

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 590 144**

51 Int. Cl.:

C07D 491/147 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
C07D 471/14 (2006.01)
C07D 487/04 (2006.01)
C07D 487/14 (2006.01)
C07D 495/14 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.04.2012 PCT/CA2012/000285**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2012 WO12135937**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2012 E 12767447 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2694515**

54 Título: **Inhibidores de proteína quinasa**

30 Prioridad:

04.04.2011 US 201161471322 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.11.2016

73 Titular/es:

**PHARMASCIENCE INC. (100.0%)
6111 Royalmount Avenue Suite 100
Montréal, Québec H4P 2T4, CA**

72 Inventor/es:

**LAURENT, ALAIN;
ROSE, YANNICK;
MORRIS, STEPHEN y
JAQUITH, JAMES**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 590 144 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

Inhibidores de proteína quinasa

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con novedosos inhibidores de la quinasa. En particular, la presente invención se relaciona con inhibidores de tirosina quinasa receptoras tales como los miembros del receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), incluyendo cFMS (CSF-1R) y tirosina quinasa 3 similar a FMS (FLT3) que normalmente regulan la función celular a través de la activación por ligandos externos.

Antecedentes de la invención

10 Las proteínas quinasa son un gran grupo de proteínas de señalización intracelulares y transmembrana en las células eucariotas (por ejemplo, véase Manning, G., D. B. Whyte, et al. (2002). "The protein kinase complement of the human genome." *Science* 298(5600): 1912-1934). Estas enzimas son responsables de la transferencia del fosfato terminal (γ) del ATP a los residuos de aminoácidos específicos de las proteínas objetivo. La fosforilación de residuos de aminoácidos específicos de las proteínas objetivo pueden modular su actividad dando lugar a profundos cambios en la señalización celular y el metabolismo. Las quinasa se pueden encontrar en la membrana celular, citosol y los orgánulos tales como el núcleo y son responsables de la mediación de múltiples funciones celulares incluyendo el metabolismo, el crecimiento celular y la división, la señalización celular, la modulación de la respuesta inmune, y la apoptosis. Los receptores de la superficie de la célula con actividad de proteína tirosina quinasa se conocen como tirosina quinasa receptoras. Esta gran familia de proteínas incluye receptores del factor de crecimiento con diversa actividad biológica (por ejemplo, véase Lemmon, M. A. and J. Schlessinger (2010). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." *Cell* 141(7): 1117-1134).

La activación aberrante o expresión excesiva de diversas proteínas quinasa están implicadas en el mecanismo de múltiples enfermedades y trastornos caracterizados por la proliferación benignas como malignas, exceso de angiogénesis, así como enfermedades resultantes de la activación inapropiada del sistema inmune. Así, se espera que los inhibidores de quinasa selectas o familias de quinasa sean útiles en el tratamiento de enfermedades y trastornos tales como: cáncer, artritis, trastornos mieloproliferativos, hipertrofia cardíaca, fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, aterosclerosis, restenosis, glomerulonefritis, psoriasis, lupus, esclerosis múltiple, degeneración macular, asma, sinovitis reactiva y similares (por ejemplo, véase: Chitu, V. and E. R. Stanley (2006). "Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation." *Curr Opin Immunol* 18(1): 39-48; Mitchell-Jordan, S. A., T. Holopainen, et al. (2008). "Loss of Bmx nonreceptor tyrosine kinase prevents pressure overload-induced cardiac hypertrophy." *Circ Res* 103(12): 1359-1362; Uemura, Y., H. Ohno, et al. (2008). "The selective M-CSF receptor tyrosine kinase inhibitor Ki20227 suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Neuroimmunol* 195(1-2): 73-80; Cohen, P. (2009). "Targeting protein kinases for the development of antiinflammatory drugs." *Curr Opin Cell Biol* 21(2): 317-324; Menke, J., W. A. Rabacal, et al. (2009). "Circulating CSF-1 promotes monocyte and macrophage phenotypes that enhance lupus nephritis." *J Am Soc Nephrol* 20(12): 2581-2592; Grimminger, F., R. T. Schermuly, et al. (2010). "Targeting non-malignant disorders with tyrosine kinase inhibitors." *Nat Rev Drug Discov* 9(12): 956-970; Hilgendorf, I., S. Eisele, et al. (2011). "The oral spleen tyrosine kinase inhibitor fostamatinib attenuates inflammation and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice." *Arterioscler Thromb Vase Biol* 31(9): 1991-1999; Sharma, P. S., R. Sharma, et al. (2011). "VEGF/VEGFR pathway inhibitors as anti-angiogenic agents: present and future." *Curr Cancer Drug Targets* 11(5): 624-653; Fabbro, D., S. W. Cowan-Jacob, et al. (2012). "Targeting cancer with small-molecular-weight kinase inhibitors." *Methods Mol Biol* 795: 1-34)

Ejemplos de quinasa que pueden ser direccionadas para modular enfermedades incluyen tirosina quinasa receptoras tales como los miembros de las familias del receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) y del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR).

45 La familia del PDGFR de tirosina quinasa receptoras incluye cFMS (CSF-1R) y tirosina quinasa 3 similar a FMS (FLT3), que normalmente regulan la función celular a través de la activación por ligandos externos.

La cFMS es una quinasa receptora de transmembrana que se enlaza a un factor 1 estimulante de colonias (CSF-1) y a la interleuquina (IL)-34 (IL-34) (por ejemplo, véase Chihara, T., S. Suzu, et al. (2010). "IL-34 and M-CSF share the receptor Fms but are not identical in biological activity and signal activation." *Cell Death Differ* 17(12): 1917-1927) y que juega un papel importante en la biología de los macrófagos, monocitos y de los osteoclastos. La ruta de cFMS-CSF-1 está sobrerregulada en diversas enfermedades humanas que involucran la activación crónica de macrófagos. La activación de cFMs juega un papel central en la artritis a través de su papel en la diferenciación de los monocitos (por ejemplo, véase Paniagua, R. T., A. Chang, et al. (2010). "c-Fms-mediated differentiation and priming of monocyte lineage cells play a central role in autoimmune arthritis." *Arthritis Res Ther* 12(1): R32) y se ha demostrado que la inhibición de cFMs es efectiva en modelos preclínicos de la artritis (por ejemplo, véase: Conway, J. G., H. Pink, et al. (2008). "Effects of the cFMS kinase inhibitor 5-(3-methoxy-4-((4-methoxybenzyl)oxy)benzyl)pyrimidine-2,4-diamine (GW2580) in normal and arthritic rats." *J Pharmacol Exp Ther* 326(1): 41-50); Ohno, H., Y. Uemura, et al. (2008). "The orally-active and selective c-Fms tyrosine kinase inhibitor Ki20227 inhibits disease progression in a

collageninduced arthritis mouse model." *Eur J Immunol* 38(1): 283-291; Huang, H., D. A. Hutta, et al. (2009). "Pyrido[2,3-d]pyrimidin- 5-ones: a novel class of antiinflammatory macrophage colony-stimulating factor-1 receptor inhibitors." *J Med Chem* 52(4): 1081-1099; and Illig, C. R., C. L. Manthey, et al. (2011). "Optimization of a potent class of arylamide colonystimulating factor-1 receptor inhibitors leading to antiinflammatory clinical candidate 4-cyano-N-[2-(1-cyclohexen-1-yl)- 4-[1-[(dimethylamino)acetyl]-4-piperidinyl]phenyl]-1H-imidazole-2-carboxamide (JNJ-28312141)." *J Med Chem* 54(22): 7860-7883) lo que sugiere que los inhibidores de quinasa cFMS pueden ser útiles en el tratamiento de la artritis humana. También se ha demostrado que la inhibición de cFMS es efectiva en un modelo preclínico de la esclerosis múltiple (Uemura, Y., H. Ohno, et al. (2008). "The selective M-CSF receptor tyrosine kinase inhibitor Ki20227 suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Neuroimmunol* 195(1-2): 73-80).

Se espera que los inhibidores de la cFMS sean terapéuticamente útiles en el tratamiento de tumor de células de ganancia tenosinovial, sinovitis villonodular pigmentada y otras sinovitis reactivas que frecuentemente se caracterizan por altos niveles de la expresión de CSF-1 (por ejemplo, véase Cupp, J. S., M. A. Miller, et al. (2007). "Translocation and expression of CSF1 in pigmented villonodular synovitis, tenosynovial giant cell tumor, rheumatoid arthritis and other reactive synovitides." *Am J Surg Pathol* 31(6): 970-976). Los estudios preclínicos que utilizan anticuerpos dirigidos a CSF-1 predicen que los inhibidores de cFMS pueden ser útiles en el tratamiento de estas enfermedades humanas (Cheng, H., P. W. Clarkson, et al. (2010). "Therapeutic Antibodies Targeting CSF1 Impede Macrophage Recruitment in a Xenograft Model of Tenosynovial Giant Cell Tumor." *Sarcoma* 2010: 174528).

La cFMS es importante en la diferenciación y función de osteoclastos y por lo tanto la inhibición de cFMS puede ser útil en la modulación de la función de los osteoclastos en la artritis, así como en la formación y la progresión de las metástasis óseas (por ejemplo, véase Manthey, C. L., D. L. Johnson, et al. (2009). "JNJ-28312141, a novel orally active colony-stimulating factor-1 receptor/ FMS-related receptor tyrosine kinase-3 receptor tyrosine kinase inhibitor with potential utility in solid tumors, bone metastases, and acute myeloid leukemia." *Mol Cancer Ther* 8(11): 3151-3161). La secreción de factores de crecimiento y citoquinas inmunosupresoras por los macrófagos asociados a tumores sugiere que el direccionamiento de su función a través de la inhibición de la cFMS podría ser una terapia útil anticáncer (por ejemplo, véase Bingle, L., N. J. Brown, et al. (2002). "The role of tumourassociated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies." *J Pathol* 196(3): 254-265). De acuerdo con lo anterior, la inhibición o anulación de cFMS ha demostrado eficacia en modelos de tumores a través de la inhibición de los macrófagos asociados a tumores (por ejemplo, véase Aharinejad, S., P. Paulus, et al. (2004). "Colony-stimulating factor-1 blockade by antisense oligonucleotides and small interfering RNAs suppresses growth of human mammary tumor xenografts in mice." *Cancer Res* 64(15): 5378-5384; and Manthey, Johnson et al. 2009) lo que sugiere que los inhibidores de cFMS pueden tener utilidad en el tratamiento del cáncer humano.

La FLT3 está mutada en aproximadamente el 30% de los pacientes adultos con leucemia mieloide aguda (AML) y tiene un impacto significativo en el pronóstico (por ejemplo, véase Gilliland, D. G. and J. D. Griffin (2002). "The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia." *Blood* 100(5): 1532-1542). De acuerdo con lo anterior, se espera que la inhibición de FLT3 sea útil en el tratamiento de enfermedades malignas tales como AML (por ejemplo, véase: Knapper, S. (2011). "The clinical development of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia." *Expert Opin Investig Drugs* 20(10): 1377-1395; Pemmaraju, N., H. Kantarjian, et al. (2011). "FLT3 inhibitors in the treatment of acute myeloid leukemia: the start of an era?" *Cancer* 117(15): 3293-3304). Adicionalmente, el ligando de FLT3 está implicado en la inducción y progresión de la artritis lo que sugiere que los inhibidores de FLT3 pueden ser útiles en el tratamiento de la artritis (por ejemplo, véase Dehlin, M., M. Bokarewa, et al. (2008). "Intra-articular fms-like tyrosine kinase 3 ligand expression is a driving force in induction and progression of arthritis." *PLoS One* 3(11): e3633).

Se espera que la inhibición de los miembros del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y las familias de TIE2 tengan efectos antiangiogénicos que pueden ser útiles en el tratamiento de muchas enfermedades o trastornos que incluyen cáncer y artritis (por ejemplo, véase: Tamar, J. and B. Dome (2008). "Antiangiogenic drugs and tyrosine kinases." *Anticancer Agents Med Chem* 8(5): 462-469; Huang, H., A. Bhat, et al. (2010). "Targeting the ANGPT-TIE2 pathway in malignancy." *Nat Rev Cancer* 10(8): 575-585; y Huang, H., J. Y. Lai, et al. (2011). "Specifically targeting angiopoietin-2 inhibits angiogenesis, Tie2-expressing monocyte infiltration, and tumor growth." *Clin Cancer Res* 17(5): 1001-1011)..

El receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGFR1) provee un ejemplo adicional de una quinasa que puede ser direccionada para efecto terapéutico. El FGFR1 se amplifica en subconjuntos selectos de cánceres (por ejemplo, véase: Courjal, F., M. Cuny, et al. (1997). "Mapping of DNA amplifications at 15 chromosomal localizations in 1875 breast tumors: definition of phenotypic groups." *Cancer Res* 57(19): 4360-4367; and Tsujimoto, H., H. Sugihara, et al. (1997). "Amplification of growth factor receptor genes and DNA ploidy pattern in the progression of gastric cancer." *Virchows Arch* 431(6): 383-389) y la inhibición de FGFR1 ha demostrado eficacia en modelos preclínicos de cáncer (por ejemplo, véase Gozgit, J. M., M. J. Wong, et al. (2012). "Ponatinib (AP24534), a multi-targeted pan-FGFR inhibitor with activity in multiple FGFR-amplified or mutated cancer models." *Mol Cancer Ther*. 11(3):690-9).

La inhibición de quinasas que utilizan inhibidores de moléculas pequeñas ha llevado exitosamente a usar varios agentes terapéuticos aprobados usados en el tratamiento de condiciones humanas. Aquí, se divulga una novedosa

familia de inhibidores de quinasa. Adicionalmente, se demuestra que las modificaciones en la sustitución de compuestos pueden influenciar la selectividad de la quinasa y por lo tanto la función biológica de ese agente y el estado de la enfermedad para la que puede ser útil como un agente terapéutico.

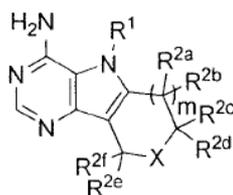
5 La WO 2012/006032 está dirigida hacia compuestos tricíclicos, sales farmacéuticamente aceptables, profármacos, solvatos, o hidratos de los mismos, que tienen actividad antimetabólica, actividad de resistencia antifármacos múltiples, por ejemplo inhibición de la glicoproteína P, y actividad antitumoral, y que inhiben la sensibilidad a paclitaxel y células tumorales resistentes.

La WO 92/06094 está dirigida hacia ciertos cicloalquilos y azacicloalquil pirrolopirimidinas que se unen selectivamente a los receptores GABA_A.

10 Resumen de la invención

La presente invención se relaciona con novedosos inhibidores de quinasa. En particular, la presente invención se relaciona con inhibidores de tirosina quinasa receptoras tales como los miembros del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), incluyendo cFMS, Flt3, KDR, y FGFR1.

Se provee aquí un compuesto de Fórmula 1:

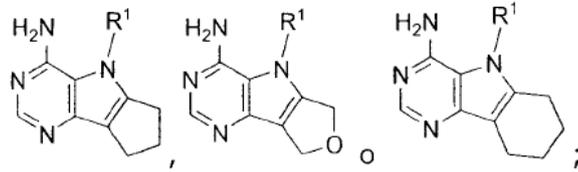


Fórmula 1

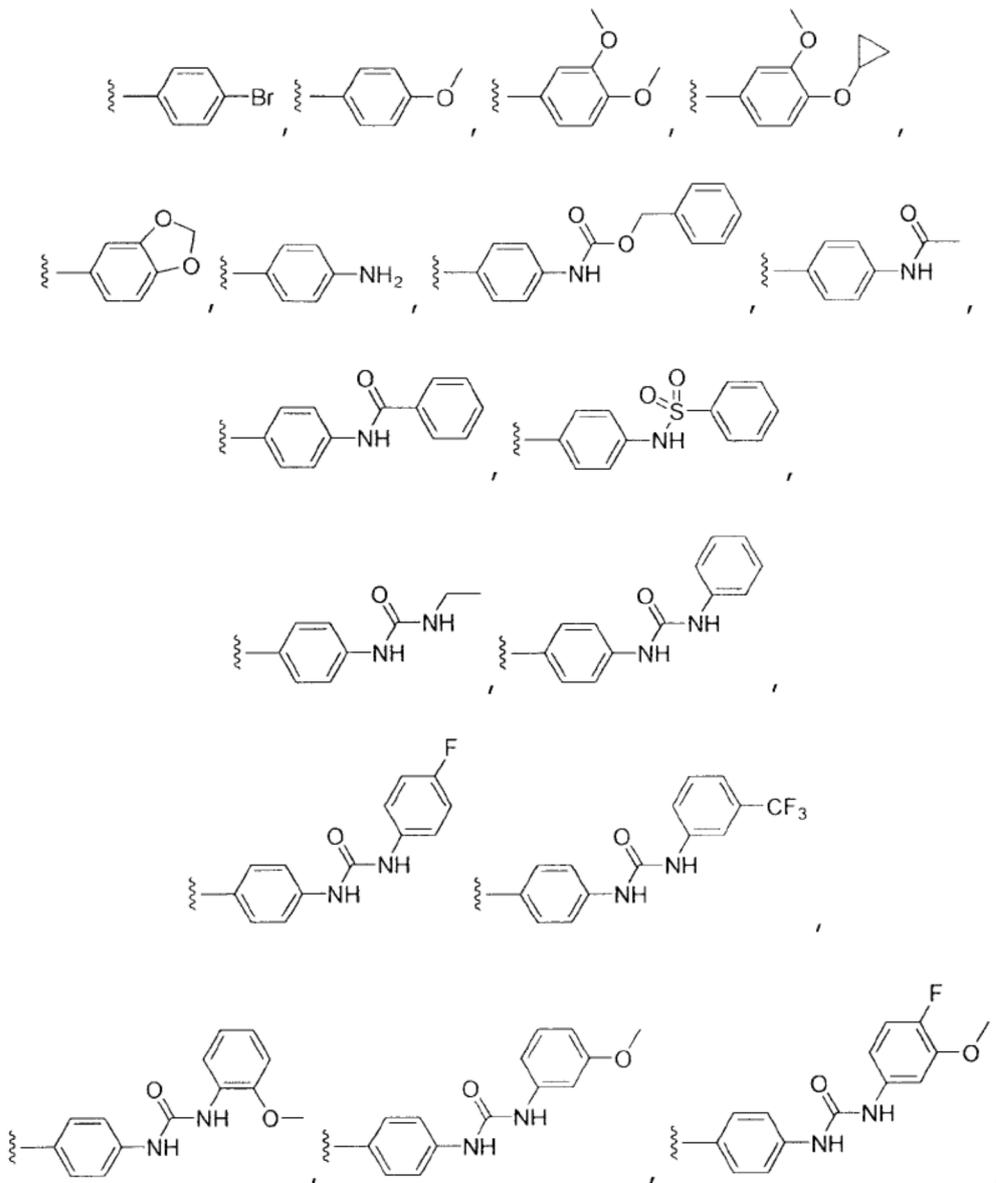
- 15 m es un entero de 0 a 1;
n es un entero de 0 a 2;
R¹ se selecciona de alquilo, heteroalquilo, carbociclilo y heterociclilo;
- 20 R¹ también se selecciona de arilo, o heteroarilo, en donde el arilo y heteroarilo son sustituidos por los grupos seleccionados de:
- 1) Halógeno,
 - 2) Alcoxi,
 - 3) Amino,
 - 4) -N(H)C(O)O-alquilo
 - 5) -N(H)SO₂-arilo,
 - 6) -N(H)SO₂-heteroarilo,
 - 7) -N(H)CON(H)-arilo,
 - 8) y -N(H)CON(H)-heteroarilo;
- 30 R^{2a}, R^{2b}, R^{2c}, R^{2d}, R^{2e}, R^{2f} se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo, heteroalquilo, carbociclilo, heterociclilo, arilo, heteroarilo. R^{2a} y R^{2b}, R^{2c} y R^{2d} o R^{2e} y R^{2f} puede ser fusionado para formar un sistema de anillo cicloalquilo o heterociclilo de 3 a 8 miembros;
- X se selecciona de CH₂, O, S(O)_n, NR³;
- R³ se selecciona de hidrógeno, alquilo, heteroalquilo, carbociclilo, heterociclilo, arilo, heteroarilo, -C(O)R⁴, -C(O)OR⁴, -S(O)₂R⁴, -C(O)NR⁴R⁵, -S(O)₂NR⁴R⁵, -C(S)NR⁴R⁵; y

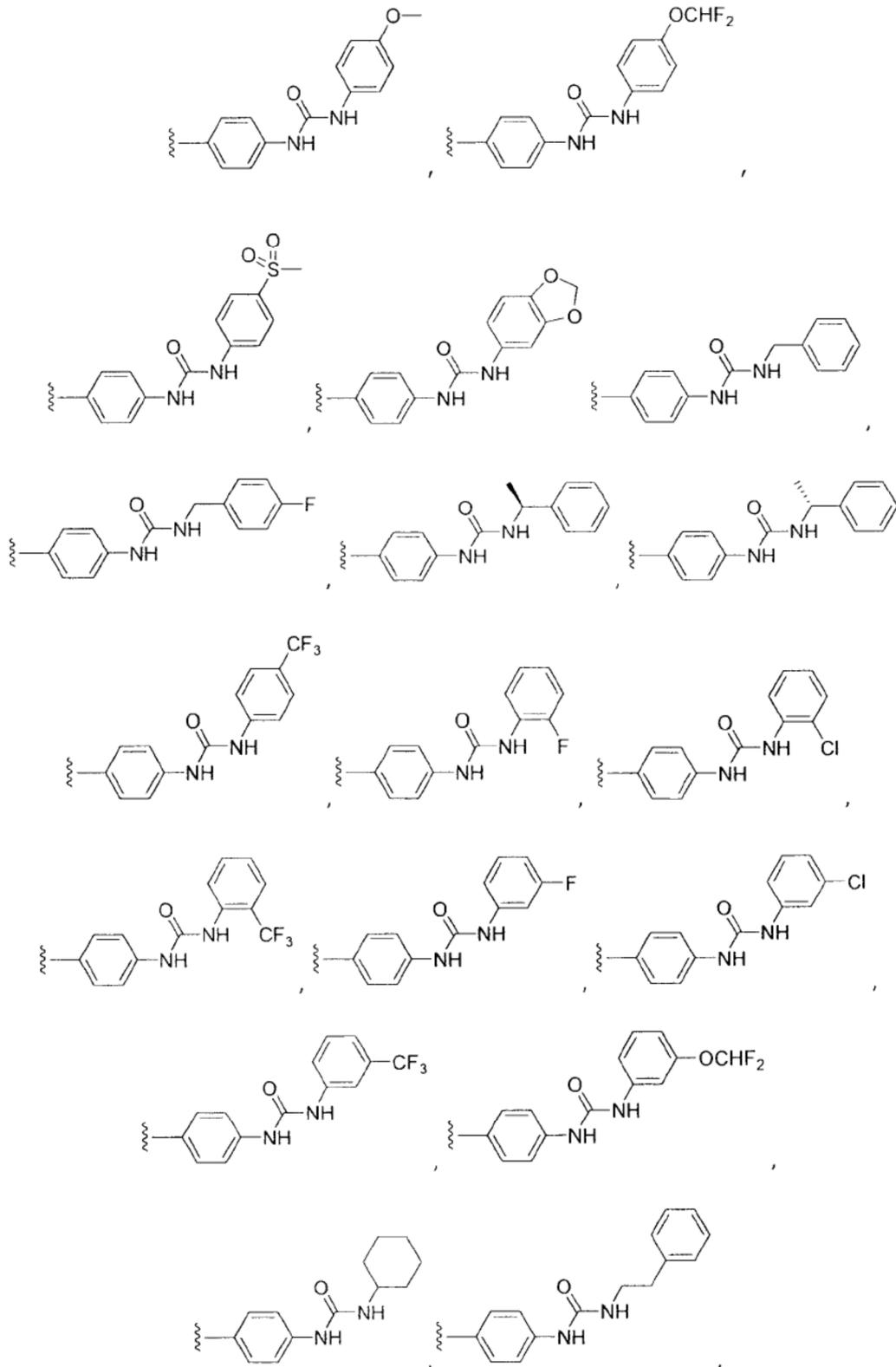
R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de alquilo, heteroalquilo, carbocicilo, heterocicilo, arilo, heteroarilo o R⁴ y R⁵ pueden ser fusionados para formar un sistema de anillo heterocicilo de 3 a 8 miembros.

En ciertas realizaciones, los compuestos de Fórmula 1 pueden ser definidos adicionalmente como:



5 en donde R¹ puede ser definido como:





En otro aspecto de la presente invención, se provee un uso del compuesto de Fórmula 1 como un inhibidor de la proteína quinasa, más particularmente, como un inhibidor de cFMS, Flt3, KDR, FGFR1 y Tie2.

5 Otro aspecto de la presente invención provee un método de modulación de la función quinasa, comprendiendo el método poner en contacto una célula con un compuesto de la presente invención en una cantidad suficiente para modular la actividad enzimática de una quinasa o quinasas dadas, tal como cFMS, FLT3, KDR, FGFR1, Tie2 u otros, modulando por lo tanto la función quinasa.

10 Otro aspecto de la presente invención provee un método de modulación de la función de quinasa objetivo, comprendiendo el método a) poner en contacto una célula con un compuesto de la presente invención en una cantidad suficiente para modular la función quinasa objetivo, por lo tanto b) modular la actividad de la quinasa objetivo y la señalización.

15 Otro aspecto de la presente invención provee una sonda, comprendiendo la sonda un compuesto de Fórmula 1 marcado con un marcador detectable o una etiqueta de afinidad. En otras palabras, la sonda comprende un residuo de un compuesto de Fórmula 1 conjugado covalentemente a un marcador detectable. Tales marcadores detectables incluyen, pero no se limitan a, una unidad estructural fluorescente, una unidad estructural quimioluminiscente, un agente de contraste paramagnético, un quelato de metal, una unidad estructural que contiene isótopos radiactivos, o biotina.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

20 La presente invención se relaciona con novedosos inhibidores de la quinasa. Los inventores han encontrado que estos compuestos son inhibidores efectivos de proteínas quinasas, incluyendo miembros de la superfamilia de la tirosina receptora.

25 Los compuestos de la presente invención se pueden formular en una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmula 1 con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden estar en una forma farmacéutica convencional adecuada para la administración oral (por ejemplo, tabletas, cápsulas, gránulos, polvos y jarabes), la administración parenteral (por ejemplo, inyecciones (intravenosa, intramuscular, o subcutánea)), preparaciones para infusión en gotas, inhalación, loción ocular, administración tópica (por ejemplo, ungüento), o supositorios. Independientemente de la ruta de administración seleccionada, los compuestos se pueden formular en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

30 La expresión "farmacéuticamente aceptable" se emplea aquí para referirse a aquellos ligandos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del juicio médico, adecuados para uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otros problemas o complicaciones, conmensurado con una relación razonable de beneficio/riesgo.

35 La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" como se usa aquí, significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un agente de relleno líquido o sólido, diluyente, excipiente, solvente o material de encapsulación. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de que sea compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz, almidón de patata, y β -ciclodextrina sustituida o no sustituida; (3) celulosa, y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes reguladores, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirogenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones reguladoras de fosfato; y (21) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

45 El término "sal farmacéuticamente aceptable" se relaciona con las sales de adición de ácido relativamente no tóxicas, inorgánicas y orgánicas de los compuestos. Estas sales se pueden preparar in situ durante el aislamiento final y la purificación de los compuestos, o haciendo reaccionar por separado un compuesto, o compuestos purificados en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado, y aislando la sal así formada. Las sales representativas incluyen el bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato, laurilsulfonato y sales de aminoácidos, y similares. (Véase, por ejemplo, Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66: 1-19.)

55 En otros casos, los compuestos de la presente invención pueden contener uno o más grupos funcionales ácidos y, así, son capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con bases farmacéuticamente aceptables. El

término "sales farmacéuticamente aceptables" en estos casos se relaciona con las sales de adición de base inorgánicas y orgánicas relativamente no tóxicas de un o unos compuestos. Estas sales pueden asimismo ser preparadas in situ durante el aislamiento final y la purificación de los compuestos, o haciendo reaccionar por separado el compuesto purificado en su forma de ácido libre con una base adecuada, tal como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable, con amoníaco, o con una amina orgánica primaria, secundaria o terciaria farmacéuticamente aceptable. Sales alcalinas o alcalinotérricas representativas incluyen las sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio, y sales de aluminio, y similares. Aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de bases incluyen etilamina, dietilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina y similares (véase, por ejemplo, Berge et al., supra).

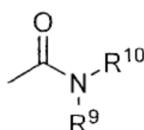
Tal como se utiliza aquí, el término "etiqueta de afinidad" significa un ligando o grupo, ya sea enlazado a un compuesto de la presente invención o a un dominio de proteína quinasa, que permite que el conjugado sea extraído de una solución.

El término "alquilo" se relaciona con grupos de hidrocarburos saturados sustituidos o no sustituidos, incluyendo grupos alquilo de cadena recta y alquilo de cadena ramificada, incluyendo grupos haloalquilo tales como trifluorometilo y 2,2,2-trifluoroetilo, etc. Grupos alquilo representativos incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, (ciclohexil) metilo, ciclopropilmetilo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, y similares. Los términos "alqueno" y "alquino" se refieren a grupos alifáticos insaturados sustituidos o no sustituidos análogos en longitud y posible sustitución a los alquilos descritos más arriba, pero que contienen al menos un doble o triple enlace respectivamente. Grupos alqueno representativos incluyen vinilo, propen-2-ilo, crotilo, isopenten-2-ilo, 1,3-butadieno-2-ilo, 2,4-pentadieno, y 1,4-pentadien-3-ilo. Grupos alquino representativos incluyen etinilo, 1- y 3-propinilo, y 3-butinilo. En ciertas realizaciones preferidas, los sustituyentes alquilo son grupos alquilo inferiores, por ejemplo, que tienen de 1 a 6 átomos de carbono. De la misma forma, alqueno y alquino se refieren preferiblemente a grupos alqueno y alquino inferiores, por ejemplo, que tienen de 2 a 6 átomos de carbono. Tal como se usa aquí, "alqueno" se relaciona con un grupo alquilo con dos valencias abiertas (en lugar de una valencia única), tales como $-(CH_2)_{1-10}-$ y variantes sustituidas de los mismos.

El término "alcoxi" se relaciona con un grupo alquilo que tiene un oxígeno unido al mismo. Grupos alcoxi representativos incluyen metoxi, etoxi, propoxi, tert-butoxi y similares. Un "éter" son dos hidrocarburos enlazados covalentemente por un oxígeno. De acuerdo con lo anterior, el sustituyente de un alquilo que hace de ese alquilo un éter es o se asemeja a un alcoxi.

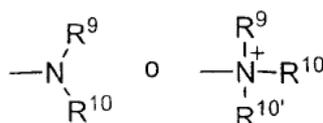
El término "alcoxilquilo" se relaciona con un grupo alquilo sustituido con un grupo alcoxi, formando de este modo un éter.

Los términos "amida" y "amido" se reconocidos en la técnica como un carbonilo sustituido con amino e incluye una unidad estructural que puede ser representado por la fórmula general:



en donde R^9 , R^{10} son como se definen más arriba. Las realizaciones preferidas de la amida no incluirán imidas, que pueden ser inestables.

Los términos "amina" y "amino" se reconocidos en la técnica y se refieren tanto a aminas sustituidos y no sustituidos y sus sales, por ejemplo, una unidad estructural que puede ser representado por las fórmulas generales:



en donde R^9 , R^{10} y $R^{10'}$ representan cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un alqueno, $-(CH_2)_m-R^8$ o R^9 y R^{10} tomados junto con el átomo de N al que están unidos completan un heterociclo que tiene de 4 a 8 átomos en la estructura del anillo; R^8 representa un arilo, un cicloalquilo, un cicloalqueno, un heterociclilo o un policiclilo; y m es cero o un entero de 1 a 8. En realizaciones preferidas, solamente uno de R^9 o R^{10} puede ser un carbonilo, por ejemplo, R^9 , R^{10} , y el nitrógeno juntos no forman una imida. En realizaciones incluso más preferidas, R^9 y R^{10} (y

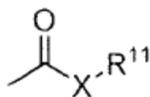
opcionalmente R¹⁰) representan cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un alqueno, o -(CH₂)_m-R⁸. En ciertas realizaciones, el grupo amino es básico, lo que significa que la forma protonada tiene un pKa ≥ 7.00.

El término "aralquilo", como se usa aquí, se relaciona con un grupo alquilo sustituido con un grupo arilo.

5 El término "arilo" como se usa aquí incluye grupos aromáticos de un solo anillo de 5, 6-, y 7 miembros sustituidos o no sustituidos en los que cada átomo del anillo es carbono. El término "arilo" también incluye sistemas de anillo policíclicos que tienen dos o más anillos cíclicos en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes en donde al menos uno de los anillos es aromático, por ejemplo, los otros anillos cíclicos pueden ser cicloalquilos, cicloalquenos, cicloalquinos, arilos, heteroarilos, y/o heterociclicos. Grupos arilo incluyen benceno, naftaleno, fenantreno, fenol, anilina, antraceno, y fenantreno.

10 Los términos "carbociclo" y "carbociclilo", como se usa aquí, se refieren a un anillo no aromático sustituido o no sustituido en donde cada átomo del anillo es carbono. Los términos "carbociclo" y "carbociclilo" incluyen también sistemas de anillos policíclicos que tienen dos o más anillos cíclicos en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes en donde al menos uno de los anillos es carbocíclico, por ejemplo, los otros anillos cíclicos pueden ser cicloalquilos, cicloalquenos, cicloalquinos, arilos, heteroarilos, y/o heterociclicos. Grupos carbocíclicos representativos incluyen ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, y 3-ciclohexen-1-ilo, cicloheptilo.

15 El término "carbonilo" es reconocido en la técnica e incluye tales unidades estructurales como pueden ser representados por la fórmula general:



20 en donde X es un enlace o representa un oxígeno o un azufre, y R¹¹ representa un hidrógeno, un alquilo, un alqueno, -(CH₂)_m-R⁸ o una sal farmacéuticamente aceptable. Cuando X es un oxígeno y R¹¹ no es hidrógeno, la fórmula representa un "éster". Cuando X es un oxígeno, y R¹¹ es un hidrógeno, la fórmula representa un "ácido carboxílico".

25 Los términos "heteroarilo" incluyen estructuras de anillo aromáticos, sustituidos o no sustituidos de 5 a 7 miembros, más preferiblemente anillos de 5 a 6 miembros, cuyas estructuras de anillo incluyen de uno a cuatro heteroátomos. El término "heteroarilo" también incluye sistemas de anillo policíclicos que tienen dos o más anillos cíclicos en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes en donde al menos uno de los anillos es heteroaromático, por ejemplo, los otros anillos cíclicos pueden ser cicloalquilos, cicloalquenos, cicloalquinos, arilos, heteroarilos, y/o heterociclicos. Los grupos heteroarilo incluyen, por ejemplo, pirrol, furano, tiofeno, imidazol, isoxazol, oxazol, tiazol, triazol, pirazol, piridina, pirazina, piridazina y pirimidina, y similares.

30 El término "heteroátomo" como se usa aquí significa un átomo de cualquier elemento diferente de carbono o hidrógeno. Los heteroátomos preferidos son nitrógeno, oxígeno y azufre.

35 Los términos "heterociclilo" o "grupo heterocíclico" se refieren a estructuras de anillo de 3 a 10 miembros sustituidos o sustituidos no aromáticos, más preferiblemente anillos de 3 a 7 miembros, cuyas estructuras de anillo incluyen de uno a cuatro heteroátomos. Los términos "heterociclilo" o "grupo heterocíclico" incluyen también sistemas de anillos policíclicos que tienen dos o más anillos cíclicos en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes en donde al menos uno de los anillos es heterocíclico, por ejemplo, los otros anillos cíclicos pueden ser cicloalquilos, cicloalquenos, cicloalquinos, arilos, heteroarilos, y/o heterociclicos. Los grupos heterociclilo incluyen, por ejemplo, tetrahidrofurano, tetrahidropirano, piperidina, piperazina, pirrolidina, morfolina, lactonas, y lactamas.

40 El término "hidrocarburo", como se usa aquí, se relaciona con un grupo que está unido a través de un átomo de carbono que no tiene un sustituyente =O o =S, y típicamente tiene al menos un enlace carbono-hidrógeno y un esqueleto principalmente de carbono, pero puede incluir opcionalmente heteroátomos. Así, grupos como metilo, etoxietilo, 2-piridilo, y trifluorometilo se consideran que son hidrocarbilo para los propósitos de esta solicitud, pero sustituyentes tales como acetilo (que tiene un sustituyente = O en el carbono de enlace) y etoxi (que está enlazado a través de oxígeno, no carbono) no lo son. Los grupos hidrocarbilo incluyen, pero no se limitan a arilo, heteroarilo, carbociclo, heterociclo, alquilo, alqueno, alquino, y combinaciones de los mismos.

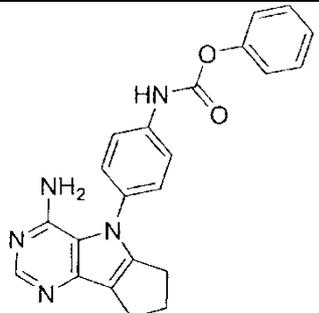
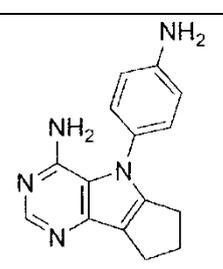
45 Los términos "policiclilo" o "policíclicos" se refieren a dos o más anillos (por ejemplo, cicloalquilos, cicloalquenos, cicloalquinos, arilos, heteroarilos, y/o heterociclicos) en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes, por ejemplo, los anillos son "anillos fusionados". Cada uno de los anillos del policiclo puede ser sustituido o no sustituido.

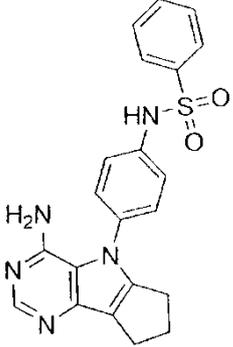
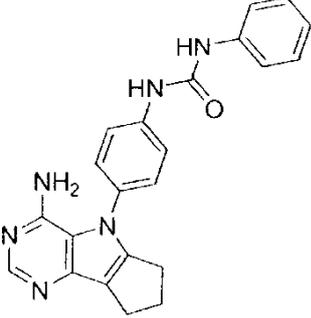
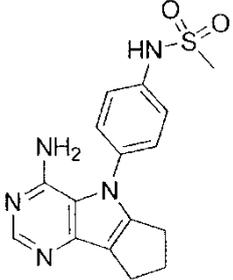
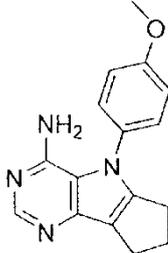
5 Tal como se utiliza aquí, el término "sonda" se relaciona con un compuesto de la invención que está marcado, ya sea con un marcador detectable o una etiqueta de afinidad, y que es capaz de enlazarse, ya sea covalentemente o no covalentemente, a un dominio de proteína quinasa. Cuando, por ejemplo, la sonda está unida de forma no covalente, puede ser desplazada por un compuesto de prueba. Cuando, por ejemplo, la sonda se une covalentemente, puede ser utilizada para formar aductos entrecruzados, que pueden ser cuantificados e inhibidos por un compuesto de prueba.

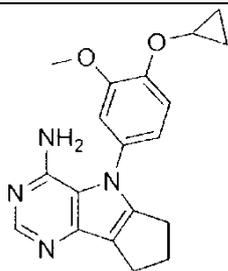
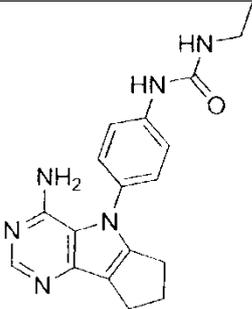
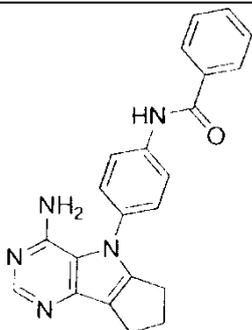
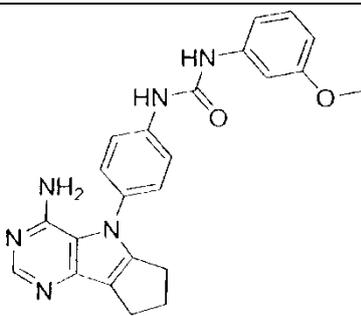
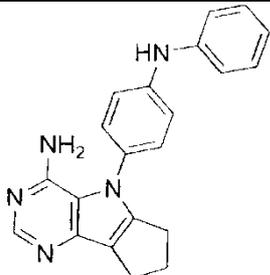
10 El término "sustituido" se relaciona con unidades estructurales que tienen sustituyentes que reemplazan un hidrógeno en uno o más carbonos del esqueleto. Se entenderá que "sustitución" o "sustituido con" incluye la condición implícita de que tal sustitución está de acuerdo con la valencia permitida del átomo sustituido y el sustituyente, y que los resultados de sustitución en un compuesto estable, por ejemplo, que no sufre transformación espontáneamente tal como por reordenamiento, ciclización, eliminación, etc. Como se usa aquí, el término "sustituido" se contempla para incluir todos los sustituyentes permisibles de compuestos orgánicos. En un amplio aspecto, los sustituyentes permisibles incluyen sustituyentes acíclicos y cíclicos, ramificados y no ramificados, carbocíclicos y heterocíclicos, aromáticos, no aromáticos de compuestos orgánicos. Los sustituyentes permisibles pueden ser uno o más y el mismo o diferentes para compuestos orgánicos apropiados. Para los propósitos de esta invención, los heteroátomos tales como nitrógeno pueden tener sustituyentes de hidrógeno y/o cualesquiera sustituyentes permisibles de compuestos orgánicos descritos aquí que satisfacen las valencias de los heteroátomos. Los sustituyentes pueden incluir, por ejemplo, un halógeno, un hidroxilo, un carbonilo (tal como un carboxilo, un alcóxycarbonilo, un formilo, o un acilo) un tiocarbonilo (tal como un tioéster, un tioacetato, o un tioformiato), un alcoxilo, fosforilo, un fosfato, un fosfonato, un fosfinato, un amino, un amido, una amidina, una imina, un ciano, un nitro, un azido, un sulfhidrilo, un alquilitio, un sulfato, un sulfonato, un sulfamilo, un sulfonamido, un sulfonilo, un heterociclilo, un aralquilo, o una unidad estructural aromática o heteroaromática. Se entenderá por los expertos en la técnica que las unidades estructurales sustituidas en la cadena de hidrocarburo pueden ser sustituidas, si es apropiado.

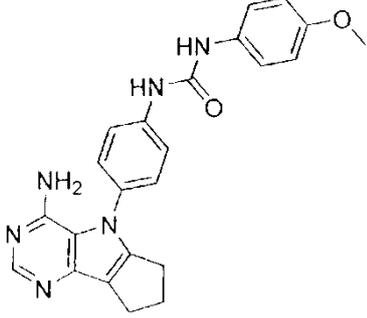
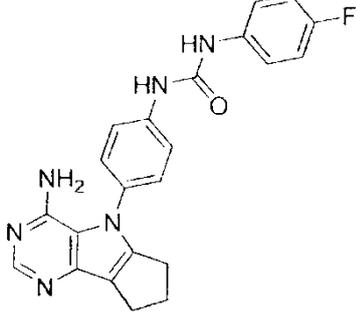
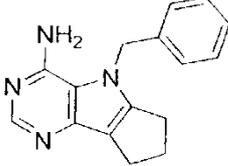
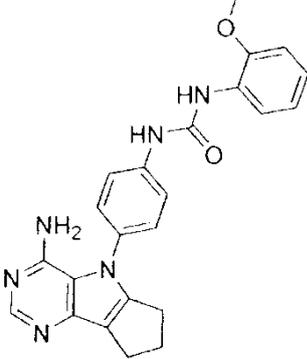
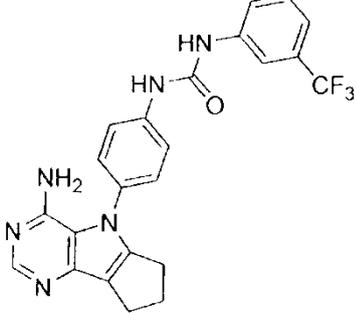
25 Los compuestos de la invención también incluyen todos los isótopos de átomos presentes en los intermediarios y/o compuestos finales. Los isótopos incluyen aquellos átomos que tienen el mismo número atómico pero diferente número de masa. Por ejemplo, los isótopos de hidrógeno incluyen deuterio y tritio.

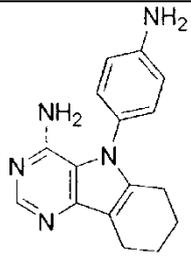
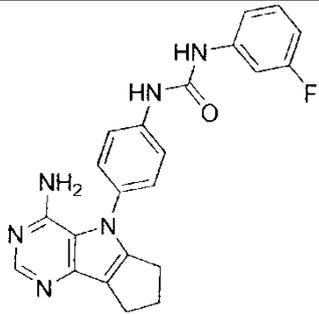
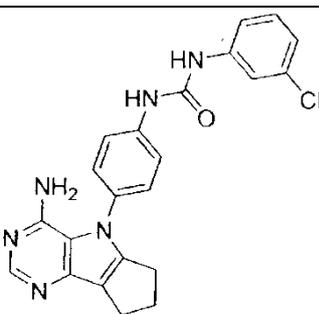
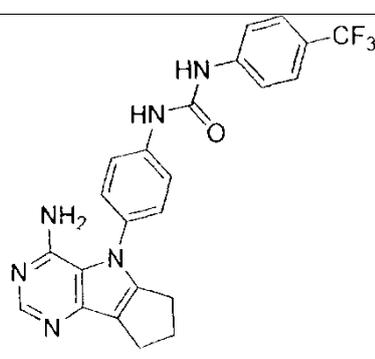
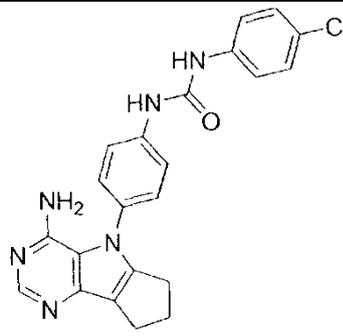
La Tabla 1 resume algunas realizaciones ilustrativas del compuesto de la Fórmula 1. Tabla 1:

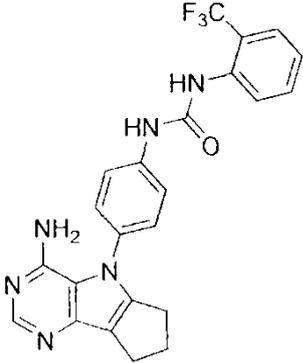
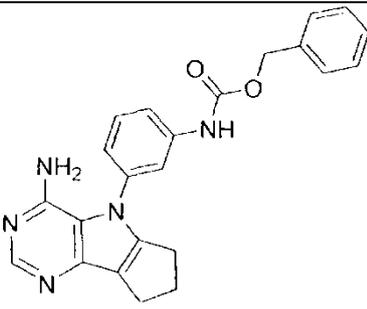
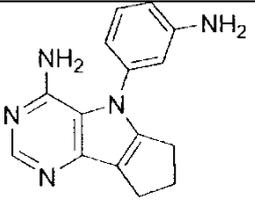
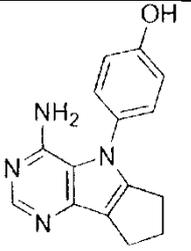
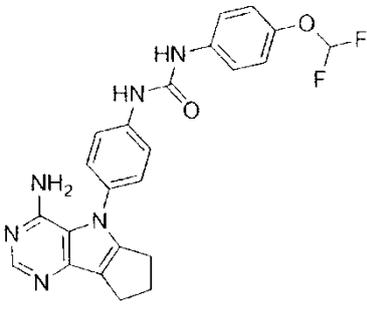
Compuesto	Estructura	MS (m/z)
1		[M+H] ⁺ =400.2
2		[M+H] ⁺ =266.2

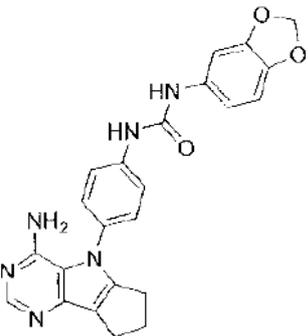
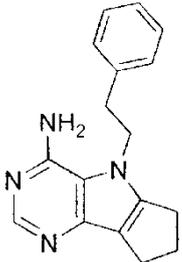
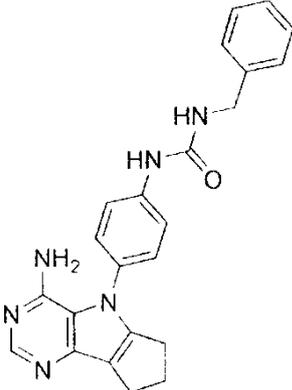
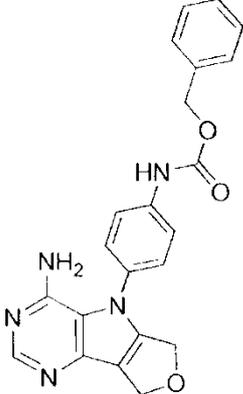
3		[M+H] ⁺ =406.1
4		[M+H] ⁺ =358.2
5		[M+H] ⁺ =295.1
6		[M+H] ⁺ =344.1
7		[M+H] ⁺ =281.1

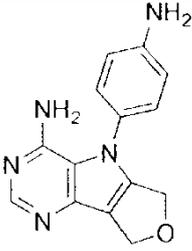
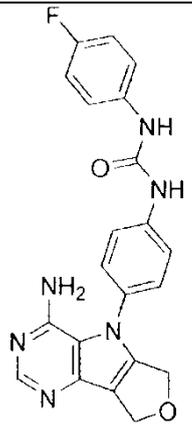
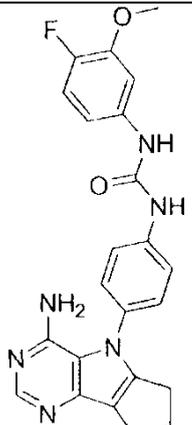
8		[M+H] ⁺ =339.2
9		[M+H] ⁺ =337.2
10		[M+H] ⁺ =370.2
11		[M+H] ⁺ =415.2
12		[M+H] ⁺ =342.2

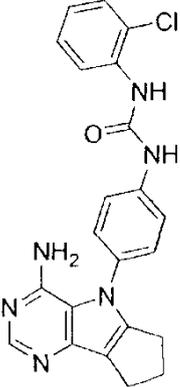
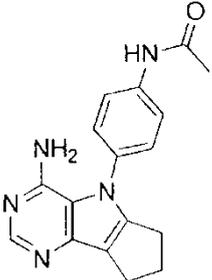
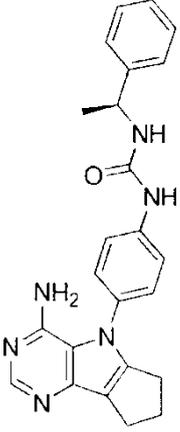
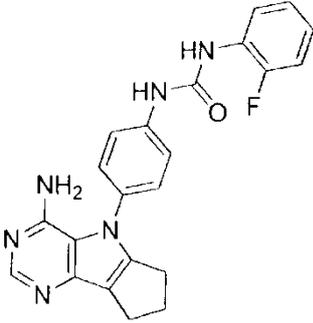
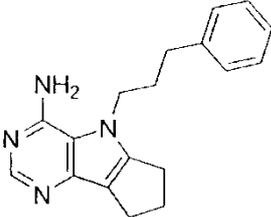
13		[M+H] ⁺ =415.2
14		[M+H] ⁺ =403.2
15		[M+H] ⁺ =265.1
16		[M+H] ⁺ =415.1
17		[M+H] ⁺ =453.1

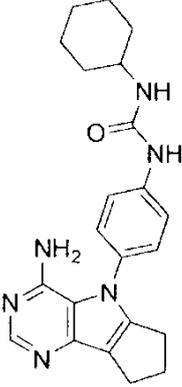
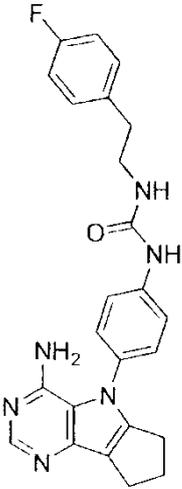
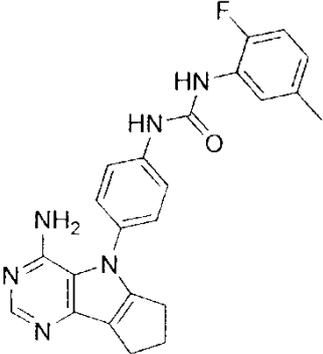
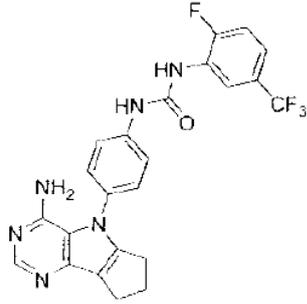
18		$[M+H]^+=280.2$
19		$[M+H]^+=403.1$
20		$[M+H]^+=419.3$
21		$[M+H]^+=453.1$
22		$[M+H]^+=419.5$

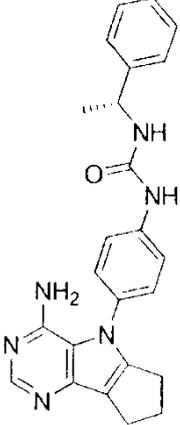
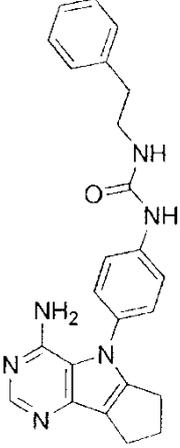
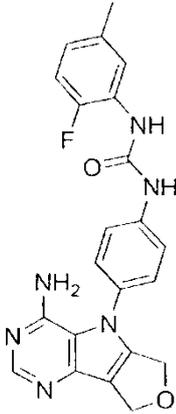
23		[M+H] ⁺ =453.1
24		[M+H] ⁺ =400.2
25		[M+H] ⁺ =266.1
26		[M+H] ⁺ =267.1
27		[M+H] ⁺ =451.1

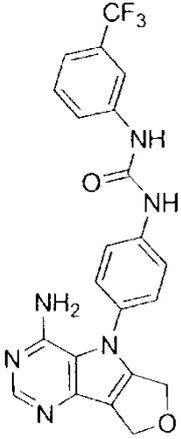
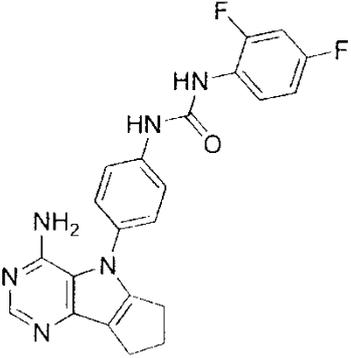
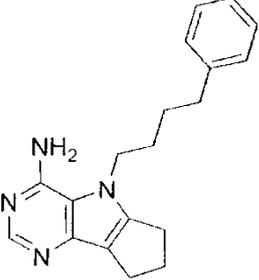
28		[M+H] ⁺ =429.1
29		[M+H] ⁺ =279.2
30		[M+H] ⁺ =399.2
31		[M+H] ⁺ =402.2

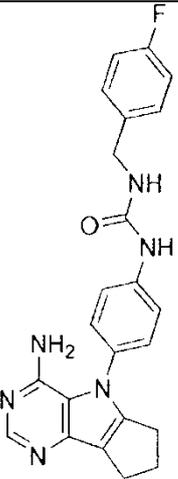
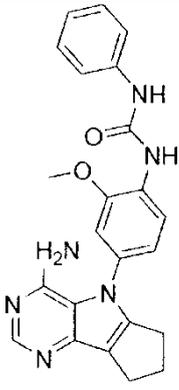
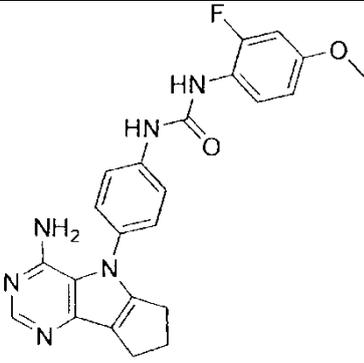
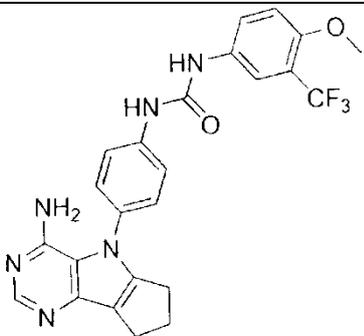
32		[M+H] ⁺ =268.2
33		[M+H] ⁺ =405.2
34		[M+H] ⁺ =311.2
35		[M+H] ⁺ =433.2

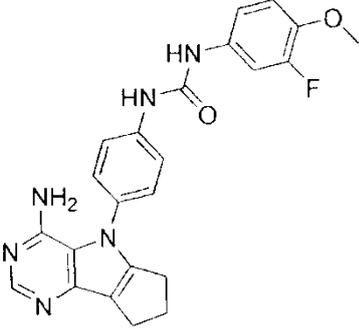
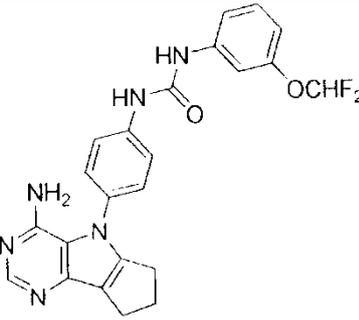
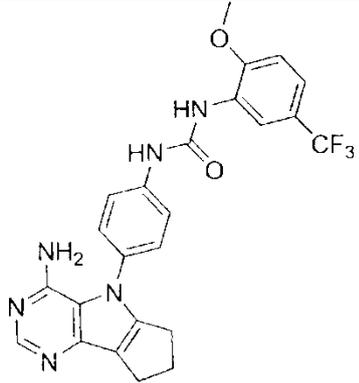
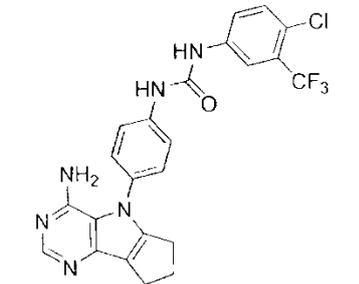
36		[M+H] ⁺ =419.4
37		[M+H] ⁺ =308.3
38		[M+H] ⁺ =413.2
39		[M+H] ⁺ =403.2
40		[M+H] ⁺ =293.2

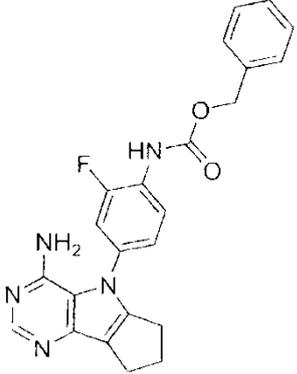
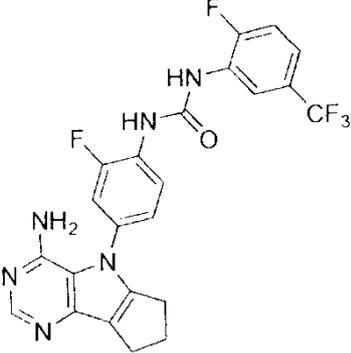
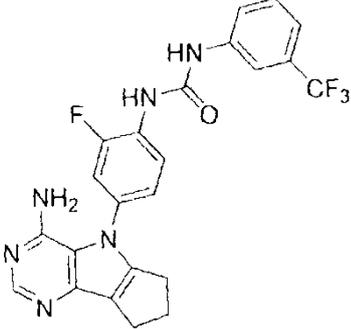
41		[M+H] ⁺ =391.3
42		[M+H] ⁺ =431.2
43		[M+H] ⁺ =417.2
44		[M+H] ⁺ =471.1

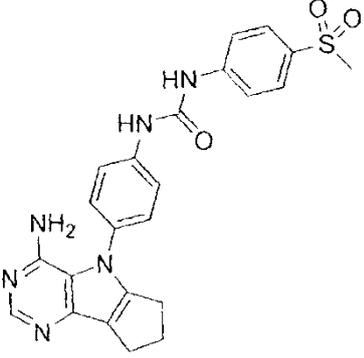
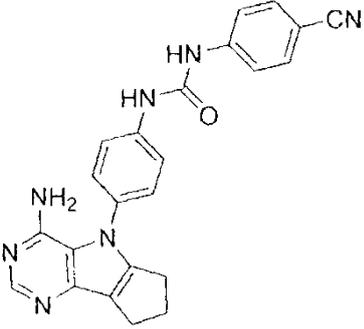
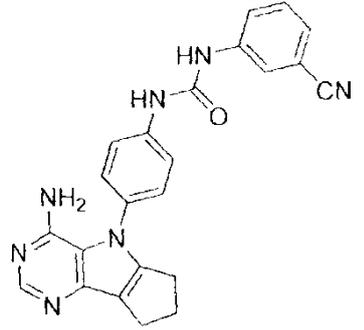
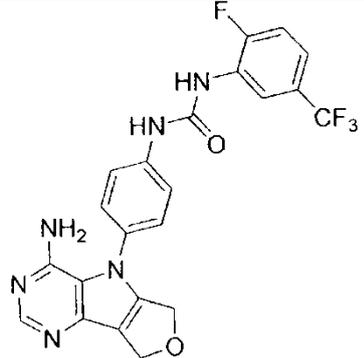
<p>45</p>		<p>[M+H]⁺=413.2</p>
<p>46</p>		<p>[M+H]⁺=413,2</p>
<p>47</p>		<p>[M+H]⁺=419.2</p>

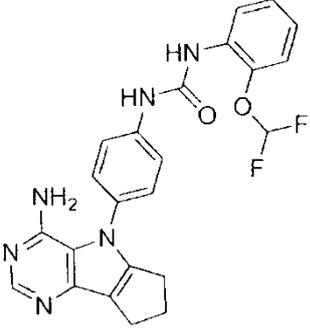
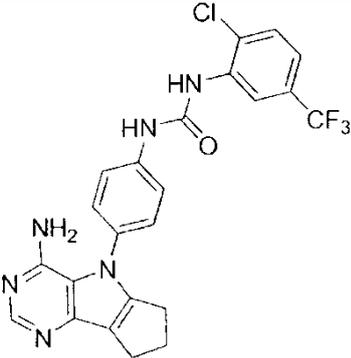
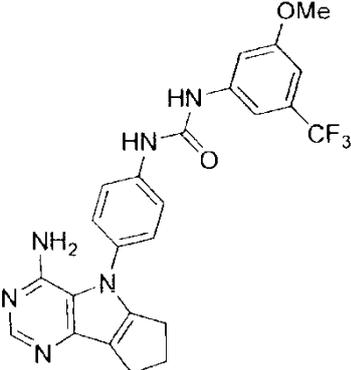
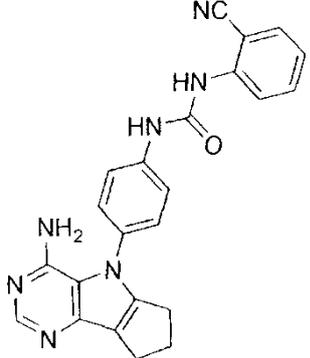
48		[M+H] ⁺ =455.1
49		[M+H] ⁺ =251,1
50		[M+H] ⁺ =421.2
51		[M+H] ⁺ =307.2

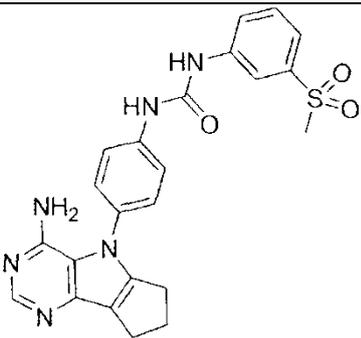
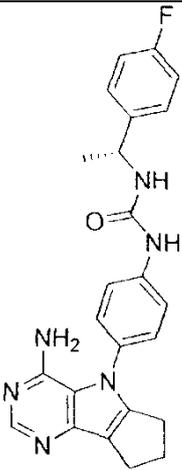
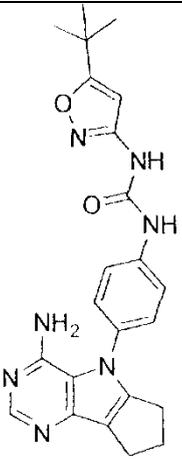
52		[M+H] ⁺ =417.2
53		[M+H] ⁺ =373.2
54		[M+H] ⁺ =433.2
55		[M+H] ⁺ =483.1

56		[M+H] ⁺ =433.3
57		[M+H] ⁺ =451.1
58		[M+H] ⁺ =483.1
59		[M+H] ⁺ =487.3

60		[M+H] ⁺ =418.1
61		
62		[M+H] ⁺ =489.1
63		[M+H] ⁺ =471.1

64		[M+H] ⁺ =463.2
65		[M+H] ⁺ =410.2
66		[M+H] ⁺ =410.2
67		[M+H] ⁺ =473.0

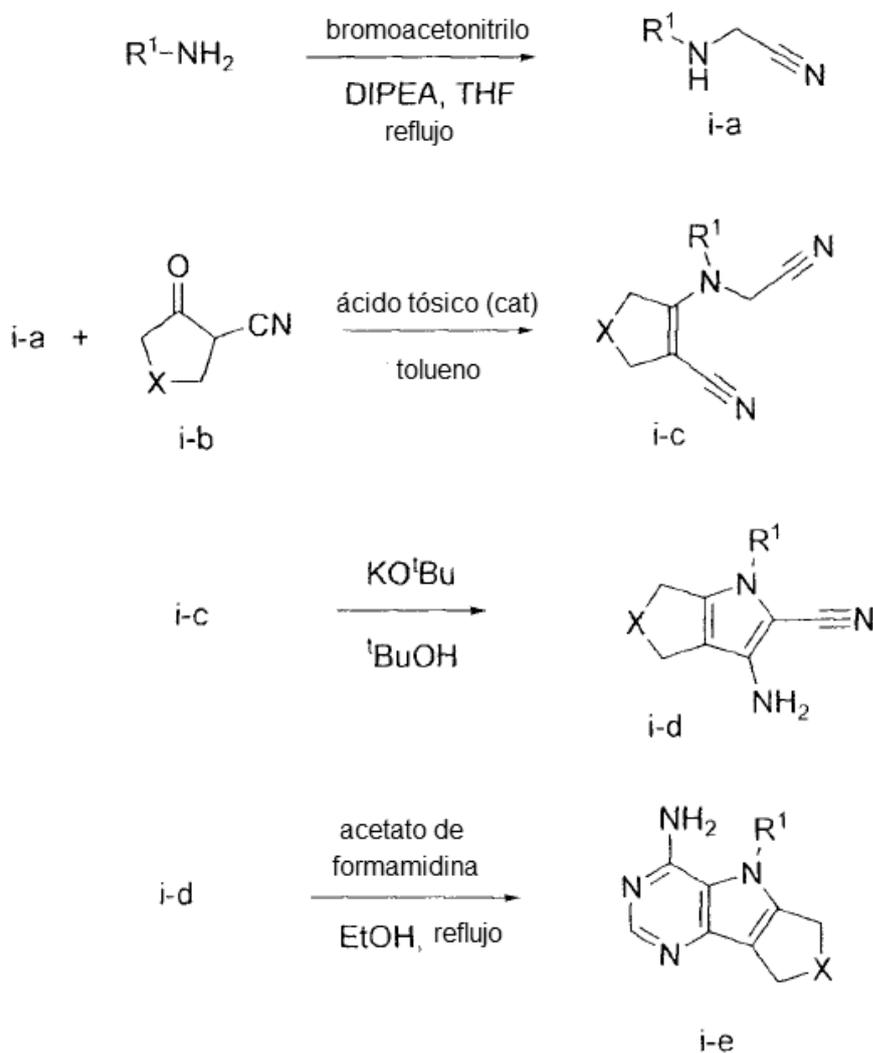
68		[M+H] ⁺ =451.2
69		[M+H] ⁺ =487,3
70		[M+H] ⁺ =483.2
71		[M+H] ⁺ =410.2

72		[M+H] ⁺ =463.2
73		[M+H] ⁺ =431.2
74		[M+H] ⁺ =432.2

Métodos sintéticos generales

Método Sintético General A:

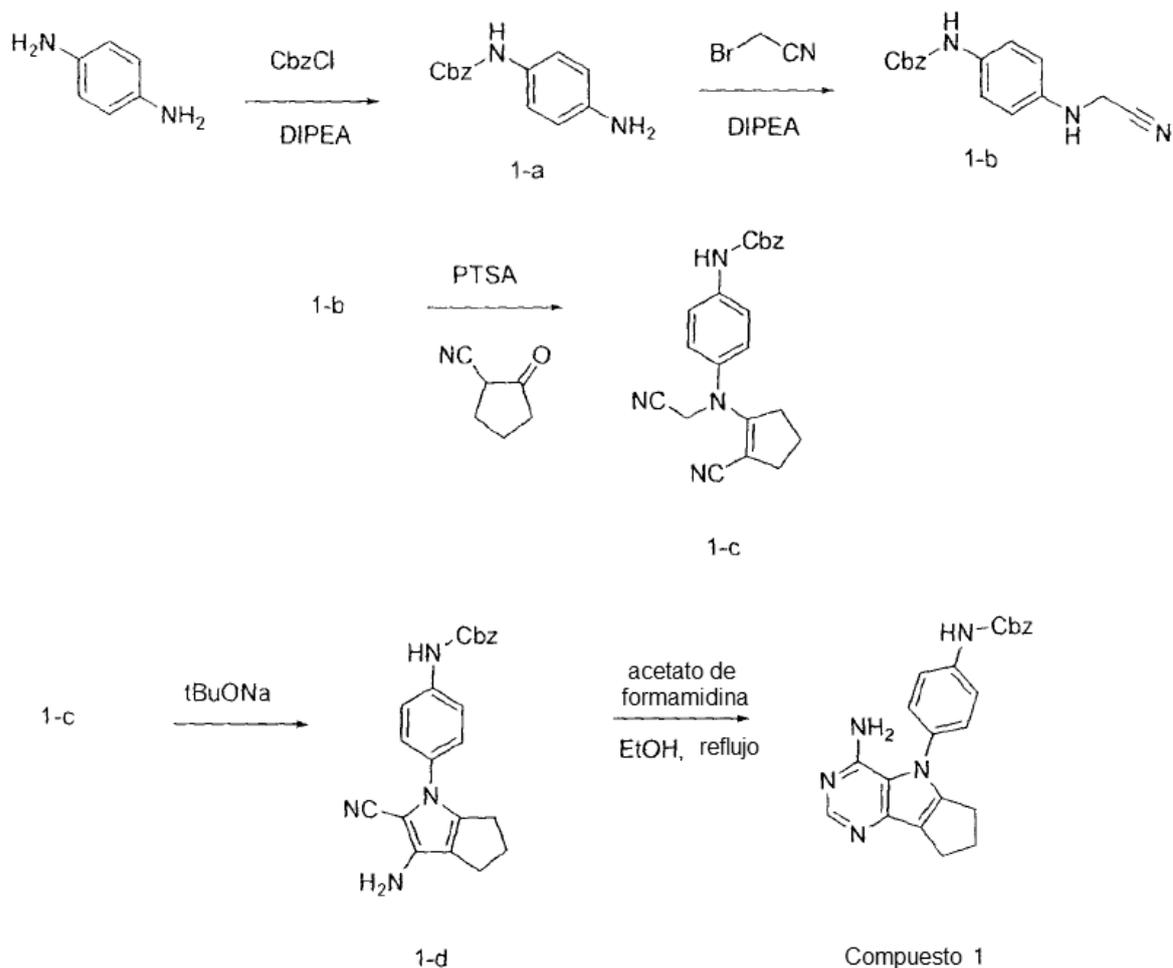
- 5 Los compuestos de fórmula general i-e se pueden preparar en un proceso de cuatro etapas que se resume en el Esquema I. La alquilación de R¹NH₂ con bromoacetnitrilo provee el intermediario i-a. La condensación de i-a con i-b en presencia de un ácido tal como ácido p-toluenosulfónico, provee el intermediario i-c. El tratamiento del intermediario i-c con una base tal como tBuOK en t-BuOH provee el intermediario i-d. El tratamiento del intermediario i-d con acetato de formamidina en etanol provee compuestos de la fórmula general i-e

**Esquema i**

Ejemplificación

Los siguientes métodos sintéticos están destinados a ser representativos de la química utilizada para preparar compuestos de Fórmula 1 y no pretenden ser limitantes.

5 Síntesis del compuesto 1



Esquema 1

Etapa 1: intermediario 1-a

5 A una solución de benceno-1,4-diamina (10.0 g, 92 mmol) en diclorometano (1000 mL), enfriada hasta 0°C, se agregaron cloroformiato de bencilo (13.20 ml, 92.0 mmol) y DIPEA (16.15 ml, 92.0 mmol). La mezcla de reacción se calentó lentamente hasta temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La reacción se concentró hasta la mitad del volumen. Se agregó agua y acetato de etilo, la capa orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida. Se agregó (30 mL) dietil éter al residuo; se formó un precipitado y se eliminó por filtración. El filtrado se concentró in vacuo para proveer el intermediario 1-a como un sólido de color beis.

10 Etapa 2: intermediario 1-b

15 A una solución del intermediario 1-a (14.3 g, 59.0 mmol) y 2-bromoacetonitrilo (7.79 g, 64.9 mmol) en THF (150 ml) se agregó DIPEA a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante la noche y luego se enfrió hasta temperatura ambiente. Se agregaron cloruro de amonio acuoso saturado y acetato de etilo la capa orgánica se separó, se lavó con cloruro de amonio acuoso saturado y salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida. Se agregó dietil éter al residuo, se formó un precipitado, y el intermediario 1-b se recolectó por filtración como un sólido de color beis.

Etapa 3: intermediario 1-c

20 A una solución del intermediario 1-b (2.00 g, 7.11 mmol) en tolueno (50 mL) se agregaron 2-oxociclopentanocarbonitrilo (815 mg, 7.47 mmol) e hidrato de ácido 4-metilbencenosulfónico (0.135 g, 0.711 mmol). La reacción se sometió a reflujo durante 3 horas utilizando un dean-stark y luego se enfrió hasta temperatura

ambiente. Se agregaron NaHCO_3 saturado acuoso y acetato de etilo, la capa orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró bajo presión reducida. Se agregó hexano al residuo, se formó un precipitado, el intermediario 1-c se recolectó por filtración como un sólido de color beis.

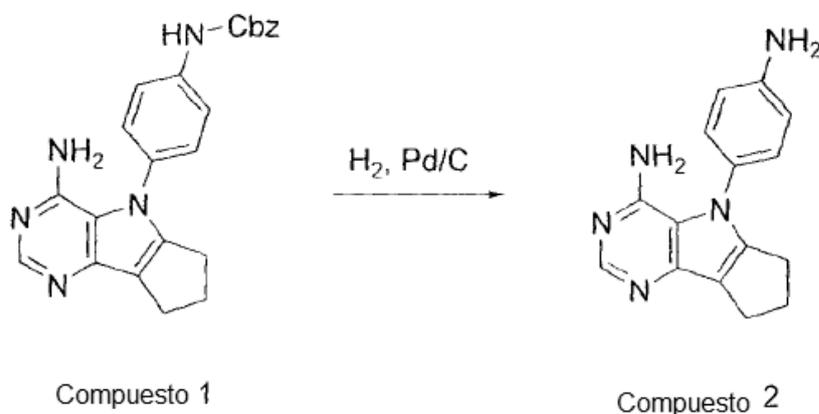
Etapa 4: intermediario 1-d

- 5 A una solución del intermediario 1-c (2.10 g, 5.64 mmol) en tert-butanol (25 mL) se agregó tert-butoxido de sodio (542 mg, 5.64 mmol) y la reacción se agitó a 80°C durante 2 horas y luego se enfrió hasta temperatura ambiente. Se agregaron cloruro de amonio acuoso saturado y acetato de etilo, la capa orgánica se separó, la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo, los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. Se agregó dietil éter al residuo, se formó un precipitado, el intermediario 1-d se recolectó por filtración como un sólido de color beis.

Etapa 5: Compuesto 1

- 15 A una solución del intermediario 1-d (2.39 g, 6.42 mmol) en etanol (50 ml) se agregó acetato de formamidina (5.34 g, 51.3 mmol) y la reacción se agitó a 80°C durante 1.5 horas. La reacción se concentró bajo presión reducida. Se agregaron una solución acuosa saturada de NaHCO_3 y acetato de etilo, la capa orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se concentró bajo presión reducida para proveer el compuesto 1 como un sólido de color beis. MS (m/z) M+H=400.2

Síntesis del compuesto 2

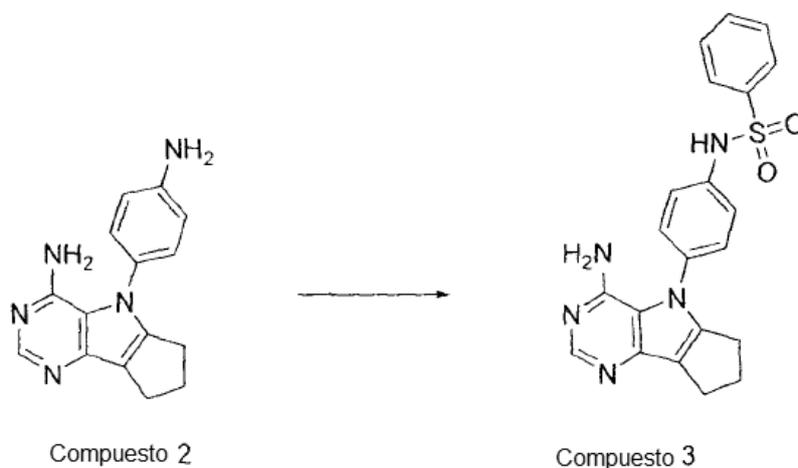


Esquema 2

- 20 Una solución de metanol del compuesto 1 (114 mg, 0.24 mmol) se trató con 10% de Pd/C (53 mg, 0.02 mmol) y se purgó con H_2 . La solución se agitó bajo H_2 (1 atm.) durante 18 horas antes de ser filtrada a través de celita. El filtrado se concentró in vacuo y se purificó por cromatografía en sílica gel proveyendo el compuesto 2 como un sólido de color beis. MS (m/z) M+H= 266.2

Síntesis del compuesto 3

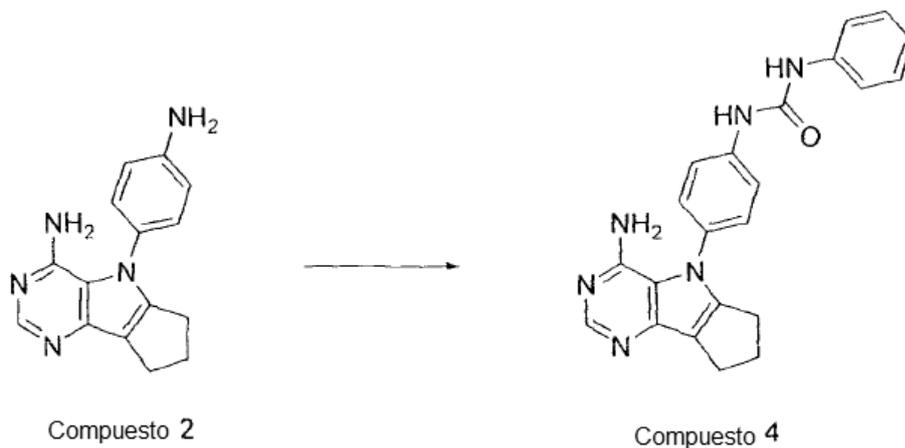
25



Esquema 3

5 A una solución del compuesto 2 (50 mg, 0.16 mmol) en piridina (1 mL), enfriada hasta 0 °C, se agregaron DMAP (2.0 mg, 0.017 mmol) y cloruro de fenilsulfonilo (64.3 mg, 0.364 mmol) en diclorometano. La reacción se agitó a 80 °C durante 3 horas y luego se enfrió hasta temperatura ambiente. Se agregaron una solución acuosa saturada de cloruro de amonio y acetato de etilo, la capa orgánica se separó, se lavó con una solución acuosa saturada de NaHCO₃ y salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró in vacuo. La purificación por cromatografía en sílica gel proveyó el compuesto 3 como un sólido de color beis. MS (m/z) M+H= 406.1

Síntesis del compuesto 4

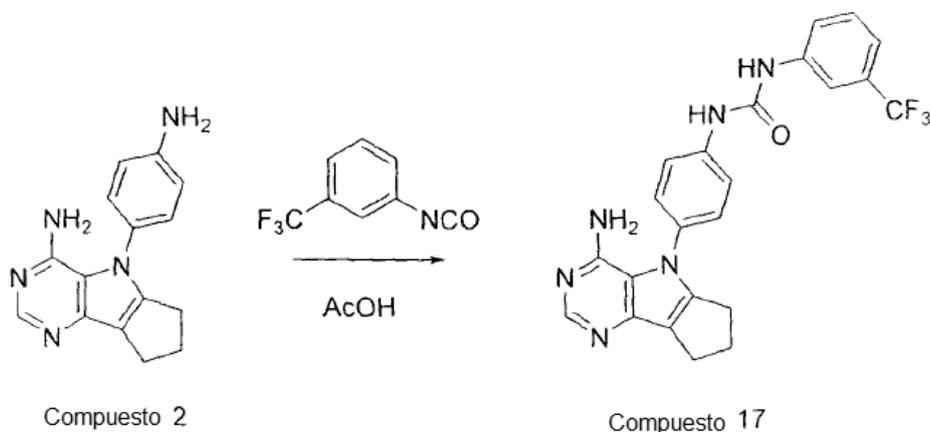


Esquema 4

10

15 A una solución del compuesto 2 (83 mg, 0.275 mmol) en piridina (1 mL), enfriada hasta 0 °C, se agregó una solución de fenilisocianato (36 mg, 0.30) en diclorometano. La reacción se agitó entonces a temperatura ambiente durante 18 horas. Se agregaron una solución acuosa saturada de cloruro de amonio y acetato de etilo, la capa orgánica se separó, se lavó con una solución acuosa saturada de NaHCO₃ y salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró in vacuo. La purificación por cromatografía en fase reversa eluyendo con 10-70% de metanol en gradiente de de HCl al 1% proveyó el compuesto 4 · HCl como un sólido blanco. MS (m/z) M+H= 358.2

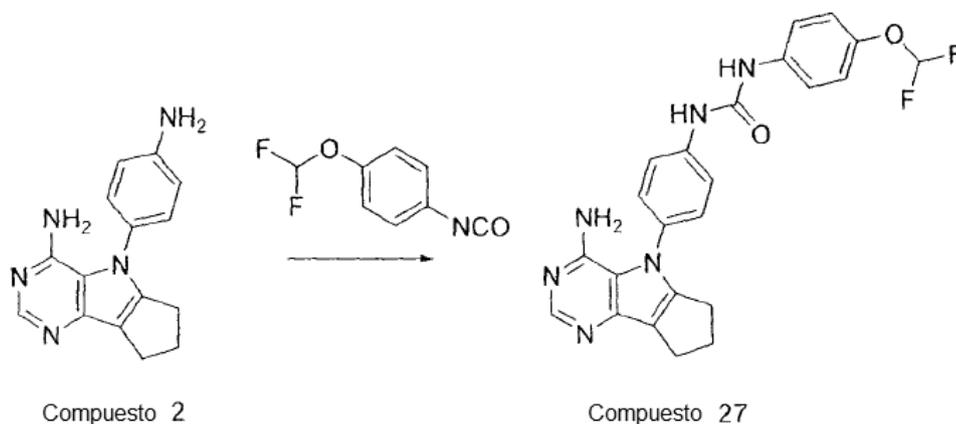
Síntesis del compuesto 17



Esquema 5

5 A una solución del compuesto 2 (150 mg, 0.56 mmol) en ácido acético (5 mL) se agregó isocianato de (trifluorometil)fenilo (83 μ L, 0.59 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se agregó acetato de etilo; se formó un precipitado y se recolectó por filtración, se secó bajo vacío para proveer el compuesto 17 como un sólido de color blanco. MS (m/z) M+H= 453.1

Síntesis del compuesto 27

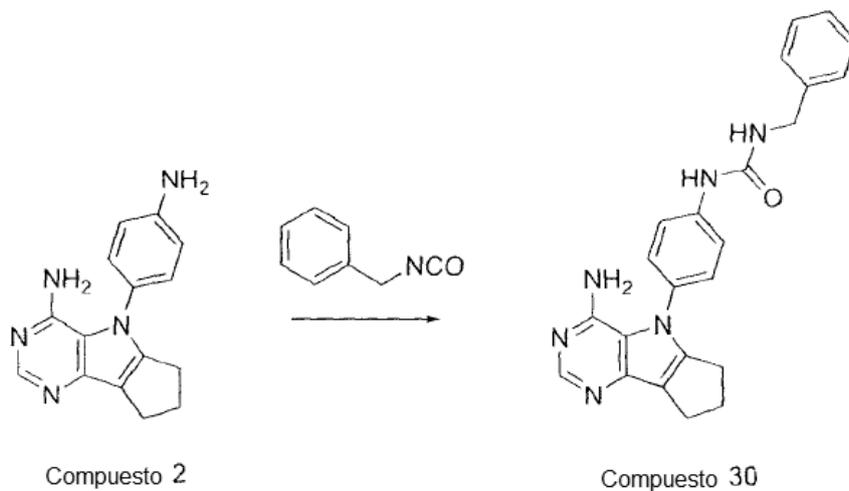


Esquema 6

10 A una solución del compuesto 2 (150 mg, 0.56 mmol) en THF (1 mL) y DCM (3 mL) se agregó isocianato de 4-(difluorometoxi) fenilo (87 μ L, 0.62 mmol) y la reacción se agitó entonces a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los volátiles se eliminaron bajo presión reducida. La purificación por cromatografía en fase reversa eluyendo con 10-70% de metanol en gradiente de HCl 1% proveyó el compuesto 27·HCl como un sólido de color blanco. MS (m/z) M+H= 451.1

15

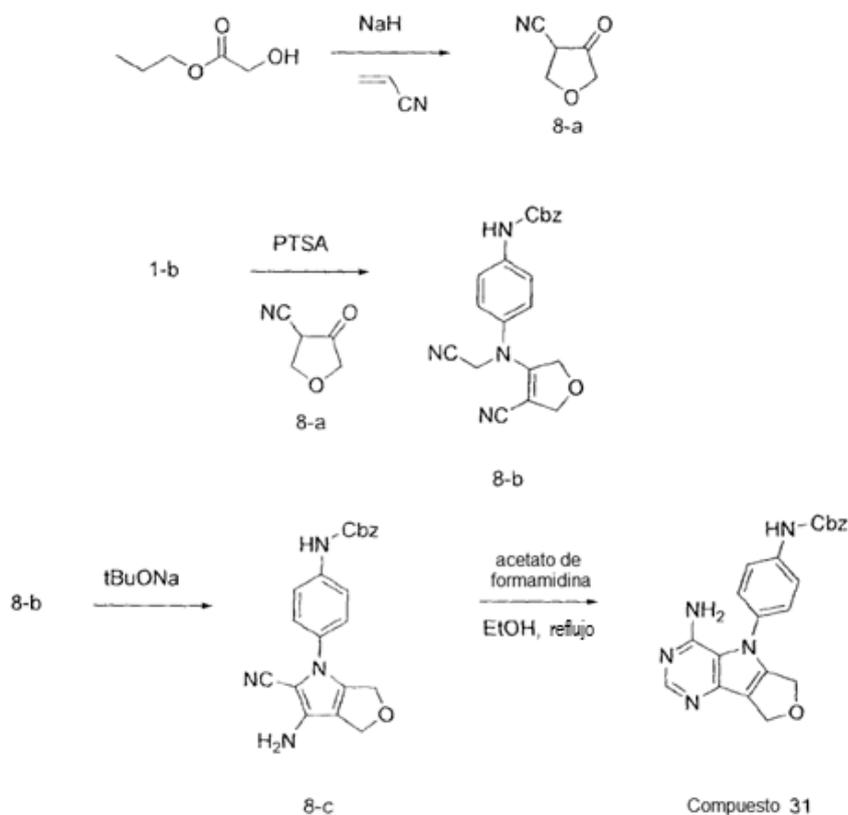
Síntesis del compuesto 30



Esquema 7

5 A una solución del compuesto 2 (100 mg, 0.37 mmol) en THF (1 mL) y DCM (3 mL) se agregó isocianato de bencilo (51 μ L, 0.41 mmol) y la reacción se agitó entonces a temperatura ambiente durante 18 horas. Los volátiles se eliminaron bajo presión reducida. La purificación por cromatografía en fase reversa eluyendo con metanol al 10-70% en gradiente de HCl 1% proveyó el compuesto 30·HCl como un sólido de color blanco. MS (m/z) M+H= 399.2

Síntesis del compuesto 31



Esquema 8

Etapa 1: intermediario 8-a

Una solución de 2-hidroxiacetato de butilo (47.2 g, 357 mmol) en THF (50 mL) se agregó gota a gota a una suspensión de hidruro de sodio (14.28 g, 357 mmol) en THF (250 mL). La mezcla se trata a reflujo con una solución de crotonitrilo (23.96 g, 357 mmol) en THF (50 mL) y la mezcla se mantuvo a reflujo durante 2 horas y luego se enfrió hasta temperatura ambiente. EL solvente se evaporó; se agregaron NaOH 2N (200 mL) y dietil éter (200 mL) al residuo. La capa orgánica se separó; la fase acuosa se extrajo dos veces con dietil éter y luego se acidificó a pH 1 con HCl concentrado (75 mL). La fase acuosa se extrajo entonces 3 veces con diclorometano; los extractos orgánicos combinados se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron bajo vacío para proveer el intermediario 8-a como aceite de color marrón.

Etapa 2: intermediario 8-b

A una solución del intermediario 1-b (3.38 g, 12.0 mmol) en tolueno (60 mL) se agregaron el intermediario 8-a (2.0 g, 18.0 mmol) e hidrato de ácido 4-metilbencenosulfónico (228 mg, 1.20 mmol). La reacción se sometió a reflujo durante 3 horas utilizando un dean-stark y luego se enfrió hasta temperatura ambiente. NaHCO₃ saturado acuoso y acetato de etilo se agregaron, la capa orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida. La purificación por cromatografía en sílica gel proveyó el intermediario 8-b como un sólido de color beis.

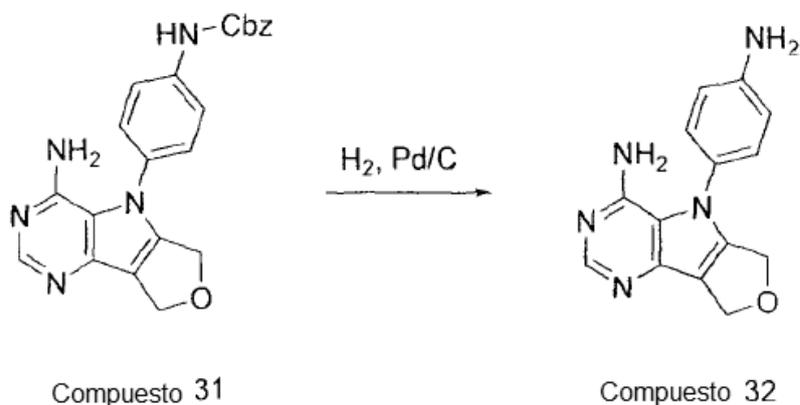
Etapa 3: intermediario 8-c

A una solución del intermediario 8-b (2.0 g, 5.34 mmol) en tert-butanol (25 mL) se agregó tert-butóxido de potasio (659 mg, 5.88 mmol) y la reacción se agitó a 80 °C durante 30 minutos y luego se enfrió hasta temperatura ambiente. Se agregaron HCl acuoso al 10% y acetato de etilo, la capa orgánica se separó, la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo, los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida para proveer el intermediario 8-c como sólido color marrón.

Etapa 4: Compuesto 31

- 5 A una solución del intermediario 8-c (1.9 g, 5.07 mmol) en etanol (50 ml) se agregó acetato de formamidina (4.23 g, 40.6 mmol) y la reacción se agitó a 80 °C durante 1.5 horas. La reacción se concentró bajo presión reducida. Se agregaron una solución acuosa saturada de NaHCO₃ y acetato de etilo, la capa orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró bajo presión reducida para proveer el compuesto 31 como un sólido de color beis. MS (m/z) M+H= 402.2

Síntesis del compuesto 32

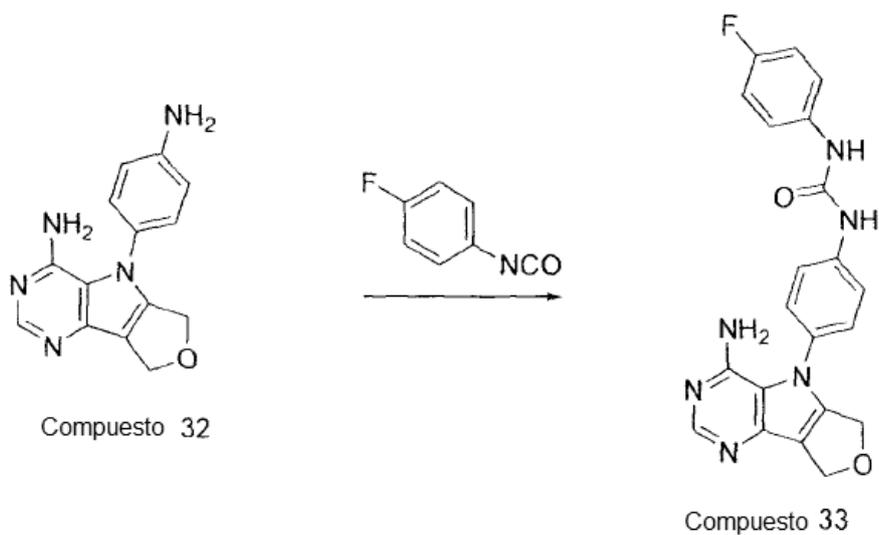


Esquema 9

- 10 Una solución de metanol del compuesto 31 (200 mg, 0.49 mmol) se trató con 10% de Pd/C (106 mg, 0.05 mmol) y se purgó con H₂. La solución se agitó bajo H₂ (1 atm) durante 45 minutos antes de ser filtrada a través de celita. El filtrado se concentró in vacuo y se purificó por cromatografía en sílica gel proveyendo el compuesto 32 como sólido color blancuzco. MS (m/z) M+H= 268.2

Síntesis del compuesto 33

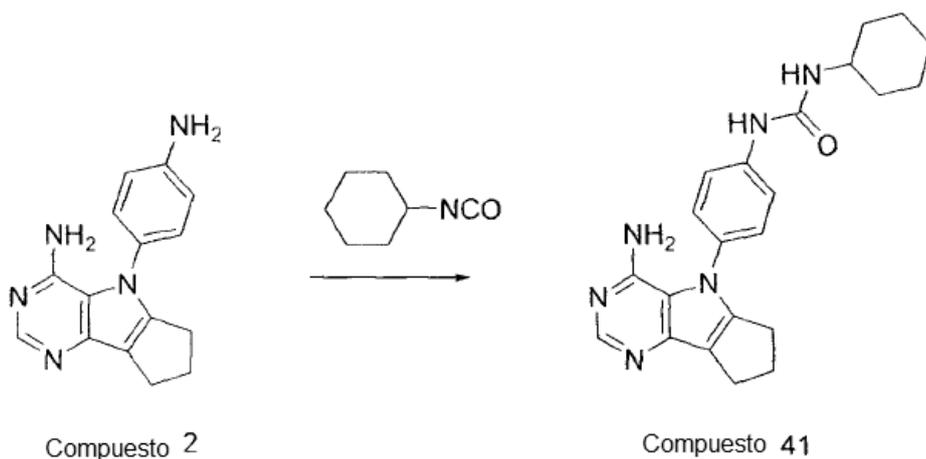
15



Esquema 10

- 5 A una solución del compuesto 32 (123 mg, 0.46 mmol) en diclorometano (3 mL) se agregó isocianato de 4-fluorofenilo (63 mg, 0.46 mmol), ácido acético (0.5 mL) y la reacción se agitó entonces a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los volátiles se eliminaron bajo presión reducida. La purificación por cromatografía en fase reversa eluyendo con metanol al 10-40% en gradiente de HCl 1% proveyó el compuesto 33-HCl como un sólido de color beis. MS (m/z) M+H= 405.2

Síntesis del compuesto 41

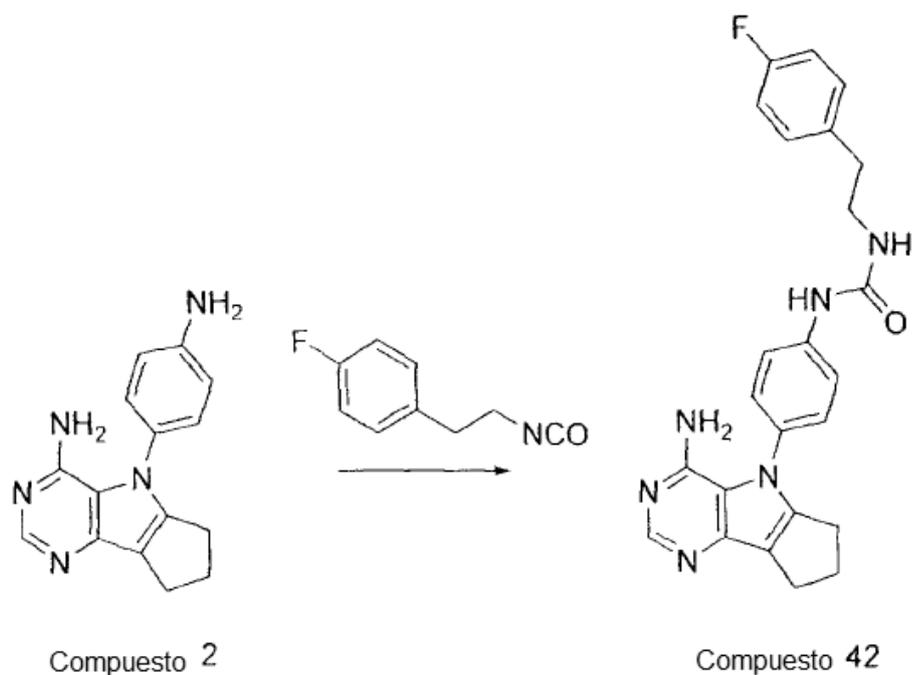


Esquema 11

- 10 A una solución del compuesto 2 (156 mg, 0.58 mmol) en DCM (5 mL) se agregó isocianato de ciclohexilo (79 μ L, 0.62 mmol), ácido acético (0.5 mL) y la reacción se agitó entonces a temperatura ambiente durante 18 horas. Los volátiles se eliminaron bajo presión reducida. La purificación por cromatografía en fase reversa eluyendo con

metanol al 10-70% en gradiente de HCl 1% proveyó el compuesto 41·HCl como un sólido de color beis. MS (m/z) M+H= 391.3

Síntesis del compuesto 42



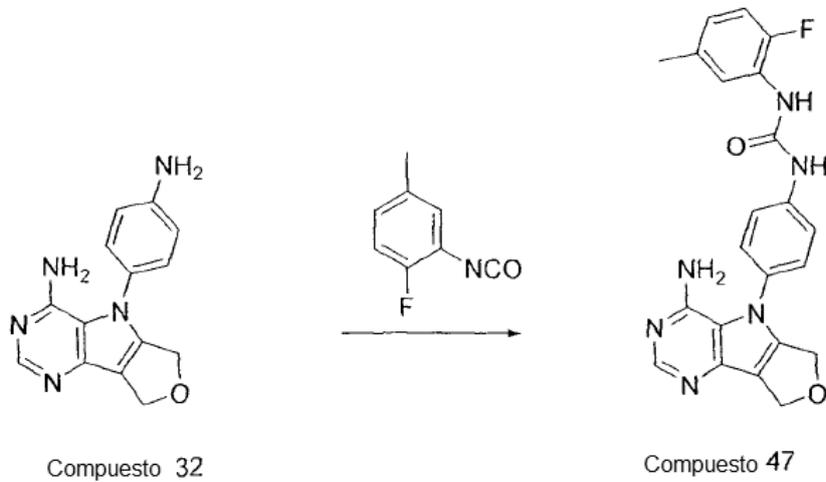
Esquema 12

5

A una solución del compuesto 2 (112 mg, 0.42 mmol) en DCM (3 mL) se agregó 1-fluoro-4(2-isocianatoetil) benceno (77 mg, 0.46 mmol), ácido acético (0.6 mL) y la reacción se agitó entonces a temperatura ambiente durante 18 horas. Los volátiles se eliminaron bajo presión reducida. La purificación por cromatografía en fase reversa eluyendo con metanol al 10-70% en gradiente de HCl 1% proveyó el compuesto 42·HCl como un sólido de color beis. MS (m/z) M+H= 431.2

10

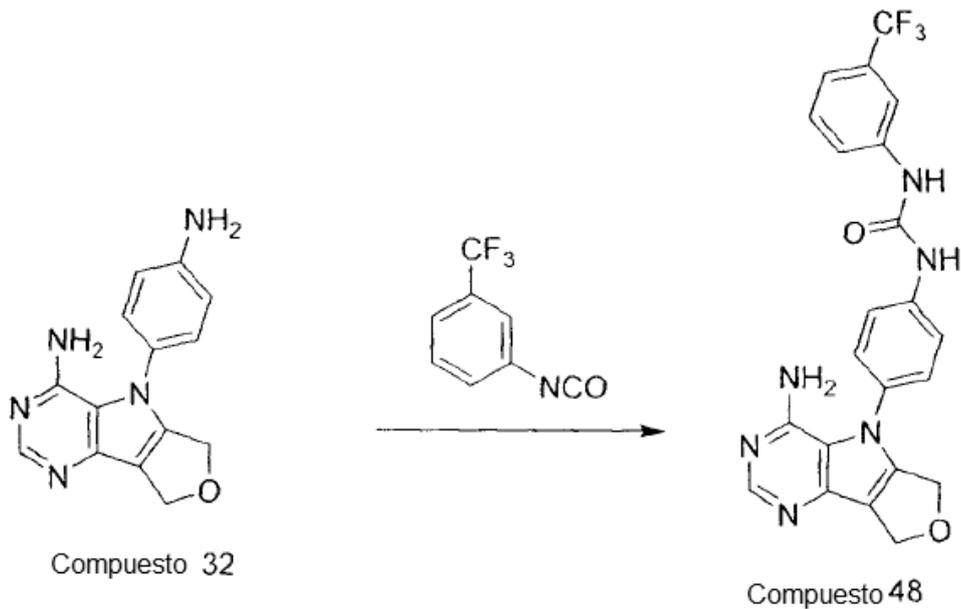
Síntesis del compuesto 47



Esquema 13

5 A una solución del compuesto 32 (200 mg, 0.74 mmol) en DCM (3 mL) se agregó 1-fluoro-2-isocianato-4-metilbenceno (113 mg, 0.74 mmol), ácido acético (0.5 mL) y la reacción se agitó entonces a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los volátiles se eliminaron bajo presión reducida. La purificación por cromatografía en fase reversa eluyendo con metanol al 10-40% en gradiente de HCl 1% proveyó el compuesto 47·HCl como un sólido de color beis. MS (m/z) M+H= 419.2

Síntesis del compuesto 48



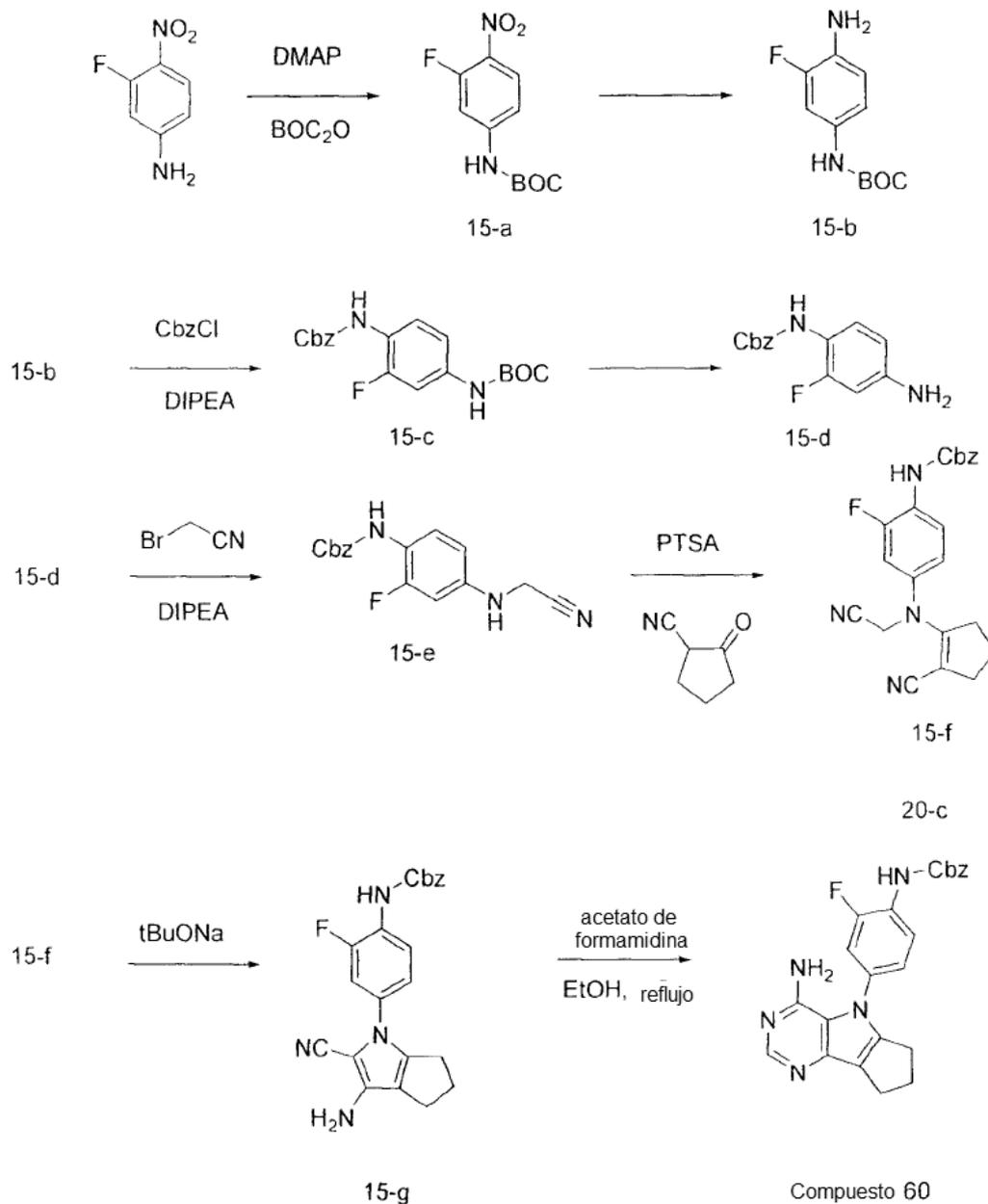
Esquema 14

10 A una solución del compuesto 32 (154 mg, 0.57 mmol) en ácido acético (5 mL) se agregó 1-isocianato-3-(trifluorometil) benceno (108 mg, 0.57 mmol) y la reacción se agitó entonces a temperatura ambiente durante la

noche. Los volátiles se eliminaron bajo presión reducida. La purificación por cromatografía en fase reversa eluyendo con metanol al 10-40% en gradiente de HCl 1% proveyó el compuesto 48·HCl como un sólido de color beis. MS (m/z) M+H= 455.1

Síntesis del compuesto 60

5



Esquema 15

Etapa 1: intermediario 15-a

A una solución de 3-fluoro-4-nitroanilina (5.0 g, 32.0 mmol) en diclorometano (100 mL) se agregó BOC_2O (6.99 g, 32.0 mmol) y después de agitar durante 15 minutos, se agregó DMAP (391 mg, 3.20 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 días y luego se concentró in vacuo. Se agregaron ácido cítrico al 10% y acetato de

10

ES 2 590 144 T3

etilo; la capa orgánica se separó, se lavó con NaHCO_3 saturado acuoso y salmuera, se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró bajo presión reducida. La purificación por cromatografía en sílica gel proveyó el intermediario 15-a como un sólido color amarillo.

Etapa 2: intermediario 15-b

- 5 La solución de metanol del intermediario 15-a (1.7 g, 6.63 mmol) se trató con 10% de Pd/C (1.41 g, 0.66 mmol) y se purgó con H_2 . La solución se agitó bajo H_2 (1 atm.) durante la noche antes de ser filtrada a través de celita. El filtrado se concentró in vacuo para proveer el intermediario 15-b como un sólido de color blanco.

Etapa 3: intermediario 15-c

- 10 A una solución del intermediario 15-b (1.5 g, 6.63 mmol) en diclorometano (66.0 mL), enfriada hasta 0 °C, se agregaron secuencialmente cloroforniato de bencilo (943 mg, 6.63 mmol) y DIPEA (1.15 mL, 6.63 mmol) y la reacción se calentó lentamente hasta temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La reacción se concentró in vacuo. Se agregaron agua y acetato de etilo, la capa orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró bajo presión reducida para proveer el intermediario 15-c como aceite color beis.

Etapa 4: intermediario 15-d

- 15 Se agregó HCl 4N en dioxano (10 mL, 40.0 mmol) al intermediario 15-c (2.17 g, 6.02 mmol) a 0 °C y la suspensión se agitó a 0 °C durante 1 hora. Los volátiles se eliminaron bajo presión reducida y el residuo se trituró con dietil éter. Se formó un precipitado y se recolectó por filtración, se secó bajo vacío para proveer el intermediario 15-d como un sólido de color blanco. MS (m/z) M+H= 261.1

Etapa 5: intermediario 15-e

- 20 A una solución del intermediario 15-d (1.8 g, 6.07 mmol) y bromoacetnitrilo (800 mg, 6.67 mmol) en THF (12.0 mL) se agregó DIPEA (2.22 mL, 12.74 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se agitó entonces a 80 °C durante la noche y luego se enfrió hasta temperatura ambiente. Se agregaron cloruro de amonio acuoso saturado y acetato de etilo; la capa orgánica se separó, se lavó con cloruro de amonio acuoso saturado y salmuera, se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró bajo presión reducida. Se agregó dietil éter al residuo; se formó un precipitado y se recolectó por filtración para proveer el intermediario 15-e como un sólido de color beis.

Etapa 6: intermediario 15-f

- 30 A una solución del intermediario 15-e (1.8 g, 6.01 mmol) en tolueno (30.0 mL), se agregó 2-oxociclopentanocarbonitrilo (984 mg, 9.02 mmol) e hidrato de ácido 4-metilbencenosulfónico (114 mg, 0.60 mmol). La reacción se sometió a reflujo durante 3 horas utilizando un dean-stark y luego se enfrió hasta temperatura ambiente. Se agregaron NaHCO_3 saturado acuoso y acetato de etilo, la capa orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró bajo presión reducida. La purificación por cromatografía en sílica gel proveyó el intermediario 15-f como un sólido de color beis. MS (m/z) M+H= 391.5

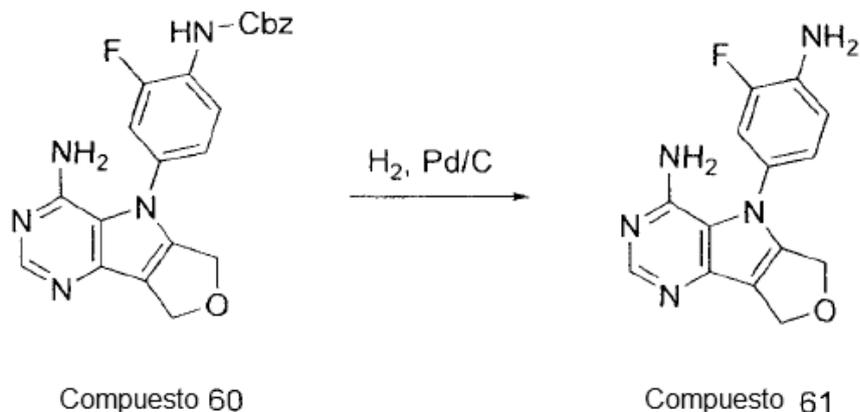
Etapa 7: intermediario 15-g

- 35 A una solución del intermediario 15-f (1.3 g, 3.33 mmol) en tert-butanol (33 mL) se agregó tert-butóxido de potasio (411 mg, 3.66 mmol) y la reacción se agitó a 80 °C durante 30 minutos y luego se enfrió hasta temperatura ambiente. Se agregaron HCl acuoso al 10% y acetato de etilo, la capa orgánica se separó, la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo, los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se concentraron bajo presión reducida para proveer el intermediario 15-g como sólido color marrón. MS (m/z) M+H= 391.7

40 Etapa 8: Compuesto 60

- 45 A una solución del intermediario 15-h (1.3 g, 3.33 mmol) en etanol (33 mL) se agregó acetato de formamidina (2.77 g, 26.6 mmol) y la reacción se agitó a 80 °C durante 1.5 horas. La reacción se concentró bajo presión reducida. Se agregaron una solución acuosa saturada de NaHCO_3 y acetato de etilo, la capa orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se concentró bajo presión reducida. La purificación por cromatografía en fase reversa eluyendo con metanol al 10-50% en gradiente de HCl 1% proveyó el compuesto 60-HCl como un sólido de color beis. MS (m/z) M+H= 418.1

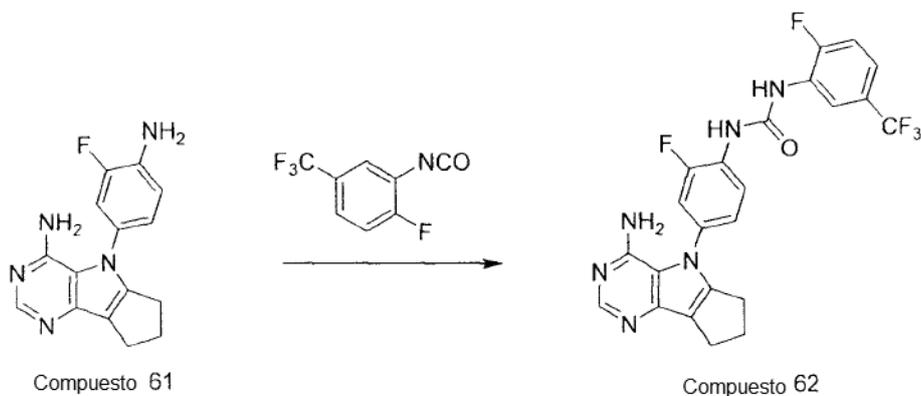
Síntesis del compuesto 61



Esquema 16

Una solución de metanol del compuesto 60 (1.2 g, 2.87 mmol) se trató con 10% de Pd/C (612 mg, 0.28 mmol) y se purgó con H₂. La solución se agitó bajo H₂ (1 atm.) durante 45 minutos antes de ser filtrada a través de celita. El filtrado se concentró in vacuo para proveer el compuesto 61 como un sólido blancuzco.

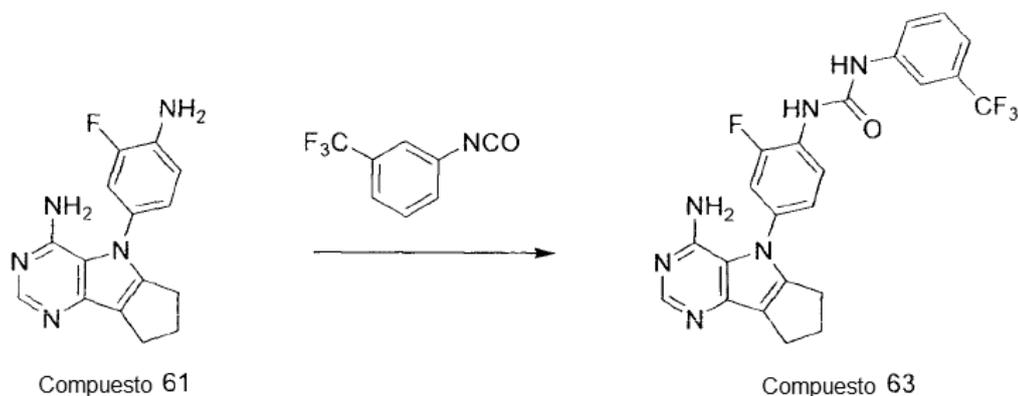
5 Síntesis del compuesto 62



Esquema 17

10 A una solución del compuesto 61 (200 mg, 0.70 mmol) en AcOH (5 ml) se agregó 1-fluoro-2-isocianato-4-(trifluorometil) benceno (145 mg, 0.76 mmol) y la reacción se agitó entonces a temperatura ambiente durante la noche. Los volátiles se eliminaron bajo presión reducida. La purificación por cromatografía en fase reversa eluyendo con 10-50% metanol en gradiente de HCl 1% proveyó el compuesto 62·HCl como un sólido de color beis. MS (m/z) M+H= 489.1

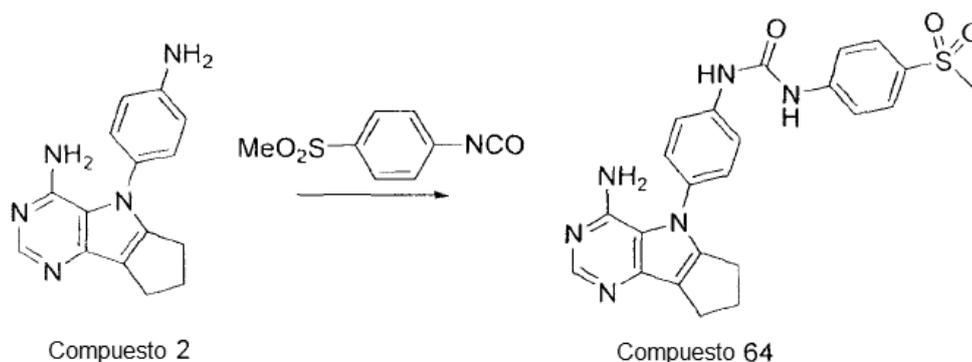
Síntesis del compuesto 63



Esquema 18

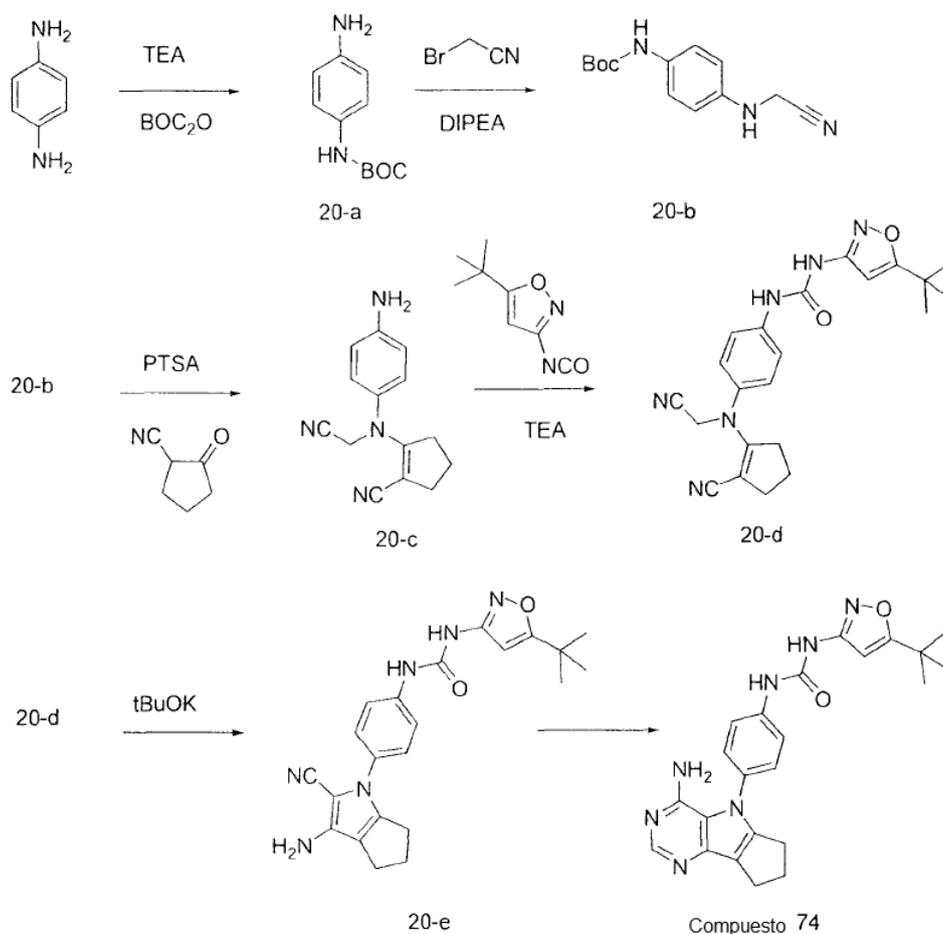
- 5 A una solución del compuesto 61 (200 mg, 0.70 mmol) en AcOH (5 ml) se agregó isocianato de 3-trifluorometilfenilo (132 mg, 0.70 mmol) y la reacción se agitó entonces a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se agregó acetato de etilo; se formó un precipitado y se recolectó por filtración. La purificación por cromatografía en fase reversa eluyendo con metanol al 10-50% en gradiente de HCl 1% proveyó el compuesto 63·HCl como un sólido de color blanco. MS (m/z) M+H= 471.1

Síntesis del compuesto 64



Esquema 19

- 10 A una solución del compuesto 2 (119 mg, 0.45 mmol) en ácido acético (3 mL) se agregó 1-isocianato-4-(metilsulfonyl) benceno (115 mg, 0.58 mmol) y la reacción se agitó entonces a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los volátiles se eliminaron bajo presión reducida. La purificación por cromatografía en fase reversa eluyendo con metanol al 10-70% en gradiente de HCl 1% proveyó el compuesto 64·HCl como un sólido de color blanco. MS (m/z) M+H= 463.2
- 15 Síntesis del compuesto 74



Esquema 20

Etapa 1: intermediario 20-a

5 A una solución de benceno-1,4-diamina (16.2 g, 150 mmol) y trietilamina (20.77 ml, 150 mmol) en DMF se agregó gota a gota durante un período de 15 minutos una solución de DMF de dicarbonato de di-tert-butilo (34.8 ml, 150 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se agregaron agua y acetato de etilo, la capa orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró in vacuo. Se agregó hexano al residuo; se formó un precipitado y se recolectó por filtración para proveer el intermediario 20-a como un sólido de color beis.

Etapa 2: intermediario 20-b

10 A una solución del intermediario 20-a (10.0 g, 48.0 mmol) y bromoacetonitrilo (6.34 g, 52.8 mmol) en THF (150 ml) se agregó DIPEA (17.61 ml, 101 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó entonces a 80 °C durante la noche y luego se enfrió hasta temperatura ambiente. Se agregaron cloruro de amonio acuoso saturado y acetato de etilo, la capa orgánica se separó, se lavó con cloruro de amonio saturado acuoso y salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida. Se agregó dietil éter al residuo; se formó un precipitado y se recolectó por filtración para proveer el intermediario 20-b como un sólido de color beis.

15

Etapa 3: intermediario 20-c

20 A una solución del intermediario 20-b (1.2 g, 4.85 mmol) en tolueno (30.0 ml), se agregó 2-oxociclopentanocarbonitrilo (794 mg, 7.28 mmol) e hidrato de ácido 4-metilbencenosulfónico (92 mg, 0.48 mmol). La reacción se sometió a reflujo durante 3 horas utilizando un dean-stark y luego se enfrió hasta temperatura ambiente. Se agregaron NaHCO₃ saturado acuoso y acetato de etilo, la capa orgánica se separó, se lavó con salmuera, se

secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida para proveer el intermediario 20-c como un sólido de color marrón.

Etapa 4: intermediario 20-d

5 A una solución del intermediario 20-c (1.3 g, 4.73 mmol) en THF (25 mL) se agregó 5-tert-butil-3-isocianatoisoxazol (865 mg, 5.20 mmol) y la reacción se agitó a reflujo durante 1 hora y luego se enfrió hasta temperatura ambiente. Los volátiles se eliminaron bajo presión reducida. Se agregaron hexanos al residuo; se formó un precipitado y se recolectó por filtración para proveer el intermediario 20-d como un sólido de color marrón.

Etapa 5: intermediario 20-e

10 A una solución del intermediario 20-d (1.9 g, 4.70 mmol) en tert-butanol (23.0 mL) se agregó tertbutoxido de potasio (580 mg, 5.17 mmol) y la reacción se agitó a 80 °C durante 30 minutos y luego se enfrió hasta temperatura ambiente. Se agregaron HCl acuoso al 10% y acetato de etilo, la capa orgánica se separó, la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo, los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida para proveer el intermediario 20-e como sólido color marrón.

Etapa 6: Compuesto 74

15 A una solución del intermediario 20-e (1.9 g, 4.70 mmol) en etanol (23 ml) se agregó acetato de formamidina (3.91 g, 37.6 mmol) y la reacción se agitó a 80 °C durante 30 minutos. La reacción se concentró bajo presión reducida. Se agregaron una solución acuosa saturada de NaHCO₃ y acetato de etilo, la capa orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró bajo presión reducida. La purificación por cromatografía en fase reversa eluyendo con 10-50% metanol en gradiente de HCl 1% proveyó el compuesto 74·HCl.
20 MS (m/z) M+H= 432.2

Enlazamiento de quinasa

Las afinidades de enlazamiento de quinasa seleccionada se determinaron utilizando el servicio de protocolos de ensayo de Quinasa Profiler™ (MILLIPORW, v53.0).

25 El compuesto 14 inhibe cFMS(h), Aurora-B(h), Flt3 (h), KDR(h), PDGFR-b(h), FGFR1, Tie2, y FLT4 a una concentración de 100 nM.

El compuesto 44 inhibe cFMS, Flt3, KDR, FGFR1, y EphA2 a 100 nM. Como una medida de la selectividad, otras 216 quinastas fueron inhibidas por 20% o menos en 300 nM.

Ensayo bioquímico de cFMS (CSF1R):

30 Se realizaron ensayos bioquímicos de quinasa basados en la polarización de fluorescencia en formato de placa de 384 pozos usando el receptor del factor 1 estimulante de colonias humanas recombinantes etiquetadas con histidina (FMS) suministrada de Invitrogen™ (que contiene el dominio catalítico (aminoácidos 538-910), expresados en células de insectos y activados in vitro a través de la auto fosforilación) y un protocolo modificado del ensayo verde de fluoresceína FP de KinEASE™ suministrada de Millipore™.

35 Se realizaron reacciones en fase en formato de placas de 384 pozos y a temperatura ambiente durante 60 minutos en presencia 100 μM de sustrato, ATP 10 μM y concentraciones variables de artículos de prueba. La reacción se detuvo con reactivos de detección EDTA/ KinEASE™ y la polarización se midió en un instrumento 500 Tecan. A partir de la curva de respuesta a la dosis obtenida, la IC₅₀ se estimó utilizando Graph pad prisms® usando una curva de ajuste no lineal.

Tabla 2:

Compuesto	cFMS IC ₅₀
3	C
4	a
9	C
10	C
11	a
12	C

ES 2 590 144 T3

14	b
16	b
17	b
19	a
20	b
21	b
23	b
27	a
28	a
30	b
33	b
35	a
36	b
39	b
41	b
43	a
44	b
45	b
46	b
47	b
48	a
50	b
54	a
55	b
56	a
57	b
58	b
59	b
62	b
63	b
64	b
65	C
66	b
67	b
68	b
69	b
71	C
72	b
73	b
74	a

IC ₅₀ a: menos de 100 nM; b: entre 100 y 1000 nM; c: mayor que 1000 nM.
--

Ensayos celulares:

Ensayo de supervivencia de células M-NFS-60 dependientes de M-CSF murínico

5 Las células de leucemia mieloide dependientes de M-CSF de M-NFS-60 murínico se adquirieron de ATCC (CRL-1838). Las células se cultivaron de forma rutinaria a 37°C, CO₂ al 5% en medio completo (RPMI suplementado con FBS al 10%, 1% de penicilina/estreptomicina, 50 uM de beta mercaptoetanol) que contenía 30 ng/ml de M-CSF murínico recombinante (Peptotech 315-02). Para los ensayos de supervivencia, las células se transfirieron a medio agotado (medio completo agotado de M-CSF) durante 24 horas antes de la iniciación de cada experimento. Se recolectaron las células sometidas a ausencia de M-CSF y resuspendieron en medio completo que contenía 20
10 ng/ml de M-CSF. Las células se sembraron a 25,000 células/pozo en placas de 96 pozos y se incubaron durante 1 hora a 37°C, CO₂ al 5%. Las células fueron tratadas con 1 uM o 10uM de curvas compuestas por triplicado y la supervivencia celular se midió 72 horas más tarde mediante Ensayo Luminiscente de Cell Titer Glo (Promega). La luminiscencia se leyó usando un lector de microplacas Tecan Infinite F200. Los valores de EC₅₀ (50% de supervivencia en presencia de compuesto en comparación con los controles tratados con vehículo) se calcularon a partir de curvas de compuestos con respuesta con ajuste no lineal a la dosis usando el Software GraphPad Prism.
15

Ensayo de supervivencia de células de leucemia mielomonocítica bifenotípica B de MV4-11 humanas

Las MV4-11 de células de leucemia mielomonocítica bifenotípica B (ATCC CRL-9591) se cultivaron en suspensión a 37°C, CO₂ al 5% en medio completo (RPMI suplementado con FBS al 10%, 1% de penicilina/estreptomicina). Un día antes del tratamiento, las células por sembraron en placas de 96 pozos a 8000 células/pozo en medio completo. Al
20 día siguiente, los pozos por triplicado se trataron con curvas compuestas de 100, 1000 o 10.000 nM a partir de concentración de acuerdo con la potencia del compuesto. La supervivencia celular se midió 72 horas más tarde mediante Ensayo Luminiscente de Cell Titer Glo (Promega). La luminiscencia se leyó usando un lector de microplacas Tecan Infinite F200. Los valores de EC₅₀ (50% de supervivencia en presencia de compuesto en comparación con los controles tratados con vehículo) se calcularon a partir de curvas de compuestos con respuesta con ajuste no lineal a la dosis utilizando el software CambridgeSoft BioAssay (Perkin Elmer).
25

Tabla 3: Resultados de los ensayos celulares

Compuesto	EC ₅₀ M-NFS-60 (nM)	EC ₅₀ MV4-11 (nM)
2	-	a
3	c	c
4	a	a
5	-	c
6	-	c
7	-	c
8	-	c
9	c	b
10	c	c
11	a	a
12	c	c
13	a	a
14	a	a
15	-	c
16	a	a
17	a	a
18	-	b
19	a	b

ES 2 590 144 T3

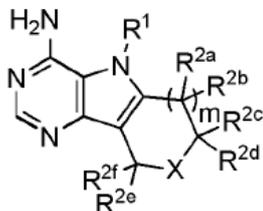
20	a	b
21	a	b
22	a	b
23	b	c
26	-	c
27	a	a
28	a	a
29	-	c
30	b	a
31	-	b
32	-	b
33	b	b
34	-	c
35	b	a
36	b	c
37	-	c
38	b	c
39	a	b
40	-	b
41	b	a
42	b	a
43	a	a
44	b	a
45	b	a
46	b	a
47	a	a
48	b	a
49	-	b
50	a	a
51	-	c
52	b	a
53	-	c
54	a	a
55	b	a
56	a	a
57	a	a
58	b	a
59	b	a
62	b	a
63	a	a

ES 2 590 144 T3

64	c	b
65	b	a
66	b	a
67	b	a
68	b	a
69	b	a
70	-	a
71	c	b
72	b	a
73	b	a
74	a	-
EC ₅₀ a: menos de 100 nM; b: entre 100 y 1000 nM; c: mayor que 1000 nM.		

Reivindicaciones

1. Un compuesto de la fórmula 1:



Fórmula 1

en donde m es un entero de 0 a 1;

5 n es un entero de 0 a 2;

R¹ se selecciona de alquilo, heteroalquilo, carbociclilo y heterociclilo;

R¹ también se selecciona de arilo o heteroarilo, en donde el arilo y heteroarilo pueden ser sustituidos adicionalmente por los grupos seleccionados de:

- 1) Halógeno,
- 2) Alcoxi,
- 3) Amino,
- 4) -N(H)C(O)O-alquilo
- 5) -N(H)SO₂-arilo,
- 6) -N(H)SO₂-heteroarilo,
- 7) -N(H)CON(H)-arilo,
- 8) y -N(H)CON(H)-heteroarilo;

R^{2a}, R^{2b}, R^{2c}, R^{2d}, R^{2e}, R^{2f} se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo, heteroalquilo, carbociclilo, heterociclilo, arilo, heteroarilo. R^{2a} y R^{2b}, R^{2c} y R^{2d} o R^{2e} y R^{2f} puede ser fusionado para formar un sistema de anillo cicloalquilo o heterociclilo de 3 a 8 miembros;

20 X se selecciona de CH₂, O, S(O)_n, NR³;

R³ se selecciona de hidrógeno, alquilo, heteroalquilo, carbociclilo, heterociclilo, arilo, heteroarilo, -C(O)R⁴, -C(O)OR⁴, -S(O)₂R⁴, -C(O)NR⁴R⁵, -S(O)₂NR⁴R⁵, -C(S)NR⁴R⁵;

R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de alquilo, heteroalquilo, carbociclilo, heterociclilo, arilo, heteroarilo o R⁴ y R⁵ pueden ser fusionados para formar un sistema de anillo heterociclilo de 3 a 8 miembros;

25 en donde

alquilo representa C₁₋₆ alquilo;

alquenilo representa C₂₋₆ alquenilo;

alquinilo representa C₂₋₆ alquinilo;

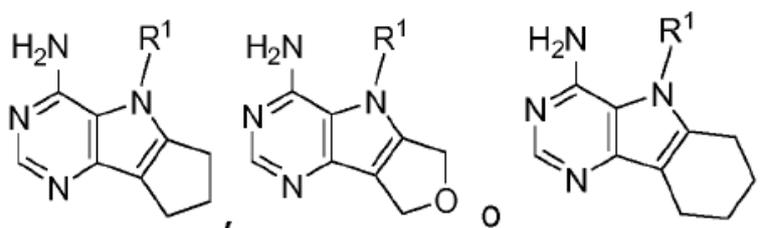
30 arilo incluye grupos aromáticos de un solo anillo de 5, 6, y 7 miembros, sustituidos o no sustituidos en el que cada átomo del anillo es sistemas de anillo de carbono o policíclico que tienen dos o más anillos cíclicos en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes en donde al menos uno de los anillos es aromático

carbociclilo incluye un anillo no aromático sustituido o no sustituido en el que cada átomo del anillo es sistemas de anillo de carbono o policíclico que tienen dos o más anillos cíclicos en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes en donde al menos uno de los anillos es carbocíclico;

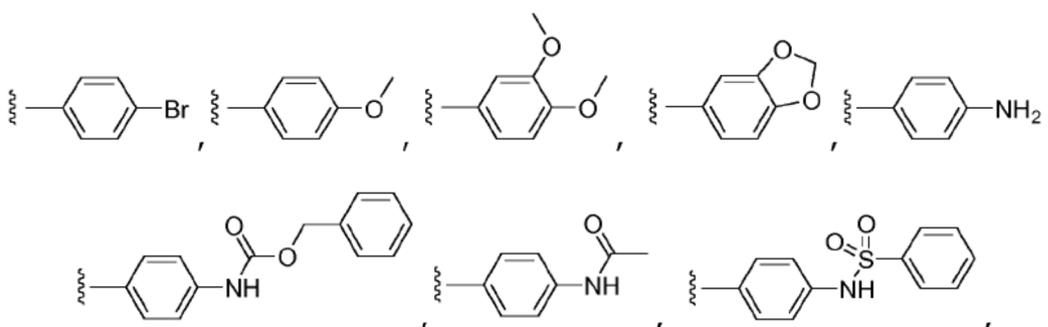
5 heteroarilo incluye estructuras de anillos de 5 a 7 miembros aromáticos sustituidos o no sustituidos, cuyas estructuras de anillo incluyen de uno a cuatro heteroátomos o sistemas de anillos policíclicos que tienen dos o más anillos cíclicos en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes en donde al menos uno de los anillos es heteroaromático;

10 heterociclilo incluye estructuras de anillo de 3 a 10 miembros no aromáticos sustituidos o no sustituidos, cuyas estructuras de anillo incluyen de uno a cuatro heteroátomos o sistemas de anillos policíclicos que tienen dos o más anillos cíclicos en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes en donde al menos uno de los anillos es heterocíclico.

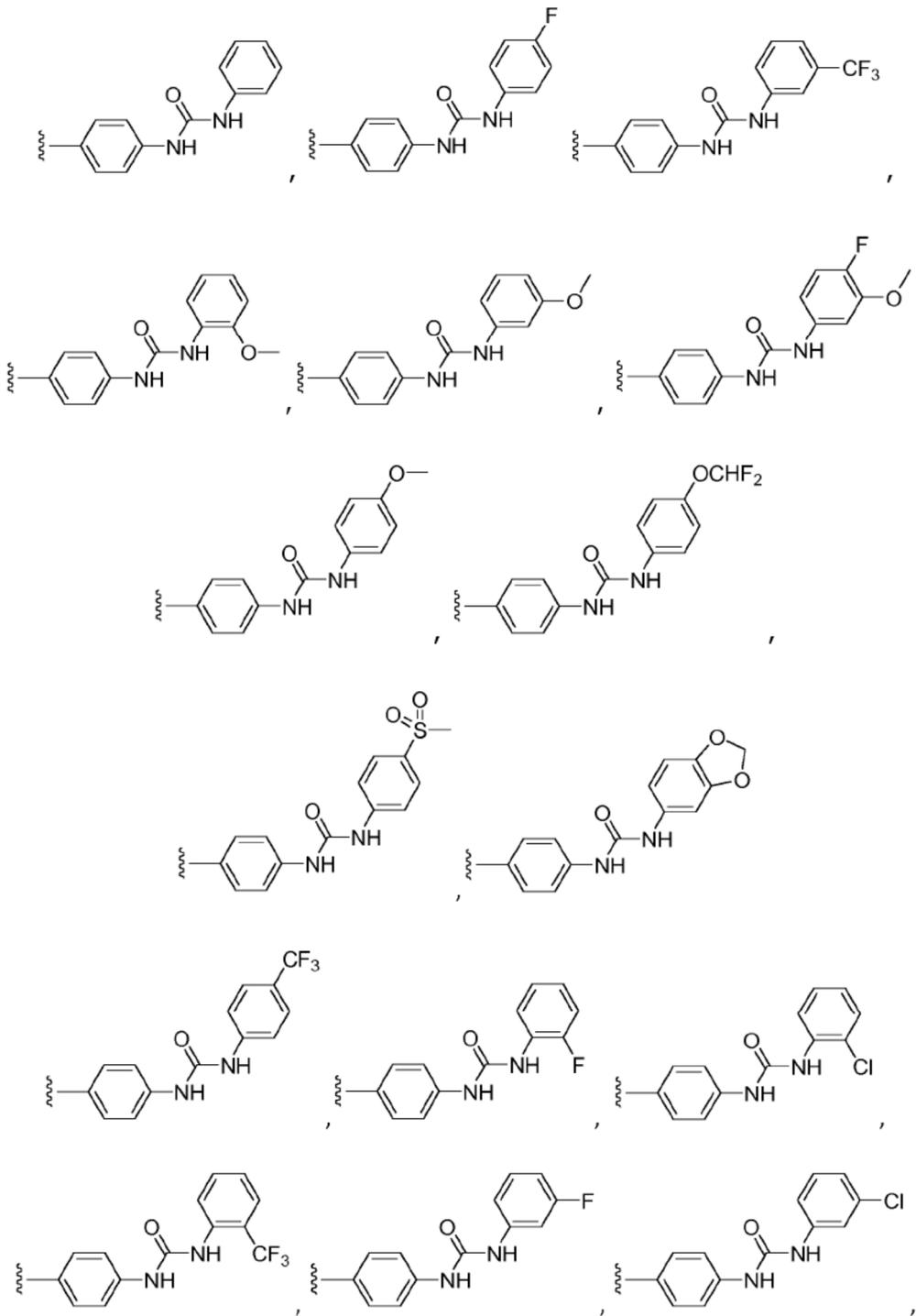
2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en donde la Fórmula I se selecciona de:

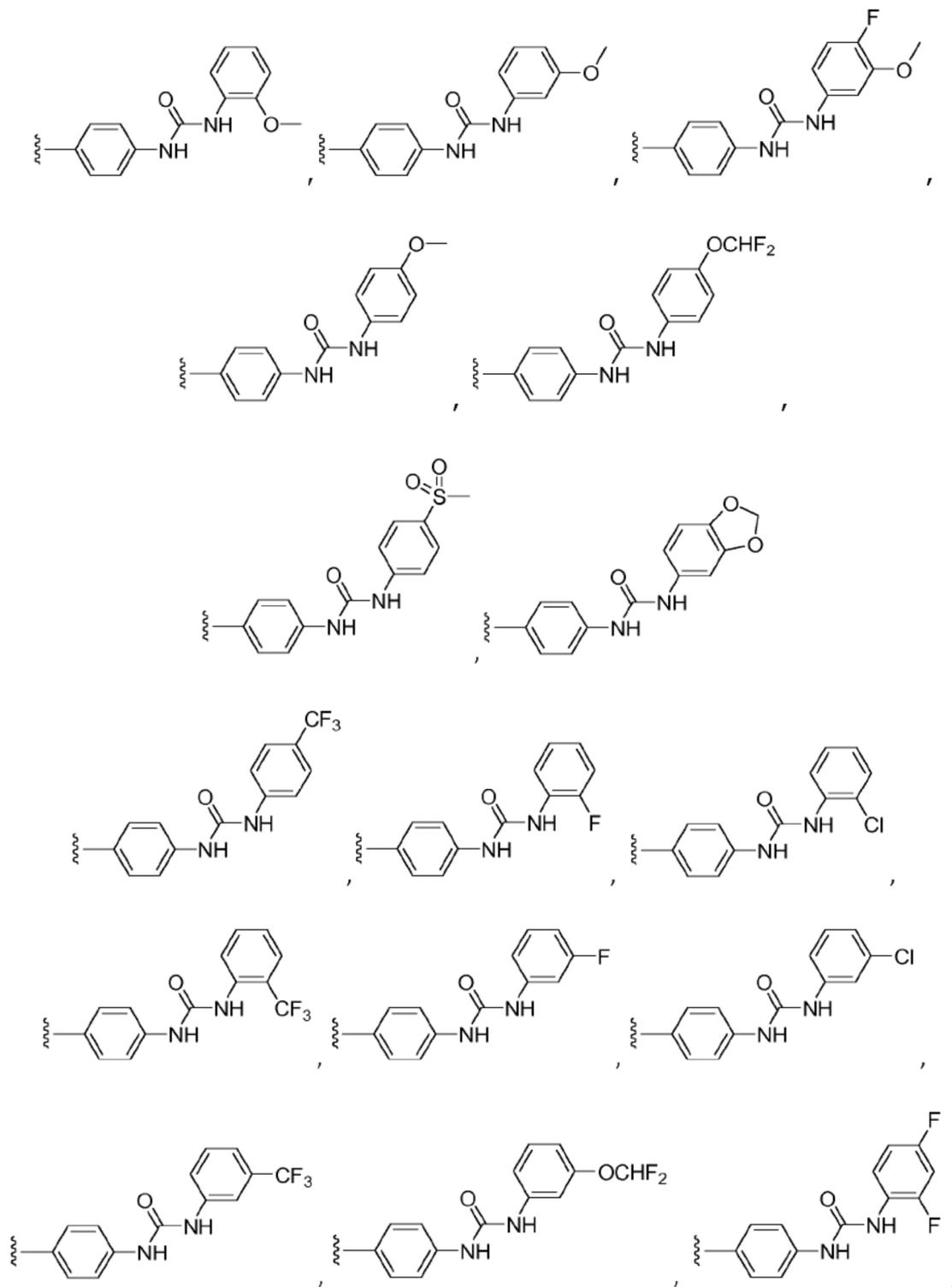


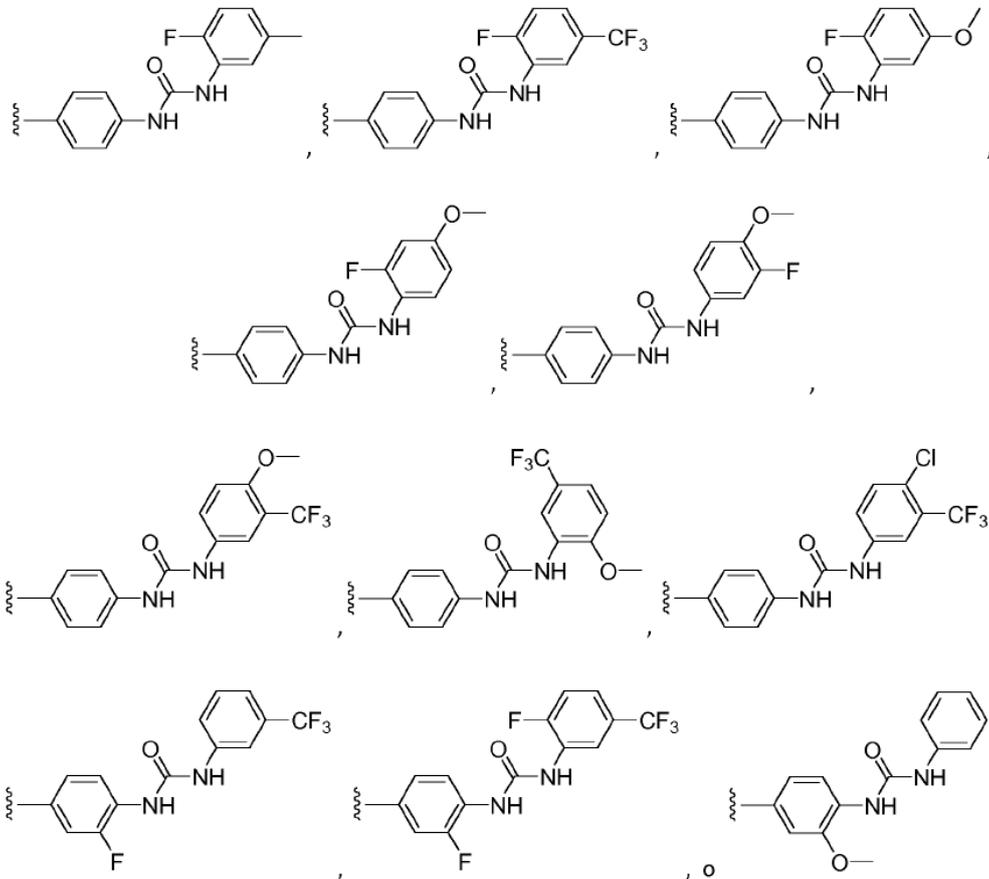
3. Un compuesto de las reivindicaciones 1 o 2 en donde R¹ se selecciona de:



15

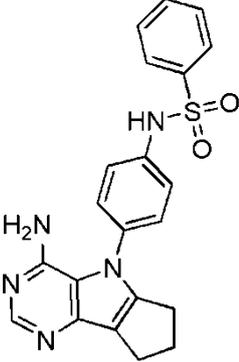
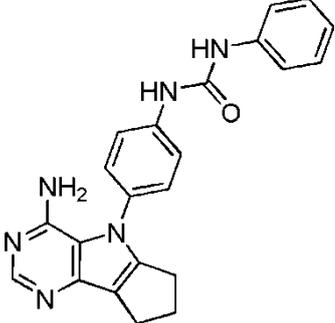
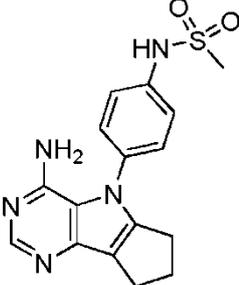
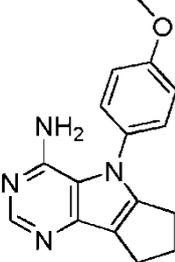


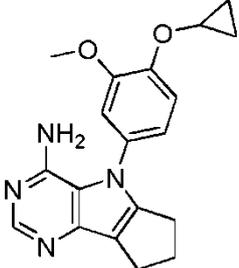
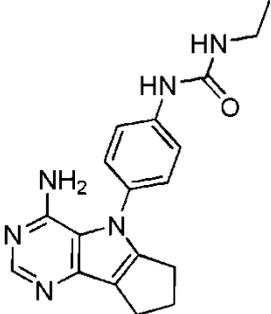
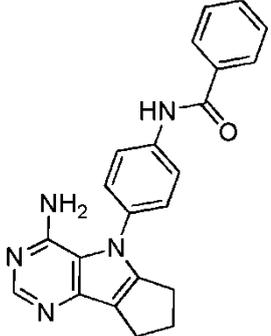
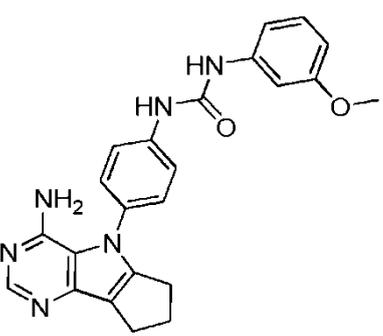
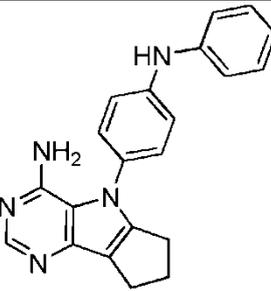


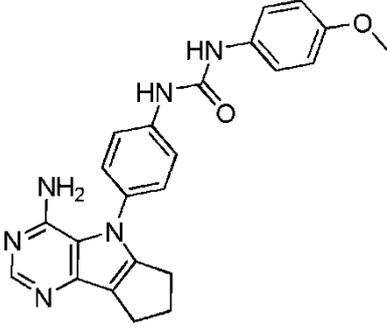
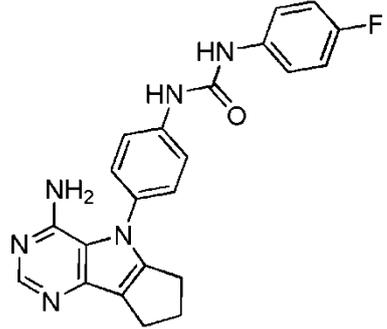
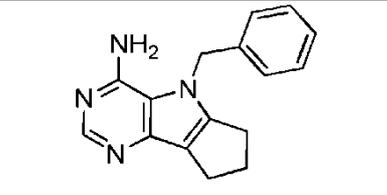
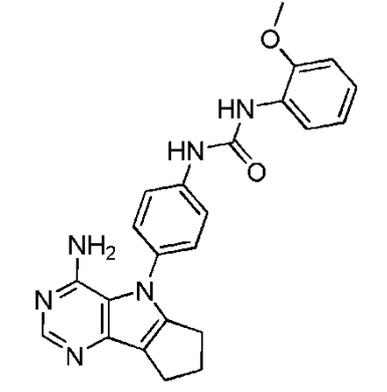
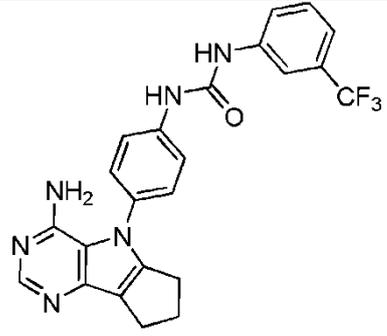


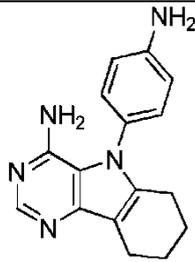
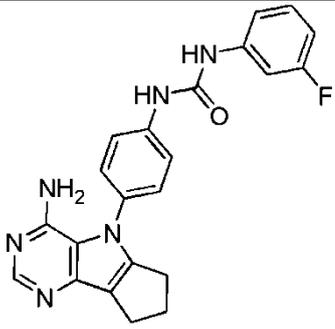
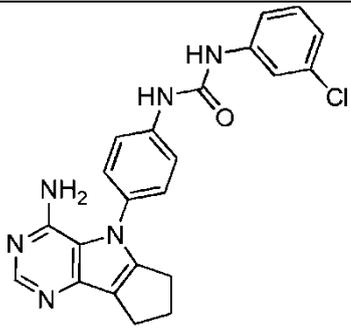
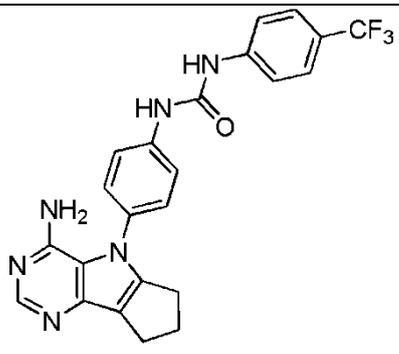
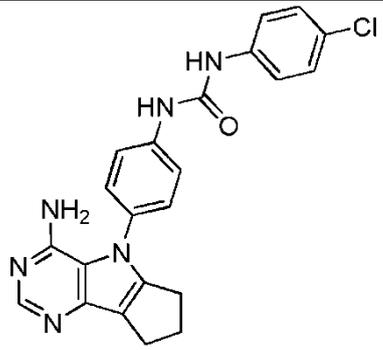
5. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste de:

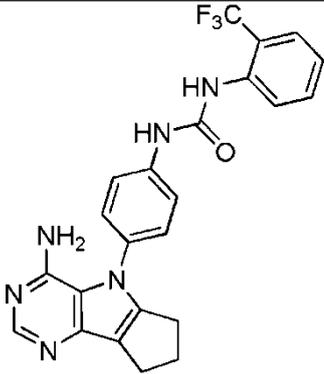
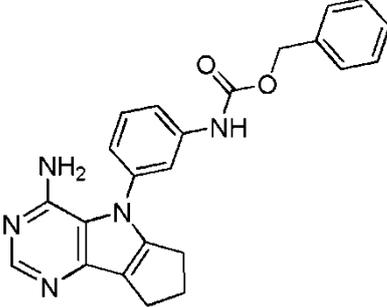
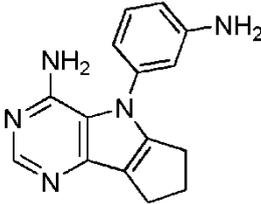
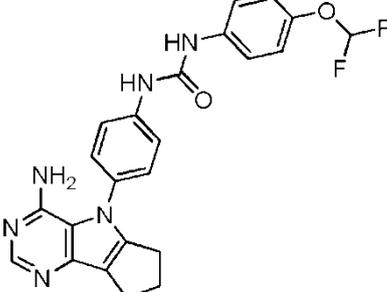
Compuesto	Estructura
1	
2	

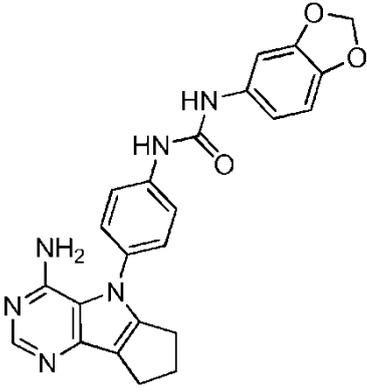
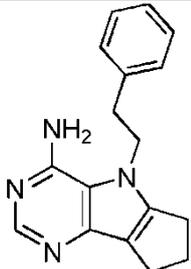
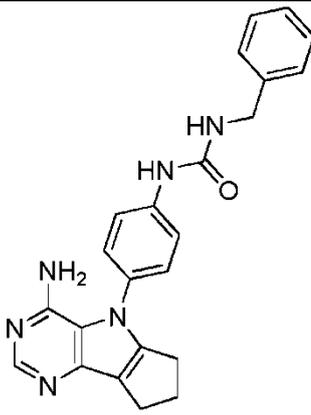
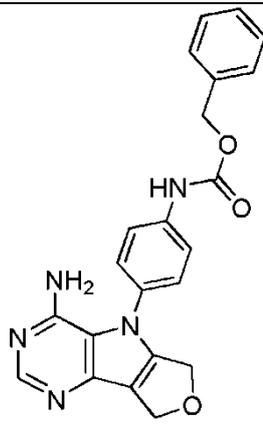
3	 <chem>Nc1nc2c(ncn2C1)NS(=O)(=O)c3ccccc3</chem>
4	 <chem>Nc1nc2c(ncn2C1)NC(=O)c3ccccc3</chem>
5	 <chem>Nc1nc2c(ncn2C1)C3=CC=C(C=C3)OC4OC4</chem>
6	 <chem>CNS(=O)(=O)c1ccc(Nc2c3c(ncn3C2)N)cc1</chem>
7	 <chem>COC1=CC=C(Nc2c3c(ncn3C2)N)C=C1</chem>

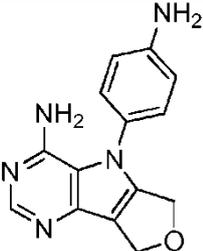
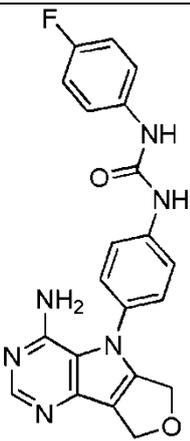
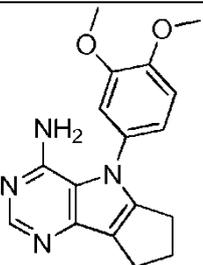
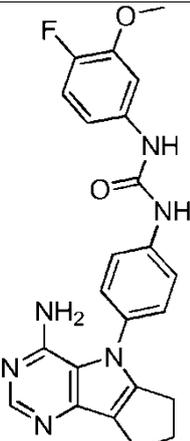
8	
9	
10	
11	
12	

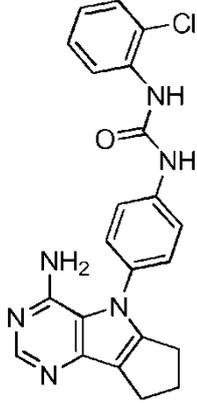
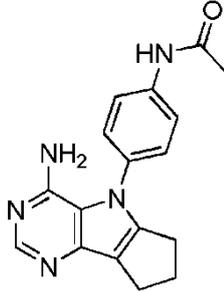
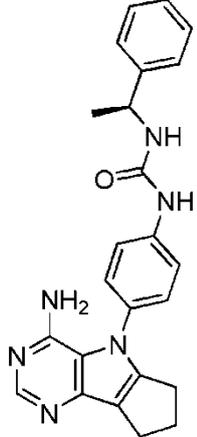
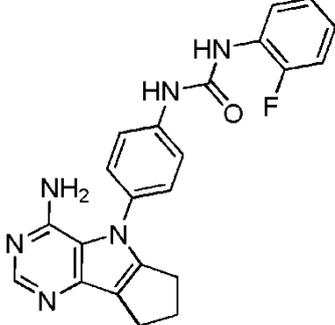
13	 <chem>COC1=CC=C(C=C1)NC(=O)Nc2ccc(cc2)N3C4C=CN=C4N(Cc5ccccc5)C3</chem>
14	 <chem>Fc1ccc(cc1)NC(=O)Nc2ccc(cc2)N3C4C=CN=C4N(Cc5ccccc5)C3</chem>
15	 <chem>Nc1nc2c(ncn2C3C=CC3)N(Cc4ccccc4)c1</chem>
16	 <chem>COC1=CC=C(C=C1)NC(=O)Nc2cccc(c2)N3C4C=CN=C4N(Cc5ccccc5)C3</chem>
17	 <chem>FC(F)(F)c1ccc(cc1)NC(=O)Nc2ccc(cc2)N3C4C=CN=C4N(Cc5ccccc5)C3</chem>

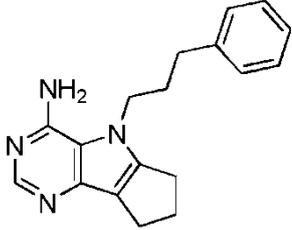
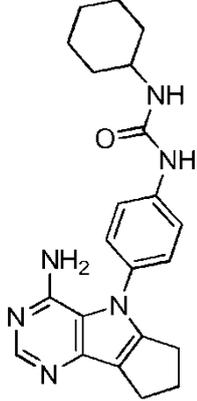
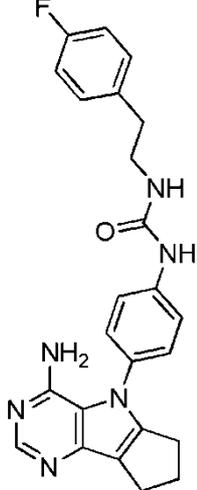
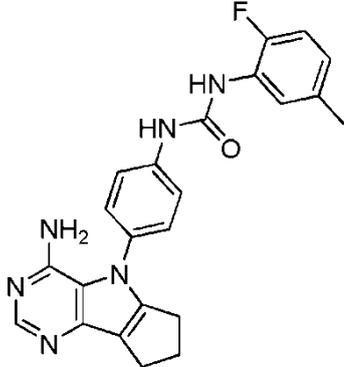
18	
19	
20	
21	
22	

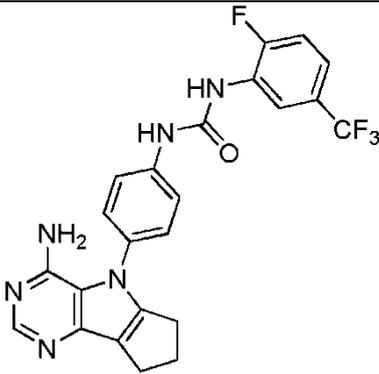
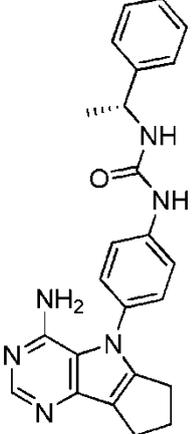
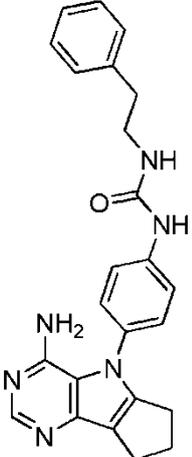
23	 <chem>Nc1nc2c(ncn2C1)N(c3ccc(N)cc3)N(Cc4ccc(C(F)(F)F)cc4)C(=O)O</chem>
24	 <chem>Nc1nc2c(ncn2C1)N(c3ccc(N)cc3)N(Cc4ccccc4)C(=O)O</chem>
25	 <chem>Nc1nc2c(ncn2C1)N(c3ccc(N)cc3)N(c4ccc(N)cc4)</chem>
26	 <chem>Nc1nc2c(ncn2C1)N(c3ccc(O)cc3)N(c4ccc(N)cc4)</chem>
27	 <chem>Nc1nc2c(ncn2C1)N(c3ccc(N)cc3)N(Cc4ccc(OC(F)F)cc4)C(=O)O</chem>

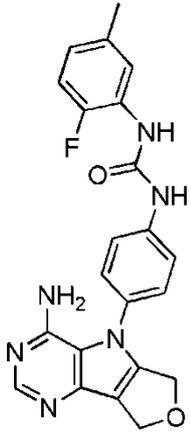
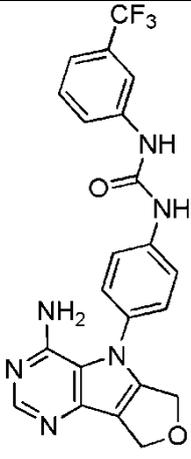
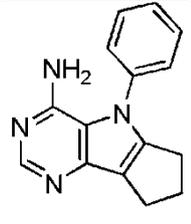
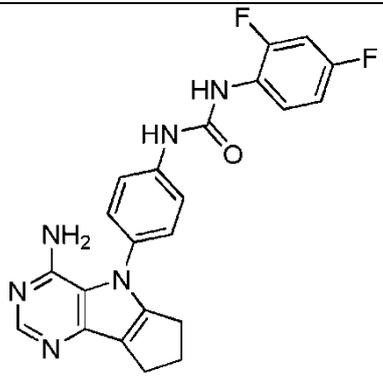
28	 <chem>Nc1ncnc2c1[nH]c3ccccc23Nc4ccc(cc4)NC(=O)Nc5ccc6occc56</chem>
29	 <chem>Nc1ncnc2c1[nH]c3ccccc23NCCc4ccccc4</chem>
30	 <chem>Nc1ncnc2c1[nH]c3ccccc23Nc4ccc(cc4)NC(=O)NCCc5ccccc5</chem>
31	 <chem>Nc1ncnc2c1[nH]c3ccccc23Nc4ccc(cc4)NC(=O)OCCc5ccccc5</chem>

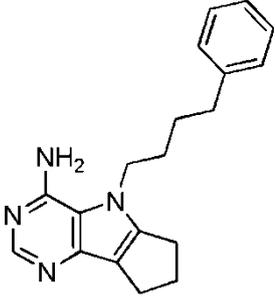
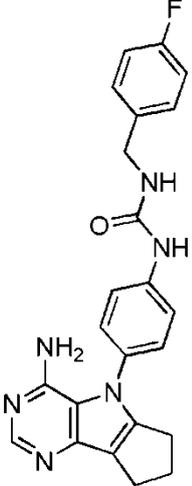
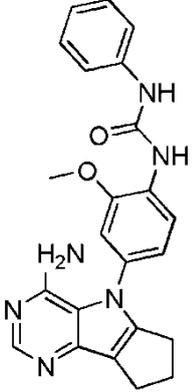
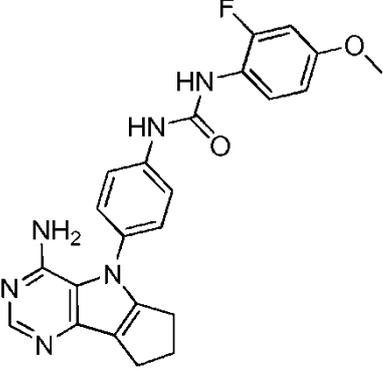
32	
33	
34	
35	

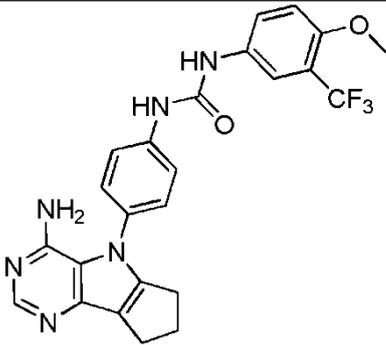
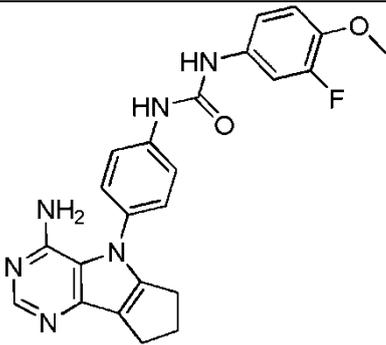
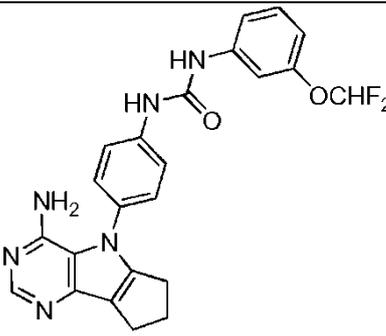
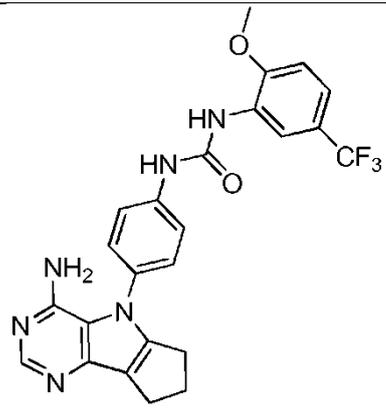
36	
37	
38	
39	

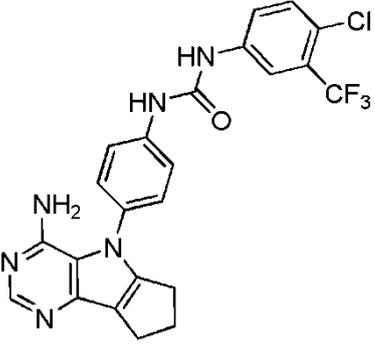
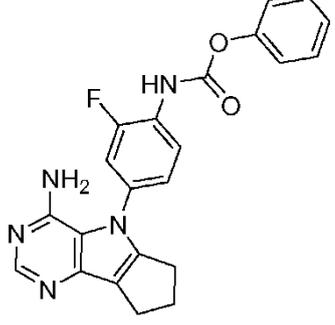
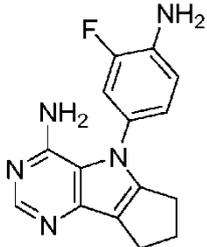
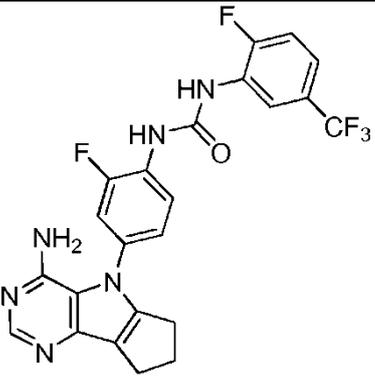
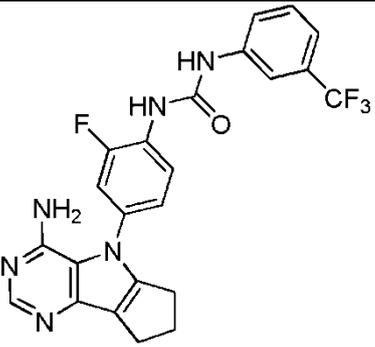
40	
41	
42	
43	

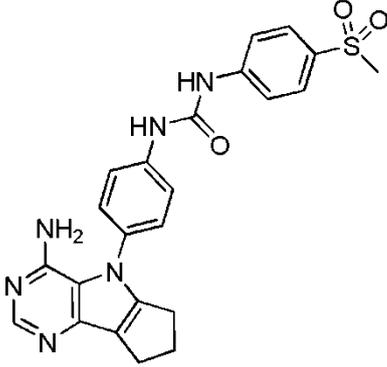
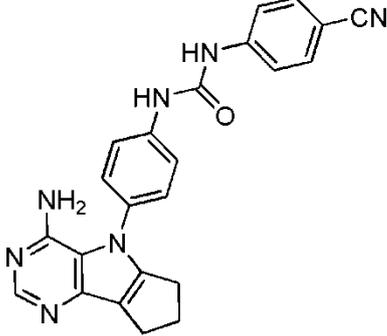
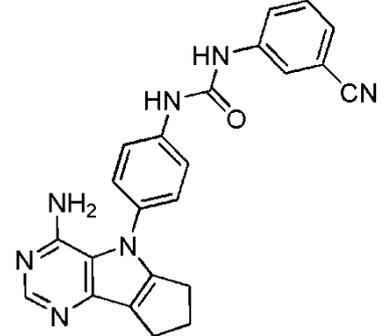
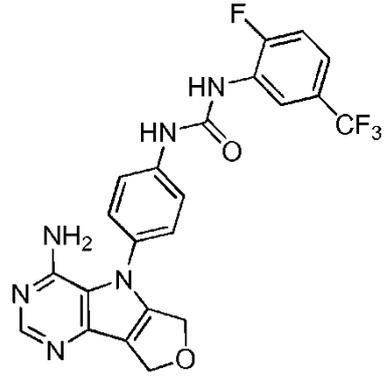
44	 <chem>Nc1nc2c(ncn2C1)c3ccc(NC(=O)Nc4ccc(C(F)(F)F)cc4)cc3</chem>
45	 <chem>Nc1nc2c(ncn2C1)c3ccc(NC(=O)Nc4ccc(N)cc4)cc3</chem>
46	 <chem>Nc1nc2c(ncn2C1)c3ccc(NC(=O)Nc4ccc(N)cc4)cc3</chem>

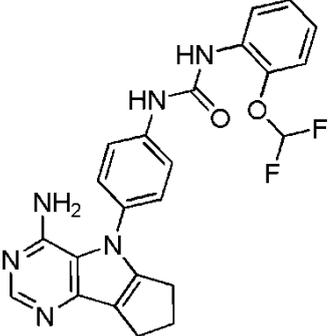
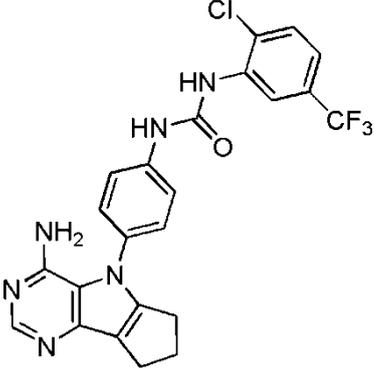
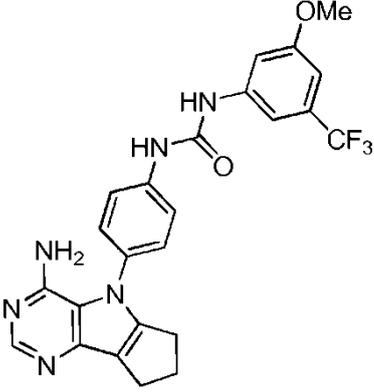
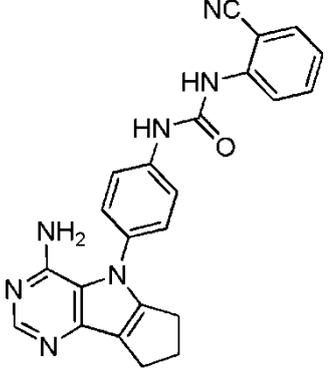
47	
48	
49	
50	

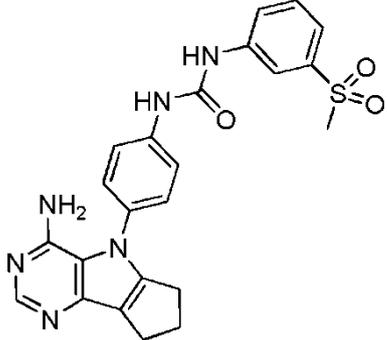
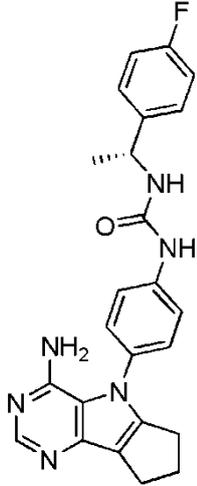
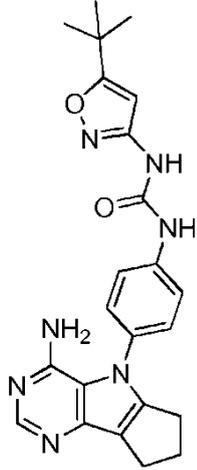
51	
52	
53	
54	

55	
56	
57	
58	

59	
60	
61	
62	
63	

64	 <chem>CN1C=NC2=C(N1)C=CC2Nc3ccc(NC(=O)c4ccc(S(=O)(=O)C)cc4)cc3</chem>
65	 <chem>Nc1ncnc2c1cnc2Nc3ccc(NC(=O)c4ccc(C#N)cc4)cc3</chem>
66	 <chem>Nc1ncnc2c1cnc2Nc3ccc(NC(=O)c4cc(C#N)ccc4)cc3</chem>
67	 <chem>Nc1ncnc2c1cnc2Nc3ccc(NC(=O)c4cc(F)c(C(F)(F)F)cc4)cc3</chem>

68	
69	
70	
71	

<p>72</p>	
<p>73</p>	
<p>74</p>	

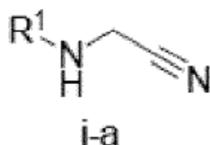
6. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste de los compuestos 1, 2, 18, 24, 25, 31, 32, 60 y 61; o

5 en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste de los compuestos 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 26, 29, 34, 37, 40, 49 y 51; o

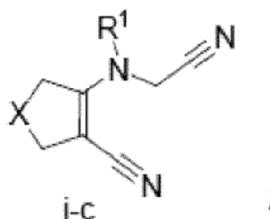
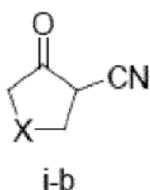
en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste de los compuestos 14, 16, 17, 20, 21, 23, 30, 33, 36, 39, 41, 44, 45, 46, 47, 50, 55, 57, 58, 59, 62, 63, 64, 66, 67, 68, 69, 72 y 73; o

en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste de los compuestos 11, 13, 19, 27, 28, 35, 43, 48, 54, 56 y 74.

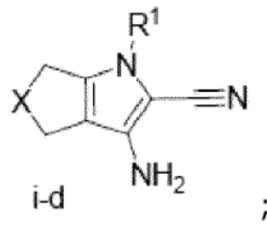
7. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un diluyente vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o la composición farmacéutica de la reivindicación 7 para uso en un método de modulación de una función de quinasa objetivo, en donde la función quinasa objetivo es una función de quinasa cFMS.
9. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso como un inhibidor de una proteína quinasa, en donde la proteína quinasa es cFMS.
10. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso como un inhibidor de quinastas o familias de quinastas en el tratamiento de enfermedades o trastornos seleccionados del cáncer, artritis, trastornos mieloproliferativos, hipertrofia cardíaca, fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, aterosclerosis, restenosis, glomerulonefritis, psoriasis, lupus, esclerosis múltiple, degeneración macular, asma y sinoviales reactiva.
11. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso en el tratamiento de:
 artritis, tumor de células gigantes tenosinovial, sinovitis vellonodular pigmentada y otras sinoviales reactivas, formación y progresión de metástasis ósea, leucemia mieloide aguda o cáncer humano por inhibición de cFMS; o leucemia mieloide aguda o artritis por inhibición de Flt3; o
 artritis o cáncer por inhibición de VEGF o Tie2; o
 selección de subconjuntos de cáncer, por ejemplo tumores de mama y cáncer gástrico por inhibición de FGFR.
12. Una sonda que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 conjugada covalentemente a un marcador detectable o etiqueta de afinidad para dicho compuesto.
13. La sonda de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el marcador detectable se selecciona de una unidad estructural fluorescente, una unidad estructural quimioluminiscente, un agente de contraste paramagnético, un quelato de metal, una unidad estructural que contiene isótopos radiactivos, y biotina.
14. Un método de modulación de la función quinasa objetivo que comprende poner en contacto una célula con un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en una cantidad suficiente para modular la función quinasa objetivo, por lo cual se modula la actividad quinasa objetivo y de señalización, con la condición de que el método no es un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.
15. Un proceso para preparar un compuesto de fórmula I-e, que comprende las etapas de
 (a) alquilación de R^1NH_2 con bromoacetonitrilo para proveer el intermediario i-a



- (b) condensación de i-a con i-b en la presencia de un ácido para proveer el intermediario i-c



- (c) tratamiento del intermediario i-c con una base para proveer el intermediario i-d



(d) tratamiento del intermediario i-d con acetato de formamidina en un alcohol para proveer un compuesto de fórmula i-e

