

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 056**

51 Int. Cl.:

C07D 495/16 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2010 E 10746224 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2402349**

54 Título: **Derivados de pirazolopirimidina tricíclica**

30 Prioridad:

25.02.2009 JP 2009042963

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

05.07.2016

73 Titular/es:

DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (100.0%)
3-5-1, Nihonbashi Honcho Chuo-ku
Tokyo 103-8426, JP

72 Inventor/es:

OKAYAMA, TOORU;
IKEDA, MASAHIRO;
OHKI, HITOSHI;
OTA, MASAHIRO;
SHIBATA, YOSHIHIRO;
NAKANISHI, TOSHIYUKI;
UEDA, YASUSI;
SUZUKI, NOBUYUKI y
MATUURA, SHINJI

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

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

ES 2 576 056 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

Derivados de pirazolopirimidina tricíclica

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un compuesto que tiene un esqueleto tricíclico de pirazolopirimidina que inhibe el efecto la proteína de choque térmico 90 (HSP90).

Técnica antecedente

La HSP90 es una proteína chaperona intracelular principal. Las proteínas chaperona son proteínas que se unen a diversas proteínas para ayudar en el plegado de proteínas de enlace. Un grupo de proteínas cuyo plegado requiere HSP90 se denomina generalmente proteínas cliente de HSP90.

10 Se asume que HSP90 así como múltiples proteínas, tales como cochaperonas, proteínas acompañantes e inmunofilinas están implicadas en el mecanismo de plegado de proteínas cliente por HSP90 y que ellas ayudan colaborativamente en el plegado de proteínas cliente de HSP90 (Documento no de patente 1); sin embargo, los detalles del mecanismo aún no están suficientemente claros.

15 Se asume que proteínas cliente de HSP90 forman un complejo con HSP90, cochaperonas y similares, y después cambian conformacionalmente para dar proteínas maduras y que las proteínas se ubiquitinan y degradan por proteasomas cuando no están plegadas normalmente por HSP90 y similares (Documentos no de patente 1 a 4).

20 En los últimos años, se han previsto inhibidores de HSP90 como candidatos para agentes terapéuticos para diversas enfermedades (por ejemplo, cáncer, enfermedades neurodegenerativas, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedades cardiovasculares, infecciones, enfermedades autoinmunes y enfermedades asociadas con lesión celular apoptótica) (Documento no de patente 2).

25 En particular, puesto que muchas proteínas asociadas con el cáncer que incluyen dianas moleculares para agentes anticancerosos son proteínas cliente de HSP90, se han previsto inhibidores de HSP90 como candidatos para agentes anticancerosos. Por ejemplo, múltiples proteínas implicadas en la aparición y desarrollo de cáncer, tales como Her2, Raf, Akt y telomerasa con conocidas como proteínas cliente de HSP90 (Documento no de patente 1). Se asume que estas proteínas asociadas al cáncer se cambian de proteínas inmaduras a proteínas maduras y actúan para provocar una transformación maligna de células, respectivamente, mediante el uso de HSP90 como una proteína chaperona. HSP90 es una proteína que existe, no solo en células cancerosas, si no también células normales, y se ha informado de que la afinidad con una proteína cliente y la actividad de ATPasa necesaria para su actividad de chaperona son más altas en células cancerosas que en células normales (Documentos no de patente 1 a 3). Por lo tanto, se asume que

30 inhibidores de HSP90 son capaces de inactivar múltiples proteínas asociadas con cáncer simultáneamente de una manera específica de células y se han previsto como candidatos para agentes anticancerosos que son potentes y tienen un espectro antitumoral amplio.

35 Geldanamicina, herbimicina, 17-alilaminogeldanamicina (17-AAG) y similares son conocidas comúnmente como inhibidores de HSP90 (Documentos no de patente 1 a 4). Estos compuestos se unen al bolsillo de unión de ATP en el N-terminal de HSP90 e inhiben la unión de HSP90 a ATP para inhibir la función de HSP90 como una proteína de chaperona. Se ha informado de diversos compuestos que inhiben HSP90 además de los compuestos anteriores (Documento de patente 1, Documento de patente 2, Documento de patente 3, Documento no de patente 5 y Documento no de patente 6) y también están indicados derivados de pirazolopirimidina tricíclica (Documento de patente 4 y documento JP 2009 256323A).

40 Además, muchas publicaciones han informado sobre los usos pretendidos de derivados de pirazolopirimidina tricíclica y compuestos que tienen una estructura de anillo condensado, que también tienen tres constituyentes heterocíclicos, para propósitos anticancerosos (Documentos de patente 5 a 9 y Documentos no de patente 7 y 8).

Lista de referencias

Documentos de patente

45 Documento de patente 1: WO 2005/28434
Documento de patente 2: WO 2008/049105
Documento de patente 3: WO 2008/093075
Documento de patente 4: WO 2008/035629
Documento de patente 5: WO 2004/047755
50 Documento de patente 6: WO 2006/015263
Documento de patente 7: WO 2005/021568
Documento de patente 8: WO 1998/043991
Documento de patente 9: WO 2008/100447

Documentos no de patente:

- Documento no de patente 1: Medicinal Research Reviews (2006) Vol. 26, No. 3, 310-338
 Documento no de patente 2: TRENDS in Molecular Medicine (2004) Vol. 10, No. 6, 283-290
 Documento no de patente 3: British Journal of Pharmacology (2005) 146, 769-780
 Documento no de patente 4: TRENDS in Biochemical Sciences (2006) Mar, 31 (3), 164-172
 Documento no de patente 5: Journal of Medicinal Chemistry (2005) Vol. 48, No. 13, 4212-4215
 Documento no de patente 6: Journal of Medicinal Chemistry (2006) Vol. 49, No. 1, 381-390
 Documento no de patente 7: Organic & Biomolecular Chemistry (2003) Vol. 1, No. 23, 4166-4172
 Documento no de patente 8: Organic & Biomolecular Chemistry (2006) Vol. 4, No. 9, 1723-1729

10 Sumario de la invención

Problema que debe resolverse por la invención

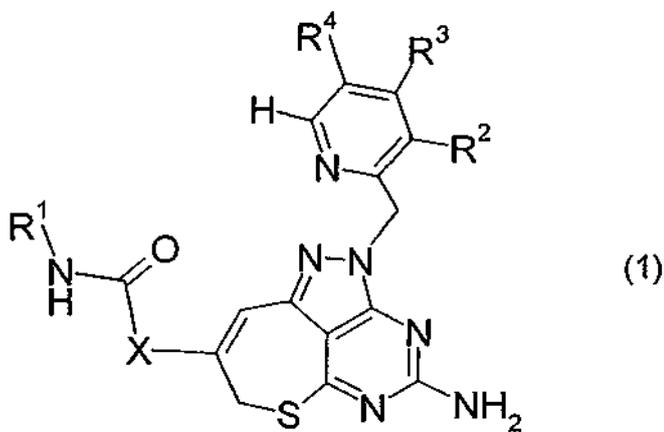
Aunque se ha esperado que los inhibidores de HSP90 se usen como medicamentos, en particular como agentes anticancerosos, hasta la fecha no se ha usado realmente ninguno de los compuestos como medicamentos.

Medios para resolver el problema

15 Como resultado de extensos estudios para resolver los problemas anteriores, los inventores de la presente invención han descubierto un nuevo compuesto que inhibe la actividad de ATPasa de HSP90 y tiene actividad antitumoral, que se representa por la fórmula (1) como se muestra más adelante, completando de este modo la presente invención. Además, los inventores han realizado ensayos de actividad antitumoral *in vivo*, ensayos de seguridad, ensayos de estabilidad metabólica, ensayos de inhibición de enzima metabólica, etc., en el compuesto de la presente invención.
 20 Como resultado, han descubierto que el compuesto de la presente invención tiene diversas propiedades requeridas para medicamentos.

Más específicamente, la presente invención proporciona:

[1] Un compuesto representado por la fórmula (1) o una sal del mismo:



25 en el que, en la fórmula (1),

- R¹ representa un grupo metilo,
 R² representa un átomo de cloro,
 R³ representa un grupo metoxi,
 R⁴ representa un grupo metilo, y
 X representa un grupo metileno.

- [2] Un compuesto de acuerdo con [1] en el que el compuesto es 2-(4-amino-2-[(3-cloro-4-metoxi-5-metilpiridin-2-ilo)metil]-2,7-dihidro-6-tia-1,2,3,5-tetraazabenz[cd]azulen-8-il)-N-metilacetamida.
 [3] Un bromhidrato de un compuesto de acuerdo con [2].
 [4] Un clorhidrato de un compuesto de acuerdo con [2].
 35 [5] Un metanosulfonato de un compuesto de acuerdo con [2].
 [6] Un etano-1,2-disulfonato de un compuesto de acuerdo con [2].
 [7] Un medicamento que comprende un compuesto de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [6] como un principio activo.
 [8] A composición farmacéutica, que comprende un compuesto de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [6] y un vehículo farmacológicamente aceptable.
 40 [9] Uso de un compuesto de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [6] para la fabricación de un medicamento.

[10] Uso de un compuesto de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [6] para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

[11] Un compuesto de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [6] para su uso en el tratamiento del cáncer.

Ventajas de la invención

- 5 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un nuevo derivado de pirazolopirimidina que tiene actividad inhibidora de HSP90, que se representa mediante la fórmula (1) anterior. El compuesto de la presente invención es útil como un agente antitumoral.

Descripción de las realizaciones

10 En la presente invención, "proteína de choque térmico 90" o "HSP90" se refiere a cualquiera o todas de la familia de HSP90 a menos que se indique otra cosa. La familia de HSP90 incluye HSP90 α , Hsp90 β , proteína regulada por glucosa 94kDa (GRP94) y Hsp75/proteína 1 asociada a receptor del factor de necrosis tumoral (TRAP1), por ejemplo.

15 En la presente invención, "inhibidor de HSP90" se refiere a un compuesto o composición que inhibe parcial o completamente un efecto que HSP90. Los ejemplos del inhibidor de HSP90 incluyen un compuesto o composición que inhibe parcial o completamente la expresión de HSP90 y un compuesto o composición que inhibe parcial o completamente la función de HSP90 como una proteína de chaperona.

En el presente documento, "función de HSP90 como una proteína de chaperona" se refiere a una función de HSP90 que ayuda en el plegado de una proteína cliente para convertir la proteína cliente en su forma funcional, o una función de HSP90 para estabilizar una proteína cliente, por ejemplo.

20 Por consiguiente, los ejemplos específicos del inhibidor de HSP90 incluyen un compuesto que inhibe la expresión de HSP90, un compuesto que inhiben la unión de HSP90 a una proteína cliente, un compuesto que inhibe la unión de HSP90 a co-chaperonas o inmunofilinas, un compuesto que inhibe la unión de HSP90 a ATP, un compuesto que inhibe la actividad de ATPasa de HSP90 y un compuesto que inhibe el cambio conformacional de HSP90. El inhibidor de HSP90 puede usarse como un agente terapéutico para una enfermedad provocada por un efecto de HSP90.

25 Los ejemplos de proteína cliente de HSP90 incluyen: cinasas receptoras de factor de crecimiento, tales como Her2, EGFR, c-Kit, c-Met, KDR, Flt3, IGF-1R y PDGF; cinasas intracelulares, tales como PDK1, Akt, Raf, S6, Cdk4, Cdk6, Chk1, PLK1, Src, Aurora B, Bcr-Abl, GSK3 β y ERK5; receptores esteroideos, tales como GR, ER α , PR y AR; y otras, tales como HIF-1, Survivina, terc, Bcl-6 y p53.

30 En la presente invención, los ejemplos de la "enfermedad causada por un efecto de HSP90" incluyen cáncer, enfermedades neurodegenerativas, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedades cardiovasculares, infecciones, enfermedades autoinmunes y enfermedades asociadas con lesión celular apoptótica. En la presente invención, los términos "tumor" y "cáncer" pueden usarse de manera intercambiable. Además, en la presente invención, tumor, tumor maligno, cáncer, neoplasma maligno, carcinoma, sarcoma y similares pueden denominarse genéricamente como "tumor" o "cáncer".

35 El compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con la presente invención puede estar presente en forma de un estereoisómero o un isómero óptico derivado de un átomo de carbono asimétrico. El estereoisómero, el isómero óptico y una mezcla de los mismos están todos incluidos en la presente invención.

El compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con la presente invención es particular y preferentemente:

2-{4-amino-2-[(3-cloro-4-metoxi-5-metilpiridin-2-ilo)metil]-2,7-dihidro-6-tia-1,2,3,5-tetraazabenz[cd]azulen-8-il}-N-metilacetamida.

40 El compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con la presente invención puede convertirse en una sal farmacológicamente aceptable, según se desee. Los ejemplos de dichas sales incluyen: sales hidrácidas halogenadas tales como sales clorhidrato o yodhidrato; sales de ácidos inorgánicos, tales como nitratos, percloratos, sulfatos y fosfatos; alcanosulfonatos inferiores, tales como metanosulfonatos, trifluorometanosulfonatos o etanosulfonatos; arilsulfonatos, tales como bencenosulfonatos o p-toluenosulfonatos; sales de ácido orgánico, tales como formiatos, acetatos, malatos, fumaratos, succinatos, citratos, tartratos, oxalatos o maleatos; y sales de aminoácido, tales como ornitinas, glutamatos o aspartatos. De estas, se prefieren sales hidrácidas halogenadas y sales de ácido orgánico, y son más preferidas bromato, clorhidrato, metanosulfonato o etano-1,2-disulfonato.

50 El compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con la presente invención o una sal del mismo puede estar presente como una forma libre, o en forma de un hidrato o un solvato. Este puede estar presente en la forma libre, o en forma de una sal hidrato o similar, como resultado de la absorción de humedad del aire. El tipo de solvato no está particularmente limitado, siempre y cuando sea farmacológicamente aceptable. Específicamente, se prefiere un hidrato, un etanolato o similar. Además, cuando un átomo de nitrógeno está presente en el compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con la presente invención, este puede ser una forma de *N*-óxido. Tales formas de solvato, hidrato, sal de hidrato y *N*-óxido también están incluidas en el alcance de la descripción.

5 Dependiendo de los tipos de sustituyentes o la combinación de los mismos, el compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con la presente invención puede estar presente como diversos tipos de isómeros, incluyendo isómeros geométricos, tales como un isómero *cis* o un isómero *trans*, tautómeros, o isómeros ópticos, tales como una forma d o una forma l. El compuesto de la presente invención incluye todos estos isómeros, estereoisómeros y mezclas de tales isómeros y estereoisómeros que se mezclan en cualquiera de las proporciones dadas, a menos que se indique otra cosa.

10 El compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con la presente invención también puede comprender uno o más isótopos atómicos de uno o más átomos constituyentes de los mismos en una proporción no natural. Los ejemplos de tal isótopo atómico incluyen deuterio (^2H), tritio (^3H), yodo-125 (^{125}I) y carbono-14 (^{14}C). Estos compuestos son útiles como agentes terapéuticos o preventivos, o reactivos usados para estudios, tales como reactivos de ensayo y agentes de diagnóstico, tales como agentes de diagnóstico *in vivo*. Independientemente de si son o no compuestos radioactivos, todas las variantes isotópicas del compuesto representado por la fórmula (1) están incluidas en el alcance de la presente invención.

15 Además, la presente descripción también desvela un compuesto que se convierte en un compuesto (1) como un principio activo de una composición farmacéutica de la presente invención como resultado de una reacción con una enzima, ácido gástrico o similar, en condiciones fisiológicas *in vivo*; a saber, un compuesto que se convierte en el compuesto (1) como resultado de una oxidación enzimática, reducción, hidrólisis o similar, o un "compuesto profármaco farmacológicamente aceptable" que se convierte en el compuesto (1) como resultado de hidrólisis similar debido a ácido gástrico, etc.

20 Los ejemplos del profármaco mencionado anteriormente incluyen compuestos obtenidos mediante acilación, alquilación o fosforilación del grupo amino del compuesto (1) (por ejemplo, compuestos obtenidos convirtiendo el grupo amino mencionado anteriormente en eicosanoilo, alanilo, pentilaminocarbonilo, (5-metil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-ilo)metoxicarbonilo, tetrahidrofuranilo, pirrolidilmetilo, pivaloiloximetilo o *terc*-butilo y otros compuestos).

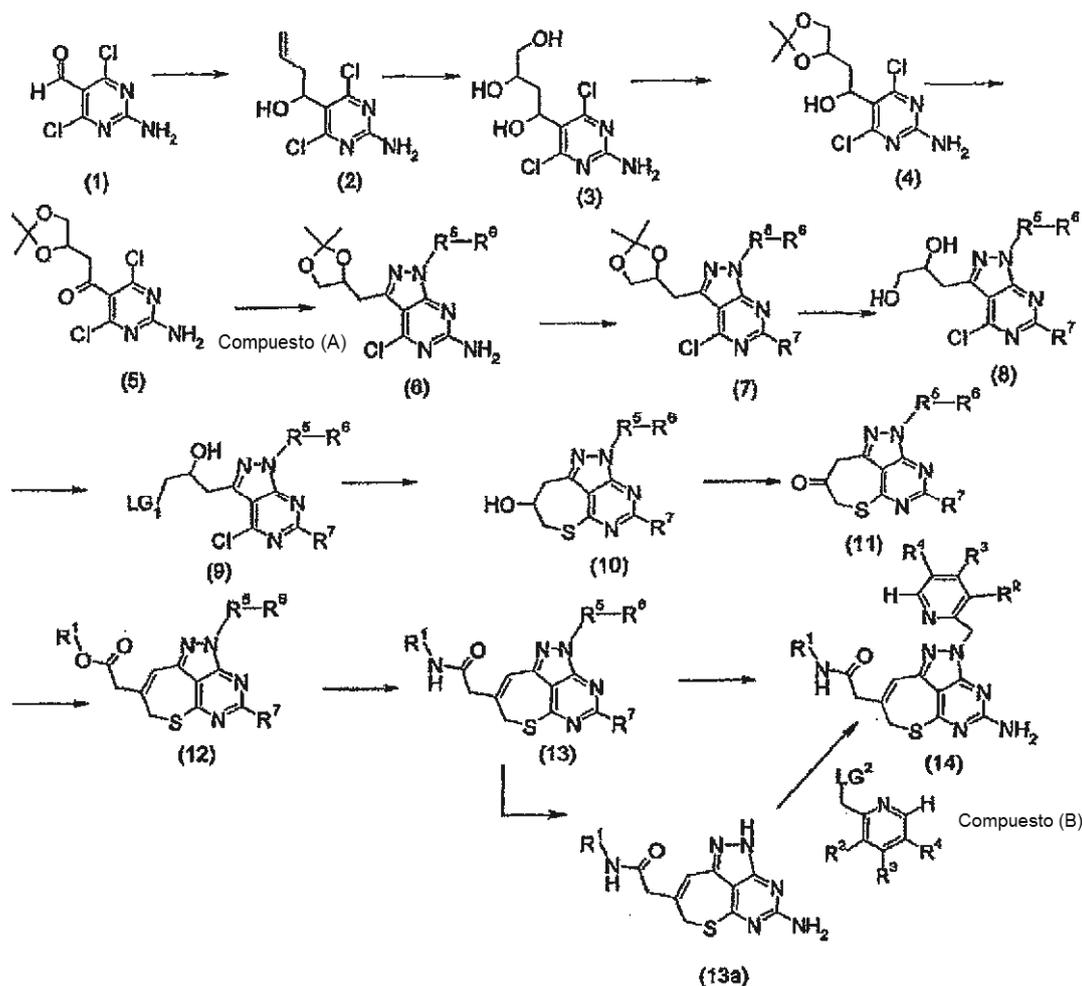
25 Un compuesto del profármaco de la presente invención puede producir a partir del compuesto (1) de acuerdo con un procedimiento conocido. Además, un profármaco del compuesto de la presente invención incluye un profármaco que se convierte en el compuesto (1) en condiciones fisiológicas, como se describe en las páginas 163-198 de "Iyakuhi no Kaihatsu (Desarrollo de medicamentos)" Vol. 7, Bunshi Sekkei (Diseño Molecular), Hirokawa Shoten Co., 1990.

30 A continuación se describirá un procedimiento típico para producir el compuesto representado por la fórmula (1). Debe indicarse que puede usarse un grupo protector adecuado en cada reacción, según sea necesario, o que puede realizarse una conversión deseada en una reacción de química orgánica común. El tipo de grupo protector y el tipo de conversión de sustituyentes respectivos no están particularmente limitados.

[Etapa principal 1]

35 Se describirá un procedimiento para producir un compuesto representado por la fórmula (1), en la que X es un grupo metileno.

Esquema 1



en el que R^1 , R^2 , R^3 y R^4 son como se ha definido anteriormente, respectivamente, R^5 representa un grupo metileno que puede estar sustituido con 1 o 2 grupos alquilo que tienen de 1 a 6 átomos de carbono, R^6 representa un grupo arilo que puede tener uno o más sustituyentes o un grupo heterocíclico que puede tener uno o más sustituyentes, R^7 representa un grupo amino que tiene un grupo protector, y cada uno de LG^1 y LG^2 representa un grupo saliente. Los grupos salientes, LG^1 y LG^2 , incluyen un átomo de halógeno, un grupo toluenosulfonilo, un grupo metanosulfonilo, un grupo trifluorometanosulfonilo y similares. Los grupos protectores para el grupo amino incluyen un grupo benciloxycarbonilo, un grupo *tert*-butoxicarbonilo, un grupo bencilo y similares.

Un derivado de aldehído (1) (obtenible como un producto disponible en el mercado) se trata con bromuro de alilo y polvos de indio en un disolvente para obtener un compuesto (2). El derivado de alqueno (2) también puede obtenerse usando el derivado de aldehído (1) y un reactivo de Grignard, tal como bromuro de alil magnesio. Como disolvente, se prefiere *N,N*-dimetilformamida, *N*-metilpirrolidona, tetrahidrofurano, dimetilsulfóxido o similar. La temperatura de reacción está preferentemente entre -70 °C y 100 °C, y más preferentemente entre -20 °C y 50 °C. El tiempo de reacción es preferentemente entre 1 hora y 48 horas.

El derivado de alqueno (2) se somete a una 1,2-dihidroxiación, de manera que se obtiene un derivado de triol (3). Los ejemplos de tal dihidroxilación de un alqueno incluyen una reacción que usa permanganato potásico, una reacción de adición de agua en presencia de sal de mercurio (procedimiento de Kucherov-Deniges), una reacción de oxidación de osmio usando una cantidad catalítica de tetraóxido de osmio y un óxido de amina como cooxidante, y una reacción de dihidroxilación usando yodo (procedimiento Prevoat o procedimiento Woodward). Los ejemplos de disolventes usados en estas reacciones incluyen *N,N*-dimetilformamida, *N*-metilpirrolidona, tetrahidrofurano, dimetilsulfóxido, cloruro de metileno, acetona, *t*-butanol, agua y mezclas de los mismos. La temperatura de reacción es adecuadamente entre 0 °C y 100 °C, y preferentemente entre 10 °C y 50 °C. El tiempo de reacción es preferentemente entre 1 hora y 72 horas.

El derivado de triol (3) puede convertirse en un derivado de acetal (4) por tratamiento con 2,2-dimetoxipropano y una cantidad catalítica de un ácido en un disolvente tal como *N,N*-dimetilformamida, *N*-metilpirrolidona, tetrahidrofurano o dimetilsulfóxido, o por tratamiento con tal catalizador ácido en acetona. Los ejemplos de tal catalizador ácido incluyen

ácidos de Lewis, incluyendo ácido p-toluenosulfónico, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y cloruro de cinc como ejemplos típicos. La temperatura de reacción está preferentemente entre 0 °C y 100 °C, y más preferentemente entre 10 °C y 50 °C. El tiempo de reacción es preferentemente entre 1 hora y 48 horas.

5 El compuesto (4) puede convertirse en un derivado de cetona (5) por tratamiento en condiciones de reacción de oxidación adecuadas. Los ejemplos de una reacción de oxidación en este caso incluyen oxidación de Mukaiyama para activar dimetilsulfóxido o similares; oxidación de Swern o una reacción de oxidación usando como su modificación dicitclohexilcarbodiimida, anhídrido trifluoroacético, acético anhídrido o un complejo de trióxido de azufre-piridina en lugar de cloruro de oxalilo; y una reacción de oxidación usando dióxido de manganeso. Los ejemplos de un disolvente usado en el presente documento incluyen dioxano, tetrahidrofurano y cloruro de metileno. La temperatura de reacción está preferentemente entre -70 °C y 50 °C. El tiempo de reacción es preferentemente entre 1 hora y 48 horas.

10 El derivado de cetona (5) puede convertirse en un compuesto (6) por tratamiento con un derivado de hidrazina ($R^6-R^5-NHNH_2$) (compuesto (A)) en un disolvente. El compuesto (A) puede producirse por el procedimiento descrito en J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 4228-4239, etc. Los ejemplos del disolvente usado en esta reacción incluyen alcohol, cloruro de metileno, tetrahidrofurano, dioxano y mezclas de los mismos. La temperatura de reacción está preferentemente entre -20 °C y 50 °C, y más preferentemente entre 0 °C y 30 °C. Cuando el compuesto (A) se reemplaza por su sal, puede usarse adecuadamente un equivalente o exceso de una base en relación a la sal. Un ejemplo de la base trietilamina. El tiempo de reacción es preferentemente entre 1 hora y 48 horas.

15 Un derivado de diol (8) puede obtenerse protegiendo el grupo amino en la posición 6 del compuesto (6) con un grupo protector adecuado tal como un grupo benciloxicarbonilo o un grupo *tert*-butoxicarbonilo para convertirlo en un compuesto (7), y después tratando el derivado de acetal (7) con un ácido, tal como ácido sulfúrico, ácido clorhídrico o ácido acético. Los ejemplos del disolvente usado en esta reacción incluyen alcohol, agua, dioxano y mezclas de los mismos. La temperatura de reacción está preferentemente entre -10 °C y 70 °C, y más preferentemente entre 0 °C y 40 °C. El tiempo de reacción es preferentemente entre 1 hora y 48 horas.

20 El compuesto (9) puede obtenerse convirtiendo el grupo hidroxilo del compuesto (8) en un grupo saliente LG^1 tal como un átomo de halógeno, un grupo toluenosulfonilo, un grupo metanosulfonilo o un grupo trifluorometanosulfonilo por tratamiento con cloruro de tionilo, bromuro de tionilo, cloruro de toluenosulfonilo, cloruro de metanosulfonilo o cloruro de trifluorometanosulfonilo en presencia de una base, por ejemplo, basado en un conocimiento común en química orgánica. La temperatura de reacción está preferentemente entre -78 °C y 30 °C, y más preferentemente entre -20 °C y 10 °C. El tiempo de reacción es preferentemente entre 1 hora y 48 horas.

25 El compuesto (10) puede obtenerse haciendo reaccionar el compuesto (9) con bisulfuro de sodio en un disolvente, tal como *N,N*-dimetilformamida y después tratando con una base. Como alternativa, el compuesto (10) también puede obtenerse haciendo reaccionar compuesto (9) con tioacetato potásico en un disolvente, tal como *N,N*-dimetilformamida. Los ejemplos de la base incluyen carbonato potásico y bicarbonato potásico. La base es preferentemente carbonato potásico. La temperatura de reacción es adecuadamente entre -30 °C y 100 °C, y preferentemente entre -10 °C y 70 °C.

30 Los ejemplos del procedimiento de conversión del grupo hidroxilo en un grupo oxo (conversión del compuesto (10) en el compuesto (11)) incluyen oxidación de Mukaiyama y oxidación de Swern o una reacción de oxidación usando como su modificación DCC, anhídrido trifluoroacético, acético anhídrido o un complejo de trióxido sulfur-piridina en lugar de cloruro de oxalilo. Estos procedimientos se describen en The Chemical Society of Japan (ed.), "Jikken Kagaku Koza (cursos en química experimental), 4ª edición, Vol. 23, Yuki Gosei (Síntesis Orgánica) V" (Maruzen Co., Ltd., 1992) o similares.

35 Un derivado de éster de ácido acético (12) puede producirse mediante una homologación, incluyendo como un ejemplo típico, reacción de Wittig de cada reactivo disponible en el mercado seleccionado para obtener un grupo R^1 deseado con el derivado de cetona (11). La homologación es preferentemente una reacción conocida, y puede ser una descrita en Jikken Kagaku Koza (Cursos en Química Experimental) (4ª edición, Vol. 22, editado por The Chemical Society of Japan, Maruzen Co., Ltd.) "Yuki Gosei (Síntesis Orgánica) I: Tankasuiso, Harogen Kagobutsu (Hidrocarburos, Compuestos de Halógeno)", pp. 57-69.

40 Un derivado de amida del ácido acético (13) puede producirse permitiendo que monoalquilamina actúe directamente sobre el derivado de éster del ácido acético (12) en alcohol, o hidrolizando el derivado de éster del ácido acético (12) para obtener un derivado de ácido acético y después sometiéndolo a una reacción de condensación con diversos tipos de aminas (obtenibles como productos disponibles en el mercado). La reacción de hidrólisis de éster hidrólisis es preferentemente una hidrólisis alcalina conocida. Una referencia es Jikken Kagaku Koza (Cursos en química experimental) (4ª edición, Vol. 22, editado por The Chemical Society of Japan, Maruzen Co., Ltd.) "Yuki Gosei (Síntesis Orgánica) IV: San, Aminosan, Peputido (Ácidos, Aminoácidos, Péptidos)", pp. 6-11. Un procedimiento usado como un procedimiento de síntesis de péptidos puede usarse adecuadamente en la reacción de condensación con aminas. Los ejemplos del procedimiento de síntesis de péptidos incluyen un procedimiento de azida, un procedimiento de cloruro de ácido, un procedimiento de DCC (dicitclohexilcarbodiimida), un procedimiento de éster activo, un procedimiento de carbonildiimidazol, un procedimiento que usa una carbodimida soluble en agua y un procedimiento que usa cianofosfato de dietilo. Estos procedimientos se describen en M. Bondansky, Y. S. Klausner y M. A. Ondetti, "Peptide

Synthesis"(A Wiley-interscience publication, Nueva York, 1976), G. R. Pettit, "Synthetic Peptides" (Elsevier Scientific Publication Company, Nueva York, 1976), The Chemical Society of Japan (ed.), "Jikken Kagaku Koza (Cursos en Química Experimental), 4ª edición, Vol. 22, Yuki Gosei (Síntesis Orgánica) IV" (Maruzen Co., Ltd., 1992) o similares. Los ejemplos del disolvente usado en la reacción de condensación con diversos tipos de aminas incluyen

5 *N,N*-dimetilformamida, *N*-metilpirrolidona, piridina, cloroformo, cloruro de metileno, tetrahidrofurano, dioxano, acetonitrilo y mezclas de los mismos. La temperatura de reacción es adecuadamente entre -20 °C y 50 °C, y preferentemente entre -10 °C y 30 °C.

El compuesto (13) puede convertirse en un compuesto (13a) mediante tratamiento de ácidos, tratamiento de oxidación o hidrólisis, y el tratamiento posterior realizado en condiciones de reacción de desprotección adecuadas para el grupo protector el grupo amino que tiene un grupo protector (R^4), cuando su grupo R^6 - R^5 - es un grupo protector tal como un grupo 4-metoxibencilo. Un ejemplo típico de las condiciones de reacción de desprotección adecuadas para el grupo protector se describirá posteriormente. Por ejemplo, cuando el grupo amino sustituido con un grupo protector es un grupo alcanoilamino o un grupo aroilamino, el grupo puede convertirse en un grupo amino por hidrólisis usando una solución acuosa de hidróxido sódico, hidróxido potásico, amoniaco o similares. Cuando el grupo amino sustituido con un grupo protector es un grupo *terc*-butoxicarbonilamino o un grupo di-*terc*-butoxicarbonilamino, el grupo puede convertirse en un grupo amino por tratamiento con un ácido, tal como ácido clorhídrico o ácido trifluoroacético.

El compuesto (13a) puede convertirse en un compuesto (14) por tratamiento con un derivado de piridina (compuesto (B)) preparado por el procedimiento descrito en J. Med. Chem. 1992, 35, 438-450, etc., en un disolvente, en presencia de una base. Los ejemplos del disolvente incluyen *N,N*-dimetilformamida, *N*-metilpirrolidona, tetrahidrofurano y dimetilsulfóxido. Los ejemplos de la base incluyen hidruro sódico, etóxido sódico, *terc*-butóxido potásico, hidróxido potásico, carbonato potásico y carbonato de cesio. La temperatura de reacción es adecuadamente entre 0 °C y 100 °C. El tiempo de reacción es adecuadamente entre 1 y 48 horas.

Por otro lado, cuando el grupo R^6 - R^5 - del compuesto (13) no es ningún grupo protector pero es un sustituyente de interés, el compuesto (14) puede obtenerse tratando el grupo amino que tiene un grupo protector (R^7) en las condiciones de reacción de desprotección mencionadas anteriormente.

Puesto que el compuesto de la presente invención o una sal del mismo inhibe HSP90, este puede usarse como un inhibidor de HSP90, un agente para inhibir la actividad de ATPasa de HSP90, o un agente para inhibir la unión de HSP90 a ATP. Por tanto, este puede usarse como un medicamento que comprende el compuesto de la presente invención o una sal del mismo, y particular y preferentemente como un agente anticanceroso.

30 La actividad de ATPasa de HSP90 puede examinarse mediante un ensayo de ATPasa usado comúnmente por una persona experta en la materia. Por ejemplo, la actividad de ATPasa de HSP90 puede detectarse usando una proteína de HSP90 recombinante y ATP en presencia o ausencia del compuesto de ensayo, como se describe en Ejemplo de Ensayo 1 posteriormente. Como alternativa, en un ensayo de ATPasa, el procedimiento descrito en Analytical Biochemistry 327, 176-183 (2004) o Nature 425, 407-410 (2003) puede llevarse a cabo adecuadamente, por ejemplo.

35 La inhibición de la expresión de HSP90 puede examinarse mediante transferencia de Northern, transferencia de Western, ELISA o similares, usados comúnmente por una persona experta en la materia. Por ejemplo, se recupera ARNm de células cultivadas en presencia o ausencia del compuesto de ensayo para realizar la transferencia de Northern. Cuando la cantidad de ARNm de HSP90 en ARNm recuperado de células cultivadas en presencia del compuesto de ensayo se reduce con respecto a la de ARNm recuperado de las células cultivadas en ausencia del compuesto de ensayo, el compuesto de ensayo se identifica como un compuesto que inhibe la expresión de HSP90. Como alternativa, la cantidad de proteína de HSP90 puede examinarse adecuadamente realizando transferencia de Western, usando el procedimiento descrito en Cancer. Res. 65, 6401-6408 (2005), por ejemplo.

45 La inhibición de la unión de HSP90 a una proteína cliente puede examinarse mediante inmunoprecipitación y transferencia de Western usados comúnmente por una persona experta en la materia, por ejemplo. En inmunoprecipitation y transferencia de Western, el procedimiento descrito en J. Biol. Chem. 277, 10346-10353 (2002) puede llevarse a cabo adecuadamente, por ejemplo.

El compuesto que inhibe la unión de HSP90 a co-chaperonas o inmunofilinas puede examinarse mediante inmunoprecipitación y transferencia de Western, usados comúnmente por una persona experta en la materia, por ejemplo. La unión de HSP90 a cochaperonas o inmunofilinas puede examinarse adecuadamente en presencia o ausencia del compuesto de ensayo realizando el procedimiento descrito en Nature 425, 407-410 (2003), por ejemplo.

La inhibición de la unión de HSP90 a ATP puede examinarse mediante un ensayo para unión de ATP marcado a HSP90, por ejemplo. La unión de HSP90 a ATP marcado puede examinarse adecuadamente en presencia o ausencia del compuesto de ensayo realizando el procedimiento descrito en J. Biol. Chem. 272, 18608-18613 (1997), por ejemplo.

55 La inhibición del cambio conformacional de HSP90 puede examinarse mediante un ensayo conformacional usando bis-ANS (1,1'-bis(ácido 4-anilino-5-naftalenosulfónico)), por ejemplo. En el ensayo conformacional, el procedimiento descrito en J. Med. Chem. 47, 3865-3873 (2004) puede llevarse a cabo adecuadamente, por ejemplo.

La actividad inhibidora del crecimiento celular puede examinarse usando un procedimiento de ensayo de inhibición del crecimiento que se usa comúnmente por una persona experta en la materia. La actividad de inhibición de crecimiento celular puede determinarse mediante, por ejemplo, comparando los niveles de crecimiento celular (por ejemplo, células tumorales) en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo como se describe en el siguiente Ejemplo de Ensayo 2. El nivel de crecimiento puede examinarse usando un sistema de ensayo para el ensayo de células vivas. Los ejemplos del procedimiento para el ensayo de células vivas incluyen un ensayo de captación de [³H]-timidina, un procedimiento de BrdU y un ensayo de MTT.

Además, la actividad antitumoral *in vivo* puede examinarse usando un procedimiento para ensayar actividad antitumoral usado comúnmente por una persona experta en la materia. Por ejemplo, se transplantan en un ratón, una rata o similar, diversos tipos de células tumorales, y después de la confirmación de la supervivencia células transplantadas, el compuesto de la presente invención se administra al animal mediante administración oral, administración intravenosa, etc. Después de esto, de varios días a varias semanas después, se compara el crecimiento del tumor en un grupo sin administración del agente con aquel en un grupo de administración del compuesto, a fin de confirmar la actividad antitumoral *in vivo* del compuesto de la presente invención.

El compuesto de la presente invención puede usarse para el tratamiento de tumores o cánceres, tales como cáncer de pulmón, cáncer gastrointestinal, cáncer de ovario, cáncer uterino, cáncer de pecho, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de sangre, cáncer renal, neoplasma testicular, cáncer de próstata, mieloma múltiple, cáncer de piel, tal como melanoma maligno, sarcoma, por ejemplo.

Puesto que el compuesto de la presente invención tiene acción inhibidora de HSP90, este puede usarse para el tratamiento del cáncer en el que la dependencia de HSP90 está aumentada. Tales cánceres en los que dependencia de HSP90 está aumentada incluyen cáncer que depende de una o más proteínas cliente de HSP90, cáncer en que una o más proteínas cliente de HSP90 están expresadas en exceso, cáncer en el que una o más proteínas clientes de HSP90 están mutadas, y similares. Los ejemplos más específicos incluyen cáncer en el que Her2, c-Met, Flt3 o similares están expresados en exceso, y cáncer en el que c-kit, PDGFR, Raf o similares están mutados. Sin embargo, los ejemplos no se limitan a los mismos.

Adicionalmente, muchos grupos de factores asociados con cáncer (RAS-MAPK, PI3K, telomerasa, etc.) están presentes en una ruta de señalización intracelular a la que pertenece la proteína cliente de HSP90. Si se inhibe HSP90, también se inhibe la señalización a tales factores. Como resultado, también se inhibe la activación de la ruta de señalización intracelular mencionada. Por tanto, también dese este punto de vista, el compuesto de la presente invención que es un inhibidor de HSP90 puede usarse preferentemente para el tratamiento de diversos tipos de cánceres.

La composición farmacéutica de la presente invención comprende un compuesto de la presente invención y un vehículo farmacológicamente aceptable. Este puede usarse en forma de diversos tipos de inyecciones tales como una inyección intravenosa, una inyección intramuscular o una inyección subcutánea, o puede administrarse por diversos procedimientos, tales como administración oral o una administración percutánea. El vehículo farmacológicamente aceptable se refiere a un material farmacológicamente aceptable (por ejemplo, un excipiente, un diluyente, un aditivo, un disolvente, etc.), que está asociado con el transporte del compuesto de la presente invención o una composición que comprende el compuesto de la presente invención desde un determinado aparato u órgano a otro aparato u órgano.

Como un procedimiento para preparar una formulación, se selecciona una formulación adecuada (por ejemplo, una formulación oral o una inyección), y puede aplicarse un procedimiento usado comúnmente para preparar diversos tipos de formulaciones dependiendo del procedimiento de administración. Los ejemplos de formulaciones orales incluyen comprimidos, polvos, gránulos, cápsulas, píldoras, trociscos, soluciones, siropes, jarabes, emulsiones y suspensiones oleosas o acuosas. En el caso de administración oral, el agente puede estar tanto en forma libre como en una forma de sal. La formulación acuosa puede producirse formando un aducto de ácido con un ácido farmacológicamente aceptable o formando una sal de un metal alcalino, tal como sodio. Cuando la formulación es una inyección, también puede usarse un estabilizador, un conservante, un solubilizador o similar en la formulación. La inyección puede proporcionarse en forma de una formulación que debe prepararse antes de su uso almacenando una solución que puede contener tal adyuvante o similar en un contenedor y después convirtiendo esta en una formulación sólida mediante liofilización o similar. Una dosis puede almacenarse en un contenedor, o pueden almacenarse múltiples dosis en un contenedor.

Los ejemplos de formulaciones sólidas incluyen comprimidos, polvos, gránulos, cápsulas, píldoras y trociscos. Estas formulaciones sólidas pueden contener un aditivo farmacéuticamente aceptable junto con el compuesto de la presente invención. Los ejemplos de los aditivos incluyen cargas, agentes formadores de volumen, aglutinantes, desintegrantes, solubilizadores, agentes humectantes y lubricantes. Estos pueden mezclarse selectivamente según sea necesario para proporcionar una formulación.

Los ejemplos de formulaciones líquidas incluyen soluciones, siropes, elixires, emulsiones y suspensiones. Estas formulaciones líquidas pueden contener un aditivo farmacéuticamente aceptable junto con el compuesto de la presente invención. Los ejemplos de los aditivos incluyen agentes de suspensión y emulsionantes. Estos pueden

mezclarse selectivamente según sea necesario para proporcionar una formulación.

5 El compuesto de la presente invención puede usarse para el tratamiento del cáncer de mamíferos, en particular seres humanos. La dosis y el intervalo de dosificación pueden seleccionarse adecuadamente en base al criterio del especialista de acuerdo con el sitio de la enfermedad y la altura del cuerpo, peso corporal, sexo o historial médico del paciente. Cuando el compuesto de la presente invención se administra a un ser humano, el intervalo de administración es aproximadamente de 0,01 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal, y preferentemente aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal al día. Cuando el compuesto se administra a un ser humano, el compuesto se administra preferentemente en una dosis o dos a cuatro dosis separadas al día, y la administración se preferentemente se repite a intervalos adecuados. La dosis diaria puede exceder la dosis mencionada anteriormente si es necesario, en base al criterio del especialista.

10 El compuesto de la presente invención puede usarse junto con otros agente antitumorales. Los ejemplos de tales otros agentes antitumorales incluyen un antibiótico antitumoral, un ingrediente de plantas antitumoral, MRB (modificador de la respuesta biológica), hormona, vitamina, un anticuerpo antitumoral, un agente dirigido molecularmente y otros agentes antitumorales.

15 Más específicamente, los ejemplos de un agente de alquilación incluyen: agentes alquilantes, tales como mostaza nitrogenada, *N*-óxido de mostaza nitrogenada o clorambucilo; agentes de alquilación de aziridina, tales como carbocouona o tiotepa; agentes de alquilación de epóxido, tales como dibromomanitol o dibromodulcitol; agentes de alquilación de nitrosourea, tales como carmustina, lomustina, semustina, clorhidrato de nimustina, estreptozocina, clorozotocina o ranimustina; busulfan; tosilato de improsulfan; y Dacarbazina.

20 Los ejemplos de diversos tipos de antimetabolitos incluyen: antimetabolitos de purina, tales como 6-mercaptopurina, 6-tioguanina o tiinosina; antimetabolitos de pirimidina, tales como fluorouracilo, tegafur, tegafururacilo, carmofur, doxifluridina, broxuridina, citarabina o enocitabina; y antifólicos, tales como metotrexato o trimetotrexato.

25 Los ejemplos de un antibiótico antitumoral incluyen: agentes antitumorales antibióticos de antraciclina, tales como mitomicina C, bleomicina, peplomicina, daunorubicina, aclarubicin, doxorubicin, pirarubicin, THP-adriamicina, 4'-epidoxorubicin o epirubicina; cromomicina A3; y actinomicina D.

Los ejemplos de un ingrediente de plantas antitumoral incluyen: alcaloides de la vinca, tales como vindesina, vincristina o vinblastina; taxanos, tales como paclitaxel o docetaxel; y epipodofilotoxinas, tales como etoposide o teniposide.

Los ejemplos de un MRB incluyen un factor de necrosis tumoral e indometacina.

30 Los ejemplos de una hormona incluyen hidrocortisona, dexametasona, metilprednisolona, prednisolona, prasterona, betametasona, triamcinolona, oximatolona, nandrolona, metenolona, fosfestrol, etinil estradiol, clormadinona y medroxiprogesterona.

Los ejemplos de una vitamina incluyen vitamina C y vitamina A.

35 Los ejemplos de un anticuerpo antitumoral y del agente dirigido molecularmente incluyen trastuzumab, rituximab, cetuximab, nimotuzumab, denosumab, bevacizumab, infliximab, mesilato de imatinib, gefitinib, erlotinib, sunitinib, lapatinib y sorafenib.

Los ejemplos de otros agente antitumorales incluyen cisplatina, carboplatina, oxaliplatina, tamoxifen, camptotecina, ifosfamidás, ciclofosfamida, melfalan, L-asparaginasa, aseclatona, esquizofilán, picibanilo, procarbazona, pipobroman, neocarzinostatin, hidroxíurea, ubenimex y crestina.

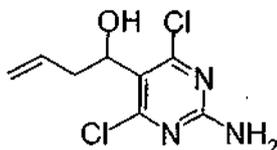
40 Además, la presente invención también incluye el uso de un compuesto de la presente invención, una sal del mismo o un solvato del mismo para la producción del medicamento mencionado anteriormente.

45 La presente invención se describirá específicamente con referencia a los Ejemplos que se muestran más adelante; sin embargo, la presente invención no se limita a los mismos y no deben interpretarse como limitativos en ningún sentido. Los reactivos, disolventes y materiales de partida no descritos específicamente en el presente documento están fácilmente disponibles de fuentes comerciales.

Ejemplos

(Ejemplo 1)

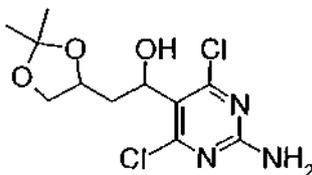
(1) 1-(2-Amino-4,6-dicloropirimidin-5-il)-3-buten-1-ol



5 Se añadieron polvo de indio (0,23 g) y polvo de cinc (1,31 g) a una mezcla compuesta de 2-amino-4,6-dicloropirimidin-5-carbaldehído disponible en el mercado (1,92 g) y *N,N*-dimetilformamida (20 ml). Después de esto, se añadieron yoduro sódico (0,15 g) y bromuro de alilo (1,73 ml) a la mezcla, a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó durante 3 horas. Después de esto, la mezcla de reacción se filtró a través de celite y después se añadió acetato de etilo al filtrado. La mezcla resultante se lavó sucesivamente con ácido clorhídrico

10 1 N y una solución salina saturada en este orden. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y después se concentró. Después de esto, se añadió hexano al residuo y después se recogió un precipitado por filtración, para obtener el compuesto del título anterior (1,75 g) en forma de un sólido. RMN ¹H (DMSO-D₆) δ: 2,55-2,69 (2H, m), 4,95-5,09 (3H, m), 5,37 (1H, d, J = 4,1 Hz), 5,67-5,77 (1H, m), 7,42 (2H, s).

(2) 1-(2-Amino-4,6-dicloropirimidin-5-il)-2-(2,2-dimetil-[1.3]dioxolan-4-ilo)etan-1-ol



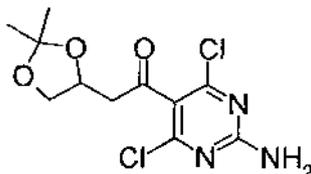
15 Una mezcla compuesta de 1-(2-amino-4,6-dicloropirimidin-5-il)-3-buten-1-ol (57,24 g), *N*-óxido de *N*-metilmorfolina (147,6 g), tetrahydrofurano (500 ml), acetona (500 ml), agua (500 ml) y tetraóxido de osmio (62 mg) se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. Después de haberse confirmado la desaparición de los materiales, se añadió una solución acuosa saturada de tiosulfato sódico (1 l) a la solución de reacción y la mezclas de reacción se concentró

20 después a aproximadamente 1,5 l a presión reducida. El residuo se saturó con cloruro sódico, seguido de la extracción con tetrahydrofurano. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro. Después de la filtración, el filtrado se concentró a presión reducida y después el disolvente se retiró por destilación. Se añadieron *N,N*-dimetilformamida (500 ml), 2,2-dimetoxipropano (210 ml) y monohidrato del ácido *p*-toluenosulfónico (18,61 g) al residuo resultante. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 14 horas. Se añadieron una solución saturada de bicarbonato sódico (1 l) y agua (1 l) a la mezcla de reacción, seguido de la extracción con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó sucesivamente con agua y una solución salina saturada en este orden, y después se secó sobre sulfato sódico anhidro. Después de la filtración, el filtrado se concentró a aproximadamente 100 ml a presión reducida. Se añadió hexano al residuo y después el precipitado se recogió por filtración, para obtener el compuesto del título

25 (53,88 g) en forma de un sólido.

30 RMN ¹H (DMSO-D₆) δ: 1,22-1,32 (6H, m), 1,72-2,23 (2H, m), 2,50 (1H, s), 3,50 (1H, td, J = 14,2, 6,9 Hz), 4,22-3,92 (2H, m), 5,06-5,36 (2H, m), 7,43 (2H, d, J = 12,8 Hz). IEN-EM m/z: 308 (M+H)⁺.

(3) 1-(2-Amino-4,6-dicloropirimidin-5-il)-2-(2,2-dimetil-[1.3]dioxolan-4-ilo)etan-1-ona

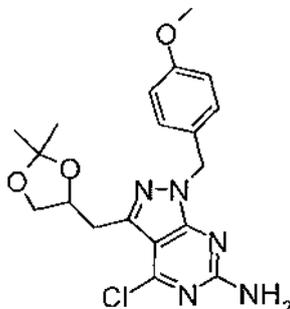


35 Se añadió gota a gota anhídrido acético (149 ml) a una mezcla compuesta del 1-(2-amino-4,6-dicloropirimidin-5-il)-2-(2,2-dimetil-[1.3]dioxolan-4-ilo)etan-1-ol anterior (74,70 g) y dimetilsulfóxido (600 ml) a temperatura ambiente durante 15 minutos en refrigeración en un baño de hielo. Después, la mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura de antes durante 18 horas. Después de haberse confirmado la desaparición de los materiales, la solución de reacción se vertió en agua enfriada con hielo. El sólido precipitado se recogió por filtración, para obtener el

compuesto del título (68,26 g).

RMN ¹H (CDCl₃) δ: 1,37 (3H, s), 1,42 (3H, s), 2,98-3,06 (1H, m), 3,32-3,40 (1H, m), 3,67-3,72 (1H, m), 4,25-4,30 (1H, m), 4,57-4,64 (1H, m), 5,72 (2H, s). IEN-EM m/z: 306 (M+H)⁺.

(4) 4-Cloro-3-[(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-ilo)metil]-1-(4-metoxibencil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-6-amina



5

Se añadió trietilamina (83,68 ml) a una mezcla compuesta de la 1-(2-amino-4,6-dicloropirimidin-5-il)-2-(2,2-dimetil-[1,3]dioxolan-4-ilo)etan-1-ona anterior (61,23 g), clorhidrato de (4-metoxibencil)-hidrazina (41,50 g) producido por el procedimiento descrito en la Patente de Estados Unidos N.º US2003/18197 y diclorometano (600 ml) durante 30 minutos en refrigeración en un baño de hielo. Después de esto, mientras la temperatura de la solución de reacción se elevaba gradualmente, se agitó durante 17 horas. Después de esto, se añadió una solución acuosa al 10 % de ácido cítrico a la mezcla de reacción, seguido de la extracción con diclorometano. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y después se concentró a presión reducida. Se añadió una solución acuosa al 5 % al residuo resultante y después el precipitado se recogió por filtración. El material resultante se lavó con agua, para obtener el compuesto del título (73,84 g) en forma de un sólido.

10

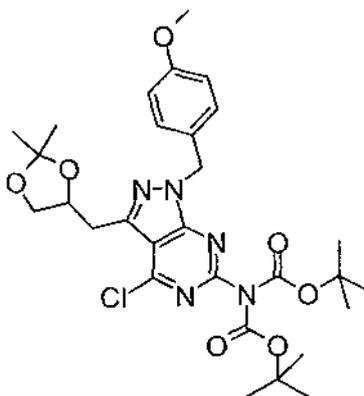
15

RMN ¹H (CDCl₃) δ: 1,36 (3H, s), 1,43 (3H, s), 3,11 (1H, dd, J = 14,7, 8,1 Hz), 3,43 (1H, dd, J = 14,7, 5,2 Hz), 3,73-3,78 (4H, m), 4,08 (1H, dd, J = 8,1,6,0 Hz), 4,54-4,61 (1H, m), 4,77 (2H, s a), 5,22 (2H, s), 6,83 (2H, d, J = 8,5 Hz), 7,24 (2H, d, J = 8,5 Hz).

IEN-EM m/z: 404 (M+H)⁺.

20

(5) Dicarbonato de di-*tert*-butil{4-cloro-3-[(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-ilo)metil]-1-(4-metoxibencil)-1H-pirazolo-[3,4-d]pirimidin-6-il}imida



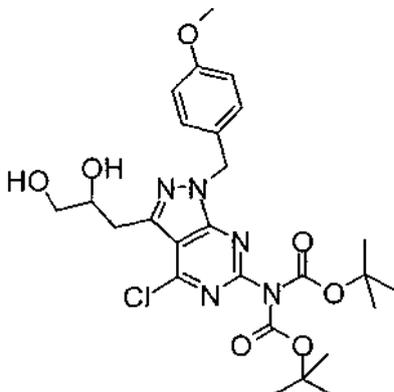
Se añadieron 4-dimetilaminopiridina (2,20 g) y dicarbonato de di-*tert*-butilo (86,59 g) a una mezcla compuesta de la 4-cloro-3-[(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-ilo)metil]-1-(4-metoxibencil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-6-amina anterior (72,83 g) y tetrahidrofurano (700 ml) y después la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. Después de esto, la mezcla de reacción se filtró y después el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (acetato de etilo-hexano), para obtener el compuesto del título (70,00 g) en forma de una sustancia amorfa.

25

RMN ¹H (CDCl₃) δ: 1,37 (3H, s), 1,40 (3H, s), 1,44-1,46 (18H, m), 3,21-3,29 (1H, m), 3,48-3,55 (1H, m), 3,74-3,81 (4H, m), 4,09-4,15 (1H, m), 4,58-4,66 (1H, m), 5,48 (2H, dd, J = 17,3, 15,1 Hz), 6,81 (2H, d, J = 7,8 Hz), 7,27-7,30 (2H, m). IEN-EM m/z: 604 (M+H)⁺.

30

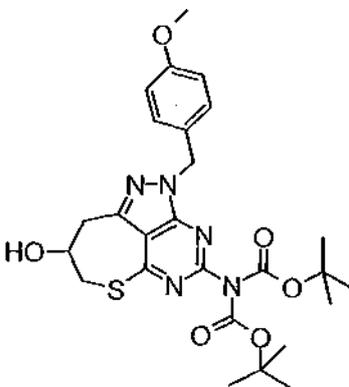
(6) Dicarbonato de di-*terc*-butil[4-cloro-3-(2,3-dihidroxipropil)-1-(4-metoxibencil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-6-il]imida



El dicarbonato de di-*terc*-butil[4-cloro-3-[(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-ilo)metil]-1-(4-metoxibencil)-1H-pirazo-
lo[3,4-d]pirimidin-6-il]imida anterior (53,85 g) se disolvió en acetonitrilo (500 ml) y después se añadió cloruro de cobre
5 (II) dihidrato (30,39 g) a la solución. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después
de esto, se añadió una solución acuosa saturada de cloruro de amonio a la solución de reacción, seguido de la
extracción con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con una solución salina saturada y después se secó sobre
sulfato sódico anhidro, seguido de concentración a presión reducida. El residuo resultante se purificó por
10 cromatografía en columna sobre gel de sílice (acetato de etilo-hexano), para obtener el compuesto del título (37,70 g)
en forma de una sustancia amorfa.

RMN ¹H (CDCl₃) δ: 1,46 (18H, s), 3,15 (1H, d, J = 3,7 Hz), 3,23-3,33 (2H, m), 3,62-3,82 (5H, m), 4,26-4,34 (1H, m), 5,49
(2H, t, J = 15,9 Hz), 6,82 (2H, d, J = 8,1 Hz), 7,25-7,30 (2H, m).
IEN-EM m/z: 564 (M+H)⁺.

(7) Dicarbonato de Di-*terc*-butil[8-hidroxi-2-(4-metoxibencil)-2,7,8,9-tetrahidro-6-tia-1,2,3,5-tetraazabenz[cd]azulen-
4-il]-imida



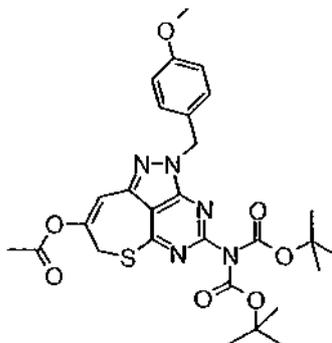
Se añadió gota a gota cloruro de metanosulfonilo (4,23 ml) a una mezcla compuesta del dicarbonato de
di-*terc*-butil[4-cloro-3-(2,3-dihidroxipropil)-1-(4-metoxibencil)-1H-pirazo[3,4-d]pirimidin-6-il]imida anterior (28,00 g),
2,4,6-collidina (16,53 ml) y diclorometano anhidro (400 ml) en refrigeración en un baño de hielo. Después, la mezcla
20 resultante se agitó a 4 °C durante 15 horas. Después de esto, se añadió una solución acuosa al 10 % de ácido cítrico
a la mezcla de reacción, seguido de la extracción con diclorometano. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico
anhidro y después se concentró a presión reducida. El residuo resultante se disolvió en *N,N*-dimetilformamida (300 ml)
y después se añadió monohidrato de hidrogenosulfuro de sodio (5,52 g) a la solución en refrigeración en un baño de
hielo. Después de esto, la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Después de esto, se
25 añadió carbonato potásico (10,29 mg) a la mezcla de reacción y después la mezcla resultante se calentó a 50 °C,
seguido de una operación de agitación adicional durante 5 horas.

Posteriormente, se añadió acetato de etilo a la mezcla de reacción y después el material resultante se lavó
sucesivamente con una solución acuosa al 10 % de ácido cítrico y después con una solución salina saturada. El
material resultante se secó sobre sulfato sódico anhidro y después se concentró a presión reducida. El residuo
30 resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (acetato de etilo-hexano), para obtener el
compuesto del título (20,59 g) en forma de un sólido.

RMN ¹H (CDCl₃) δ: 1,45 (18H, s), 2,39 (1H, s a), 3,29-3,51 (4H, m), 4,58 (1H, s a), 3,76 (3H, s), 5,42-5,49 (2H, m), 6,82
(2H, d, J = 8,6 Hz), 7,30 (2H, d, J = 8,6 Hz).

IEN-EM m/z: 544 (M+H)⁺.

(8) Acetato de 4-[bis(*terc*-butoxicarbonilo)amino]-2-(4-metoxibencil)-2,7-dihidro-6-tia-1,2,3,5-tetraazabenz[cd]azulen-8-ilo

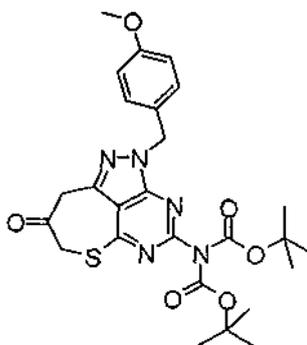


5 En una atmósfera de nitrógeno, se añadió gota a gota acético anhídrido (14 ml) a una mezcla compuesta del dicarbonato de di-*terc*-butil[8-hidroxi-2-(4-metoxibencil)-2,7,8,9-tetrahidro-6-tia-1,2,3,5-tetraazabenz[cd]azulen-4-il]imida anterior (8,17 g), dimetilsulfóxido (74 ml) y piridina (12 ml) en refrigeración sobre hielo y después la mezcla resultante se agitó durante 30 minutos. Después de esto, la solución de reacción se agitó adicionalmente a temperatura ambiente durante 15 horas. Después de haberse confirmado la desaparición de los materiales, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y después se lavó con una solución salina saturada. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro, seguido de concentración a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (acetato de etilo- hexano), para obtener el compuesto del título (6,15 g) en forma de una sustancia amorfa.

10 RMN ¹H (CDCl₃) δ: 1,44 (18H, s), 2,26 (3H, s), 3,77 (3H, s), 3,88 (2H, s), 5,50 (2H, s), 6,68 (1H, s), 6,83 (2H, d, J = 8,8 Hz), 7,31 (2H, d, J = 8,8 Hz).

15 IEN-EM m/z: 584 (M+H)⁺.

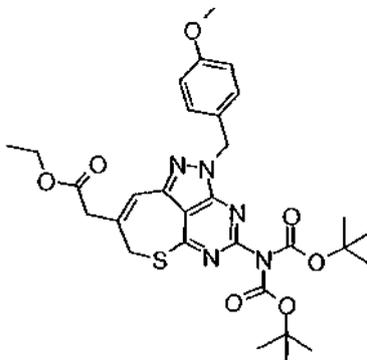
(9) Dicarbonato de di-*terc*-butil[2-(4-metoxibencil)-8-oxo-2,7,8,9-tetrahidro-6-tia-1,2,3,5-tetraazabenz[cd]azulen-4-il]imida



20 Una mezcla compuesta del acetato de 4-[bis(*terc*-butoxicarbonilo)amino]-2-(4-metoxibencil)-2,7-dihidro-6-tia-1,2,3,5-tetraazabenz[cd]azulen-8-ilo anterior (6,15 g), metanol (200 ml) y carbonato potásico (0,73 g) se agitó durante 1,5 horas en refrigeración en un baño de hielo. Después de haberse confirmado la desaparición de los materiales, se añadió una solución acuosa saturada de cloruro de amonio a la mezcla de reacción, seguido de la extracción con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con una solución salina saturada y después se secó sobre sulfato sódico anhidro, seguido de concentración a presión reducida, para obtener el compuesto del título (5,70 g) en forma de una sustancia amorfa. RMN ¹H (CDCl₃) δ: 1,46 (18H, s), 3,84 (2H, s), 3,77 (3H, s), 4,23 (2H, s), 5,48 (2H, s), 6,83 (2H, d, J = 8,6 Hz), 7,32 (2H, d, J = 8,6 Hz).

25 IEN-EM m/z: 542 (M+H)⁺.

(10) {4-[Bis(*tert*-butoxicarbonilo)amino]-2-(4-metoxibencil)-2,7-dihidro-6-tia-1,2,3,5-tetraazabenzocd]azulen-8-il}acetato de etilo



5 Una mezcla compuesta del dicarbonato de di-*tert*-butil[2-(4-metoxibencil)-8-oxo-2,7,8,9-tetrahidro-6-tia-1,2,3,5-tetraazabenzocd]azulen-4-il]imida anterior (5,19 g), (trifenilfosfanilideno)acetato de etilo (3,51 g) y tolueno (300 ml) se agitó a 65 °C durante 13 horas. Después de esto, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida y después el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (acetato de etilo-hexano), para obtener el compuesto del título (3,78 g) en forma de una sustancia amorfa.

10 RMN ¹H (CDCl₃) δ: 1,29 (3H, t, J = 7,1 Hz), 1,69-1,77 (1H, m), 2,37-2,40 (1H, m), 2,46-2,52 (1H, m), 2,68-2,71 (2H, m), 4,20 (2H, c, J = 7,1 Hz), 5,10-5,13 (1H, m), 5,20 (2H, s a).
IEN-EM m/z: 612 (M+H)⁺

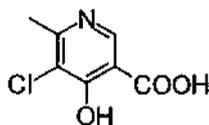
(11) Trifluoroacetato de 2-(4-amino-2,7-dihidro-6-tia-1,2,3,5-tetraazabenzocd]azulen-8-il)-N-metilacetamida



15 El {4-[bis(*tert*-butoxicarbonilo)amino]-2-(4-metoxibencil)-2,7-dihidro-6-tia-1,2,3,5-tetraaza-benzocd]azulen-8-il}acetato de etilo anterior (2,2 g) se disolvió en una solución al 40 % de metilamina/metanol (40 ml), y la solución mezclada se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La finalización de la reacción se confirmó por CL-EM y después el disolvente se retiró por destilación a presión reducida. Después de esto, se añadieron anisól (2 ml) y ácido trifluoroacético (40 ml) al residuo resultante y después la mezcla resultante se agitó a 65 °C durante 15 horas. Después de esto, la solución de reacción se concentró a presión reducida y después se añadió una solución mixta de isopropil éter-éter al residuo. El precipitado se recogió por filtración, para obtener el compuesto del título (1,53 g) en forma de un sólido.

20 IEN-EM m/z: 277 (M+H)⁺.

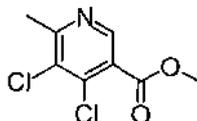
(12) Ácido 5-cloro-4-hidroxi-6-metilnicotínico



25 Se suspendió ácido 4-hidroxi-6-metil-nicotínico disponible en el mercado (300 mg) en 3 ml de acetonitrilo y después se añadió *N*-clorosuccinimida (380 mg) a la suspensión. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de esto, la solución de reacción se calentó a reflujo durante 45 minutos. Después de haberse confirmado la desaparición de los materiales, la solución de reacción se enfrió sobre hielo y después el precipitado se recogió por filtración, para obtener el compuesto del título (324 mg) en forma de un sólido. RMN ¹H (CD₃OD) δ: 2,56 (3H, s), 8,50 (1H, s). IEN-EM m/z: 188 (M+H)⁺.

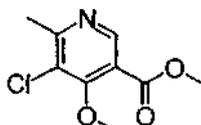
30

(13) 4,5-Dicloro-6-metilnicotinato de metilo



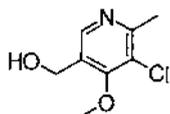
5 Se añadió oxicloruro de fósforo (1,13 ml) al ácido 5-cloro-4-hidroxi-6-metilnicotínico anterior (320 mg) y después la mezcla resultante se calentó a reflujo durante 2 horas. Después de esto, la solución de reacción se concentró a presión reducida y después se añadió gota a gota metanol (3 ml) al residuo en refrigeración sobre hielo. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, seguido de concentración a presión reducida. Una solución saturada de bicarbonato sódico se añadió al residuo en refrigeración sobre hielo, seguido de la extracción con acetato de etilo. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y después el disolvente se retiró por destilación, para obtener un producto en bruto del compuesto del título (436 0mg) en forma de un sólido. IEN-EM m/z: 220 (M+H)⁺.

10 (14) 5-Cloro-4-metoxi-6-metilnicotinato de metilo



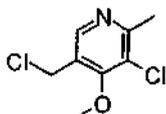
15 Se disolvió 4,5-dicloro-6-metilnicotinato de metilo en bruto (380 mg) en 3 ml de metanol y, en una corriente de nitrógeno, se añadió después metóxido sódico (120 mg) a la solución en refrigeración sobre hielo. La temperatura de la solución de reacción se elevó gradualmente a temperatura ambiente y se agitó durante 18 horas. Después de haberse confirmado la desaparición de los materiales, se añadió una solución acuosa saturada de cloruro de amonio a la solución de reacción en refrigeración sobre hielo, seguido de la extracción con cloroformo. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y después el disolvente se retiró por destilación. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (acetato de etilo-hexano), para obtener el compuesto del título (210 mg) en forma de un sólido.
 20 RMN ¹H (CDCl₃) δ: 2,67 (3H, s), 3,95 (4H, s), 4,00 (3H, s), 8,76 (1H, s).
 IEN-EM m/z: 216 (M+H)⁺

(15) (5-Cloro-4-metoxi-6-metilpiridin-3-ilo)metanol



25 El 5-cloro-4-metoxi-6-metilnicotinato de metilo anterior (1,0 g) se disolvió en 30 ml de metanol y después se añadió borohidruro sódico (1,75 g) a la solución. La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 1 hora. Después de esto, una solución acuosa saturada de cloruro de amonio se añadió a la solución de reacción en refrigeración sobre hielo, seguido de la extracción tres veces con cloroformo. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y después el disolvente se retiró por destilación, para obtener el compuesto del título (0,92 g) en forma de una sustancia oleosa.
 RMN ¹H (CDCl₃) δ: 2,63 (3H, s), 4,00 (3H, s), 4,71 (2H, s a), 8,33 (1H, s)
 IEN-EM m/z: 188 (M+H)⁺

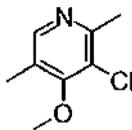
30 (16) 3-Cloro-5-(clorometil)-4-metoxi-2-metilpiridina



35 El (5-cloro-4-metoxi-6-metilpiridin-3-ilo)metanol anterior (520 mg) se disolvió en 20 ml de cloroformo y después se añadió cloruro de tionilo (0,38 ml) a la solución en refrigeración sobre hielo. La mezcla resultante se agitó a la misma temperatura de antes durante 3 horas. Después de esto, la solución de reacción se concentró y después se añadió acetato de etilo al concentrado. La mezcla resultante se lavó con una solución saturada de bicarbonato sódico, agua y una solución salina saturada en este orden. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y después el disolvente se retiró por destilación. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (acetato de etilo-hexano), para obtener el compuesto del título (550 mg) en forma de una sustancia oleosa.
 RMN ¹H (CDCl₃) δ: 2,64 (3H, s), 4,05 (3H, s), 4,61 (2H, s), 8,35 (1H, s).

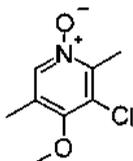
IEN-EM m/z: 206 (M+H)⁺.

(17) 3-Cloro-4-metoxi-2,5-dimetilpiridina



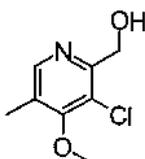
- 5 La 3-cloro-5-(clorometil)-4-metoxi-2-metilpiridina anterior (550 mg) se disolvió en 10 ml de metanol y después se añadió Pd al 10 % sobre carbono (50 mg) a la solución. Se realizó hidrogenación por contacto a presión normal sobre la mezcla en refrigeración sobre hielo durante 3 horas. Después de esto, el catalizador se retiró por filtración y después el metanol se retiró por destilación a presión reducida. El residuo se extrajo con cloroformo. La fase orgánica se lavó con una solución saturada de bicarbonato sódico y después se secó sobre sulfato sódico anhidro. El disolvente se retiró por destilación y el residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (acetato de etilo-hexano), para
- 10 obtener el compuesto del título (365 mg) en forma de una sustancia oleosa.
 RMN 1H (CDCl₃) δ: 2,25 (3H, s), 2,59 (3H, s), 3,89 (3H, s), 8,16 (1H, s).
 IEN-EM m/z: 172 (M+H)⁺.

(18) 1-Óxido de 3-cloro-4-metoxi-2,5-dimetilpiridina



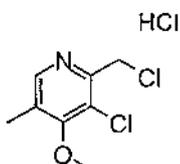
- 15 La 3-cloro-4-metoxi-2,5-dimetilpiridina anterior (181 mg) se disolvió en 5 ml de diclorometano y después se añadieron peróxido de urea (169 mg) y anhídrido ftálico (219 mg) a la solución. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2,5 horas. Después de esto, una solución acuosa saturada de tiosulfato sódico se añadió a la solución de reacción en refrigeración sobre hielo y la mezcla resultante después se diluyó con cloroformo. La fase acuosa se extrajo dos veces con cloroformo. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y después el
- 20 disolvente se retiró por destilación, para obtener el compuesto del título (181 mg) en forma de un sólido.
 RMN 1H (CDCl₃) δ: 2,24 (3H, s), 2,62 (3H, s), 3,87 (3H, s), 8,07 (1H, s).
 IEN-EM m/z: 188 (M+H)⁺.

(19) (3-Cloro-4-metoxi-5-metilpiridin-2-ilo)metanol



- 25 El 1-óxido de 3-cloro-4-metoxi-2,5-dimetilpiridina anterior (530 mg) se suspendió en 15 ml de diclorometano y después se añadió anhídrido trifluoroacético (0,39 ml) a la suspensión en refrigeración sobre hielo. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución de reacción se diluyó con cloroformo y después se lavó con una solución saturada de bicarbonato sódico. La fase de agua se extrajo con cloroformo. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y después el disolvente se retiró por destilación para obtener el compuesto del título
- 30 (521 mg) en forma de una sustancia oleosa.
 RMN 1H (CDCl₃) δ: 2,29 (3H, s), 3,93 (3H, s), 4,29 (1H, s a), 4,72-4,74 (2H, m), 8,26 (1H, s).
 IEN-EM m/z: 188 (M+H)⁺.

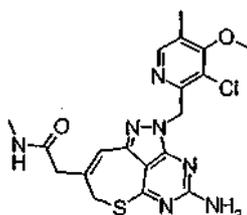
(20) Clorhidrato de 3-cloro-2-(clorometil)-4-metoxi-5-metilpiridina



El (3-cloro-4-metoxi-5-metilpiridin-2-ilo)metanol anterior (530 mg) se disolvió en 20 ml de cloroformo y después se añadió gota a gota cloruro de tionilo (1,03 ml) a la solución en refrigeración sobre hielo. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de esto, la solución de reacción se concentró y después se lavó con un disolvente mixto de éter-hexano, para obtener el compuesto del título (410 mg) en forma de un sólido.

- 5 RMN ¹H (CDCl₃) δ: 2,47 (3H, s), 4,32 (3H, s), 5,09 (2H, s), 8,54 (1H, s).
IEN-EM m/z: 206 (M+H)⁺.

(21) 2-{4-Amino-2-[(3-cloro-4-metoxi-5-metilpiridin-2-ilo)metil]-2,7-dihidro-6-tia-1,2,3,5-tetraazabenz[cd]azulen-8-il}-N-metilacetamida



- 10 Se añadió dimetilformamida (1 ml) a trifluoroacetato de 2-(4-amino-2,7-dihidro-6-tia-1,2,3,5-tetraazabenz[cd]azulen-8-il)-N-metilacetamida (28 mg), clorhidrato de 3-cloro-2-(clorometil)-4-metoxi-5-metilpiridina (36 mg) y carbonato potásico (69 mg). La mezcla resultante se agitó a 60 °C durante 2,5 horas. Después de esto, el material insoluble se retiró por filtración y después el disolvente se retiró por destilación en una corriente de nitrógeno. El residuo resultante se disolvió en dimetilsulfóxido (1 ml) y después se purificó por HPLC preparativa de fase inversa.
- 15 El disolvente se retiró por destilación a presión reducida, para obtener el compuesto del título (27,0 mg) en forma de un sólido.
RMN ¹H (CDCl₃) δ: 2,24 (4H, s), 2,82 (3H, d, J = 4,9 Hz), 3,27 (2H, s), 3,80 (2H, s), 3,91 (3H, s), 5,21 (2H, s), 5,65 (2H, s), 5,87 (1H, s), 6,70 (1H, s), 8,16 (1H, s).
IEN-EM m/z: 446 (M+H)⁺.

20 (Ejemplo 2)

Monobromhidrato de 2-{4-amino-2-[(3-cloro-4-metoxi-5-metilpiridin-2-ilo)metil]-2,7-dihidro-6-tia-1,2,3,5-tetraazabenz[cd]azulen-8-il}-N-metilacetamida

- Una solución al 20 % de ácido bromhídrico-etanol (204 µl, 0,505 mmol) se añadió a una solución en acetonitrilo (350 ml) de 2-{4-amino-2-[(3-cloro-4-metoxi-5-metilpiridin-2-ilo)metil]-2,7-dihidro-6-tia-1,2,3,5-tetraazabenz[cd]azulen-8-il}-N-metilacetamida (250 mg, 0,561 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó durante 3 horas y después el sólido precipitado se recogió por filtración. Se añadió etanol (3 ml) al sólido resultante y después la mezcla resultante se agitó durante 1 día. Después de esto, el sólido se recogió por filtración. Después el sólido se secó a presión reducida a temperatura ambiente durante 2 días, para obtener el compuesto del título (128 mg, 0,243 mmol).
- 30 Anal. calc. para C₁₉H₂₁N₇O₂SClBr0,4H₂O: C, 42,91; H, 4,01; O, 7,13; N, 18,57; Cl, 6,68; Br, 15,03; S, 6,08.
Encontrado: C, 42,73; H, 4,11; O, 7,19; N, 18,36; Cl, 6,64; Br, 14,96; S, 6,00.

(Ejemplo 3)

Monoclorhidrato de 2-{4-amino-2-[(3-cloro-4-metoxi-5-metilpiridin-2-ilo)metil]-2,7-dihidro-6-tia-1,2,3,5-tetraazabenz[cd]azulen-8-il}-N-metilacetamida

- 35 Se añadió ácido clorhídrico 3 N (0,786 ml, 2,358 mmol) a una suspensión en etanol (30 ml) de la 2-{4-amino-2-[(3-cloro-4-metoxi-5-metilpiridin-2-ilo)metil]-2,7-dihidro-6-tia-1,2,3,5-tetraazabenz[cd]azulen-8-il}-N-metilacetamida anterior (527,52 mg, 1,183 mmol), mientras se agitaba a 25 °C. La mezcla resultante se agitó durante 1 hora. El sólido precipitado se filtró, se lavó con etanol (6 ml) y después se secó a presión reducida a 40 °C durante 30 minutos, para obtener el compuesto del título (531,09 mg, 1,101 mmol).
- 40 Anal. calc. para C₁₉H₂₁Cl₂N₇O₂S: C, 47,31; H, 4,39; N, 20,33; O, 6,63; Cl, 14,70; S, 6,65.
Encontrado: C, 47,29; H, 4,40; N, 20,02; O, 6,87; Cl, 14,99; S, 6,83.

(Ejemplo 4)

Monometanosulfonato de 2-{4-amino-2-[(3-cloro-4-metoxi-5-metilpiridin-2-ilo)metil]-2,7-dihidro-6-tia-1,2,3,5-tetraazabenz[cd]azulen-8-il}-N-metilacetamida

- 45 Una solución en éter dietílico (50 ml) de ácido metanosulfónico (32 mg, 0,302 mmol) se añadió a 5 °C a una solución en acetonitrilo (150 ml) de 2-{4-amino-2-[(3-cloro-4-metoxi-5-metilpiridin-2-ilo)metil]-2,7-dihidro-6-tia-1,2,3,5-tetraaza-benz[cd]azulen-8-il}-N-metilacetamida (151 mg, 0,339 mmol). La mezcla resultante se agitó a 5 °C durante 25 minutos. Después de esto, el disolvente se retiró por destilación a presión reducida, después se

añadió una cantidad adecuada de éter dietílico al residuo y después un sólido se recogió por filtración. Después de esto, se añadió etanol (1 ml) al sólido resultante y después la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 día. Después de esto, un sólido se recogió por filtración y después se secó a presión reducida a temperatura ambiente durante 1 día, para obtener el compuesto del título (145 mg, 0,268 mmol).

5 Anal. calc. para $C_{20}H_{24}N_7O_5S_2ClO,3H_2O$: C, 44,71; H, 4,69; O, 15,45; N, 17,81; Cl, 6,54; S, 11,56.
Encontrado: C, 43,88; H, 4,53; O, 15,49; N, 17,91; Cl, 6,48; S, 11,71.

(Ejemplo 5)

Monoetano-1,2-disulfonato de 2-{4-amino-2-[(3-cloro-4-metoxi-5-metilpiridin-2-ilo)metil]-2,7-dihidro-6-tia-1,2,3,5-tetraazabenzocd]azulen-8-il}-N-metilacetamida

10 Una solución en acetona (50 ml) de etano-1,2-disulfonato (70 mg, 0,368 mmol) se añadió a 5 °C a una solución en acetona (50 ml) de 2-{4-amino-2-[(3-cloro-4-metoxi-5-metilpiridin-2-ilo)metil]-2,7-dihidro-6-tia-1,2,3,5-tetraaza-
benzo[cd]azulen-8-il}-N-metilacetamida (164 mg, 0,368 mmol). La mezcla resultante se agitó a 5 °C durante 20 minutos. Después de esto, la solución de reacción se dejó en reposo a 5 °C durante 18 horas y después se agitó a temperatura ambiente durante 7 horas. Después de esto, el sólido precipitado se recogió por filtración y después se
15 secó a presión reducida a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 día, para obtener el compuesto del título (119 mg, 0,187 mmol).

Anal. calc. para $C_{21}H_{26}N_7O_8S_3CM.4H_2O$: C, 38,06; H, 4,68; O, 22,29; N, 14,92; Cl, 5,25; S, 13,83.
Encontrado: C, 38,14; H, 4,39; O, 22,74; N, 14,83; Cl, 5,36; S, 14,55.

(Ejemplo de ensayo 1: Ensayo de ATPasa de Hsp90)

20 Un ensayo de ATPasa de Hsp90 se realizó usando a proteína recombinante Hsp90 de levadura (en lo sucesivo llamada rHsp90). Se clonó ADN de Hsp90 de levadura a partir de una genoteca de ADN genómico de levadura de acuerdo con un procedimiento convencional. El ADN de Hsp90 de levadura clonado se incorporó en un plásmido para expresión en *Escherichia coli*, y el plásmido se expresó en *Escherichia coli* para obtener rHsp90.

25 El compuesto de ensayo se disolvió en DMSO a 10 mM. La solución disuelta se diluyó con DMSO a dos concentraciones, 1 mM y 0,2 mM. Cada solución diluida se diluyó 10 veces más con un tampón de ensayo (Tris 100 mM, pH 7,4, KCl 20 mM, $MgCl_2$ 6 mM) (concentración de cada solución de compuesto de ensayo: 100 μ M y 20 μ M; concentración de DMSO: 10 %).

30 Se disolvió rHsp90 en un tampón TE (Tris 20 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM) a una concentración de 2,531 mg/ml. La solución se diluyó con un tampón de ensayo a 125 μ g/ml y se repartió en una placa de ensayo de 96 pocillos a 40 μ l por pocillo (concentración final: 100 μ g/ml).

35 La solución de compuesto de ensayo se repartió a 5 μ l por pocillo y después las soluciones en los pocillos respectivos se mezclaron usando un mezclador de placas. Se diluyó ATP 100 mM (Sigma, Catalog N.º A-7699) con un tampón de ensayo a 1 mM y se repartió a 5 μ l por pocillo (concentración final: 100 μ M). Las soluciones en los pocillos respectivos se mezclaron usando un mezclador de placas y después la placa de ensayo se dejó en reposo en a 37 °C durante dos horas.

40 Se repartió Reactivo BIOMOL GREEN (BIOMOL, N.º de catálogo AK-111) at 100 μ l por pocillo, y la reacción se finalizó. Las soluciones en los pocillos respectivos se mezclaron usando un mezclador de placas y después se repartió citrato sódico al 34 % a 10 μ l por pocillo. Las soluciones en los pocillos respectivos se mezclaron usando un mezclador de placas y después la placa de ensayo se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 30 minutos. La absorbancia a 650 nm de cada pocillo se midió usando SpectramaxPLUS (Molecular Devices).

45 La relación de la absorbancia del grupo añadido al compuesto de ensayo con respecto a la absorbancia del grupo sin el compuesto de ensayo (valor T/C) se determinó mediante la siguiente fórmula de cálculo, basada en la suposición de que la absorbancia del pocillo en el que se añadieron el compuesto de ensayo y rHsp90 era A, la absorbancia del pocillo en el que únicamente se añadió rHsp90 era B y la absorbancia del pocillo en el que no se añadieron ni el compuesto de ensayo ni rHsp90 era C. El cálculo se realizó usando Softmax Pro 4,6 (Molecular Devices). Adicionalmente, se calculó una tasa de inhibición (%) usando la siguiente fórmula de cálculo:

$$T/C = (A-C)/(B-C)$$

El compuesto del Ejemplo 1 mostró una actividad inhibidora de ATPasa del 50 % o superior a una concentración de 2 μ M.

50 (Ejemplo de ensayo 2: ensayo de inhibición del crecimiento celular)

Se realizó un ensayo de inhibición del crecimiento celular usando dos tipos de células (SK-BR.3 de línea celular de cáncer de mama humano y NCI-H460 de línea celular de cáncer de pulmón humano).

Se suspendieron células de cada tipo en un medio y se sembraron en una placa multi pocillo de 96 pocillos a 2000 células/150 μ l/pocillo en el caso de SK-BR-3 y a 500 células/150 μ l/pocillo en el caso de NCI-H460. El compuesto de

5 ensayo se disolvió en DMSO y este se diluyó con un medio para preparar una solución de muestra (concentración de DMSO: 0,5 % o inferior). El día de la siembra, se añadieron adicionalmente a las células 50 µl de medio que contenía DMSO al que no se había añadido el compuesto de ensayo (en lo sucesivo llamada solución diluida de DMSO; concentración de DMSO: 0,5 % o inferior) o 50 µl de la solución de muestra. Se realizó un ensayo de MTT inmediatamente después y 72 horas después de añadir la solución de muestra o la solución diluida de DMSO a las células. El ensayo de MTT se realizó como se indica a continuación.

10 Se añadieron 5 mg/ml de una solución de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) a 20 µl por pocillo. Después de esto, la placa se incubó a 37 °C en CO₂ al 5 % durante cuatro horas. La placa se centrifugó a 1200 rpm durante cinco minutos y después el sobrenadante de cultivo se retiró mediante succión usando a dosificador. Se añadió DMSO a 150 µl por pocillo y el formazán generado se disolvió. La placa se agitó usando un mezclador de placas para teñir uniformemente los pocillos respectivos. La absorbancia de cada pocillo se midió usando un lector de placas a una OD de 540 nm con una referencia de 660 nm.

15 Se determinó el valor T/C (%) para cada concentración mediante la siguiente fórmula de cálculo y se representó una curva de dosis-respuesta para calcular la concentración inhibidora del crecimiento del 50 % (valor GI₅₀), basada en la suposición de que el valor de OD medido inmediatamente después de añadir la solución de muestra era S, el valor de OD medido 72 horas después de añadir la solución de muestra era T y el valor de OD medido 72 horas después de añadir la solución diluida de DMSO era C.

$$T/C (\%) = (T-S)/(C-S) \times 100$$

Los resultados se muestran a continuación.

	GI ₅₀ de GI ₅₀ (nM)	
	SK-BR-3	NCI-H460
Compuesto 1	13	26

20

(Ejemplo de ensayo 3: ensayo de actividad antitumoral *in vivo*)

Se realizó un ensayo de actividad antitumoral usando NCI-H1975 (línea celular de cáncer de pulmón de células humanas no pequeñas).

25 En el día 0, las células mencionadas anteriormente se trasplantaron subcutáneamente en la región del costado izquierdo de cada ratón macho desnudo (4 x 10⁶ células por ratón).

En el día 10, se midieron el peso corporal y el diámetro del tumor. Después, los ratones se dividieron en grupos aleatoriamente, de manera que los grupos no tuvieron diferencias estadísticamente significativas en términos de peso corporal y el volumen de tumor estimado (el volumen de tumor estimado = el diámetro largo del tumor x el diámetro corto del tumor x el diámetro corto del tumor/2).

30 En el día 11, el diámetro del tumor se midió y después se inició la administración del compuesto de ensayo.

El compuesto de ensayo se preparó a una concentración de 1,5 mg/ml y se administró por vía oral a los ratones a una dosis de 15 mg/10 ml/kg.

Tal administración se realizó una vez al día durante el periodo del día 11 al día 14 y se midió el diámetro del tumor durante el periodo del día 11 al día 14 y en el día 17.

35 El día 17, el tumor se extirpó y después se midió el peso húmedo del tumor.

El peso inicial del tumor se calculó a partir del volumen del tumor medido el día 11, definiendo la gravedad como 1.

El peso aumentado del tumor se calculó restando el peso inicial del tumor del peso húmedo del tumor medido el día 17.

La tasa de inhibición del crecimiento tumoral ($GI\% = 100 - T/C (\%)$) de cada compuesto de ensayo se calculó a partir de la relación ($T/C (\%)$) del peso de tumor aumentado (T) del grupo de administración de compuesto de ensayo con respecto al peso de tumor aumentado (C) del grupo de control (grupo de administración de disolvente).

5 El ensayo de significancia entre el grupo de control y el grupo de administración de compuesto de ensayo se realizó de acuerdo con el ensayo de comparación múltiple de Dunnett usando EXSAS ver. 7.5.2.2 (Arm Corp).

El compuesto del Ejemplo 1 mostró una actividad inhibidora del crecimiento tumoral significativa del 50 % o superior.

(Ejemplo de ensayo 4: Ensayo de inhibición de CYP3A4 usando microsoma hepático humano)

10 Se usaron Midazolam (un sustrato; Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 1'-Hidroximidazolam (una diana para su medición; Becton, Dickinson and Company, Japón), Ketoconazol (un control positivo; Sigma Chemical Co.), NADPH Regeneration System (Solución A y Solución B (Becton, Dickinson and Company, Japón)). Se pesaron cantidades adecuadas de dicho compuesto de ensayo, sustrato, diana para su medición y control positivo. Estas se disolvieron en DMSO y después se diluyeron con acetonitrilo, según fue adecuado.

180 μ l de una solución de reacción preparada mezclando los siguientes materiales (1) a (5) se habían calentado previamente a 37 °C durante 10 minutos:

- 15 (1) Tampón fosfato potásico (pH 7,4; concentración final: 50 mM)
 (2) Agua purificada
 (3) Midazolam (concentración final: 2,5 μ M)
 (4) Compuesto de ensayo (concentración final: 10 μ M; control negativo: ningún compuesto; control positivo: Ketoconazol, concentración final: 0,1 μ M)
 20 (5) Microsoma hepático humano (concentración final: 0,05 mg-P/ml).

25 Se añadieron 20 μ l del NADPH Regeneration System (solución A/solución B/agua purificada = 5/1/4) a esta solución de reacción y la reacción se inició. La mezcla se incubó durante 10 minutos. Después de esto, se muestrearon 50 μ l de la solución de reacción y después esta se añadió a 200 μ l de acetonitrilo, seguido de la terminación de la reacción. Además, se añadieron 50 μ l de una solución de acetonitrilo que contenía una sustancia de patrón interno a la solución de reacción.

Para retirar proteínas de esta muestra, la solución de reacción se transfirió a una placa de recolección de 96 pocillos (Waters) usando Captiva (marca registrada) (GL Sciences). Esta solución de muestras se definió como una muestra usada para el ensayo de CL-EM/EM.

30 Se prepararon muestras de 1'-Hidroximidazolam que tenían concentraciones conocidas (concentraciones finales: de 0 a 5 μ M; 5 puntos en total), por separado. Se preparó una curva de calibración usada para el ensayo y se ensayó la concentración de 1'-Hidroximidazolam en la muestra. Esta reacción se realizó por duplicado.

La cantidad de 1'-Hidroximidazolam generada en el control negativo se definió como 100 % y después se calculó la proporción de la cantidad de este compuesto generada mediante la adición de cada compuesto. Por tanto, se obtuvo el valor de inhibición de CYP3A4.

35 Como resultado, la tasa de inhibición del compuesto 1 fue 15 %. El control positivo, Ketoconazol, mostró una tasa de inhibición del 82 %.

(Ejemplo de ensayo 5: ensayo de actividad antitumoral *in vivo*)

Un ensayo de actividad antitumoral se realizó usando NCI-H1650 (línea celular de cáncer de pulmón de células humanas no pequeñas).

40 Las células mencionadas anteriormente se trasplantaron por vía subcutánea en la región del costado derecho de cada ratón desnudo macho (1×10^7 células por ratón).

Treinta y nueve días después, el tumor se extirpó y se preparó una pequeña sección que tenía cada lado de 2 a 3 mm. La sección pequeñas se trasplantó subcutáneamente en la región del costado derecho de cada ratón desnudo macho (Día 0).

45 El día 14, se midieron el peso corporal y el diámetro del tumor. Después, los ratones se dividieron en grupos aleatoriamente, de manera que los grupos no tuvieran diferencias estadísticamente significativas en términos de peso corporal y volumen de tumor estimado (el volumen de tumor estimado = el diámetro más largo del tumor x el diámetro más corto del tumor x el diámetro corto del tumor /2).

El día 14, se inició entonces la administración del compuesto de ensayo.

50 Los compuestos de ensayo se prepararon a concentraciones de 0,65, 0,9 y 1,3 mg/ml, y se administraron por vía oral a los ratones de una dosis de 10 ml/kg.

ES 2 576 056 T3

Tal administración se realizó una vez al día durante el periodo del día 14 al día 31 y se midió el diámetro del tumor el día 14, día 17, día 21, día 24, día 28 y día 31.

El día 31, el tumor se extirpó y después se midió el peso húmedo del tumor.

El peso inicial del tumor se calculó a partir del volumen de tumor medido el día 14, definiendo la gravedad como 1.

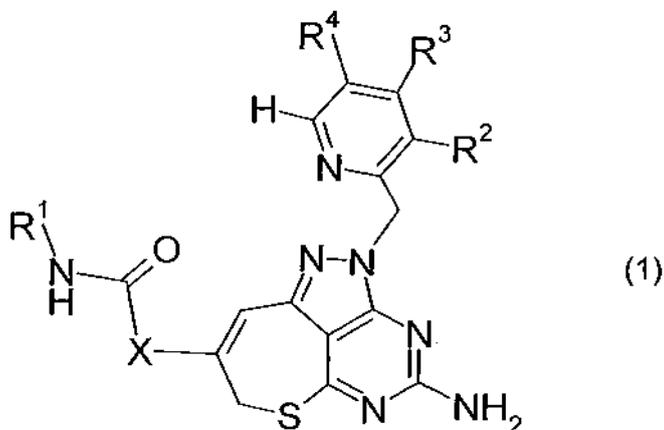
5 El peso aumentado del tumor se calculó restando el peso inicial del tumor del peso húmedo del tumor medido el día 31.

La tasa de inhibición del crecimiento tumoral ($GI\% = 100 - T/C (\%)$) de cada compuesto de ensayo se calculó a partir de la proporción ($T/C (\%)$) del peso de tumor aumentado (T) del grupo de administración del compuesto de ensayo con respecto al peso tumoral aumentado (C) del grupo de control (grupo de administración de disolvente).

10 El ensayo de significancia entre el grupo de control y el grupo de administración de compuesto de ensayo se realizó de acuerdo con el ensayo de comparación múltiple de Dunnett usando EXSAS ver. 7.5.2.2 (Arm Corp).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la fórmula (1) o una sal del mismo:



en el que, en la fórmula (1),

- 5 R¹ representa un grupo metilo,
 R² representa un átomo de cloro,
 R³ representa un grupo metoxi,
 R⁴ representa un grupo metilo, y
 X representa un grupo metileno.
- 10 2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto es 2-{4-amino-2-[(3-cloro-4-metoxi-5-metilpiridin-2-ilo)metil]-2,7-dihidro-6-tia-1,2,3,5-tetraazabenzo[cd]azulen-8-il}-N-metilacetamida.
3. Un bromhidrato de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2.
4. Un clorhidrato de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2.
5. Un metanosulfonato de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2.
- 15 6. Un etano-1,2-disulfonato de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2.
7. Un medicamento que comprende un compuesto de acuerdo con uno cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 como un principio activo.
8. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un vehículo farmacológicamente aceptable.
- 20 9. Uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la fabricación de un medicamento.
10. Uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
- 25 11. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en el tratamiento del cáncer.