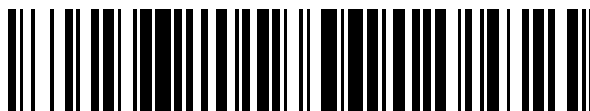


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 931**

51 Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)

C07D 519/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2008** **E 08782684 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015** **EP 2188289**

54 Título: **(7H-Pirrololo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazinas como inhibidores de cinasas para el tratamiento de cáncer e inflamación**

30 Prioridad:

08.08.2007 US 954698 P

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

29.01.2016

73 Titular/es:

**LEXICON PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
8800 TECHNOLOGY FOREST PLACE
THE WOODLANDS, TX 77381, US**

72 Inventor/es:

**HARRISON, BRYCE ALDEN;
KIMBALL, SPENCER DAVID;
MABON, ROSS;
RAWLINS, DAVID BRENT;
RICE, DENNIS S.;
VORONKOV, MICHAEL VICTOR y
ZHANG, YULIAN**

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

Observaciones :

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

ES 2 557 931 T3

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

DESCRIPCIÓN

(7H-Pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazinas como inhibidores de cinasas para el tratamiento de cáncer e inflamación

- 5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional estadounidense n.º 60/954.698, presentada el 8 de agosto de 2007.

1. Campo de la invención

- 10 Esta invención se refiere a inhibidores de cinasas, a composiciones que comprenden los mismos y a métodos de uso de los mismos para tratar diversas enfermedades y trastornos.

2. Antecedentes

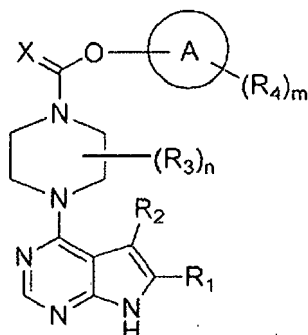
- 15 Las proteínas cinasas son una clase de enzimas que catalizan la transferencia del grupo γ -fosfato desde el ATP hasta una proteína receptora. Se estima que el genoma humano codifica para más de 500 proteína cinasas distintas, de las cuales muchas se han implicado en una amplia gama de enfermedades y trastornos, incluyendo cáncer e inflamación.
- 20 Las LIM cinasas (LIMK) se han vinculado con la ruta de p53. Véase, por ejemplo, la solicitud internacional n.º WO 02/099048. LIMK pertenece a una pequeña subfamilia de cinasas con una combinación única de dos motivos LIM N-terminales y un dominio proteína cinasa C-terminal. Estos motivos LIM y dominios cinasa están unidos por una región rica en prolina y serina que contiene varios supuestos sitios de reconocimiento de caseína cinasas y map cinasas. Se cree que las LIM cinasas y las proteínas de su ruta contribuyen a la reorganización inducida por Rho del citoesqueleto de actina. Ídem. Los miembros de la familia de LIM cinasas incluyen LIM cinasa 1 (LIMK1) y LIM
- 25 cinasa 2 (LIMK2). Ambas fosforilan cofilina y regulan el reordenamiento del citoesqueleto de actina dependiente de la familia de Rho. Ídem.

- 30 Se han propuesto inhibidores de LIM cinasas para el tratamiento de cáncer. Ídem. También se ha sugerido que inhibidores de LIMK pueden ser útiles en el tratamiento de glaucoma, al fomentar la despolimerización de actina en células trabeculares y reducir la tensión ocular. Véase la solicitud internacional n.º WO 04/047868.

- Se ha notificado un enorme número de compuestos, con una amplia variedad de quimiotipos, como inhibidores de cinasas. Por ejemplo, se han dado a conocer compuestos de pirimidina sustituidos con fenilo que tal como se
- 35 notifica son útiles como inhibidores de LIMK. Véase la solicitud internacional WO 2006/084017. Se han dado a conocer compuestos a base de pirrol[2,3-d]pirimidina como inhibidores de cinasa Janus 3. Véase, por ejemplo, la publicación de patente estadounidense n.º 2004/0058922. También se han dado a conocer algunos compuestos a base de pirrol[2,3-d]pirimidina entre una amplia variedad de otros compuestos como posibles inhibidores de proteína cinasa AKT. Véase la publicación de patente estadounidense n.º 2005/0130954. Algunos inhibidores de cinasas a
- 40 base de pirrol[2,3-d]pirimidina son útiles tal como se notifica en el tratamiento de cáncer. Véase la solicitud de patente estadounidense n.º 11/354.636, presentada el 15 de febrero de 2006.

3. Sumario de la invención

- 45 Esta invención se refiere, en parte, a compuestos de fórmula I:



I

- 50 y a sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, cuyos sustituyentes se definen en el presente documento. Compuestos particulares de estas fórmulas son potentes inhibidores de LIMK2.

Una realización de la invención engloba formaciones farmacéuticas que comprenden compuestos dados a conocer en el presente documento (por ejemplo, compuestos de fórmula I).

Otra realización engloba los compuestos dados a conocer en el presente documento para su uso en el tratamiento, la gestión y la prevención de diversas enfermedades y trastornos afectados por LIMK2, incluyendo cáncer, enfermedades y trastornos inflamatorios, y enfermedad y trastornos que afectan a la visión (por ejemplo, enfermedades y trastornos del ojo), tales como glaucoma, neurodegeneración e infección.

4. Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra el efecto de un compuesto de la invención en el ensayo de perfusión de cultivo de órganos en cámara anterior de cerdo descrito en los ejemplos más adelante. En este caso, se encontró que una disolución 0,1 μ M que contenía un compuesto de la invención aumentaba el flujo de salida en función del tiempo.

La figura 2 muestra el efecto de un compuesto de la invención en el modelo de hipertensión ocular descrito en los ejemplos más adelante. Se usaron ratones de tipo natural F2 hembra. Los datos en esta figura se obtuvieron una hora tras la aplicación tópica del compuesto a los ojos de los ratones.

5. Descripción detallada

Esta invención se basa, en parte, en el descubrimiento de inhibidores novedosos de LIM cinasa 2 (LIMK2), que pueden usarse para tratar, gestionar y/o prevenir una variedad de enfermedades y trastornos.

5.1. Definiciones

A menos que se indique de otro modo, el término “alquenilo” significa un hidrocarburo de cadena lineal, ramificado y/o cíclico que tiene desde 2 hasta 20 (por ejemplo, de 2 a 10 o de 2 a 6) átomos de carbono, y que incluye al menos un doble enlace carbono-carbono. Los restos alquenilo representativos incluyen vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-metil-1-butenilo, 2-metil-2-butenilo, 2,3-dimetil-2-butenilo, 1-hexenilo, 2-hexenilo, 3-hexenilo, 1-heptenilo, 2-heptenilo, 3-heptenilo, 1-octenilo, 2-octenilo, 3-octenilo, 1-nonenilo, 2-nonenilo, 3-nonenilo, 1-decenilo, 2-decenilo y 3-decenilo.

A menos que se indique de otro modo, el término “alcoxilo” significa un grupo -O-alquilo. Los ejemplos de grupos alcoxilo incluyen, pero no se limitan a, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -O(CH₂)₂CH₃, -O(CH₂)₃CH₃, -O(CH₂)₄CH₃ y -O(CH₂)₅CH₃.

A menos que se indique de otro modo, el término “alquilo” significa un hidrocarburo de cadena lineal, ramificado y/o cíclico (“cicloalquilo”) que tiene desde 1 hasta 20 (por ejemplo, de 1 a 10 o de 1 a 4) átomos de carbono. Restos alquilo que tienen desde 1 hasta 4 carbonos se denominan “alquilo inferior”. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, pentilo, hexilo, isohexilo, heptilo, 4,4-dimetilpentilo, octilo, 2,2,4-trimetilpentilo, nonilo, decilo, undecilo y dodecilo. Los restos cicloalquilo pueden ser monocíclicos o multicíclicos, y los ejemplos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y adamantilo. Ejemplos adicionales de restos alquilo tienen partes lineales, ramificadas y/o cíclicas (por ejemplo, 1-etil-4-metil-ciclohexilo). El término “alquilo” incluye hidrocarburos saturados así como restos alquenilo y alquinilo.

A menos que se indique de otro modo, el término “alquilarilo” o “alquil-arilo” significa un resto alquilo unido a un resto arilo.

A menos que se indique de otro modo, el término “alquilheteroarilo” o “alquil-heteroarilo” significa un resto alquilo unido a un resto heteroarilo.

A menos que se indique de otro modo, el término “alquilheterociclo” o “alquil-heterociclo” significa un resto alquilo unido a un resto heterociclo.

A menos que se indique de otro modo, el término “alquinilo” significa un hidrocarburo de cadena lineal, ramificado o cíclico que tiene desde 2 hasta 20 (por ejemplo, de 2 a 20 o de 2 a 6) átomos de carbono, y que incluye al menos un triple enlace carbono-carbono. Los restos alquinilo representativos incluyen acetilenilo, propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo, 3-metil-1-butinilo, 4-pentinilo, 1-hexinilo, 2-hexinilo, 5-hexinilo, 1-heptinilo, 2-heptinilo, 6-heptinilo, 1-octinilo, 2-octinilo, 7-octinilo, 1-noninilo, 2-noninilo, 8-noninilo, 1-decinilo, 2-decinilo y 9-decinilo.

A menos que se indique de otro modo, el término “arilo” significa un anillo aromático o un sistema de anillos aromáticos o parcialmente aromáticos que se compone de átomos de carbono e hidrógeno. Un resto arilo puede comprender múltiples anillos unidos o condensados entre sí. Los ejemplos de restos arilo incluyen, pero no se limitan a, antracenilo, azuleno, bifenilo, fluorenilo, indano, indenilo, naftilo, fenantrenilo, fenilo, 1,2,3,4-tetrahidro-naftaleno y tolilo.

A menos que se indique de otro modo, el término “arilalquilo” o “aril-alquilo” significa un resto arilo unido a un resto

alquilo.

A menos que se indique de otro modo, los términos “halógeno” y “halo” engloban flúor, cloro, bromo y yodo.

- 5 A menos que se indique de otro modo, el término “heteroalquilo” se refiere a un resto alquilo (por ejemplo, lineal, ramificado o cíclico) en el que al menos uno de sus átomos de carbono se ha reemplazado por un heteroátomo (por ejemplo, N, O o S).

- 10 A menos que se indique de otro modo, el término “heteroarilo” significa un resto arilo en el que al menos uno de sus átomos de carbono se ha reemplazado por un heteroátomo (por ejemplo, N, O o S). Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, acridinilo, bencimidazolilo, benzofuranilo, benzoisotiazolilo, benzoisoxazolilo, benzoquinazolinilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, furilo, imidazolilo, indolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, oxadiazolilo, oxazolilo, ftalazinilo, pirazinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridilo, pirimidinilo, pirimidilo, pirrolilo, quinazolinilo, quinolinilo, tetrazolilo, tiazolilo y triazinilo.

- 15 A menos que se indique de otro modo, el término “heteroarilalquilo” o “heteroaril-alquilo” significa un resto heteroarilo unido a un resto alquilo.

- 20 A menos que se indique de otro modo, el término “heterociclo” se refiere a un anillo o sistema de anillos monocíclico o policíclico aromático, parcialmente aromático o no aromático que se compone de carbono, hidrógeno y al menos un heteroátomo (por ejemplo, N, O o S). Un heterociclo puede comprender múltiples anillos (es decir, dos o más) condensados o unidos entre sí. Los heterociclos incluyen heteroarilos. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, benzo[1,3]dioxolilo, 2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxinilo, cinolinilo, furanilo, hidantoinilo, morfolinilo, oxetanilo, oxiranilo, piperazinilo, piperidinilo, pirrolidinonilo, pirrolidinilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, tetrahidropiridinilo, tetrahidropirimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo y valerolactamilo.

- 25 A menos que se indique de otro modo, el término “heterocicloalquilo” o “heterociclo-alquilo” se refiere a un resto heterociclo unido a un resto alquilo.

- 30 A menos que se indique de otro modo, el término “heterocicloalquilo” se refiere a un heterociclo no aromático.

A menos que se indique de otro modo, el término “heterocicloalquilalquilo” o “heterocicloalquil-alquilo” se refiere a un resto heterocicloalquilo unido a un resto alquilo.

- 35 A menos que se indique de otro modo, el término “ CI_{50} de LIMK2” es la CI_{50} de un compuesto determinada usando el ensayo de inhibición *in vitro* de LIM cinasa 2 humana descrito en los ejemplos, más adelante.

- 40 A menos que se indique de otro modo, los términos “gestionar”, “que gestiona” y “gestión” engloban prevenir la recidiva de la enfermedad o el trastorno especificado en un paciente que ya ha padecido la enfermedad o el trastorno, y/o alargar el tiempo que un paciente que ha padecido la enfermedad o el trastorno permanece en remisión. Los términos engloban modular el umbral, el desarrollo y/o la duración de la enfermedad o el trastorno, o cambiar el modo en que un paciente responde a la enfermedad o el trastorno.

- 45 A menos que se indique de otro modo, el término “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a sales preparadas a partir de ácidos o bases no tóxicos farmacéuticamente aceptables incluyendo ácidos y bases inorgánicos y ácidos y bases orgánicos. Las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen, pero no se limitan a, sales metálicas preparadas a partir de aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio y zinc o sales orgánicas preparadas a partir de lisina, N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (N-metilglucamina) y procaina. Los ácidos no tóxicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, ácidos inorgánicos y orgánicos tales como ácido acético, algínico, antranílico, bencenosulfónico, benzoico, canforsulfónico, cítrico, etenosulfónico, fórmico, fumárico, furoico, galacturónico, glucónico, glucurónico, glutámico, glicólico, bromhídrico, clorhídrico, isetiónico, láctico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, mícico, nítrico, pamoico, pantoténico, fenilacético, fosfórico, propiónico, salicílico, esteárico, succínico, sulfanílico, sulfúrico, tartárico y ácido p-toluenosulfónico. Los ácidos no tóxicos específicos incluyen ácidos clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, sulfúrico y metanosulfónico. Los ejemplos de sales específicas incluyen por tanto sales de clorhidrato y mesilato. Otras se conocen bien en la técnica. Véanse, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed. (Mack Publishing, Easton PA: 1990) y Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª ed. (Mack Publishing, Easton PA: 1995).

- 60 A menos que se indique de otro modo, un “potente inhibidor de LIMK2” es un compuesto que tiene una CI_{50} de LIMK2 de menos de aproximadamente 250 nM.

- 65 A menos que se indique de otro modo, los términos “prevenir”, “que previene” y “prevención” contemplan una acción que se produce antes de que un paciente comience a padecer la enfermedad o el trastorno especificado, que inhibe o reduce la gravedad de la enfermedad o el trastorno. En otras palabras, los términos engloban la profilaxis.

A menos que se indique de otro modo, una “cantidad profilácticamente eficaz” de un compuesto es una cantidad suficiente para prevenir una enfermedad o un estado, o uno o más síntomas asociados con la enfermedad o el estado, o prevenir su recidiva. Una “cantidad profilácticamente eficaz” de un compuesto significa una cantidad de agente terapéutico, solo o en combinación con otros agentes, que proporciona un beneficio profiláctico en la prevención de la enfermedad. El término “cantidad profilácticamente eficaz” puede englobar una cantidad que mejora la profilaxis global o potencia la eficacia profiláctica de otro agente profiláctico.

A menos que se indique de otro modo, el término “mezcla estereoisomérica” engloba mezclas racémicas así como mezclas estereoméricamente enriquecidas (por ejemplo, R/S = 30/70, 35/65, 40/60, 45/55, 55/45, 60/40, 65/35 y 70/30).

A menos que se indique de otro modo, el término “estereoméricamente puro” significa una composición que comprende un estereoisómero de un compuesto y que está sustancialmente libre de otros estereoisómeros de ese compuesto. Por ejemplo, una composición estereoméricamente pura de un compuesto que tiene un estereocentro estará sustancialmente libre del estereoisómero opuesto del compuesto. Una composición estereoméricamente pura de un compuesto que tiene dos estereocentros estará sustancialmente libre de otros diastereómeros del compuesto. Un compuesto estereoméricamente puro típico comprende más de aproximadamente el 80% en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente el 20% en peso de otros estereoisómeros del compuesto, más de aproximadamente el 90% en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente el 10% en peso de los otros estereoisómeros del compuesto, más de aproximadamente el 95% en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente el 5% en peso de los otros estereoisómeros del compuesto, más de aproximadamente el 97% en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente el 3% en peso de los otros estereoisómeros del compuesto, o más de aproximadamente el 99% en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente el 1% en peso de los otros estereoisómeros del compuesto.

A menos que se indique de otro modo, el término “sustituido”, cuando se usa para describir una estructura o un resto químico, se refiere a un derivado de esa estructura o resto en el que uno o más de sus átomos de hidrógeno se sustituye por un resto químico o grupo funcional tal como, pero sin limitarse a, alcohol, aldehído, alcoxilo, alcianoiloxilo, alcocarbonilo, alquenoilo, alquilo (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, t-butilo), alquinoilo, alquilcarboniloxilo (-OC(O)-alquilo), amida (por ejemplo -C(O)NH-alquilo-, -alquilo-NHC(O)-alquilo), amidinilo (por ejemplo, -C(NH)NH-alquilo-, -C(NR)NH₂), amina (primaria, secundaria y terciaria tal como alquilamino, arilamino, arilalquilamino), aroilo, arilo, ariloxilo, azo, carbamoilo (por ejemplo, -NHC(O)O-alquilo-, -OC(O)NH-alquilo), carbamilo (por ejemplo, CONH₂, CONH-alquilo, CONH-arilo, CONH-arilalquilo), carbonilo, carboxilo, ácido carboxílico, anhídrido de ácido carboxílico, cloruro de ácido carboxílico, ciano, éster, epóxido, éter (por ejemplo, metoxilo, etoxilo), guanidino, halo, haloalquilo (por ejemplo, -CCl₃, -CF₃, -C(CF₃)₃), heteroalquilo, hemiacetal, imina (primaria y secundaria), isocianato, isotiocianato, cetona, nitrilo, nitro, oxo, fosfodiéster, sulfuro, sulfonamido (por ejemplo, SO₂NH₂), sulfona, sulfonilo (incluyendo alquilsulfonilo, arilsulfonilo y arilalquilsulfonilo), sulfóxido, tiol (por ejemplo, sulfhidrilo, tioéter) y urea (por ejemplo, -NHCONH-alquilo-).

A menos que se indique de otro modo, una “cantidad terapéuticamente eficaz” de un compuesto es una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico en el tratamiento o la gestión de una enfermedad o un estado, o para retrasar o minimizar uno o más síntomas asociados con la enfermedad o el estado. Una “cantidad terapéuticamente eficaz” de un compuesto significa una cantidad de agente terapéutico, solo o en combinación con otras terapias, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o la gestión de la enfermedad o el estado. El término “cantidad terapéuticamente eficaz” puede englobar una cantidad que mejora la terapia global, reduce o evita síntomas o causas de una enfermedad o un estado, o potencia la eficacia terapéutica de otro agente terapéutico.

A menos que se indique de otro modo, los términos “tratar”, “que trata” y “tratamiento” contemplan una acción que se produce mientras que un paciente padece la enfermedad o el trastorno especificado, que reduce la gravedad de la enfermedad o el trastorno, o retrasa o ralentiza la progresión de la enfermedad o el trastorno.

A menos que se indique de otro modo, el término “incluyen” tiene el mismo significado que “incluyen, pero no se limitan a”, y el término “incluye” tiene el mismo significado que “incluye, pero no se limita a”. De manera similar, el término “tal como” tiene el mismo significado que el término “tal como, pero sin limitarse a”.

A menos que se indique de otro modo, debe interpretarse que uno o más adjetivos que siguen inmediatamente a una serie de sustantivos se aplican a cada uno de los sustantivos. Por ejemplo, la expresión “alquilo, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido” tiene el mismo significado que “alquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido”.

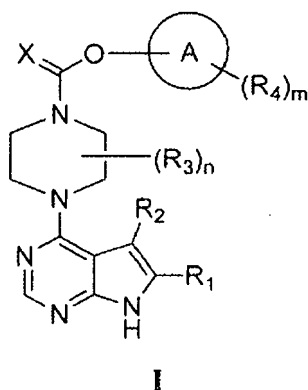
A menos que se indique de otro modo, una estructura o un nombre de un compuesto o género de compuestos engloba todas las formas de ese compuesto o género de compuestos, y todas las composiciones que comprenden ese compuesto o género de compuestos.

Debe indicarse que un resto químico que forma parte de un compuesto más grande puede describirse en el presente documento usando un nombre comúnmente otorgado cuando existe como una única molécula o un nombre químico comúnmente otorgado a su radical. Por ejemplo, los términos "piridina" y "piridilo" otorgan el mismo significado cuando se usan para describir un resto unido a otras entidades químicas. Por tanto, las dos expresiones "XOH, en el que X es piridilo" y "XOH, en el que X es piridina" otorgan el mismo significado, y engloban los compuestos piridin-2-ol, piridin-3-ol y piridin-4-ol.

Debe indicarse también que si no se indica la estereoquímica de una estructura o una parte de una estructura con, por ejemplo, líneas en negrita o discontinuas, debe interpretarse que la estructura o la parte de la estructura engloba todos los estereoisómeros de la misma. Además, se supone que cualquier átomo mostrado en un dibujo con las valencias no completas está unido a suficientes átomos de hidrógeno como para completar las valencias. Además, los enlaces químicos representados con una línea continua paralela a una línea discontinua engloban enlaces tanto sencillos como dobles (por ejemplo, aromáticos), si las valencias lo permiten.

5.2. Compuestos

Una realización de esta invención engloba compuestos de fórmula I:



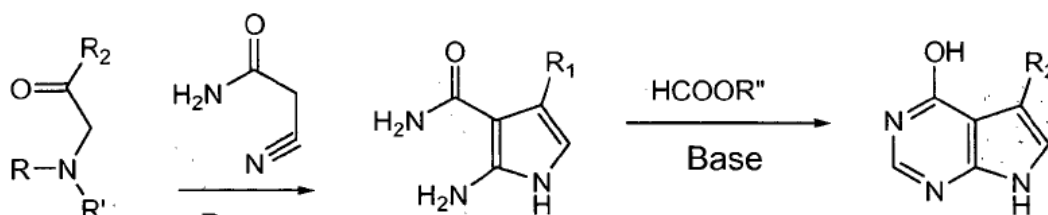
y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la que: X es O o NR_A ; A es cicloalquilo, arilo o heterociclo; R_1 es hidrógeno, OR_B , $\text{N}(\text{R}_B)_2$, SR_B , o alquilo, arilo o heterociclo; R_2 es hidrógeno, halógeno, ciano, OR_B , $\text{N}(\text{R}_B)_2$, SR_B , o alquilo, arilo o heterociclo; cada R_3 es independientemente halógeno o alquilo, y/o dos R_3 pueden tomarse junto con el anillo al que están unidos para proporcionar un cicloalquilo o heterociclo; cada R_4 es ciano, halógeno, hidroxilo, nitro, R_C , OR_C , $\text{N}(\text{R}_C)_2$, $\text{NHC}(\text{O})\text{R}_C$, $\text{C}(\text{O})\text{R}_C$, $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}_C)_2$ o SO_2R_C ; R_A es hidrógeno, ciano, nitro, R_{A1} , SO_2R_{A1} , $\text{SO}_2\text{NR}_{A1}$ o $\text{SO}_2\text{N}(\text{R}_{A1})_2$; cada R_{A1} es independientemente hidrógeno, alquilo, heteroalquilo, arilo, heterocicilo; cada R_B es independientemente hidrógeno o alquilo; cada R_C es independientemente hidrógeno, alquilo, heteroalquilo, arilo, heterocicilo; n es 0-8; y m es 0-4.

Compuestos particulares de la invención son potentes inhibidores de LIMK2. Determinados compuestos tienen una Cl_{50} de LIMK2 de menos de 100, 75, 50, 25 ó 10 nM.

5.3. Métodos de síntesis

Pueden prepararse compuestos de la invención mediante métodos conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente estadounidense n.ºs 2004/0058922 y 2005/0130954.

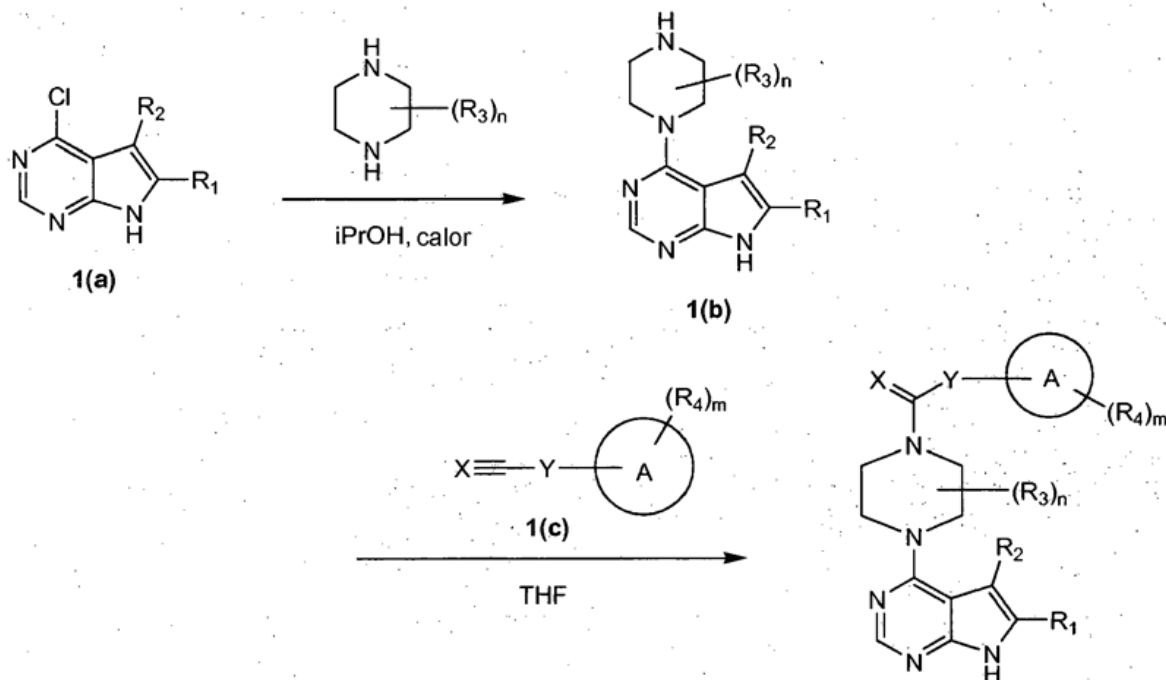
Pueden prepararse pirrolopirimidinas mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, West, J. Org. Chem. 26:4959 (1961); Aono *et al.*, documento EP 0733633-B1. Se describe un enfoque en la solicitud de patente estadounidense n.º 60/853.891, presentada el 23 de octubre de 2006, y se muestra a continuación en el esquema 1:



Esquema 1

El compuesto de 4-hidroxipirrolo[2,3-*d*]pirimidina resultante se convierte entonces en el compuesto de 4-cloro correspondiente (compuesto 1(a) en el esquema 2, a continuación) usando métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, West, J. Org. Chem. 26:4959 (1961). Ese compuesto se usa entonces para preparar compuestos de la invención, tal como se muestra a continuación en el esquema 2:

5



Esquema 2

Tal como se muestra en el esquema 2, la pirrolopirimidina 1(a) se condensa con una piperazina en condiciones adecuadas (por ejemplo, calentamiento en *i*-PrOH) para formar la pirrolopirimidina sustituida 1(b). El tratamiento de esta nueva piperazina con un agente de acoplamiento sustituido adecuado (por ejemplo, un isocianato) 1(c) produce el compuesto final. Si se desea, pueden usarse métodos conocidos para transformar ese compuesto en otros diversos englobados por esta invención.

5.4. Métodos de uso

Esta invención se refiere a un método de inhibición de LIMK2, que comprende poner en contacto LIMK2 con un potente inhibidor de LIMK2. Potentes inhibidores de LIMK2 preferidos son compuestos de la invención (es decir, compuestos dados a conocer en el presente documento).

Una realización particular se refiere a un método de tratamiento, gestión o prevención de una enfermedad o un trastorno inflamatorio en un paciente, que comprende administrar al paciente que lo necesita una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un compuesto de la invención.

Otra realización se refiere a un método de tratamiento, gestión o prevención de cáncer en un paciente, que comprende administrar al paciente que lo necesita una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un compuesto de la invención.

Otra realización se refiere a un método de reducción de la presión intraocular en un paciente, que comprende inhibir la actividad o expresión de LIMK2 en un paciente que lo necesita. En un método, se inhibe la actividad de LIMK2 poniendo en contacto el ojo del paciente con un potente inhibidor de LIMK2. Potentes inhibidores de LIMK2 particulares son de fórmulas I o II. En otro método, se inhibe la expresión de LIMK2 administrando al ojo del paciente un compuesto (por ejemplo, un ARNip) que inhibe la expresión de LIMK2.

Otra realización se refiere a un método de tratamiento, gestión o prevención de enfermedades o trastornos que afectan a la visión en un paciente, que comprende inhibir la actividad o expresión de LIMK2 en un paciente que lo necesita. En un método, se inhibe la actividad de LIMK2 poniendo en contacto el ojo del paciente con un potente inhibidor de LIMK2. Potentes inhibidores de LIMK2 particulares son de fórmulas I o II. En otro método, se inhibe la expresión de LIMK2 administrando al ojo del paciente un compuesto (por ejemplo, un ARNip) que inhibe la expresión de LIMK2. Las enfermedades y los trastornos que afectan a la visión incluyen glaucoma, enfermedades

neurodegenerativas y enfermedades infecciosas.

5.5. Formulaciones farmacéuticas

Esta invención engloba composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos de la invención. Determinadas composiciones farmacéuticas son formas de dosificación unitarias individuales adecuadas para la administración oral, mucosa (por ejemplo, nasal, sublingual, vaginal, bucal o rectal), parenteral (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, mediante inyección en bolo, intramuscular o intraarterial), transdérmica, tópica y oftálmica (por ejemplo, tópica, intravítrea) a un paciente.

Los ejemplos de formas de dosificación incluyen, pero no se limitan a: comprimidos; comprimidos oblongos; cápsulas, tales como cápsulas de gelatina elástica blanda; sellos; trociscos; pastillas para chupar; dispersiones; supositorios; pomadas; cataplasmas (sinapismos); pastas; polvos; vendajes; cremas; emplastos; disoluciones; parches; aerosoles (por ejemplo, pulverizaciones nasales o inhaladores); geles; formas de dosificación líquidas adecuadas para la administración oral o mucosa a un paciente, incluyendo suspensiones (por ejemplo, suspensiones líquidas acuosas o no acuosas, emulsiones de aceite en agua, o una emulsión líquida de agua en aceite), disoluciones y elixires; formas de dosificación líquidas adecuadas para la administración parenteral a un paciente; y sólidos estériles (por ejemplo, sólidos cristalinos o amorfos) que pueden reconstituirse para proporcionar formas de dosificación líquidas adecuadas para la administración parenteral a un paciente.

La formulación debe adecuarse al modo de administración. Por ejemplo, la administración oral requiere recubrimientos entéricos para proteger los compuestos de esta invención frente a la degradación dentro del tracto gastrointestinal. De manera similar, una formulación puede contener componentes que facilitan la administración del/de los principio(s) activo(s) al sitio de acción. Por ejemplo, pueden administrarse compuestos en formulaciones liposómicas, con el fin de protegerlos frente a enzimas de degradación, facilitar el transporte en el sistema circulatorio y efectuar la administración a través de membranas celulares a sitios intracelulares.

La composición, forma y tipo de una forma de dosificación variará dependiendo de su uso. Por ejemplo, una forma de dosificación usada en el tratamiento agudo de una enfermedad puede contener mayores cantidades de uno o más de los principios activos que comprende que una forma de dosificación usada en el tratamiento crónico de la misma enfermedad. De manera similar, una forma de dosificación parenteral puede contener menores cantidades de uno o más de los principios activos que comprende que una forma de dosificación oral usada para tratar la misma enfermedad. Estas y otras maneras en las que variarán entre sí formas de dosificación específicas englobadas por esta invención resultarán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed. (Mack Publishing, Easton PA: 1990).

5.5.1. Formas de dosificación oral

Las composiciones farmacéuticas de la invención adecuadas para la administración oral pueden presentarse como formas de dosificación diferenciadas, tales como, pero sin limitarse a, comprimidos (por ejemplo, comprimidos masticables), comprimidos oblongos, cápsulas y líquidos (por ejemplo, jarabes aromatizados). Tales formas de dosificación contienen cantidades predeterminadas de principios activos, y pueden prepararse mediante métodos de la farmacia bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed. (Mack Publishing, Easton PA: 1990).

Se preparan formas de dosificación oral típicas combinando el/los principio(s) activo(s) en una mezcla íntima con al menos un excipiente según técnicas de combinación farmacéutica convencionales. Los excipientes pueden adoptar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración.

Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan las formas unitarias de dosificación oral más ventajosas. Si se desea, pueden recubrirse los comprimidos mediante técnicas en estado acuoso o no acuoso convencionales. Tales formas de dosificación pueden prepararse mediante métodos de la farmacia convencionales. En general, se preparan composiciones farmacéuticas y formas de dosificación mezclando de manera uniforme e íntima los principios activos con portadores líquidos, portadores sólidos finamente divididos o ambos, y luego conformando el producto para dar la presentación deseada si es necesario. Pueden incorporarse disgregantes en formas de dosificación sólidas para facilitar una rápida disolución. También pueden incorporarse lubricantes para facilitar la fabricación de formas de dosificación (por ejemplo, comprimidos).

5.5.2. Formas de dosificación parenteral

Pueden administrarse formas de dosificación parenteral a pacientes por diversas vías incluyendo, pero sin limitarse a, subcutánea, intravenosa (incluyendo mediante inyección en bolo), intramuscular e intraarterial. Debido a que su administración normalmente sortea las defensas naturales de los pacientes contra los contaminantes, las formas de dosificación parenteral son específicamente estériles o pueden esterilizarse antes de su administración a un paciente. Los ejemplos de formas de dosificación parenteral incluyen, pero no se limitan a, disoluciones listas para inyección, productos secos listos para disolverse o suspenderse en un vehículo farmacéuticamente aceptable para

inyección, suspensiones listas para inyección, y emulsiones.

Los expertos en la técnica conocen bien vehículos adecuados que pueden usarse para proporcionar formas de dosificación parenteral de la invención. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: agua para inyección USP; vehículos acuosos tales como, pero sin limitarse a, inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de dextrosa y cloruro de sodio, e inyección de Ringer con lactato; vehículos miscibles en agua tales como, pero sin limitarse a, alcohol etílico, polietilenglicol y polipropilenglicol; y vehículos no acuosos tales como, pero sin limitarse a, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, oleato de etilo, miristato de isopropilo y benzoato de bencilo.

5.5.3. Formas de dosificación transdérmica, tópica y mucosa

Las formas de dosificación transdérmica, tópica y mucosa incluyen, pero no se limitan a, disoluciones oftálmicas, pulverizaciones, aerosoles, cremas, lociones, pomadas, geles, disoluciones, emulsiones, suspensiones u otras formas conocidas por un experto en la técnica. Véanse, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed. (Mack Publishing, Easton PA: 1990); e Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 4ª ed. (Lea & Febiger, Filadelfia: 1985). Las formas de dosificación transdérmica incluyen parches "de tipo depósito" o "de tipo matriz", que pueden aplicarse a la piel y llevarse puestos durante un periodo de tiempo específico para permitir la penetración de una cantidad deseada de principios activos.

Los expertos en las técnicas farmacéuticas conocen bien excipientes (por ejemplo, portadores y diluyentes) y otros materiales adecuados que pueden usarse para proporcionar formas de dosificación transdérmica, tópica y mucosa, y dependen del tejido particular al que se aplicará una composición farmacéutica o forma de dosificación dada.

Dependiendo del tejido específico que va a tratarse, pueden usarse componentes adicionales antes de, junto con o de manera posterior al tratamiento con principios activos de la invención. Por ejemplo, pueden usarse potenciadores de la penetración para ayudar en la administración de principios activos al tejido.

También puede ajustarse el pH de una composición farmacéutica o forma de dosificación, o del tejido al que se aplica la composición farmacéutica o forma de dosificación, para mejorar la administración de uno o más principios activos. De manera similar, puede ajustarse la polaridad de un portador disolvente, su fuerza iónica o tonicidad para mejorar la administración. También pueden añadirse compuestos, tales como estearatos, a composiciones farmacéuticas o formas de dosificación para alterar ventajosamente la hidrofiliidad o lipofiliidad de uno o más principios activos para mejorar la administración. En este sentido, los estearatos pueden servir como vehículo lipídico para la formulación, como agente emulsionante o tensioactivo, y como agente potenciador de la administración o potenciador de la penetración. Pueden usarse diferentes sales, hidratos o solvatos de los principios activos para ajustar adicionalmente las propiedades de la composición resultante.

5.5.4. Formas de dosificación oftálmica

Pueden administrarse compuestos de la invención al ojo usando disoluciones acuosas, suspensiones acuosas y pomadas. Tal como conocen los expertos en la técnica, el producto oftálmico debe ser estéril en su recipiente final para prevenir la contaminación microbiana del ojo. Pueden usarse conservantes para mantener la esterilidad una vez que se ha abierto el recipiente. Las formulaciones oftálmicas también requieren que se controlen el pH, la capacidad de tamponamiento, la viscosidad y la tonicidad de la formulación. Formulaciones preferidas tienen un pH de desde aproximadamente 6,5 hasta 8,5, y una capacidad de tamponamiento de desde aproximadamente 0,01 hasta 0,1. Formaciones particulares son isotónicas. Formaciones particulares tienen una viscosidad de desde aproximadamente 25 hasta 50 cps.

Se conocen bien componentes que pueden usarse para proporcionar vehículos seguros que administran eficazmente un principio activo farmacéutico (API) a su sitio de acción, aunque variarán dependiendo de las características físicas y químicas del API.

Pueden usarse disoluciones acuosas tamponadas de manera apropiada para la administración de compuestos solubles en agua. En composiciones en disolución, se usan normalmente componentes poliméricos para aumentar la viscosidad de la composición. Los ejemplos de polímeros adecuados incluyen polímeros celulósicos (por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, etilhidroxietilcelulosa), polímeros sintéticos (por ejemplo, polímeros de carboxivinilo, poli(alcohol vinílico)), polisacáridos (por ejemplo, goma xantana, goma guar y dextrano), y mezclas de los mismos. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs. 4.136.173 y 7.244.440. También pueden usarse suspensiones para administrar compuestos. Se usan normalmente componentes poliméricos en composiciones en suspensión como adyuvantes de estabilidad física, que ayudan a mantener los componentes insolubles en suspensión o fácilmente redispersables. Ídem.

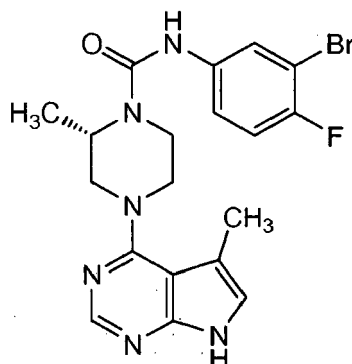
Pueden usarse conservantes para garantizar la esterilidad de las formaciones. Los conservantes adecuados incluyen cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, clorobutanol, acetato fenilmercúrico, nitrato fenilmercúrico, timerosal, metilparabeno y propilparabenos. Y pueden usarse antioxidantes para garantizar la estabilidad de

formaciones susceptibles a la oxidación. Los antioxidantes adecuados incluyen ácido etilendiaminotetraacético, bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio y tiourea.

6. Ejemplos

Pueden entenderse aspectos de esta invención a partir de los siguientes ejemplos, que no limitan su alcance. En la medida en que los ejemplos se refieran a compuestos fuera del alcance de las reivindicaciones, se incluirán como ejemplos de referencia. Por tanto, todos los compuestos en el presente documento tras los "ejemplos" nombrados no son ejemplos de la invención reivindicada excepto el ejemplo 13.

6.1. Ejemplo 1: (S)-N-(3-Bromo-4-fluorofenil)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboxamida



Se preparó el compuesto del título en varias etapas.

A. Preparación de (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboxilato de terc-butilo. Se añadieron (S)-2-metilpiperazin-1-carboxilato de terc-butilo (3 g, 15 mmol), N,N-diisopropiletilamina (3 ml) y 4-cloro-5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (2 g, 12 mmol) a isopropanol (10 ml). Se calentó la disolución a 120°C en un tubo de presión sellado durante 12 horas. Se concentró la reacción a vacío, y se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida (80 g de SiO₂, MeOH al 0-5%: CH₂Cl₂, 50 min) para dar (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboxilato de terc-butilo limpio (1,5 g, 4,5 mmol, 38%).

¹H-RMN (400 MHz, cloroformo-*d*) δ ppm 10,42 (s, a., 1H), 8,39 (s, 1H), 6,96 (s, 1H), 4,40 (d, J=6,06 Hz, 1H), 3,83-4,01 (m, 2H), 3,43 (td, J=12,57, 3,41 Hz, 1H), 3,32 (4d, J=12,76, 3,92 Hz, 1H), 3,07 (td, J=12,32, 3,41 Hz, 1H), 2,44 (s, 3H), 1,50 (s, 9H), 1,24 (d, J=6,82 Hz, 3H); EM (ES+) [M+H]⁺ = 332.

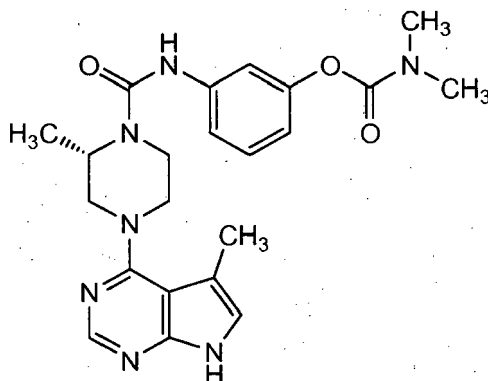
B. Preparación de (S)-5-metil-4-(3-metilpiperazin-1-il)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina. Se añadió la piperazina protegida con Boc de la etapa A (1,5 g, 4,5 mmol) a una mezcla 1:1 de ácido trifluoroacético y diclorometano (10 ml). Se agitó la reacción durante la noche, luego se concentró a vacío, se diluyó con diclorometano y se neutralizó con bicarbonato de sodio ac. sat. Se separaron las fases, y se sometió a retroextracción la fase acuosa con más diclorometano. Se secaron sobre MgSO₄ las fracciones orgánicas combinadas y se concentraron a vacío para dar (S)-5-metil-4-(3-metilpiperazin-1-il)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (0,80 g, 3,5 mmol, 76%).

¹H-RMN (400 MHz, MeOD) δ ppm 8,24 (s, 1H), 7,05 (d, J=1,01 Hz, 1H), 3,97-4,04 (m, 2H), 3,00-3,14 (m, 4H), 2,74 (dd, J=12,88, 10,36 Hz, 1H), 2,45 (d, J=1,01 Hz, 3H), 1,19 (d, J=6,32 Hz, 3H); EM (ES+) [M+H]⁺ = 232.

C. Preparación de (S)-N-(3-bromo-4-fluorofenil)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboxamida. A una disolución de trifosgeno (0,30 g, 1 mmol) en CH₂Cl₂ (70 ml) a -5°C se le añadieron 3-bromo-4-fluoroanilina (0,19 g, 1 mmol) en CH₂Cl₂ (20 ml) y trietilamina (0,60 ml, 4,3 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 20 min, luego se añadió (S)-5-metil-4-(3-metilpiperazin-1-il)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina de la etapa B (0,23 g, 1 mmol) en CH₂Cl₂ (30 ml). Se agitó la mezcla durante 1,5 horas, luego se concentró a vacío. Se purificó el residuo mediante HPLC prep. para proporcionar (S)-N-(3-bromo-4-fluorofenil)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboxamida (65 mg) como un sólido blanco.

¹H-RMN (400 MHz, metanol-*d*₄) δ ppm 8,36 (s, 1H), 7,74 (dd, J=6,3, 2,5 Hz, 1H), 7,35 (dd, J=8,9, 4,2, 2,6 Hz, 1H), 7,24 (d, J=1,0 Hz, 1H), 7,13 (t, J=8,7 Hz, 1H), 4,55-4,62 (m, 1H), 4,33-4,41 (m, 1H), 4,18 (dd, J=13,0, 1,3 Hz, 1H), 4,04-4,12 (m, 1H), 3,85 (dd, J=13,0, 4,0 Hz, 1H), 3,57-3,68 (m, 2H), 2,49 (d, J=1,0 Hz, 3H), 1,28 (d, J=6,8 Hz, 3H); EM (ES+) [M+H]⁺ = 447,3.

6.2. Ejemplo 2: (S)-Dimetilcarbamato de 3-(2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-

carboxamido)fenilo

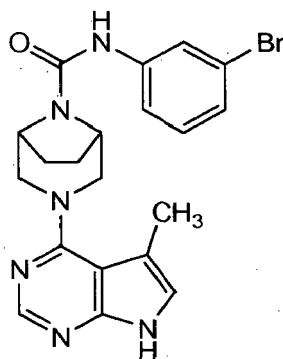
5 **A. Preparación de N,N-dimetilcarbamato de 3-aminofenilo:** Se trató 3-nitrofenol (1,0 g, 7,2 mmol) con piridina (1,7 ml, 21,6 mmol), trietilamina (1,5 ml, 10,8 mmol) y clorocarbamato de N,N-dimetilo (0,79 ml, 8,6 mmol) durante 3 días. Se extinguió la reacción con H₂O, se agitó durante 15 min, se diluyó con Et₂O, se lavó con NaHSO₄ 1 M ac., H₂O, NaHCO₃ ac. sat. y salmuera (con retroextracción), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a vacío. Se hidrogenó el residuo con H₂ a presión en globo sobre Pd al 10%/C (húmedo al 50%, 1,26 g, 0,59 mmol) en THF (36 ml) con AcOH (0,42 ml) durante 18 horas. Se filtró la reacción a través de Celite con EtOAc y se concentró a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida (40 g de SiO₂, MeOH al 0-4%: CH₂Cl₂) para dar N,N-dimetilcarbamato de 3-aminofenilo (1,15 g, 6,4 mmol, 89%).

15 ¹H-RMN (400 MHz, cloroformo-*d*) δ ppm 7,12 (t, *J*=8,0 Hz, 1H), 6,52 (t, *J*=2,3 Hz, 1H), 6,50 (t, *J*=2,3 Hz, 1H), 6,46 (t, *J*=2,1 Hz, 1H), 3,71 (s. a., 2H), 3,08 (s, 3H), 3,01 (s, 3H); EM (ES+) [M+H]⁺ = 181.

20 **B. Preparación de (S)-dimetilcarbamato de 3-(2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboxamido)fenilo:** A una disolución de trifosgeno (104 mg, 0,35 mmol) en THF anhidro (7,5 ml) a 0°C se le añadió lentamente N,N-dimetilcarbamato de 3-aminofenilo de la etapa A (180 mg, 1,0 mmol) en THF (2,5 ml). Se agitó la reacción durante 15 min a 0°C y 15 min a temperatura ambiente. Se añadió (S)-5-metil-4-(3-metilpiperazin-1-il)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina del ejemplo 1, etapa B (231 mg, 1,0 mmol). Se agitó la reacción durante 1 hora, se extinguió con MeOH, se diluyó con EtOAc, se lavó con H₂O, NaHCO₃ ac. sat. y salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida (40 g de SiO₂, MeOH al 0-8%: CH₂Cl₂) y se liofilizó para dar (S)-dimetilcarbamato de 3-(2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboxamido)fenilo (365 mg, 0,84 mmol, 84%) como un sólido blanco.

30 ¹H-RMN (400 MHz, cloroformo-*d*) δ ppm 9,82 (s. a., 1H), 8,40 (s, 1H), 7,31 (t, *J*=2,1 Hz, 1H), 7,24 (t, *J*=8,2 Hz, 1H), 7,10-7,19 (m, 1H), 6,95 (s, 1H), 6,80 (dd, *J*=6,8, 1,3 Hz, 1H), 6,60 (s, 1H), 4,37 (ddd, *J*=6,2, 3,3, 3,2 Hz, 1H), 4,14 (dd, *J*=12,5, 1,4 Hz, 1H), 3,91-3,98 (m, 2H), 3,54 (td, *J*=12,3, 3,3 Hz, 1H), 3,45 (dd, *J*=12,9, 4,0 Hz, 1H), 3,18 (td, *J*=12,3, 3,5 Hz, 1H), 3,09 (s, 3H), 3,01 (s, 3H), 2,45 (d, *J*=1,0 Hz, 3H), 1,32 (d, *J*=6,6 Hz, 3H); EM (ES+) [M+H]⁺ = 438.

6.3. Ejemplo 3: N-(3-Bromofenil)-3-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octano-8-carboxamida



35 **A. Preparación de 3-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octano-8-carboxilato de terc-butilo.** A una disolución de 4-cloro-5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (25 mg, 0,15 mmol) y 3,8-diazabicyclo[3.2.1]octano-8-carboxilato de terc-butilo (30 mg, 0,14 mmol) en isopropanol (2 ml) se le añadió trietilamina (36 μl, 0,26 mmol). Se calentó la reacción a 180°C durante 30 min en el microondas, luego se concentró a vacío. Se purificó el residuo mediante HPLC prep. (Sunfire C18 30x50 mm, H₂O al 10-90%/MeOH con el 0,01% de TFA, 15 min, 35 ml/min,

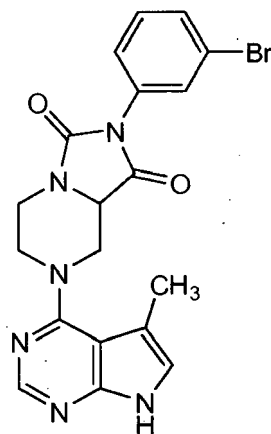
220 nm) para dar 3-(5-metil-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidin-4-il)-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octano-8-carboxilato de terc-butilo (35 mg, 0,10 mmol, 66%).

B. Preparación de clorhidrato de 4-(3,8-diazabicyclo[3.2.1]octan-3-il)-5-metil-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidina. Se disolvió el diazabicyclo[3.2.1]octano protegido con Boc de la etapa A en HCl 4 M en dioxano (4 ml). Se agitó la reacción durante 1 hora y se concentró a vacío para proporcionar clorhidrato de 4-(3,8-diazabicyclo[3.2.1]octan-3-il)-5-metil-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidina (30 mg, 0,093 mmol, 91%).

C. Preparación de N-(3-bromofenil)-3-(5-metil-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidin-4-il)-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octano-8-carboxamida. Se disolvió el diazabicyclo[3.2.1]octano de la etapa B en THF seco (3 ml) bajo N₂, y se añadió 3-bromoisocianato (30 µl, 0,1 mmol). Tras agitar durante 3 horas, se concentró la reacción, y se purificó el residuo mediante HPLC prep. para dar 1,5 mg de N-(3-bromofenil)-3-(5-metil-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidin-4-il)-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octano-8-carboxamida.

¹H-RMN (MeOD): δ 5,45 (1H, s), 7,69 (1H, s), 7,3 (1H, m), 7,1 (3H, m), 4,52 (2H, m), 2,2 (2H, J = 12,4 Hz, d), 2,18 (2H, J = 12,4 Hz, d), 2,38 (3H, s), 1,94 (2H, m), 2,25 (2H, m); EM (ES⁺) [M+H]⁺ = 443.

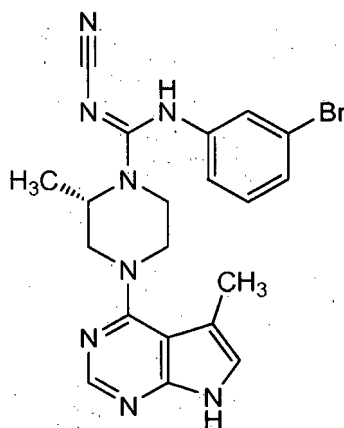
6.4. Ejemplo 4: 2-(3-Bromofenil)-7-(5-metil-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidin-4-il)tetrahidroimidazo[1,5-a]pirazin-1,3(2H,5H)-diona



A una disolución de 4-(5-metil-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-2-carboxilato de metilo preparada de manera análoga a la piperazina del ejemplo 1, etapa B (30 mg, 0,1 mmol) en 1,5 ml de CH₂Cl₂ se le añadió lentamente 3-bromoisocianato (13 µl, 0,1 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente hasta que se consumió el material de partida (monitorización mediante CL/EM). Se eliminó el disolvente a vacío, y se purificó el residuo mediante HPLC prep. para dar 2-(3-bromofenil)-7-(5-metil-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidin-4-il)tetrahidroimidazo[1,5-a]pirazin-1,3(2H,5H)-diona como un sólido blanco.

¹H-RMN (CD₃OD): δ 8,27 (s, 1H), 7,71 (s, 1H), 7,39-7,58 (m, 3H), 7,16 (s, 1H), 4,58-4,62 (m, 1H), 4,49-4,51 (m, 1H), 4,15-4,21 (m, 2H), 3,20-3,41 (m, 3H), 2,46 (s, 3H); EM (ES⁺) [M+H]⁺ = 441, 443.

6.5. Ejemplo 5: (S)-N-(3-Bromofenil)-N'-ciano-2-metil-(5-metil-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida



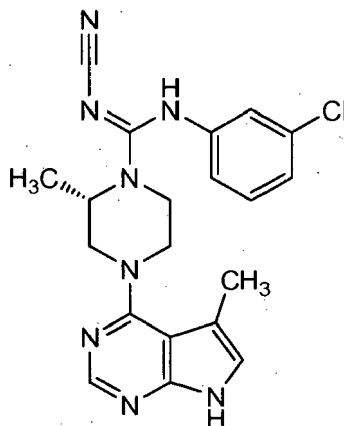
A. Preparación de N-3-bromofenil-N'-cianocarbamidato de fenilo. Se añadieron 3-bromoanilina (1,44 g, 8,4 mmol), N-cianocarbonimidato de difenilo (2 g, 8,4 mmol) a acetonitrilo (20 ml). Se calentó la disolución a 50°C durante la noche y se enfrió hasta temperatura ambiente, dando como resultado la precipitación del producto. Se filtró el sólido cristalino blanco para dar N-3-bromofenil-N'-cianocarbamidato de fenilo (2 g, 6,3 mmol, 75%).

¹H-RMN (400 MHz, cloroformo-*d*) δ ppm 7,59 (t, *J*=2,02 Hz, 1H), 7,42-7,47 (m, 2H), 7,40 (ddd, *J*=8,15, 1,45, 1,26 Hz, 1H), 7,31-7,36 (m, 2H), 7,24-7,29 (m, 2H), 7,13-7,18 (m, 1H); EM (ES+) [M+H]⁺ = 316, 318.

B. Preparación de (S)-N-(3-bromofenil)-N'-ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida. Se combinaron el cianocarbamidato de la etapa A (9,48 g, 30 mmol), (S)-5-metil-4-(3-metilpiperazin-1-il)-7H-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina del ejemplo 1, etapa B (6,93 g, 30 mmol) y trietilamina (4,16 ml, 30 mmol) en MeCN (250 ml) y se calentaron hasta 85°C durante 6 horas. Se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se concentró a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida (750 g de SiO₂, MeOH al 0-7%: CH₂Cl₂) para dar una espuma amarilla. Se disolvió este material en MeOH y se agitó con carbón activado a 60°C durante 15 min. Se filtró la mezcla a través de Celite, lavando con cantidades copiosas de MeOH y MeOH al 10%: CH₂Cl₂, y se concentró a vacío. Se purificó el residuo de nuevo mediante cromatografía ultrarrápida (750 g de SiO₂, MeOH al 0-7%: CH₂Cl₂). Se disolvió el material resultante en MeOH, y se añadió agua para precipitar el producto. Se concentró la mezcla a vacío, y se resuspendió el producto en agua y se liofilizó para dar un hidrato de (S)-N-(3-bromofenil)-N'-ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida (8,17 g, 57%, 1,25 eq. de H₂O basado en el análisis de CHN) como un sólido blanco amorfo.

¹H-RMN (400 MHz, DMSO) δ ppm 11,60 (s, 1H), 9,50 (s, 1H), 8,22 (s, 1H), 7,25 (m, 3H), 7,07 (m, 2H), 4,51 (m, 1H), 4,00 (m, 1H), 3,91 (m, 1H), 3,84 (m, 1H), 3,53 (m, 1H), 3,32 (m, 1H), 3,08 (m, 1H), 2,37 (d, *J*=1,0 Hz, 3H), 1,24 (d, *J*=6,6 Hz, 3H); EM (ES+) [M+H]⁺= 453, 455; Anal. de CHN calc. para C₂₀H₂₁BrN₈·1,25 H₂O: C, 50,48; H, 4,98; N, 23,55. Hallado: C, 50,18; H, 4,58; N, 23,53.

6.6. Ejemplo 6: (S)-N-(3-Clorofenil)-N'-ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida

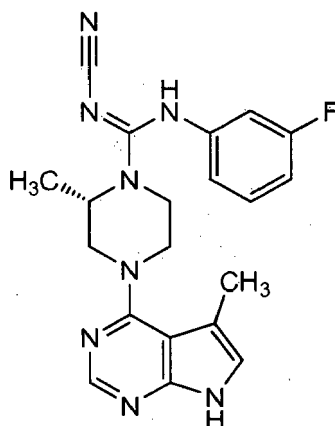


A. Preparación de N-3-clorofenil-N'-cianocarbamidato de fenilo. Se añadieron N-cianocarbonimidato de difenilo (2 g, 8,4 mmol) y 3-cloroanilina (0,88 ml, 8,4 mmol) a acetonitrilo (20 ml). Se calentó la disolución a 50°C durante la noche y se enfrió hasta temperatura ambiente, dando como resultado la precipitación del producto. Se filtró el sólido cristalino blanco para dar N-3-clorofenil-N'-cianocarbamidato de fenilo (2 g, 7,3 mmol, 88%).

¹H-RMN (400 MHz, cloroformo-*d*) δ ppm 7,42-7,48 (m, 3H), 7,28-7,36 (m, 2H), 7,24-7,27 (m, 2H), 7,13-7,18 (m, 2H); EM (ES+) [M+H]⁺ = 272.

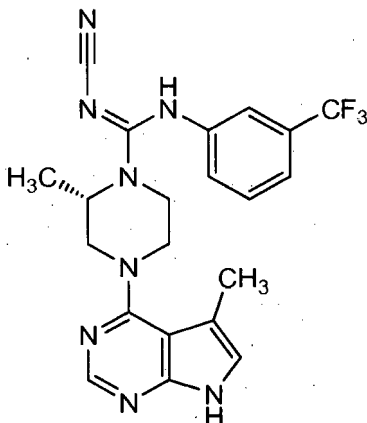
B. Preparación de (S)-N-(3-clorofenil)-N'-ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida. Se añadieron el cianocarbamidato de la etapa A (0,47 g, 1,7 mmol), (S)-5-metil-4-(3-metilpiperazin-1-il)-7H-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina del ejemplo 1, etapa B (0,40 g, 1,7 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (1 ml) a acetonitrilo (10 ml). Se calentó la mezcla a 85°C en un tubo de presión sellado durante 4 horas. Se evaporó el disolvente, y se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida (80 g de SiO₂, MeOH al 0-5%: CH₂Cl₂, 50 min) para dar (S)-N-(3-clorofenil)-N'-ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida (0,32 g, 0,79 mmol, 46%).

¹H-RMN (400 MHz, MeOD) δ ppm 8,22 (s, 1H), 7,31 (t, *J*=7,96 Hz, 1H), 7,01-7,16 (m, 4H), 4,15 (d, *J*=13,14 Hz, 1H), 4,00 (d, *J*=13,39 Hz, 1H), 3,91 (d, *J*=13,14 Hz, 1H), 3,65 (d, *J*=3,28 Hz, 1H), 3,47 (dd, *J*=13,14, 3,79 Hz, 1H), 3,34 (s, 1H), 3,09-3,25 (m, 1H), 2,44 (s, 3H), 1,32 (d, *J*=6,57 Hz, 3H); EM (ES+) [M+H]⁺ = 409.

6.7. Ejemplo 7: (S)-N'-Ciano-N-(3-fluorofenil)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolol[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida

Se añadieron N'-ciano-N-(3-fluorofenil)carbamimidato de fenilo, preparado de manera análoga a N-3-clorofenil-N'-cianocarbamidato de fenilo del ejemplo 6, etapa A, (0,55 g, 2,2 mmol), (S)-5-metil-4-(3-metilpiperazin-1-il)-7H-pirrolol[2,3-d]pirimidina, del ejemplo 1, etapa B, (0,50 g, 2,2 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (1 ml) a acetonitrilo (10 ml). Se calentó la mezcla a 85°C en un tubo de presión sellado durante 4 horas. Se evaporó el disolvente, y se purificó el residuo mediante HPLC prep. (columna Sunfire C18 30x250 mm, MeCN al 10-100%: H₂O (NH₄OAc 10 mM), 18 min, 45 ml/min) para dar (S)-N'-ciano-N-(3-fluorofenil)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolol[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida (0,23 g, 0,58 mmol, 27%).

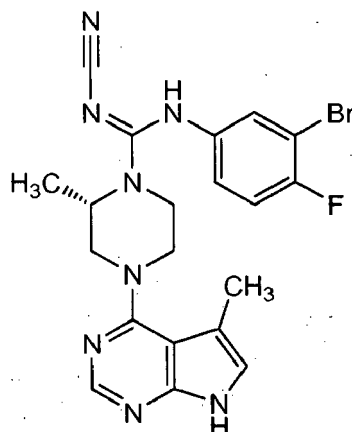
¹H-RMN (400 MHz, MeOD) δ ppm 8,28 (s, 1H), 7,31-7,49 (m, 1H), 7,08 (d, J=1,01 Hz, 1H), 6,89-7,02 (m, 2H), 4,63-4,74 (m, 1H), 4,20 (d, J=13,14 Hz, 1H), 4,06 (d, J=13,39 Hz, 1H), 3,97 (d, J=11,12 Hz, 1H), 3,67-3,86 (m, 1H), 3,54 (dd, J=13,14, 3,79 Hz, 1H), 3,38 (s. a., 2H), 3,18-3,29 (m, 1H), 2,50 (d, J=1,01 Hz, 2H), 1,39 (d, J=6,57 Hz, 3H); EM (ES+) [M+H]⁺ = 393.

6.8. Ejemplo 8: (S)-N'-Ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolol[2,3-d]pirimidin-4-il)-N-(3-(trifluorometil)fenil)piperazin-1-carboximidamida

Se combinaron N'-ciano-N-(3-(trifluorometil)fenil)carbamimidato de fenilo, preparado de manera análoga a N'-cianocarbamidato de N-3-bromofenilo del ejemplo 5, etapa A (36 mg, 0,12 mmol), (S)-5-metil-4-(3-metilpiperazin-1-il)-7H-pirrolol[2,3-d]pirimidina, del ejemplo 1, etapa B, (35 mg, 0,15 mmol) y trietilamina (0,05 ml, 0,36 mmol) en isopropanol en un recipiente para microondas. Se calentó la reacción a 140°C durante 30 min en condiciones de microondas. Se evaporó el disolvente, y se lavó el residuo con CH₂Cl₂ (3 x 10 ml). Se purificó el producto en bruto mediante HPLC prep. para proporcionar (S)-N'-ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolol[2,3-d]pirimidin-4-il)-N-(3-(trifluorometil)fenil)piperazin-1-carboximidamida como un sólido blanco.

¹H (CD₃OD): δ 1,349-1,6 (3H, J = 6,4 Hz, d), 2,028-2,054 (ancho, N-H); 3,515-3,547 (1H, m), 3,611-3,736 (2H, m), 4,059-4,092 (1H, J = 13,2 Hz, d), 4,561-4,595 (1H, J = 13,6 Hz, d), 4,643-4,706 (2H, m) 6,70 (1H, s), 7,19 (1H, s), 7,428-7,449 (2H, m), 7,549-7,588 (2H, m), 8,203 (1H, s, ancho); EM (ES+) [M+H]⁺ = 429.

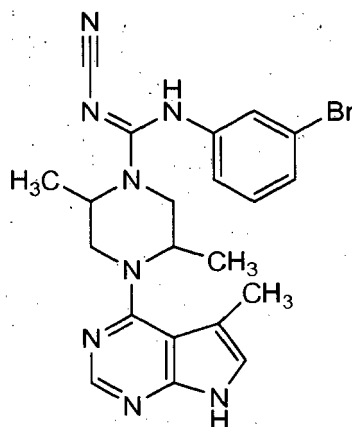
6.9. Ejemplo 9: (S)-N-(3-Bromo-4-fluorofenil)-N'-ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolol[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida



Se preparó el compuesto del título de la misma manera que (S)-N-(3-clorofenil)-N'-ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida del ejemplo 6.

^1H -RMN (400 MHz, MeOD) δ ppm 8,23 (s, 1H), 7,42 (dd, $J=5,8, 2,5$ Hz, 1H), 7,13-7,24 (m, 2H), 7,04 (s, 1H), 4,62 (s. a., 1H), 4,16 (d, $J=13,1$ Hz, 1H), 4,03 (d, $J=13,4$ Hz, 1H), 3,92 (d, $J=13,1$ Hz, 1H), 3,63-3,73 (m, 1H), 3,49 (dd, $J=13,0, 3,7$ Hz, 1H), 3,21 (td, $J=12,4, 3,3$ Hz, 1H), 2,45 (s, 3H), 1,33 (d, $J=6,6$ Hz, 3H); EM (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 471, 473$.

6.10. Ejemplo 10: N-(3-Bromofenil)-N'-ciano-2,5-dimetil-4-(5-metil-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida

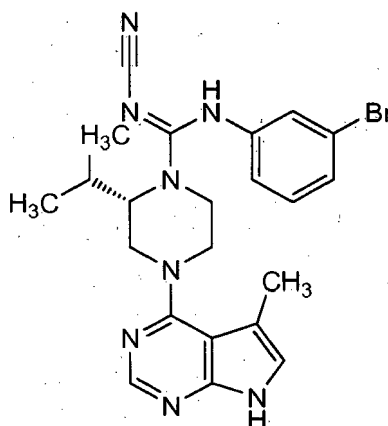


A. Preparación de 4-(2,5-dimetilpiperazin-1-il)-5-metil-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidina. Se añadieron trans-2,5-dimetilpiperazina (1 g, 8,8 mmol), N,N-diisopropiletilamina (1ml) y 4-cloro-5-metil-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidina (2 g, 11,9 mmol) a isopropanol (10 ml). Se calentó la disolución en un microondas a 150°C durante 6 horas, luego se concentró a vacío. Se purificó el material mediante HPLC prep. (columna Sunfire C18 30x250 mm, MeCN al 10-100%: H_2O (NH_4OAc 10 mM), 18 min, 45 ml/min.) para dar 4-(trans-2,5-dimetilpiperazin-1-il)-5-metil-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidina (0,30 g, 14%).

^1H -RMN (400 MHz, cloroformo- d) δ ppm 8,49 (s, 1H), 6,95 (s, 1H), 3,62-3,70 (m, 1H), 3,46-3,57 (m, 1H), 3,20-3,27 (m, 1H), 2,95 (q, $J=7,41$ Hz, 1H), 2,81 (dd, $J=12,63, 9,60$ Hz, 1H), 2,08 (s, 3H), 1,31 (d, $J=6,82$ Hz, 3H), 1,15 (t, $J=6,57$ Hz, 4H); EM (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 246$.

B. Preparación de N-(3-bromofenil)-N'-ciano-2,5-dimetil-4-(5-metil-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida: Se añadieron la dimetilpiperazina de la etapa A (80 mg, 0,32 mmol), N-3-bromofenil-N'-cianocarbamimidato de fenilo, del ejemplo 5, etapa A, (100 mg, 0,32 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (0,20 ml) a isopropanol (10 ml). Se calentó la mezcla a 150°C durante 20 min en un microondas, luego se concentró a vacío. Se purificó el material mediante HPLC prep. (columna Sunfire C18 30x250 mm, MeCN al 10-100%: H_2O (NH_4OAc 10 mM), 18 min, 45 ml/min) para dar (E)-N-(3-bromofenil)-N'-ciano-2,5-dimetil-4-(5-metil-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida (29 mg, 0,062 mmol), 19%.

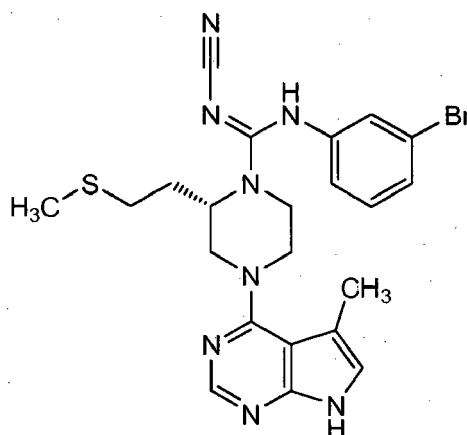
^1H -RMN (400 MHz, MeOD) δ ppm 8,21 (s, 1H), 7,23-7,32 (m, 3H), 7,08-7,15 (m, 1H), 7,02 (s, 1H), 4,60 (s. a., 2H), 3,85 (d, $J=2,53$ Hz, 3H), 3,63 (d, $J=12,38$ Hz, 1H), 2,43 (s, 3H), 1,26 (d, $J=6,82$ Hz, 3H), 1,18 (d, $J=6,57$ Hz, 3H); EM (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 469$.

6.11. Ejemplo 11: (S)-N-(3-Bromofenil)-N'-ciano-2-isopropil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida

A. Preparación de (S)-4-(3-isopropilpiperazin-1-il)-5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina. A una disolución de (S)-3-isopropilpiperazin-2,5-diona (100 mg, 0,6 mmol) en THF anhidro se le añadió hidruro de litio y aluminio 1 M en THF (1,2 ml, 1,2 mmol). Se sometió a reflujo la reacción durante 1 h, se enfrió hasta temperatura ambiente, se extinguió con H₂O, se filtró, luego se concentró a vacío para producir (S)-2-isopropilpiperazina. Se combinó este material con 4-cloro-5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (85,5 mg, 0,5 mmol) en trietilamina (1 ml) e isopropanol (2 ml). Se calentó la reacción en un microondas a 180°C durante 30 min, se concentró a vacío, se disolvió en EtOAc, se lavó con H₂O y se concentró a vacío para proporcionar (S)-4-(3-isopropilpiperazin-1-il)-5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina, con la que se continuó sin purificación adicional.

B. Preparación de (S)-N-(3-bromofenil)-N'-ciano-2-isopropil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida. Se combinó la piperazina de la etapa A con N-3-bromofenil-N'-cianocarbamidato de fenilo, del ejemplo 5, etapa A, (40 mg, 1,2 mmol) en isopropanol en un tubo sellado. Se calentó la reacción hasta 120°C, se monitorizó mediante CL/EM hasta que no quedaba material de partida, y luego se concentró a vacío. Se purificó el residuo mediante HPLC prep. (Sunfire C18 5u 30 x 100 mm, B a del 10% al 100%, tiempo de gradiente = 13 min, velocidad de flujo = 45 ml/min, longitud de onda = 220 nm, disolvente A = acetato de amonio ac. 10 mM, disolvente B = acetonitrilo) para dar (S)-N-(3-bromofenil)-N'-ciano-2-isopropil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida (2,2 mg, 7%) como un sólido blanco.

¹H-RMN (400 MHz, MeOD) δ (ppm) 8,35 (s, 1H), 7,3 (d, 1H), 7,29 (m, 1H), 7,1 (s, 1H), 7,19 (s, 1H), 7,13 (d, 1H), 3,6 dm, 2H), 3,5 (m, 2H), 3,3 (m, 2H), 2,46 (s, 3H), 1,44 (m, 2H), 0,93 (m, 6H); EM (ES⁺) [M+H]⁺ = 482.

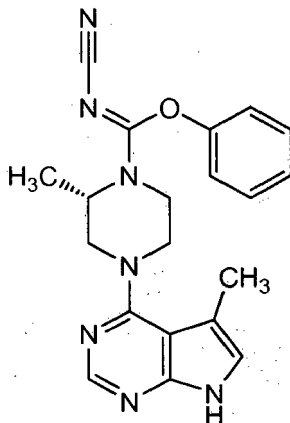
6.12. Ejemplo 12: (S)-N-(3-Bromofenil)-N'-ciano-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-2-(2-(metiltio)etil)piperazin-1-carboximidamida

A. Preparación de (S)-3-(2-(metiltio)etil)piperazin-2,5-diona. Se llevó éster metílico de L-metionina HCl (1 g, 5 mmol) a CH₂Cl₂ y se añadió cloruro de cloroacetilo (598 μl, 7,5 mmol) con agitación. Tras 10 minutos de agitación, se añadió NaOH acuoso saturado (1 ml). Se agitó la reacción durante 20 minutos, y se separó la fase de CH₂Cl₂, se lavó con H₂O (2x) y se concentró a vacío. Se trató el residuo con amoníaco 7 N en MeOH a 100°C durante 1,5 h. Se concentró la reacción a vacío para producir (S)-3-(2-(metiltio)etil)piperazin-2,5-diona que va a usarse en bruto.

B. Preparación de (S)-N-(3-bromofenil)-N'-ciano-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-2-(2-(metiltio)etil)piperazin-1-carboximidamida. Usando la diona de la etapa A, se preparó el compuesto del título de la misma manera que (S)-N-(3-bromofenil)-N'-ciano-2-isopropil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida del ejemplo 11.

¹H-RMN (400 MHz, MeOD) δ (ppm) 8,35 (s, 1H), 7,3 (d, 1H), 7,29 (m, 1H); 7,1 (s, 1H), 7,19 (s, 1H), 7,13 (d, 1H), 4,24 (M, 2H), 3,99 (m, 1H), 3,6 (m, 2H), 3,4 (m, 2H), 2,4 (m, 2H), 2,3 (s, 3H), 1,97 (m, 1H), 1,91 (s, 3H), 1,79 (m, 1H); EM (ES+) [M+H]⁺ = 514.

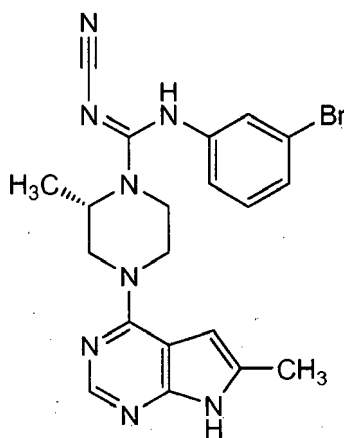
6.13. Ejemplo 13: (S)-N-Ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carbimato de fenilo



Se combinaron (S)-5-metil-4-(3-metilpiperazin-1-il)-7H-pirrol[2,3-d]pirimidina, del ejemplo 1, etapa B, (347 mg, 1,5 mmol) y N-cianocarbonimato de difenilo (357 mg, 1,5 mmol) en acetonitrilo (3 ml) y se calentaron a 50°C durante 2 horas, luego se agitaron durante la noche a temperatura ambiente. Se concentró la reacción a vacío, y se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida (40 g de SiO₂, MeOH al 0-5%: CH₂Cl₂) para dar (S)-N-ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carbimato de fenilo (481 mg, 1,3 mmol, 86%) como un sólido blanquecino.

¹H-RMN (400 MHz, MeOD) δ ppm 8,24 (s, 1H), 7,41-7,47 (m, 2H), 7,28 (t, J=7,5 Hz, 1H), 7,18 (d, J=7,6 Hz, 2H), 7,04 (d, J=1,0 Hz, 1H), 4,72 (s. a., 1H), 4,17-4,29 (m, 2H), 3,96 (dt, J=13,4, 1,9 Hz, 1H), 3,78 (ddd, J=13,5, 11,9, 3,4 Hz, 1H), 3,55 (dd, J=13,4, 4,0 Hz, 1H), 3,21-3,29 (m, 1H), 2,45 (d, J=1,0 Hz, 3H), 1,38 (d, J=6,8 Hz, 3H); EM (ES+) [M+H]⁺ = 376.

6.14. Ejemplo 14: (S)-N-(3-Bromofenil)-N'-ciano-2-metil-4-(6-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida



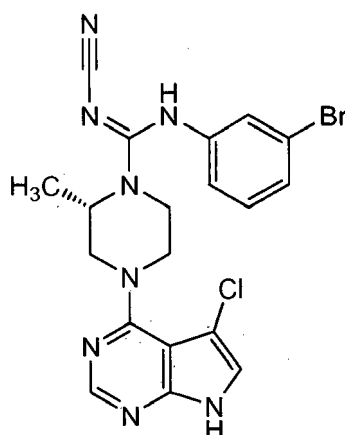
A. Preparación de 4-cloro-6-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidina. En un tubo sellado, se disolvió 2-amino-5-metil-1H-pirrol-3-carboxilato de etilo (150 mg, 0,9 mmol, preparado según procedimientos de la bibliografía, J. Heterocyclic Chem., 23:1555 (1985)) en formamida (4,5 ml), ácido fórmico (2,3 ml) y DMF (1,0 ml) y se calentó hasta 155°C durante 12 h. Se concentró la reacción, se llevó a disolución de NaHCO₃ y se extrajo con DCM para proporcionar 6-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-ol (70 mg, 0,46 mmol, 51%, EM (ES+) [M+H]⁺ = 150). Se disolvió este material en oxicloruro de fósforo (5 ml) y se calentó hasta 110°C durante 1 h. Se concentró la reacción, se llevó a NaHCO₃ y se

extrajo con DCM para dar 4-cloro-6-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (40 mg, 0,23 mmol), 50%). EM (ES+) $[M+H]^+ = 168$.

B. Preparación de (S)-N-(3-bromofenil)-N'-ciano-2-metil-4-(6-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida. Usando la pirrolopirimidina de la etapa A, se preparó el compuesto del título de la misma manera que (S)-N-(3-bromofenil)-N'-ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida del ejemplo 5.

$^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD): δ 8,1 (1H, s), 7,29 (3H, m), 7,12 (1H, m), 6,38 (1H, s), 4,59 (2H, m), 4,83 (1H, $J = 13,6$ Hz, d), 3,72 (3H, m), 2,4 (3H, s), 1,31 (3H, $J = 6,8$ Hz, d); EM (ES+) $[M+H]^+ = 455$.

6.15. Ejemplo 15: (S)-N-(3-Bromofenil)-4-(5-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-N'-ciano-2-metilpiperazin-1-carboximidamida



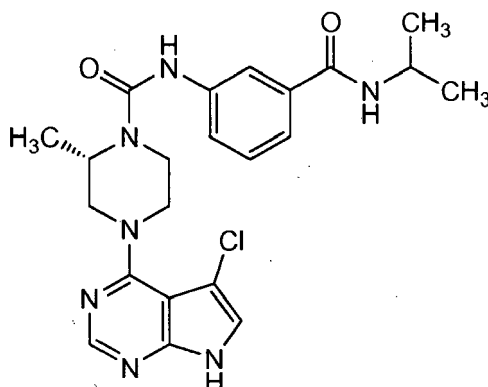
A. Preparación de 4,5-dicloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina: Se suspendió 4-cloro-pirrolo[2,3-d]pirimidina (0,5 g, 3,26 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (25 ml), y se añadió N-clorosuccinimida (0,87 g, 6,52 mmol). Se sometió a reflujo la mezcla de reacción durante 3 días, luego se enfrió hasta temperatura ambiente. Se recogió el sólido blanco mediante filtración para dar 5-dicloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (0,54 g, 2,9 mmol, 88%).

$^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD): δ 8,57 (1H, s), 7,60 (1H, s); EM (ES+) $[M+H]^+ = 188$.

Preparación de (S)-N-(3-bromofenil)-4-(5-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-N'-ciano-2-metilpiperazin-1-carboximidamida. Usando la pirrolopirimidina de la etapa A, se preparó el compuesto del título de la misma manera que (S)-N'-ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-N-(3-(trifluorometil)fenil)piperazin-1-carboximidamida del ejemplo 8.

$^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD): δ 8,29 (s, 1H), 7,12-7,34 (m, 5H), 4,64 (s, 1H), 4,41-4,43 (d, $J = 8$ Hz, 1H), 4,16-4,19 (d, $J = 12$ Hz, 1H), 3,98-4,02 (d, $J = 16$ Hz, 1H), 3,71-3,78 (t, $J = 14$ Hz, 1H), 3,47-3,52 (m, 1H), 3,21-3,28 (m, 1H), 1,35-1,36 (d, $J = 4$ Hz, 3H); EM (ES+) $[M+H]^+ = 475$.

6.16. Ejemplo 16: (S)-4-(5-Cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-N-(3-(isopropilcarbamoil)fenil)-2-metilpiperazin-1-carboxamida

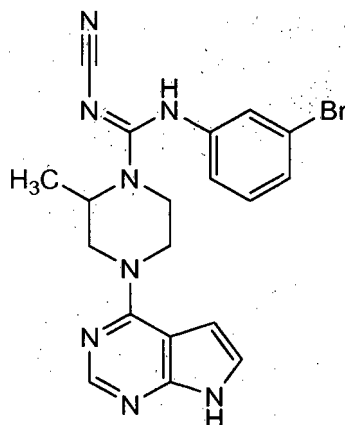


Se preparó el compuesto del título a partir de 4,5-dicloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina, del ejemplo 15, etapa A, de la

misma manera que (S)-dimetilcarbamato de 3-(2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboxamido)fenilo del ejemplo 2.

$^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD): δ 8,28 (s, 1H), 7,81 (s, 1H), 7,36-7,54 (m, 3H), 7,31 (s, 1H), 4,57-4,59 (m, 1H), 4,43-4,46 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 4,18-4,24 (m, 2H), 4,04-4,08 (d, $J = 16$ Hz, 1H), 3,62-3,68 (m, 1H), 3,44-3,48 (m, 1H), 3,19-3,23 (m, 1H), 1,33-1,38 (d, $J = 4$ Hz, 3H), 1,26-1,27 (d, $J = 4$ Hz, 6H). EM (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 456$.

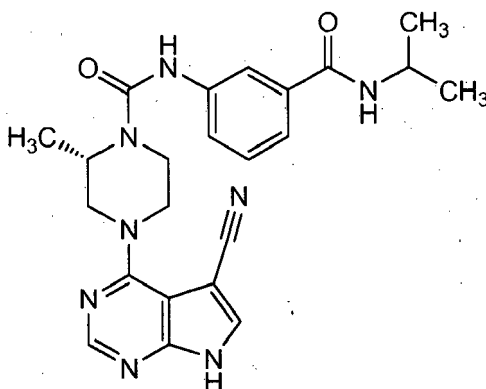
6.17. Ejemplo 17: N-(3-Bromofenil)-N'-ciano-2-metil-4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida



Se preparó el compuesto del título a partir de 4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina mediante el mismo procedimiento que (S)-N'-ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-N-(3-(trifluorometil)fenil)piperazin-1-carboximidamida del ejemplo 8.

$^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD): δ 8,18 (s, 1H), 7,05-7,35 (m, 5H), 6,66 (s, 1H), 4,51-4,74 (m, 3H), 3,98-4,09 (m, 1H), 3,35-3,74 (m, 3H), 1,32-1,33 (d, $J = 4$ Hz, 3H); EM (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 441$.

6.18. Ejemplo 18: (S)-4-(5-Ciano-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-N-(3-(isopropilcarbamoil)fenil)-2-metilpiperazin-1-carboxamida



A. Preparación de 5-bromo-4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina. A una disolución de 4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (1,2 g, 7,8 mmol) en CH_2Cl_2 (25 ml) se le añadió N-bromoacetamida (1,186 g, 8,6 mmol) en CH_2Cl_2 (25 ml). Se calentó la mezcla a la temperatura de reflujo durante 40 min, luego se enfrió hasta temperatura ambiente y se concentró a vacío para dar un sólido blanquecino. Se añadió agua fría (40 ml) al sólido, que luego se recogió mediante filtración, se lavó con agua fría (5 ml) y se secó a vacío. Se recrystalizó el producto en una cantidad mínima de isopropanol para producir 5-bromo-4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina pura (1,475 g, 81,5%).

$^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD): δ 8,572 (s, 1H), 7,665 (s, 1H); EM (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 232$.

B. Preparación de 5-bromo-4-cloro-7-fenilsulfonil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina. A una suspensión de 5-bromo-4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina de la etapa A (1,17 g, 5 mmol) en DMF (10 ml) a 0°C , se le añadió NaH (al 60% en aceite mineral, 0,28 g, 7 mmol). Tras agitar 15 min, se añadió cloruro de bencenosulfonilo (0,64 ml, 5 mmol). Se calentó la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas, dando como resultado la precipitación de un sólido blanco. Se añadió más DMF (5 ml), y se extinguió la reacción con 10 ml de agua. Se recogió el sólido

mediante filtración y se secó a vacío para proporcionar 5-bromo-4-cloro-7-(fenilsulfonyl)-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidina (1,62 g, 4,35 mmol, 87%) como un sólido blanco, con la que se continuó sin purificación adicional. EM (ES+) $[M+H]^+ = 373$.

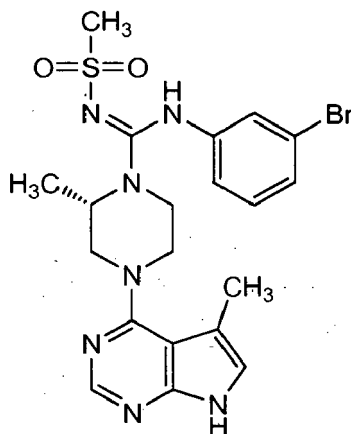
C. Preparación de (S)-5-bromo-4-(3-metilpiperazin-1-il)-7-(fenilsulfonyl)-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidina. A una mezcla de pirrolopirimidina de la etapa B (76 mg, 0,2 mmol) y (S)-2-metilpiperazina (21 mg, 0,2 mmol) en isopropanol (2 ml) se le añadió trietilamina (0,11 ml, 0,8 mmol). Se calentó la mezcla a 80°C durante 5 min por medio de microondas y se concentró a vacío para dar (S)-5-bromo-4-(3-metilpiperazin-1-il)-7-(fenilsulfonyl)-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidina en bruto (65 mg, 0,15 mmol, 75%) que se usó directamente para la siguiente etapa. EM (ES+) $[M+H]^+ = 437$.

D. Preparación de (S)-4-(5-bromo-7-(fenilsulfonyl)-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidin-4-il)-N-(3-(isopropilcarbamoil)fenil)-2-metilpiperazin-1-carboxamida. A una disolución de trifosgeno (15 mg, 0,05 mmol) en THF (1 ml) a 0°C bajo N_2 se le añadió gota a gota una disolución de 3-amino-N-isopropilbenzamida (25 mg, 0,14 mmol) y trietilamina (43 μ l, 0,3 mmol) en THF (1 ml). Se agitó la mezcla durante 15 min a 0°C y otros 15 min a temperatura ambiente. Se añadió la piperazina de la etapa C (65 mg, 0,14 mmol) en THF (1 ml), y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante la noche, luego se extinguió con MeOH y K_2CO_3 (97 mg, 0,70 mmol) y se filtró. Se concentró la disolución a vacío y se purificó mediante HPLC prep. para dar (S)-4-(5-bromo-7-(fenilsulfonyl)-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidin-4-il)-N-(3-(isopropilcarbamoil)fenil)-2-metilpiperazin-1-carboxamida (70 mg, 0,11 mmol, 77%). EM (ES+) $[M+H]^+ = 641$.

E. Preparación de (S)-4-(5-ciano-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidin-4-il)-N-(3-(isopropilcarbamoil)fenil)-2-metilpiperazin-1-carboxamida. A una disolución de (S)-4-(5-bromo-7-(fenilsulfonyl)-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidin-4-il)-N-(3-(isopropilcarbamoil)fenil)-2-metilpiperazin-1-carboxamida de la etapa D (70 mg, 0,11 mmol) en DMF (2 ml) se le añadió $Zn(CN)_2$ (26 mg, 0,22 mmol) y $Pd(PPh_3)_4$ (13 mg, 0,011 mmol). Se calentó la mezcla a 150°C durante 3 min por medio de microondas, se enfrió hasta temperatura ambiente y se filtró a través de un lecho de Celite. Se concentró la disolución a vacío, y se trató el residuo con NaOH y MeOH durante 2 h. Se purificó el producto mediante HPLC prep. para obtener (S)-4-(5-ciano-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidin-4-il)-N-(3-(isopropilcarbamoil)fenil)-2-metilpiperazin-1-carboxamida como un sólido blanco.

1H -RMN (CD_3OD): δ 8,37 (s, 1H), 8,07 (s, 1H), 7,79 (s, 1H), 7,32-7,61 (m, 3H), 4,52-4,65 (m, 2H), 4,30-4,42 (m, 1H), 4,18-4,16 (m, 1H), 4,02-4,13 (m, 1H), 3,57-3,76 (m, 2H), 3,38-3,47 (m, 1H), 1,31-1,33 (d, $J = 8$ Hz, 3H), 1,26-1,28 (d, $J = 8$ Hz, 6H); EM (ES+) $[M+H]^+ = 447$.

6.19. Ejemplo 19: (S)-N-(3-Bromofenil)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidin-4-il)-N'-(metilsulfonyl)piperazin-1-carboximidamida



A. Preparación de metilsulfonylcarbonimidato de difenilo.

Se disolvieron diclorodifenoximetano (2 g, 7,46 mmol) y metilsulfonamida (1,56 g, 16,41 mmol) en EtOAc (15 ml) y se calentaron a reflujo durante 12 horas. Se permitió que la mezcla se enfriase y se concentró a vacío. La purificación de la mezcla en bruto mediante cromatografía ultrarrápida (EtOAc al 20%/hexanos) proporcionó metilsulfonylcarbonimidato de difenilo (0,75 g, 2,59 mmol, 35%).

1H -RMN (400 MHz, cloroformo) δ ppm 7,38-7,43 (m, 4H), 7,30 (m, 2H), 7,21 (m, 4H), 3,01 (s, 3H); EM (ES+) $[M+H]^+ = 292$.

B. Preparación de N-3-bromofenil-N'-(metilsulfonyl)carbamidato de fenilo.

Se disolvieron metilsulfonylcarbonimidato de difenilo de la etapa A (0,75 g, 2,59 mmol) y 3-bromoanilina (0,28 ml,

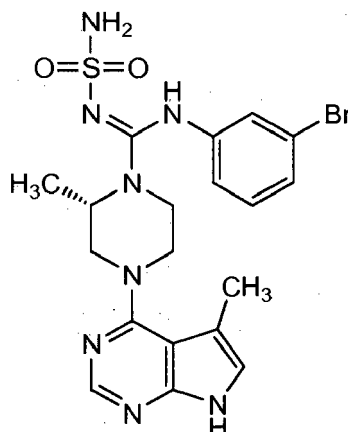
2,59 mmol) en acetonitrilo (5 ml) y se calentaron hasta 70°C durante 12 horas. Se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía ultrarrápida (EtOAc al 30%/hexanos) proporcionó N-3-bromofenil-N'-(metilsulfonyl)carbamimidato de fenilo (0,50 g, 1,35 mmol, 52%).

- 5 ^1H -RMN (400 MHz, cloroformo) δ ppm 9,2 (s, 1H), 7,54 (m, 1H), 7,40 (m, 3H), 7,26 (m, 2H), 7,13 (m, 2H), 2,96 (s, 3H); EM (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 369, 371$.

C. Preparación de (S)-N-(3-bromofenil)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-N'-(metilsulfonyl)piperazin-1-carboximidamida. Se combinaron el carbamimidato de la etapa B (100 mg, 0,27 mmol), (S)-5-metil-4-(3-metilpiperazin-1-il)-7H-pirrol[2,3-d]pirimidina, del ejemplo 1, etapa B (63 mg, 0,27 mmol) y trietilamina (77 μl , 0,27 mmol) en MeCN (1,5 ml) y se calentaron a reflujo durante 2 horas. Se concentró la mezcla y se purificó mediante HPLC preparativa para proporcionar (S)-N-(3-bromofenil)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-N'-(metilsulfonyl)piperazin-1-carboximidamida.

- 15 ^1H -RMN (400 MHz, metanol) δ ppm 8,19 (s, 1H), 7,40 (s, 1H), 7,30 (m, 2H), 7,16 (m, 1H), 7,01 (s, 1H), 4,46 (m, 1H), 4,01 (m, 1H), 3,78 (m, 2H), 3,52 (m, 1H), 3,40 (m, 1H), 3,08 (m, 1H), 2,98 (s, 3H), 2,39 (d, $J = 1,0\text{Hz}$, 3H), 1,26 (d, $J = 6,8\text{Hz}$, 3H); EM (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 506, 508$.

20 **6.20. Ejemplo 20: (S)-N-(3-Bromofenil)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-N'-sulfamoilpiperazin-1-carboximidamida**



- 25 A. Preparación de sulfamoilcarbonimidato de difenilo. Se disolvieron diclorodifenoximetano (1 g, 3,72 mmol) y sulfamida (0,72 g, 7,44 mmol) en MeCN (10 ml) y se agitaron a temperatura ambiente durante 18 horas. Se concentró la mezcla a vacío y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (EtOAc al 20-40%/hexanos) para proporcionar sulfamoilcarbonimidato de difenilo (0,69 g, 2,34 mmol, 63%) como un aceite incoloro.

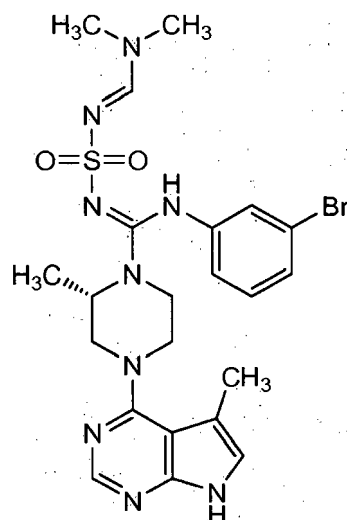
- 30 ^1H -RMN (400 MHz, metanol) δ ppm 7,43-7,47 (m, 4H), 7,24-7,33 (m, 6H); EM (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 293$.

- 35 B. Preparación de N-3-bromofenil-N'-sulfamoilcarbamimidato de fenilo. Se disolvieron sulfamoilcarbonimidato de difenilo, de la etapa A, (0,05 g, 0,17 mmol) y 3-bromoanilina (18 μl , 0,17 mmol) en acetonitrilo (0,5 ml) y se calentaron hasta 70°C durante 12 horas. Se concentró la reacción a vacío para proporcionar N-3-bromofenil-N'-sulfamoilcarbamimidato de fenilo, con el que se continuó en bruto en la siguiente reacción.

- 40 C. Preparación de (S)-N-(3-bromofenil)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-N'-sulfamoil-piperazin-1-carboximidamida. Se combinaron carbamimidato en bruto de la etapa B (~25 mg, 0,068 mmol), (S)-5-metil-4-(3-metilpiperazin-1-il)-7H-pirrol[2,3-d]pirimidina, del ejemplo 1, etapa B (16 mg, 0,68 mmol) y trietilamina (10 μl , 0,068 mmol) en MeCN (0,5 ml) y se calentaron hasta 70°C durante 2 horas. Se concentró la mezcla y se purificó mediante HPLC preparativa para proporcionar (S)-N-(3-bromofenil)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-N'-sulfamoil-piperazin-1-carboximidamida (4 mg, 0,0075 mmol, 11%) como un sólido blanco.

- 45 ^1H -RMN (400 MHz, metanol) δ ppm 8,19 (s, 1H), 7,31 (m, 1H), 7,20 (m, 1H), 7,11-7,15 (m, 2H), 7,07 (m, 1H), 4,43 (m, 1H), 4,03 (m, 1H), 3,76 (m, 2H), 3,47 (m, 1H), 3,35 (m, 1H), 3,05 (m, 1H), 2,39 (d, $J = 1,0\text{ Hz}$, 3H), 1,25 (d, $J = 6,8\text{ Hz}$, 3H); EM (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 507, 509$.

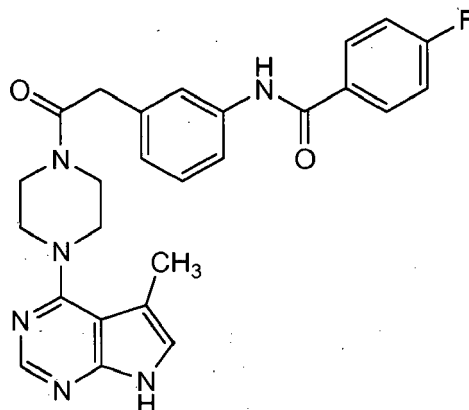
6.21. Ejemplo 21: (S)-N-(3-bromofenil)-N-(N-((dimetilamino)metilen)sulfamoil)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida



Se disolvió (S)-N-(3-bromofenil)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-N'-sulfamoilpiperazin-1-carboximidamida en bruto del ejemplo 20, etapa C, (~25 mg, 0,068 mmol) en MeOH (0,5 ml) y se añadió dimetilacetal de N,N-dimetilformamida (7 μ l). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 20 minutos y luego se concentró. Se purificó la mezcla mediante HPLC preparativa para proporcionar el compuesto deseado (5 mg, 0,0088 mmol, 13%) como un sólido blanco.

^1H -RMN (400 MHz, metanol) δ ppm 8,19 (s, 1H), 8,02 (s, 1H), 7,28 (m, 2H), 7,10 (m, 2H), 7,01 (s, 1H), 4,48 (m, 1H), 4,03 (m, 1H), 3,79 (m, 2H), 3,49 (m, 1H), 3,36 (m, 1H), 3,05 (m, 1H), 2,97 (s, 3H), 2,86 (s, 3H), 2,39 (d, J = 1,0Hz, 3H), 1,25 (d, J = 6,8Hz, 3H); EM (ES+) $[\text{M}+\text{H}]^+$ = 562, 564.

6.22. Ejemplo 22: 4-Fluoro-N-(3-(2-(4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)-2-oxoetil)fenil)benzamida



A. Preparación de 2-(3-nitrofenil)-1-(piperazin-1-il)etanona. Se añadió cloruro de 2-(3-nitrofenil)acetilo (0,20 ml, 1,0 mmol) a una mezcla con agitación vigorosa de piperazin-1-carboxilato de terc-butilo (0,19 g, 1,0 mmol) en CH_2Cl_2 (2 ml) y NaHCO_3 ac. sat. (1 ml). Se agitó la reacción durante 1 hora; luego se separó la fase orgánica, se filtró a través de una capa de MgSO_4 y se concentró a vacío. Se trató el residuo con TFA en CH_2Cl_2 para eliminar el grupo Boc para dar 2-(3-nitrofenil)-1-(piperazin-1-il)etanona, con la que se continuó en bruto.

B. Preparación de 1-(4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)-2-(3-nitrofenil)etanona. Se combinaron 2-(3-nitrofenil)-1-(piperazin-1-il)etanona de la etapa A (0,32 g, 0,9 mmol), 4-cloro-5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (0,168 g, 1,0 mmol) y diisopropiletilamina (0,1 ml) en isopropanol y se calentaron a 80°C durante 24 horas. Se aisló el producto mediante HPLC prep. para dar 1-(4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)-2-(3-nitrofenil)etanona.

C. Preparación de 4-fluoro-N-(3-(2-(4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)-2-oxoetil)fenil)benzamida. A una disolución de 1-(4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)-2-(3-nitrofenil)etanona de la etapa B (0,13 g, 0,3 mmol) en isopropanol (2 ml) se le añadió SnCl_2 (0,19 g, 1 mmol) y 1 gota de HCl ac. concentrado. Se calentó la reacción a reflujo durante 2 horas, y se aisló el producto de anilina mediante procedimientos convencionales. Se disolvió una parte de este material (35 mg, 0,1 mmol) en CH_2Cl_2 (2 ml) y NaHCO_3 ac. sat. (2 ml).

Se añadió gota a gota cloruro de 4-fluorobenzoilo (16 mg, 0,1 mmol) en CH₂Cl₂ (1 ml) con agitación vigorosa. Se agitó la reacción durante 2 horas, luego se sometió a tratamiento final mediante procedimientos convencionales. Se aisló el producto mediante HPLC prep. seguida por CCF prep. para proporcionar 4-fluoro-N-(3-(2-(4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)-2-oxoetil)fenil)benzamida. EM (ES+) [M+H]⁺ = 473.

6.23. Compuestos adicionales

Se prepararon compuestos adicionales usando métodos descritos en el presente documento y conocidos en la técnica. Algunos de esos compuestos se enumeran a continuación con sus masas observadas. Se incluyen compuestos que se encuentran fuera del alcance de las presentes reivindicaciones como ejemplos de referencia únicamente. Por tanto ninguno de los compuestos enumerados a continuación en el presente documento es según la invención.

Tabla 1

Compuesto	(M+H) ⁺
(2S)-N-(Biciclo[2.2.1]heptan-2-il)-N'-ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida	393,2
Éster isobutílico del ácido (3-[(S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carbonil]-amino)-fenil)-carbámico	466
(3-Bromo-fenilamino)-[(R)-2-terc-butoximetil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-metil-cianamida	528
(3-Bromo-fenil)-amida del ácido (R)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	431
(R)-N-(3-Bromofenil)-N'-ciano-2-(hidroximetil)-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida	470
(3-Bromo-fenil)-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	429; 431
[3-(4-Fluoro-fenoxi)-fenil]-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	461
(3-Cloro-fenil)-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	385
(3-Fluoro-fenil)-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	369
(3-Ciano-fenil)-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	376
(2-Bromo-fenil)-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	429, 431
o-Tolilamida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	365
(4-Bromo-fenil)-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	431
m-Tolilamida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	365
[3-(Morfolino-4-carbonil)-fenil]-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	464,2
[3-(2-Dimetilamino-etilcarbamoil)-fenil]-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	465
(3-Isopropilcarbamoil-fenil)-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	436
(3-Isopropilsulfamoil-fenil)-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	472
[3-(2-Hidroxi-etilcarbamoil)-fenil]-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	438,1
[3-(1-Metil-piperidin-4-ilsulfamoil)-fenil]-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	527,1
(3-Metoxi-fenil)-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	381
[3-((S)-2-Hidroxi-1-metil-etilcarbamoil)-fenil]-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	452,3
[3-((R)-2-Hidroxi-1-metil-etilcarbamoil)-fenil]-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	452,2
(3-Ciclopropilsulfamoil-fenil)-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	470,1
[3-(2-Hidroxi-1-hidroximetil-etilcarbamoil)-fenil]-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	468

(3-Ciclopropilcarbamoil-fenil)-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	434
(3-Dimetilcarbamoilmetoxi-fenil)-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	452
[3-(1-Metil-piperidin-4-ilcarbamoil)-fenil]-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	491,1
(3-Isopropoxi-fenil)-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	409
[3-(2-Dimetilamino-etoxi)-fenil]-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	438
[3-(2-Hidroxi-1-hidroxi-metil-etilsulfamoil)-fenil]-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	504,1
[3-(3-Dimetilamino-propionilamino)-fenil]-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	465
[3-(3-Metil-butirilamino)-fenil]-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	450
[3-[(Tetrahidro-furano-2-carbonil)-amino]-fenil]-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	464
[3-(4-Dimetilamino-butirilamino)-fenil]-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	479
[3-[2-(3-Butil-ureido)-acetilamino]-fenil]-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	522
[3-[(Furano-2-carbonil)-amino]-fenil]-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	460
[3-[2-(Piridin-4-ilsulfanil)-acetilamino]-fenil]-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	517
[3-(2-Amino-acetilamino)-fenil]-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	423
(4-Metoxi-fenil)-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	381
[4-(2-Dimetilamino-etilcarbamoil)-fenil]-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	465
[3-[(4-Metil-piperazin-1-carbonil)-amino]-fenil]-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	492
(4-Etilcarbamoil-fenil)-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	422
[4-(2-Hidroxi-etilcarbamoil)-fenil]-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	438
[3-[3-(4-Cloro-butyl)-3-metil-ureido]-fenil]-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	514
(4-Carbamoil-fenil)-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	394
[4-(3-Dimetilamino-propionilamino)-fenil]-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	465
(3-Aminometil-fenil)-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	380,1
(4-Aminometil-fenil)-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	380,2
(3-Dimetilaminometil-fenil)-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico ácido	408,3
[4-(3,3-Dimetil-ureido)-fenil]-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	437
[3-[(S)-2-Oxo-tiazolidin-4-carbonil]-amino]-fenil-amida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	495
Piridin-3-ilamida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	352,1
Piridin-4-ilamida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	352,2
Tiazol-2-ilamida del ácido (S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	358,2
(S)-3-(N'-Ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamido)-N-isopropilbenzamida	460,1
Ácido (S)-3-(N'-ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamido)benzoico	419,1
(S)-3-(N'-Ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamido)-N-etilbenzamida	446,1

(S)-3-(N'-Ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamido)-N-(2-idroxiutil)benzamida	462,1
(S)-3-(N'-Ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamido)-N-(2-dimetilamino)etil)benzamida	489,2
(S)-3-(N'-Ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamido)-N-(2-morfolinoetil)benzamida	531,1
(S)-3-(N'-Ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamido)-N-(2-pirrolidin-1-il)etil)benzamida	515,1
(S)-4-(N'-Ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamido)benzamida	418
(S)-5-(N'-Ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamido)-2-fluoro-N-(2-idroxiutil)benzamida	480
(S)-3-(N'-Ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamido)benzoato de metilo	433,1
(S)-N-((trans)-4-Aminociclohexil)-N'-ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida	396,3
(S)-N-(3-terc-Butilfenil)-N'-ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida	431,2
(S)-N-Adamantil-N'-ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida	433,2
(S)-N-Bencil-N'-ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida	389,1
(S)-N'-Ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-N-(3-(trifluorometil)fenil)piperazin-1-carboximidamida	443
(S)-N'-Ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-N-(3-(metiltio)fenil)piperazin-1-carboximidamida	421
(S)-N'-Ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-N-(piridin-3-il)piperazin-1-carboximidamida	376,2
(S)-N'-Ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-N-p-tolilpiperazin-1-carboximidamida	389,2
(S)-N'-Ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-N-(4-metilciclohexil)piperazin-1-carboximidamida	395,2
(S)-N'-Ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-N-(piperidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida	382
(S)-N'-Ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-N-(piridin-2-ilmetil)piperazin-1-carboximidamida	390
(S)-N'-Ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-N-(1-metilpiperidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida	396
(S)-N-Ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-N-fenilpiperazin-1-carboximidamida	375
(S)-N'-Ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-N-(3-(morfolin-4-carbonil)fenil)piperazin-1-carboximidamida	488,2
(S)-N'-Ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-N-(3-(N-(2-morfolinoetil)sulfamoil)fenil)piperazin-1-carboximidamida	567,2
(S)-N'-Ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-N-(3-(N-(1-metilpiperidin-4-il)sulfamoil)fenil)piperazin-1-carboximidamida	551,1
(S)-N'-Ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-N-(tetraidro-2H-piran-4-il)piperazin-1-carboximidamida	383,1
(S)-N'-Ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-N-(3-oxo-1,3-dihidroisobenzofuran-5-il)piperazin-1-carboximidamida	431
(S)-N'-Ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-N-(piridin-4-ilmetil)piperazin-1-carboximidamida	390,1
(S)-N'-Ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-N-(piridin-3-ilmetil)piperazin-1-carboximidamida	390,2
(S)-N'-Ciano-N-((trans)-4-idroxiciclohexil)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida	397,1
(S)-N'-ciano-N-(3-((dimetilamino)metil)fenil)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida	432,3
(S)-N'-Ciano-N-(3-(4-fluorofenoxi)fenil)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamina	485,1
(S)-N'-Ciano-N-(3-(N-(2-(dimetilamino)etil)sulfamoil)fenil)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida	525,1
(S)-N'-Ciano-N-(3-(N-(2-idroxiutil)sulfamoil)fenil)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida	498,1
(S)-N'-Ciano-N-(3-(N-isopropilsulfamoil)fenil)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida	496,1

(S)-N'-Ciano-N-(3-cianofenil)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida	400
(S)-N'-Ciano-N-(3-isopropilfenil)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida	417,1
(S)-N'-Ciano-N-(4-((dimetilamino)metil)fenil)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida	432,2
(S)-N'-Ciano-N-(4-fluoro-3-metilfenil)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida	407,2
(S)-N'-Ciano-N-(4-fluorofenil)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida	393
(S)-N'-Ciano-N-(4-fluorofenil)-3-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida	393
(S)-N'-ciano-N-(4-metoxifenil)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida	405
(S)-N'-ciano-N,N-bis(2-hidroxietil)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida	
(S)-N'-ciano-N-ciclopropil-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida	339
(S)-3-((S)-N'-Ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamido)pirrolidin-1-carboxilato de terc-butilo	468
(S)-4-(N'-Ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamido)piperidin-1-carboxilato de terc-butilo	382
Éster terc-butílico del ácido [(3-((S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carbonil)-amino]-fenilcarbamoil)-metil]-carbámico	523
(3-Bromo-fenil)-amida del ácido 2,5-dimetil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	445
(3-Bromo-fenil)-amida del ácido 2,6-dimetil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	443; 445
[3-(4-Fluoro-fenoxi)-fenil]-amida del ácido 2,6-dimetil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	475
2-[3-(4-Fluoro-fenoxi)-fenil]-1-[4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-etanona	446,1
(3-Bromo-fenil)-amida del ácido 2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	429
3-(((E)-Etanosulfonilimino)-[(S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-metil)-amino)-N-isopropil-benzamida	527
Éster metílico del ácido 3-(((E)-etanosulfonilimino)-[(S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-metil)-amino)-benzoico	500
3-(((E)-Etanosulfonilimino)-[(S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-metil)-amino)-N-piridin-4-il-benzamida	562
3-(((E)-Etanosulfonilimino)-[(S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-metil)-amino)-N-etil-benzamida	513
3-(((E)-Etanosulfonilimino)-[(S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-metil)-amino)-benzamida	485
3-(((E)-Etanosulfonilimino)-[(S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-metil)-amino)-N-fenil-benzamida	561
3-(((E)-Etanosulfonilimino)-[(S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-metil)-amino)-N-(1-metil-piperidin-4-il)-benzamida	582
3-(((E)-Etanosulfonilimino)-[(S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-metil)-amino)-N-(2-morfolin-4-il-etil)-benzamida	598
(3-Bromo-fenil)-amida del ácido 3-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-3,8-diaza-biciclo[3.2.1]octano-8-carboxílico	442,9
(4-Fluoro-fenil)-amida del ácido 4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	371,2
Piridin-3-ilamida del ácido 4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	354
[3-(4-Fluoro-fenoxi)-fenil]-amida del ácido 4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	447
(3-Bromo-4-fluoro-fenil)-amida del ácido 4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	435
(3-Bromo-fenil)-amida del ácido 4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	417
(3-Bromo-fenil)-amida del ácido 4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	415, 417
(3,4-Difluoro-fenil)-amida del ácido 4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	373,1
(4-Fluoro-fenil)-amida del ácido 4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	355,2
[4-Fluoro-3-(4-fluoro-fenoxi)-fenil]-amida del ácido 4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	465,1
(3-Cloro-2-metil-fenil)-amida del ácido 4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	385,2

(3-Ciano-fenil)-amida del ácido 4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	362,2
(2,3-Dicloro-fenil)-amida del ácido 4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	407
(2,3-Dimetil-fenil)-amida del ácido 4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	365,1
(3-Cloro-fenil)-amida del ácido 4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	371,2
m-Tolilamida del ácido 4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	351,2
(3-Fluoro-4-metil-fenil)-amida del ácido 4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	369
Bifenil-2-ilamida del ácido 4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	413
(3-Metilsulfanil-fenil)-amida del ácido 4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	383
[2-(1H-Indol-3-il)-etil]-amida del ácido 4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	404,2
3-Fluoro-bencilamida del ácido 4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	369
(3,5-Dimetoxi-fenil)-amida del ácido 4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	397,05
(3-Metoxi-fenil)-amida del ácido 4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	367,1
(3-Bromo-fenil)-metil-amida del ácido 4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxílico	431
4-[(S)-4-(6-Cloro-5-metil-pirimidin-4-il)-3-metil-piperazin-1-il]-5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina	358,2
4-Fluoro-N-(3-{2-[4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-2-oxo-etil}-fenil)-benzamida	473,2
Éster 2-(3-[(S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carbonil]-amino)-benzoilamino-etílico del ácido acético	480,1
Éster 3-[(E)-etanosulfonilimino]-[(S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-metil-amino-fenílico del ácido dimetil-carbámico	529
Éster 4-[(S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carbonil]-amino-fenílico del ácido dimetil-carbámico	438
1-(2-Metil-benzooxazol-5-ilamino)-1-[(S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-met-(E)-ilidenamida del ácido etanosulfónico	497
1-(3-Bromo-fenilamino)-1-[(S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-met-(E)-ilidenamida del ácido etanosulfónico	520, 522
1-(3H-Benzimidazol-5-ilamino)-1-[(S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-met-(E)-ilidenamida del ácido etanosulfónico	482
1-(4-Fluoro-3'-metoxi-fenilamino)-1-[(S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-met-(E)-ilidenamida del ácido etanosulfónico	490
1-(Benzo[1,3]dioxol-5-ilamino)-1-[(S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-met-(E)-ilidenamida del ácido etanosulfónico	486
1-(Benzofuran-5-ilamino)-1-[(S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-met-(E)-ilidenamida del ácido etanosulfónico	482
1-(Bifenil-4-ilamino)-1-[(S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-met-(E)-ilidenamida del ácido etanosulfónico	518
1-[(S)-2-Metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-1-(5-metil-tiazol-2-ilamino)-met-(E)-ilidenamida del ácido etanosulfónico	463
1-[(S)-2-Metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-1-[3-(piridin-3-iloxi)-fenilamino]-met-(E)-ilidenamida del ácido etanosulfónico	535
1-[(S)-2-Metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-1-[3-(morfolin-4-carbonil)-fenilamino]-met-(E)-ilidenamida del ácido etanosulfónico	555
1-[(S)-2-Metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-1-(piridin-3-ilamino)-met-(E)-ilidenamida del ácido etanosulfónico	443
1-[(S)-2-Metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-1-(tiazol-2-ilamino)-met-(E)-ilidenamida del ácido etanosulfónico	449
1-[(S)-2-Metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-1-fenilamino-met-(E)-ilidenamida del ácido etanosulfónico	442
1-[(S)-2-Metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-1-(3-oxazol-5-il-fenilamino)-met-(E)-ilidenamida del ácido etanosulfónico	509
1-[(S)-2-Metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-1-[3-(2-metil-tiazol-4-il)-fenilamino]-met-(E)-ilidenamida del ácido etanosulfónico	539
1-[(S)-2-Metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-1-(quinolin-7-ilamino)-met-(E)-ilidenamida del ácido etanosulfónico	493
1-[(S)-2-Metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-1-(quinoxalin-6-ilamino)-met-(E)-ilidenamida del ácido etanosulfónico	494
1-[(S)-2-Metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-1-(3-trifluorometil-fenilamino)-met-(E)-ilidenamida del ácido etanosulfónico	510
1-[(S)-2-Metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-1-[4-(3-trifluorometil-fenoxi)-fenilamino]-met-(E)-ilidenamida del ácido etanosulfónico	602
1-[(S)-2-Metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-1-(3,4,5-trimetoxi-fenilamino)-met-(E)-ilidenamida del ácido etanosulfónico	532
1-[(S)-2-Metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-1-[3-(morfolin-4-sulfonil)-fenilamino]-met-(E)-ilidenamida del ácido etanosulfónico	591

1-[2-(1H-Indol-3-il)-etilamino]-1-[(S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-met-(E)-ilidenamida del ácido etanosulfónico	509
1-[3-(4-Fluoro-fenoxi)-fenilamino]-1-[(S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-met-(E)-ilidenamida del ácido etanosulfónico	552
N-(3-{2-[4-(5-Metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-2-oxoetil}-fenil)-isonicotinamida	456,2
N-(3-Bromofenil)-2-butil-N'-ciano-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida	496
N-(3-Bromo-fenil)-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-carboxamidina	416
N-(3-Bromofenil)-N'-ciano-2-(4-fluorobencil)-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida	548
N-(3-Bromofenil)-N'-ciano-2-etil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida	468
N-(3-Bromofenil)-N'-ciano-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida	441
N-(3-Bromofenil)-N'-ciano-5-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboximidamida	452,9
N-[1-(3-Bromo-fenilamino)-1-[(S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-met-(E)-iliden]-bencenosulfonamida	568, 570
N-[1-(3-Bromo-fenilamino)-1-[(S)-2-metil-4-(5-metil-2H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-met-(E)-iliden]-4-metoxi-bencenosulfonamida	598, 600
N-[1-[(S)-2-Metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-1-(5-metil-tiazol-2-ilamino)-met-(E)-iliden]-bencenosulfonamida	511
N-[1-Etilamino]-[(S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-met-(E)-iliden]-bencenosulfonamida	442
N-[1-Isopropilamino]-1-[(S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-met-(E)-iliden]-bencenosulfonamida	456
1-(3-Bromo-fenilamino)-1-[(S)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-piperazin-1-il]-met-(E)-ilidenamida del ácido naftaleno-2-sulfónico	618, 620
N'-Ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-N-m-tolilpiperazin-1-carboximidamida	389
N'-Ciano-N-(3-(4-fluorofenoxi)fenil)-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida	471
N'-Ciano-N-(3-cianofenil)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida	400
N'-Ciano-N-(3-metoxifenil)-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamida	404
3-((S)-N'-Ciano-2-metil-4-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboximidamido)piperidin-1-carboxilato de terc-butilo	482

6.24. Expresión y purificación de LIMK2

Se expresó LIMK2 usando el sistema de expresión en baculovirus BAC-to-BAC® (Invitrogen). Se preparó baculovirus recombinante según las indicaciones del fabricante expuestas en el manual de instrucciones. En resumen, se transformaron los plásmidos (pFactBac1 o pFastBacHT) que portaban los insertos de LIMK2 en *E. coli* componente DH10Bac de eficiencia máxima para generar un bácmido recombinante. La cepa huésped de *E. coli* DH10Bac contiene un vector lanzadera de baculovirus (bácmido) con un sitio diana mini-attTn7 y un plásmido auxiliar, y permite la generación de un bácmido recombinante tras la transposición entre el elemento mini-Tn7 en el vector pFastBac y el sitio diana min-attTn7 en el bácmido. La reacción de transposición se produce en presencia de proteínas de transposición suministradas por el plásmido auxiliar. Se sembraron en placa las células y se escogieron las colonias blancas para el aislamiento de bácmidos tal como se describe en el manual de instrucciones.

Se transfirió el ADN de bácmido aislado a células SF9 para generar un baculovirus recombinante, y se recogió el virus cinco días tras la transfección. Se amplificó el virus en frascos T75 a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,2. Se usó el virus amplificado para infectar células SF9 a una MOI de 5 para la expresión de proteínas.

Para la purificación a pequeña escala de los constructos de LIMK2, se usó un cultivo de 50 ml de células Sf9 infectadas con el baculovirus recombinante. Se recogieron las células mediante centrifugación durante 5 minutos a 500 x g. Entonces se resuspendieron las células en tampón de lisis (5 volúmenes por gramo de células). Un tampón de lisis típico contiene lo siguiente: HEPES 50 mM (pH 8,0), KCl 300 mM, glicerol al 10%, NP-40 al 1%, imidazol 15 mM, benzamidina 1 mM e inhibidores de proteasas completos de Roche (1 comprimido por 50 ml de lisado celular). Se lisó la suspensión celular mediante un pase a través de un microfluidizador M-110Y de Microfluidics a una presión de líquido de 14.000 a 20.000 psi seguido por centrifugación del lisado a 60.000 x g durante 15 minutos a 4°C.

Entonces se cargó directamente el sobrenadante sobre una matriz de cromatografía que contenía ion de cobalto unido covalentemente a ácido nitrilotriacético NTA. Se equilibró la matriz de cromatografía en el mismo tampón que la disolución de carga de proteína. La resina cargada iónicamente tiene normalmente una capacidad de unión equivalente a de 5 a 10 mg de proteína con cola de histidina por ml de resina rellena. La cantidad de extracto que

puede cargarse sobre la columna depende de la cantidad de proteína con cola de histidina soluble en el extracto. Entonces se lavó la columna de un modo gradual, en primer lugar con: HEPES 50 mM (pH 8,0), KCl 300 mM, glicerol al 10%, NP-40 al 1%, imidazol 15 mM, benzamidina 1 mM; en segundo lugar, con HEPES 20 mM (pH 8,0), KCl 500 mM, glicerol al 10% e imidazol 20 mM; en tercer lugar, con HEPES 20 mM (pH 8,0), KCl 100 mM, glicerol al 10% e imidazol 20 mM; seguido por elución con imidazol 250 mM en el mismo tampón. Entonces se analizó la disolución de proteína LIMK2 mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos comerciales dirigidos contra tanto el extremo carboxilo-terminal como dominios catalíticos internos de la proteína. Para fines de almacenamiento, se dializó la proteína en Tris 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, BME al 0,1%, Brij-35 al 0,03% y glicerol al 50%.

Se realizó la purificación de LIMK2 a gran escala en un biorreactor Wave (Wave Biotech) con volúmenes de cultivo de 10 l. Se infectaron 10 l de cultivo celular a $2-3 \times 10^6$ células viables/ml a una MOI=5 ufp/célula y se recogieron a las 48 horas tras la infección.

6.25. Ensayo de inhibición de LIMK2 *in vitro*

Se desarrolló un ensayo *in vitro* usado para identificar inhibidores de LIMK2. La lectura analítica era la incorporación de ^{33}P a partir de sustrato de ATP en placas FlashPlate recubiertas con proteína básica de la mielina inmovilizada (Perkin Elmer Biosciences), que se contaron en un contador de centelleo equipado con un lector de placas (TopCount, Packard Bioscience, Meriden, CT). Usando placas FlashPlate MBP planas de 384 pocillos, el volumen de ensayo total fue de 50 μl . El programa HTS utilizó un instrumento Biomek FX para la dilución.

Para cada ensayo, los componentes y las condiciones fueron los siguientes: Se incubaron 200 ng de enzima en tampón de ensayo (el tampón de ensayo 1X contiene HEPES 30 mM (pH 8,0), DTT 5 mM y MgCl_2 10 mM), ATP 10 μM , 0,2 μCi de $[\text{gamma-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ y 10 μM de posible compuesto inhibidor. Se incubó la reacción a temperatura ambiente durante 60 minutos, se lavó 3 veces con 75 μl de tampón de detención/lavado (el tampón de detención/lavado 1X contiene EDTA 50 mM y Tris 20 mM (pH 7,4)), y entonces se leyeron las placas en el contador de centelleo. Se usaron diferentes concentraciones de estaurosporina (400 nM, 200 nM, 100 nM y 50 nM; adquirida de BIOMOL (Plymouth Meeting, PA)) como controles en cada placa.

6.26. Ensayo de perfusión de cultivo de órganos en cámara anterior de cerdo

Se obtuvieron ojos recién enucleados de un matadero local. Se recogieron los ojos inmediatamente tras la muerte y se pusieron en hielo. Se realizaron disecciones de la cámara anterior en el plazo de 4 horas tras sacrificarse el cerdo. Para preparar los segmentos anteriores para la perfusión, se limpiaron en primer lugar los ojos retirando todos los músculos extraorbitarios y sumergiendo la órbita en yodo al 1% (Veterinary Products Laboratories, Phoenix, AZ) durante 30 segundos. Entonces se practicó una incisión circular alrededor de la circunferencia posterior de la órbita y se retiró esta sección posterior de la esclerótica que incluía el nervio óptico y se desechó. Entonces se retiraron cuidadosamente el cuerpo vítreo, la retina, el cristalino y la coroides sin dañar el ángulo de flujo de salida en la parte anterior del ojo. También se retiró el anillo central interno del iris. Entonces se colocó la cámara anterior limpia y diseccionada en la cámara de perfusión. Se eliminaron las fugas involuntarias de alrededor del ojo colocando grasa de alto vacío (Dow Corning Corp., Midland, MI) entre la parte distal de la esclerótica y la cámara de perfusión y sujetando el ojo en su sitio con una banda de goma para ortodoncia 4C (5/16") de 3 Oz (ORMCO Corp., Glendora, CA). Una vez sujeta, se llena la configuración de perfusión con el medio de perfusión. El medio de perfusión era DMEM complementado con D-glucosa 4,5 g/l, penicilina G 200 unidades/ml, sulfato de estreptomicina 200 $\mu\text{g/ml}$ y L-glutamina 0,2 mM (Invitrogen, Grand Island, NY). Entonces se conectó la configuración de perfusión llena de medio a los tubos de infusión y la bomba de jeringa programable. Se monitorizó la presión colocando un sensor de presión sanguínea (WPI, Sarasota, FL) en línea entre la bomba de jeringa y la cámara de perfusión. El sensor retransmitía la señal a través de un amplificador Bridge-8 (WPI, Sarasota, FL). Se convirtió la señal amplificada en una lectura digital a través de un sistema de adquisición de datos MP-100 (WPI, Sarasota, FL), y se analizaron los datos usando el software AcqKnowledge (WPI, Sarasota, FL). Se eliminó del ensayo cualquier configuración de cámara de perfusión que no pudiese mantener una presión estacionaria debido a fugas.

Una vez preparadas cuatro configuraciones de perfusión de cámara anterior, se permitió que las cámaras se calentaran hasta 35°C durante varias horas mientras se perfundían con medio a una velocidad de 2 $\mu\text{l/min}$. Una vez estabilizadas las configuraciones de perfusión, se realizó el primer intercambio de medio control de 15 ml. La velocidad de intercambio era de 5 ml/min. Entonces se permitió que las configuraciones de perfusión establecieran un nivel de referencia durante la noche a una velocidad de flujo de 2 $\mu\text{l/min}$. A la mañana siguiente, se realizó un segundo intercambio de medio control del mismo modo. Se usó este segundo intercambio para establecer el nivel de referencia de 2 horas para el estudio de compuestos. Tras establecer un nivel de referencia de 2 horas que no tiene una desviación de más de 1 mmHg, se realizó intercambio de medio con compuesto. Se realizaron intercambios de medios con compuesto en dos de las cuatro configuraciones de perfusión. Las configuraciones de perfusión restantes recibieron un intercambio de medio con vehículo. Se realizaron todos los intercambios a una velocidad de 5 ml/min y un volumen de intercambio de 25 ml. Tras el intercambio, se perfundieron las configuraciones de perfusión a una velocidad de 2 $\mu\text{l/min}$ durante al menos 4 h. Se calculó la facilidad de flujo de salida dividiendo la

presión PIO (mmHg) resultante entre la velocidad de flujo ($\mu\text{l}/\text{min}$). Se representaron gráficamente los datos como una diferencia relativa desde tiempo cero, es decir, el tiempo tras el nivel de referencia de 2 h y antes del intercambio de compuesto/vehículo.

5 **6.27. Modelo de hipertensión ocular inducida por dexametasona**

Se llenaron bombas miniosmóticas Alzet para ratón de veintiocho días (DURECT Corp., Cupertino, CA) con una disolución de dexametasona soluble en agua (dex) en PBS (Sigma, St. Louis, MO) de modo que liberasen aproximadamente 0,1 mg de dex al día. Una vez llenas las bombas con la dex, se permitió que las bombas se equilibraran en PBS a 37°C durante 60 horas. Se colocaron quirúrgicamente las bombas equilibradas por vía subcutánea en los lomos de ratones híbridos C57:129 F2 de tipo natural que pesaban entre 25 y 35 gramos. Se suturaron las incisiones quirúrgicas con seda trenzada 5-0 (ROBOZ, Gaithersburg, MD) y se trataron con pomada antibiótica a lo largo de toda la duración del estudio. Se midió la presión intraocular (PIO) en estos ratones usando un tonómetro TonoLab (Colonial Medical Supply Co., Franconia, NH). Se sedaron ligeramente los ratones con isoflurano y se anestesiaron por vía tópica con proparacaína al 0,5% (Akorn, Buffalo Grove, IL) antes de tomarse las mediciones de PIO. Se midió la PIO de referencia 1 día antes de la implantación de las minibombas. Tras la implantación de las minibombas, se tomaron mediciones de PIO 2-3 veces a la semana durante 4 semanas. Se realizaron estudios farmacológicos con posibles compuestos hipotensores oculares entre 21 y 28 días tras la implantación.

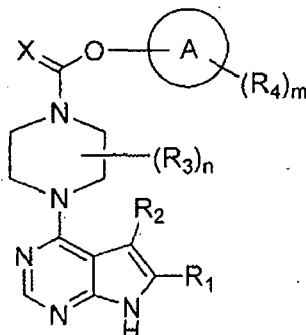
20 **6.28. Efectos *in vivo***

Entonces se sometieron a prueba los compuestos de la invención que se encontró que afectan al flujo de salida convencional en el ensayo de perfusión de cultivo de órganos en cámara anterior de cerdo descrito anteriormente, en el modelo de hipertensión ocular de ratón.

Tal como se muestra en la figura 1, una disolución 100 μM de un compuesto de la invención aumentó significativamente el flujo de salida convencional en el ensayo de perfusión de cerdo en comparación con el control de vehículo. Y tal como se muestra en la figura 2, la administración tópica de ese mismo compuesto redujo significativamente la presión intraocular en ratones con hipertensión ocular de tipo natural F2 hembra. Los datos en esta figura se obtuvieron una hora tras el tratamiento tópico.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

X es O o NR_A;

A es cicloalquilo, arilo o heterociclilo;

R₁ es hidrógeno, OR_B, N(R_B)₂, SR_B, o alquilo, arilo o heterociclilo;

R₂ es hidrógeno, halógeno, ciano, OR_B, N(R_B)₂, SR_B, alquilo, arilo o heterociclilo;

cada R₃ es independientemente halógeno, alquilo, o dos R₃ pueden tomarse junto con el anillo al que están unidos para proporcionar cicloalquilo o heterociclilo;

cada R₄ es ciano, halógeno, hidroxilo, nitro, R_C, OR_C, N(R_C)₂, NHC(O)R_C, C(O)R_C, C(O)N(R_C)₂ o SO₂R_C;

R_A es hidrógeno, ciano, nitro, R_{A1}, SO₂R_{A1} o SO₂N(R_{A1})₂;

cada R_{A1} es independientemente hidrógeno, alquilo, heteroalquilo, arilo o heterociclilo,

cada R₈ es independientemente hidrógeno o alquilo;

cada R_C es independientemente hidrógeno, alquilo, heteroalquilo, arilo o heterociclilo;

n es 0-8; y

m es 0-4;

en los que el término "alquilo" significa un hidrocarburo de cadena lineal, ramificado o cíclico que tiene desde 1 hasta 20 átomos de carbono; el término "alquilo" incluye hidrocarburos saturados así como restos alquenilo y alquinilo; el término "alquenilo" significa un hidrocarburo de cadena lineal, ramificado y/o cíclico que tiene desde 2 hasta 20 átomos de carbono y que incluye al menos un doble enlace carbono-carbono; el término "alquinilo" significa un hidrocarburo de cadena lineal, ramificado o cíclico que tiene desde 2 hasta 20 átomos de carbono, y que incluye al menos un triple enlace carbono-carbono.

2. Compuesto según la reivindicación 1, que tiene una IC₅₀ de LIMK2 de menos de 100, 75, 50, 25 ó 10 nM.

3. Compuesto según la reivindicación 1, en el que R₄ es R_C o C(O)NHR_C.

4. Compuesto según la reivindicación 1, en el que X es NR_A.

5. Compuesto según la reivindicación 1, en el que R₄ es halo.

6. Compuesto según la reivindicación 1, en el que R₄ es C(O)N(R_C)₂.

7. Compuesto según la reivindicación 6, en el que cada R_C es independientemente hidrógeno o alquilo.

8. Formulación farmacéutica que comprende un vehículo líquido adecuado para la administración oftálmica y un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una sal farmacéuticamente aceptable del

mismo.

- 5 9. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como medicamento para el tratamiento de cáncer o una enfermedad o un trastorno inflamatorio o para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno que afecta a la visión.
- 10 10. Compuesto para su uso según la reivindicación 9, en el que el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno que afecta a la visión seleccionado de glaucoma, neurodegeneración o infección.
- 10 11. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o formulación farmacéutica según la reivindicación 8, para su uso como medicamento.

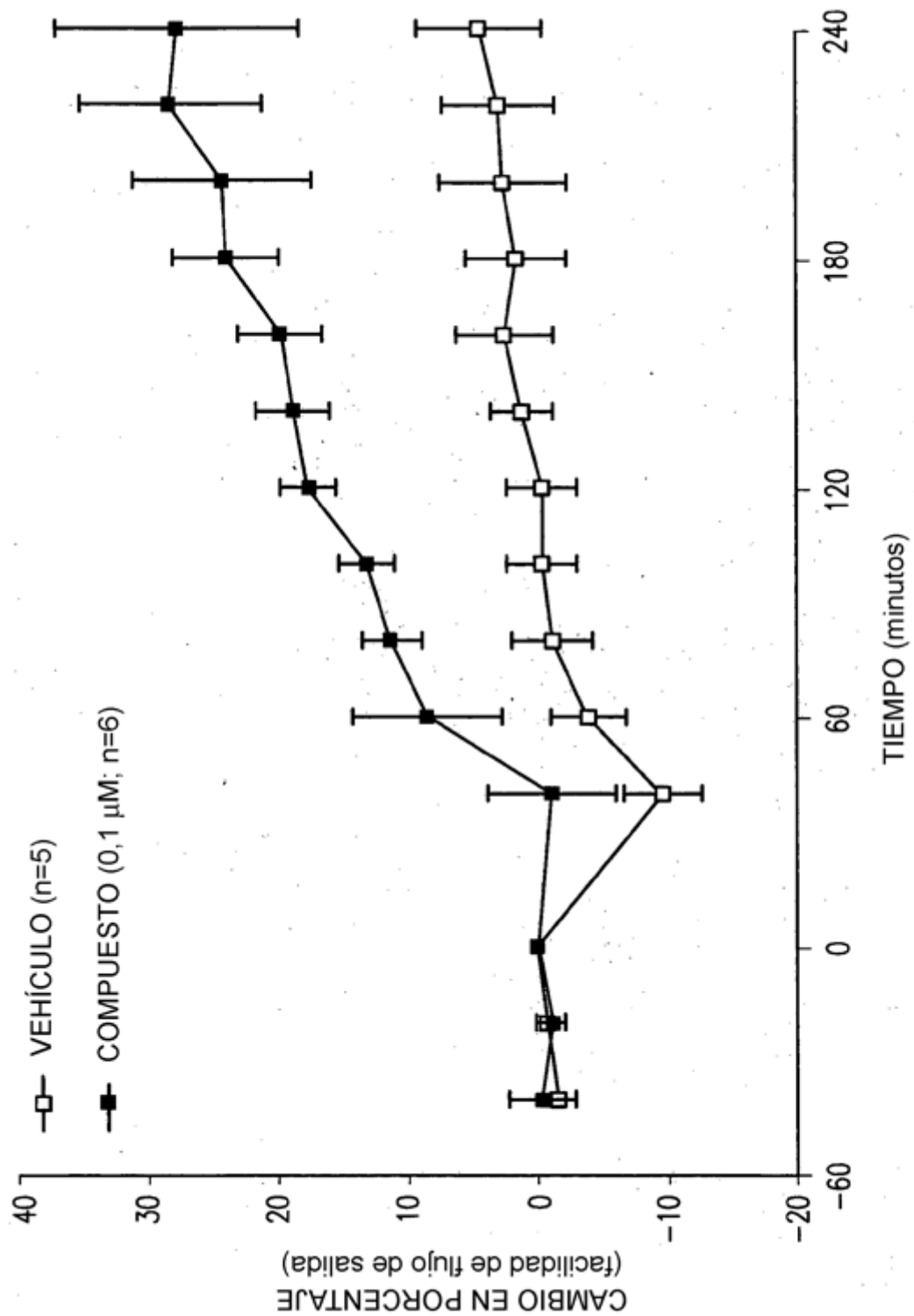


FIG. 1

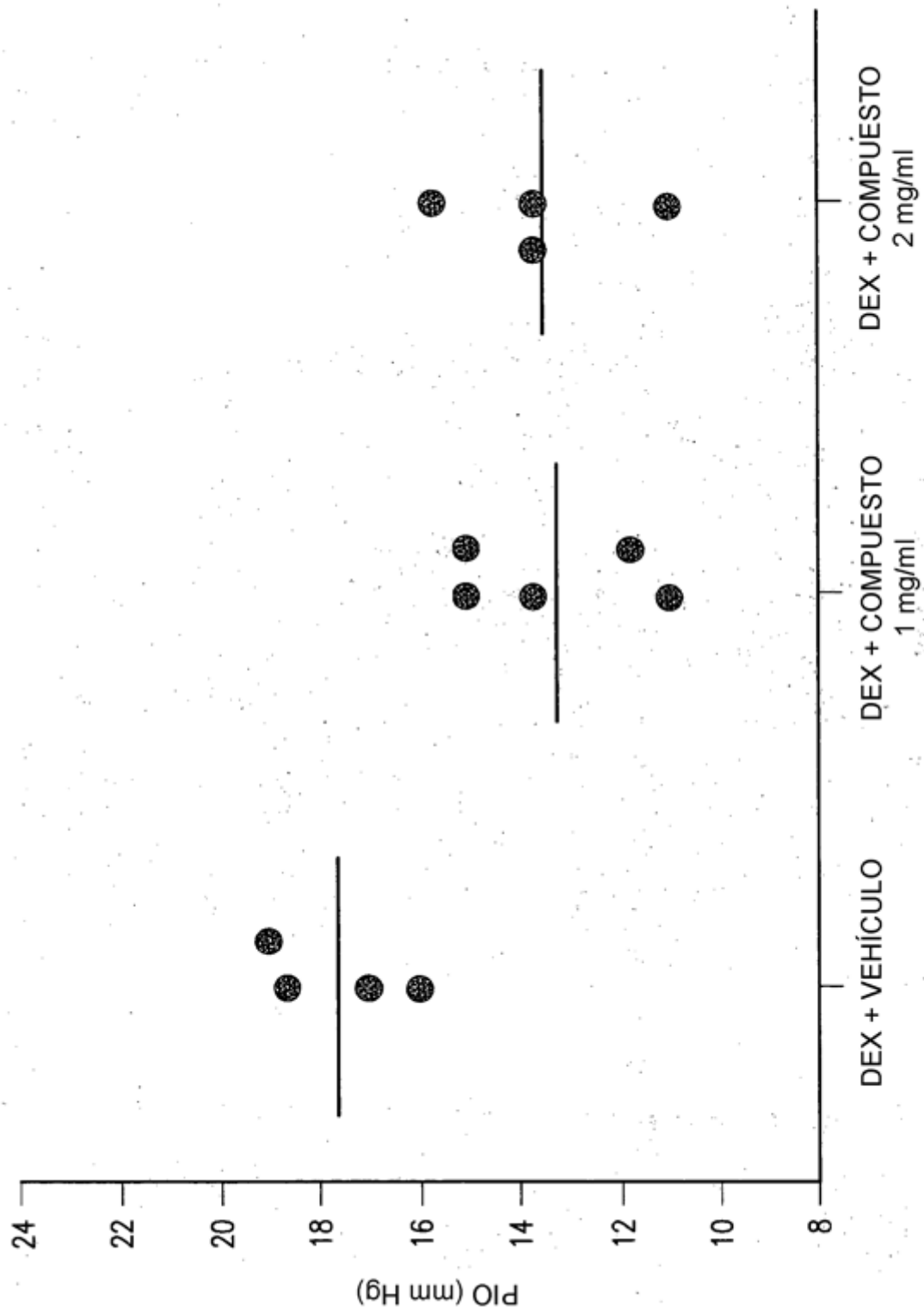


FIG. 2