 Hz); 7,69 (1H, d, J = 9.1 Hz); 7,63 (2H, d, J = 8.7 Hz); 7,52 (1H, d, J = 9.1 Hz); 4,97 (2H, d, J =s); 3,81 (4H, m); 3,21 (3H, s); 3,06 (4H, m). CL-IEN-EM (método C): ta 5,4 min; m/z 509,3 [M+H]*. Se disolvieron ácido 5-(4-(4-(N-(cianometil)metilsulfonamido)fenil)pirimidin-2-ilamino)-2-morfolinobenzoico (50 mg, 0,098 mmol) y 65 hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (41 mg, 1,1 eq.) en N,N-dimetilformamida anhidra (4 ml) y se sometieron a ultrasonidos durante 5 minutos. Se añadieron trietilamina (41 ml, 3 eq.) y *N,N*-dimetiletilendiamina (21 ml, 2 eq.) y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (50 ml) y se lavó con solución de bicarbonato (20 ml), agua (20 ml) y salmuera (20 ml). La fase orgánica se secó (sulfato de sodio) y se concentró al vacío para proporcionar, en forma de un sólido de color amarillo, el **Compuesto 73** (48 mg, rendimiento del 86 %).

Ejemplo 5 - Síntesis del Compuesto 65

20

25

30

35

55

60

A una solución de 5-bromo-2,4-dicloropirimidina (300 mg, 1,3 mmol) en diclorometano (3 ml) mantenida a -5 °C se le añadió ácido yodhídrico acuoso al 57 % frío (5 ml). La solución resultante se agitó a -5 °C durante 2 horas. Se añadió carbonato de sodio sólido en pequeñas porciones hasta que la solución tuvo pH 7 y la mezcla se decoloró mediante la adición de metabisulfito de sodio acuoso al 5 %. Se añadió agua hasta que todo el sólido se disolvió y la fase orgánica se separó. La fase acuosa se extrajo dos veces con diclorometano y después las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron para proporcionar 5-bromo-2,4-diyodopirimidina en bruto en forma de un sólido de color blanco (410 mg). Este material se utilizó para la siguiente etapa sin purificación adicional. CL-IEN-EM (método B): ta 6,8 min; m/z 410,9/412,9 [M+H]⁺.

A una mezcla de ácido 4-(cianometilcarbamoil)fenilbórico (véase el ejemplo 3) (185 mg, 0,9 mmol) y 5-bromo-2,4-diyodopirimidina (410 mg, 1,0 mmol) en 1,4-dioxano (10 ml), se le añadió carbonato de potasio acuoso 2 M (100 µl). La mezcla resultante se agitó en nitrógeno durante 5 minutos y después se añadió tetraquis(trifenilfosfina)paladio(0) (52 mg, 0,045 mmol) en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla se calentó a 80 °C durante la noche. La mezcla de reacción enfriada se diluyó con agua y se extrajo dos veces con acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua y después con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron para proporcionar el producto en bruto en forma de un sólido de color marrón. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida, eluyendo con acetato de etilo al 50 %/éter de petróleo para proporcionar 4-(5-bromo-2-yodopirimidin-4-il)-*N*-(cianometil)benzamida (200 mg, 35 % en 2 etapas). CL-IEN-EM (método B): ta 6,2 min; *m*/z 443,0/445,0 [M+H]⁺.

A un matraz de fondo redondo que contenía 4-(5-bromo-2-yodopirimidin-4-il)-*N*-(cianometil)benzamida (45 mg, 0,1 mmol) y 4-morfolinoanilina (27 mg, 0,15 mmol) en 1,4-dioxano (3 ml), se le añadió diisopropilamina (26 mg, 0,2 mmol). El matraz se equipó con un condensador de reflujo y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante la noche. Después de que se enfriara a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo, se lavó con agua y después con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró para proporcionar el producto en bruto en forma de un sólido de color marrón. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida, se eluyó con acetato de etilo al 50 %/éter de petróleo después acetato de etilo al 80 %/éter de petróleo para proporcionar, en forma de un sólido de color amarillo, el **Compuesto 65** (12 mg, 24 %).

Ejemplo 6 - Formación de sal a partir del Compuesto 3

El Compuesto 3 (10,0 g) se suspendió en metanol (1 l). Se le añadió ácido sulfúrico concentrado (10,52 g, 90 % p/p) gota a gota a la solución en agitación. Dio como resultado una solución de color marrón transparente y se formó un conglomerado sólido. La solución se filtró rápidamente, después, se dejó que continuara agitándose durante 3 h (un segundo precipitado apareció en minutos). Después de este tiempo el precipitado de color amarillo pálido se recogió mediante filtración, se lavó con metanol (10 ml) después se secó al vacío durante la noche para proporcionar hidrógenosulfato de 4-(4-(4-(4-(cianometilcarbamoil)fenil)pirimidin-1-io-2-ilamino)fenil)morfolin-4-io, en forma de un sólido de color amarillo pálido (10,20 g, 69 %). p.f. 205 °C. Microanálisis: Encontrado C, 45,18; H, 4,36; N, 13,84; S, 10,24. C₂₃H₂₆N₆O₁₀S₂ requiere C, 45,24; H, 4,29; N 13,76; S, 10,50 %. RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ 9,85 (s a., 1H), 9,34 (t, J = 5,4 Hz, 1H), 8,59 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 8,27 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 8,03 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,83 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,50 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 7,34 (s a., 2H), 4,36 (d, J = 5,4 Hz, 2H), 3,89 (s a., 4H), 3,37 (s a., 4H); RMN
¹³C (75,5 MHz, d₆-DMSO) δ 166,07, 163,36, 159,20, 158,48, 140,19, 139,34, 136,45, 134,89, 128,00, 127,22, 121,13, 119,89, 117,59, 109,05, 64,02, 54,04, 27,82. CL-IEN-EM (método D): ta 10,0 min; m/z 415,1 [M+H]⁺.

(0,30 g). p.f. 210 °C. RMN ¹H (300 MHz, d_6 -DMSO) RMN ¹H (300 MHz, DMSO) δ 9,92 (s a., 1H), 9,42 (t, J = 5,3, 1H), 8,62 (d, J = 4,8, 1H), 8,29 (d, J = 8,1, 2H), 8,06 (d, J = 8,1, 2H), 7,89 (d, J = 9,0, 2H), 7,53 (s a., 3H), 4,36 (d, J = 5,4, 2H), 3,82 (s a., 4H.), 3,43 (s a., 4H). CL-IEN-EM (método D): ta 10,3 min; m/z 415,3 [M+H] $^+$.

Ejemplo 7 - Síntesis del Compuesto 79

10

15

20

25

30

35

45

50

60

Un matraz de fondo redondo de dos bocas de 50 ml se equipó con una barra agitadora magnética y un embudo de adición. Se añadió una suspensión de NaBH₄ en tetrahidrofurano (100 mg, 2,4 mmol/10 ml), seguida de ácido 5-amino-2-morfolinobencenocarboxílico (222 mg, 1,0 mmol) en una porción. Se ajustó un condensador de reflujo y la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C en atmósfera de nitrógeno. Se le añadió una solución de yodo en tetrahidrofurano (250 mg, 1,0 mmol/15 ml) gota a gota a la mezcla de reacción. Después de que se completara la adición de yodo y el desprendimiento de gas hubiera cesado, la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 6 horas y se dejó agitar a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió metanol lentamente hasta que la mezcla se volvió transparente. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se disolvió en KOH al 20 % (30 ml), se agitó durante 4 horas y se extrajo con diclorometano (30 ml, 3 veces). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron para proporcionar el alcohol 5-amino-2-morfolinobencílico en forma de un sólido de color blanquecino (150 mg, rendimiento del 72 %). RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,05 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 6,59 (dd, *J* = 8,4, 2,7 Hz, 1H), 6,49 (d, *J* = 2,7 Hz, 1H), 5,51 (s a, 1H), 4,71 (s, 2H), 3,84 (t, *J* = 5,1 Hz, 4H), 3,60 (s a, 2H), 2,91 (t, *J* = 5,1 Hz, 4H). CL-IEN-EM (método B): ta 2,31 min; *m/z* 209,2) [M+H]⁺.

A una suspensión de NaH en tetrahidrofurano frío (80 mg/20 ml), se le añadió alcohol 5-amino-2-morfolinobencílico (400 mg, 2 mmol). La mezcla se agitó durante 15 minutos después se añadieron cloruro de alilo (150 mg, 2 mmol) y yoduro de tetrabutilamonio (37 mg, 5 % en moles). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y después a 60 °C durante la noche. Después de enfriarse a temperatura ambiente, se añadió agua (200 μ l) y la mezcla se agitó durante 10 minutos y después se diluyó con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó secuencialmente con cloruro de amonio acuoso al 10 % y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró para proporcionar un sólido de color amarillo. El producto en bruto se purificó con acetato de etilo al 50 % en éter de petróleo para obtener 3-(((aliloxi)metil)-4-morfolinobencenamina en forma de un aceite de color naranja claro (250 mg, rendimiento del 50 %). RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 6,95 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 6,82 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 6,61 (dd, J = 8,2, 2,7 Hz, 1H), 6,10-5,90 (m, 1H), 5,34-5,28 (m, 1H), 5,23 (dd, J = 10,5, 1,9 Hz, 1H), 4,57 (s, 2H), 4,07-4,05 (m, 2H), 3,80 (t, J = 4,8 Hz, 4H), 3,55 (s a, 2H), 2,83 (t, J = 4,6 Hz, 4H). CL-IEN-EM (método B) ta 5,91 min; m/z 249,3 [M+H][†].

La 3-((aliloxi)metil)-4-morfolinobencenamina se convirtió en el **Compuesto 79** mediante la reacción con 4-(2-cloropirimidin-4-il)-*N*-(cianometil)benzamida en presencia de ácido *p*-toluenosulfónico utilizando métodos análogos a aquellos descritos para la síntesis del **Compuesto 3** y el **Compuesto 47**.

40 Análisis de los compuestos

Los datos de RMN ¹H y ¹³C se obtuvieron en un espectrómetro de RMN Brucker AV-300 AVANCE.

CL-IE-EM y IE-EM

Parámetros generales:

Los datos de CL-IE-EM y IE-EM se obtuvieron en un HPLC Waters 2795 Alliance acoplado a un Detector de Fotodiodos en Serie Waters 2996 y un Espectrómetro de Masas de Impacto Electrónico Integrity TMD que opera controlado por el software Waters Millenium³² versión 4.0 con la configuración esbozada a continuación:

Parámetros del espectrómetro de masas:

Flujo de helio de aproximadamente 0,36 l/min; modo de obtención configurado para exploración; velocidad de muestreo de 1 espectro/seg; temperatura de la fuente de 200 °C; temperatura del nebulizador de 80 °C; temperatura de la región de expansión de 75 °C; intervalo de masa *m/z* 100-550, *m/z* 100-650 o *m/z* 100-700 según sea necesario.

Parámetros de HPLC

Los parámetros de la CL-EM eran como se describe para cada uno de los métodos que se esbozan a continuación. Las muestras de la IE-EM se inyectaron y se analizaron sin ninguna columna presente, con un caudal de disolvente de 0,25 ml/min.

65 Método A1 (CL-IE-EM)

Gradiente de disolvente:

Tiempo	% de agua MilliQ	% de ACN	% de ácido fórmico ac. al 0,5 %	Curva
0	90	0	10	-
0,5	90	0	10	6
7,5	0	90	10	6
10,5	0	90	10	6
11,5	90	0	10	6
14,5	90	0	10	6

Caudal: 0,25 ml/min. 5 Columna: una de

- Alltima HP C₁₈ 2,1 x 150 mm, 5 micrómetros
- XTerra MS C₁₈ 3,0 × 100 mm, 3,5 micrómetros
- XBridge C₁₈, 3,0 × 100 mm, 3,5 micrómetros

Método A2 (CL-IE-EM)

Gradiente de disolvente:

Tiempo	% de agua MilliQ	% de ACN	Curva
0	90	10	-
7	0	100	6
9	0	100	6
10	90	10	6
13	90	10	6

15

20

10

Caudal: 0,25 ml/min. Columna: una de

- Alltima HP C₁₈ 2,1 x 150 mm, 5 micrómetros
- XTerra MS C₁₈ 3,0 x 100 mm, 3,5 micrómetros
- XBridge C₁₈, 3,0 x 100 mm, 3,5 micrómetros

CL-IEN-EM

25 Parámetros generales:

Los datos de CL-IEN-EM se obtuvieron en un HPLC Waters 2695Xe acoplado a un Detector de Fotodiodos en Serie Waters 2996 y un Espectrómetro de Masas Waters ZQ operando en condiciones de ionización por electronebulización con el software Masslynx versión 4.1 con los ajustes que se esbozan a continuación.

30

Parámetros del espectrómetro de masas:

Intervalo de masa: m/z 100-650

Tiempo de exploración: 0,5 Retardo inter-exploración: 0,1

Gas de desolvatación: N_2 500 l/h Gas del cono: N_2 100 l/h Temperatura de desolvatación: 400 °C Temperatura de la fuente: 120 °C

Tensión del cono: +30 V para el modo IEN positivo o -45 V para el modo IEN negativo

Parámetros de HPLC:

35

Eran uno de los siguientes conjuntos de condiciones que se esbozan a continuación.

Método B

Gradiente de disolvente:

5

Tiempo	% de agua MilliQ	% de ACN	Curva
0	90	10	1
5	0	100	6
6	0	100	6
7	90	10	6
10	90	10	6

Caudal: 0,25 ml/min.

Columna: XTerra MS C₁₈, 2,1 × 50 mm, 3,5 micrómetros

10 Método C

Gradiente de disolvente:

Tiempo	% de agua MilliQ	% de ACN	% de ácido fórmico ac. al 0,5 %	Curva
0	90	0	10	1
0,5	90	0	10	1
5,5	0	90	10	1
7,5	0	90	10	6
8,5	90	0	10	6
11,5	90	0	10	6

15 Caudal: 0,25 ml/min.

Columna: XTerra MS C₁₈, 2,1 × 50 mm, 3,5 micrómetros

Método D

20 Gradiente de disolvente:

Tiempo	% de agua MilliQ	% de ACN	Curva	
0	90	10	1	
10	0	100	6	
12	0	100	6	
13	90	10	6	
16	90	10	6	

Caudal: 0,25 ml/min.

25

Columna: XTerra MS C₁₈, 3,0 × 50 mm, 3,5 micrómetros

Ejemplo 8 – Exploración enzimática

Dilución de los compuestos

30 Con fines de exploración, los compuestos (en DMSO al 100 %) se calentaron a 37 °C durante al menos 20 minutos antes de su uso. Inicialmente, se preparó una solución madre 20 μM en tampón de ensayo, donde la concentración final de DMSO era del 0,3 %. Las soluciones madre se diluyeron en OptiPlates de 384 pocillos (Packard) donde la concentración final del compuesto era 5 μM.

35 Producción de dominios tirosina-cinasa de las JAK

Los dominios cinasa de las JAK se produjeron utilizando los siguientes procedimientos:

JAK2

El dominio cinasa de la JAK2 humana se amplificó a partir de U937ARNm utilizando la reacción en cadena de la polimerasa con los siguientes cebadores:

SALI-jk2 5'-ACG CGT CGA CGG TGC CTT TGA AGA CCG GGA T-3' [ID. SEC. № 7] jk2-NOTI 5'-ATA GTT TAG CGG CCG CTC AGA ATG AAG GTC ATT T-3' [ID. SEC. № 8]

Los productos de la PCR de la JAK2 se clonaron en el vector de destino pDest20 (Gibco). El plásmido JAK2 después se transformó en células DH10Bac competentes (Gibco) y el baculovirus recombinante se preparó a través de la transfección de células de insecto Sf9.

JAK3

20

30

35

40

45

15 El dominio cinasa de la JAK3 humana se amplificó a partir de U937ARNm utilizando la reacción en cadena de la polimerasa con los siguientes cebadores:

XHOI-J3 5'-CCG CTC GAG TAT GCC TGC CAA GAC CCC ACG-3' [ID. SEC. Nº 9] J3-KPNI 5'-CGG GGT ACC CTA TGA AAA GGA CAG GGA GTG-3 '[ID. SEC. Nº 10]

Los productos de la PCR de la JAK3 se clonaron en el vector de destino pDest20 (Gibco). El plásmido JAK3 después se transformó en células DH10Bac competentes (Gibco) y el baculovirus recombinante se preparó a través de la transfección de células de insecto Sf9.

25 Producción de dominios cinasa a gran escala

Las preparaciones de baculovirus de cada uno de los miembros de la familia JAK se infectaron en un litro de células Sf9 (Spodoptera frugiperda) (Invitrogen) cultivadas en medio sin suero SF900II (Invitrogen) hasta una densidad celular de aproximadamente 2 × 10⁶ células/ml. Las células se infectaron con el virus en un cultivo celular hasta una relación de solución madre de virus 20:1. Las células se recolectaron y se lisaron 48 horas después de la infección. Los dominios cinasa de las JAK marcados con GST se purificaron mediante cromatografía de afinidad en una columna de agarosa GSH (Scientifix).

Protocolos de ensayo

Los ensayos de cinasas se realizaron en OptiPlates de 384 pocillos (Packard) utilizando un kit de detección Alphascreen Protein Tyrosine KinaseP100. Los compuestos se preincubaron con dominio PTK purificado por afinidad en presencia de tampón de ensayo de fosfotirosina (HEPES 10 mM, pH 7,5, MgCl₂ 100 mM, NaCl 25 mM, vanadato de sodio 200 mM y Tween 20 al 0,1 %) durante 20 minutos. Los compuestos después se incubaron con sustrato en presencia de ATP ya sea 80 o 625 μM durante 60 o 90 minutos. El sustrato utilizado fue ya sea el sustrato-1 con la secuencia biotina-EGPWLEEEEEAYGW-MDF-NH₂ [ID. SEC. Nº 13] (concentración final 111 μM) o el sustrato-2 con la secuencia biotina-EQEDE-PEGDYFEWLEPE (concentración final 133 μM). Se añadieron perlas aceptoras de fosfotirosina AlphaScreen seguidas de perlas donadoras de estreptavidina a una concentración de 1/100 en tampón de terminación a cada pocillo bajo luz tenue y se incubaron durante 2-3 horas. Las placas AlphaScreen se leyeron en un instrumento Packard Fusión *Alfa*.

Los resultados del ensayo enzimático y los datos estructurales de los compuestos seleccionados se proporcionan a continuación en la Tabla 2, donde +++ es <100 nM, ++ es <500 nM y + es <1 µM.

50 Ejemplo 9 – Exploración celular

Dilución de los compuestos

Con fines de selección, los compuestos se diluyeron en placas de 96 pocillos a una concentración de 20 µM. Las placas se calentaron a 37 °C durante 30 minutos antes de realizar el ensayo.

Establecimiento de la línea celular TEL:JAK2

La región de codificación que abarca los nucleótidos 1-487 de la TEL se amplificó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos 5TEL (5' -GGA GGA TCC TGA TCT CTC TCG CTG TGA GAC-3') [ID. SEC. Nº 14] y 3TEL (5' -AGGC GTC GAC TTC TTC ATG GTT CTG-3') [ID. SEC. Nº 15] y U937 ARNm como plantilla. Se incorporó un sitio de restricción BamHI en el cebador 5TEL y se incorporó un sitio de restricción Sal I en el cebador 3TEL. Las regiones que abarcan el dominio cinasa de la JAK2 (nucleótidos 2994-3914; JAK2F 5'-ACGC GTC GAC GGT GCC TTT GAA GAC CGG GAT-3' [ID. SEC. Nº 16]; JAK2R 5'-ATA GTT TAG CGG CCG CTC AGA ATG AAG GTC ATT T-3') [SEQ ID Nº 17] y de la JAK3 (nucleótidos 2520-3469; JAK3F 5'-GAA GTC GAC TAT GCC TGC CAA GAC CCC ACG ATC TT-3') [ID. SEC. Nº 18] se generaron mediante PCR utilizando la ADN polimerasa Tag (Gibco/BRL) y

ES 2 557 930 T3

U937 ARNm como plantilla. Se incorporó un sitio de restricción Sal I en el cebador directo de la JAK2 y la JAK3, se incorporó un sitio Not I en el cebador inverso de la JAK2 y se añadió un sitio Xba I al cebador inverso de la JAK3.

- Se generó una fusión TEL/JAK2 mediante la digestión del producto TELPCR con las enzimas de restricción BamH I/Sal I, la digestión del producto de la PCR de la JAK2 con las enzimas de restricción Sal I/Not I, seguida de ligamiento y subclonación del producto del ligamiento en el vector de expresión de mamíferos pTRE 2 (Clontech), que se preparó mediante la digestión con las enzimas de restricción BamH I-Not I, para proporcionar el plásmido de fusión TEL/JAK2 pTELJAK2.
- La fusión TEL/Jak3 se preparó mediante el ligamiento del producto de la PCR dominio cinasa de la JAK3 escindido por Sal I/Not I con el producto TEL digerido por restricción con BamH I/Sal I, seguido de ligamiento del producto de ligamiento en el pTRE2 digerido por BamH I/Not I, para proporcionar el plásmido de la fusión TEL/Jak3, pTELJAK3.
- La línea celular mielomonocítica BaF3 dependiente de factor de crecimiento que lleva el plásmido pTet-off (Clontech) se transfectó con ya sea pTELJAK2 o pTELJAK3 y las células transfectadas se seleccionaron para el crecimiento celular independiente del factor de crecimiento. Las células BaF3 de tipo silvestre se cultivaron en DMEM que contenía FCS al 10 %, medio acondicionado WEHI 3B al 10 %. Las células BaF3 TELJAK (BafT_J2 o BafT_J2) se cultivaron en DMEM FBS Tet-System Approved al 10 % (sin medio acondicionado WEHI 3B)

20 Los ensayos celulares se realizaron como sigue:

Las suspensiones celulares se prepararon mediante la recolección de células del cultivo (las células utilizadas en este ensayo estaban en crecimiento en fase logarítmica tardía con alta viabilidad.) Las células se diluyeron en el medio de crecimiento adecuado, como se ha descrito anteriormente, hasta 1,1 veces la concentración final (de 50.000 células/ml a 200.000 células/ml, dependiendo de la línea celular).

Los compuestos a ensayar (10 μ l, 10 veces la concentración final) se añadieron a una placa de 96 pocillos de fondo plano. La suspensión celular (90 μ l por pocillo) se añadió después y la placa se incubó durante 48-72 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %. Se añadieron 10 μ l de Alamar Blue por pocillo y las placas se devolvieron a la incubadora durante 4-6 horas adicionales. Las después placas se leyeron a 544 nm.

Resultados

Los resultados se proporcionan en la tabla 2, donde +++ es <1 µM, ++ es <5 µM y + es <20 µM.

35

25

30

ES 2 557 930 T3

	CI50_MM_CTLL2	>20	‡	NE	NE			‡	‡	>20	>20	+		‡	+			‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	++	>20	‡	‡
	CI50_µM_BAF3wt	>20	‡	NE	NE			‡	‡	>20	+	>20		+++	+			‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	+	‡	‡
No ensayado)	CI50_µM_BafT_J2	>20	‡	>20	>20			‡	‡	>20	‡	‡	>20	+++	+	>20	‡	‡	‡	+	++	+	‡	+	‡	+	‡	+	‡
Tabla 2 (NE = No ensayado)	CI50_nM_JAK3		‡					‡		>1000	+	+	>1000	+++	‡	‡	‡	‡	‡	‡	++	+++	‡	‡	‡	++	+	‡	‡
	CI50_nM_JAK2	+++	‡	‡	+	>1000	‡	‡	+++	>1000	‡	‡	>1000	+++	+	>1000	+	+++	+++	‡	+++	+++	+++	+++	‡	+++	+++	+++	‡
	Número del compuesto	1	3	5	9	2	8	6	11	16	17	18	19	20	21	22	23	25	31	34	36	39	42	44	45	46	20	53	55

‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	+	‡	‡
‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	++	‡
‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	+++	‡	‡	+++	‡
‡	+	‡	‡	‡	+	+	‡	‡	>1000	>1000	+++	‡	‡	++	‡
‡	+++	++	+++	++	‡	‡	‡	‡	‡	‡	+++	+	‡	+++	+++
95	22	58	59	92	75	92	62	80	81	82	85	89	06	92	93

Ejemplo 10 – Clasificador celular activado por fluorescencia (FACS)

Análisis de citometría de flujo intracelular multiparámetro de la fosforilación del STAT 5

- 5 La línea celular eritroleucémica humana, HEL 92.1.7 (ATCC, TIB-180), se cultivó en RPMI 1640 que contenía FCS al 10 % suplementado con piruvato de sodio 1 mM. Para la determinación de fosfor-STAT 5, se cultivaron células HEL en RPMI 1640 + FCS al 1 % durante 18 horas a 37 °C y se expusieron 2×10⁵ células por punto de ensayo a DMSO/compuestos ensayo durante 2 horas a 37 °C. Las células se centrifugaron a 1300 rpm durante 3 minutos y se fijaron en paraformaldehído (concentración final del 2 %) durante 15 minutos a 37 °C. Después de la centrifugación, 0 las células se permeabilizaron en metanol al 90 % a 4 °C durante 30 minutos. Después de tres lavados en PBS-FCS al 2 %, la tinción se realizó como sigue utilizando ficoeritrina-isotipo control de inmunoglobulina de ratón conjugado BD PharMingen (Cat. № 551.436 y ficoeritrina-anticuerpo IgG₁ para STAT 5 conjugado de ratón (Y694) (Cat. № 612567).
- La tinción transcurrió durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad, seguida de 3 lavados en PBS-FCS al 2 %. Las células se resuspendieron a continuación en 800 µl de PBS-FCS para el análisis por FACS. La citometría de flujo se realizó utilizando un Beckman Cell Lab Quanta SC System con capacidades de 3 colores y de dispersión lateral. El análisis de datos se realizó con el software de análisis CXP (versión 2.2). Se utilizó la intensidad de fluorescencia media (IFM) para determinar la relación de cambio tras el tratamiento de las células con compuestos inhibidores específicos, calculada como la relación IFMestimulada/IFMsin estimular para el canal de fluorescencia del anticuerpo fosfoespecífico (FL2).

Los resultados que se muestran en la Figura 2 muestran claramente un efecto dependiente de la dosis sobre la fosforilación del STAT5 mediante el tratamiento con el compuesto 3.

Ejemplo 11 - Transferencias de Western

Experimento 1

30 Metodología

25

35

60

La línea celular pro-B murina BaF3 se mantuvo rutinariamente en medio RPMI 1640 que contenía FCS al 10 %. El día del experimento, las células se lavaron dos veces en PBS y se resuspendieron en medio RPMI 1640 que contenía FCS al 0,1 %. Después de 2 horas de privación de suero, las células se trataron con la concentración deseada del Compuesto 3, Compuesto de Control o vehículo solo (DMSO) durante 2 horas adicionales. Después se añadió IL-3 de ratón a las células a una concentración final de 5 ng/ml durante 15 minutos. Después las células se colocaron en hielo y se lavaron dos veces en PBS enfriado con hielo. Los sedimentos de células lavadas se congelaron de forma instantánea en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

Los sedimentos celulares se lisaron en hielo en tampón RIPA y los lisados se aclararon mediante centrifugación (20.000 x g, 4 °C, 5 min). La concentración de proteína de los lisados se determinó mediante el método Bradford y se separaron cantidades iguales de proteína (60 µg/carril) mediante SDS-PAGE. Después la proteína se transfirió a PVDF y se realizó la transferencia de Western utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente el STAT5 fosforilado en la tirosina 694. Después la membrana se separó y se volvió a sondar con un anticuerpo que reconoce la proteína STAT5 total.

Los resultados que se muestran en la Figura 3 muestran claramente un efecto dependiente de la dosis sobre la fosforilación del STAT5 mediante el tratamiento con el compuesto 3.

50 Experimento 2

Metodología

La línea celular eritroleucémica humana HEL 92.1.7 se mantuvo rutinariamente en medio RPMI 1640 que contenía FCS al 10 %. El día antes del experimento, las células se lavaron dos veces en PBS, se resuspendieron en medio RPMI 1640 que contenía FCS al 1 % y se cultivaron durante la noche.

Al día siguiente, las células se trataron con la concentración deseada del Compuesto 3, Compuesto de Control o vehículo solo (DMSO) durante 2 horas. Después las células se colocaron en hielo y se lavaron dos veces en PBS enfriado con hielo. Los sedimentos de células lavadas se congelaron de forma instantánea en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

Los sedimentos celulares se lisaron en hielo en tampón RIPA y los lisados se aclararon mediante centrifugación (20.000 x g, 4 °C, 5 min). La concentración de proteína de los lisados se determinó mediante el método Bradford y se separaron cantidades iguales de proteína (60 µg/carril) mediante SDS-PAGE. Después la proteína se transfirió a PVDF y se realizó la transferencia de Western utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente el STAT5

fosforilado en la tirosina 694. Después la membrana se separó y se volvió a sondar con un anticuerpo que reconoce la proteína STAT5 total.

Los resultados que se muestran en la Figura 4 muestran una disminución en la fosforilación del STAT5 tras el tratamiento con el compuesto 3.

Ejemplo 12 - Eficacia del Compuesto 3 sobre el crecimiento celular fisiológico y tumoral dependientes de la JAK2

10 <u>Efecto del Compuesto 3 sobre las concentraciones del factor de crecimiento insulinoide 1 estimulado por la hormona</u> del crecimiento en plasma de ratón

Se midieron las concentraciones circulantes de IGF-1 (media ± e.e.m.) en ratones C3/H hembras (n = 6/grupo) después de la administración del compuesto 3 (50 mg/kg) o el vehículo solo (Control, + GH), por sonda oral 8 h y 30 min antes de la administración subcutánea de hormona del crecimiento (+ GH, 30 µg/ratón) o solución salina (Control) en el tiempo 0. Las muestras de sangre se recogieron 6 horas después de la administración -GH y se midieron las concentraciones plasmáticas de IGF-1 utilizando un ELISA para IGF-1 de ratón (R & D Systems). Los diferentes superíndices indican diferencias significativas (p <0,05) entre los grupos detectadas mediante ANOVA unidireccional y test de Bonferroni retrospectivos.

Los resultados que se muestran en la Figura 5 muestran una disminución marcada en la concentración plasmática de IGF-1 después del tratamiento con el compuesto 3.

Eficacia del Compuesto 3 administrado por vía oral en un modelo de tumor subcutáneo de células Ba/F3 TelJAK2 en ratones desnudos.

Se inocularon células Ba/F3 TelJAK2 de ratón (2,5 × 10⁶/ratón) a ratones Balb/C^{nu/nu} por vía subcutánea y se realizó la dosificación dos veces al día por sonda oral del compuesto 3 (20 mg/kg, 10 mg/kg o 5 mg/kg) o vehículo solo (N-metilpirrolidona al 5 %, Captisol® 0,1 M) o Taxol® (5 mg/kg i.v. 3 veces a la semana, n = 15 ratones/grupo). La dosificación se inició 11 días después de la inoculación de células tumorales, cuando los tumores eran palpables (volumen del tumor medio de 6 mm³). Se midieron las dimensiones tumorales dos veces por semana. Para el día de dosificación 14, los valores medios de T/C en porcentaje fueron del 39 % para el compuesto 3 a 20 mg/kg dos veces al día, del 25 % a 10 mg/kg dos veces al día y del 82 % a 5 mg/kg/día. La comparación de los volúmenes tumorales después de 14 días de dosificación mediante prueba-t (pruebas del orden de Mann Whitney) descubrió volúmenes tumorales más pequeños (p <0,05) en los grupos tratados con el compuesto 3 a 20 mg/kg dos veces al día y 10 mg/kg dos veces al día y Taxol, en comparación con el Grupo tratado con Control de Vehículo y el grupo tratado con el Compuesto 3 5 mg/kg, que no eran diferentes entre sí. Una prueba estadística más rigurosa (ANOVA unidireccional de Kruskal Wallis) seguida de la comparación múltiple de Dunn frente al Grupo Control retrospectiva identificó una diferencia significativa (p <0,05) entre el Grupo tratado con Control de Vehículo y ya sea el grupo tratado con el Compuesto 3 (ya sea 10 o 20 mg/kg dos veces al día) o el Grupo de tratado con Taxol. Los resultados se muestran en la figura 6.

Los resultados muestran que el compuesto 3 inhibe la enzima JAK2 in vitro, así como el crecimiento in vitro de células Baf3Tel Jak2, que son dependientes de la Jak2 constitutivamente activa para el crecimiento y la supervivencia. Las células Baf3Tel JAK2 que crecen *in vivo* como un tumor, también son inhibidas por el compuesto 3 de una forma dosis dependiente. Además, los resultados demuestran que el compuesto 3 inhibe la síntesis y secreción de IGF-1 impulsadas por la hormona del crecimiento (y por tanto dependientes de la JAK2) desde el hígado del ratón *in vivo*

50 Ejemplo 13 – Evaluación adicional de compuestos

Los compuestos también pueden ensayarse en un modelo murino de enfermedad mieloproliferativa positiva para JAK2^{V617F} (EMP)

55 <u>Establecimiento de EMP positiva para JAK2^{V617F}</u>

La médula ósea de ratones Balb/c machos tratados con 5-fluorouracilo puede infectarse con un retrovirus JAK2-V617F-GFP e inyectarse retroorbitalmente en receptoras hembras irradiadas letalmente. A partir del día 21, los ratones pueden controlarse mediante inspección diaria y recuentos sanguíneos dos veces a la semana + FACS de células positivas para GFP. Sería de esperar que se produjese un aumento en el hematocrito aproximadamente el día 28 y un aumento del recuento de glóbulos blancos aproximadamente el día 40.

Tratamiento con los compuestos

15

20

30

35

40

45

60

65 Grupo de intervención temprana: El tratamiento comenzaría el día 21 con la administración del compuesto o vehículo por sonda oral (12 ratones en cada grupo). Los ratones pueden controlarse mediante inspección diaria y

recuentos sanguíneos dos veces a la semana + FACS de células positivas para GFP. Los animales se sacrificarían el día 60, 8-12 h después de la última dosis de fármaco. Los ratones moribundos o los ratones con un recuento de glóbulos blancos de más de 200.000/nl o una pérdida de peso >20 % pueden ser sacrificados antes.

Grupo de intervención tardía: Pueden sacrificarse grupos de 3 ratones el día 29, 36, 43, 50 y 57 y la médula ósea y el bazo pueden analizarse para determinar la fibrosis de reticulina. El tratamiento puede comenzar con la administración del compuesto o vehículo por sonda oral tan pronto como la fibrosis se documente en 3/3 ratones. Los ratones pueden controlarse mediante inspección diaria y recuentos sanguíneos dos veces a la semana + FACS de células positivas para GFP. Los animales pueden ser sacrificados después de 30 días de terapia 08-12 h después de la última dosis de fármaco. Los ratones moribundos o los ratones con un recuento de glóbulos blancos de más de 200.000/nl o una pérdida de peso >20 % pueden ser sacrificados antes. Los animales pueden ser sometidos a necropsia.

Análisis de los tejidos y la supervivencia

15

10

Pueden determinarse los pesos del hígado y el bazo. Las secciones de tejido de médula ósea, hígado y bazo pueden analizarse mediante tinción HE. Las médulas óseas y los bazos pueden teñirse con plata para evaluar la fibrosis de reticulina. Las células del bazo y de la médula ósea pueden analizarse mediante FACS para determinar la GFP, los marcadores de linaje, la JAK2 y la fosforilación del STAT5. La sangre puede recogerse mediante punción cardíaca y el plasma puede separarse y congelarse para la medición de la concentración del fármaco. La supervivencia entre los grupos puede compararse mediante el método de Kaplan-Meyer.

Evaluación de la **actividad** de los inhibidores de la JAK2 en ensayos de formación de colonias de **células hematopoyéticas** humanas

25

30

20

Las células mononucleares de la sangre periférica de pacientes que padecen EMP (predominantemente mielofibrosis) con y sin mutación JAK2^{V617F} (N = 10 para cada uno) y 5 controles normales (proveedor comercial) pueden aislarse mediante centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll). Las células CD34 + pueden seleccionarse utilizando kits comerciales para enriquecer en células progenitoras. Las células CD34 + pueden sembrarse por triplicado en metilcelulosa suplementada con suero bovino fetal y citocinas (+/- EPO). Después de la incubación de las placas durante 2 semanas puede evaluarse la formación de colonias eritroides y mieloides con un microscopio invertido.

Cáncer

35

40

45

50

55

60

El efecto de los compuestos sobre la iniciación, progresión y metástasis tumorales puede evaluarse en modelos animales de eficacia *in vivo* relevantes. Los modelos pueden ser modelos de xenoinjertos de tumores humanos en ratones inmunodeficientes, a partir de líneas celulares tumorales humanas o preferentemente de tumores humanos primarios o metastásicos. Otros modelos pueden ser xenoinjertos de tumores humanos que crecen en sitios ortotópicos, modelos de enfermedad diseminada y modelos de tumores transgénicos o marcados. Los modelos también pueden incluir la resección quirúrgica del tumor primario y la evaluación de la enfermedad metastásica.

Los modelos pueden seleccionarse para asegurar que la diana molecular del fármaco se expresa. Los ejemplos de tumores que muestran la desregulación de la vía JAK/STAT incluyen el carcinoma de próstata, el cáncer de mama, el carcinoma de colon, incluyendo la leucemia, el linfoma, el mieloma, los tumores de ovario, el melanoma, el carcinoma de pulmón, el glioma y los tumores de las células renales.

La eficacia puede medirse en estos modelos mediante diversos efectos dependiendo del tipo de tumor (sólido, leucémico o metastásico) y pueden incluir la medida de la aparición del tumor, de la tasa de crecimiento tumoral, de la carga tumoral, del retardo en el crecimiento tumoral, de la muerte de la células tumorales, de la incidencia de metástasis, de la obtención de imágenes del tumor y de la invasividad/metástasis mediante diversos enfoques incluyendo las células o los reactivos marcados, la supervivencia, la angiogénesis, la histopatología. Los modelos animales de eficacia in vivo también pueden utilizarse para la determinación de la aditividad o sinergia del efecto de los compuestos en combinación con otros fármacos, el asma se limita a la especie humana, pero los modelos animales se utilizan a menudo para investigar aspectos particulares de esta enfermedad humana. Se ha demostrado que las biopsias bronquiales y el fluido de lavado broncoalveolar (LBA) recuperados de los pacientes que padecen asma contienen un mayor número de células T, células B, eosinófilos y mastocitos activados. Muchos pacientes que padecen asma están sensibilizados y tienen anticuerpos de inmunoglobulina E (IgE) específicos para uno o más alérgenos inhalados. La atopia se considera una causa importante del asma. En los individuos atópicos, la inhalación de alérgenos induce preferentemente una respuesta de células T cooperadoras 2 (Th2). En la mayoría de los modelos actuales, los ratones se sensibilizan mediante inyección intraperitoneal (ip) de ovoalbúmina (OVA), a menudo junto con un adyuvante sesgado Th2, tal como alumbre. En el modelo clásico de ratón para el asma, los ratones C57/BL6 se sensibilizan activamente el día 0 mediante inyección ip de 10 µg de OVA absorbidos en 1 mg de alumbre. Desde el día 14-21 los ratones se exponen diariamente a OVA en aerosol durante un periodo de 30 minutos. El día 22, la inflamación de las vías respiratorias es evidente. El fluido de LBA recuperado de estos animales demuestra un aumento en el espacio peribronquiolar que consiste en infiltrados celulares mixtos de células

mononucleares y eosinófilos. Pueden presentarse anticuerpos IgE específicos de OVA en el suero de animales sensibilizados. La población de células mononucleares consiste principalmente en células de fenotipo Th2 que secretan citocinas IL-4 e IL-5. La IL-4 promueve el cambio de isotipo de las células B hacia la síntesis de IgE y la IL-5 influye en la producción, maduración y activación de eosinófilos.

10

15

20

25

Los compuestos de fórmula lb pueden ensayarse en el modelo de perro de hipertensión pulmonar como se describe en Gust, R y Schuster, D. P. Experimental Lung Research, 27: 1-12, 2001. También pueden ensayarse en un modelo de conejo de hipertensión pulmonar inducida por monocrotalina. Los compuestos de fórmula Ib también pueden ensayarse en seres humanos que padecen hipertensión arterial pulmonar. El efecto de los compuestos de fórmula Ib puede ensayarse en seres humanos que padecen hipertensión arterial pulmonar mediante la medición de sus efectos agudos sobre la hemodinámica cardiopulmonar. Puede determinarse el efecto de los compuestos sobre las presiones del ventrículo derecho, las presiones arteriales pulmonares, la resistencia vascular pulmonar y el gasto cardíaco. El efecto de los compuestos sobre el tiempo de marcha de seis minutos y el consumo máximo de oxígeno puede determinarse en seres humanos que padecen HAP. El efecto de los compuestos sobre la calidad de vida (medida mediante un cuestionario), la hospitalización y la supervivencia puede determinarse en seres humanos que padecen HAP. En los seres humanos la HAP puede estar causada por anormalidades genéticas (es decir, HAP primaria o familiar) o causas secundarias, como la esclerodermia, la enfermedad cardíaca congénita no corregida, el trastorno vascular mixto del colágeno, la hepatitis C u otra enfermedad del hígado, la infección por VIH o la telangiectasia hemorrágica hereditaria. El efecto de los compuestos también puede determinarse en líneas celulares de células endoteliales, fibroblastos y/o músculo liso humanos: por ejemplo, la determinación de la CI50 para la fosforilación de la STAT3 en líneas celulares humanas de músculo liso de la arteria pulmonar. También pueden examinarse las líneas celulares de otras especies, es decir, de la rata. Puede examinarse el efecto de los compuestos sobre los anillos vasculares precontraídos de los vasos sanguíneos humanos o de los vasos sanguíneos de otras especies, es decir, de la rata. Por ejemplo, los anillos de la arteria pulmonar de rata precontraídos con fenilefrina o endotelina o serotonina o vasopresina, angiotensina II o KCL pueden estudiarse para determinar la respuesta a la dosis de los compuestos para la vasorrelajación. Pueden examinarse otros vasoconstrictores.

30

Puede examinarse el efecto de los compuestos sobre la hipoxia inducida por la vasoconstricción pulmonar. Un modelo de hipertensión pulmonar inducida por hipoxia podría incluir el estudio de ratas, tales como la rata Fawn-Hooded expuesta a bajos niveles de oxígeno (es decir, 5 por ciento de oxígeno). Otro modelo de hipertensión pulmonar inducida por hipoxia podría incluir el ternero fetal mantenido en una cámara de elevada altitud.

35

El efecto de los compuestos puede examinarse en modelos transgénicos de hipertensión pulmonar: es decir, el ratón knock out BMPR2 tratado con IL6, el ratón knock out para la caveolina1 o el ratón knock out para el péptido intestinal vasoactivo.

45

Puede medirse el efecto de los compuestos sobre los cambios histopatológicos que se producen en los modelos de 40 HAP tanto humanos como animales. Por ejemplo, los compuestos pueden disminuir la extensión de las lesiones plexiformes en las arteriolas pulmonares de pulmones enfermos. La lesión plexiforme consiste en células endoteliales, células del músculo liso y fibroblastos que proliferan y obstruyen en un grado variable, el lumen arteriolar pulmonar.

Ejemplo 14 - Análisis ex vivo del compuesto 3 en células de pacientes positivos para JAK2V617F

Para evaluar la actividad de los inhibidores de la JAK2 de molécula pequeña se ha desarrollado un ensayo para cuantificar la actividad de la vía JAK-STAT midiendo el estado de fosforilación de la proteína corriente abaio STAT5. Después de unirse al ligando, un receptor de citocinas hematopoyéticas sufre un cambio conformacional que activa la proteína JAK2 asociada. La JAK2 activada después fosforila la porción intracelular del receptor formando sitios de unión para el reclutamiento de proteínas de señalización intracelular. La STAT5 es una proteína que se recluta para el complejo receptor de citocinas activado, donde se fosforila y después se traslada al núcleo para regular la expresión de un conjunto de genes que median el crecimiento y la diferenciación celulares.

55

60

65

50

La citometría de flujo intracelular puede utilizarse para medir el STAT5 con tirosina fosforilada (pYSTAT5) en poblaciones celulares específicas mediante la activación de marcadores de superficie hematopoyéticos de linaje específico. Esto es particularmente importante para la enfermedad mieloproliferativa positiva para JAK2 V617F ya que el clon que contiene la mutación solo forma una fracción variable de todas las células hematopoyéticas dentro de la médula ósea. Se han seleccionado las células eritroides para su análisis en este estudio ya que este linaje es hiperplásico en la PV.

Métodos

La médula ósea se recogió de la cresta ileal de pacientes que padecían enfermedades mieloproliferativas positivas para JAK2 V617F. Los ensayos de citometría de flujo se realizaron en muestras de médula ósea frescas el día del procedimiento de la biopsia. Las células mononucleares de médula ósea se recogieron mediante centrifugación en gradiente de densidad y después 0,75-1,0 × 10⁶ células se incubaron con el compuesto 3 en varias concentraciones durante una hora en RPMI sin indicador a 37 °C. Las células se estimularon con eritropoyetina al máximo durante 10 minutos y después se fijaron mediante la adición de formaldehído al 4 % directamente en el medio de cultivo. Después las células se permeabilizaron mediante metanol frío y después se añadieron concentraciones óptimas de anticuerpos marcados con fluorescencia. Se seleccionaron células eritroides para la medición de pYSTAT5 sobre la base de la expresión de proteínas de la superficie celular (población CD45¹⁰, CD71^{hi}).

Resultados

10

El Compuesto 3 se ensayó en la población de células eritroides en concentraciones variables de 3 μ M a 0,0041 μ M. La primera muestra de médula ósea se examinó con un intervalo de concentraciones de inhibidores de 3 μ M a 0,037 μ M. Las dos siguientes muestras de pacientes se examinaron con un intervalo de concentraciones de entre 1 μ M y 0,0041 μ M.

15

20

30

Las muestras de médula ósea no estimuladas sin inhibidor (Figura 7A - el control negativo) mostraron una cantidad variable de fosforilación del pYSTAT5 basal del 6 al 32 % de la población eritroide activada total. La estimulación con eritropoyetina (EPO) aumentó la actividad del pYSTAT5 en las células eritroides de todas las muestras examinadas. Este aumento en el pYSTAT5 con estimulación fue más evidente en el subconjunto de células con la mayor expresión de CD 71 (Figura 7B), coherente con la activación de las células más inmaduras dentro de la población eritroide.

Todas las muestras de pacientes mostraron una reducción dependiente de la dosis en la fosforilación del STAT5 con dosis crecientes de inhibidor. Los resultados de los experimentos de citometría de flujo se presentan en dos formatos diferentes (Figura 7C). La población positiva para pYSTAT5 se cuantifica como porcentaje de células en el cuadrante superior derecho de los gráficos de representaciones de puntos (Figura 7A y B). El umbral de sucesos positivos para pYSTAT5 en estos gráficos se basa en la tinción de anticuerpos de control de isotipo y era coherente entre los experimentos. Solo un subconjunto de la población eritroide total se volvió positiva con la estimulación con

positivos para pYSTAT5 en estos gráficos se basa en la tinción de anticuerpos de control de isotipo y era coherente entre los experimentos. Solo un subconjunto de la población eritroide total se volvió positiva con la estimulación con EPO y ésta era máxima en la muestra de control positivo. A medida que se aumentó la dosis de inhibidor el número de sucesos positivos para pYSTAT5 disminuyeron y esto se presenta como el porcentaje de sucesos positivos para pYSTAT5 en comparación con los sucesos positivos para pYSTAT5 en el control positivo del panel izquierdo de la

Figura 7C. Esta es una medida relativa dentro de cada muestra individual de pacientes.

El segundo formato de presentación se presenta en el panel derecho de la Figura 7C. Esta medición representa la intensidad de fluorescencia media en el canal del pYSTAT5 e incluye tanto las células eritroides que están estimuladas con EPO como las que no lo están. Esta es una medición del valor absoluto de la fluorescencia y había variabilidad entre estos valores entre los tres individuos analizados. A medida que la concentración de inhibidor se redujo, la fluorescencia media de la población eritroide total se movió hacia el valor del control positivo.

40 Se apreciará por los expertos en la técnica que pueden hacerse numerosas variaciones y/o modificaciones a la invención como se muestra en las realizaciones específicas sin apartarse del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

En las reivindicaciones que siguen y en la descripción de la invención precedente, excepto cuando el contexto requiera otra cosa debido al lenguaje especificado o a la implicación necesaria, la palabra "comprende", o variaciones tales como "comprenden" o "que comprende", se utiliza en un sentido inclusivo, es decir, para especificar la presencia de las características indicadas, pero no excluye la presencia o adición de otras características en diversas realizaciones de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula lb

$$\mathbb{R}^{8}$$
 \mathbb{R}^{1}
 \mathbb{R}^{1}
 \mathbb{R}^{1}
 \mathbb{R}^{1}

en donde

5

20

35

40

Z se selecciona independientemente entre N y CH;

R¹ se selecciona independientemente entre H, halógeno, OH, CONHR², CON(R²)₂, CF₃, R²OR², CN, morfolino, tiomorfolinilo, 1,1-dióxido de tiomorfolino, piperidinilo sustituido o no sustituido, piperazinilo sustituido o no sustituido, imidazolilo, pirrolidinilo sustituido o no sustituido y alquileno C₁-₄, en donde los átomos de carbono están opcionalmente reemplazados por NRY y/u O sustituidos con morfolino, tiomorfolinilo, 1,1-dióxido de tiomorfolino, piperidinilo sustituido o no sustituido o no sustituido, piperazinilo sustituido o no sustituido;

R² es alquilo C₁₋₄ sustituido o no sustituido;

RY es H o alquilo C₁₋₄ sustituido o no sustituido;

R8 es RXCN:

R^X es alquileno C₁₋₄ sustituido o no sustituido, en donde hasta 2 átomos de carbono pueden estar opcionalmente reemplazados por CO, NSO₂R¹, NR^y, CONR^y, SO, SO₂ u O;

R¹¹ es H o alquilo C₁₋₄,

en donde los sustituyentes se seleccionan entre el grupo que consiste en alquilo C_{1-4} , cicloalquilo C_{3-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , alquinilo C_{1-6} , arilo, heterociclilo, halo, haloarilo, haloheterociclilo, hidroxi, alcoxi C_{1-4} , ariloxi, carboxi, amino,

 $25 \qquad \text{alquilacilo C_{1-6}, a rilacilo, heterociclilacilo, acilamino, aciloxi, alquilsulfenilo C_{1-6}, a rilsulfonilo y ciano; } \\$

o un enantiómero del mismo, un profármaco del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde los profármacos se seleccionan entre

- compuestos en donde un residuo de aminoácido o una cadena polipeptídica de dos o más residuos de aminoácidos están unidos covalentemente a través de un enlace peptídico a un grupo amino, hidroxi o ácido carboxílico libres de dicho compuesto de fórmula lb:
 - compuestos en donde un carbonato, un carbamato, una amida o un éster de alquilo están unidos covalentemente a un grupo amino, amido, hidroxi o ácido carboxílico libres de dicho compuesto de fórmula lb a través de una cadena lateral de carbono de carbonilo del profármaco; y
 - compuestos en donde un grupo hidroxilo libre de dicho compuesto de fórmula Ib está unido a través de un enlace fósforo-oxígeno a un derivado de fosfato de un compuesto (tal como un ácido, sal de ácido o éster).
 - 2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R1 es morfolino.

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o con la reivindicación 2, en donde Z es CH.

- 4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, seleccionado entre:
- 45 *N*-(cianometil)-4-(2-(4-morfolinofenilamino)pirimidin-4-il)benzamida:

N-(2-cianopropan-2-il)-4-(2-(4-morfolinofenilamino)pirimidin-4-il)benzamida;

N-(cianometil)-4-(2-(3-morfolinofenilamino)pirimidin-4-il)benzamida;

N-(cianometil)-4-(2-(4-tiomorfolinofenilamino)pirimidin-4-il)benzamida;

N-(cianometil)-4-(2-(4-yodofenilamino)pirimidin-4-il)benzamida;

50 N-(cianometil)-N-(4-(2-(4-morfolinofenilamino)pirimidin-4-il)fenil)metanosulfonamida;

N-(cianometil)-4-(2-(4-(morfolinometil)fenilamino)pirimidin-4-il)benzamida;

N-(2-(cianometilamino)-2-oxoetil)-4-(2-(4-morfolinofenilamino)pirimidin-4-il)benzamida;

N-(cianometil)-4-(2-(4-(4-hidroxipiperidin-1-il)fenilamino)pirimidin-4-il)benzamida;

N-(cianometil)-4-(2-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenilamino)pirimidin-4-il)benzamida;

N-(cianometil)-4-(2-(4-(3-hidroxipiperidin-1-il)fenilamino)-5-metilpirimidin-4-il)benzamida;

4-(2-(4-(1-bencilpiperidin-4-iloxi)fenilamino)pirimidin-4-il)-N-(cianometil)benzamida;

N-(cianometil)-4-(2-(6-morfolinopiridin-3-ilamino)pirimidin-4-il)benzamida;

4-(2-(4-(4-acetilpiperazin-1-il)fenilamino)pirimidin-4-il)-*N*-(cianometil)benzamida:

5 tosilato de *N*-(4-(2-(4-morfolinofenilamino)pirimidin-4-il)fenil)-*N*-(prop-2-inil)metanosulfonamida;

N-(cianometil)-4-(2-(4-(4-hidroxipiperidin-1-il)fenilamino)-5-metilpirimidin-4-il)benzamida;

N-(cianometil)-4-(2-(4-(piperidin-4-iloxi)fenilamino)pirimidin-4-il)benzamida;

5-(4-(4-(cianometilcarbamoil)fenil)pirimidin-2-ilamino)-N,N-dimetil-2-morfolinobenzamida;

N-terc-butil-5-(4-(4-(cianometilcarbamoil)fenil)pirimidin-2-ilamino)-2-morfolinobenzamida;

10 5-(4-(4-(cianometilcarbamoil)fenil)pirimidin-2-ilamino)-N-etil-2-morfolinobenzamida;

N-(cianometil)-4-(2-(3-fluoro-4-morfolinofenilamino)pirimidin-4-il)benzamida;

N-(cianometil)-4-(2-(4-morfolino-3-(trifluorometil)fenilamino)pirimidin-4-il)benzamida;

5-(4-(4-(N-(cianometil)metilsulfonamido)fenil)pirimidin-2-ilamino)-N-(2-(dimetilamino)etil)-2-morfolinobenzamida;

N-(cianometil)-N-(4-(2-(4-morfolino-3-(trifluorometil)fenilamino)pirimidin-4-il)fenil)metanosulfonamida;

15 *N*-(cianometil)-4-(2-(3-(propoximetil)fenilamino)pirimidin-4-il)benzamida;

4-(2-(3-(aliloximetil)-4-morfolinofenilamino)pirimidin-4-il)-N-(cianometil)benzamida;

N-(cianometil)-4-(2-(4-(1-etilpiperidin-4-iloxi)fenilamino)pirimidin-4-il)benzamida;

N-(cianometil)-N-(4-(2-(3-fluoro-4-morfolinofenilamino)pirimidin-4-il)fenil)metanosulfonamida;

N-(4-(2-(3-ciano-4-morfolinofenilamino)pirimidin-4-il)fenil)-N-(cianometil)metanosulfonamida;

20 2-ciano-*N*-(4-(2-(4-morfolinofenilamino)pirimidin-4-il)fenil)acetamida;

N-(cianometil)-4-(2-(4-(2-morfolinoetoxi)fenilamino)pirimidin-4-il)benzamida;

N-(cianometil)-4-(2-{[4-(1,1-dioxo-1λ⁶,4-tiomorfolin-4-il)fenil]amino}pirimidin-4-il)benzamida;

N-(cianometil)-4-[2-({4-[(1,1-dioxo-1 λ^6 ,4-tiomorfolin-4-il)metil]fenil}amino)pirimidin-4-il]benzamida;

N-(cianometil)-N-metil-4-(2-(4-morfolinofenilamino)pirimidin-4-il)benzamida; y

N-(cianometil)-4-(5-metil-2-(4-morfolinofenilamino)pirimidin-4-il)benzamida.

y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

25

30

35

40

5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que es

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5 que es una sal de clorhidrato de

7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que es

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 8. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el compuesto es un inhibidor de cinasas.
- 9. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el inhibidor de cinasas es un inhibidor de la JAK2.
- 10. Un proceso para la preparación del compuesto de fórmula Ib de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende la etapa de acoplar un compuesto de fórmula II

10 en donde

5

R¹¹ es como se define en la reivindicación 1 y X es cloro que después se convierte en yodo antes del acoplamiento con los compuestos de fórmulas III y IV

$$R^8$$

$$R^1$$
 NH_2
 IV

15 III

en donde

Z, R^1 y R^8 son como se definen en la reivindicación 1; y M es B o un metal.

20

- 11. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 12. Un implante que comprende el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
 - 13. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11 para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad asociada a cinasas, en donde dicho método comprende la administración a un sujeto que lo necesite de una cantidad eficaz de dicho compuesto o composición farmacéutica..
 - 14. El compuesto o la composición farmacéutica para su uso como se reivindica en la reivindicación 13, en donde la enfermedad asociada a cinasas es una enfermedad inmunitaria o inflamatoria; enfermedad hiperproliferativa; enfermedad viral; enfermedad metabólica; o enfermedad vascular.

35

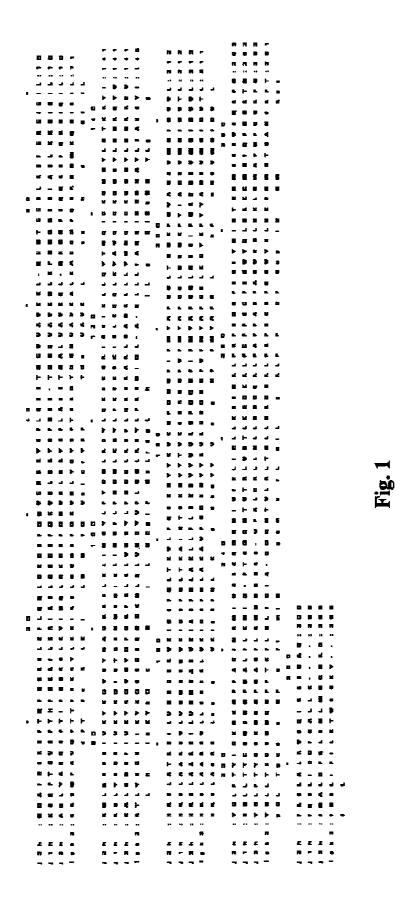
45

30

- 15. El compuesto o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la enfermedad inmunitaria o inflamatoria es el trasplante de órganos.
- 16. El compuesto o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la enfermedad hiperproliferativa es cáncer o una enfermedad mieloproliferativa.
 - 17. El compuesto o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la enfermedad hiperproliferativa es una enfermedad mieloproliferativa seleccionada entre el grupo que consiste en policitemia vera (PV), mielofibrosis primaria, trombocitopenia, trombocitemia esencial (TE), metaplasia mieloide agnogénica (MMA), mielofibrosis idiopática (MFI), leucemia mielógena crónica (LMC), mastocitosis sistémica (MS), leucemia neutrofílica crónica (LNC), síndrome mielodisplásico (SMD) y enfermedad mastocitaria sistémica (EMC).
 - 18. El compuesto o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la

ES 2 557 930 T3

enfermedad mieloproliferativa se selecciona entre el grupo que consiste en policitemia vera (PV), mielofibrosis primaria, trombocitemia y trombocitemia esencial (TE).



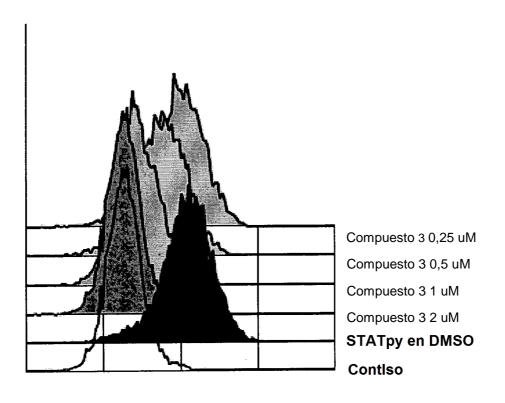


Fig. 2

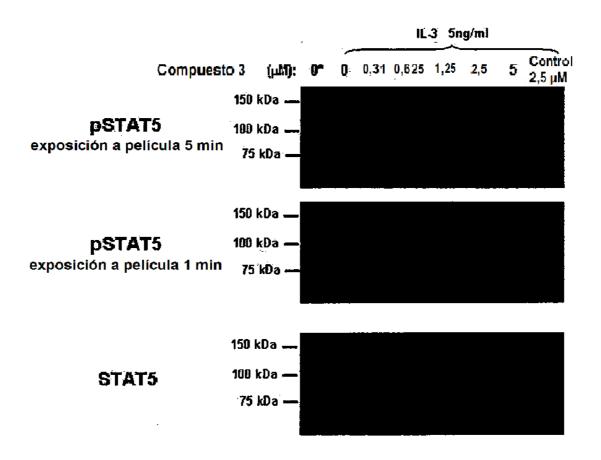


Fig. 3

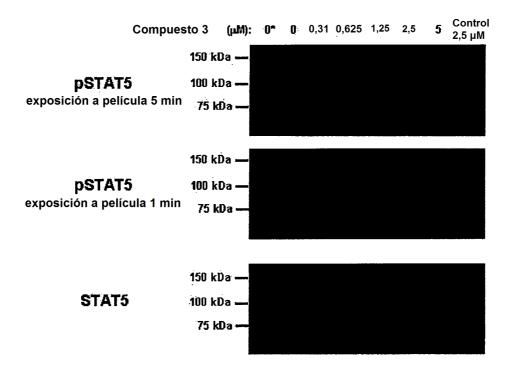


Fig. 4

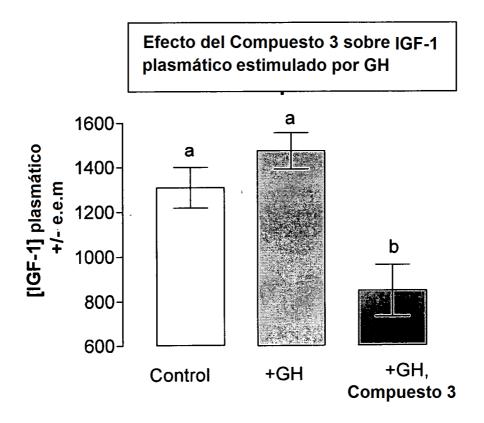


Fig. 5

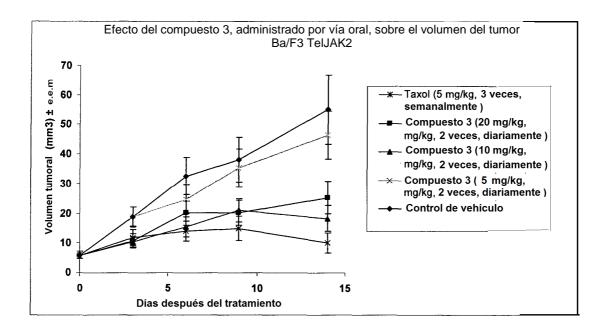
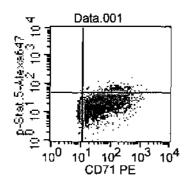
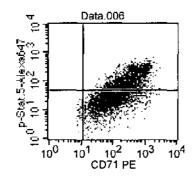


Fig. 6

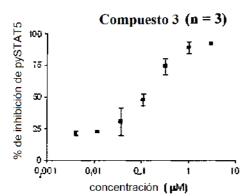
A. Población eritroide sin estimulación por citocinas



B. Población eritroide con estimulación por EPO y vehículo (DMSO)



C. Población eritroide con adición del Compuesto 3 a concentraciones diferentes



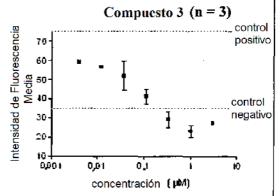


Fig. 7