

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 687**

51 Int. Cl.:

C07D 413/12 (2006.01)

A61K 31/5377 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2007 E 07863295 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015 EP 2114934**

54 Título: **Composición y métodos para modular una cascada de cinasa**

30 Prioridad:

28.12.2006 US 877762 P

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

15.02.2016

73 Titular/es:

**ATHENEX, INC. (100.0%)
701 Ellicott Street
Buffalo, NY 14203, US**

72 Inventor/es:

**HANGAUER, DAVID G.;
COUGHLIN, DANIEL;
CODY, JEREMY A.;
GALE, JONATHAN y
PATRA, DEBASIS**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 559 687 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

Composición y métodos para modular una cascada de cinasa

Campo de la invención

5 La presente invención se dirige a procedimientos para la síntesis de N-bencil-2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetamida (KX2-391) sustancialmente pura y sales de la misma.

Antecedentes de la invención

10 La transducción de señales es cualquier procedimiento por el que una célula convierte un tipo de señal o estímulo en otro. Los procedimientos denominados transducción de señales implican a menudo una secuencia de reacciones bioquímicas dentro de la célula, que son llevadas a cabo por enzimas y conectadas a través de segundos mensajeros. En muchos procedimientos de transducción, un número creciente de enzimas y otras moléculas se ven envueltas en los episodios que avanzan desde el estímulo inicial. En tales casos, la cadena de etapas se denomina una "cascada de señalización" o una "ruta de segundos mensajeros" y a menudo da como resultado un estímulo pequeño que provoca una gran respuesta. Una clase de moléculas implicadas en la transducción de señales es la familia de enzimas cinasa. El mayor grupo de cinasas son proteína cinasas, que actúan sobre y modifican la actividad de proteínas específicas. Se usan ampliamente para transmitir señales y controlar procesos complejos en las células.

15 Las proteína cinasas son una gran clase de enzimas que catalizan la transferencia del γ -fosfato desde ATP hasta el grupo hidroxilo de la cadena lateral de Ser/Thr o Tyr en proteínas y péptidos y están íntimamente implicadas en el control de diversas funciones celulares importantes, quizás lo más notablemente: transducción de señales, diferenciación y proliferación. Se estima que hay aproximadamente 2.000 proteína cinasas distintas en el cuerpo humano, y aunque cada una de estas fosforila sustratos proteínicos/peptídicos particulares, todas se unen al mismo segundo sustrato, ATP, en un bolsillo muy conservado. Las proteína fosfatasa catalizan la transferencia de fosfato en la dirección opuesta.

20 Una tirosina cinasa es una enzima que puede transferir un grupo fosfato desde ATP hasta un residuo de tirosina en una proteína. La fosforilación de proteínas por cinasas es un mecanismo importante en la transducción de señales para la regulación de la actividad enzimática. Las tirosina cinasas se dividen en dos grupos; las que son proteínas citoplásmicas y las cinasas ligadas a receptores transmembranarios. En los seres humanos, hay 32 proteína tirosina cinasas citoplásmicas y 58 proteína tirosina cinasas ligadas a receptores. Las hormonas y los factores de crecimiento que actúan sobre receptores ligados a tirosina cinasas de la superficie celular generalmente son promotores del crecimiento y funcionan para estimular la división celular (p. ej., insulina, factor de crecimiento insulinoide 1, factor de crecimiento epidérmico).

25 Los inhibidores de diversas proteína cinasas o proteína fosfatasa conocidas tienen una variedad de aplicaciones terapéuticas. Un uso terapéutico potencial prometedor para los inhibidores de proteína cinasas o proteína fosfatasa es como agentes anticancerosos. Aproximadamente 50% de los productos oncogénicos conocidos son proteína tirosina cinasas (PTK, por sus siglas en inglés) y se ha mostrado que su actividad como cinasa conduce a la transformación celular.

30 Las PTK se pueden clasificar en dos categorías, las PTK receptoras membranarias (p. ej. PTK receptoras de factores de crecimiento) y las PTK no receptoras (p. ej. la familia Src de productos protooncogénicos). Hay al menos 9 miembros de la familia Src de PTK no receptoras, siendo pp60^{c-src} (posteriormente denominada simplemente en la presente "Src") la PTK prototípica de la familia en la que aproximadamente 300 dominios catalíticos de aminoácido están altamente conservados. La hiperactivación de Src se ha presentado en un número de cánceres humanos, incluyendo los de colon, mama, pulmón, vejiga urinaria y piel, así como en cáncer gástrico, tricoleucemia y neuroblastoma. Las señales de proliferación celular sobreestimuladas procedentes de receptores transmembranarios (p. ej. EGFR y p185HER2/Neu) al interior de la célula también parecen pasar a través de Src. Por consiguiente, se ha propuesto recientemente que Src es una diana universal para la terapia del cáncer, debido a que la hiperactivación (sin mutación) está implicada en la iniciación, el avance y la metástasis tumoral para muchos tipos de tumores humanos importantes.

35 Debido a que las cinasas están implicadas en la regulación de una amplia variedad de rutas de transducción de señales celulares normales (p. ej., crecimiento, diferenciación, supervivencia, adherencia, migración, etc. celular), se cree que las cinasas representan un papel en una variedad de enfermedades y trastornos. Así, la modulación de cascadas de señalización de cinasas puede ser un modo importante de tratar o prevenir tales enfermedades y trastornos.

40 Se ha publicado una síntesis a pequeña escala de KX2-391 (Patente de EE. UU. 7.300.931). Sin embargo, esta síntesis es poco práctica para producir grandes cantidades del compuesto y el producto resultante sufre contaminación con cloruro de etilo, que se sabe que es un agente alquilante débil. Así, la presencia de cloruro de etilo en niveles suficientemente altos limita la eficacia práctica de las composiciones de KX2-391.

Según esto, hay una necesidad de composiciones y procedimientos para la síntesis de KX2-391 altamente purificada, que sea segura y simple y que produzca KX2-391 a gran escala con alto rendimiento y que esté sustancialmente libre de cloruro de etilo.

Compendio de la invención

5 La invención se refiere a un procedimiento para preparar 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)-*N*-bencilacetamida que comprende la etapa de:

hacer reaccionar 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetato de metilo con bencilamina para dar 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)-*N*-bencilacetamida.

10 El 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetato de metilo se puede preparar mediante la etapa de convertir 2-(*S*-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetonitrilo en 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetato de metilo.

El 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetonitrilo se puede preparar mediante la etapa de hacer reaccionar 4-(2-(4-(6-fluoropiridin-3-il)fenoxi)etil)morfolina con acetonitrilo.

La 4-(2-(4-(6-fluoropiridin-3-il)fenoxi)etil)morfolina se puede preparar mediante la etapa de acoplar 4-(2-(4-bromofenoxi)etil)morfolina con ácido 6-fluoropiridin-3-il-3-borónico.

15 El procedimiento puede comprender las etapas de:

(1) hacer reaccionar 4-(2-cloroetil)morfolina con 4-bromofenol para dar 4-(2-(4-bromofenoxi)etil)morfolina;

(2) acoplar la 4-(2-(4-bromofenoxi)etil)morfolina con ácido 6-fluoropiridin-3-il-3-borónico para dar 4-(2-(4-(6-fluoropiridin-3-il)fenoxi)etil)morfolina;

20 (3) hacer reaccionar la 4-(2-(4-(6-fluoropiridin-3-il)fenoxi)etil)morfolina con acetonitrilo para dar 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetonitrilo;

(4) convertir el 2-(*S*-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetonitrilo en 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetato de metilo; y

(5) hacer reaccionar el 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetato de metilo con bencilamina para dar 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)-*N*-bencilacetamida.

25 El procedimiento puede comprender adicionalmente la etapa de poner en contacto la 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)-*N*-bencilacetamida con solución de ácido clorhídrico para dar dihidrocloruro de 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)-*N*-bencilacetamida.

En otra realización de la invención, el procedimiento comprende las etapas de:

(1) hacer reaccionar 4-(2-cloroetil)morfolina con 4-bromofenol para dar 4-(2-(4-bromofenoxi)etil)morfolina;

30 (2) acoplar la 4-(2-(4-bromofenoxi)etil)morfolina con ácido 6-fluoropiridin-3-il-3-borónico para dar 4-(2-(4-(6-fluoropiridin-3-il)fenoxi)etil)morfolina;

(3) hacer reaccionar la 4-(2-(4-(6-fluoropiridin-3-il)fenoxi)etil)morfolina con acetonitrilo para dar 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetonitrilo;

35 (4) convertir el 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetonitrilo en 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetato de metilo;

(5) hacer reaccionar el 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetato de metilo con bencilamina para dar 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)-*N*-bencilacetamida; y

(6) poner en contacto la 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)-*N*-bencilacetamida con una solución de ácido clorhídrico para dar dihidrocloruro de 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)-*N*-bencilacetamida.

40 Los compuestos descritos en la presente memoria son útiles en la modulación de un componente de la cascada de señalización de cinasa. Algunos compuestos pueden ser útiles en la modulación de más de un componente de una cascada de señalización de cinasa. Los compuestos son útiles como agentes farmacéuticos. Los compuestos pueden ser útiles para modular la regulación de una cinasa que puede estar implicada en una ruta de transducción de señales celulares normal (p. ej., crecimiento, diferenciación, supervivencia, adherencia, migración, etc. celular), o una cinasa implicada en una enfermedad o trastorno.

45

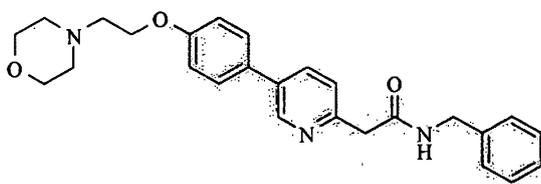
Por ejemplo, el componente o los componentes de la cascada de cinasa modulados por un compuesto de la divulgación son responsables de la manifestación de una enfermedad o trastorno tal como trastornos hiperproliferativos, cánceres, precánceres, osteoporosis, trastornos cardiovasculares, disfunción del sistema

inmunitario, diabetes tipo II, obesidad, enfermedad oftálmica, edema macular, dolor neuropático crónico, pérdida de audición y rechazo de trasplantes.

- 5 Los compuestos de la divulgación son útiles en el tratamiento de enfermedades y trastornos que son modulados por la inhibición de tirosina cinasas, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades y trastornos que son modulados por cinasa Src. Los compuestos de la divulgación también pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades y trastornos que son modulados por cinasa de adherencia focal (FAK, por sus siglas en inglés).

- 10 Por ejemplo, los compuestos pueden ser útiles como agentes antiproliferativos, para tratar mamíferos, tal como para tratar seres humanos y animales. Los compuestos se pueden usar sin limitación, por ejemplo, como agentes anticancerosos, antiangiogénicos, antimetastásicos, antimicrobianos, antibacterianos, antifúngicos, antiparasitarios y/o antivirales. Los compuestos de la divulgación son útiles, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer de pulmón. Los compuestos también son útiles, por ejemplo, en el tratamiento de cáncer de colon o cáncer de mama.

La divulgación se refiere a N-bencil-2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetamida (Compuesto 1) sustancialmente pura, y sales, solvatos, hidratos o profármacos de la misma:



- 15 (Compuesto 1, KX2-391).

La divulgación se refiere a composiciones y procedimientos para la síntesis de KX2-391 altamente purificada (> 98,0% según se determina mediante HPLC) que sea segura y simple y que produzca KX2-391 a gran escala (> 100 g) con alto rendimiento (> 80%) y con cloruro de etilo limitado (<250 ppm según se determina por análisis del disolvente residual por cromatografía de gases del espacio libre superior).

- 20 Preferiblemente, el Compuesto 1 tiene una pureza de más de 98%. Por ejemplo, la pureza del Compuesto 1 es 98,5%, 99,0%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% o 99,9%.

Las composiciones y las formulaciones pueden contener menos de 2% de impurezas. Por ejemplo, las composiciones y las formulaciones contienen menos de 2% de una cualquiera de las siguientes impurezas, o combinaciones de las mismas: cloruro de etilo, etanol, acetato de etilo, heptano, anisol y paladio.

- 25 Preferiblemente, la composición contiene menos de 250 ppm de cloruro de etilo según se determina mediante análisis del disolvente residual por cromatografía de gases del espacio libre superior. Los compuestos y las formulaciones contienen cloruro de etilo en un intervalo de aproximadamente 0 ppm a aproximadamente 250 ppm (o cualquier valor dentro de dicho intervalo). Por ejemplo, las composiciones contienen menos de 200 ppm, menos de 200 ppm, menos de 150 ppm, menos de 100 ppm o menos de 50 ppm cloruro de etilo.

- 30 Los compuestos y las formulaciones de la divulgación contienen menos de aproximadamente 100 ppm de paladio. Los compuestos y las formulaciones contienen paladio en un intervalo de aproximadamente 0 ppm a aproximadamente 100 ppm (o cualquier valor dentro de dicho intervalo). Por ejemplo, las composiciones contienen menos de 75 ppm, menos de 50 ppm, menos de 30 ppm, menos de 20 ppm, menos de 10 ppm o menos de 5 ppm de paladio.

- 35 La divulgación se refiere a una composición que incluye un solvato sustancialmente puro del Compuesto 1.

La divulgación también se refiere a una composición que incluye un hidrato sustancialmente puro del Compuesto 1.

La divulgación también incluye una sal por adición de ácido sustancialmente pura del Compuesto 1, por ejemplo, una sal de hidrócloruro. La sal por adición de ácido puede ser, por ejemplo, una sal de dihidrócloruro.

- 40 La divulgación se refiere a una composición que incluye una sal por adición de ácido sustancialmente pura del Compuesto 1; a una composición que incluye una sal de hidrócloruro sustancialmente pura del Compuesto 1; a una composición que incluye una sal de dihidrócloruro sustancialmente pura del Compuesto 1; y también incluye un profármaco del Compuesto 1 y una sal farmacéuticamente aceptable sustancialmente pura del Compuesto 1.

La divulgación también se refiere a una composición que incluye en Compuesto 1 sustancialmente puro o un solvato, un hidrato o una sal del mismo, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 45 La divulgación también se refiere al uso de tales compuestos sustancialmente puros y composiciones para modular un componente de la cascada de señalización de cinasa. Algunos compuestos pueden ser útiles en la modulación

de más de un componente de una cascada de señalización de cinasa. Los compuestos son útiles como agentes farmacéuticos.

Ciertos compuestos son inhibidores de cinasa no competitivos con ATP.

5 La divulgación se refiere a compuestos y métodos para usar los compuestos para tratar trastornos de proliferación celular.

Por ejemplo, una composición farmacéutica que incluye un Compuesto 1 sustancialmente puro, o una sal, un solvato, un hidrato o un profármaco del mismo, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable se puede usar en un método para prevenir o tratar un trastorno de proliferación celular.

10 Por ejemplo, el trastorno de proliferación celular es precáncer o cáncer. El trastorno de proliferación celular tratado o prevenido por los compuestos de la divulgación puede ser un cáncer, tal como, por ejemplo, cáncer de colon o cáncer de pulmón, un trastorno hiperproliferativo o psoriasis.

Por ejemplo, el tratamiento o la prevención del trastorno proliferativo se puede presentar a través de la inhibición de una tirosina cinasa. Por ejemplo, la tirosina cinasa puede ser una cinasa Src o una cinasa de adherencia focal (FAK).

15 Una composición farmacéutica que incluye un Compuesto 1 sustancialmente puro, o una sal, un solvato, un hidrato o un profármaco del mismo, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable se puede usar en un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno que es modulado por la inhibición de tirosina cinasa. Por ejemplo, la enfermedad o el trastorno que es modulado por la inhibición de tirosina cinasa es cáncer, precáncer, un trastorno hiperproliferativo o una infección microbiana.

20 La composición farmacéutica de la divulgación puede modular una ruta de cinasa. Por ejemplo, la ruta de cinasa es una ruta de cinasa Src o una ruta de cinasa de adherencia focal.

La composición farmacéutica de la divulgación puede modular una cinasa directamente. Por ejemplo, la cinasa es cinasa Src o cinasa de adherencia focal.

Ciertas composiciones farmacéuticas de la divulgación son inhibidores de cinasa no competitivos con ATP.

25 Los compuestos de la divulgación también son útiles para tratar o prevenir una infección microbiana, tal como una infección bacteriana, fúngica, parasitaria o viral.

30 Un compuesto preparado mediante los métodos de la divulgación puede usarse como un agente farmacéutico, por ejemplo, usarse como un agente antiproliferativo, para tratar seres humanos y/o animales, tal como para tratar seres humanos y/u otros mamíferos. Los compuestos se pueden usar sin limitación, por ejemplo, como agentes anticancerosos, antiangiogénicos, antimicrobianos, antibacterianos, antifúngicos, antiparasitarios y/o antivirales. Adicionalmente, los compuestos se pueden usar para otros trastornos relacionados con la proliferación celular tales como retinopatía diabética, degeneración macular y psoriasis. Los agentes anticancerosos incluyen agentes antimetastásicos.

35 El compuesto de la divulgación usado como un agente farmacéutico incluye un Compuesto 1 sustancialmente puro y sales, solvatos e hidratos del mismo.

Un compuesto de la divulgación se puede usar para modular una cascada de cinasa. Por ejemplo, el compuesto se usa para modular un componente de una cascada de cinasa que es responsable de la manifestación de una enfermedad o trastorno.

40 Tales enfermedades y trastornos incluyen cánceres, osteoporosis, trastornos cardiovasculares, disfunción del sistema inmunitario, diabetes tipo II, obesidad y rechazo de trasplantes.

45 Por ejemplo, un compuesto de la divulgación se puede usar para tratar o prevenir un trastorno de proliferación celular en un individuo, tal como precáncer o cáncer o un trastorno hiperproliferativo. La prevención o el tratamiento del trastorno de proliferación celular, el cáncer o el trastorno hiperproliferativo se puede producir a través de la inhibición de una cinasa, tal como tirosina cinasa, p. ej. cinasa Src o cinasa de adherencia focal (FAK). El individuo puede ser un mamífero, p. ej. el individuo es un ser humano.

50 La divulgación también se extiende a un método para tratar o prevenir el cáncer o un trastorno de proliferación en un individuo, que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición que incluye el Compuesto 1 sustancialmente puro, o una sal, un solvato, un hidrato o un profármaco del mismo. Por ejemplo, el compuesto puede ser un inhibidor de cinasa. El compuesto puede ser un inhibidor de cinasa no competitivo con ATP. El compuesto puede inhibir una cinasa directamente, o puede afectar a la ruta de la cinasa.

Otro aspecto de la divulgación incluye un método para proteger contra o tratar la pérdida de audición en un individuo, que comprende administrar una composición que incluye Compuesto 1 sustancialmente puro, o una sal,

un solvato, un hidrato o un profármaco del mismo. El compuesto se puede administrar antes del inicio de la pérdida de audición. Alternativamente, el compuesto se administra después del inicio de la pérdida de audición. El compuesto se puede administrar en combinación con un fármaco que provoca pérdida de audición, p. ej. cisplatino o un antibiótico aminoglicosídico, o en combinación con un fármaco que tiene como diana tricoleucocitos.

5 Otro aspecto de la divulgación incluye un método para proteger contra o tratar la osteoporosis en un individuo, que comprende administrar la composición que incluye un Compuesto 1 sustancialmente puro, o una sal, un solvato, un hidrato o un profármaco del mismo. El compuesto se puede administrar antes del inicio de la osteoporosis o después del inicio de la osteoporosis.

10 Otro aspecto de la divulgación incluye un método para proteger contra o tratar enfermedades oftálmicas, p. ej., degeneración macular, retinopatía, edema macular, etc. en un individuo, que comprende administrar una composición que incluye un Compuesto 1 sustancialmente puro, o una sal, un solvato, un hidrato o un profármaco del mismo. El compuesto se puede administrar antes del inicio de la enfermedad oftálmica o después del inicio de la enfermedad oftálmica.

15 Otro aspecto de la divulgación incluye un método para proteger contra o tratar la diabetes en un individuo, que comprende administrar una composición que incluye un Compuesto 1 sustancialmente puro, o una sal, un solvato, un hidrato o un profármaco del mismo. El compuesto se puede administrar antes del comienzo de la diabetes o después del comienzo de la diabetes.

20 Otro aspecto de la divulgación incluye un método para proteger contra o tratar la obesidad en un individuo, que comprende administrar una composición que incluye un Compuesto 1 sustancialmente puro, o una sal, un solvato, un hidrato o un profármaco del mismo. El compuesto se puede administrar antes de que el individuo sea obeso o después de que el individuo sea obeso.

25 Otro aspecto de la divulgación incluye un método para proteger contra o tratar la apoplejía en un individuo, que comprende administrar una composición que incluye un Compuesto 1 sustancialmente puro, o una sal, un solvato, un hidrato o un profármaco del mismo. El compuesto se puede administrar antes de que se haya producido la apoplejía o después de que se haya producido la apoplejía.

Otro aspecto de la divulgación incluye un método para proteger contra o tratar la aterosclerosis en un individuo, que comprende administrar una composición que incluye un Compuesto 1 sustancialmente puro, o una sal, un solvato, un hidrato o un profármaco del mismo.

30 Otro aspecto de la divulgación incluye un método para regular la actividad del sistema inmunitario en un individuo, que comprende administrar una composición que incluye un Compuesto 1 sustancialmente puro, o una sal, un solvato, un hidrato o un profármaco del mismo.

35 Otro aspecto de la divulgación incluye un método para proteger contra o tratar el dolor neuropático crónico en un individuo, que comprende administrar una composición que incluye un Compuesto 1 sustancialmente puro, o una sal, un solvato, un hidrato o un profármaco del mismo. El compuesto se puede administrar antes del comienzo del dolor neuropático crónico o después del comienzo del dolor neuropático crónico.

Otro aspecto de la divulgación incluye un método para proteger contra o tratar la hepatitis B en un individuo, que comprende administrar una composición que incluye un Compuesto 1 sustancialmente puro, o una sal, un solvato, un hidrato o un profármaco del mismo. El compuesto se puede administrar antes del comienzo de la hepatitis B o después del comienzo de la hepatitis B.

40 Otro aspecto de la divulgación es un método para prevenir o tratar un trastorno de proliferación celular, que comprende administrar a un individuo que lo necesite una composición que incluye un Compuesto 1 sustancialmente puro, o una sal, un solvato, un hidrato o un profármaco del mismo.

45 En estos aspectos de la divulgación, la administración del compuesto se puede llevar a cabo oralmente, parentalmente, subcutáneamente, intravenosamente, intramuscularmente, intraperitonealmente, mediante instilación intranasal, mediante instilación intracavitaria o intravesical, tópicamente, intraarterialmente, intralesionalmente, mediante una bomba dosificadora o mediante aplicación a membranas mucosas. El compuesto se puede administrar con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

50 El compuesto puede inhibir uno o más componentes de una cascada de señalización de proteína cinasa. El compuesto puede ser un inhibidor alostérico o un inhibidor de un sustrato peptídico. El compuesto puede no inhibir la unión de ATP a una proteína cinasa. El compuesto puede inhibir una proteína cinasa de la familia Src, por ejemplo tirosina cinasa pp60^{c-src}.

La divulgación incluye un método para tratar o prevenir una enfermedad o un trastorno que es modulado por la inhibición de tirosina cinasas, en donde el trastorno de proliferación se selecciona de cáncer, precáncer, un trastorno hiperproliferativo y una infección microbiana.

- Por ejemplo, la infección microbiana es una infección bacteriana, fúngica, parasitaria o viral. En otro ejemplo, el trastorno de proliferación es un trastorno hiperproliferativo seleccionado de psoriasis, retinopatía diabética y degeneración macular. En ciertos ejemplos, el trastorno de proliferación es cáncer. Por ejemplo, el cáncer puede ser un tumor sólido, tal como cáncer de pulmón, mama, colon, ovarios, cerebro, hígado, páncreas o próstata, melanoma maligno o cáncer de piel no melanómico. En ciertos ejemplos, el cáncer es cáncer de mama, colon o pulmón. En ciertos ejemplos, el cáncer es un tumor hematológico, una enfermedad maligna hematológica, leucemia infantil, linfoma, mieloma múltiple, enfermedad de Hodgkin, linfoma de origen linfocítico o cutáneo, leucemia aguda o crónica, leucemia linfoblástica, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielocítica crónica, neoplasma de células plasmáticas, neoplasma linfoideo o un cáncer asociado con el sida.
- En algunos ejemplos, el trastorno de proliferación es un quiste epidérmico, un quiste dermoide, un lipoma, un adenoma, un hemangioma capilar, un hemangioma cutáneo, un linfangioma, una lesión névica, un teratoma, un nefroma, una miofibromatosis, un tumor osteoplástico o una masa displástica.

En ciertos métodos de la divulgación, el individuo tratado con un compuesto de la divulgación es un ser humano.

Breve descripción de los dibujos

- La Figura 1 es una gráfica que indica la DSC de KX2-3912HCl lote 02BP111F.
- La Figura 2 es una gráfica que indica la DSC de KX2-391 2HCl lote 02BP111E.
- La Figura 3 es una gráfica que indica la XRPD de KX2-391 2HCl lote 02BP111E.
- La Figura 4 es una gráfica que indica la XRPD de KX2-391-2HCl lote 02BP111F.
- La Figura 5 es un espectro de NMR de KX2-391 (lote 02BP096K).

20 Descripción detallada de la invención y la divulgación

Los detalles de una o más realizaciones de la invención y la divulgación se indican posteriormente en la descripción adjunta.

- Debido a que las cinasas están implicadas en la regulación de una amplia variedad de rutas de transducción de señales celulares normales (p. ej., crecimiento, diferenciación, supervivencia, adherencia, migración, etc. celular), se cree que las cinasas representan un papel en una variedad de enfermedades y trastornos. Así, la modulación de cascadas de señalización de cinasa puede ser un modo importante de tratar o prevenir tales enfermedades y trastornos. Tales enfermedades y trastornos incluyen, por ejemplo, cánceres, osteoporosis, trastornos cardiovasculares, una disfunción del sistema inmunitario, diabetes tipo II, obesidad y rechazo de trasplantes.

- Los compuestos de la divulgación y los compuestos preparados mediante los métodos de la invención son útiles en la modulación de un componente de la cascada de señalización de cinasa. Algunos compuestos pueden ser útiles en la modulación de más de un componente de una cascada de señalización de cinasa. La expresión "modula uno o más componentes de una cascada de señalización de proteína cinasa" significa que uno o más componentes de la cascada de señalización de cinasa están afectados de modo que cambia el funcionamiento de una célula. Componentes de una cascada de señalización de proteína cinasa incluyen cualesquiera proteína implicadas directamente o indirectamente en la ruta de señalización de cinasa incluyendo segundos mensajeros y dianas aguas arriba y aguas abajo.

Se conoce un número de proteína cinasas y fosfatasa, y son dianas para el desarrollo de tratamientos. Véanse, p. ej., Hidaka y Kobayashi, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1992, 32:377-397; Davies et al., *Biochem. J.*, 2000, 351:95-105.

- Una familia de cinasas, las proteína tirosina cinasas, se dividen en dos grandes familias: tirosina cinasas receptoras, o RTK (por sus siglas en inglés) (p. ej., cinasa receptora de insulina (IRK, por sus siglas en inglés), receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés), receptor de factor de crecimiento fibroblástico básico (FGFR, por sus siglas en inglés), receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR, por sus siglas en inglés), receptor de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-2 o Flk1/KDR) y receptor de factor de crecimiento nervioso (NGFR, por sus siglas en inglés)) y tirosina cinasas no receptoras, o NRTK (por sus siglas en inglés) (p. ej., la familia Src (Src, Fyn, Yes, Blk, Yrk, Fgr, Hck, Lck y Lyn), Fak, Jak, Abl y Zap70). Véase, por ejemplo, Parang y Sun, *Expert Opin. Ther. Patents*, 2005, 15:1183-1207.

- Debido al papel de las cinasas Src en una variedad de cánceres, estas cinasas son el objeto de un número de estudios que se refieren al desarrollo de inhibidores de Src como tratamientos para el cáncer, incluyendo el crecimiento de células cancerosas altamente metastásicas. Los inhibidores de Src se buscan como tratamientos para una variedad de cánceres, incluyendo, por ejemplo, cáncer de colon, lesiones colónicas precancerosas, cáncer ovárico, cáncer de mama, cánceres epiteliales, cáncer de esófago, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer pancreático y otros. Véanse, p. ej., Frame, *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, 1602:114-130 y Parang y Sun, *Expert Opin. Ther. Patents*, 2005, 15:1183-1207.

La inhibición de otras cinasas puede ser útil en el tratamiento y la modulación de otros tipos de enfermedades y trastornos. Por ejemplo, diversas enfermedades oculares se pueden inhibir o prevenir mediante la administración de inhibidores de la tirosina cinasa receptora VEGF. Los inhibidores de la tirosina fosfatasa PTP-1B y/o glicógeno fosforilasa pueden proporcionar tratamientos para la diabetes tipo II o la obesidad. Los inhibidores de p56^{lck} pueden ser útiles para tratar trastornos del sistema inmunitario. Otras dianas incluyen transcriptasa inversa de VIH, tromboxano sintasa, EGFR^{TK}, p55^{fyn}, etc.

Los compuestos de la divulgación pueden ser inhibidores de la señalización de Src que se unen en el sitio de un sustrato peptídico de Src. La actividad de diversos compuestos de la divulgación se ha estudiado en células NIH3T3 transformadas con c-Src (527F, constitutivamente activa y transformante) y en células de cáncer de color humano (HT29). Por ejemplo, en estas líneas celulares, se observó que KX2-391 reducía el nivel de fosforilación de sustratos proteínicos de Src conocidos de un modo dependiente de la dosis y en buena correlación con los efectos inhibidores del crecimiento. Así, los compuestos de la divulgación pueden inhibir directamente Src, y lo pueden hacer al unirse al sitio de unión a péptidos (en oposición a la unión en un sitio alostérico).

Se han realizado experimentos de modelado molecular que muestran que los compuestos de la divulgación se ajustan al sitio del sustrato de Src del modelo (Véanse, p. ej., las Patentes de EE. UU. 7.005.445 y 7.070.936). El modelado también se usa para rediseñar los andamiajes del inhibidor de cinasa Src a fin de elegir como diana otras cinasas, simplemente al usar un grupo diferente de cadenas laterales presentes en las moléculas y/o modificar el propio andamiaje.

Sin querer limitarse por una teoría, se cree que la conformación de algunas cinasas (p. ej., Src) fuera de las células con relación a la conformación dentro de las células es notablemente diferente, debido a que dentro de las células muchas cinasas están embebidas en complejos de señalización multiproteínicos. Así, debido a que el sitio de unión al sustrato peptídico no está bien formado en una cinasa aislada (según se muestra por las estructuras de rayos X de la Src), se cree que la actividad contra una cinasa aislada para un inhibidor de la unión a un sustrato peptídico sería débil. La unión a este sitio en un ensayo de cinasa aislada requiere que el inhibidor capture el porcentaje muy pequeño de proteína total en un ensayo de enzima aislada que está en la misma conformación que existe dentro de las células. Esto requiere un gran exceso del inhibidor para drenar cantidades significativas de la enzima desde el ciclo catalítico en el ensayo a fin de que sea detectable.

Sin embargo, para ensayos basados en células, no es necesario un gran exceso de inhibidor debido a que se espera que se forme el sitio de unión a péptidos. En ensayos de Src basados en células, las proteínas que se unen a los dominios SH2 y SH3 ya han cambiado la conformación de la Src de modo que el sitio de unión a sustratos peptídicos esté completamente formado. Así, bajas concentraciones del inhibidor pueden retirar la enzima del ciclo catalítico debido a que toda la enzima está en la conformación de unión estrecha.

La gran mayoría de los inhibidores de cinasa conocidos son competitivos con ATP y muestran escasa selectividad en un conjunto de ensayos de cinasas aisladas. Sin embargo, se cree que muchos de los compuestos de la divulgación son inhibidores de la unión a sustratos peptídicos. Así, el tradicional cribado de alto rendimiento de compuestos contra enzimas aisladas, tales como Src, no daría como resultado el descubrimiento de estos compuestos.

Existe un considerable soporte bibliográfico reciente para elegir como diana pp60^{c-src} (Src) como un enfoque ampliamente útil para la terapia del cáncer sin dar como resultado una toxicidad grave. Por ejemplo, los tumores que presentan señalización mejorada de PTK receptora de EGF o sobreexpresan el receptor Her-2/neu relacionado, tienen constitutivamente Src activada e invasividad tumoral potenciada. La inhibición de Src en estas células induce la interrupción del crecimiento, desencadena la apoptosis e invierte el fenotipo transformado (Kami et al. (1999) *Oncogene* 18(33): 4654-4662). Se sabe que la actividad de Src anormalmente elevada permite que las células transformadas crezcan de un modo dependiente del anclaje. Aparentemente, esto está provocado por el hecho de que la señalización de la matriz extracelular eleva la actividad de Src en la ruta FAK/Src, de un modo coordinado con la señalización mitogénica, y de ese modo bloquea un mecanismo apoptótico que normalmente se habría activado. Por consiguiente, la inhibición de FAK/Src en células tumorales puede inducir la apoptosis debido a que se induciría el mecanismo apoptótico que normalmente se habría activado al liberarse de la matriz extracelular (Hisano, et al., *Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res.* 38:A1925 (1997)). Adicionalmente, se apreció la expresión reducida de mRNA de VEGF durante la inhibición de Src y los tumores derivados de estas líneas celulares inhibidas en Src mostraron un desarrollo angiogénico reducido (Ellis et al., *Journal of Biological Chemistry* 273 (2):1052-1057 (1998)).

Por ejemplo, una desactivación del gen Src en ratones condujo a un solo defecto, a saber los osteoclastos no formaban bordes en cepillo y por consiguiente no reabsorbían hueso. Sin embargo, la función de resorción ósea osteoclastica se rescató en estos ratones al insertar un gen Src defectuoso en cinasa (Schwartzberg et al., (1997) *Genes & Development* 11: 2835-2844). Esto sugería que la actividad de la cinasa Src se puede inhibir in vivo sin desencadenar la única toxicidad conocida debido a que la presencia de la proteína de Src es aparentemente suficiente para incorporar y activar otras PTK (que son esenciales para mantener la función de los osteoclastos) en un complejo de señalización esencial de los osteoclastos.

Se ha propuesto que la Src es una diana "universal" para la terapia del cáncer ya que se ha encontrado que está sobreactivada en un número creciente de tumores humanos (Levitzki, *Current Opinion in Cell Biology*, 8, 239-244 (1996); Levitzki, *Anti-Cancer Drug Design*, 11, 175-182 (1996)). Los beneficios potenciales de la inhibición de Src para la terapia del cáncer parecen ser la cuádruple inhibición del crecimiento celular descontrolado provocado por los efectos de bucle del factor de crecimiento autocrino, la inhibición de la metástasis debida al desencadenamiento de la apoptosis al liberarse de la matriz celular, la inhibición de la angiogénesis tumoral a través de niveles de VEGF reducidos y la baja toxicidad.

Se ha presentado que las células de cáncer de próstata tienen una sobreexpresión tanto de paxilina como de p130cas y están hiperfosforiladas (Tremblay et al., *Int. J. Cancer*, 68, 164-171, 1996) y así pueden ser una diana fundamental para los inhibidores de Src.

Así, la divulgación se refiere a compuestos y métodos para usar los compuestos para tratar trastornos de proliferación celular.

Los compuestos preparados mediante los métodos de la invención y la divulgación son útiles como agentes farmacéuticos, por ejemplo, como agentes terapéuticos para tratar seres humanos y animales. Los compuestos se pueden usar sin limitación, por ejemplo, como agentes anticancerosos, antiangiogénicos, antimetastásicos, antimicrobianos, antibacterianos, antifúngicos, antiparasitarios y/o antivirales. Los compuestos se pueden usar para otros trastornos relacionados con la proliferación celular tales como psoriasis.

Según se describe en la presente memoria, un compuesto de la divulgación se puede usar para proteger contra o prevenir la pérdida de audición en un individuo. A fin de proteger contra la pérdida de audición, el compuesto se puede administrar antes de la exposición a ruido o la exposición a un fármaco que induce la pérdida de audición. Tales fármacos pueden incluir fármacos quimioterapéuticos (p. ej., fármacos basados en platino que tienen como diana tricoleucocitos) y antibióticos aminoglicosídicos. Un compuesto de la divulgación puede proporcionar un efecto sinérgico con ciertos fármacos para el cáncer. Por ejemplo, se pueden rastrear inhibidores prometedores en ensayos tisulares de tumores humanos primarios, particularmente para buscar sinergia con otros fármacos antineoplásicos conocidos. Además, los inhibidores de proteína cinasas pueden reducir la toxicidad de ciertos fármacos para el cáncer (p. ej., fármacos basados en platino que son tóxicos para la cóclea y el riñón), permitiendo así un incremento de la dosificación.

Alternativamente, un compuesto de la divulgación se puede usar para tratar la pérdida de audición en un individuo. El compuesto se puede administrar al individuo después del inicio de la pérdida de audición para reducir el nivel de pérdida de audición. Un compuesto de la divulgación puede estar implicado en la modulación de una cascada de cinasa, p. ej. un inhibidor de cinasa, un inhibidor no competitivo con ATP, un inhibidor de tirosina cinasa, un inhibidor de Src o un modulador de cinasa de adherencia focal (FAK). Aunque sin querer limitarse por una teoría, se cree que la administración de inhibidores de cinasa evita la apoptosis de tricoleucocitos cocleares, evitando de ese modo la pérdida de audición. Un compuesto de la divulgación se puede administrar a un individuo que sufra pérdida de audición a fin de evitar una pérdida de audición adicional, o para restaurar la audición perdida. En particular, después de la exposición a ruido, las estrechas uniones celulares entre las tricoleucocitos cocleares, así como la interacción de la matriz celular-extracelular, se rompen y se tensionan. La tensión de estas estrechas uniones celulares inicia la apoptosis en las células a través de una ruta de señalización compleja en la que las tirosina cinasas actúan como conmutadores moleculares, interactuando con cinasa de adherencia focal para transducir señales de ruptura célula-matriz al núcleo. Se cree que la administración de inhibidores de cinasa evita el inicio de la apoptosis en esta cascada.

La identificación de la apoptosis en la cóclea expuesta a ruido ha generado un número de nuevas posibilidades para la prevención de la pérdida de audición inducida por ruido (NIHL, por sus siglas en inglés) (Hu, et al.; 2000, *Acta Otolaryngol.*, 120, 19-24). Por ejemplo, el oído se puede proteger de la NIHL mediante la administración de fármacos antioxidantes a la ventana redonda del oído (Hight, et al.; 2003, *Hear. Res.*, 179, 21-32; Hu, et al.; *Hear. Res.* 113, 198-206). Específicamente, la NIHL se ha reducido mediante la administración de compuestos antioxidantes aprobados por la FDA (N-L-acetilcisteína (L-NAC) y salicilato) en la chinchilla (Kopke, et al.; 2000, *Hear. Res.*, 149, 138-146). Por otra parte, Harris et al. han descrito recientemente la prevención de NIHL con inhibidores de Src-PTK (Harris, et al.; 2005, *Hear. Res.*, 208, 14-25). Así, se establece como hipótesis que la administración de un compuesto de la divulgación que modula la actividad de cinasas es útil para tratar la pérdida de audición.

Los cambios en la ligazón celular o la tensión celular pueden activar una variedad de señales a través de la activación de integrinas y a través de la fosforilación de PTK, incluyendo la familia Src de tirosina cinasas. Las interacciones de Src se han relacionado con rutas de señalización que modifican el citoesqueleto y activan una variedad de cascadas de proteína cinasa que regulan la supervivencia celular y la transcripción génica (revisado en Giancotti y Ruoslahti; 1999, *Science*, 285, 1028-1032). De hecho, resultados recientes han indicado que los tricoleucocitos externos (OHC, por sus siglas en inglés), que se han separado en la base celular después de una exposición a ruido intenso, sufrían muerte celular apoptótica. Específicamente, se cree que la cascada de señalización de la PTK Src está implicada en la iniciación inducida tanto metabólica como mecánicamente de la apoptosis en células sensoriales de la cóclea. En un estudio reciente, los inhibidores de Src proporcionaban protección de un ruido de banda de octava de 4 Hz de 4 horas a 106 dB, indicando que las PTK Src podrían ser

activadas en tricoleucocitos externos después de la exposición a ruido (Harris, et al.; 2005, *Hear. Res.*, 208, 14-25). Así, los compuestos de la divulgación que modulan la actividad de Src son útiles para tratar la pérdida de audición.

La divulgación se refiere a un método para proteger contra o tratar la osteoporosis en un individuo. Este método implica administrar una cantidad eficaz de un compuesto de la divulgación al individuo para proteger contra o para tratar la osteoporosis. A fin de proteger contra la osteoporosis, el compuesto se puede administrar antes del desarrollo de la osteoporosis. Alternativamente, el compuesto se puede usar para tratar la osteoporosis en un individuo. El compuesto se puede administrar al individuo después del inicio de la osteoporosis para reducir el nivel de osteoporosis.

Un compuesto de la divulgación puede ser, p. ej., un inhibidor no competitivo con ATP. El compuesto de la divulgación puede modular una cascada de señalización de cinasa, dependiendo de las cadenas laterales particulares y las modificaciones del andamiaje seleccionadas. El compuesto de la divulgación puede ser un inhibidor de cinasa. Por ejemplo, el compuesto puede ser un inhibidor de proteína tirosina cinasa (PTK). La tirosina cinasa rica en prolina (PYK2; también conocida como cinasa de adherencia celular β , tirosina cinasa relacionada con la adherencia focal o tirosina cinasa dependiente del calcio) y la cinasa de adherencia focal (FAK) son miembros de una familia distinta de proteína tirosina cinasas no receptoras que son reguladas por una variedad de estímulos extracelulares (Avraham, et al.; 2000, *Cell Signal.*, 12, 123-133; Schlaepfer, et al.; 1999, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 71, 435-478). El compuesto de la divulgación puede ser un inhibidor de Src. Se ha mostrado que la deficiencia de Src está asociada con la osteoporosis en ratones, debido a la pérdida de la función de los osteoclastos (Soriano, et al.; 1991, *Cell*, 64, 693-702). Alternativamente, el compuesto puede modular la expresión de cinasa M asociada con receptor de interleucina-1 (IRAK-M, por sus siglas en inglés). Los ratones que carecen de IRAK-M desarrollan osteoporosis grave, que está asociada con la diferenciación acelerada de osteoclastos, un incremento en la semivida de los osteoclastos, y su activación (Hongmei, et al.; 2005, *J. Exp. Med.*, 201, 1169-1177).

Se originan osteoclastos multinucleados a partir de la fusión de fagocitos mononucleares y representan un papel importante en el desarrollo y la remodelación ósea a través de la resorción ósea. Los osteoclastos son células terminalmente diferenciadas multinucleadas que degradan la matriz mineralizada. En tejido óseo normal, hay un equilibrio entre la formación ósea por los osteoblastos y la resorción ósea por los osteoclastos. Cuando el equilibrio de este proceso dinámico y altamente regulado se rompe, la resorción ósea puede superar la formación ósea dando como resultado una pérdida ósea cuantitativa. Debido a que los osteoclastos son esenciales para el desarrollo y la remodelación de hueso, los incrementos en su número y/o actividad conducen a enfermedades que están asociadas con una pérdida ósea generalizada (p. ej., osteoporosis) o otras con pérdida ósea localizada (p. ej., artritis reumatoide, enfermedad periodontal).

Los osteoclastos y los osteoblastos dirigen una multitud de rutas de señalización celular que implican proteína cinasas. La activación de los osteoclastos se inicia mediante la adherencia a hueso, la redistribución citoesquelética, la formación de la zona de sellado y la formación de la membrana en cepillo polarizada. Se cree que la proteína tirosina cinasa 2 (PYK2) participa en la transferencia de señales desde la superficie celular hasta el citoesqueleto, ya que está fosforilada en la tirosina y activada por la señalización iniciada por adherencia en los osteoclastos (Duong, et al.; 1998, *J. Clin. Invest.*, 102, 881-892). Una evidencia reciente ha indicado que la reducción de los niveles de proteína de PYK2 da como resultado la inhibición de la formación de osteoclastos y la resorción ósea in vitro (Duong, et al.; 2001, *J. Bio. Chem.*, 276, 7484-7492). Por lo tanto, la inhibición de PYK2 u otras proteína tirosina cinasas podrían reducir el nivel de osteoporosis al disminuir la formación de osteoclastos y la resorción ósea. Así, sin querer limitarse por una teoría, se establece como hipótesis que la administración de un compuesto de la divulgación modulará la actividad de cinasas (p. ej. PTK) y por lo tanto dará como resultado la inhibición de la formación de osteoclastos y/o la resorción ósea, tratando de ese modo la osteoporosis.

La tirosina cinasa Src destaca como una diana terapéutica prometedoras para la enfermedad ósea según se valida por estudios en ratones desactivados para Src y experimentos celulares in vitro, sugiriendo un papel regulador para la Src tanto en osteoclastos (positivo) como en osteoblastos (negativo). En los osteoclastos, la Src representa papeles clave en la movilidad, la polarización, la supervivencia, la activación (formación de bordes en cepillo) y la adherencia, al mediar en diversas rutas de transducción de señales, especialmente en la señalización de citocinas e integrinas (Parang y Sun; 2005, *Expert Opin. Ther. Patents*, 15, 1183-1207). Por otra parte, la perturbación elegida como diana del gen *src* en ratones induce la osteopetrosis, un trastorno caracterizado por una disminución de la resorción ósea, sin mostrar ningunas anomalías morfológicas o funcionales obvias en otros tejidos o células (Soriano, et al.; 1991, *Cell*, 64, 693-702). El fenotipo osteopetrótico de ratones *src*^{-/-} es autónomo celularmente y resulta de defectos en los osteoclastos maduros, que normalmente expresan altos niveles de proteína de Src (Horne, et al.; 1991, *Cell*, 119, 1003-1013). Al limitar la eficacia de tirosina cinasa Src, que desencadena la actividad de los osteoclastos e inhibe los osteoblastos, se cree que los inhibidores de Src reducen la rotura de huesos y fomentan la formación ósea. Debido a que los osteoclastos normalmente expresan altos niveles de Src, la inhibición de la actividad de cinasa Src podría ser útil en el tratamiento de la osteoporosis (Missbach, et al.; 1999, *Bone*, 24, 437-449). Así, los inhibidores de PTK de la divulgación que modulan la actividad de Src son útiles para tratar la osteoporosis.

Según se describe en la presente memoria, un compuesto de la divulgación se puede usar para proteger contra o prevenir la obesidad en un individuo. A fin de proteger contra la obesidad, el compuesto se puede administrar antes

del desarrollo de la obesidad en un individuo. Alternativamente, el compuesto se puede usar para tratar la obesidad en un individuo. Un compuesto de la divulgación puede estar implicado en la modulación de una cascada de señalización de cinasa, p. ej., un inhibidor de cinasa, un inhibidor no competitivo con ATP, un inhibidor de tirosina cinasa, un inhibidor de proteína tirosina fosfatasa o un inhibidor de proteína tirosina fosfatasa 1B.

5 La obesidad está asociada con la diabetes y el incremento de la resistencia a insulina en tejidos sensibles a insulina, tales como el músculo esquelético, el hígado y el tejido adiposo blanco (Klaman, et al.; 2000, *Mol. Cell. Biol.*, 20, 5479-5489). La insulina representa un papel crítico en la regulación de la homeostasis de glucosa, el metabolismo lipídico y el balance energético. La señalización de insulina se inicia mediante la unión de insulina al receptor de insulina (IR, por sus siglas en inglés), una tirosina cinasa receptora. La unión de insulina provoca una cascada de episodios de fosforilación, comenzando con la autofosforilación del IR sobre múltiples residuos de tirosilo. La autofosforilación potencia la actividad de la cinasa IR y desencadena episodios de señalización aguas abajo. Los efectos estimulantes de las proteína tirosina cinasas y los efectos inhibidores de proteína tirosina fosfatasa definen en gran parte la acción de la insulina. La señalización apropiada de insulina minimiza fluctuaciones grandes en las concentraciones de glucosa en sangre y asegura un aporte adecuado de glucosa a las células. Puesto que la estimulación de insulina conduce a múltiples episodios de fosforilación de tirosilo, la actividad potenciada de una o más proteína tirosina fosfatasa (PTP, por sus siglas en inglés) podría conducir a resistencia a insulina, que puede conducir a obesidad. En efecto, el incremento de la actividad de PTP se ha presentado en varios estados resistentes a insulina, incluyendo la obesidad (Ahmad, et al.; 1997, *Metabolism*, 46, 1140-1145). Así, sin querer limitarse por una teoría, la administración de un compuesto de la divulgación modula la actividad de cinasas (p. ej., PTP), tratando de ese modo la obesidad en un individuo.

La señalización de insulina comienza con la activación del IR a través de la fosforilación de tirosina y culmina en la absorción de glucosa en las células por el transportador de glucosa, GLUT4 (Saltiel y Kahn; 2001, *Nature*, 414, 799-806). A continuación, el IR activado se debe desactivar y devolver al estado basal, un proceso que se cree que implica la proteína tirosina fosfatasa-1B (PTP-1B) (Ahmad, et al.; 1997, *J. Biol. Chem.*, 270, 20503-20508). La perturbación del gen que codifica PTP-1B en ratones da como resultado sensibilidad a insulina y un incremento de la resistencia a obesidad inducida por la dieta (Elchebly, et al.; 1999, *Science*, 283, 1544-1548; Klaman, et al.; 2000, *Mol. Cell. Biol.*, 20, 5479-5489). La disminución de la adiposidad en ratones deficientes en PTP-1B se debía a una notable reducción en la masa de células grasas sin una disminución en el número de adipocitos (Klaman, et al.; 2000, *Mol. Cell. Biol.*, 20, 5479-5489). Por otra parte, la magreza en ratones deficientes en PTP-1B estaba acompañada por un incremento en la tasa metabólica basal y el gasto energético total, sin una alteración notable de la expresión de mRNA de proteínas de desacoplamiento. La perturbación del gen de PTP-1B demostró que alterar la actividad de PTP-1B puede modular la señalización de insulina y la obesidad inducida por la dieta in vivo. Así, sin querer limitarse por una teoría, la administración de un compuesto de la divulgación que modula la señalización de insulina (p. ej., la actividad de PTP-1B) es útil para tratar la obesidad en un individuo.

35 Según se describe en la presente memoria, un compuesto de la divulgación se puede usar para proteger contra o prevenir la diabetes en un individuo. A fin de proteger contra la diabetes, el compuesto se puede administrar antes del desarrollo de la diabetes en un individuo. Alternativamente, el compuesto se puede usar para tratar la diabetes en un individuo. El compuesto de la divulgación puede estar implicado en la modulación de una cascada de señalización de cinasa, p. ej. un inhibidor de cinasa, un inhibidor no competitivo con ATP, un inhibidor de tirosina cinasa, un inhibidor de fosfatasa y homólogo de tensina en el cromosoma 10 (PTEN, por sus siglas en inglés) o un inhibidor de inositol 5'-fosfatasa 2 que contiene homología de secuencia 2 (SHIP2, por sus siglas en inglés).

La diabetes mellitus tipo 2 (T2DM, por sus siglas en inglés) es un trastorno del metabolismo energético desregulado. El metabolismo energético está controlado en gran parte por la hormona insulina, un potente agente anabólico que promueve la síntesis y el almacenamiento de proteínas, carbohidratos y lípidos, e inhibe su descomposición y liberación de nuevo a la circulación. La acción de la insulina se inicia mediante la unión a su receptor de tirosina cinasa, lo que da como resultado la autofosforilación y el incremento de la actividad catalítica de la cinasa (Patti, et al.; 1998, *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 9, 89-109). La fosforilación de tirosina hace que las proteína del sustrato receptor de insulina (IRS, por sus siglas en inglés) interactúen con la subunidad reguladora p85 de fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), conduciendo a la activación de la enzima y su elección como diana para una localización subcelular específica, dependiendo del tipo de célula. La enzima genera el producto lipídico 3,4,5-trisfosfato de fosfatidilinositol (PtdIns(3,4,5)P₃), que regula la localización y la actividad de numerosas proteínas (Kido, et al.; 2001, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86, 972-979). La PI3K tiene un papel esencial en la absorción y el almacenamiento de glucosa estimulados por insulina, la inhibición de la lipólisis y la regulación de la expresión de genes hepáticos (Saltiel, et al.; 2001, *Nature*, 414, 799-806). La sobreexpresión de formas dominantes-interferentes de PI3K puede bloquear la absorción de glucosa y la translocación del transportador de glutamato cuatro, GLUT4, a la membrana plasmática (Quon, et al.; 1995, *Mol. Cell. Biol.*, 15, 5403-5411). Así, la administración de un compuesto de la divulgación que modula la actividad de una cinasa (p. ej. PI3K), y por lo tanto da como resultado un incremento de la absorción de glucosa, es útil para tratar la diabetes.

PTEN es un importante regulador de la señalización de PI3K en muchos tipos de células, y funciona como un supresor de tumores debido al antagonismo de las actividades antiapoptótica, proliferativa e hipertrófica de la ruta de PI3K (Goberdhan, et al.; 2003, *Hum. Mol. Genet.*, 12, R239-R248; Leslie, et al.; 2004, *J. Biochem.*, 382, 1-11). Aunque sin querer limitarse por una teoría, se cree que PTEN atenúa la ruta de PI3K mediante desfosforilación de la

molécula de PtdIns(3,4,5)P₃, degradando este importante segundo mensajero lipídico hasta PtdIns(4,5)P₂. En un estudio reciente, la reducción de la proteína de PTEN endógena en 50% usando RNA interferente pequeño (siRNA) potenciaba los incrementos dependientes de insulina en los niveles de PtdIns(3,4,5)P₃, y la absorción de glucosa (Tang, et al.; 2005, J. Biol. Chem., 280, 22523-22529). Así, sin querer limitarse por una teoría, se establece como hipótesis que la administración de un compuesto de la divulgación que modula la actividad de PTEN, y por lo tanto da como resultado un incremento en la absorción de glucosa, es útil para tratar la diabetes.

Los niveles de PtdIns(3,4,5)P₃ también son controlados por la familia de proteínas de inositol 5'-fosfatasa que contiene homología de SRC 2 (SH2) (SHIP), SHIP1 y SHIP2 (Lazar and Saltiel; 2006, Nature Reviews, 5, 333-342). SHIP2, expresada en músculo esquelético, entre otros tejidos sensibles a insulina, cataliza la conversión de PtdIns(3,4,5)P₃ en PtdIns(3,4)P₂ (Pesesse, et al.; 1997; Biochem Biophys. Res. Commun., 239, 697-700; Backers, et al.; 2003, Adv. Enzyme Regul., 43, 15-28; Chi, et al.; 2004, J. Biol. Chem., 279, 44987-44995; Sleeman, et al.; 2005, Nature Med., 11, 199-205). La sobreexpresión de SHIP2 reducía notablemente los niveles de PtdIns(3,4,5)P₃ estimulados por insulina, de acuerdo con la capacidad propuesta de la SHIP2 para atenuar la activación de efectores aguas abajo de PI3K (Ishihara, et al.; 1999, Biochem. Biophys. Res. Commun., 260, 265-272). Así, sin querer limitarse por una teoría, se establece como hipótesis que la administración de un compuesto de la divulgación que modula la actividad de SHIP2, y por lo tanto da como resultado un incremento en la absorción de glucosa, es útil para tratar la diabetes.

Según se describe en la presente memoria, un compuesto de la divulgación se puede usar para proteger contra o prevenir una enfermedad ocular en un individuo. A fin de proteger contra la enfermedad ocular, el compuesto se puede administrar antes del desarrollo de la enfermedad ocular en un individuo. Alternativamente, el compuesto se puede usar para tratar una enfermedad ocular en un individuo, p. ej. degeneración macular, retinopatía y edema macular. El compuesto de la divulgación puede estar implicado en la modulación de una cascada de cinasa, p. ej. un inhibidor de cinasa, un inhibidor no competitivo con ATP, un inhibidor de tirosina cinasa, p. ej. un inhibidor de tirosina cinasa receptora de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés).

Se puede producir una neovascularización que amenaza la visión de la córnea fisiológicamente avascular. Las retinopatías proliferativas, principalmente la retinopatía diabética y la degeneración macular asociada a la edad, se caracterizan por un incremento en la permeabilidad vascular, que conduce a edema retinal y acumulación de fluido subretinal, y a la proliferación de nuevos vasos que son propensos a hemorragia. La angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de capilares preexistentes, en una parte integral tanto del desarrollo normal como de numerosos procesos patológicos. El VEGF, un mediador fundamental de la compleja cascada de angiogénesis y un potente factor de permeabilidad, es una diana atractiva para nuevos tratamientos. El VEGF es el ligando para dos receptores de tirosina cinasa unidos a la membrana, VEGFR-1 y VEGFR-2. La unión al ligando desencadena la dimerización y la transfosforilación de VEGFR con la posterior activación de un dominio de tirosina cinasa intracelular. El consiguiente eje de señalización intracelular da como resultado proliferación, migración y supervivencia de células endoteliales vasculares. Así, sin querer limitarse por una teoría, se establece como hipótesis que la administración de un compuesto de la divulgación que modula una actividad de cinasa, p. ej. actividad de tirosina cinasa, y da como resultado la inhibición de la angiogénesis y/o neovascularización, es útil para tratar una enfermedad ocular, p. ej. degeneración macular, retinopatía y/o edema macular.

La degeneración macular se caracteriza por fuga retinal (un incremento en la permeabilidad vascular) mediada por VEGF y por el crecimiento anormal de pequeños vasos sanguíneos en la parte posterior del ojo (angiogénesis). El VEGF se ha identificado en membranas neovasculares tanto en la retinopatía diabética como en la degeneración macular asociada a la edad, y los niveles intraoculares del factor se correlacionan con la gravedad de la neovascularización en la retinopatía diabética (Kvanta, et al.; 1996, Invest. Ophthal. Vis. Sci., 37, 1929-1934.; Aiello et al., 1994, N. Engl. J. Med., 331, 1480-1487). El antagonismo terapéutico de VEGF en estos modelos da como resultado una inhibición significativa de la neovascularización tanto retinal como coroidal, así como una reducción en la permeabilidad vascular (Aiello, et al.; 1995, Proe. Natl. Acad. Sci. USA., 92, 10457-10461; Krzystolik, et al.; 2002, Arch. Ophthal., 120, 338-346; Qaum, et al.; 2001, Invest. Ophthal. Vis. Sci., 42, 2408-2413). Así, sin querer limitarse por una teoría, se establece como hipótesis que la administración de un compuesto de la divulgación que modula la actividad de VEGF, y da como resultado la inhibición de la angiogénesis y/o la neovascularización, es útil para tratar una enfermedad ocular, p. ej. degeneración macular, retinopatía y/o edema macular.

Los compuestos de la divulgación se usan en métodos para tratar, prevenir o mejorar una apoplejía en un individuo que tiene riesgo de sufrir una apoplejía, está sufriendo una apoplejía o ha sufrido una apoplejía. Los compuestos de la divulgación son útiles en métodos para tratar a pacientes que se están sometiendo a rehabilitación posapoplética.

Una apoplejía, también conocida como un accidente cerebrovascular (CVA, por sus siglas en inglés), es una lesión neurológica aguda por la que se interrumpe el suministro de sangre a una parte del cerebro debido bien al bloqueo de una arteria o bien a la rotura de un vaso sanguíneo. La parte del cerebro en la que se interrumpe el suministro de sangre ya no recibe oxígeno y/o nutrientes transportados por la sangre. Las células cerebrales se dañan o se vuelven necróticas, deteriorando de ese modo la función en o desde esa parte del cerebro. El tejido cerebral deja de funcionar si se priva de oxígeno durante más de 60 a 90 segundos y después de unos pocos minutos sufrirá una lesión irreversible conduciendo posiblemente a una muerte del tejido, es decir, infarto.

Las apoplejías se clasifican en dos tipos principales: isquémica, es decir, bloqueo de un vaso sanguíneo que alimenta el cerebro, y hemorrágica, es decir, sangrado en o alrededor del cerebro. La mayoría de todas las apoplejías son apoplejías isquémicas. La apoplejía isquémica se divide comúnmente en apoplejía trombótica, apoplejía embólica, hipoperfusión sistémica (apoplejía de Watershed) o trombosis venosa. En la apoplejía trombótica, se desarrolla un proceso de formación de trombo en la arteria afectada, el trombo, es decir, el coágulo de sangre, estrecha gradualmente la luz de la arteria, impidiendo de ese modo el flujo de sangre a tejido distal. Habitualmente, estos coágulos se forman alrededor de placas ateroscleróticas. Hay dos tipos de apoplejías trombóticas, que se clasifican basándose en el tipo de vaso sobre el que se forma el trombo. La apoplejía trombótica de vasos grandes implica las carótidas común e interna, vertebral, y el círculo de Willis. La apoplejía trombótica de vasos pequeños implica las arterias intracerebrales, las ramas del círculo de Willis, el tronco arterial cerebral medio y las arterias que surgen de la arteria vertebral y basilar distal.

Un trombo, aunque no sea oclusivo, puede conducir a una apoplejía embólica si el trombo se rompe, punto en el que se convierte en un émbolo. Un émbolo se refiere a una partícula o residuo móvil en la corriente sanguínea arterial que se origina en cualquier parte. La apoplejía embólica se refiere al bloqueo del acceso arterial a una parte del cerebro por un émbolo. Un émbolo es frecuentemente un coágulo de sangre, pero también puede ser una placa que se ha roto de un vaso sanguíneo aterosclerótico o un número de otras sustancias incluyendo grasa, aire e incluso células cancerosas. Debido a que un émbolo surge de cualquier parte, una terapia local solo soluciona el problema temporalmente. Así, se debe identificar la fuente del émbolo. Hay cuatro categorías de apoplejía embólica: aquellas con una fuente cardíaca conocida; aquellas con una fuente cardíaca o aórtica potencial (procedentes de un ecocardiograma transtorácico o transesofágico); aquellas con una fuente arterial; y aquellas con una fuente desconocida.

La hipoperfusión sistémica es la reducción del flujo sanguíneo a todas las partes del cuerpo. Comúnmente, se debe a un fallo de la bomba cardíaca procedente de paro cardíaco o arritmias, o procedente de una reducción del gasto cardíaco como resultado de infarto de miocardio, embolismo pulmonar, efusión pericárdica o sangrado. La hipoxemia (es decir, bajo contenido de oxígeno en sangre) puede precipitar la hipoperfusión. Debido a que la reducción en el flujo sanguíneo es global, todas las partes del cerebro se pueden ver afectadas, especialmente las áreas "de captación" que son regiones de zonas fronterizas alimentadas por las arterias cerebrales principales. El flujo sanguíneo a estas áreas no se ha detenido necesariamente, pero en cambio se puede haber reducido hasta el punto de que se produzca daño cerebral.

Las venas del cerebro funcionan para drenar la sangre de vuelta al cuerpo. Cuando las venas están ocluidas debido a trombosis, el drenaje de sangre se bloquea y la sangre retrocede hacia arriba, provocando así un edema cerebral. Este edema cerebral puede dar como resultado apoplejías tanto isquémicas como hemorrágicas. Comúnmente, esto se produce en la enfermedad rara trombosis venosa sinusal.

La apoplejía se diagnostica en un individuo o paciente usando una o más de una variedad de técnicas conocidas en la especialidad, tales como, por ejemplo, examen neurológico, pruebas sanguíneas, ecografías de CT (sin mejoras por contraste), ecografías de MRI, ecografía Doppler y arteriografía (es decir, roentgenografía de las arterias después de la inyección de material radioopaco en la corriente sanguínea). Si se confirma una apoplejía con el diagnóstico por imagen, se realizan otros diversos estudios para determinar si hay una fuente periférica de émbolos. Estos estudios incluyen, p. ej., un estudio de ultrasonidos/Doppler de las arterias carótidas (para detectar estenosis de la carótida); un electrocardiograma (ECG) y un ecocardiograma (para identificar arritmias y coágulos resultantes en el corazón que se pueden extender hasta los vasos cerebrales a través de la corriente sanguínea); un estudio Holter para identificar arritmias intermitentes y un angiograma de la vasculatura cerebral (si se piensa que se ha originado de un aneurisma o malformación arteriovenosa).

Los compuestos útiles en estos métodos para tratar, prevenir o mejorar la apoplejía o un síntoma asociado con la apoplejía son compuestos que modulan una cascada de señalización de cinasa antes, durante o después de una apoplejía. En algunas realizaciones, el compuesto es un inhibidor de cinasa. Por ejemplo, el compuesto es un inhibidor de tirosina cinasa. En una realización, el inhibidor de tirosina cinasa es un inhibidor de Src. Por ejemplo, el compuesto usado en los métodos para tratar, prevenir o mejorar la apoplejía o un síntoma asociado con la apoplejía descrito en la presente memoria es un inhibidor alostérico de una cascada de señalización de cinasa antes, durante o después de una apoplejía. Preferiblemente, el compuesto usado en los métodos para tratar, prevenir o mejorar una apoplejía o un síntoma asociado con la apoplejía descrito en la presente memoria es un inhibidor no competitivo con ATP de una cascada de señalización de cinasa antes, durante o después de una apoplejía.

Se ha observado que la inhibición de la actividad de Src proporciona protección cerebral durante la apoplejía. (Véase Paul et al., *Nature Medicine*, vol. 7(2):222-227 (2001). Se ha observado que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que se produce en respuesta a la lesión isquémica, promueve la permeabilidad vascular. Los estudios han mostrado que la cinasa Src regula la VP mediada por VEGF en el cerebro después de una apoplejía, y que la administración de un inhibidor de Src antes o después de la apoplejía reducía el edema, mejoraba la perfusión cerebral y disminuía el volumen de infarto después de que se produjera una lesión. (Paul et al., 2001). Así, la inhibición de Src se puede usar en la prevención, el tratamiento o la mejora de un daño secundario después de una apoplejía.

Los compuestos de la divulgación previenen, tratan o mejoran la apoplejía o un síntoma asociado con la apoplejía. Síntomas de una apoplejía incluyen entumecimiento o debilidad repentinos, especialmente en un lado del cuerpo; confusión o dificultad para hablar o entender el lenguaje repentinas; dificultad de visión repentina en uno o ambos ojos; dificultad repentina para caminar, mareos o pérdida de equilibrio o coordinación; o cefalea intensa repentina sin causa conocida.

Generalmente, hay tres fases de tratamiento para la apoplejía: prevención, terapia inmediatamente después de la apoplejía y rehabilitación posapoplética. Las terapias para prevenir una primera apoplejía o una recurrente se basan en tratar los factores de riesgo subyacentes para la apoplejía, tales como, p. ej., hipertensión, colesterol elevado, fibrilación auricular y diabetes. Las terapias para la apoplejía aguda tratan de detener una apoplejía mientras está ocurriendo al disolver rápidamente el coágulo de sangre que provoca una apoplejía isquémica o al detener el sangrado de una apoplejía hemorrágica. La rehabilitación posapoplética ayuda a los individuos a vencer las discapacidades que resultan del daño apoplético. La medicación o la terapia farmacológica es el tratamiento más común para la apoplejía. Las clases más populares de fármacos usadas para prevenir o tratar la apoplejía son los antitrombóticos (p. ej., agentes antiplaquetarios y anticoagulantes) y trombolíticos. Los compuestos se administran a un paciente que tiene riesgo de sufrir una apoplejía, está sufriendo una apoplejía o ha sufrido una apoplejía en un momento antes, durante o después, o cualquiera de sus combinaciones, de la presencia de una apoplejía. Los compuestos de la divulgación se administran solos, en composiciones farmacéuticas, o en combinación con cualquiera de una variedad de tratamientos conocidos, tales como, por ejemplo, una medicación antiplaquetaria (p. ej., aspirina, clopidogrel, dipiridamol), un anticoagulante (p. ej., warfarina) o una medicación trombolítica (p. ej., activador de plasminógeno tisular (t-PA, por sus siglas en inglés), reteplasa, urocinasa, estreptocinasa, tenecteplasa, lanoteplasa o anistreplasa.

Los compuestos de la divulgación se usan en métodos para tratar, prevenir, mejorar la aterosclerosis o un síntoma de la misma en un individuo que tiene riesgo de o sufre aterosclerosis.

La aterosclerosis es una enfermedad que afecta al vaso sanguíneo arterial y se denomina comúnmente un "endurecimiento" de las arterias. Está provocada por la formación de múltiples placas dentro de las arterias. Las placas ateroscleróticas, aunque compensadas por el agrandamiento de la arteria, finalmente conducen a rupturas de placas y estenosis (es decir, estrechamiento) de la arteria, que, a su vez, conduce a un suministro de sangre insuficiente al órgano que alimenta. Alternativamente, si el proceso de agrandamiento de la arteria compensatorio es excesivo, resulta un aneurisma neto. Estas complicaciones son crónicas, lentamente progresivas y acumulativas. Lo más comúnmente, una placa blanda se rompe repentinamente, provocando la formación de un coágulo de sangre (es decir, un trombo) que rápidamente frena o detiene el flujo sanguíneo, lo que, a su vez, conduce a la muerte de los tejidos alimentados por la arteria. Este episodio extremadamente grave se denomina infarto. Por ejemplo, la trombosis coronaria de una arteria coronaria provoca un infarto de miocardio, comúnmente conocido como ataque cardíaco. Un infarto de miocardio se produce cuando una placa aterosclerótica se acumula lentamente en el revestimiento interno de una arteria coronaria y a continuación se rompe repentinamente, ocluyendo totalmente la arteria e impidiendo el flujo sanguíneo aguas abajo.

La aterosclerosis y el infarto de miocardio agudo se diagnostican en un paciente usando cualquiera de una variedad de pruebas clínicas y/o de laboratorio tales como examen físico, examen radiológico o ultrasónico y análisis de sangre. Por ejemplo, un médico o profesional clínico puede escuchar las arterias de un individuo para detectar un ruido sibilante anormal, llamado soplo. Un soplo se puede escuchar mediante un estetoscopio cuando se pone sobre la arteria afectada. Alternativamente, o además, el profesional clínico o el médico puede comprobar anomalías del pulso tales como debilidad o ausencia, p. ej., en la pierna o el pie. El médico o profesional clínico puede realizar un análisis de sangre para comprobar los niveles de colesterol o para comprobar los niveles de enzimas cardíacas, tales como creatina cinasa, troponina y lactato deshidrogenasa, para detectar anomalías. Por ejemplo, las subunidades de troponina I o T, que son muy específicas para el miocardio, aumentan antes de que se desarrolle una lesión permanente. Una troponina positiva en el entorno de un dolor torácico puede predecir con precisión una alta probabilidad de un infarto de miocardio en el futuro próximo. Otras pruebas para diagnosticar la aterosclerosis y/o el infarto de miocardio incluyen, por ejemplo, EKG (electrocardiograma) para medir el ritmo y la regularidad del latido cardíaco de un individuo; rayos X del tórax, que miden el índice maleolar/braquial, que compara la presión sanguínea en el tobillo con la presión sanguínea en el brazo; análisis ultrasónico de las arterias; ecografía de CT de áreas de interés; angiografía; una prueba de esfuerzo, ecografía cardíaca nuclear; y diagnóstico por imagen de resonancia magnética (MRI, por sus siglas en inglés) y ecografía cardíaca por tomografía de emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés).

Los compuestos útiles en estos métodos para tratar, prevenir o mejorar la aterosclerosis o un síntoma de la misma son compuestos que modulan una cascada de señalización de cinasa en un paciente con riesgo de o que sufre aterosclerosis. En algunas realizaciones, el compuesto es un inhibidor de cinasa. Por ejemplo, el compuesto es un inhibidor de tirosina cinasa. En una realización, el inhibidor de tirosina cinasa es un inhibidor de Src. Preferiblemente, el compuesto usado en los métodos para tratar, prevenir o mejorar la aterosclerosis o un síntoma de la misma descrito en la presente memoria es un inhibidor alostérico de una cascada de señalización de cinasa implicada en la aterosclerosis. Preferiblemente, el compuesto usado en los métodos para tratar, prevenir o mejorar la aterosclerosis o un síntoma asociado con la aterosclerosis descrito en la presente memoria es un inhibidor no competitivo con ATP de una cascada de señalización de cinasa implicada en la aterosclerosis.

Se cree que la transducción de señales celulares por Src representa un papel clave en el incremento de la permeabilidad de los vasos, conocida como permeabilidad vascular (VP, por sus siglas en inglés). Se ha observado que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que se produce en respuesta a la lesión isquémica, incluyendo, p. ej., infarto de miocardio, promueve la permeabilidad vascular. Los estudios han mostrado que la inhibición de la cinasa Src disminuye la VP mediada por VEGF. (Véase Parang y Sun, Expert Opin. Ther. Patents, vol. 15(9): 1183-1206 (2005). Ratonos tratados con un inhibidor de Src demostraban un daño tisular reducido asociado con trauma o lesión de los vasos sanguíneos después de un infarto de miocardio, en comparación con ratones no tratados. (Véanse p. ej., las Publicaciones de Patente de EE. UU. N° 20040214836 and y 20030130209 de Cheresch et al.). Así, la inhibición de Src puede ser útil en la prevención, el tratamiento o la mejora de daño secundario después de una lesión debida a aterosclerosis, tal como, por ejemplo, infarto de miocardio.

Los compuestos de la divulgación previenen, tratan o mejoran la apoplejía o un síntoma asociado con la aterosclerosis. Generalmente, la aterosclerosis no produce síntomas hasta que estrecha mucho la arteria y restringe el flujo sanguíneo, o hasta que provoca una obstrucción repentina. Los síntomas dependen de dónde se desarrollen las placas y el estrechamiento, p. ej., en el corazón, el cerebro, otros órganos vitales y las piernas o casi en cualquier parte del cuerpo. Los síntomas iniciales de la aterosclerosis pueden ser dolor o calambres cuando el cuerpo requiere más oxígeno, por ejemplo durante el ejercicio, cuando una persona puede sentir dolor torácico (angina) debido a la falta de oxígeno al corazón o calambres en las piernas debido a la falta de oxígeno a las piernas. El estrechamiento de las arterias que suministran sangre al cerebro puede provocar mareos o ataques isquémicos transitorios (TIA, por sus siglas en inglés), donde los síntomas y signos de una apoplejía duran menos de 24 horas. Típicamente, estos síntomas se desarrollan gradualmente.

Los síntomas del infarto de miocardio se caracterizan por grados variables de dolor torácico, malestar, sudoración, debilidad, náuseas, vómitos y arritmias, provocando a veces pérdida de conocimiento. El dolor torácico es el síntoma más común del infarto de miocardio agudo y a menudo se describe como una sensación de opresión, presión o aplastamiento. El dolor puede irradiarse a la mandíbula, el cuello, los brazos, la espalda y el epigastrio, lo más a menudo al brazo izquierdo o el cuello. El dolor torácico está provocado más probablemente por un infarto de miocardio cuando dura más de 30 minutos. Los pacientes que sufren un infarto de miocardio pueden exhibir falta de aliento (disnea) especialmente si la disminución en la contractilidad del miocardio debida al infarto es suficiente para provocar insuficiencia ventricular izquierda con congestión pulmonar o incluso edema pulmonar.

Los compuestos de la divulgación se administran solos, en composiciones farmacéuticas o en combinación con cualquiera de una variedad de tratamientos conocidos para la aterosclerosis, tales como, por ejemplo, fármacos que reducen el colesterol (p. ej., estatinas), medicaciones antiplaquetarias o anticoagulantes.

Los compuestos de la divulgación se usan en métodos para tratar, prevenir, mejorar el dolor neuropático, tal como dolor neuropático crónico, o un síntoma del mismo en un individuo que tiene riesgo de sufrir, está sufriendo o ha sufrido dolor neuropático.

El dolor neuropático, también conocido como neuralgia, es cualitativamente diferente del dolor nociceptivo normal. El dolor neuropático habitualmente se presenta como sensaciones continuas de quemazón y/u "hormigueo" y/o "descarga eléctrica". La diferencia entre el dolor nociceptivo y el dolor neuropático se debe al hecho de que el dolor nociceptivo "normal" estimula solamente los nervios del dolor, mientras que la neuropatía a menudo da como resultado la estimulación de los nervios tanto del dolor como sensoriales no relacionados con el dolor (p. ej., nervios que responden al tacto, el calor, el frío) en la misma área, produciendo de ese modo señales que la médula espinal y el cerebro normalmente no esperan recibir.

El dolor neuropático es un estado de dolor crónico complejo que habitualmente está acompañado por una lesión tisular. Con el dolor neuropático, las propias fibras nerviosas pueden estar dañadas, ser disfuncionales o estar lesionadas. Estas fibras nerviosas dañadas envían señales incorrectas a otros centros del dolor. El impacto de la lesión de las fibras nerviosas incluye un cambio en la función nerviosa tanto en la zona de la lesión como en áreas alrededor de la lesión.

El dolor neuropático se diagnostica en un individuo o paciente usando una o más de una variedad de técnicas de laboratorio y/o clínicas conocidas en la especialidad, tales como, por ejemplo, un examen físico.

Los compuestos útiles en estos métodos para tratar, prevenir o mejorar el dolor neuropático, tal como dolor neuropático crónico, o un síntoma asociado con el dolor neuropático son compuestos que modulan una cascada de señalización de cinasa implicada en el dolor neuropático. En algunas realizaciones, el compuesto es un inhibidor de cinasa. Por ejemplo, el compuesto es un inhibidor de tirosina cinasa. En una realización, el inhibidor de tirosina cinasa es un inhibidor de Src. Preferiblemente, el compuesto usado en los métodos para tratar, prevenir o mejorar el dolor neuropático o un síntoma del mismo es un inhibidor alostérico de una cascada de señalización de cinasa implicada en el dolor neuropático. Preferiblemente, el compuesto usado en los métodos para tratar, prevenir o mejorar el dolor neuropático o un síntoma del mismo es un inhibidor no competitivo con ATP de una cascada de señalización de cinasa implicada en el dolor neuropático.

- Se ha observado que c-Src regula la actividad de receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA). (Véase Yu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 96:7697-7704 (1999). Los estudios han mostrado que PP2, un inhibidor de cinasa Src de bajo peso molecular, disminuye la fosforilación de la subunidad NM2 del receptor de NMDA. (Véase Guo et al., J. Neuro., vol. 22:6208-6217 (2002). Así, la inhibición de Src que, a su vez, inhibe la actividad de receptores de NMDA, puede ser útil en la prevención, el tratamiento o la mejora del dolor neuropático, tal como dolor neuropático crónico.
- Los compuestos de la divulgación previenen, tratan o mejoran el dolor neuropático, tal como dolor neuropático crónico, o un síntoma asociado con el dolor neuropático. Síntomas de dolor neuropático incluyen dolor punzante y ardiente, parestesia y entumecimiento.
- Los compuestos de la divulgación se administran solos, en composiciones farmacéuticas, o en combinación con cualquiera de una variedad de tratamientos conocidos, tales como, por ejemplo, analgésicos, opioides, antidepresivos tricíclicos, anticonvulsivos e inhibidores de la reabsorción de serotonina-norepinefrina.
- Los compuestos de la divulgación se usan en métodos para tratar, prevenir, mejorar la hepatitis B o un síntoma de la misma en un individuo que tiene riesgo de sufrir hepatitis B.
- El virus de la hepatitis B, un miembro de la familia de Hepadnavirus, consiste en una partícula de nucleocápside proteínica que contiene el genoma viral en la forma de DNA de doble hebra con regiones de una sola hebra y una envuelta externa basada en lípidos con proteínas embebidas. Las proteínas de la envuelta están implicadas en la unión viral y la liberación en células sensibles. La cápside interna resitúa el genoma de DNA en el núcleo de la célula donde se transcriben los mRNAs virales. Se forman tres transcritos subgenómicos que codifican las proteínas de la envuelta, junto con un transcrito que codifica la proteína X. Se transcribe un cuarto RNA pregenómico, que se exporta al citosol y traduce la polimerasa viral y las proteínas de la nucleocápside. La polimerasa y el RNA pregenómico están encapsidados en partículas de ensamblaje de la nucleocápside, donde se produce la transcripción inversa del RNA pregenómico en DNA genómico mediante la proteína polimerasa. La partícula de la nucleocápside madura sale entonces de la célula a través de rutas secretoras normales, adquiriendo una envuelta por el camino.
- La hepatitis B es uno de unos pocos virus no retrovirales conocidos que emplean transcripción inversa como parte del proceso de replicación. Otros virus que usan transcripción inversa incluyen, p. ej., HTLV o HIV.
- Durante la infección con HBV, la respuesta inmunitaria del huésped es responsable tanto del daño hepatocelular como de la eliminación viral. Aunque la respuesta inmunitaria innata no representa un papel significativo en estos procesos, la respuesta inmunitaria adaptativa, particularmente linfocitos T citotóxicos (CTL, por sus siglas en inglés) específicos para el virus, contribuye a casi toda la lesión hepática asociada con la infección por HBV. Al destruir las células infectadas y al producir citocinas antivirales capaces de purgar el HBV de hepatocitos viables, los CTL también eliminan el virus. Aunque el daño hepático es iniciado y mediado por los CTL, las células inflamatorias no específicas para el antígeno pueden empeorar la inmunopatología inducida por CTL y las plaquetas pueden facilitar la acumulación de CTL en el hígado.
- La hepatitis B se diagnostica en un paciente usando cualquiera de una variedad de pruebas clínicas y/o de laboratorio tales como examen físico y análisis de sangre y suero. Por ejemplo, se ensaya en sangre o suero la presencia de antígenos virales y/o anticuerpos producidos por el huésped. En una prueba común para la hepatitis B, se usa la detección del antígeno superficial de la hepatitis B (HBsAg, por sus siglas en inglés) para cribar la presencia de infección. Es el primer antígeno viral detectable en aparecer durante la infección con este virus; sin embargo, inicialmente en una infección, este antígeno puede no estar presente y puede ser indetectable posteriormente en la infección ya que está siendo eliminado por el huésped. Durante esta 'ventana' en la que el huésped sigue infectado pero está eliminando satisfactoriamente el virus, los anticuerpos de IgM para el antígeno de la nucleocápside la hepatitis B (anti-HBc IGM) pueden ser la única evidencia serológica de enfermedad.
- Poco después de la aparición del HBsAg, aparecerá otro antígeno llamado antígeno e de la hepatitis B (HBeAg, por sus siglas en inglés). Tradicionalmente, la presencia de HBeAg en un suero de huésped se asocia con velocidades muy superiores de replicación viral; sin embargo, algunas variantes del virus de la hepatitis B no producen el antígeno "e" en absoluto. Durante el transcurso natural de una infección, el HBeAg se puede eliminar, y surgirán inmediatamente después anticuerpos para el antígeno "e" (anti-HBe). Esta conversión se asocia habitualmente con una disminución drástica en la replicación viral. Si el huésped es capaz de eliminar la infección, finalmente el HBsAg se hará indetectable y estará seguido por anticuerpos para el antígeno superficial de la hepatitis B (anti-HBs). Una persona negativa a HBsAg pero positiva a anti-HBs bien ha eliminado una infección o bien ha sido vacunada previamente. Un número de personas que son positivas a HBsAg pueden tener muy poca multiplicación viral, y de ahí que puedan tener poco riesgo de complicaciones a largo plazo o de transmitir la infección a otros.
- Compuestos útiles en estos métodos para tratar, prevenir o mejorar la hepatitis B o un síntoma de la misma son compuestos que modulan una cascada de señalización de cinasa en un paciente con riesgo de o que sufre hepatitis B. En algunas realizaciones, el compuesto es un inhibidor de cinasa. Por ejemplo, el compuesto es un inhibidor de tirosina cinasa. En una realización, el inhibidor de tirosina cinasa es un inhibidor de Src. Preferiblemente, el compuesto usado en los métodos para tratar, prevenir o mejorar la hepatitis B o un síntoma de la misma descrito en

la presente memoria es un inhibidor alostérico de una cascada de señalización de cinasa implicada en la hepatitis B. Preferiblemente, el compuesto usado en los métodos para tratar, prevenir o mejorar la hepatitis B o un síntoma asociado con la hepatitis B descrito en la presente memoria es un inhibidor no competitivo con ATP de una cascada de señalización de cinasa implicada en la hepatitis B.

5 La Src representa un papel en la replicación del virus de la hepatitis B. El factor de transcripción viralmente codificado HBx activa Src en una etapa que se requiere desde la propagación del virus HBV. (Véase, p. ej., Klein et al., *EMBO J.*, vol. 18:5019-5027 (1999); Klein et al., *Mol. Cell. Biol.*, vol. 17:6427-6436 (1997). Así, la inhibición de Src, que, a su vez, inhibe la propagación mediada por Src del virus HBV, puede ser útil en la prevención, el tratamiento o la mejora de la hepatitis B o un síntoma de la misma.

10 Los compuestos de la divulgación previenen, tratan o mejoran la hepatitis B o un síntoma asociado con la hepatitis B. Los síntomas de la hepatitis B se desarrollan típicamente en 30-180 días desde la exposición al virus. Sin embargo, hasta la mitad de todas las personas infectadas con el virus de la hepatitis B no tiene síntomas. Los síntomas de la hepatitis B a menudo se comparan con la gripe e incluyen, p. ej., pérdida de apetito; fatiga; náuseas y vómitos, prurito en todo el cuerpo; dolor sobre el hígado (p. ej., sobre el lado derecho del abdomen, bajo la jaula torácica inferior), ictericia y cambios en las funciones excretoras.

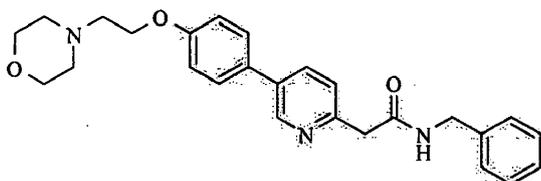
Los compuestos de la divulgación se administran solos, en composiciones farmacéuticas o en combinación con cualquiera de una variedad de tratamientos conocidos para la hepatitis B, tales como, por ejemplo, interferón α , lamivudina (Epivir-HBV) y baraclude (entecavir).

20 Según se describe en la presente memoria, los compuestos de la divulgación se pueden usar para regular la actividad del sistema inmunitario en un individuo, protegiendo o previniendo de ese modo una enfermedad autoinmunitaria, p. ej., artritis reumatoide, esclerosis múltiple, septicemia y lupus así como rechazo de trasplantes y enfermedades alérgicas. Alternativamente, el compuesto se puede usar para tratar una enfermedad autoinmune en un individuo. Por ejemplo, el compuesto puede dar como resultado la reducción en la gravedad de los síntomas o la detención del próximo avance de la enfermedad autoinmunitaria en un individuo. El compuesto de la divulgación puede estar implicado en la modulación de una cascada de señalización de cinasa, p. ej., un inhibidor de cinasa, un inhibidor no competitivo con ATP, un inhibidor de tirosina cinasa, p. ej., un inhibidor de Src, un inhibidor de p59fyn (Fyn) o un inhibidor de p56lck (Lck).

30 Las enfermedades autoinmunitarias son enfermedades provocadas por un desajuste de la autotolerancia de modo que el sistema inmunitario adaptativo responde a autoantígenos y media en el daño celular y tisular. Las enfermedades autoinmunitarias pueden ser específicas de un órgano (p. ej., tiroiditis o diabetes) o sistémicas (p. ej., lupus eritematoso sistémico). Las células T modulan la respuesta inmunitaria mediada por células en el sistema inmunitario adaptativo. Bajo condiciones normales, las células T expresan receptores antigénicos (receptores de células T) que reconocen fragmentos peptídicos de proteínas extrañas unidas a moléculas propias del complejo principal de histocompatibilidad. Entre los episodios más tempranos reconocibles después de la estimulación del receptor de células T (TCR, por sus siglas en inglés) están la activación de Lck y Fyn, que da como resultado la fosforilación de TCR sobre residuos de tirosina dentro de motivos de activación basados en tirosina inmunorreceptores (Zamoyska, et al.; 2003, *Immunol. Rev.*, 191, 107-118). Las tirosina cinasas, tales como Lck (que es un miembro de la familia Src de proteína tirosina cinasas) representan un papel esencial en la regulación de la señalización celular y la proliferación celular por residuos de tirosina fosforilantes de péptidos y proteínas (Levitzki; 2001, *Top. Curr. Chem.*, 211, 1-15; Longati, et al.; 2001, *Curr. Drug Targets*, 2, 41-55; Qian, y Weiss; 1997, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9, 205-211). Así, aunque sin querer limitarse por una teoría, se establece como hipótesis que la administración de un compuesto de la divulgación que modula la actividad de una tirosina cinasa (p. ej., Src) es útil en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria.

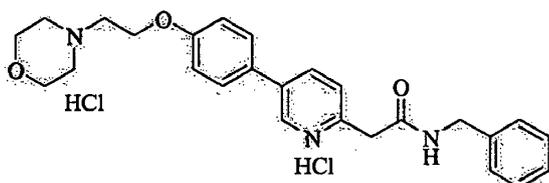
45 Las tirosina cinasas lck y fyn se activan ambas en la ruta de TCR; así, los inhibidores de lck y/o fyn tienen utilidad potencial como agentes autoinmunitarios (Palacios y Weiss; 2004, *Oncogene*, 23, 7990-8000). Lck y Fyn son expresadas predominantemente por células T a través de la mayoría de su vida. Los papeles de Lck y Fyn en el desarrollo de células T, la homeostasis y la activación se ha demostrado mediante estudios en animales y líneas celulares (Parang y Sun; 2005, *Expert Opin. The. Patents*, 15, 1183-1207). La activación de Lck está implicada en enfermedades autoinmunitarias y rechazo de trasplantes (Kamens, et al.; 2001, *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 2, 1213-1219). Los resultados han mostrado que las líneas celulares Jurkat lck (-) son incapaces de proliferar, producir citocinas y generar incrementos en el calcio intracelular, el fosfato de inositol y la fosforilación de tirosina en respuesta a la estimulación de receptores de células T (Straus y Weiss; 1992, *Cell.*, 70, 585-593; Yamasaki, et al.; 1996, *Mol. Cell. Biol.*, 16, 7151-7160). Por lo tanto, un agente que inhiba lck bloqueará eficazmente la función de las células T, actuará como un agente inmunosupresor y tendrá utilidad potencial en enfermedades autoinmunitarias, tales como artritis reumatoide, esclerosis múltiple y lupus, así como en el área del rechazo de trasplantes y las enfermedades alérgicas (Hanke y Pollok; 1995, *Inflammation Res.*, 44, 357-371). Así, aunque sin querer limitarse por una teoría, se establece como hipótesis que la administración de un compuesto de la divulgación que modula uno o más miembros de la familia Src de proteína tirosina cinasas (p. ej., lck y/o fyn) es útil en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria.

La divulgación se refiere a N-bencil-2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetamida (Compuesto 1) sustancialmente pura, y sales, solvatos, hidratos o profármacos de la misma:



(Compuesto 1, KX2-391).

- 5 La divulgación también se refiere a dihidrocloruro de N-bencil-2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetamida sustancialmente puro:



KX2-391 2HCl

- 10 La presente divulgación proporciona composiciones y formulaciones que contienen impurezas limitadas. Los compuestos y las formulaciones de la presente divulgación tienen una pureza mayor que aproximadamente 98,0% según se determina mediante métodos conocidos en la especialidad, por ejemplo, HPLC. Preferiblemente, los compuestos y las formulaciones de la presente divulgación tienen una pureza que varía de aproximadamente 99,0% a aproximadamente 100% (o cualquier valor dentro de dicho intervalo). Por ejemplo, tales compuestos, composiciones o formulaciones pueden tener una pureza de 98,1%, 98,2%, 98,3%, 98,4%, 98,5%, 98,6%, 98,7%, 98,8%, 98,9%, 99,0%, 99,1%, 99,2%, 99,3, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% o 99,9%.

- 15 A fin de provocar el máximo efecto farmacodinámico y terapéutico de las composiciones y formulaciones de la presente divulgación, es beneficioso limitar los niveles de impurezas tales como cloruro de etilo y paladio. Estas impurezas pueden dar como resultado una toxicidad no deseable.

- 20 Preferiblemente, las composiciones y formulaciones de la divulgación contienen menos de 2% de impurezas. Por ejemplo, las composiciones y formulaciones de la divulgación contienen menos de 2% de una cualquiera de las siguientes impurezas, o combinaciones de las mismas: cloruro de etilo, etanol, acetato de etilo, heptano, anisol y paladio.

- 25 La composición puede contener menos de 250 ppm de cloruro de etilo según se determina mediante análisis del disolvente residual por cromatografía de gases del espacio libre superior. Los compuestos y las formulaciones de la divulgación contienen cloruro de etilo en un intervalo de aproximadamente 0 ppm a aproximadamente 250 ppm (o cualquier valor dentro de dicho intervalo). Por ejemplo, las composiciones contienen menos de 200 ppm, menos de 200 ppm, menos de 150 ppm, menos de 100 ppm o menos de 50 ppm de cloruro de etilo.

- 30 Los compuestos y las formulaciones de la presente divulgación contienen menos de aproximadamente 100 ppm de paladio. Los compuestos y las formulaciones de la divulgación contienen paladio en un intervalo de aproximadamente 0 ppm a aproximadamente 100 ppm (o cualquier valor dentro de dicho intervalo). Por ejemplo, las composiciones contienen menos de 75 ppm, menos de 50 ppm, menos de 30 ppm, menos de 20 ppm, menos de 10 ppm o menos de 5 ppm de paladio.

Definiciones

Por comodidad, se recogen aquí ciertos términos usados en la memoria descriptiva, los ejemplos y las reivindicaciones adjuntas.

- 35 Las proteína cinasas son una gran clase de enzimas que catalizan la transferencia del fosfato y desde ATP hasta el grupo hidroxilo en la cadena lateral de Ser/Thr o Tyr en proteínas y péptidos que están íntimamente implicados en el control de diversas funciones celulares importantes, quizás lo más notablemente: transducción de señales, diferenciación y proliferación. Se estima que hay aproximadamente 2.000 proteína cinasas distintas en el cuerpo humano, y, aunque cada una de estas fosforila sustratos proteínicos/peptídicos particulares, todas se unen al mismo
- 40 ATP del segundo sustrato en un bolsillo muy conservado. Aproximadamente 50% de los productos oncogénicos conocidos son proteína tirosina cinasas (PTK), y se ha mostrado que su actividad de cinasa conduce a transformación celular.

- 5 Las PTK se pueden clasificar en dos categorías, las PTK receptoras membranas (p. ej. PTK receptoras de factores de crecimiento) y las PTK no receptoras (p. ej. la familia Src de productos protooncogénicos y la cinasa de adherencia focal (FAK)). La hiperactivación de Src se ha presentado en un número de cánceres humanos, incluyendo los de colon, mama, pulmón, vejiga urinaria y piel, así como en cáncer gástrico, tricoleucemia y neuroblastoma.
- 10 "Inhibe uno o más componentes de una cascada de señalización de proteína cinasa" significa que uno o más componentes de la cascada de señalización de cinasa son afectados de modo que el funcionamiento de la célula cambie. Componentes de una cascada de señalización de proteína cinasa incluyen cualesquiera proteínas implicadas directamente o indirectamente en la ruta de señalización de cinasa incluyendo segundos mensajeros y dianas aguas arriba y aguas abajo.
- 15 "Tratar" incluye cualquier efecto, p. ej., disminuir, reducir, modular o eliminar, que dé como resultado la mejora de la afección, la enfermedad, el trastorno, etc. "Tratar" o "tratamiento" de un estado patológico incluye: inhibir el estado patológico, es decir, detener el desarrollo del estado patológico o sus síntomas clínicos; o aliviar el estado patológico, es decir, provocar una regresión temporal o permanente del estado patológico o sus síntomas clínicos.
- "Prevenir" el estado patológico incluye hacer que los síntomas clínicos del estado patológico no se desarrollen en un individuo que puede estar expuesto o predispuesto al estado patológico, pero todavía no experimenta o presenta síntomas del estado patológico.
- "Estado patológico" significa cualquier enfermedad, trastorno, afección, síntoma o indicación.
- 20 Según se usa en la presente memoria, el término "trastorno proliferativo celular" se refiere a afecciones en las que el crecimiento desregulado y/o anormal de células puede conducir al desarrollo de una afección o enfermedad no deseada, que puede ser cancerosa o no cancerosa, por ejemplo una afección psoriásica. Según se usa en la presente memoria, los términos "afección psoriásica" o "psoriasis" se refieren a trastornos que implican hiperproliferación de queratinocitos, infiltración de células inflamatorias y alteración de citocinas.
- 25 En una realización, el trastorno de proliferación celular es cáncer. Según se usa en la presente memoria, el término "cáncer" incluye tumores sólidos, tales como cánceres de pulmón, mama, colon, ovario, cerebro, hígado, páncreas, próstata, melanoma maligno, cánceres de piel no melanómicos, así como tumores y/o enfermedades malignas hematológicas, tales como leucemia y linfomas infantiles, mieloma múltiple, enfermedad de Hodgkin, linfomas de origen linfocítico y cutáneo, leucemia aguda y crónica tal como leucemia linfoblástica aguda, mielocítica aguda o mielocítica crónica, neoplasma de células plasmáticas, neoplasma linfoide y cánceres asociados con el sida.
- 30 Además de las afecciones psoriásicas, los tipos de enfermedades proliferativas que pueden ser tratados usando las composiciones de la presente divulgación son quistes epidérmicos y dermoides, lipomas, adenomas, hemangiomas capilares y cutáneos, linfangiomas, lesiones névicas, teratomas, nefromas, miofibromatosis, tumores osteoplásticos, y otras masas displásicas y similares. Las enfermedades proliferativas pueden incluir displasias y trastornos similares.
- 35 Una "cantidad eficaz" de un compuesto de la divulgación es la cantidad que, cuando se administra a un individuo que tiene una enfermedad o trastorno, da como resultado la regresión de la enfermedad o el trastorno en el individuo. Así, una cantidad eficaz de un compuesto es la cantidad que, cuando se administra a un individuo que tiene un trastorno de proliferación celular, da como resultado la regresión del crecimiento celular en el individuo. La cantidad del compuesto divulgado que se ha de administrar a un individuo dependerá del trastorno particular, el modo de administración, los compuestos coadministrados, si los hay, y las características del individuo, tales como
- 40 la salud general, otras enfermedades, la edad, el sexo, el genotipo, el peso corporal y la tolerancia a los fármacos. El experto podrá determinar las dosificaciones apropiadas dependiendo de estos y otros factores.
- Según se usa en la presente memoria, el término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto, o una combinación de compuestos, de la divulgación eficaz cuando se administra solo o en combinación como un agente antiproliferativo. Por ejemplo, una cantidad eficaz se refiere a una cantidad del compuesto presente en una formulación o en un dispositivo médico suministrado a un paciente o individuo receptor suficiente para provocar actividad biológica, por ejemplo, actividad antiproliferativa, tal como, p. ej., actividad anticancerosa o actividad antineoplásica. Opcionalmente, la combinación de compuestos es una combinación sinérgica. La sinergia, según se describe, por ejemplo, por Chou y Talalay, Adv. Enzyme Regul. vol. 22, pp. 27-55 (1984), se produce cuando el
- 50 efecto de los compuestos cuando se administran en combinación es mayor que el efecto aditivo de los compuestos cuando se administran solo como un agente individual. En general, un efecto sinérgico se demuestra lo más claramente a concentraciones subóptimas de los compuestos. La sinergia puede ser en cuanto a una citotoxicidad inferior, o un incremento del efecto antiproliferativo, o algún otro efecto beneficioso de la combinación en comparación con los componentes individuales.
- 55 "Una cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un mamífero para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar tal tratamiento para la enfermedad. La "cantidad terapéuticamente eficaz" variará dependiendo del compuesto, la enfermedad y su gravedad y la edad, el peso, etc., del mamífero que se va a tratar.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los compuestos se puede formular con un vehículo farmacéuticamente aceptable para la administración a un ser humano o un animal. Según esto, los compuestos o las formulaciones se pueden administrar, por ejemplo, a través de vías oral, parenteral o tópica, para proporcionar una cantidad eficaz del compuesto. En realizaciones alternativas, los compuestos preparados según la divulgación se pueden usar para revestir o impregnar un dispositivo médico, p. ej., una endoprótesis vascular ("stent").

El término "cantidad profilácticamente eficaz" significa una cantidad eficaz de un compuesto o compuestos de la divulgación que se administra para prevenir o reducir el riesgo de proliferación celular no deseada.

"Efecto farmacológico", según se usa en la presente memoria, abarca efectos producidos en el individuo que alcanzan el propósito pretendido de una terapia. En una realización, un efecto farmacológico significa que las indicaciones primarias del individuo que se trata se previenen, alivian o reducen. Por ejemplo, un efecto farmacológico sería uno que diera como resultado la prevención, el alivio o la reducción de indicaciones primarias en un individuo tratado. En otra realización, un efecto farmacológico significa que los trastornos o síntomas de las indicaciones primarias del individuo que se trata se previenen, alivian o reducen. Por ejemplo, un efecto farmacológico sería uno que diera como resultado la prevención o reducción de indicaciones primarias en un individuo tratado.

Los compuestos de la divulgación que contienen nitrógenos se pueden convertir en N-óxidos mediante tratamiento con un agente oxidante (p. ej., ácido 3-cloroperoxisbenzoico (*m*-CPBA) y/o peróxidos de hidrógeno) para proporcionar otros compuestos de la divulgación. Así, se considera que todos los compuestos que contienen nitrógeno mostrados y reivindicados, cuando esté permitido por la valencia y la estructura, incluyen el compuesto que se muestra y su derivado de N-óxido (que se puede indicar como N→O o N⁺-O⁻). Por otra parte, en otros casos, los nitrógenos de los compuestos de la divulgación se pueden convertir en compuestos N-hidroxilados o N-alcoxilados. Por ejemplo, los compuestos N-hidroxilados se pueden preparar mediante la oxidación de la amina originaria por un agente oxidante tal como *m*-CPBA. También se considera que todos los compuestos que contienen nitrógeno mostrados y reivindicados, cuando esté permitido por la valencia y la estructura, cubren tanto el compuesto que se muestra como sus derivados N-hidroxilado (es decir, N-OH) y N-alcoxilado (es decir, N-OR, en donde R es alquilo C₁₋₆, alqueno C₁₋₆, alquino C₁₋₆, carbociclo C₃₋₁₄ o heterociclo de 3-14 miembros, sustituido o no sustituido).

"Ion conjugado" se usa para representar una especie pequeña cargada negativamente tal como cloruro, bromuro, hidróxido, acetato y sulfato.

Un "grupo aniónico", según se usa en la presente memoria, se refiere a un grupo que está cargado negativamente a pH fisiológico. Grupos aniónicos incluyen carboxilato, sulfato, sulfonato, sulfinato, sulfamato, tetrazolilo, fosfato, fosfonato, fosfinato o fosforotioato o equivalentes funcionales de los mismos. Se pretende que los "equivalentes funcionales" de grupos aniónicos incluyan bioisómeros, p. ej., bioisómeros de un grupo carboxilato. Los bioisómeros abarcan tanto equivalentes bioisostéricos clásicos como equivalente bioisostérico no clásicos. Los bioisómeros clásicos y no clásicos se conocen en la especialidad (véase, p. ej., Silverman, R. B. The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action, Academic Press, Inc.: San Diego, Calif., 1992, pp.19-23). En una realización, un grupo aniónico es un carboxilato.

Los isótopos incluyen los átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números de masa. A modo de ejemplo general y sin limitación, isótopos de hidrógeno incluyen tritio y deuterio, e isótopos de carbono incluyen C-13 y C-14.

Los compuestos descritos en la presente memoria pueden tener centros asimétricos. Los compuestos que contienen un átomo asimétricamente sustituido se pueden aislar en formas ópticamente activas o racémicas. Se conoce bien en la especialidad cómo preparar formas ópticamente activas, tal como mediante resolución de formas racémicas o mediante síntesis a partir de materias primas ópticamente activas. Muchos isómeros geométricos de olefinas, dobles enlaces C=N, y similares también pueden estar presentes en los compuestos descritos en la presente memoria, y se contemplan todos estos isómeros estables. Los isómeros geométricos *cis* y *trans* de los compuestos se describen y se pueden aislar como una mezcla de isómeros o como formas isómeras separadas. Se incluyen todas las formas isómeras quirales, diastereoisómeras, racémicas y geométricas de una estructura, a menos que esté específicamente indicada la estereoquímica o la forma isómera específica. Se divulgan en la presente memoria todos los tautómeros de los compuestos mostrados o descritos.

En la presente memoria descriptiva, la fórmula estructural del compuesto representa un cierto isómero por comodidad en algunos casos, pero la divulgación incluye todos los isómeros tales como un isómero geométrico, un isómero óptico basado en un carbono asimétrico, un estereoisómero, un tautómero y similares que se presenten estructuralmente y una mezcla de isómeros y no se limita a la descripción de la fórmula por comodidad, y puede ser uno cualquiera de los isómeros o una mezcla. Por lo tanto, un átomo de carbono asimétrico puede estar presente en la molécula y un compuesto ópticamente activo y un compuesto racémico puede estar presente en el presente compuesto, pero la divulgación no se limita a ellos e incluye uno cualquiera. Además, puede estar presente un polimorfismo cristalino, pero no es limitativo, sino que cualquier forma cristalina puede ser individual o una mezcla de formas cristalinas, o un anhídrido o hidrato. Además, se incluye en la presente memoria el llamado metabolito que se produce mediante degradación del presente compuesto in vivo.

"Isomería" significa compuestos que tienen fórmulas moleculares idénticas pero que difieren en la naturaleza o la secuencia de unión de sus átomos o en la disposición de sus átomos en el espacio. Los isómeros que difieren en la disposición de sus átomos en el espacio se denominan "estereoisómeros". Los estereoisómeros que no son imágenes especulares entre sí se denominan "diastereoisómeros", y los estereoisómeros que son imágenes especulares no superponibles se denominan "enantiómeros", o a veces isómeros ópticos. Un átomo de carbono unido a cuatro sustituyentes diferentes se denomina un "centro quiral".

"Isómero quiral" significa un compuesto con al menos un centro quiral. Tiene dos formas enantiómeras de quiralidad opuesta y puede existir bien como un enantiómero individual o bien como una mezcla de enantiómeros. Una mezcla que contiene cantidades iguales de formas enantiómeras individuales de quiralidad opuesta se denomina una "mezcla racémica". Un compuesto que tiene más de un centro quiral tiene 2^{n-1} pares enantiómeros, donde n es el número de centros quirales. Los compuestos con más de un centro quiral pueden existir bien como un diastereoisómero individual o bien como una mezcla de diastereoisómeros, denominada una "mezcla diastereoisómera". Cuando está presente un centro quiral, un estereoisómero se puede caracterizar por la configuración absoluta (R o S) de ese centro quiral. Configuración absoluta se refiere a la disposición en el espacio de los sustituyentes ligados al centro quiral. Los sustituyentes ligados al centro quiral considerados se clasifican según la regla de secuencia de Cahn, Ingold y Prelog. (Cahn et al, Angew. Chem. Inter. Edit. 1966, 5, 385; errata 511; Cahn et al., Angew. Chem. 1966, 78, 413; Cahn e Ingold, J. Chem. Soc. 1951 (Londres), 612; Cahn et al., Experientia 1956, 12, 81; Cahn, J., Chem. Educ. 1964, 41, 116).

"Isómeros geométricos" significa los diastereoisómeros que deben su existencia a una rotación impedida alrededor de dobles enlaces. Estas configuraciones se diferencian en sus nombres por los prefijos cis y trans, o Z y E, que indican que los grupos están en el mismo lado o el opuesto del doble enlace en la molécula según las reglas de Cahn-Ingold-Prelog.

Además, las estructuras y otros compuestos divulgados en esta solicitud incluyen todos los isómeros atropícos de los mismos. Los "isómeros atropícos" son un tipo de estereoisómero en el que los átomos de dos isómeros están dispuestos de forma diferente en el espacio. Los isómeros atropícos deben su existencia a una rotación restringida provocada por el impedimento de la rotación de grupos grandes alrededor de un enlace central. Tales isómeros atropícos existen típicamente como una mezcla, sin embargo, como resultado de los recientes avances en las técnicas cromatográficas, ha sido posible separar mezclas de dos isómeros atropícos en casos seleccionados.

Los términos "polimorfos cristalinos" o "polimorfos" o "formas cristalinas" significan estructuras cristalinas en las que un compuesto (o una sal o solvato del mismo) puede cristalizar en diferentes disposiciones de empaquetamiento cristalino, todas las cuales tienen la misma composición elemental. Diferentes formas cristalinas tienen habitualmente diferentes patrones de difracción de rayos X, espectros infrarrojos, puntos de fusión, densidad y dureza, conformación cristalina, propiedades ópticas y eléctricas, estabilidad y solubilidad. El disolvente de recristalización, la velocidad de cristalización, la temperatura de almacenamiento y otros factores pueden hacer que domine una forma cristalina. Se pueden preparar polimorfos cristalinos de los compuestos mediante cristalización bajo diferentes condiciones.

Adicionalmente, los compuestos de la divulgación, por ejemplo, las sales de los compuestos, pueden existir en forma bien hidratada o bien no hidratada (la anhidra) o como solvatos con otras moléculas de disolvente. Ejemplos no limitativos de hidratos incluyen monohidratos, dihidratos, etc. Ejemplos no limitativos de solvatos incluyen solvatos de etanol, solvatos de acetona, etc.

"Solvatos" significa formas por adición de disolvente que contienen cantidades bien estequiométricas o bien no estequiométricas de disolvente. Algunos compuestos tienen tendencia a atrapar una relación molar fija de moléculas de disolvente en el estado sólido cristalino, formando así un solvato. Si el disolvente es agua, el solvato formado es un hidrato, cuando el disolvente es alcohol, el solvato formado es un alcoholato. Los hidratos se forman mediante la combinación de una o más moléculas de agua con una o más sustancias en las que el agua retiene su estado molecular como H₂O, siendo capaz tal combinación de formar uno o más hidratos.

"Tautómeros" se refiere a compuestos cuyas estructuras difieren notablemente en la disposición de átomos, pero que existen en un equilibrio fácil y rápido. Se ha de entender que los compuestos de la divulgación se pueden representar como diferentes tautómeros. También se debe entender que cuando los compuestos tienen formas tautómeras, todas las formas tautómeras se divulgan en la presente memoria, y la denominación de los compuestos no excluye ninguna forma tautómera.

Algunos compuestos de la divulgación pueden existir en una forma tautómera.

Los compuestos, las sales y los profármacos de la divulgación pueden existir en varias formas tautómeras, incluyendo la forma enólica e imínica, y la forma cetónica y enamínica e isómeros geométricos y mezclas de los mismos. Todas estas formas tautómeras se describen en la presente memoria. Los tautómeros existen como mezclas de un grupo tautómero en solución. En forma sólida, habitualmente predomina un tautómero. Aunque se puede describir un tautómero, la divulgación incluye todos los tautómeros de los presentes compuestos

Un tautómero es uno de dos o más isómeros estructurales que existen en equilibrio y se convierten fácilmente de una forma isómera en otra. Esta reacción da como resultado la migración formal de un átomo de hidrógeno acompañada por un intercambio de dobles enlaces conjugados adyacentes. En soluciones en las que es posible la tautomerización, se alcanzará un equilibrio químico de los tautómeros. La relación exacta de los tautómeros depende de varios factores, incluyendo la temperatura, el disolvente y el pH. El concepto de tautómeros que son interconvertibles mediante tautomerizaciones se denomina tautomería.

De los diversos tipos de tautomería que son posibles, comúnmente se observan dos. En la tautomería cetoenólica, se produce un intercambio simultáneo de electrones y un átomo de hidrógeno. La tautomería de anillo-cadena es exhibida por la glucosa. Surge como resultado de que el grupo aldehído (-CHO) en una molécula de cadena de azúcar reaccione con uno de los grupos hidroxilo (-OH) de la misma molécula para darla una forma cíclica (conformación de anillo).

Las tautomerizaciones son catalizadas por: Base: 1. desprotonación; 2. formación de un anión deslocalizado (p. ej. un enolato); 3. protonación en una posición diferente del anión; Ácido: 1. protonación; 2. formación de un catión deslocalizado; 3. desprotonación en una posición diferente adyacente al catión.

Pares tautómeros comunes son: cetona - enol, amida - nitrilo, lactama - lactima, tautomería amida - ácido imídico en anillos heterocíclicos (p. ej. en las nucleobases guanina, timina y citosina), amina - enamina y enamina - enamina.

Se ha de entender según esto que los isómeros que surgen de átomos de carbono asimétricos (p. ej., todos los enantiómeros y diastereoisómeros) están incluidos dentro del alcance de la divulgación, a menos que se indique otra cosa. Tales isómeros se pueden obtener en forma sustancialmente pura mediante técnicas de separación clásicas y mediante síntesis estereoquímicamente controlada. Por otra parte, las estructuras y otros compuestos y restos analizados en esta solicitud también incluyen todos los tautómeros de los mismos. Los alquenos pueden incluir la geometría bien E o bien Z, cuando sea apropiado. Los compuestos de esta divulgación pueden existir en forma estereoisómera, por lo tanto se pueden producir como estereoisómeros individuales o como mezclas.

Una "composición farmacéutica" es una formulación que contiene los compuestos divulgados en una forma adecuada para la administración a un individuo. En una realización, la composición farmacéutica está a granel o en forma de dosificación unitaria. Puede ser ventajoso formular las composiciones en forma unitaria de dosificación por facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Forma unitaria de dosificación, según se usa en la presente memoria, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el individuo que se va a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de reactivo activo calculada para producir el efecto terapéutico en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Las especificaciones de las formas unitarias de dosificación de la divulgación están dictadas por y son directamente dependientes de las características únicas del reactivo activo y el efecto terapéutico particular que se va a alcanzar, y las limitaciones inherentes a la especialidad de combinar tal agente activo para el tratamiento de individuos.

La forma de dosificación unitaria es cualquiera de una variedad de formas, incluyendo, por ejemplo, una cápsula, una bolsa intravenosa, un comprimido, una bomba individual en un inhalador de aerosol, o un vial. La cantidad de ingrediente activo (p. ej., una formulación del compuesto divulgado o una sal, un hidrato, un solvato o un isómero del mismo) en una dosis unitaria de la composición es una cantidad eficaz y se varía según el tratamiento particular implicado. Un experto en la especialidad apreciará que a veces es necesario hacer variaciones habituales en la dosificación dependiendo de la edad y el estado del paciente. La dosificación también dependerá de la vía de administración. Se contempla una variedad de vías, incluyendo oral, pulmonar, rectal, parenteral, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, por inhalación, yugal, sublingual, intrapleurales, intratecal, intranasal y similares. Formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de un compuesto de esta divulgación incluyen polvos, aerosoles, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhaladores. En una realización, el compuesto activo se mezcla bajo condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y con cualesquiera conservantes, tampones o propelentes que se requieran.

El término "dosis instantánea" se refiere a formulaciones de compuesto que son formas de dosificación que se dispersan rápidamente.

El término "liberación inmediata" se define como una liberación de compuesto desde una forma de dosificación en un período de tiempo relativamente breve, generalmente hasta aproximadamente 60 minutos. El término "liberación modificada" se define para incluir liberación retardada, liberación duradera y liberación pulsátil. El término "liberación pulsátil" se define como una serie de liberaciones de fármaco desde una forma de dosificación. El término "liberación sostenida" o "liberación duradera" se define como una liberación continua de un compuesto desde una forma de dosificación a lo largo de un período prolongado.

Un "individuo" incluye mamíferos, p. ej., seres humanos, animales de compañía (p. ej., perros, gatos, aves y similares), animales de granja (p. ej., vacas, ovejas, cerdos, caballos, aves de corral y similares) y animales de laboratorio (p. ej., ratas, ratones, cobayas, aves y similares). En una realización, el individuo es un ser humano.

Según se usa en la presente memoria, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a los compuestos, los materiales, las composiciones, los vehículos y/o las formas de dosificación que son, dentro del alcance del juicio

médico razonable, adecuados para el uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, de acuerdo con una relación beneficio/riesgo razonable.

5 "Excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un excipiente que es útil para preparar una composición farmacéutica que generalmente es seguro, atóxico y ni biológicamente ni de otro modo indeseable, e incluye un excipiente que es aceptable para uso veterinario así como uso farmacéutico en seres humanos. Un "excipiente farmacéuticamente aceptable", según se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, incluye tanto uno como más de uno de tales excipientes.

10 Los compuestos de la divulgación son capaces de formar adicionalmente sales. Todas estas formas también se contemplan en la presente memoria.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" de un compuesto significa una sal que es farmacéuticamente aceptable y que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto originario.

Según se usa en la presente memoria, "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos divulgados en los que el compuesto originario se modifica al formar sales ácidas o básicas del mismo. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos minerales u orgánicos de residuos básicos tales como aminas, sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos, y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales atóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario del compuesto originario formadas, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos atóxicos. Por ejemplo, tales sales atóxicas convencionales incluyen, pero no se limitan a, las derivadas de ácidos inorgánicos y orgánicos seleccionados de ácido 2-acetoxibenzoico, 2-hidroxietanosulfónico, acético, ascórbico, benzenosulfónico, benzoico, bicarbónico, carbónico, cítrico, edético, etanodisulfónico, 1,2-etanosulfónico, fumárico, glucoheptónico, glucónico, glutámico, glicólico, glicoliarsanílico, hexilresorcínico, hidrabámico, bromhídrico, clorhídrico, yodhídrico, hidroximaleico, hidroxinaftoico, isetiónico, láctico, lactobiónico, laurilsulfónico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, napsílico, nítrico, oxálico, pamoico, pantoténico, fenilacético, fosfórico, poligalacturónico, propiónico, salicílico, esteárico, subacético, succínico, sulfámico, sulfanílico, sulfúrico, tánico, tartárico, toluenosulfónico, y los aminoácidos comúnmente presentes en la naturaleza, p. ej., glicina, alanina, fenilalanina, arginina, etc.

Otros ejemplos incluyen ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido pirúvico, ácido malónico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido 4-clorobenzenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-toluenosulfónico, ácido canforsulfónico, ácido 4-metilbicyclo-[2,2,2]-oct-2-eno-1-carboxílico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido terc-butilacético, ácido mucónico, y similares. La divulgación también abarca sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto originario bien se reemplaza por un ion metálico, p. ej., un ion de metal alcalino, un ion alcalinotérreo o un ion aluminio; o bien se coordina con una base orgánica tal como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina, y similares.

35 Se debe entender que todas las referencias a sales farmacéuticamente aceptables incluyen formas de adición de disolvente (solvatos) o formas cristalinas (polimorfos) según se definen en la presente memoria, de la misma sal.

Las sales farmacéuticamente aceptables de la divulgación se pueden sintetizar a partir de un compuesto originario que contiene un resto básico o ácido mediante métodos químicos convencionales. Generalmente, tales sales se pueden preparar al hacer reaccionar las formas de ácido o base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o el ácido apropiados en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos; se pueden usar medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Listas de sales adecuadas se encuentran en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª ed. (Mack Publishing Company, 1990). Por ejemplo, las sales pueden incluir, pero no se limitan a, las sales de hidrocloreuro y acetato de los compuestos de la divulgación que contienen amina alifática, que contienen hidroxilamina y que contienen imina.

45 Los compuestos de la divulgación se pueden preparar como profármacos, por ejemplo profármacos farmacéuticamente aceptables. El término "profármaco" se refiere a cualquier compuesto que libere un fármaco originario activo in vivo. Puesto que se sabe que los profármacos mejoran numerosas cualidades deseables de los productos farmacéuticos (p. ej., solubilidad, biodisponibilidad, fabricación, etc.), los compuestos de la divulgación se pueden aportar en forma de profármaco. Así, la divulgación incluye profármacos de los compuestos, métodos para aportar los mismos y composiciones que contienen los mismos. "Profármacos" está destinado a incluir cualesquiera vehículos unidos covalentemente que liberen un fármaco originario activo in vivo cuando tal profármaco se administra a un individuo. Los profármacos se preparan al modificar grupos funcionales presentes en el compuesto de tal modo que las modificaciones se escindan, bien en una manipulación habitual o bien in vivo, hasta el compuesto originario. Los profármacos incluyen compuestos en los que un grupo hidroxilo, amino, sulfhidrilo, carboxi o carbonilo está unido a cualquier grupo que se pueda escindir in vivo para formar un grupo hidroxilo libre, amino libre, sulfhidrilo libre, carboxi libre o carbonilo libre, respectivamente.

Ejemplos de profármacos incluyen, pero no se limitan a, ésteres (p. ej., acetato, dialquilaminoacetatos, formiatos, fosfatos, sulfatos y derivados de benzoato) y carbamatos (p. ej., N,N-dimetilaminocarbonilo) de grupos funcionales

hidroxi, grupos éster (p. ej. ésteres etílicos, ésteres de morfolinoetanol) de grupos funcionales carboxilo, derivados N-acilados (p. ej. N-acetilo), bases de Mannich nitrogenadas, bases de Schiff y enaminonas de grupos funcionales amino, oximas, acetales, cetales y ésteres enólicos de grupos funcionales cetona y aldehído en compuestos, y similares, véase Bundegaard, H. "Design of Prodrugs" p1-92, Elsevier, Nueva York-Oxford (1985).

5 "Grupo protector" se refiere a un agrupamiento de átomos que cuando está ligado a un grupo reactivo en una molécula enmascara, reduce o previene esa reactividad. Ejemplos de grupos protectores se pueden encontrar en Green y Wuts, Protective Groups in Organic Chemistry, (Wiley, 2ª ed. 1991); Harrison y Harrison et al., Compendium of Synthetic Organic Métodos, Vols. 1-8 (John Wiley and Sons, 1971-1996); y Kocienski, Protecting Groups, (Verlag, 3ª ed. 2003).

10 Se entiende que "compuesto estable" y "estructura estable" indican un compuesto que es suficientemente robusto para sobrevivir al aislamiento hasta un grado de pureza útil a partir de una mezcla de reacción, y formularse como un agente terapéutico eficaz.

15 En la memoria descriptiva, las formas singulares también incluyen el plural, a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que es entendido comúnmente por un experto normal en la especialidad a la que pertenecen esta invención y divulgación. En caso de conflicto, dominará la presente memoria descriptiva.

Todos los porcentajes y las relaciones usados en la presente memoria, a menos que se indique otra cosa, son en peso.

20 Una "terapia combinada" (o "coterapia") incluye la administración de un compuesto de la divulgación y al menos un segundo agente como parte de un régimen de tratamiento específico destinado a proporcionar el efecto beneficioso de la acción conjunta de estos agentes terapéuticos. El efecto beneficioso de la combinación incluye, pero no se limita a, una acción conjunta farmacocinética o farmacodinámica que resulta de la combinación de agentes terapéuticos. La administración de estos agentes terapéuticos en combinación se lleva a cabo típicamente a lo largo de un período de tiempo definido (habitualmente minutos, horas, días o semanas dependiendo de la combinación seleccionada). "Terapia combinada" puede estar destinado a abarcar, pero generalmente no lo está, la administración de dos o más de estos agentes terapéuticos como parte de regímenes monoterapéuticos separados que incidentemente y arbitrariamente dan como resultado las combinaciones descritas en la presente memoria.

30 "Terapia combinada" pretende abarcar la administración de estos agentes terapéuticos de modo secuencial, esto es, en donde cada agente terapéutico se administra en un momento diferente, así como la administración de estos agentes terapéuticos, o al menos dos de los agentes terapéuticos, de un modo sustancialmente simultáneo. Una administración sustancialmente simultánea se puede efectuar, por ejemplo, al administrar al individuo una sola cápsula que tiene una relación fija de cada agente terapéutico o en múltiples cápsulas individuales para cada uno de los agentes terapéuticos. La administración secuencial o sustancialmente simultánea de cada agente terapéutico se puede efectuar mediante cualquier vía apropiada incluyendo, pero no limitado a, vías orales, vías intravenosas, vías intramusculares y absorción directa a través de tejidos membranosos mucosos. Los agentes terapéuticos se pueden administrar mediante la misma ruta o mediante rutas diferentes. Por ejemplo, un primer agente terapéutico de la combinación seleccionada se puede administrar mediante inyección intravenosa mientras que los otros agentes terapéuticos de la combinación se pueden administrar oralmente. Alternativamente, por ejemplo, todos los agentes terapéuticos se pueden administrar oralmente o todos los agentes terapéuticos se pueden administrar mediante inyección intravenosa. La secuencia en la que se administran los agentes terapéuticos no es estrictamente crítica.

45 "Terapia combinada" también abarca la administración de los agentes terapéuticos que se describen anteriormente en combinación adicional con otros ingredientes biológicamente activos y terapias no farmacológicas (p. ej., cirugía o tratamiento por radiación). Cuando la terapia combinada comprende además un tratamiento no farmacológico, el tratamiento no farmacológico se puede efectuar en cualquier momento adecuado con tal de que se alcance un efecto beneficioso de la acción conjunta de la combinación de los agentes terapéuticos y el tratamiento no farmacológico. Por ejemplo, en casos apropiados, el efecto beneficioso se alcanza sin embargo cuando el tratamiento no farmacológico se retira temporalmente de la administración de los agentes terapéuticos, quizás días o incluso semanas.

50 A lo largo de la descripción, cuando se describe que las composiciones tienen, incluyen o comprenden componentes específicos, se contempla que las composiciones también consisten esencialmente en, o consisten en, los componentes citados. De forma similar, cuando se describe que los procedimientos tienen, incluyen o comprenden etapas de procedimiento específicas, los procedimientos también consisten esencialmente en, o consisten en, las etapas de procesamiento citadas. Además, se debe entender que el orden de las etapas o el orden para realizar ciertas acciones son indiferentes con tal de que la invención o divulgación siga siendo operativa. Por otra parte, dos o más etapas o acciones se pueden efectuar simultáneamente.

Los compuestos, o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran oralmente, nasalmente, transdérmicamente, pulmonarmente, por inhalación, yugalmente, sublingualmente, intraperitonealmente,

subcutáneamente, intramuscularmente, intravenosamente, rectalmente, intrapleuralmente, intratecalmente y parenteralmente. En una realización, el compuesto se administra oralmente. Un experto en la especialidad conocerá las ventajas de ciertas vías de administración.

5 El régimen de dosificación que utiliza los compuestos se selecciona según una variedad de factores incluyendo el tipo, la especie, la edad, el peso, el sexo y el estado médico del paciente; la gravedad de la afección que se va a tratar; la vía de administración; la función renal y hepática del paciente; y el compuesto particular o la sal del mismo empleados. Un médico o veterinario de experiencia normal puede determinar y recetar fácilmente la cantidad eficaz del fármaco requerida para prevenir, contrarrestar o detener el avance de la afección.

10 Técnicas para la formulación y administración de los compuestos divulgados de la divulgación se pueden encontrar en Remington: the Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, Mack Publishing Co., Easton, PA (1995). En una realización, los compuestos descritos en la presente memoria, y las sales farmacéuticamente aceptable de los mismos, se usan en preparaciones farmacéuticas en combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen cargas o diluyentes sólidos inertes y soluciones acuosas u orgánicas estériles. Los compuestos estarán presentes en tales composiciones farmacéuticas en cantidades suficientes para proporcionar la cantidad de dosificación deseada en el intervalo descrito en la presente memoria.

En una realización, el compuesto se prepara para administración oral, en donde los compuestos divulgados o las sales de los mismos se combinan con un vehículo sólido o líquido adecuado para formar cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos, jarabes, soluciones, suspensiones y similares.

20 Los comprimidos, las píldoras, las cápsulas y similares contienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 99 por ciento en peso del ingrediente activo y un aglutinante tal como goma de tragacanto, gomas arábicas, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente desintegrante tal como almidón de maíz, almidón de patata o ácido alginico; un lubricante tal como estearato magnésico; y/o un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa, sacarina, xilitol, y similares. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, a menudo contiene, además de materiales del tipo anterior, un vehículo líquido tal como un aceite graso.

En algunas realizaciones, varios otros materiales están presentes como revestimientos o para modificar la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los comprimidos se revisten con goma laca, azúcar o ambos. En algunas realizaciones, un jarabe o elixir contiene, además del ingrediente activo, sacarosa como agente edulcorante, metil- y propilparabenos como conservantes, un colorante y un saborizante tal como sabor a cereza o naranja, y similares.

30 Para algunas realizaciones que se refieren a la administración parenteral, los compuestos divulgados, o las sales, los tautómeros o los polimorfos de los mismos, se pueden combinar con medios acuosos u orgánicos estériles para formar soluciones o suspensiones inyectables. En una realización, las composiciones inyectables son soluciones o suspensiones isotónicas acuosas. Las composiciones pueden esterilizarse y/o contener adyuvantes, tales como agentes conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, promotores de la disolución, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Además, también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Las composiciones se preparan según métodos de mezclado, granulación o revestimiento convencionales, respectivamente, y contienen de aproximadamente 0,1 a 75%, en otra realización, las composiciones contienen de aproximadamente 1 a 50% del ingrediente activo.

40 Por ejemplo, se producen soluciones inyectables usando disolventes tales como aceite de sésamo o cacahuete o propilenglicol acuoso, así como soluciones acuosas de sales farmacéuticamente aceptables solubles en agua de los compuestos. En algunas realizaciones, se preparan dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos en aceites. Bajo condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos. Los términos "administración parenteral" y "administrado parenteralmente", según se usan en la presente memoria, significan modos de administración distintos a la administración enteral y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal e intraesternal.

50 Para la administración rectal, composiciones farmacéuticas adecuadas son, por ejemplo, preparaciones tópicas, supositorios o enemas. Los supositorios se preparan ventajosamente a partir de emulsiones o suspensiones grasas. Las composiciones se pueden esterilizar y/o contener adyuvantes, tales como agentes conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, promotores de la disolución, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Además, también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Las composiciones se preparan según métodos de mezclado, granulación o revestimiento convencionales, respectivamente, y contienen de aproximadamente 0,1 a 75%, en otra realización, las composiciones contienen de aproximadamente 1 a 50% del ingrediente activo.

En algunas realizaciones, los compuestos se formulan para aportar el agente activo mediante administración pulmonar, p. ej., la administración de una formulación en aerosol que contiene el agente activo desde, por ejemplo, un atomizador de bomba manual, un nebulizador o un inhalador de dosis medida presurizado. En algunas realizaciones, formulaciones adecuadas de este tipo también incluyen otros agentes, tales como agentes antiestáticos, para mantener los compuestos divulgados como aerosoles eficaces.

Un dispositivo de aporte de fármacos para aportar aerosoles comprende un bote de aerosol adecuado con una válvula de dosificación que contiene una formulación farmacéutica de aerosol como la descrita y una carcasa de accionamiento adaptada para contener el bote y permitir el aporte de fármaco. El bote del dispositivo de aporte de fármaco tiene un espacio libre superior que representa más de aproximadamente 15% del volumen total del bote. A menudo, el polímero destinado a la administración pulmonar está disuelto, suspendido o emulsionado en una mezcla de un disolvente, tensioactivo y propelente. La mezcla se mantiene bajo presión en un bote que se ha sellado con una válvula dosificadora.

Para la administración nasal, se puede usar un vehículo bien sólido o bien líquido. El vehículo sólido incluye un polvo grueso que tiene un tamaño de partícula en el intervalo de, por ejemplo, aproximadamente 20 a aproximadamente 500 micras y tal formulación se administra mediante inhalación rápida a través de la fosas nasales. En algunas realizaciones en las que se usa el vehículo líquido, la formulación se administra como una nebulización o gotas nasales e incluye soluciones oleosas o acuosas de los ingredientes activos.

Los reactivos activos se pueden preparar con vehículos que protegerán contra la eliminación rápida del cuerpo. Por ejemplo, se puede usar una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de aporte microencapsulados. Se pueden usar polímeros biocompatibles biodegradables, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres y poli(ácido láctico). Métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la especialidad. Los materiales también se pueden obtener comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También se pueden usar suspensiones liposómicas (incluyendo liposomas que eligen como diana células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos virales) como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estas se pueden preparar según métodos conocidos por los expertos en la especialidad, por ejemplo, como se describe en la Pat. EE. UU. N° 4.522.811.

Las composiciones y formulaciones de la divulgación también pueden comprender uno o más desecantes. Desecantes adecuados que se pueden usar son los farmacéuticamente seguros e incluyen, por ejemplo, calidades farmacéuticas de gel de sílice, aluminosilicato sódico, potásico o cálcico cristalino, sílice coloidal, sulfato cálcico anhidro y similares. El desecante puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 1,0% a 20,0%, o de aproximadamente 2% a 15% p/p (o cualquier valor dentro de dicho intervalo).

También se contemplan formulaciones que son formas de dosificación que se dispersan rápidamente, también conocidas como formas de "dosificación instantánea". En particular, algunas realizaciones de la divulgación se formulan como composiciones que liberan sus ingredientes activos en un corto período de tiempo, p. ej., típicamente menos de aproximadamente cinco minutos, en otra realización, menos de aproximadamente noventa segundos, en otra realización, menos de aproximadamente treinta segundos y en otra realización, en menos de aproximadamente diez o quince segundos. Tales formulaciones son adecuadas para la administración a un individuo a través de una variedad de vías, por ejemplo mediante la inserción en una cavidad corporal o la aplicación a una superficie corporal húmeda o herida abierta.

Típicamente, una "dosificación instantánea" es una forma de dosificación sólida que se administra oralmente, que se dispersa rápidamente en la boca y de ahí que no requiere un gran esfuerzo para tragar y permite que el compuesto se ingiera o absorba rápidamente a través de las membranas mucosas orales. En algunas realizaciones, también se usan en otras aplicaciones formas de dosificación que se dispersan rápidamente, incluyendo el tratamiento de heridas y otras lesiones corporales y estados patológicos en los que no es posible la liberación del medicamento mediante humedad suministrada externamente.

Las formas de "dosificación instantánea" se conocen en la especialidad; véanse, por ejemplo, formas de dosificación efervescentes y revestimientos de liberación rápida de micropartículas insolubles en las Pat. EE. UU. N° 5.578.322 y 5.607.697; espumas y líquidos liofilizados en las Pat. EE. UU. N° 4.642.903 y 5.631.023; hilado en estado fundido de formas de dosificación en las Pat. EE. UU. N° 4.855.326, 5.380.473 y 5.518.730; fabricación en forma libre sólida en la Pat. EE. UU. N° 6.471.992; matriz portadora basada en sacáridos y un aglutinante líquido en las Pat. EE. UU. N° 5.587.172, 5.616.344, 6.277.406 y 5.622.719; y otras formas conocidas en la especialidad.

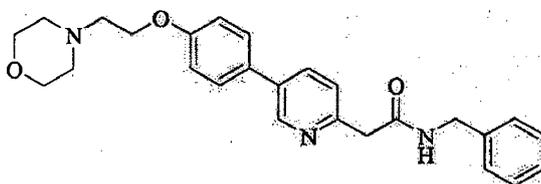
Los compuestos de la divulgación también se formulan como formulaciones de "liberación pulsátil", en las que el compuesto se libera de las composiciones farmacéuticas en una serie de liberaciones (es decir, pulsos). Los compuestos también se formulan como formulaciones de "liberación sostenida" en las que el compuesto se libera continuamente de la composición farmacéutica a lo largo de un período prolongado.

También se contemplan formulaciones, p. ej., formulaciones líquidas, incluyendo agentes encapsulantes o solvatantes cíclicos o acíclicos, p. ej., ciclodextrinas, poliéteres o polisacáridos (p. ej., metilcelulosa), o en otra realización derivados de β -ciclodextrina polianiónicos con un grupo salino sulfonato sódico separado de la cavidad

- lipófila por un grupo espaciador de éter alquílico o polisacáridos. En una realización, el agente es metilcelulosa. En otra realización, el agente es un derivado de β -ciclodextrina polianiónico con una sal de sulfonato sódico separada de la cavidad lipófila por un grupo espaciador de éter butílico, p. ej., CAPTISOL® (CyDex, Overland, KS). Un experto en la especialidad puede evaluar relaciones adecuadas de agente/formulación de compuesto divulgado al preparar una solución del agente en agua, p. ej., una solución al 40% en peso; preparar diluciones en serie, p. ej. para elaborar soluciones de 20%, 10, 5%, 2,5%, 0% (control) y similares; añadir un exceso (en comparación con la cantidad que puede ser solubilizada por el agente) del compuesto divulgado; mezclar bajo condiciones apropiadas, p. ej., calentamiento, agitación, ultrasonidos y similares; centrifugar o filtrar las mezclas resultantes para obtener soluciones transparentes; y analizar la concentración del compuesto divulgado en las soluciones.
- 10 Habiendo descrito ahora la invención y la divulgación por medio de una descripción escrita, los expertos en la especialidad sabrán que la invención se puede poner en práctica en una variedad de realizaciones y que la descripción precedente y los ejemplos posteriores tienen propósitos de ilustración y no limitación de las reivindicaciones que siguen.

Ejemplos

- 15 Ejemplo comparativo 1: Síntesis a pequeña escala de KX2-391



La síntesis preliminar descrita posteriormente se ilustra en la Patente de EE. UU. 7.300.931. Este procedimiento es útil para reacciones a pequeña escala, por ejemplo, reacciones que producen hasta 50 g de producto. Esta síntesis es útil, por ejemplo, para producir material de calidad para investigación.

- 20 Para la siguiente síntesis, a menos que se apunte otra cosa, los reactivos y los disolventes se usaron según se recibían de proveedores comerciales. Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono se obtuvieron en un espectrómetro Bruker AC 300 o Bruker AV 300 a 300 MHz para el protón y 75 MHz para el carbono. Los espectros se dan en ppm (δ) y las constantes de acoplamiento, J, se presentan en hertzios. Se usó tetrametilsilano como un patrón interno para los espectros de protón y el pico del disolvente se usó como el pico de referencia para espectros de carbono. Los espectros de masas y los datos de masas de LC-MS se obtuvieron en un espectrómetro de masas de ionización a presión atmosférica (APCI, por sus siglas en inglés) Sciex 100 de Perkin Elmer. Los análisis de LC-MS se obtuvieron usando una columna Luna C8(2) (100 x 4,6 mm, Phenomenex) con detección UV a 254 nm usando un programa de gradiente de disolvente estándar (Método B). Se realizó cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés) usando placas de gel de sílice Analtech y se visualizó mediante luz ultravioleta (UV), yodo o ácido fosfomolibdico al 20% en peso en etanol. Los análisis de HPLC se obtuvieron usando una columna Prevail C18 (53 x 7 mm, Alltech) con detección UV a 254 nm usando un programa de gradiente de disolvente estándar (Método A o B).

Método A:

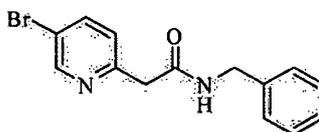
Tiempo (min.)	Flujo (ml/min.)	%A	%B
0,0	3,0	95,0	5,0
10,0	3,0	0,0	100,0
11,0	3,0	0,0	100,0

A = Agua con ácido trifluoroacético al 0,1 v/v
 B = Acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0,1 v/v

Método B:

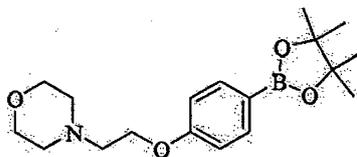
Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	%A	%B
0,0	2,0	95,0	5,0
4,0	2,0	5,0	95,0

A = Agua con ácido trifluoroacético al 0,02 v/v
B = Acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0,02 v/v

Síntesis de *N*-bencil-2-(5-bromopiridin-2-il)acetamida:

- 5 Un matraz se cargó con 5-(5-bromopiridin-2(1H)-iliden)-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona (1,039 g, 3,46 mmol), bencilamina (0,50 ml, 4,58 mmol) y tolueno (20 ml). La reacción se llevó hasta reflujo bajo nitrógeno durante 18 horas, a continuación se enfrió y se puso en un frigorífico hasta que se enfriaba. El producto se recogió y se lavó con hexanos para dar una masa de cristales blancos brillantes (1,018 g, 96%).

Síntesis de 4-(2-(4-(4,4,5,5-tetrametil[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-fenoxi)etil)morfolina:



- 10 Se añadió gota a gota DIAD (2,82 g, 13,9 mmol) una solución agitada de 4-(4,4,5,5-tetrametil[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-fenol (2,55 g, 11,58 mmol), 2-morfolin-4-iletanol (1,60 ml, 1,73 g, 13,2 mmol) y trifenilfosfina (3,64 g, 13,9 mmol) en cloruro de metileno (60 ml) a 0°C. Se dejó que la reacción se enfriara hasta temperatura ambiente y se agitó durante la noche. Después de 18 horas, se añadieron porciones adicionales de trifenilfosfina (1,51 g, 5,8 mmol), 2-morfolin-4-iletanol (0,70 ml, 5,8 mmol) y DIAD (1,17 g, 5,8 mmol). Después de agitar 2 horas adicionales a temperatura ambiente, la reacción se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido (EtOAc del 5% al 25% en CHCl₃) para proporcionar el producto como un sólido blanco (2,855 g, 74%).

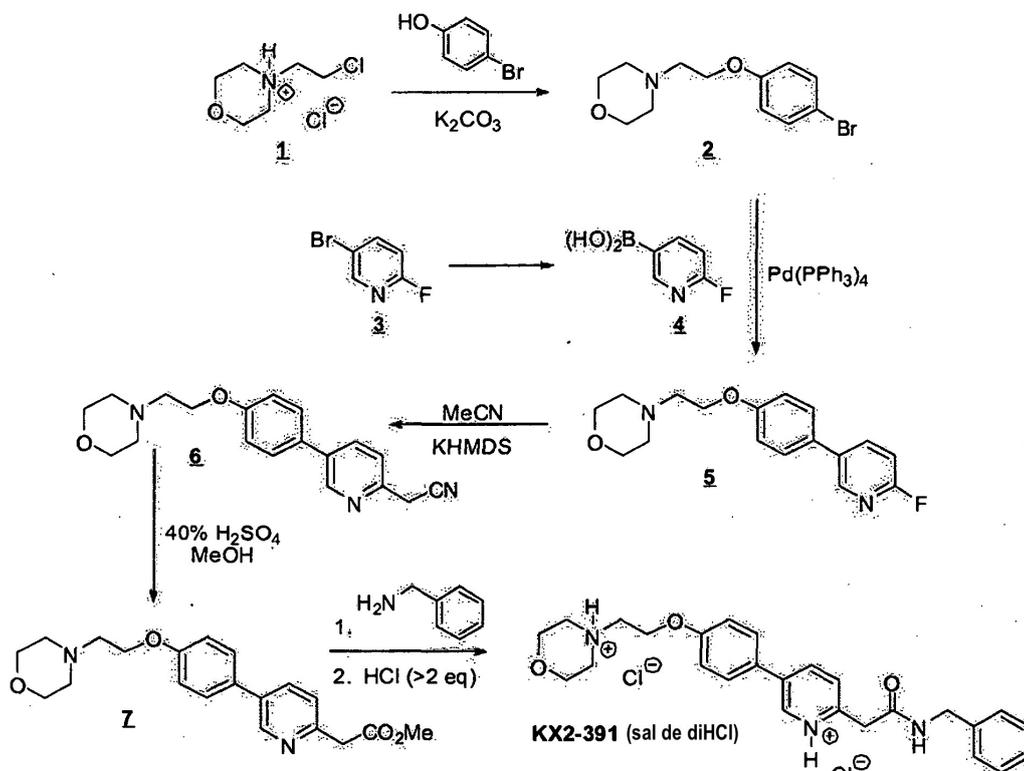
- 20 Un tubo de reacción de 10 ml con un tapón de goma y barra agitadora se cargó con *N*-bencil-2-(5-bromopiridin-2-il)acetamida (123 mg, 0,403 mmol), 4-(2-(4-(4,4,5,5-tetrametil[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-fenoxi)etil)morfolina (171 mg, 0,513 mmol) y FibreCat 1007¹ (30 mg, 0,015 mmol). Se añadió etanol (3 ml), seguido por solución acuosa de carbonato potásico (0,60 ml, 1,0 M, 0,60 mmol). El tubo se cerró herméticamente y se calentó bajo condiciones de microondas a 150°C durante 10 minutos. La reacción se enfrió y se concentró para retirar la mayoría del etanol, y a continuación se recogió en 10 ml de acetato de etilo y se lavó sucesivamente con agua y solución saturada de cloruro sódico. La capa orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró hasta un sólido blanco. Este sólido blanco se trituró con éter etílico para dar KX2-391 como un sólido blanco (137 mg, 79%): pf 135-137°C.; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8,70 (d, 1H, *J*=2,0 Hz), 7,81 (dd, 1H, *J*=2,4 Hz, *J*=8,0 Hz), 7,65 (s an, 1H), 7,49 (d, 2H, *J*=8,8 Hz), 7,37-7,20 (m, 6H), 7,01 (d, 2H, *J*=8,8 Hz), 4,49 (d, 2H, *J*=5,8 Hz), 4,16 (t, 2H, *J*=5,7 Hz, 3,82 (s, 2H), 3,78-3,72 (m, 4H), 2,84 (t, 2H, *J*=5,7 Hz), 2,62-2,58 (m, 4H); HPLC (Método B) 98,0% (AUC), *t_R* = 1,834 min.; APCI MS *m/z* 432 [M+H]⁺.

- 30 ¹ Di(acetato)diciclohexilfenilfosfinapaladio(II) unido a polímero, fabricado por Johnson Matthey, Inc. y disponible de Aldrich (n° de catálogo 590231).

Ejemplo 2: Síntesis a escala intermedia de KX2-391

- 35 La síntesis esbozada en este ejemplo se puede usar en reacciones a escala intermedia. La preparación de lotes de al menos 50 g de la sal de dihidrocloruro de KX2-391 se muestra en el Esquema 1. La síntesis lineal consistía en 6 etapas, siendo una séptima etapa la preparación de uno de los reactivos, ácido 6-fluoropiridin-3-ilborónico (que también está disponible comercialmente). El rendimiento global de la secuencia era 35% con un rendimiento medio

de 83%, siendo la etapa de rendimiento más bajo la de 68%. De las siete etapas solo una requería cromatografía. El procedimiento listado posteriormente se realizó a una escala de 70 g.



La primera etapa es una síntesis de éter de Williamson entre 4-bromofenol (131 g) y N-cloroetilmorfolina (**1** como la sal de HCl; 141 g) usando polvo de K_2CO_3 (de 3 a 3,5 equivalentes) como la base y que tiene acetonitrilo como el disolvente. Los ingredientes se mezclaron y se agitaron a reflujo durante la noche con alta conversión (96,3-99,1%). Después de la dilución con diclorometano y heptano, la mezcla de reacción se filtró y se evaporó para dar el producto deseado **2** con un rendimiento esencialmente cuantitativo (216 g). Nótese que con sustratos similares (p. ej., 4-bromo-3-fluorofenol), las conversiones (incluso con calentamiento intensivo) no siempre eran tan altas (p. ej., 59,9-98,3%). Tanto el cloruro de alquilo como el K_2CO_3 se adquieren preferiblemente de Aldrich. Si el calentamiento continuado no conduce la reacción hasta la terminación, el bromofenol sin reaccionar se puede retirar fácilmente disolviendo la mezcla de reacción en bruto en 4 partes de tolueno y lavando el fenol con 4 partes de NaOH acuoso al 15%.

Uno de los reactivos requeridos para la segunda etapa (acoplamiento de Suzuki) era el ácido 6-fluoropiridin-3-ilborónico (**4**). Aunque estaba disponible comercialmente, este reactivo se preparaba fácilmente mediante intercambio con bromuro de litio de 5-bromo-2-fluoropiridina (**3**) (102 g) con n-butil-litio (1,2 eq) a bajas temperaturas ($<-60^\circ C$) en TBME seguido por la adición de borato de triisopropilo (1,65 eq). Ambas fases de la reacción son breves, con un tiempo de reacción global (incluyendo los tiempos de adición) de ~ 3 h. La desactivación se consigue con NaOH acuoso al 24%, que también extrae el producto dejando impurezas en la capa orgánica. Una vez que se retira la capa acuosa, se neutraliza con HCl y se extrae con EtOAc. Después de secar las fases orgánicas y diluir con algo de heptano, la concentración conduce a precipitación/cristalización del producto. La filtración dio el ácido borónico **4** con una pureza relativamente alta (96,4% del AUC) y buen rendimiento (69 g, 79-90%; véase la nota sobre la estimación del rendimiento en la sección experimental), que se puede usar sin purificación adicional.

La segunda etapa de reacción en la secuencia lineal (un acoplamiento de Suzuki) es una reacción simple de establecer; todos los reactivos [**2** (111 g), Na_2CO_3 acuoso, DME y $Pd(PPh_3)_4$ (0,04 eq)] se cargaron al matraz de reacción y la mezcla se calentó a reflujo; nótese que la mezcla de reacción se desgasificaba para retirar oxígeno. Una vez que la reacción fuera completa (en 7 h), el tratamiento implicaba decantar (o separar con sifón) la solución de reacción de las sales orgánicas en la zona del matraz (no había capa acuosa visible), el matraz se enjuagó y se secó, y el disolvente se retiró de las fases orgánicas combinadas. La cristalización de **5** en bruto en isopropanol/heptano proporcionaba material de pureza mejorada en comparación con el material en bruto, pero todavía requería cromatografía (la relación de gel de sílice a material en bruto era $\sim 8,5:1$) para obtener material de pureza adecuada ($>98\%$); el rendimiento era 68% (79,5 g). El uso de **5** puro evitaba la necesidad de cromatografía en la siguiente etapa, desplazamiento por acetonitrilo del átomo de flúor.

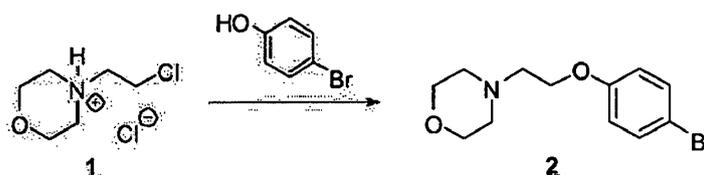
La sustitución de fluoruro por acetonitrilo también era una reacción simple, y una cristalización simple a temperatura ambiente del producto en bruto proporcionó **6** puro con rendimientos y purezas altos. La reacción implicaba la formación inicial del "enolato" a partir de acetonitrilo (6,5 eq) usando hexametildisilano potásico KHMDS (8 eq)/THF a -10°C seguido inmediatamente por la adición del fluoruro **5** (79 g). La reacción era rápida y después de una hora se alcanzaba la desactivación con salmuera saturada. Después del secado y la evaporación del disolvente de las fases orgánicas, la mezcla en bruto resultante consistía en solo dos componentes, el producto deseado y un producto mucho menos polar procedente de la autocondensación aparente de acetonitrilo. La mezcla en bruto se sometió a turbulencia en isopropanol/heptano y se dejó asentar durante la noche, lo que dio como resultado la cristalización completa del producto, que se separó por filtración y se lavó para proporcionar **6** de alta pureza (99,3% del AUC) con buen rendimiento (64 g, 76%).

La metanolisis de **6** (64 g) se efectuó al calentar en H₂SO₄ al 40% (en MeOH) hasta que la reacción se completaba (25 h). A continuación, la reacción se enfrió, se agitó con MgSO₄ para convertir trazas de producto hidrolizado (ArCH₂-CO₂Me) de nuevo en producto, y a continuación se añadió a K₂CO₃ acuoso enfriado, con extracción simultánea en diclorometano. El secado y la evaporación de la mayoría del DCM seguido por la adición de EtOAc al 5% (en heptano) y la concentración adicional dio como resultado la cristalización del producto. La filtración del sólido y el lavado dieron **7** con alta pureza (98,9% del AUC) con buen rendimiento (82%), obteniéndose producto de alta pureza adicional (4 g) a partir de las aguas madres para un rendimiento total de 61,7 g (87%).

La etapa de amidación también implicaba la carga del recipiente de reacción con los ingredientes (**7** (61 g), bencilamina (3 eq) y anisol de alto punto de ebullición) y a continuación el calentamiento a reflujo hasta que la reacción se completaba. El enfriamiento de la mezcla de reacción dio como resultado la cristalización completa del compuesto buscado con alta pureza (98,9%) y buen rendimiento (81%).

La etapa final era la formación de la sal dihidroclórica del compuesto buscado. A fin de asegurar la protonación completa en ambos centros básicos, la reacción se efectuó en etanol absoluto, que disolvía libremente la sal de dihidrocloruro. Después de la evaporación casi hasta sequedad, la mezcla de reacción se "capturó" con etanol dos veces para retirar el exceso de cloruro de hidrógeno. El aceite viscoso resultante se disolvió en etanol (2 partes) y a continuación se añadió, con agitación rápida, a un gran volumen (20 partes) de EtOAc (acetato de etilo). La filtración, el lavado con acetato de etilo (sin heptano) y el secado a vacío proporcionaron la sal de dihidrocloruro de KX2-391 como un polvo blanco crema. Se obtuvo un total de 68 g (rendimiento de 97%) de la sal final con alta pureza (99,6% del AUC), que contenía trazas de EtOAc (4,8% p/p), EtOH (0,3% p/p) y heptano (0,6% p/p; a partir de un lavado final con heptano antes del secado a vacío). Esta sal también se cristalizó (en lugar del método de precipitación descrito anteriormente) en EtOH/EtOAc calientes para proporcionar cuentas cristalinas que tenían niveles muy inferiores de disolvente atrapado (solamente 0,26% p/p de EtOAc y 0,45% p/p de EtOH) y fluían libremente.

Parte experimental

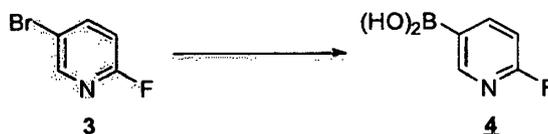


35 Preparación de 4-(2-(4-bromofenoxi)etil)morfolina (**2**):

Un matraz de fondo redondo de tres bocas de 5 l, equipado con agitador mecánico, termómetro con adaptador, condensador y entrada para nitrógeno (en la parte superior del condensador), se cargó con **1** (140,7 g, 0,756 mol), 4-bromofenol (130,6 g, 0,755 mol), polvo de K₂CO₃ anhidro (367,6 g, 2,66 mol, 3,5 eq) y acetonitrilo (1,3 l). La mezcla se agitó vigorosamente (tocando el álabo el fondo del matraz) a 80°C (durante la noche), seguido por dilución con DCM (500 ml) y heptano (200 ml) y filtración a través de Celite. La evaporación hasta sequedad (rotavapor, a continuación alto vacío) dio **2** como un aceite amarillo claro (216,00 g, rendimiento de 100%, 96,3% del AUC, contiene 3,7% de bromofenol sin reaccionar). Este material se usó satisfactoriamente sin purificación adicional.

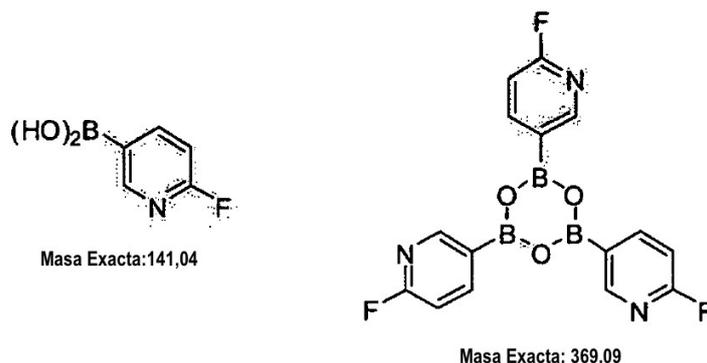
¹H NMR (CDCl₃) δ 2,57 (t, 4 H), 2,79 (t, 2 H), 3,73 (t, 4 H), 4,08 (t, 2 H), 6,78 (d, 2 H), 7,37 (d, 2 H). MS (a partir de LC/MS): m/z 287,1 [M + 1].

45 Que el bromofenol se puede retirar fácilmente se demostró sobre una muestra de 2 g al disolver en primer lugar la muestra en tolueno (8 g) y lavar con 8 g de NaOH acuoso al 15%; la cromatografía de líquidos no mostraba traza de bromofenol sin reaccionar en el producto recuperado (1,97 g; 98,5% de recuperación).

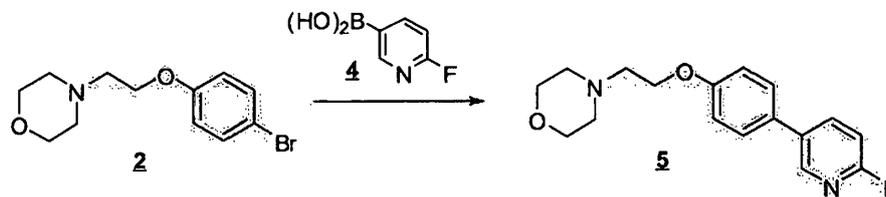


Preparación de ácido 6-fluoropiridin-3-ilborónico (**4**):

Se añadió (a través de una jeringa) BuLi 2 M (352 ml, 0,704 mol, 1,2 eq) a [TBME] anhidro (baño de hielo seco-acetona) agitado y enfriado (620 ml; en un matraz de fondo redondo de tres bocas de 3 l equipado con agitador mecánico, sonda de temperatura con adaptador, y entrada para nitrógeno). Se añadió una solución de **3** (102,2 g, 0,581 mol) en TBME anhidro (100 ml) a esta mezcla rápidamente agitada y enfriada (< -75°C) a lo largo de un período de 13 min., tiempo durante el cual la temperatura interna ascendía hasta -62°C. La reacción se agitó durante otros 45 min. (la temperatura se mantuvo entre -62°C y -80°C), seguido por la adición rápida y secuencial de cuatro porciones de borato de triisopropilo (total de 180 g, 0,957 mol, 1,65 eq). Al final de la adición, la temperatura interna había ascendido hasta -33°C. Después de agitar 45 min. adicionales sobre el baño frío (la temperatura interna disminuía desde -33°C hasta -65°C), el baño frío se retiró y la mezcla agitada ascendía por sí misma hasta -22°C a lo largo de un período de 50 min. Después de calentar (a través de un baño de agua) hasta 6°C a lo largo de un período de 15 min., la mezcla de reacción agitada se puso en un baño de agua de hielo y a continuación se desactivó bajo nitrógeno con una solución enfriada de NaOH (160 g) en agua (500 ml). Una vez que se completaba la adición, la temperatura interna era 20°C. Esta mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. La capa acuosa se retiró, se neutralizó hasta pH 7 con ~350 ml de HCl concentrado y a continuación se extrajo con EtOAc (3 x 1 l). Debido a que el pH era ahora 8-9, la capa acuosa se ajustó hasta pH 7 usando ~15 ml de HCl concentrado y se extrajo adicionalmente (2 x 1 l) con acetato de etilo. Los extractos de EtOAc combinados se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron hasta un volumen de ~150 ml. Con turbulencia del concentrado, se añadió heptano en porciones (volumen total de 300 ml) dando como resultado la precipitación/cristalización del producto. La filtración, el lavado del sólido con heptano (100 ml, 300 ml, a continuación otros 300 ml) y el secado al aire dieron el producto del epígrafe como un sólido blancuzco (68,6 g, rendimiento de 79-90%*; pureza por LC de 96,4%, la NMR mostraba un 5,5% p/p estimado de heptano), que se usó satisfactoriamente sin purificación adicional. La LC/MS mostraba que era una mezcla de las dos entidades siguientes, siendo mayor la intensidad de la entidad de mayor peso molecular (*Nota: el rendimiento de la reacción es 79% si se supone que el ácido borónico es el único constituyente y es 90% si se supone que el borato cíclico es el único constituyente):



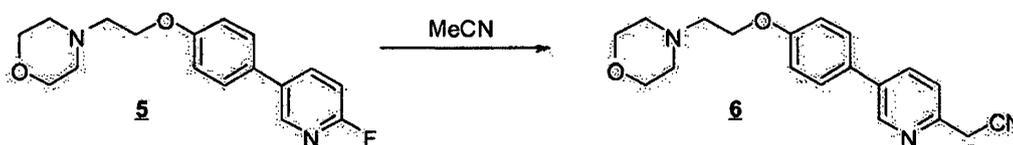
¹H NMR (CDCl₃) δ 7,14 (dd, 1 H), 8,27 (ddd, 1 H), 8,39 (s an, 2 H, 2 OH), 8,54 (d fino, 1 H). MS (a partir de LC/MS): m/z 143,0 [M + 1; para el ácido borónico] y 370,0 [M + 1; para el borato cíclico anterior].

30 Preparación de 4-(2-(4-(6-fluoropiridin-3-il)fenoxi)etil)morfolina (**5**):

Un matraz de fondo redondo de tres bocas de 2 l equipado con agitador mecánico, termómetro y adaptador, condensador y entrada para nitrógeno (en la parte superior del condensador) se cargó con **2** (110,7 g, 0,387 mol), **4** (71,05 g, 0,477 mol, 1,23 eq) y DME (700 ml). La solución agitada resultante se desgasificó al hacer pasar una corriente rápida de nitrógeno a través de la solución agitada a lo largo de un período de 5 min. seguido por la adición de una solución desgasificada de Na₂CO₃ (121,06 g, 1,142 mol, 3 eq) en H₂O (250 ml) y también Pd(PPh₃)₄ sólido (19,8 g, 0,044 eq). Inmediatamente después de la última adición, el espacio libre por encima de la mezcla de reacción se purgó con nitrógeno y a continuación la mezcla se agitó a 80-85°C (temperatura interna) durante 7 h, seguido por enfriamiento hasta temperatura ambiente. Debido a la falta de una capa acuosa, el sobrenadante se decantó, dejando las sales inorgánicas (con agua adsorbida). El matraz de reacción con las sales inorgánicas se lavó con diclorometano al 50%/acetato de etilo (2 x 250 ml), añadiéndose los lavados al sobrenadante decantado.

Estas fases orgánicas combinadas se secaron (Na_2SO_4), se filtraron y se evaporaron hasta sequedad hasta un aceite pardo oscuro (148 g). Se añadieron a este aceite 150 g de heptano al 50%/alcohol isopropílico (IPA) y, después de la turbulencia y el enfriamiento (a través de un baño de agua de hielo), comenzaba la cristalización. Se añadió heptano adicional (50 g) y el sólido resultante se filtró, se lavó y se secó al aire para dar 48 g de un sólido pardo claro. Después de evaporar el filtrado hasta sequedad, la mezcla resultante se sometió a turbulencia en 100 ml de heptano al 50%/IPA seguido por la adición de más heptano (~100 ml), la tapadura y la colocación en el refrigerador para la cristalización. El sólido resultante se filtró, se lavó con heptano y se secó al aire para dar 61 g de un sólido gomoso. La evaporación del filtrado resultante dio un aceite (34 g) que contenía impurezas menos polares significativas incluyendo $\text{Ph}_3\text{P}=\text{O}$ y así se repartió entre HCl 2 N (240 ml) y EtOAc (220 ml). La capa acuosa inferior se retiró y a continuación se agitó con EtOAc mientras se neutralizaba con K_2CO_3 hasta un pH de 7-8. La capa de EtOAc se seco, se filtró y se evaporó hasta sequedad (22 g). Las porciones de 48 g, 61 g y 22 g se cromatografiaron sobre gel de sílice (1,1 kg) rellenas en DCM. La elución con DCM (400 ml), DCM al 50%/EtOAc (5 l) y a continuación DCM al 50%/EtOAc (8 l) que contenían cantidades crecientes de MeOH/ Et_3N (empezando con MeOH al 1,5%/Et₃N al 1% y terminando con MeOH al 5%/Et₃N al 3%) dieron 77,68 g de un aceite viscoso (pureza 98,0%) que cristalizó inmediatamente al someter a turbulencia en heptano (300 ml). La filtración, el lavado con heptano y el secado al aire dieron 75,55 g (98,7% del AUC) de **5** sólido. Se obtuvo **5** puro adicional (total de 3,9 g, 98,6-99,3% del AUC) a partir de fracciones cromatográficas previas que contenían $\text{Ph}_3\text{P}=\text{O}$ depurándolas como se hizo para la muestra de 34 g anterior, seguido por cristalización evaporativa. El rendimiento total de **5** era 79,5 g (68%).

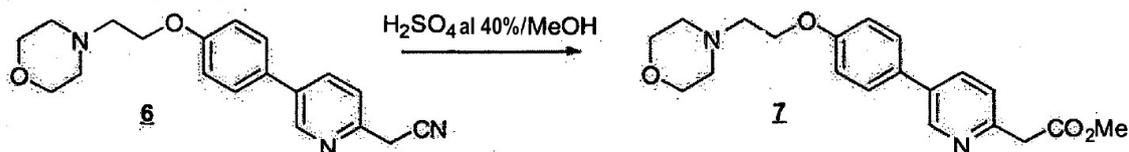
^1H NMR (CDCl_3) δ 2,59 (t, 4 H), 2,84 (t, 2 H), 3,75 (t, 4 H), 4,16 (t, 2 H), 6,97 (dd, 1 H), 7,01 (d, 2 H), 7,46 (d, 2 H), 7,92 (ddd, 1 H), 8,37 (d fino, 1 H). MS (a partir de LC/MS): m/z 303,2 [$\text{M} + 1$].



Preparación de 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetonitrilo (**6**):

Un matraz de fondo redondo de tres bocas de 3 l equipado con agitador mecánico, termómetro y adaptador, embudo adicional y una entrada para nitrógeno (sobre el embudo de adición, presión positiva a través de un burbujeador). Pasando una corriente rápida de nitrógeno a través del burbujeador, el tapón se retiró y el matraz se cargó con KHMDS (415,8 g, 2,08 mol) y a continuación THF anhidro (1 l). Se añadió gota a gota una solución de MeCN (70 g) en THF (110 ml) a la solución de KHMDS/THF agitada y enfriada (baño de hielo/metanol, la temperatura interna de la solución era -8°C) a lo largo de un período de 22 min. seguido inmediatamente por la adición relativamente rápida (4 min.) de **5** (79,06 g, 0,262 mol) en THF (400 ml), tiempo después del cual la temperatura interna de la mezcla de reacción había alcanzado 10°C . Con enfriamiento continuado (1 h), la temperatura interna era -6°C y mediante TLC la reacción parecía completa. Después de 30 min. adicionales (temperatura interna de -3°C), la mezcla de reacción se desactivó con salmuera saturada (1 l) y se diluyó con EtOAc (500 ml). Después de retirar la capa acuosa, la solución orgánica se secó (Na_2SO_4), se filtró y se evaporó hasta sequedad (hasta un aceite) seguido por disolver completamente en IPA (150 ml), diluir con heptano (300 ml), añadir cristales seminales (preparados al disolver ~100 mg de aceite en bruto en IPA (~150 mg) y diluir con heptano (~2,5 ml)) y dejar reposar durante la noche. Después de agitar para romper el sólido cristalino, el sólido se filtró, se lavó con 250 ml de heptano/IPA 2:1 y a continuación múltiples lavados con heptano y secado al aire para dar 64,38 g (rendimiento de 76%) del producto del epígrafe **6** como un sólido cristalino de color canela (pureza por LC de 99,3%). Se obtuvieron del filtrado otros 5,88 g de material menos puro.

^1H NMR (CDCl_3) δ 2,59 (t, 4 H), 2,84 (t, 2 H), 3,74 (t, 4 H), 3,97 (s, 2 H), 4,17 (t, 2 H), 7,02 (d, 2 H), 7,46 (d, 1 H), 7,51 (d, 2 H), 7,87 (dd, 1 H), 8,77 (d fino, 1 H). MS (a partir de LC/MS): m/z 324,4 [$\text{M} + 1$].

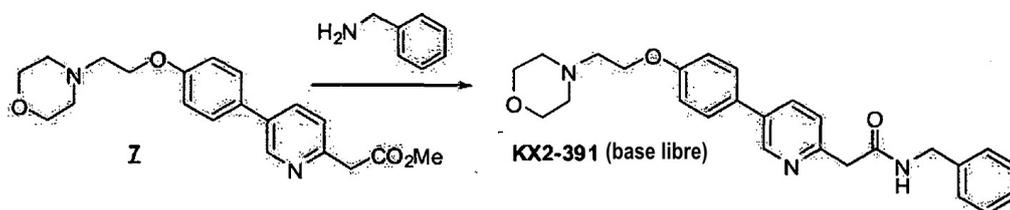


Preparación de 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetato de metilo (**7**):

Un matraz de fondo redondo de una boca de 2 l se cargó con **6** (64,00 g, 0,198 mol) y MeOH (360 g) seguido por la adición lenta, cuidadosa y gota a gota de H_2SO_4 (240 g) y la solución homogénea resultante se agitó a reflujo (baño de aceite de 115°C) hasta que se completó la reacción (25 h con 0,8% de materia prima sin reaccionar) con $\text{ArCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ al 3,5%. Después de un enfriamiento breve, se añadió MgSO_4 (75 g) y la mezcla se sometió a

turbulencia y se dejó reposar 45 min. adicionales (composición ahora 96,3% de producto, 0,8% de materia prima sin reaccionar y 2,5% de ArCH₂CO₂H). A continuación, la mezcla de reacción se añadió lentamente a una mezcla rápidamente agitada y enfriada (baño de agua de hielo) de DCM (2 l) y una solución de K₂CO₃ (450 g) en H₂O (600 ml). La emulsión resultante se dejó reposar durante la noche. Las porciones transparentes de solución orgánica se separaron con sifón y las porciones restantes se trataron repetitivamente con agua y DCM, combinándose las fases orgánicas transparentes con la porción original que se separaba con sifón. Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron hasta un volumen de ~1,2 l seguido por la adición de 300 ml de EtOAc al 5% (en heptano) y a continuación heptano (300 ml) y la mezcla se concentró (rotavapor con calor) de nuevo para retirar el DCM. En este punto, se añadieron 15 ml de EtOAc y la mezcla caliente se sometió a turbulencia hasta que hubo comenzado la cristalización, la turbulencia continuó hasta que la cristalización era casi completa, y a continuación se dejó reposar y enfriar hasta temperatura ambiente para la cristalización completa. A continuación, el sólido se filtró, se lavó con 300 ml de EtOAc al 5% (en heptano) y heptano (100 ml) y a continuación se secó completamente al aire para dar 57,74 g (rendimiento de 82%) de **Z** como un sólido amarillo claro (98,9% del AUC). Se obtuvieron otros 3,94 g de producto puro (97,9% del AUC) a partir del filtrado (rendimiento total de 87%).

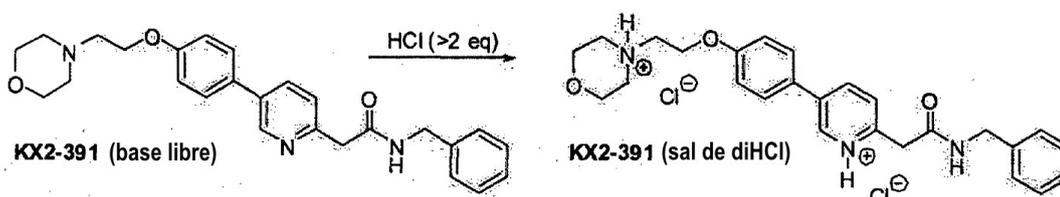
¹H NMR (CDCl₃) δ 2,60 (t, 4 H), 2,84 (t, 2 H), 3,74 (t y s solapados, 6 H), 3,89 (s, 2 H), 4,17 (t, 2 H), 7,01 (d, 2 H), 7,34 (d, 1 H), 7,49 (d, 2 H), 7,80 (dd, 1 H), 8,74 (d fino, 1 H). MS (a partir de LC/MS): *m/z* 357,4 [M + 1].



Preparación de N-bencil-2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetamida (base libre de KX2-391).

Un matraz de fondo redondo de una boca de 1 l se cargó con **7** (61,4 g, 0,172 mol), bencilamina (55,6 g, 0,519 mol, 3 eq) y anisol anhidro (300 g) y a continuación se agitó a reflujo hasta que la reacción se completaba esencialmente (23 h, temperatura del baño de aceite 165°C; la temperatura interna era 147°C) y a continuación se dejó enfriar hasta cerca de la temperatura ambiente. Una porción (1 ml) de la mezcla de reacción se diluyó con tolueno (1 ml) dando como resultado la cristalización completa de esa porción. Esta semilla se añadió a continuación a la mezcla de reacción y se dejó reposar hasta que toda la mezcla de reacción había cristalizado en un solo bloque. Se añadió tolueno (150 ml) y la mezcla se sometió a turbulencia para romper el sólido. Se añadió heptano/tolueno (1:1, 100 ml) y la mezcla sólida se rompió más. Finalmente, se añadió heptano (50 ml, a continuación 25 ml) y la mezcla se rompió aún más, dejando reposar 30 min. adicionales antes de filtrar el sólido. La filtración del sólido, el lavado con tolueno/heptano 2:1 (300 ml), tolueno/heptano 1:2 (300 ml) y a continuación heptano (2 x 300 ml) y a continuación el secado (aire, a continuación alto vacío) dieron 60,16 g (rendimiento de 81%) del producto del epígrafe como un sólido blanco (>98,9% del AUC). Se obtuvieron otros 2,5 g de material menos puro (97,4%) a partir de las aguas madres.

¹H NMR (CDCl₃) δ 2,60 (t, 4 H), 2,83 (t, 2 H), 3,74 (t, 4 H), 3,82 (s, 2 H), 4,18 (t, 2 H), 4,49 (d, 2 H), 7,01 (d, 2 H), 7,2-7,35 (m, 6 H), 7,49 (d, 2 H), 7,64 (t an, 1 H), 7,81 (dd, 1 H), 8,69 (d fino, 1 H). MS (a partir de LC/MS): *m/z* 432,5 [M + 1].



Preparación de cloruro de 4-(2-(4-(6-(2-(bencilamino)-2-oxoetil)piridinio-3-il)fenoxi)etil)-morfolin-4-ilo (KX2-391, sal de diHCl).

Se añadieron 170 ml de HCl 2,5 M (en etanol) a una suspensión agitada de KX2-391 (base libre, 60,00 g) en EtOH absoluto (600 ml), añadiéndose 25 ml de EtOH para lavar las paredes del matraz. La solución homogénea resultante se agitó a temperatura ambiente (20 min) y a continuación se evaporó casi hasta sequedad (hasta la formación de espuma). Después de capturar con EtOH (2 x 150 ml), el residuo se recogió de nuevo en EtOH (150 ml) y a continuación fue seguido por la adición lenta de heptano hasta que la mezcla parecía saturada (se requerían 33 ml para que permaneciera la turbidez). Después de asentar durante la noche, se habían formado dos capas. Después de añadir heptano adicional (250 ml), ya no se podía inducir cristalización y así la mezcla de reacción concentró

5 hasta un volumen de ~200 ml, momento en el cual la mezcla era homogénea. Esta solución homogénea espesa se
añadió gota a gota a EtOAc (2 l) agitado muy rápidamente (mecánicamente). Después de que se completara la
adición, se añadió un enjuague de 25 ml de EtOH del matraz original y el embudo de adición a la mezcla agitada
rápidamente. La agitación rápida se continuó durante otra ~1 h y a continuación la mezcla se filtró y el sólido
10 (parcialmente gomoso) se lavó con EtOAc (300 ml) y a continuación heptano. Tan pronto como comenzaba el lavado
de heptano, el sólido se volvía mucho más gomoso. El embudo de Buchner fritado y su contenido se cubrieron
(toalla de papel/banda de goma) y se pusieron inmediatamente en el horno de vacío. Después de un vacío durante
la noche a ~45°C, el vacío se liberó bajo nitrógeno, y el embudo de Buchner que contenía el producto (sólido
15 espumoso) se puso inmediatamente en una bolsa de cierre de cremallera y a continuación, bajo nitrógeno (bolsa con
guantes), se transfirió a una botella y el sólido espumoso se rompió (espátula) hasta un polvo. Una segunda noche
bajo alto vacío (~45°C) dio como resultado solamente 1,3 g de pérdida de peso adicional. El peso constante se
alcanzaba esencialmente con la tercera noche de alto vacío (~45°C) en la que solo se perdían 0,2 g de peso. El
peso final del material era 68,05 g (rendimiento de 97%), que contenía 0,29 eq (4,8% p/p) de EtOAc, 0,035 eq (0,3%
p/p) de EtOH y 0,03 eq (0,6% p/p) de heptano. La pureza era 99,6%. ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 3,1-3,3 (m, 2 H), 3,45-
3,65 (m, 4 H), 3,8-4,0 (m, 4 H), 4,11 (s, 2 H), 4,32 (d, 2 H), 4,57 (t, 2 H), 7,19 (d, 2 H), 7,2-7,4 (m, 5 H), 7,88 (d, 2 H),
7,93 (d, 1 H), 8,68 (dd, 1 H), 8,99 (t an, 1 H), 9,10 (d fino, 1 H), 11,8 (s an, 1 H). MS (a partir de LC/MS): *m/z* 432,5
[M + 1 de base libre].

Análisis elemental (para C₂₆H₂₉N₃O₃ • 2 HCl • 0,035 EtOH • 0,29 EtOAc • 0,03 heptano • 0,8 H₂O):

- a. Calculado (%): C, 60,03; H, 6,54; N, 7,65; Cl, 12,91
- 20 b. Observado (%): C, 59,85/59,97; H, 6,54/6,47; N, 7,67/7,67; Cl, 13,10/13,24 Peso fórmula calculado: 534,63
(no tiene en cuenta los 0,8 H₂O que probablemente surgían durante el manejo de este polvo muy
higroscópico, puesto que la ¹H NMR no muestra evidencia de H₂O). Se midió el nivel de cloruro de etilo en
este material y se encontró que era 98 ppm. También se analizó la muestra y se encontró que contenía 5.800
ppm de heptano.
- 25 El análisis de otra porción de esta muestra dio los siguientes resultados: 99,6% del AUC, 1.640 ppm de etanol,
41.480 ppm de acetato de etilo, 5.600 ppm de heptano, no se detectó anisol, y 120 ppm de cloruro de etilo.

También se desarrolló un procedimiento para recrystallizar la sal usando la sal secada anteriormente. Este
procedimiento funcionaría igual de bien en la sal en bruto muy pura (que contiene EtOH residual) obtenida de
concentrar la mezcla de reacción que forma la sal de HCl:

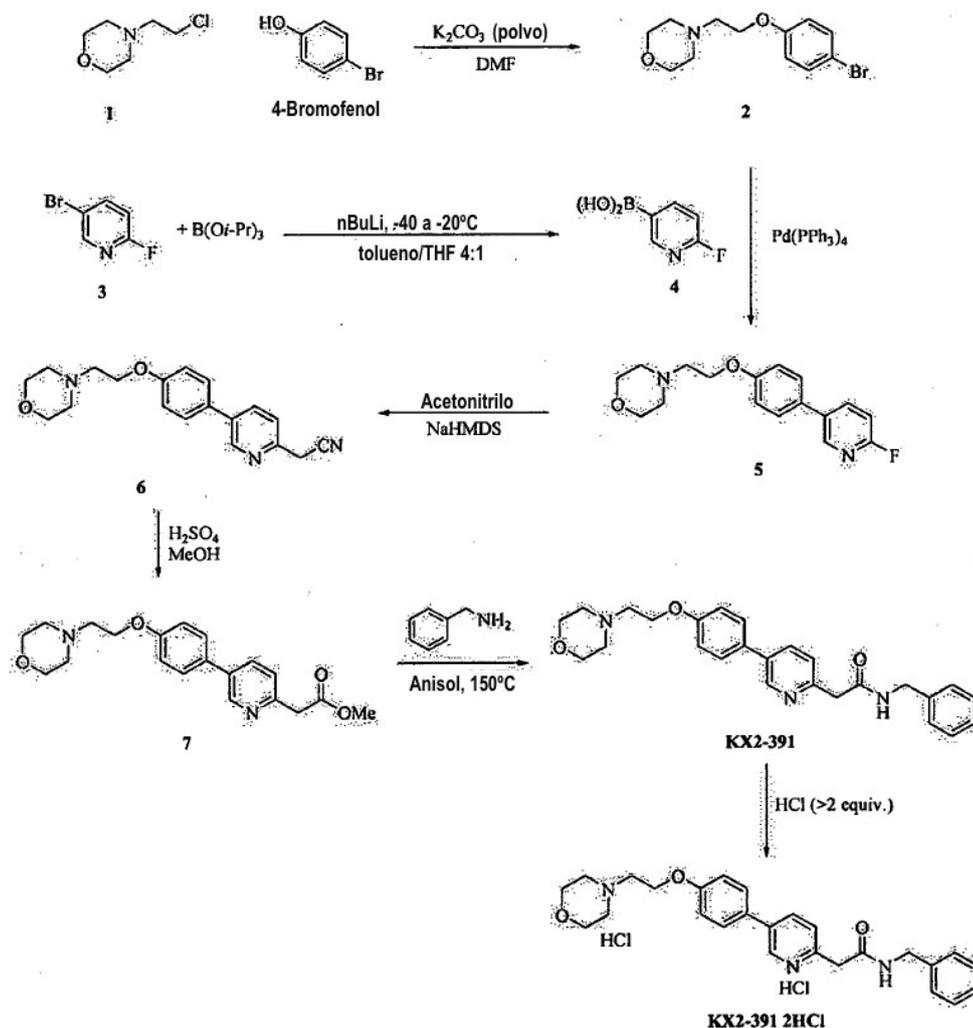
- 30 La sal (575 mg) se disolvió en dos veces la masa de EtOH absoluto (1,157 g) y a continuación se calentó bajo
nitrógeno. Se añadieron 1,6 g de EtOH al 25% (en EtOAc) a esta solución caliente (agitada) seguido por la adición
de EtOAc (0,25 ml), dando como resultado una turbidez que se mantenía. La solución caliente turbia se dejó enfriar
hasta temperatura ambiente, tiempo durante el cual se producía la cristalización. Después de que se completara la
35 cristalización (2 h), el sólido cristalino se filtró, se lavó con EtOAc anhidro (~40 ml) y se secó a vacío para dar 424
mg de la sal de dihidrocloruro de KX2-391 como un sólido que fluye libremente (cuentas diminutas, 99,8% del AUC)
que contiene sólo 0,05 eq (0,45% p/p) de EtOH y 0,015 eq (0,26% p/p) de EtOAc. Se obtuvo una recuperación
ligeramente mejor (460 mg a partir de 586 mg) usando isopropanol/EtOAc pero el nivel de atrapamiento de
disolvente era superior [0,085 eq (1,0% p/p) de isopropanol y 0,023 eq (0,4% p/p) de EtOAc].

Ejemplo 3: Síntesis a gran escala de KX2-391

- 40 Este ejemplo describe el desarrollo de una ruta sintética para la preparación de KX2-391.2HCl a una escala de al
menos 100 g. Este procedimiento se puede usar, por ejemplo, para producir cantidades de material en kilogramos.
La ruta final se representa en el Esquema 1. La ruta tiene seis etapas e incluye una formación de éter, un
acoplamiento de Suzuki, un desplazamiento de fluoruro y una solvatación catalizada por ácido. Este procedimiento
se probó a una escala de una partida de demostración de 105 g.

45

Esquema 2. Preparación de KX2-391 2HCl



Etapa 1: Preparación de 4-(2-(4-bromofenoxi)etil)morfolina (2)

Se desarrollaron varias modificaciones para el procedimiento descrito en el Ejemplo 2 para la síntesis del éter. Cuando la síntesis del éter se efectuaba en acetonitrilo como disolvente, la mezcla de reacción era una suspensión muy espesa y difícil de agitar. Por lo tanto, el disolvente se cambió por dimetilformamida (DMF), que generaba una suspensión blanca diluida más manejable. También se determinó que no eran esenciales condiciones rigurosamente secas, por ejemplo, 0,3 volúmenes de agua desionizada (DI) sin efectos perjudiciales en la pureza o el rendimiento de la reacción. Debido a los cambios en el disolvente de reacción por DMF, también se modificaba el tratamiento. El tratamiento modificado implicaba ahora la dilución con agua DI y la extracción con MTBE. También era conveniente efectuar un lavado básico con hidróxido sódico acuoso para retirar cualquier 4-bromofenol restante. La síntesis del éter se aumentó a escala para convertir 3.435 g de hidrocloreuro de 4-(3-cloropropil)morfolina en 4.800 g de 4-(2-(4-bromofenoxi)etil)morfolina (2). La pureza mediante HPLC (% del AUC) era 99,9%.

Etapa 2: Preparación de ácido 6-fluoropiridin-3-ilborónico (4)

La formación del ácido borónico 4 se mejoró de varios modos al cambiar el orden de adición y los disolventes. El procedimiento inicial requería añadir una solución de $n-BuLi$ en hexanos a una solución fría de MTBE. A continuación, la solución aniónica se enfrió hasta menos de $-75^\circ C$ y se añadió lentamente una segunda solución de 5-bromo-2-fluoropiridina en MTBE. Se añadió borato de triisopropilo en porciones en una secuencia rápida a la mezcla resultante. Este procedimiento no era propenso al aumento a escala debido a la rápida adición del borato de triisopropilo. El desarrollo de este procedimiento tenía prioridad al seguir un procedimiento publicado (Li, et al., J. Org. Chem. 2002, 67, 5394-5397). Una mejora era premezclar 5-bromo-2-fluoropiridina y borato de triisopropilo en una solución de tolueno y THF. La mezcla se enfrió entre -50 y $-35^\circ C$ y a continuación se añadió una solución de $n-BuLi$ para formar el anión arilo que a continuación se desactivó in situ mediante borato de triisopropilo para formar el borato de arilo. Este procedimiento no solo controlaba el episodio exotérmico, sino que también conducía a

temperaturas más calientes que menos de -75°C como se describe previamente. Se pensó que si se obtenían temperaturas más calientes durante la reacción, se observaría una reacción de eliminación competitiva de HBr del bromobutano. No se exploró si el n.BuLi o el anión arilo era la base en la reacción secundaria. El tratamiento se modificó al añadir una extracción con hidróxido sódico acuoso en lugar de solo ácido clorhídrico acuoso. Las extracciones acuosas se combinaron cuidadosamente, lo que daba como resultado que solo se necesitaba un pequeño ajuste del pH.

La preparación de ácido 6-fluoropiridin-3-ilborónico (**4**) avanzó bien para convertir 5.050 g de 5-bromo-2-fluoropiridina para dar 3.515 g del ácido borónico **4** en 3 partidas. Los detalles se pueden observar en la Tabla 3.

Etapas 3: Preparación de 4-(2-(4-(6-fluoropiridin-3-il)fenoxi)etil)morfolina (**5**)

Al realizar las reacciones de acoplamiento de paladio a menor escala, se apreció que se formaban sólidos sobre las paredes de vidrio del reactor. Debido a que los sólidos actuarían como un aislante, el aumento a escala de esta reacción podría dar como resultado un sobrecalentamiento del reactor. Se acometieron dos enfoques para evitar el sobrecalentamiento. La cantidad de agua añadida a la reacción se incrementó de 2,3 a 4,0 volúmenes y, cuando la reacción se efectuaba a una escala de kilogramos, se usó un termopar adicional entre el reactor y la manta calentadora para controlar el calentamiento si se alcanzaba una temperatura umbral. La reacción de acoplamiento se completó en dos partidas, de modo que un total de 5.269 g de 4-(2-(4-bromofenoxi)etil)morfolina se convertía en 5.735 g de 4-(2-(4-(6-fluoropiridin-3-il)fenoxi)etil)morfolina, y la pureza mediante HPLC de las partidas era 94,9 y 90,3 (% del AUC).

Etapas 3a: Purificación de 4-(2-(4-(6-fluoropiridin-3-il)fenoxi)etil)morfolina (**5**)

El producto en bruto procedente del acoplamiento de paladio se purificó mediante cromatografía en gel de sílice. El material (5.735 g) se purificó en siete columnas para dar el compuesto **5** como un sólido pardo claro (4.220 g, 97,6 de AUC por HPLC), y el nivel de paladio era 0,2% en peso. En la partida para toxicología, se observaron niveles de paladio de 7 y 11 ppm en la fase del compuesto **5** purificado.

Etapas 4: Preparación de 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetonitrilo (**6**)

Se realizaron varias modificaciones en el desarrollo de una reacción de desplazamiento de fluoruro aumentable a escala. La reacción de desplazamiento requería hexametildisilano potásico (KHMDs), que no estaba disponible comercialmente como una solución en THF. Por lo tanto, la reacción requería preparar la mezcla a partir del sólido. Esta operación sería indeseable para una reacción a gran escala. Se evaluaron tres cationes diferentes (LiHMDS, KHMDs y NaHMDS). El LiHMDS dio como resultado una mezcla de reacción de color pardo oscuro, sin conversión observada. El NaHMDS se comportaba de forma equivalente a KHMDs. Están fácilmente disponibles soluciones en THF de NaHMDS.

El uso de un gran exceso de base (KHMDs, 8 equiv.) y nucleófilo (acetonitrilo, 6,5 equiv.) en reacciones a menor escala no estaba de acuerdo con lo que se ha presentado en la bibliografía con sistemas similares (2 equivalentes de base y 1 equivalente del nucleófilo: véase Klapars, et al., J. Org. Chem. 2005, 70, 10186-10189). Disminuir los equivalentes de NaHMDS y acetonitrilo en proporción dio como resultado conversiones incompletas. Sin embargo, se apuntaba que la reacción se podía llevar hasta la terminación cuando se añadían equivalentes adicionales de base y acetonitrilo. Inicialmente en el desarrollo, el compuesto **5** en THF se añadió rápidamente a una solución de acetonitrilo y base. Las adiciones rápidas a escala no serían aceptables o plausibles. Los tiempos de espera y los tiempos de adición se prolongaron a pequeña escala para simular los tiempos de espera y el tiempo de adición requeridos a escalas mayores. Con tiempos de adición y tiempos de espera más prolongados, las conversiones se deterioraban mucho, de 43 a 5%, respectivamente. Mantener la solución de base y acetonitrilo durante 2 h antes de añadir una solución de **5** proporcionaba rápidamente conversiones pobres (5%). La base y el acetonitrilo no son compatibles y dan como resultado la degradación de los reactivos. Por lo tanto, el orden de adición de reactivos se cambió de modo que la base y el compuesto **5** se premezclaran y el acetonitrilo se añadiera lentamente. La reacción realizada usando el nuevo procedimiento dio como resultado una conversión consecuentemente en los 90. Los equivalentes mínimos de NaHMDS y acetonitrilo usados satisfactoriamente eran 5 equivalentes y 4 equivalentes, respectivamente. Se alcanzaba una disminución de 40% en los equivalentes tanto de base como de acetonitrilo.

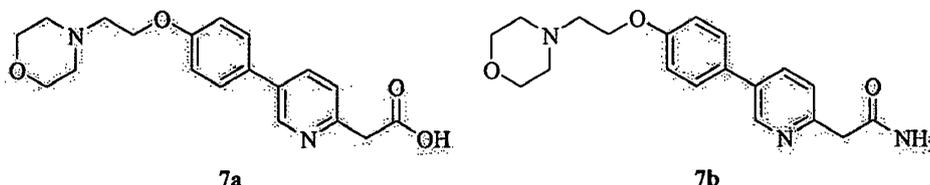
Etapas 5: Preparación de 2-(5-(4-(2-morfolindetoxi)fenil)piridin-2-il)acetato de metilo (**7**)

Típicamente, la metanolisis catalizada por ácido del nitrilo **6** daba como resultado una pequeña cantidad del ácido carboxílico **7a**. Un enfoque adoptado para retirar agua ventajosa, una fuente probable de **7a**, era añadir ácido sulfúrico fumante a la mezcla de reacción de metanol y ácido sulfúrico concentrado. El ácido sulfúrico concentrado se suministra normalmente como una solución al 95-98%. El ácido sulfúrico fumante retira el 2-5% de agua contenida en el ácido sulfúrico. Usar la mezcla de ácido sulfúrico concentrado y fumante proporcionaba consecuentemente menos de 6% del ácido carboxílico **7a** como un subproducto, que se retiraba fácilmente con tratamiento acuoso.

Desactivar la reacción bajo condiciones acuosas requería una atención cuidadosa para evitar generar el ácido carboxílico **7a**. La estabilidad del éster **7** se determinó a pH 1, 9 y 13-14 al agitar en metanol y agua durante 18 h

cada uno. Después de 18 h, había 19% de conversión en **7a** a pH 1, 37% de conversión a pH 9 y 100% de conversión a pH 13-14. La reacción se desactivó al añadir una mezcla agitada de bicarbonato sódico saturado y diclorometano asegurando mantener la temperatura por debajo de 20°C.

- 5 Conviene destacar que durante una reacción a pequeña escala en la que el metanol se evaporaba por equivocación, se formaba una nueva impureza atribuida a la amida **7b** por los datos de LC/MS. Un procedimiento precedente para preparar amidas a partir de nitrilos es tratar con ácido sulfúrico concentrado (Sarel, S., J. Am. Chem. Soc., 1956, 79, 5416).



Etapa 6: Preparación de KX2-391

- 10 El procedimiento para la formación de amida descrito para la reacción a media escala funcionaba bien a gran escala. El éster metílico **7** y bencilamina (3 equiv.) se disolvieron en anisol y se calentaron a 150°C durante casi 2 días. Sin embargo, el aislamiento del producto usando el procedimiento a media escala puede dar como resultado una masa sólida de producto. Para evitar este problema, la mezcla de reacción no se enfriaba hasta temperatura ambiente, sino que se enfriaba hasta 45-50°C antes de añadir el antisolvente. Se usaban tolueno y heptano como
- 15 antisolvente en el procedimiento original. Usar *n*-heptano solo proporcionaba una pureza adecuada y rendimientos incrementados de 81 a 90%. Además, el uso de un solo isómero de heptano era esencial para cuantificar adecuadamente el disolvente residual.

Etapa 7: Preparación de KX2-391·2HCl

- 20 Debido a la naturaleza higroscópica del KX2-391·2HCl, se adoptaron precauciones adicionales a fin de preparar la reproducibilidad de la sal de bis-HCl. Se formó una solución de HCl seco en etanol al añadir cloruro de acetilo a etanol absoluto. A continuación, la base libre de KX2-391 se trató con esta solución bajo una atmósfera de nitrógeno. Se emplearon a continuación concentración y secado azeotrópico. Sin embargo, la cristalización de KX2-391·2HCl no se obtenía reproduciblemente. Se usaron varios disolventes diferentes, por ejemplo, IPA (alcohol isopropílico), acetato de etilo/IPA, etanol, propanol y alcohol butílico (Tabla 1). Los experimentos de la Tabla 1 son
- 25 los intentos iniciales para explorar diferentes condiciones de cristalización y precipitación. Las condiciones experimentales finales que producían los dos lotes presentados (E y F) se seleccionaron basándose en esta información.

Tabla 1: Estudio de cristalización de KX2-391 2HCl

Expt	Condiciones de Formación de Sal				Condiciones de Cristalización					Comentarios
	Amida (g)	Lote	Disolvente	Ácido	Disolvente (vol)	Lote	EtOAc (vol)	Temp. (C)	Sólidos Correctos (s/n)	
02BP097 A	0,1	02BP09 0D (blancuzco)	IPA	IPA-HCl (5M)	IPA (10)	--	10	60	N	Sólidos gomosos / lechada formada al añadir EtOAc
02BP097 B	0,1	02BP09 1E (blanco)	IPA	IPA-HCl (5M)	IPA (10)	--	--	60	N	Formación de goma con enfriamiento
02BP097 C	0,1	02BP09 1E (blanco)	IPA	IPA-HCl (5M)	IPA (15)	--	6	65	N	Secado con EtOAc en primer lugar; producto formado como aceite con enfriamiento
02BP097 D	0,1	02BP09 1E (blanco)	--	IPA-HCl (5M)	EtOAc/ IPA	--	--	60	N	IPA-HCl añadidos a la solución de amida; formación de goma durante la adición (2 gotas)
02BP097 E	0,3	02BP09 0D (blancuzco)	EtOH	IPA-HCl (5M)	EtOH (3,3)	Acros	6,3	30-60	S	Sólidos observados a 30°C después de añadir EtOAc; filtración lenta
02BP097 F	0,3	02BP09 3G (sólido canela)	EtOH	IPA-HCl (5M)	EtOH (3,3)	Acros	6,6	60	S	Sólidos observados durante el enfriamiento después de añadir EtOAc; filtración lenta
02BP097 G	0,3	02BP09 3G (sólido canela)	PrOH	IPA-HCl (5M)	PrOH (3,3)	--	1,7	60	S	Sólidos observados durante el enfriamiento después de añadir EtOAc; filtración lenta
02BP097 H	0,3	02BP09 3G (sólido canela)	BuOH	IPA-HCl (5M)	BuOH (5)	--	1,2	60	S	Sólidos observados durante el enfriamiento después de añadir EtOAc; filtración muy lenta
02BP098 A,B,C	1,0	02BP09 3G (sólido canela)	EtOH	IPA-HCl (5M)	EtOH (3,3)	Ald	4-6	60	N	Turbidez observada antes de lo esperado; formación de aceite
02BP098 D	1,0	02BP09 3G (sólido canela)	EtOH	EtO H-HCl (2,5 M)	EtOH (3,3)	Ald	4,6	60	N	Formación de aceite al enfriar
02BP098 E	0,3	02BP09 0D (blancuzco)	EtOH	EtO H-HCl (2,5 M)	EtOH (3,3)	Ald	5,3	60	N	Formación de aceite a partir de la adición de EtOAc
02BP098 F	0,3	02BP09 1E (blanco)	EtOH	IPA-HCl (5M)	EtOH (3,3)	Acros	6	60	N	Formación de aceite a partir de la adición de EtOAc
02BP098 G	0,3	02BP09 1E (blanco)	PrOH	IPA-HCl (5M)	PrOH (3,3)	--	4	60	N	Formación de aceite con enfriamiento

Se alcanzó una precipitación satisfactoria mediante una adición inversa de KX2-391.2HCl en una solución concentrada de etanol a un gran volumen de acetato de etilo que se agita rápidamente. Este procedimiento de precipitación se puso en práctica para la partida de demostración dando como resultado la formación de dos tipos de sólidos distintos. Los dos tipos de sólidos distintos se separaron físicamente y se filtraron separadamente. Un sólido canela menos denso (lote 02BP111E, 74 g, 99,1% del AUC mediante HPLC) se filtró en primer lugar, seguido por un sólido más oscuro más denso (lote 02BP111F, 43 g, 99,1% del AUC mediante HPLC). Después de secar en un horno de vacío y antes de combinar los dos sólidos, una muestra de cada uno se reservó para el análisis. Los datos de interés son la calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés, Figuras 1 y 2) la difracción del polvo de rayos X (XRPD, por sus siglas en inglés, Figuras 3 y 4). Los datos de HPLC para las dos muestras eran comparables aunque la DSC y la XRPD eran diferentes.

Ambas preparaciones de HPLC tenían más de 99,0% de pureza (por el % del área), la muestra del lote 02BP111E mostraba un solo episodio endotérmico a aproximadamente 198°C mientras que la muestra del lote 02BP111F mostraba dos episodios endotérmicos a 117°C y 189°C. Los datos de XRPD para las dos muestras también eran diferentes. La muestra del lote 02BP111E parecía cristalina mientras que la muestra del lote 02BP111F parecía ser amorfa. Los datos de HPLC, los datos de XRPD y los datos de DSC apoyan que las dos muestras son formas diferentes del mismo material.

Los dos lotes de KX2-391.2HCl (lote 02BP111E y 02BP111F) se combinaron en seco dando como resultado un nuevo lote de KX2-391.2HCl (lote 02BP111G). KX2-391.2HCl (lote 02BP111G) contenía 170 ppm de cloruro de etilo.

Parte experimental

Los reactivos y los disolventes se usaron según se recibían de proveedores comerciales. El avance de las reacciones se verificó mediante HPLC, GC/MS o ¹H NMR. Se realizó cromatografía en capa fina (TLC) usando placas de gel de sílice Analtech y se visualizaron mediante luz UV (254 nm). Se realizó cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) en un instrumento de la serie Agilent 1100. Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono se obtuvieron usando un Bruker AV 300 a 300 MHz para el protón y 75 MHz para el carbono. El pico del disolvente se usó como un pico de referencia para los espectros de protón y carbono.

Preparación de 4-(2-(4-Bromofenoxi)etil)morfolina (2)

Un reactor de 50 l con envuelta equipado con un condensador de reflujo y una sonda de temperatura se cargó con 4-(3-cloropropil)morfolina (2,44 kg, 0,54 mol), 4-bromofenol (2,27 kg, 0,54 mol, 1,0 equiv.), carbonato potásico en polvo (6,331 kg, 1,88 mol, 3,50 equiv.) y DMF (12,2 l) y se agitó. A continuación, la mezcla de reacción se calentó hasta 60-65°C y se agitó durante la noche. Después de 17,5 h, la mezcla de reacción se enfrió hasta 20-25°C. La mezcla de reacción se cargó a un reactor diferente equipado con una válvula de fondo para el tratamiento. Mientras se mantenía la temperatura entre 20-30°C, se cargó al reactor agua DI (48,7 l). Las fases se separaron. La capa acuosa se extrajo con MTBE (3 x 24,4 l). Se añadieron agua DI (18,3 l) y a continuación hidróxido sódico 6M (18,2 l) a las fases orgánicas combinadas. La mezcla se agitó durante 2-5 minutos y las fases se separaron. La fase orgánica se lavó con agua (24,4 l) y salmuera (24,4 l), se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y se concentró para dar 3.370 g de un aceite amarillo (rendimiento del producto en bruto 89%, 99,4% de AUC mediante HPLC).

Preparación de ácido 6-fluoropiridin-3-ilborónico (4)

Un reactor de 72 l estaba equipado con un condensador de reflujo y una sonda de temperatura. Se cargaron al reactor 5-bromo-2-fluoropiridina (1,17 l, 0,568 mol), tolueno (18,2 l) y borato de triisopropilo (3,13 l, 0,68 mol, 1,2 equiv.) y se agitaron. Se añadió al reactor tetrahidrofurano (4,4 l) y la mezcla de reacción se enfrió hasta entre -35 y -50°C. Mientras se mantenía una temperatura entre -35 y -45°C, se añadió cuidadosamente al reactor n-butil-litio (solución 2,5 M de hexanos, 5,44 l, 0,68 mol, 1,2 equiv.). Después de 5 h, la reacción se consideraba completa y la mezcla de reacción se calentó hasta entre -15 y -20°C. Se añadió a la reacción HCl 2 M (11,80 l) mientras se mantenía una temperatura entre -15°C y 0°C. La mezcla de reacción se agitó a de 18 a 23°C durante 16 h y las fases se separaron. A continuación, las fases orgánicas se extrajeron con hidróxido sódico 6 M (6,0 l). Las fases acuosas ácidas y básicas se mezclaron en el reactor y se añadió HCl 6 M (2,5 l) hasta que se alcanzaba un pH 7,5. A continuación, se añadió cloruro sódico (6,0 kg) a la fase acuosa. A continuación, la fase acuosa se extrajo con THF (3 x 20 l). Las fases orgánicas combinadas se secaron con sulfato magnésico y se concentraron para dar 1.300 g de un sólido canela (81% de rendimiento del producto en bruto).

Preparación de 4-(2-(4-(6-fluoropiridin-3-il)fenoxi)etil)morfolina (5)

Un reactor de 72 l equipado con condensador de reflujo, tubo de rociado, burbujeador y sonda de temperatura se cargó con ácido 6-fluoropiridin-3-ilbórico (2,84 kg, 1,24 equiv.), 4-(2-(4-bromofenoxi)etil)morfolina (4,27 kg, 1,0 equiv.) y DME (27 l). Se inició la agitación y a continuación se cargó a la mezcla de reacción carbonato sódico (4,74 kg, 3,0 equiv.) como una solución en agua DI (17,1 l). Se burbujó argón a través de la mezcla de reacción durante 50 minutos. Bajo una atmósfera de argón, se añadió tetraquis(trifenilfosfina)paladio (750 g, 0,04 equiv.) a la mezcla de reacción como una suspensión en DME (1,0 l). La mezcla de reacción se calentó hasta 75 - 85°C y se agitó durante la noche (17 h). La mezcla de reacción se enfrió hasta entre 18 - 22°C. Se cargaron al reactor agua DI

(26,681kg) y MTBE (26,681 l) y se agitaron durante 5 minutos. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con MTBE (2 x 26,7 l). Las fases orgánicas combinadas se extrajeron con HCl 2 M (1 x 15,0 l, 3 x 21,8 l). La fase acuosa se cargó de nuevo al reactor y se añadió acetato de etilo (26,7 l). El pH se ajustó hasta 6,2 usando hidróxido sódico 6 M (26,7 l) mientras se mantenía una temperatura entre 15 - 25°C. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 26,7 l). Las fases orgánicas combinadas se secaron con sulfato magnésico y se concentraron para dar 4.555 g de un residuo (101% de rendimiento del producto en bruto, 67,1% del AUC mediante HPLC).

5

Purificación de 4-(2-(4-(6-fluoropiridin-3-il)fenoxi)etil)morfolina (5)

El producto en bruto (575 g) se purificó mediante cromatografía en gel de sílice al eluir con metanol/acetato de etilo/heptano (acetato de etilo al 30%/heptano, acetato de etilo al 50%/heptano, acetato de etilo al 75%/heptano, acetato de etilo al 100% y metanol al 5%/acetato de etilo). La concentración de las fracciones puras mediante TLC (metanol al 10%/diclorometano, $R_f = 0,3$) proporcionó 420 g de un sólido pardo claro (73% de recuperación, >99,9% del AUC mediante HPLC).

10

Preparación de 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetonitrilo (6)

Una solución 1 M de NaHMDS (2,0 l, 5,0 equiv.) en THF se cargó a un matraz de 5 l y se enfrió hasta de -20 a -15°C. Mientras se mantenía una temperatura por debajo de -10°C, se cargó al matraz fluoruro (119,7g, 1,0 equiv.) en THF (500 ml) a lo largo de 20 minutos. Se añadió al matraz acetonitrilo (82,5 ml, 4,0 equiv.) en THF (170 ml) a lo largo de 20 minutos, mientras se mantenía una temperatura por debajo de -10°C. A continuación, la mezcla de reacción se agitó durante 1 h. Se añadió salmuera (1,5 l, 12,6 vol.) a la reacción a una velocidad para mantener una temperatura por debajo de 10°C. A continuación, la solución se calentó hasta temperatura ambiente y se dejó que las capas se separaran. La mezcla se filtró sobre Celite y se lavó con THF (1 x 200 ml, 1 x 100 ml). La fase acuosa se extrajo con tolueno (750 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron con sulfato magnésico, se filtraron, se lavaron con tolueno (2 x 250 ml) y se concentraron hasta sequedad. Se añadió tolueno (1 l) y la solución se concentró hasta sequedad de nuevo para dar 169,8 g de un aceite. Se añadió MTBE (1.190 ml, 7 vol.) al aceite a 50°C y se agitó durante 15 minutos. Se añadió heptano (850 ml, 5 vol.) a lo largo de diez minutos a 50°C. A continuación, la mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente a lo largo de 1,5 h y se agitó durante 2 h. La suspensión se filtró, se lavó con MBTE/heptano 1:4 (2 x 100 ml) y se secó en un horno durante la noche a 45°C para dar 102,3 g de un sólido blancuzco (80% de rendimiento, 98,8% del AUC mediante HPLC).

15

20

25

Preparación de 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetato de metilo (7)

Se cargaron el nitrilo 6 (101 g) y metanol (1,01 l, 10 vol.) a un matraz de 3 l equipado con una barra agitadora y un termopar. Se añadió gota a gota a la solución H₂SO₄ concentrado (175 ml, 10,0 equiv.) a lo largo de 15 minutos mientras se mantenía una temperatura por debajo de 60°C. Seguidamente, se añadió gota a gota a la solución ácido sulfúrico fumante al 30% (124 ml) mientras se mantenía una temperatura por debajo de 60°C. A continuación, la solución se calentó hasta reflujo con una manta calentadora y se agitó durante la noche. Cuando la reacción se consideraba completa, se enfrió hasta 20°C. En un segundo matraz (22 l), se cargaron bicarbonato sódico saturado (10,7 l) y diclorometano (1,1 l) y se enfriaron hasta 15°C. Mientras se mantenía una temperatura por debajo de 20°C, la mezcla de reacción se añadió a la mezcla de bicarbonato sódico/diclorometano. La mezcla desactivada se agitó durante 15 minutos y las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo con diclorometano (1 x 550 ml, 1 x 300 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron con sulfato magnésico y se concentraron hasta sequedad para dar 105 g de un sólido naranja (94% de rendimiento del producto en bruto, 97,7% del AUC mediante HPLC).

30

35

40

Preparación de *N*-bencil-2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetamida (KX2-391)

Se cargaron el éster 7 (103 g), anisol (513 ml, 5 vol.) y bencilamina (94 ml, 3,0 equiv.) a un matraz de 3 l equipado con un termopar y un agitador superior. A continuación, la mezcla de reacción se calentó hasta 142°C y se agitó durante dos días. La mezcla de reacción se enfrió hasta 45-50°C y se agitó durante 2 horas. Se añadió *n*-heptano (1,5 l) a la mezcla gota a gota a lo largo de una hora. La solución se enfrió hasta temperatura ambiente a lo largo de tres horas y a continuación se agitó durante la noche. La suspensión resultante se filtró, se lavó con anisol/*n*-heptano 4:1 (200 ml) y *n*-heptano (3 x 100 ml). Secando en el horno durante la noche, el producto resultante era 112,1 g de un sólido canela (90% de rendimiento, 99,6% del AUC mediante HPLC). Véase la Figura 5 para la ¹H NMR de KX2-391.

45

50

Preparación de sal de dihidrocloruro de *N*-bencil-2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetamida (KX2-391·2HCl)

Se cargó EtOH (1,0 l) a un matraz de 2 l y se añadió lentamente al matraz cloruro de acetilo (62,5 ml, 3,0 equiv.) y se agitó durante 40 minutos. La solución resultante se añadió a KX2-391 (100 g) a lo largo de 30 minutos mientras se mantenía una temperatura de 30°C. La solución se concentró hasta una masa de 270 g. La solución concentrada se añadió a acetato de etilo (2 l) a lo largo de 20 minutos con agitación rápida. La mezcla se agitó durante la noche y a continuación se filtró bajo nitrógeno para dar dos productos sólidos distintos, sólidos canela (73,5 g) y sólidos más oscuros (42,2 g). Los sólidos se combinaron en seco para dar un rendimiento combinado de 99%. El análisis por HPLC indicaba 99,0% de pureza (AUC). El análisis indicaba que estaba presente etanol en 2.530 ppm, acetato de

55

ES 2 559 687 T3

etilo en 48.110 ppm, cloruro de etilo en 170 ppm, y no se detectaban heptano ni anisol. El contenido de paladio se ensayó tres veces y se midió que era 29 ppm, 2 ppm y menos de 1 ppm.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)-*N*-bencilacetamida que comprende la etapa de:

5 hacer reaccionar 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetato de metilo con bencilamina para dar 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)-*N*-bencilacetamida.

2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetato de metilo se prepara mediante la etapa de convertir 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetonitrilo en 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetato de metilo:

10 3. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que el 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetonitrilo se prepara mediante la etapa de hacer reaccionar 4-(2-(4-(6-fluoropiridin-3-il)fenoxi)etil)morfolina con acetonitrilo.

4. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que la 4-(2-(4-(6-fluoropiridin-3-il)fenoxi)etil)morfolina se prepara mediante la etapa de acoplar 4-(2-(4-bromofenoxi)etil)morfolina con ácido 6-fluoropiridin-3-il-3-borónico.

5. El procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, que comprende las etapas de:

(1) hacer reaccionar 4-(2-cloroetil)morfolina con 4-bromofenol para dar 4-(2-(4-bromofenoxi)etil)morfolina;

15 (2) acoplar la 4-(2-(4-bromofenoxi)etil)morfolina con ácido 6-fluoropiridin-3-il-3-borónico para dar 4-(2-(4-(6-fluoropiridin-3-il)fenoxi)etil)morfolina;

(3) hacer reaccionar la 4-(2-(4-(6-fluoropiridin-3-il)fenoxi)etil)morfolina con acetonitrilo para dar 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetonitrilo;

20 (4) convertir el 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetonitrilo en 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetato de metilo; y

(5) hacer reaccionar el 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetato de metilo con bencilamina para dar 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)-*N*-bencilacetamida.

25 6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 5, que comprende adicionalmente poner en contacto la 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)-*N*-bencilacetamida con una solución de ácido clorhídrico para dar dihidrocloruro de 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)-*N*-bencilacetamida.

7. El procedimiento según la reivindicación 6, que comprende las etapas de:

(1) hacer reaccionar 4-(2-cloroetil)morfolina con 4-bromofenol para dar 4-(2-(4-bromofenoxi)etil)morfolina;

(2) acoplar la 4-(2-(4-bromofenoxi)etil)morfolina con ácido 6-fluoropiridin-3-il-3-borónico para dar 4-(2-(4-(6-fluoropiridin-3-il)fenoxi)etil)morfolina;

30 (3) hacer reaccionar la 4-(2-(4-(6-fluoropiridin-3-il)fenoxi)etil)morfolina con acetonitrilo para dar 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetonitrilo;

(4) convertir el 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetonitrilo en 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetato de metilo;

35 (5) hacer reaccionar el 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)acetato de metilo con bencilamina para dar 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)-*N*-bencilacetamida; y

(6) poner en contacto la 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)-*N*-bencilacetamida con una solución de ácido clorhídrico para dar dihidrocloruro de 2-(5-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)piridin-2-il)-*N*-bencilacetamida.

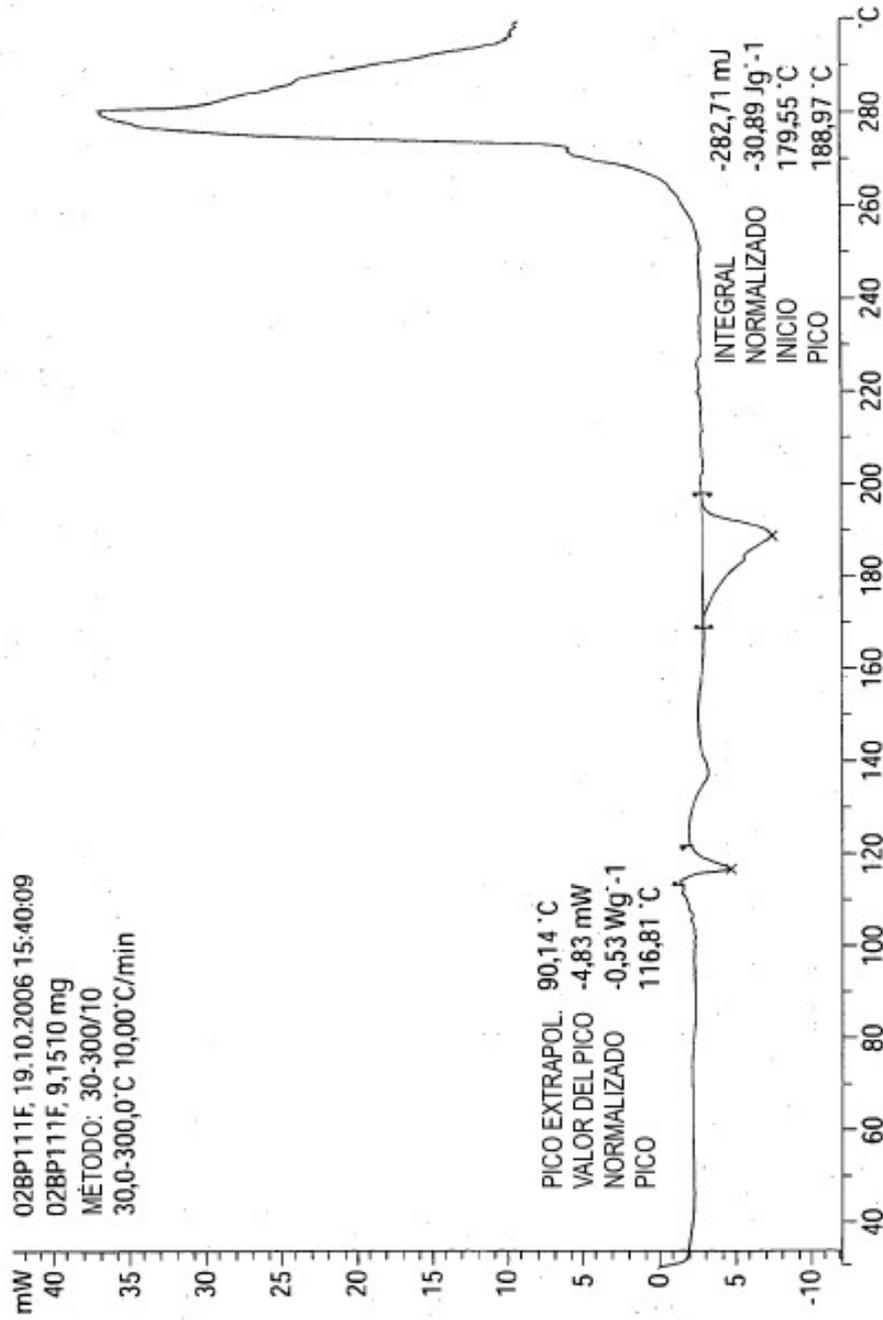


Fig.1

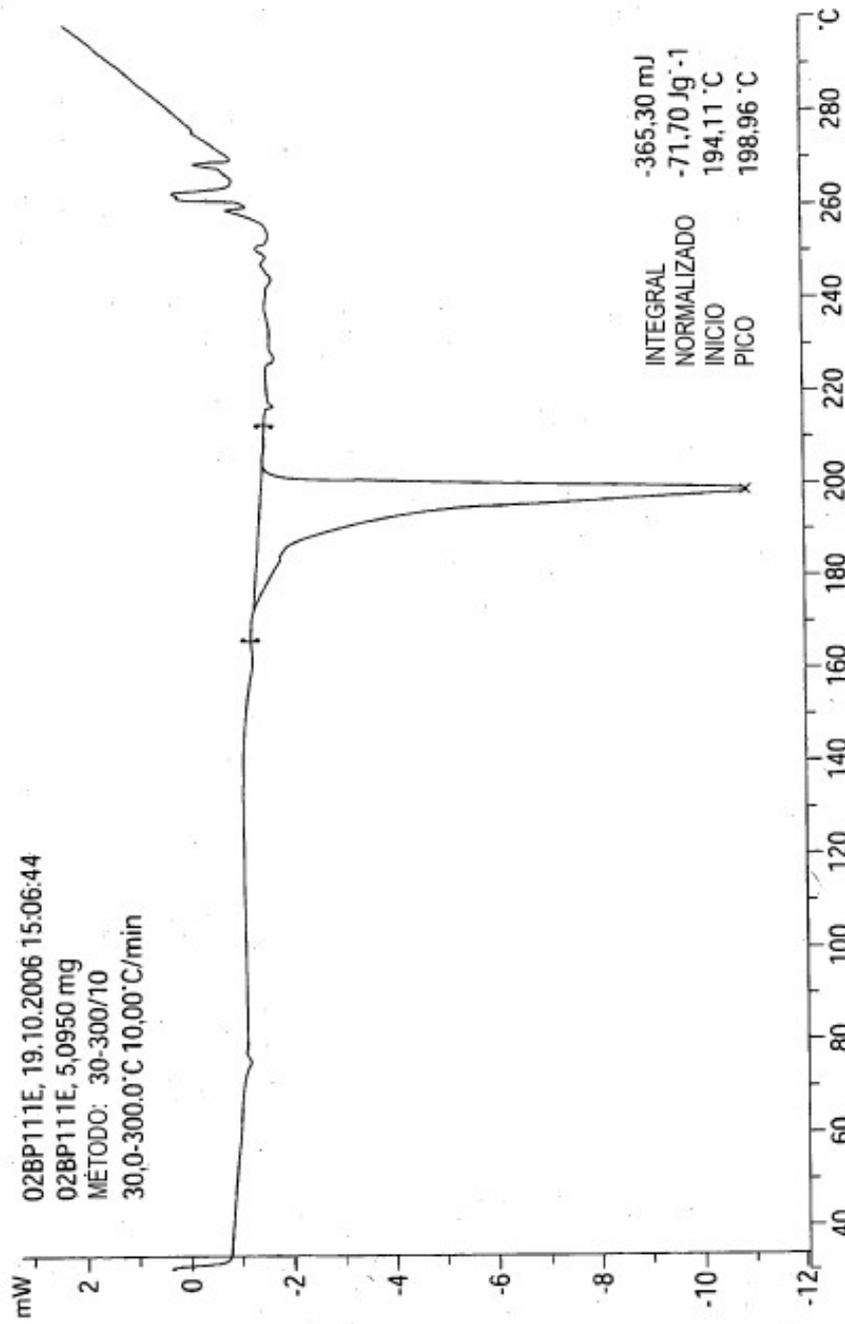


Fig. 2

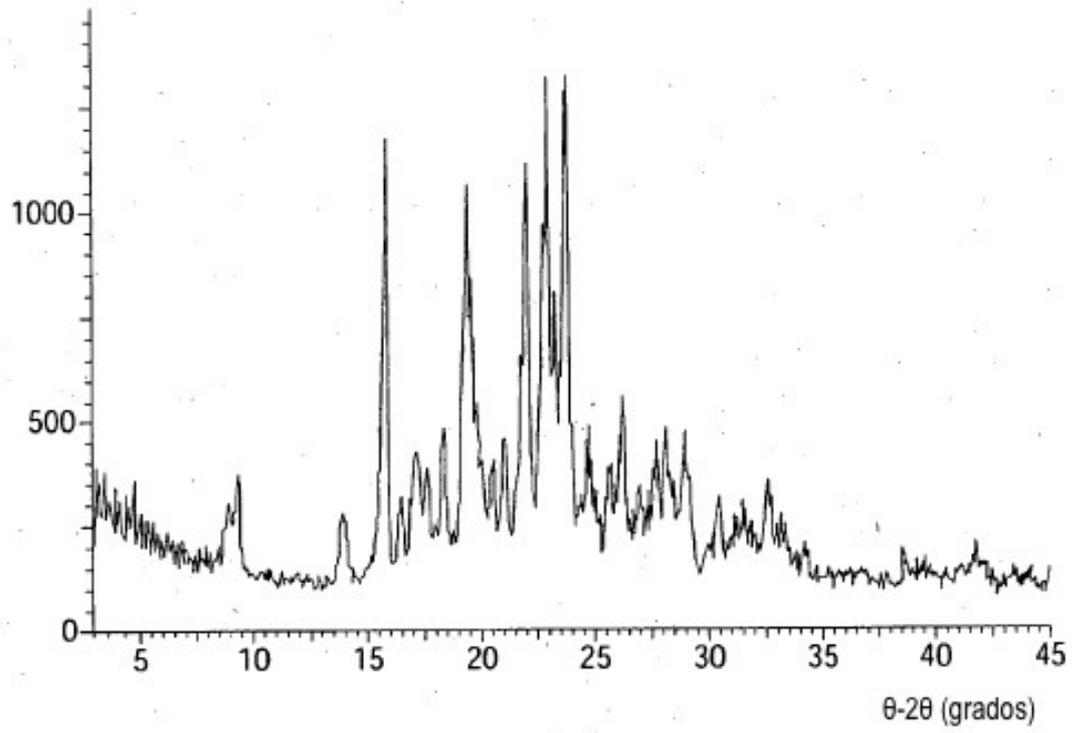


Fig. 3

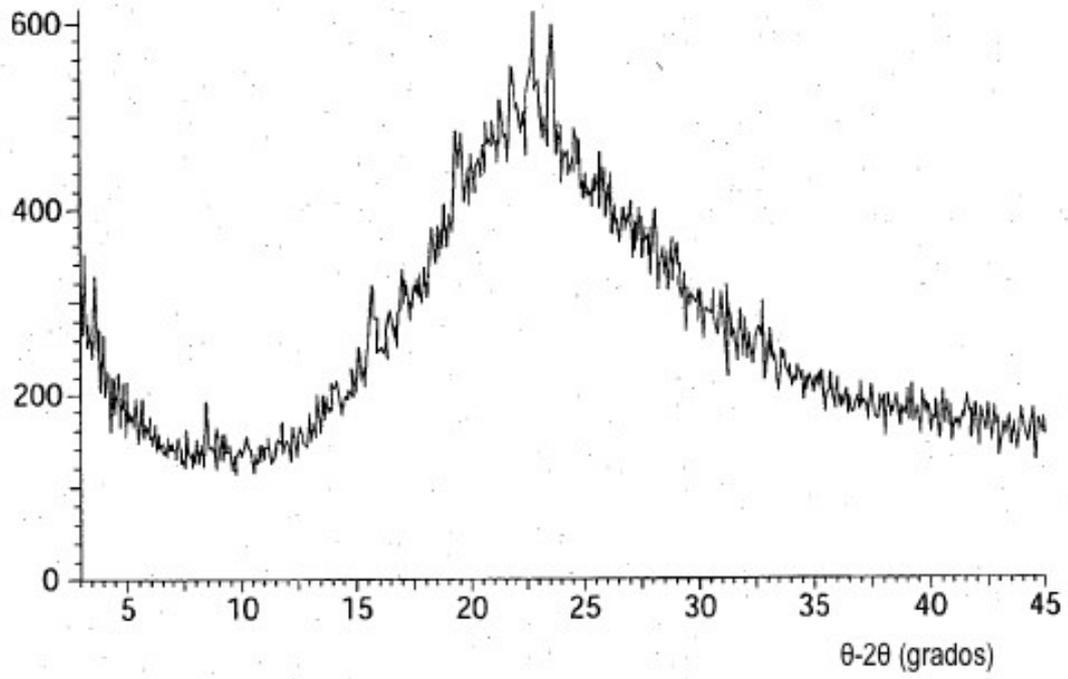


Fig. 4

