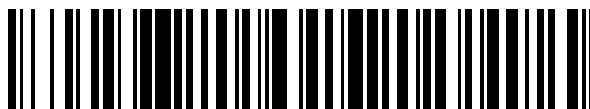


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 592 152**

51 Int. Cl.:

C07D 473/34 (2006.01)
A61K 31/522 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2011** **PCT/JP2011/062377**
87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2011** **WO11152351**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2011** **E 11789754 (6)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016** **EP 2578585**

54 Título: **Derivado de purinona como inhibidor de Btk quinasa**

30 Prioridad:

31.05.2010 JP 2010123727

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
28.11.2016

73 Titular/es:

ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
1-5, Doshomachi 2-chome Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka 541-8526, JP

72 Inventor/es:

YAMAMOTO, SHINGO y
YOSHIZAWA, TOSHIO

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 592 152 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

Derivado de purinona como inhibidor de Btk quinasa

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a 6-amino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona y sales de la misma (abreviado en lo sucesivo como "compuestos de la presente invención").

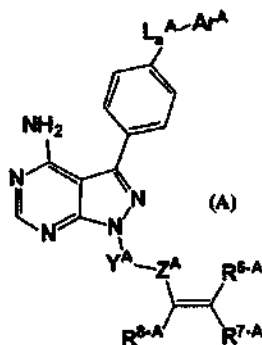
10 **Antecedentes en la técnica**

La tirosina quinasa de Bruton (abreviada en lo sucesivo como "Btk") pertenece a la familia Tec de quinasas, que son tirosina quinasas no receptoras, y se expresan selectivamente en líneas de linfocitos B y mielocitos. Btk desempeña un importante papel en la transducción de señal en linfocitos B y es un factor que contribuye a la supervivencia, diferenciación, proliferación, y activación de linfocitos B. La señalización en linfocitos B a través del receptor antigénico de linfocitos B (BCR) induce una amplia diversidad de respuestas biológicas, y aquí una transducción de señal anómala causa activación anómala de linfocitos B y la formación de autoanticuerpos patógenos. Se cree que Btk forma una eslabón en las rutas de transducción de señal mediadas por BCR en linfocitos B. De ese modo, se conoce que la agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (XLA) está causada por un defecto en el gen Btk humano que da como resultado la inducción de diferenciación anómala de linfocitos B y una reducción drástica en la producción de inmunoglobulina (véase el Documento de No Patente 1). Los síntomas de esta enfermedad incluyen una reducción considerable de los linfocitos B en la sangre periférica y un aumento de la susceptibilidad a infecciones bacterianas. Btk también se conoce por participar en la activación de mastocitos y en funciones fisiológicas de las plaquetas. Debido a esto, los compuestos que tienen una actividad inhibidora de Btk son eficaces para el tratamiento de enfermedades en las que participan linfocitos B o mastocitos, por ejemplo, enfermedades alérgicas, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, enfermedades tromboembólicas y cánceres (véase el Documento de No Patente 2).

Los siguientes compuestos se conocen como técnica anterior para los compuestos de la presente invención.

Los compuestos representados por la fórmula general (A) se conocen como compuestos que tienen actividad inhibidora de Btk

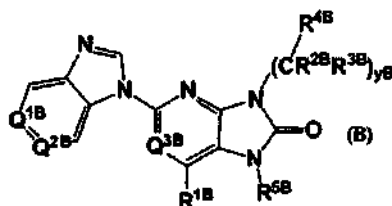
[C 2]



(en la fórmula La^{A} representa CH_2 , O, NH, o S; Ar^{A} representa arilo sustituido o sin sustituir o heteroarilo sustituido o sin sustituir; Y^{A} representa cualquier sustituyente seleccionado entre alquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, y heteroarilo; Z^{A} representa CO, OCO, NHCO, o CS; $\text{R}^{7-\text{A}}$ y $\text{R}^{8-\text{A}}$ representan cada uno independientemente H, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$ sin sustituir, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$ sustituido, heteroalquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$ sin sustituir, heteroalquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$ sustituido, cicloalquilo $\text{C}_3\text{-C}_6$ sin sustituir, cicloalquilo $\text{C}_3\text{-C}_6$ sustituido, heterocicloalquilo $\text{C}_2\text{-C}_6$ sin sustituir, y heterocicloalquilo $\text{C}_2\text{-C}_6$ sustituido; o $\text{R}^{7-\text{A}}$ y $\text{R}^{8-\text{A}}$ forman juntos un enlace; y $\text{R}^{6-\text{A}}$ representa H, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$ sustituido o sin sustituir, heteroalquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$ sustituido o sin sustituir, alcoxialquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, alquilaminoalquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$, cicloalquilo $\text{C}_3\text{-C}_6$ sustituido o sin sustituir, o arilo sustituido o sin sustituir (las definiciones de estos grupos se han extraído)) (véanse los Documentos de Patente 1, 2, y 3).

Por otro lado, por ejemplo, los compuestos representados por la fórmula general (B)

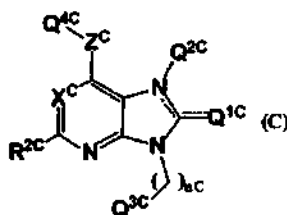
[C 3]



(en la fórmula, Q^{1B} y Q^{2B} se seleccionan independientemente entre CX^{1B} , CX^{2B} , y nitrógeno; Q^{3B} representa N o CH; X^{1B} y X^{2B} se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C_1-C_6), ciano, halógeno, etc.; R^{1B} se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo (C_1-C_6); y B representa 0 o un número entero de 1 a 3; R^{2B} y R^{3B} se seleccionan independientemente entre hidrógeno y alquilo (C_1-C_6); R^{4B} se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo, heterociclilo, arilo, heteroarilo, etc.; y R^{5B} se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo, heterociclilo, y heterociclilo sustituido (las definiciones de estos grupos se han extraído)) (véase el Documento de Patente 4) se conocen como compuestos que tienen un esqueleto de purinona.

También se conocen los compuestos representados por la fórmula general (C)

[C 4]

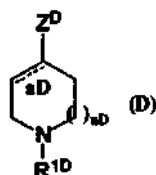


(en la fórmula, X^C se selecciona entre el grupo que consiste en nitrógeno y CR^{8C} ; R^{8C} se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquilo sustituido o sin sustituir, etc.; Q^{1C} se selecciona entre el grupo que consiste en O, S, etc.; Z^C se selecciona entre el grupo que consiste en oxígeno, azufre, y NY^{5C} ; Y^{5C} se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo sustituido o sin sustituir, etc.; Q^{2C} , Q^{3C} , y Q^{4C} se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, etc.; R^{2C} se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo sustituido o sin sustituir; y nC representa 0, 1, 2, 3 o 4 (las definiciones de estos grupos se han extraído)) (véase el Documento de Patente 5).

También se desvelan compuestos que tienen un esqueleto de purinona como la fórmula 20 (véase el número de párrafo 0028) en el Documento de Patente 6.

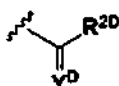
También se conocen los compuestos representados por la fórmula general (D)

[C 5]



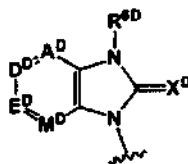
(en la fórmula, R^{1D} representa un grupo seleccionado entre hidrógeno, alquilo sustituido o sin sustituir,

[C 6]



etc.; R^{2D} representa alquilo sustituido o sin sustituir, alquenilo sustituido o sin sustituir, o alquinilo sustituido o sin sustituir; Y^D representa un grupo seleccionado entre O, C-NO₂, y S; Z^D representa un grupo seleccionado entre

[C 7]



etc.; aquí, A^D , D^D , E^D , y M^D representan cada uno independientemente CR^{12D}, N, y N-óxido; R^{12D} representa un grupo seleccionado entre hidrógeno, halógeno, amino, hidroxilo, y ciano; X^D representa un grupo seleccionado entre O, C-NO₂, y S; R^{6D} representa un grupo seleccionado entre cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, y arilo sustituido o sin sustituir; la indicación a^D representada por la línea punteada representa un enlace sencillo o un doble enlace; y n^D representa un número entero seleccionado entre 0, 1, y 2) (véase el Documento de Patente 7).

Los compuestos de la presente invención son compuestos que, además de tener actividad inhibidora selectiva de Btk, exhiben una excelente actividad metabólica y pueden evitar la actividad inhibidora de CYP y reacciones adversas tales como, por ejemplo, hepatotoxicidad; sin embargo, no existe ninguna declaración o sugerencia con respecto a estos rasgos característicos en ninguno de los documentos de la técnica anterior.

Documento de Patente 1: Traducción Japonesa de Solicitud PCT n.º 2010-504324

Documento de Patente 2: WO 2008/121742

Documento de Patente 3: WO 2010/009342

Documento de Patente 4: WO 2008/060301

Documento de Patente 5: WO 2007/142755

Documento de Patente 6: Traducción Japonesa de Solicitud PCT n.º 2003-509427

Documento de Patente 7: WO 2003/037890

Documento de No Patente 1: Nature, Volumen 361, pp. 226-233, 1993

Documento de No Patente 2: Anticancer Agents in Medicinal Chemistry, Volumen 7, número 6, pp. 624-632, 2007

Divulgación de la invención

Con el fin de proporcionar un agente terapéutico muy seguro para enfermedades en las que participan linfocitos B y/o mastocitos, un objetivo de la presente invención es desarrollar un compuesto que, además de tener una actividad inhibidora selectiva de Btk, exhiba una excelente estabilidad metabólica y pueda evitar hepatotoxicidad.

Con el fin de conseguir el objetivo anterior, los presentes inventores llevaron a cabo investigaciones exhaustivas dirigidas a descubrir compuestos que tienen actividad inhibidora selectiva de Btk y descubrieron los compuestos de la presente invención como resultado. Además, también se descubrió que estos compuestos son compuestos que exhiben una excelente actividad metabólica y pueden evitar hepatotoxicidad, y se logró la presente invención como resultado.

Es decir, la presente invención se refiere a

[1] 6-amino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, o una sal de la misma;

y
[2] 6-amino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona.

Los compuestos de la presente invención, además de tener actividad inhibidora selectiva de Btk, exhiben una excelente actividad metabólica y pueden evitar hepatotoxicidad, y como consecuencia son útiles como agentes terapéuticos muy seguros para enfermedades en las que participan linfocitos B y/o mastocitos, tales como linfoma no Hodgkin.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

La presente invención se describe con detalle a continuación.

En la presente invención, "que tiene actividad inhibidora selectiva de Btk" representa que tiene actividad inhibidora selectiva de Btk con respecto a tirosina quinasas no Btk y particularmente proteína tirosina quinasa específica de

linfocitos (Lck), proteína tirosina quinasas fyn (Fyn), e isoforma A homologa del oncogén relacionado con sarcoma viral de Yamaguchi v-yes-1 (LynA). Esta propiedad hace posible evitar reacciones adversas impredecibles causadas por la inhibición de otras tirosina quinasas. Por ejemplo, se conoce la aparición de anomalías retinianas en ratones deficientes de Lck (Oncogene, Volumen 16, pp. 2351-2356, 1998), que aumenta la posibilidad de que se produzcan reacciones adversas en el ojo en el caso de inhibición de Lck.

En la presente invención, el átomo de halógeno representa flúor, cloro, bromo, y yodo.

En la presente invención, a menos que se indique específicamente otra cosa, y como es evidente para el experto en la materia,

el símbolo [C 11]  representa que enlaza hacia el lado posterior del plano del papel (es decir, la posición α);

el símbolo [C 12]  representa que enlaza hacia la parte anterior del plano del papel (es decir, la posición β); y

[C 13]  representa la posición α , la posición β , o su mezcla en cualquier proporción.

Los compuestos de la presente invención se convierten en las sales correspondientes mediante métodos conocidos. La sal es preferentemente una sal soluble en agua. Algunas sales adecuadas se pueden mostrar a modo de ejemplo mediante las sales con metales alcalinos (potasio y sodio), sales con metales alcalinotérreos (calcio y magnesio), la sal de amonio, sales con aminas orgánicas farmacéuticamente aceptables (tetrametilamonio, trietilamina, metilamina, dimetilamina, ciclopentilamina, bencilamina, fenetilamina, piperidina, monoetanolamina, dietanolamina, tris(hidroximetil)aminometano, lisina, arginina y N-metil-D-glucamina), y sales de adición de ácido (sales de ácidos inorgánicos (clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, fosfato y nitrato) y sales de ácidos orgánicos (acetato, trifluoroacetato, lactato, tartrato, oxalato, fumarato, maleato, benzoato, citrato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, toluenosulfonato, isetionato, glucuronato y gluconato)).

Los compuestos de la presente invención y sus sales se pueden convertir en solvatos. Este solvato es preferentemente soluble en agua y tiene baja toxicidad. Algunos solvatos adecuados se pueden mostrar a modo de ejemplo mediante solvatos con, por ejemplo, agua o un disolvente de alcohol (por ejemplo, etanol).

Los compuestos de la presente invención se pueden usar como profármacos. Un profármaco de un compuesto de la presente invención representa un compuesto que se convierte mediante una reacción *in vivo*, por ejemplo, mediante una enzima o ácido gástrico, en el compuesto de la presente invención. Algunos profármacos de los compuestos de la presente invención se pueden mostrar mediante compuestos en los que - cuando el compuesto de la presente invención tiene un grupo hidroxilo - este grupo hidroxilo está acilado, alquilado, fosfatado, o borado (por ejemplo, compuestos proporcionados por acetilación, palmitoilación, propanoilación, pivaloilación, succinilación, fumarilación, alanilación o dimetilaminometilcarbonilación del grupo hidroxilo en los compuestos de la invención); otros ejemplos son compuestos proporcionados por la esterificación o amidación de un grupo carboxilo en un compuesto de la presente invención (por ejemplo, compuestos proporcionados por esterificación de etilo, esterificación de isopropilo, esterificación de fenilo, esterificación de carboximetilo, esterificación de dimetilaminometilo, esterificación de pivaloiloximetilo, esterificación de etoxycarboniloxietilo, esterificación de ftalidilo, esterificación de (5-metil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)metilo, esterificación de ciclohexiloxycarboniletilo, o metilamidación de un grupo carboxilo en un compuesto de la presente invención). Estos compuestos se pueden preparar mediante métodos conocidos. Además, el profármaco de un compuesto de la presente invención puede ser un hidrato o anhidro. El profármaco de un compuesto de la presente invención se convierte en condiciones fisiológicas en el compuesto de la presente invención, como se describe en las páginas 163 a 198 de Molecular Design en el volumen 7 de Development of Medicines (Hirokawa Shoten Co., 1990). Además, los compuestos de la presente invención se pueden marcar con un isótopo (por ejemplo, ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{35}S , ^{18}F , ^{36}Cl , ^{123}I , y ^{125}I).

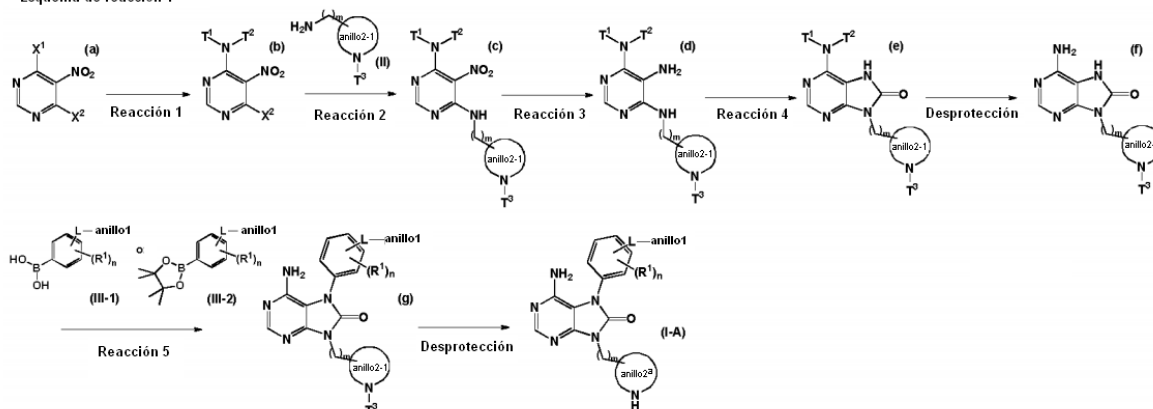
[Métodos para producir los compuestos de la presente invención]

Los compuestos de la presente invención se pueden producir modificando y combinando adecuadamente métodos conocidos, por ejemplo, los métodos descritos en Comprehensive Organic Transformations: A Guide to Functional Group Preparations, 2ª edición (Richard C. Larock, John Wiley & Sons Inc., 1999), o los métodos que se dan en los ejemplos.

Los compuestos de la presente invención se pueden producir usando el siguiente esquema de reacción 1.

[C 15]

Esquema de reacción 1



(En la fórmulas, T^1 y T^2 representan cada uno independientemente un grupo protector para el grupo amino (por ejemplo, el grupo bencilo (Bn), el grupo 4-metoxibencilo, y el grupo 3,4-dimetoxibencilo); X^1 y X^2 representan cada uno independientemente un átomo de halógeno; anillo2-1 representa un anillo2^a que se ha protegido mediante un grupo protector representado por T^3 (por ejemplo, el grupo terc-butoxicarbonilo (Boc) y el grupo benciloxicarbonilo (Cbz)); anillo2a es un anillo de pirrolidina, L es -O-, anillo1 es un anillo de benceno, m es 0 y n es 0.)

La reacción 1 en el esquema de reacción 1 se conoce y se lleva a cabo usando un compuesto con fórmula general (a) y un derivado de amina protegido, es decir, un compuesto representado por T^1T^2 -NH (T^1 y T^2 en la fórmula tienen las mismas definiciones que se han indicado anteriormente) y realizando la reacción en un disolvente orgánico (por ejemplo, diclorometano, tetrahidrofurano, dioxano, dimetilformamida, dimetilacetamida, y 1-metil-2-pirrolidona) en presencia de una base (por ejemplo, trietilamina, N,N-diisopropiletilamina, piridina, 4-dimetilaminopiridina, y N-metilmorfolina) a una temperatura de -20 °C a la temperatura ambiente.

La reacción 2 en el esquema de reacción 1 se conoce y se lleva a cabo usando un compuesto con fórmula general (b) y un compuesto representado por la fórmula general (II) y realizando la reacción en un disolvente orgánico (por ejemplo, dioxano, acetonitrilo, tetrahidrofurano, dimetilformamida, dimetilacetamida y 1-metil-2-pirrolidona) en presencia de una base (por ejemplo, trietilamina, N,N-diisopropiletilamina, piridina, 4-dimetilaminopiridina, y N-metilmorfolina) a una temperatura de -20 °C a 70 °C.

La reacción 3 en el esquema de reacción 1 se conoce y se lleva a cabo usando un compuesto representado por la fórmula general (c) y usando un reactivo metálico (por ejemplo, cinc, hierro, estaño, cloruro de estaño, cloruro de hierro, samario, indio, y borohidruro sódico-cloruro de níquel) en un disolvente miscible en agua (por ejemplo, etanol, metanol, tetrahidrofurano, y acetato de etilo) en presencia o ausencia de un ácido (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, cloruro de amonio, ácido acético, y formiato amónico) a una temperatura de 0 °C a 150 °C.

La reacción 4 en el esquema de reacción 1 se conoce y se lleva a cabo usando un compuesto representado por la fórmula general (d) y usando un reactivo (por ejemplo, 1,1'-carbonyldiimidazol (CDI) y trifosgeno) en un disolvente orgánico (por ejemplo, tetrahidrofurano, dimetilformamida, y dimetilacetamida) en presencia o ausencia de una base (por ejemplo, trietilamina, N,N-diisopropiletilamina, piridina, 4-dimetilaminopiridina, y N-metilmorfolina) de una temperatura generada por enfriamiento en hielo a la temperatura de reflujo.

Las reacciones de desprotección para los grupos protectores en el esquema de reacción 1 se conocen y se pueden realizar mediante los métodos descritos a continuación. Algunos ejemplos aquí son (1) reacciones de desprotección basadas en hidrólisis alcalina, (2) reacciones de desprotección en condiciones ácidas, (3) reacciones de desprotección basadas en hidrogenólisis, (4) reacciones de desprotección para el grupo sililo, (5) reacciones de desprotección usando un metal, y (6) reacciones de desprotección usando un complejo metálico.

Estos métodos se describen específicamente continuación.

(1) La reacción de desprotección basada en hidrólisis alcalina se puede llevar a cabo, por ejemplo, en un disolvente orgánico (por ejemplo, metanol, tetrahidrofurano, y dioxano) de 0 °C a 40 °C usando un hidróxido de metal alcalino (por ejemplo, hidróxido sódico, hidróxido potásico, e hidróxido de litio), un hidróxido de metal alcalinotérreo (por ejemplo, hidróxido de bario e hidróxido de calcio), o un carbonato (por ejemplo, carbonato sódico y carbonato potásico), o una solución acuosa de los precedentes, o su mezcla.

(2) La reacción de desprotección en reacciones ácidas se puede llevar a cabo, por ejemplo, de 0 °C a 100 °C en presencia o ausencia de 2,2,2-trifluoroetanol, en un disolvente orgánico (por ejemplo, diclorometano, cloroformo, dioxano, acetato de etilo, metanol, alcohol isopropílico, tetrahidrofurano, y anisól) y en un ácido orgánico (por

ejemplo, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido metanosulfónico, y p-tosilato) o un ácido inorgánico (por ejemplo, ácido clorhídrico y ácido sulfúrico) o su mezcla (por ejemplo, bromuro de hidrógeno/ácido acético).

(3) La reacción de desprotección basada en hidrogenólisis se puede llevar a cabo, por ejemplo, de 0 °C a 200 °C en un disolvente (por ejemplo, un éter (por ejemplo, tetrahidrofurano, dioxano, dimetoxietano, y dietil éter), un alcohol (por ejemplo, metanol y etanol), un disolvente de benceno (por ejemplo, benceno y tolueno), una cetona (por ejemplo, acetona y metil etil cetona), un nitrilo (por ejemplo, acetonitrilo), una amida (por ejemplo, N,N-dimetilformamida), agua, acetato de etilo, ácido acético, o un disolvente mixto de dos o más de los precedentes) en presencia de un catalizador (por ejemplo, paladio-carbono, negro de paladio, hidróxido de paladio-carbono, óxido de platino, y níquel Raney) en una atmósfera de hidrógeno a presión normal o presión elevada o en presencia de formiato de amonio.

(4) La reacción de desprotección para el grupo siliilo se puede llevar a cabo, por ejemplo, de 0 °C a 40 °C en un disolvente orgánico miscible en agua (por ejemplo, tetrahidrofurano y acetonitrilo) usando fluoruro de tetrabutylamonio. También se puede llevar a cabo, por ejemplo, de -10 °C a 100 °C en un ácido orgánico (por ejemplo, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido metanosulfónico, y p-tosilato) o un ácido inorgánico (por ejemplo, ácido clorhídrico y ácido sulfúrico) o su mezcla (por ejemplo, bromuro de hidrógeno/ácido acético).

(5) La reacción de desprotección usando un metal se puede llevar a cabo, por ejemplo, de 0 °C a 40 °C en un disolvente ácido (por ejemplo, ácido acético, un tampón con un pH de 4,2 a 7,2, o una solución mixta de las soluciones precedentes con un disolvente orgánico tal como tetrahidrofurano) en presencia de polvo de cinc y según sea necesario mientras se aplican ultrasonidos.

(6) La reacción de desprotección usando un complejo metálico se puede llevar a cabo, por ejemplo, de 0 °C a 40 °C en un disolvente orgánico (por ejemplo, diclorometano, N,N-dimetilformamida, tetrahidrofurano, acetato de etilo, acetonitrilo, dioxano, y etanol), agua, o sus soluciones mixtas, usando un complejo metálico (por ejemplo, tetraakis(trifenilfosfina)paladio(0), dicloruro de bis(trifenilfosfina)paladio(II), acetato de paladio(II), y cloruro de tris(trifenilfosfina)rodio(I)) en presencia de un agente de captura (por ejemplo, hidruro de tributilestaño, trietilsilano, dimedona, morfolina, dietilamina, y pirrolidona), un ácido orgánico (por ejemplo, ácido acético, ácido fórmico, y ácido 2-etilhexanoico) y/o una sal de ácido orgánico (por ejemplo, 2-etilhexanoato sódico y 2-etilhexanoato potásico) y en presencia o ausencia de un reactivo de tipo fosfina (por ejemplo, trifenilfosfina).

Además de lo expuesto anteriormente, la reacción de desprotección también se puede llevar a cabo usando los métodos que se describen, por ejemplo, en T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley, Nueva York, 1999.

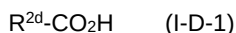
El grupo protector para un grupo amino se puede mostrar a modo de ejemplo mediante el grupo benciloxicarbonilo, el grupo t-butoxicarbonilo, el grupo aliloxicarbonilo (Alloc), el grupo 1-metil-1-(4-bifenil)etoxicarbonilo (Bpoc), el grupo trifluoroacetilo, el grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo, el grupo bencilo (Bn), el grupo p-metoxibencilo, el grupo benciloximetilo (BOM), y el grupo 2-(trimetilsilil)etoximetilo (SEM).

Además de lo expuesto anteriormente, el grupo protector para un grupo amino puede ser cualquier grupo capaz de una eliminación fácil y selectiva y no se limita particularmente de otro modo. Por ejemplo, se pueden usar los grupos descritos en T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley, Nueva York, 1999.

La reacción 5 en el esquema de reacción 1 se conoce y se lleva a cabo usando un compuesto con fórmula general (f) y un compuesto representado por la fórmula general (III-1) o la fórmula general (III-2) y realizando la reacción de la temperatura ambiente a 120 °C en un disolvente orgánico (por ejemplo, diclorometano y acetonitrilo) en presencia de una base (por ejemplo, piridina, trietilamina, y N,N-diisopropiletilamina), una sal de cobre (por ejemplo, acetato de cobre(II)), y un agente de secado (por ejemplo, tamices moleculares).

Los compuestos de la presente invención se pueden producir usando el compuesto representado por la fórmula general (I-A) y un compuesto representado por la fórmula general (I-D-1)

[C 22]



(R^{2d} en la fórmula es un grupo alquínico C₃) y llevando a cabo la reacción de 0 °C a la temperatura ambiente usando un agente de condensación (por ejemplo, 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC), 1-etil-3-[3-(dimetilamino)propil]carbodiimida (EDC), 1,1'-carbonildiimidazol (CDI), yoduro de 2-cloro-1-metilpiridinio, y anhídrido cíclico de ácido 1-propanofosfónico (PPA)) en un disolvente orgánico (por ejemplo, cloroformo, diclorometano, dimetilformamida, dimetilacetamida, dietil éter, y tetrahidrofurano), o sin disolvente, en presencia o ausencia de una base (por ejemplo, trietilamina, piridina, N,N-diisopropiletilamina, 4-dimetilaminopiridina, y N-metilmorfolina) y con o sin el uso de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt).

Los compuestos que se usan como materiales de partida en cada una de las reacciones de la presente Descripción, por ejemplo, de fórmula general (a), (II), (III-1), (III-2) y (I-D-1), se conocen o se pueden producir fácilmente mediante métodos conocidos.

Para cada una de las reacciones de la presente Descripción, las reacciones acompañadas por aplicación de calor se pueden llevar a cabo usando un baño de agua, un baño de aceite, un baño de arena, o microondas, como será evidente para el experto en la materia.

- 5 Se puede usar un reactivo de fase sólida, que comprende el reactivo soportado sobre un polímero de alto peso molecular (por ejemplo, poliestireno, poliácridamida, polipropileno, y polietilenglicol), según sea apropiado en las reacciones de la presente Descripción.

- 10 El producto de reacción en cada una de las reacciones de la presente Descripción se puede purificar mediante los medios de purificación habituales, por ejemplo, usando métodos tales como destilación a presión normal o a presión reducida, cromatografía líquida de alta resolución usando gel de sílice o silicato de magnesio, cromatografía en capa fina, resinas de intercambio iónico, resinas secuestradoras, cromatografía en columna, lavado y recristalización. La purificación se puede llevar a cabo en cada reacción o se puede llevar a cabo después de la finalización de varias reacciones.

15 [Toxicidad]

- 20 Los compuestos de la presente invención tienen una toxicidad aceptablemente baja, por ejemplo, casi no tienen actividad inhibitoria de CYP y casi no tienen hepatotoxicidad, y de ese modo se pueden usar de forma segura como ingrediente farmacéutico activo.

[Aplicaciones para compuestos farmacéuticos]

- 25 Los compuestos de la presente invención tienen una actividad inhibidora selectiva de Btk y como resultado son útiles como agentes para prevenir y/o tratar enfermedades relacionadas con Btk, es decir, enfermedades en las que participan linfocitos B y/o mastocitos, por ejemplo, enfermedades alérgicas, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, enfermedades tromboembólicas, cánceres, y enfermedades de injerto frente al hospedador. Los compuestos de la presente invención también ejercen una acción inhibidora selectiva en la activación de linfocitos B y como resultado también son eficaces como inhibidores de la activación de linfocitos B.

- 30 Las enfermedades alérgicas en la presente invención se puede mostrar a modo de ejemplo mediante alergias, anafilaxis, conjuntivitis alérgica, rinitis alérgica, y dermatitis alérgica.

- 35 Las enfermedades autoinmunes en la presente invención se pueden ejemplificar con enfermedad inflamatoria del intestino, artritis, lupus, artritis reumatoide, artritis psoriática, osteoartritis, enfermedad de Still, artritis juvenil, diabetes de tipo I, miastenia gravis, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis de Ord, enfermedad de Basedow, síndrome de Sjögren, esclerosis múltiple, síndrome de Guillain-Barré, encefalomiелitis diseminada aguda, enfermedad de Addison, síndrome de opsoclono-mioclono, espondilitis anquilosante, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, anemia aplásica, hepatitis autoinmune, enfermedad celíaca, síndrome de Goodpasture, púrpura trombocitopénica idiopática, neuritis óptica, esclerodermia, cirrosis biliar primaria, enfermedad de Reiter, arteritis de Takayasu, arteritis temporal, anemia hemolítica autoinmune cálida, granuloma de Wegener, psoriasis, alopecia universal, enfermedad de Behçet, síndrome de fatiga crónica, disautonomía, endometriosis, cistitis intersticial, miotonía, vulvodinia, y lupus sistémico eritematoso.

- 45 Las enfermedades inflamatorias en la presente invención se pueden ejemplificar con asma, apendicitis, blefaritis, bronquiolitis, bronquitis, bursitis, cervicitis, colangitis, colecistitis, colitis, conjuntivitis, cistitis, dacrioadenitis, dermatitis, dermatomiositis, encefalitis, endocarditis, endometritis, enteritis, epicondilitis, epididimitis, fascitis, fibrositis, gastritis, gastroenteritis, hepatitis, hidradenitis supurativa, laringitis, mastitis, meningitis, mielitis, miocarditis, miositis, nefritis, ooforitis, orquitis, osteítis, pancreatitis, parotiditis, pericarditis, peritonitis, faringitis, pleuritis, flebitis, neumonía, proctitis, prostatitis, pielonefritis, rinitis, salpingitis, sinusitis, estomatitis, sinovitis, tendinitis, amigdalitis, uveítis, vaginitis, vasculitis y vulvitis.

- 50 Las enfermedades tromboembólicas en la presente invención se pueden ejemplificar con infarto de miocardio, angina de pecho, reoclusión después de angioplastia, reestenosis después de angioplastia, reoclusión después de revascularización aortocoronaria, reestenosis después de revascularización aortocoronaria, apoplejía, isquemia transitoria, trastornos oclusivos de arterias periféricas, embolia pulmonar y trombosis venosa profunda.

- 60 En la presente invención, los cánceres incluyen linfomas no Hodgkin, entre los que son particularmente adecuados los linfomas no Hodgkin de linfocitos B, por ejemplo, linfoma de Burkitt, linfoma relacionado con SIDA, linfoma de linfocitos B de zona marginal (linfoma de linfocitos B de zona marginal nodal, linfoma de linfocitos B de zona marginal extranodal y linfoma de linfocitos B de zona marginal esplénica), linfoma de linfocitos B grandes y difusos, linfoma de efusión primaria, granulomatosis linfomatoide, linfoma folicular, leucemia linfocítica crónica de linfocitos B, leucemia prolinfocítica de linfocitos B, leucemia linfoplasmocítica/macroglobulinemia de Waldenstrom, plasmocitoma, linfoma de células del manto, linfoma de linfocitos B grandes mediastínico, linfoma de linfocitos B grandes intravascular, y leucemia de células peludas. Además del linfoma no Hodgkin, los cánceres en la presente invención incluyen tumores endocrinos pancreáticos, por ejemplo, insulinoma, gastrinoma, glucagonoma, somatostatina, y

VIPoma, PPoma, y GRFoma.

Un compuesto de la presente invención se puede administrar por sí mismo o se puede administrar como una preparación combinada en combinación con otro fármaco con el fin de

5

- 1) suplementar y/o aumentar el efecto profiláctico y/o terapéutico del compuesto,
- 2) mejorar la farmacocinética y la absorción y reducir la dosis del compuesto, y/o
- 3) reducir las reacciones adversas del compuesto.

10 La preparación combinada de un compuesto de la presente invención con otro fármaco se pueden administrar en forma de un agente combinado en el que ambos componentes se combinan en una única formulación o se pueden administrar como formulaciones separadas. La administración como formulaciones separadas incluye administración simultánea y administración en momentos diferentes. En el caso de administración en momentos diferentes, el compuesto de la presente invención se puede administrar primero seguido por la administración del otro fármaco, o
15 el otro fármaco se puede administrar en primer lugar seguido por la administración del compuesto de la presente invención. El mismo método de administración se puede usar para cada método o se pueden usar diferentes métodos de administración.

20 No hay limitación en particular sobre las enfermedades que se pueden someter a la prevención y/o el tratamiento con la preparación combinada mencionada anteriormente, y esta preparación combinada se puede usar con cualquier enfermedad con la que el efecto de prevención y/o tratamiento del compuesto de la presente invención se suplemente y/o mejore.

25 Este otro fármaco para suplementar y/o potenciar el efecto profiláctico y/o terapéutico de los compuestos de la presente invención frente a enfermedades alérgicas se puede ejemplificar con antihistamínicos, antagonistas de leucotrienos, fármacos antialérgicos, antagonistas del receptor de tromboxano A₂, inhibidores de la tromboxano sintasa y esteroides.

30 El otro fármaco para suplementar y/o potenciar el efecto profiláctico y/o terapéutico de los compuestos de la presente invención frente a enfermedades autoinmunes se puede ejemplificar con inmunosupresores; esteroides; fármacos antirreumáticos modificado desde la enfermedad; inhibidores de elastasa; agonistas de receptores de cannabinoide-2; prostaglandinas; inhibidores de la prostaglandina sintasa; inhibidores de fosfodiesterasa; inhibidores de metaloproteasas; inhibidores de moléculas de adhesión; agentes de proteínas anti-citoquina, tales como agentes anti-TNF- α , agentes anti-IL-1, y agentes anti-IL-6; inhibidores de citoquinas; antiinflamatorios no esteroideos; y anticuerpos anti-CD20.
35

40 El otro fármaco para suplementar y/o potenciar el efecto profiláctico y/o terapéutico de los compuestos de la presente invención frente a enfermedades inflamatorias se puede ejemplificar con esteroides, inhibidores de elastasa, agonistas receptores de cannabinoide-2, prostaglandinas, inhibidores de la prostaglandina sintasa, inhibidores de fosfodiesterasa, inhibidores de metaloproteasas, inhibidores de moléculas de adhesión, antileucotrienos, agentes anticolinérgicos, antagonistas del receptor de tromboxano A₂, inhibidores de la tromboxano sintasa, derivados de xantina, agentes expectorantes, antibacterianos, antihistamínicos, agentes de proteína anti-citoquina, inhibidores de citoquina, agentes de forskolina, inhibidores de liberación de mediadores, y antiinflamatorios no esteroideos.
45

El otro fármaco para suplementar y/o potenciar el efecto profiláctico y/o terapéutico de los compuestos de la presente invención frente a enfermedades tromboembólicas se puede ejemplificar con agentes trombolíticos, heparina, heparinoides, heparinas de bajo peso molecular, warfarina, inhibidores de trombina, inhibidores del factor Xa, antagonistas del receptor de ADP, e inhibidores de ciclooxygenasa.
50

El otro fármaco para suplementar y/o potenciar el efecto profiláctico y/o terapéutico de los compuestos de la presente invención frente a linfomas no Hodgkin se puede ejemplificar con agentes de alquilación, antimetabolitos, antibióticos anticáncer, alcaloides vegetales, hormonas, compuestos de platino, anticuerpos anti-CD20, y otros agentes anticáncer.
55

Los antihistamínicos se pueden ejemplificar con clorhidrato de azelastina, ebastina, clorhidrato de epinastina, fumarato de emedastina, auranofina, oxatomida, clorhidrato de olopatadina, maleato de dl-clorfeniramina, fumarato de clemastina, fumarato de ketotifeno, cimetidina, dimenhidrinato, clorhidrato de difenhidramina, clorhidrato de ciproheptadina, clorhidrato de cetirizina, desloratadina, terfenadina, famotidina, clorhidrato de fexofenadina, bepotastina, besilato de bepotastina, mizolastina, mequitazina, furoato de mometasona, ranitidina, clorhidrato de ranitidina, loratadina, clorhidrato de prometazina y clorhidrato de homoclorciclina.
60

Los antagonistas de leucotrieno se pueden ejemplificar con hidrato de pranlukast, montelukast sódico, zafirlukast, ablukast, pobilukast, sulukast, iralukast sódico, verlukast, ritolukast, cinalukast, pirodomast, tomelukast, y doqualast.
65

- Los fármacos antialérgicos se pueden ejemplificar con amlexanox, clorhidrato de azelastina, israpafant, ibudilast, imitrodast sódico, ebastina, clorhidrato de epinastina, fumarato de emedastina, oxatomida, clorhidrato de ozagrel, clorhidrato de olopatadina, ácido cromoglicólico, cromoglicato sódico, fumarato de ketotifeno, seratrodest, clorhidrato de cetirizina, tosilato de suplastast, tazanolest, terfenadina, hidrato de domitrobán y calcio, tranilast, nedocromilo, fexofenadina, clorhidrato de fexofenadina, pemirolast potásico, mequitazina, ramatrobán, repirinast, y loratadina.
- Los antagonistas de receptor de tromboxano A2 se pueden ejemplificar con seratrodest, hidrato de domitrobán y calcio, y ramatrobán.
- Los inhibidores de la tromboxano sintasa se pueden ejemplificar con imitrodast sódico y clorhidrato de ozagrel.
- Los esteroides se pueden ejemplificar con amcinonida, succinato de hidrocortisona y sodio, succinato de prednisolona y sodio, succinato de metilprednisolona y sodio, ciclesonida, difluprednato, propionato de betametasona, dexametasona, deflazacort, triamcinolona, acetónido de triamcinolona, halcinonida, palmitato de dexametasona, hidrocortisona, pivalato de flumetasona, butilacetato prednisolona, budesonida, sulfato de prasterona, furoato de mometasona, fluocinonida, acetónido de fluocinolona, fludroxicortida, flunisolida, prednisolona, propionato de alclometasona, propionato de clobetasol, propionato de dexametasona, propionato de depredona, propionato de fluticasona, propionato de beclometasona, betametasona, metilprednisolona, suleptanato de metilprednisolona, succinato de metilprednisolona y sodio, fosfato de dexametasona y sodio, fosfato de hidrocortisona y sodio, fosfato de prednisolona y sodio, valerato de diflucortolona, valerato de dexametasona, valerato de betametasona, valerato acetato de prednisolona, acetato de cortisona, acetato de diflorasona, acetato de dexametasona, acetato de triamcinolona, acetato de parametasona, acetato de halopredona, acetato de fludrocortisona, acetato de prednisolona, acetato de metilprednisolona, butirato de clobetasona, butirato de hidrocortisona, butirato propionato de hidrocortisona, butirato propionato de betametasona.
- Los agentes inmunosupresores se pueden ejemplificar con azatioprina, ascomicina, everolimus, salazosulfapiridina, ciclosporina, ciclofosfamida, sirolimus, tacrolimus, bucillamina, metotrexato, y leflunomida.
- Los fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad se pueden ejemplificar con D-penicilamina, actarit, auranofina, salazosulfapiridina, hidroxycloquina, bucillamina, metotrexato, leflunomida, lobenzarit sódico, aurotioglucosa, y aurotiomalato sódico.
- Los inhibidores de elastasa se pueden ejemplificar con ONO-5046, ONO-6818, MR-889, PBI-1101, EPI-HNE-4, R-665, ZD-0892, ZD-8321, GW-311616, DMP-777, L-659286, L-680833, L-683845, y AE-3763.
- Los prostaglandinas (abreviadas en lo sucesivo como "PG") se pueden ejemplificar con fármacos de PGE1 (ejemplos: alprostadilo alfadex, alprostadilo), fármacos de PGI2 (ejemplo: beraprost sódico), agonistas de receptor de PG, y antagonistas de receptor de PG. El receptor de PG receptor se puede ejemplificar con receptores de PGE (EP1, EP2, EP3, y EP4), receptores de PGD (DP, CRTH2), receptores de PGF (FP), receptores de PGI2 (IP), y receptores de TX (TP).
- Los inhibidores de la prostaglandina sintasa se pueden ejemplificar con salazosulfapiridina, mesalazina, olsalazina, ácido 4-aminosalicílico, JTE-522, auranofina, carprofeno, difenpiramida, flunoxaprofeno, flurbiprofeno, indometacina, ketoprofeno, lornoxicam, loxoprofeno, meloxicam, oxaprozina, parsalmida, piroxeno, piroxicam, cinamato de piroxicam, zaltoprofeno, y pranoprofeno.
- Los inhibidores de la fosfodiesterasa se pueden ejemplificar con rolipram, cilomilast, Bayl9-8004, NIK-616, roflumilast (A-217), cipamfilina (BRL-61063), atizoram (CP-80633), ONO-6126, SCH-351591, YM-976, V-11294A, PD-168787, D-4396, e IC-485.
- Los inhibidores de molécula de adhesión se pueden ejemplificar con antagonista de $\alpha 4$ integrina.
- Los agentes anti-TNF- α se pueden ejemplificar con anticuerpos anti-TNF- α , receptor de TNF- α soluble, anticuerpos de receptor anti-TNF- α , y proteína de unión a TNF- α soluble y en particular por infliximab y etanercept.
- Los agentes anti-IL-1 se pueden ejemplificar con anticuerpos anti-IL-1, receptor soluble de IL-1, anticuerpos anti-IL-1Ra y/o anticuerpos anti-receptor de IL-1 y en particular con anakinra.
- Los agentes anti-IL-6 se pueden ejemplificar con anticuerpos anti-IL-6, receptor soluble de IL-6, anticuerpos anti-receptor de IL-6 y en particular con tocilizumab.
- Los inhibidores de citoquina se pueden ejemplificar con tosilato de suplastast, T-614, RS-31747, y sonatimod.
- Los agentes anticolinérgicos se pueden ejemplificar con trihexifenidilo, clorhidrato de trihexifenidilo, clorhidrato de biperideno, y clorhidrato de biperideno.

- Los derivados de xantina se pueden ejemplificar con aminofilina, teofilina, doxofilina, sipamfilina, y diprofilina.
- Los expectorantes se pueden ejemplificar con disolventes de amoniaco foeniculado, bicarbonato sódico, clorhidrato de bromhexina, carbocisteína, clorhidrato de ambroxol, clorhidrato de metilcisteína, acetilcisteína, clorhidrato de etil L-cisteína, y tiloxapol.
- Los antibacterianos se pueden ejemplificar con cefuroxima sódica, trihidrato de meropenem, sulfato de netilmicina, sulfato de sisomicina, ceftibuteno, PA-1806, IB-367, tobramicina, PA-1420, doxorubicina, sulfato de astromicina, y clorhidrato de cefetamet pivoxilo.
- Los inhibidores de liberación de mediador se pueden ejemplificar con tranilast, cromoglicato sódico, amlexanox, repirinast, ibudilast, dazanolast, y pemirolast potásico.
- Los agentes trombolíticos se pueden ejemplificar con alteplasa, uroquinasa, tisoquinasa, nasaruplasa, nateplasa, t-PA, pamiteplasa, monteplasa, prouroquinasa, y estreptoquinasa.
- Los heparinoides se pueden ejemplificar con fondaparinux.
- Las heparinas de bajo peso molecular se pueden ejemplificar con danaparoid sódico, enoxaparina (sódica), nadroparina cálcica, bemiparina (sódica), reviparina (sódica), y tinzaparina (sódica).
- El inhibidor de trombina se puede ejemplificar con argatrobán, ximelagatrán, melagatrán, dabigatrán, bivalirudina, lepirudina, hirudina, y desirudina.
- Los antagonistas del receptor de ADP se pueden ejemplificar con clorhidrato de ticlopidina y sulfato de clopidogrel.
- Los inhibidores de ciclooxygenasa se pueden ejemplificar con aspirina.
- Los agentes de alquilación se pueden ejemplificar con clorhidrato de N-óxido de mostaza de nitrógeno, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán, tiotepa, carbocuna, busulfán, clorhidrato de nimustina, dacarbazina, y ranimustina.
- Los antimetabolitos se pueden ejemplificar con metotrexato, mercaptopurina, ribósido de 6-mercaptopurina, fluorouracilo, tegafur, tegafur uracilo, carmofur, doxiluridina, citarabina, enocitabina, tegafur gimestat otastat potásico, clorhidrato de gemcitabina, ocfosfato de citarabina, clorhidrato de procarbazona, e hidroxycarbamida.
- Los antibióticos anticáncer se pueden ejemplificar con actinomicina D, mitomicina C, clorhidrato de daunorrubicina, clorhidrato de doxorubicina, clorhidrato de aclarrubicina, neocarzinostatina, clorhidrato de pirarubicina, epirubicina (clorhidrato), clorhidrato de idarrubicina, cromomicina A3, bleomicina (clorhidrato), sulfato de peplomycin, terarubicina, y estimalámero de zinostatina.
- Los alcaloides vegetales se pueden ejemplificar con sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina, sulfato de vindesina, clorhidrato de irinotecán, etopósido, flutamida, tartrato de vinorelbina, hidrato de docetaxel, y paclitaxel.
- Los hormonas se pueden ejemplificar con estramustina fosfato sódico, mepitiostano, epitioestanol, acetato de goserelina, fosfestrol (fosfato de dietilestilbestrol), citrato de tamoxifeno, citrato de toremifeno, hidrato de clorhidrato de fadrozol, acetato de medroxiprogesterona, bicalutamida, acetato de leuprorelina, anastrozol, y exemestano.
- Los compuestos de platino se pueden ejemplificar con carboplatino, cisplatino, y nedaplatino.
- Los anticuerpos anti-CD-20 se pueden ejemplificar con rituximab, ibritumomab, y ocrelizumab.
- Los otros agentes anticáncer se pueden ejemplificar con L-asparaginasa, acetato de octeotido, porfímero sódico, y acetato de mitoxantrona.
- Los preparaciones combinadas que comprende una combinación con un compuesto de la presente invención no solamente incluye las preparaciones combinadas descubiertas hasta la fecha, sino que también incluye preparaciones combinadas que se puedan descubrir en el futuro.
- Los compuestos de la presente invención se administran por lo general por vía sistémica o por vía local como un componente farmacéuticamente eficaz es una forma oral o parenteral. Las formulaciones orales se pueden ejemplificar con líquidos para administración oral (por ejemplo, elixires, jarabes, formulaciones con base de agua farmacéuticamente aceptables, suspensiones, y emulsiones) y sólidos para administración oral (por ejemplo, comprimidos (incluyendo comprimidos sublinguales y comprimidos de desintegración por vía oral), píldoras, cápsulas (incluyendo cápsulas duras, cápsulas blandas, cápsulas de gelatina, y microcápsulas), polvos, gránulos, y pastillas para chupar). Las formulaciones parenterales se pueden ejemplificar con soluciones (por ejemplo, inyectables (por

- ejemplo, inyectables subcutáneos, inyectables intravenosos, inyectables intramusculares, inyectables por vía intraperitoneal, y formulaciones de goteo), gotas oftálmicas (por ejemplo, gotas oftálmicas acuosas (por ejemplo, gotas oftálmicas acuosas, suspensiones de gotas oftálmicas acuosas, gotas oftálmicas viscosas, y gotas oftálmicas solubilizadas) y gotas oculares no acuosas (por ejemplo, gotas oculares no acuosas y suspensiones de gotas oftálmicas no acuosas)), agentes tópicos (por ejemplo, pomadas (por ejemplo, ungüentos oftálmicos)), y gotas para los oídos). Estas formulaciones pueden ser formulaciones de liberación controlada tales como formulaciones de liberación rápida y formulaciones de liberación sostenida. Estas formulaciones se pueden producir con métodos conocidos, por ejemplo, con los métodos que se describen en la farmacopea japonesa.
- 10 Los líquidos para administración oral dentro del ámbito de formulaciones orales se pueden producir, por ejemplo, por disolución, suspensión, o emulsión del componente eficaz en un diluyente de uso común (por ejemplo, agua purificada, etanol, o una mezcla de los mismos). Estas formulaciones líquidas también pueden contener, por ejemplo, un agente humectante, agente de suspensión, agente emulgente, edulcorante, aromatizante, fragancia, conservante y tampón.
- 15 Los sólidos para administración oral dentro del ámbito de formulaciones orales se pueden preparar mezclando el componente eficaz, por ejemplo, con un vehículo (por ejemplo, lactosa, manitol, glucosa, celulosa microcristalina, y almidón), un aglutinante (por ejemplo, hidroxipropil celulosa, polivinilpirrolidona, y metasilicato aluminato de magnesio), un agente disgregante (por ejemplo, glicolato de celulosa y calcio), un lubricante (por ejemplo, estearato de magnesio), un estabilizante, un adyuvante de disolución (por ejemplo, ácido glutámico y ácido aspártico), y se pueden formular de acuerdo con métodos convencionales. Si fuera necesario, se puede realizar un revestimiento con un agente de revestimiento (por ejemplo, azúcar, gelatina, hidroxipropil celulosa, y ftalato de hidroxipropil metil celulosa) y se pueden aplicar dos o más capas.
- 20 Dentro del ámbito de las formulaciones parenterales, un agente tópico se puede producir usando un método conocido o una formulación de uso común. Por ejemplo, una pomada se puede preparar mediante la incorporación o fusión del componente eficaz en una base. La base de pomada se selecciona entre bases de pomada conocidas o una base de pomada de uso común. Por ejemplo, se puede usar una selección individual a partir de lo que sigue a continuación o una mezcla de dos o más selecciones a partir de lo que sigue a continuación: ácidos grasos superiores y ésteres de ácidos grasos superiores (por ejemplo, ácido adípico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ésteres de adipato, ésteres de miristato, ésteres de palmitato, ésteres de estearato, y ésteres de oleato), ceras (por ejemplo, cera de abejas, esperma de ballena, y ceresina), tensioactivos (por ejemplo, ésteres de fosfato de polioxietilén alquil éter), alcoholes superiores (por ejemplo, cetanol, alcohol estearílico, y alcohol cetosteárico), aceites de silicona (por ejemplo, dimetilpolisiloxano), hidrocarburos (por ejemplo, vaselina hidrófila, vaselina blanca, lanolina purificada, y parafina líquida), glicoles (por ejemplo, etilenglicol, dietilenglicol, propilenglicol, polietilenglicol, y macrogol), aceites vegetales (por ejemplo, aceites de ricino, aceite de oliva, aceite de sésamo, y aceite trementina), aceites animales (por ejemplo, aceite de visón, aceite de yema de huevo, escualeno, y escualeno), agua, promotores de absorción, y agentes antiirritantes. También se puede incorporar un agente humectante, conservante, estabilizante, antioxidante y fragancia.
- 30 Los agentes inyectables dentro del ámbito de las formulaciones parenterales incluyen soluciones, suspensiones, y emulsiones así como agentes inyectables sólidos usados por disolución o suspensión en un disolvente en el momento de su uso. Por ejemplo, se puede usar un agente inyectable en el que el componente eficaz se disuelve, suspende, o emulsiona en un disolvente. Por ejemplo, para el disolvente se puede usar agua destilada para inyección, solución salina fisiológica, un aceite vegetal, propilenglicol, polietilenglicol, un alcohol tal como etanol, o una combinación de los agentes mencionados anteriormente. El agente inyectable también puede contener un estabilizante, un adyuvante de disolución (por ejemplo, ácido glutámico, ácido aspártico, y Polisorbato 80 (marca registrada)), un agente de suspensión, un agente emulgente, un agente calmante, un tampón y un conservante. El agente inyectable se puede esterilizar en la etapa final o se puede fabricar usando procesamiento aséptico. El agente inyectable también se puede fabricar como una forma sólida estéril, por ejemplo, un producto liofilizado, y se puede usar después de la disolución en agua destilada para inyección o en otro disolvente, que es estéril o se esteriliza antes de su uso.
- 40 La dosis cuando se usa un compuesto de la presente invención como un componente eficaz en un fármaco se puede seleccionar según sea apropiado dependiendo, por ejemplo, de los síntomas, edad y tipo de formulación. En el caso de una formulación oral, preferentemente de 1 mg a 100 mg y más preferentemente de 5 mg a 30 mg se pueden administrar de una a varias veces al día (por ejemplo, de una a tres veces). En el caso de las gotas oftálmicas, se pueden infundir de una a varias gotas por administración de una solución oftálmica con una concentración preferentemente de un 0,000001 % a un 5 % (p/v) y más preferentemente de un 0,00001 % a un 0,05 % (p/v) de una a varias veces al día (por ejemplo, de una a ocho veces). En el caso de una pomada oftálmica, una pomada oftálmica con una concentración preferentemente de un 0,000001 % a un 5 % (p/p) y más preferentemente de un 0,00001 % a un 0,05 % (p/p) se puede aplicar de una a varias veces al día (por ejemplo, de una a cuatro veces).
- 50 Por supuesto, como se ha indicado anteriormente, la dosis dependerá de diversas condiciones y como resultado se producirán casos en los que será suficiente una cantidad inferior a la de los niveles de dosificación mencionados
- 65

anteriormente o en los que estos intervalos se deben superar.

Ejemplos

- 5 La presente invención se describe a continuación usando ejemplos, pero la presente invención no se limita mediante estos ejemplos.

Los disolventes que se dan entre paréntesis para TLC y en las secciones de separación cromatográfica indican los disolventes de elución o los disolventes de revelado usados, y las proporciones son relaciones en volumen.

- 10 A menos que se indique específicamente otra cosa, los datos de RMN son datos para RMN ¹H.

El disolvente que se usa en la medición se da entre paréntesis en la sección de RMN.

- 15 Los nombres de los compuestos que se usan en la presente Descripción son generalmente nombres generados basándose en las reglas de nomenclatura de la IUPAC o generados usando ACD/Name (marca registrada), un programa de ordenador de Advanced Chemistry Development, Inc., que lleva a cabo la nomenclatura basándose en las reglas de la IUPAC.

20 Ejemplo 1 (referencia)

N,N-dibencil-6-cloro-5-nitropirimidina-4-amina

- 25 Se añadió gota a gota dibencilamina (10,2 g) en una solución de diclorometano (30 ml) en un baño de hielo a una solución en diclorometano (70 ml) de 4,6-dicloro-5-nitropirimidina (10 g). Esto fue seguido de la adición de trietilamina (14,4 ml) y agitación durante 1 hora. A continuación, se añadió agua a la mezcla de reacción y la fase orgánica se lavó posteriormente con una solución acuosa saturada de cloruro sódico y se secó sobre sulfato sódico anhidro. El disolvente se concentró a presión reducida para obtener el compuesto del título (19,2 g) que tenía los valores de propiedades físicas indicados a continuación. TLC: R_f 0,50 (hexano : acetato de etilo = 7 : 1).

30 Ejemplo 2 (referencia)

3-[[6-(dibencilamino)-5-nitropirimidin-4-il]amino]azetidina-1-carboxilato de terc-butilo

- 35 El compuesto (10,3 g) preparado en el Ejemplo 1 y 3-aminoazetidina-1-carboxilato de terc-butilo (5,0 g) se disolvieron en dioxano (58 ml); se añadió trietilamina (8,1 ml); y a continuación se llevó cabo una agitación durante 5 horas a 50 °C. La mezcla de reacción se devolvió a temperatura ambiente; a continuación se retiró el disolvente por destilación; se añadió agua; y se llevó a cabo una extracción con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de cloruro sódico y se secó posteriormente sobre sulfato sódico anhidro y a continuación se retiró el disolvente por destilación. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice para obtener el compuesto del título (10,8 g) que tenía los valores de propiedades físicas indicados a continuación. TLC: R_f 0,40 (hexano : acetato de etilo = 4 : 1).

45 Ejemplo 3 (referencia)

3-[[5-amino-6-(dibencilamino)pirimidin-4-il]amino]azetidina-1-carboxilato de terc-butilo

- 50 Una solución de acetato de etilo (360 ml) del compuesto (17,5 g) preparado en el Ejemplo 2 se añadió gota a gota a una mezcla de cinc (23,3 g) y una solución acuosa 3,0 M de cloruro de amonio (11,4 g) en un baño de hielo y la temperatura se aumentó inmediatamente a la temperatura ambiente. Después de agitar durante 2 horas, la mezcla de reacción se filtró sobre Celite (nombre comercial) y a continuación se retiró el disolvente por destilación. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice para obtener el compuesto del título (12,4 g) que tenía los valores de propiedades físicas indicados a continuación. TLC: R_f 0,69 (hexano : acetato de etilo = 1 : 1).

55 Ejemplo 4 (referencia)

3-[6-(dibencilamino)-8-oxo-7,8-dihidro-9H-purin-9-il]azetidina-1-carboxilato de terc-butilo

- 60 El compuesto (8,4 g) preparado en el Ejemplo 3 y 1,1'-carbonildiimidazol (5,9 g) se disolvieron en tetrahidrofurano (120 ml) seguido de agitación durante 15 horas a 60 °C. Después de que el disolvente se hubiera destilado de la mezcla de reacción, se añadió agua y se llevó a cabo una extracción con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de cloruro sódico y se secó sobre sulfato sódico anhidro y a continuación se retiró el disolvente por destilación. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice para obtener el compuesto del título (7,8 g) que tenía los valores de propiedades físicas indicados a continuación. TLC: R_f 0,28 (hexano : acetato de etilo = 2 : 1).

65

Ejemplo 5 (referencia)

3-(6-amino-8-oxo-7,8-dihidro-9H-purin-9-il)azetidina-1-carboxilato de terc-butilo

El compuesto (7,8 g) preparado en el Ejemplo 4 se disolvió en metanol (240 ml) y acetato de etilo (50 ml); se añadió catalizador de Pearlman al 20 % (Pd(OH)₂/C) (8,0 g, 100 % en peso); se llevó a cabo un reemplazo con hidrógeno; y se llevó a cabo una agitación durante 7,5 horas a 60 °C. La mezcla de reacción se filtró sobre Celite (nombre comercial) y el disolvente se retiró por destilación para obtener el compuesto del título (5,0 g) que tenía los valores de propiedades físicas indicados a continuación. TLC: Rf 0,50 (acetato de etilo).

Ejemplo 6 (referencia)

3-[6-amino-8-oxo-7-(4-fenoxifenil)-7,8-dihidro-9H-purin-9-il]azetidina-1-carboxilato de terc-butilo

Se añadieron ácido p-fenoxifenilbórico (2,1 g), acetato de cobre(II) (1,48 g), tamiz molecular de 4A (2,5 g), y piridina (0,82 ml) a temperatura ambiente a una suspensión en diclorometano (200 ml) del compuesto (2,5 g) preparado en el Ejemplo 5, seguido de agitación durante 21 horas. La solución de reacción se filtró sobre Celite (nombre comercial) y el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice para obtener el compuesto del título (1,3 g) que tenía los valores de propiedades físicas indicados a continuación. TLC: Rf 0,18 (hexano : acetato de etilo = 1 : 1).

Ejemplo 7 (referencia)

Diclorhidrato de 6-amino-9-azetidin-3-il-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona

Se añadió ácido clorhídrico/dioxano 4 N (13 ml) a temperatura ambiente a una suspensión en metanol (13 ml) del compuesto (1,3 g, 2,76 mmol, 1,0 equivalente) preparado en el Ejemplo 6 y se llevó a cabo una agitación durante 1 hora. A continuación se retiró el disolvente por destilación para obtener el compuesto del título (1,5 g) que tenía los valores de propiedades físicas indicados a continuación. TLC: Rf 0,50 (diclorometano : metanol : amoníaco acuoso al 28 % = 9 : 1 : 0,1).

Ejemplo 9 (referencia)

(3R)-3-[[6-(dibencilamino)-5-nitropirimidin-4-il]amino]piperidina-1-carboxilato de terc-butilo

El compuesto del título (1,44 g) que tenía los valores de propiedades físicas que se dan a continuación se obtuvo siguiendo la misma plantilla de proceso que en el Ejemplo 2 usando el compuesto (1,5 g) producido en el Ejemplo 1 y usando (3R)-3-aminopiperidina-1-carboxilato de terc-butilo (0,85 g) en lugar de 3-aminoazetidina-1-carboxilato de terc-butilo. TLC: Rf 0,23 (hexano : acetato de etilo = 9 : 1).

Ejemplo 10 (referencia)

Diclorhidrato de 6-amino-7-(4-fenoxifenil)-9-[(3R)-piperidin-3-il]-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona

El compuesto del título (155 mg) que tenía los valores de propiedades físicas que se dan a continuación se obtuvo siguiendo la misma plantilla de proceso que en el Ejemplo 3 → Ejemplo 4 → Ejemplo 5 → Ejemplo 6 → Ejemplo 7, usando el compuesto producido en el Ejemplo 9 y usando ácido p-fenoxifenilbórico (154 mg). TLC: Rf 0,68 (metanol : diclorometano : amoníaco acuoso = 80 : 20 : 4).

Ejemplo 17 (referencia)

4-([6-(dibencilamino)-5-nitropirimidin-4-il]amino)metilpiperidina-1-carboxilato de terc-butilo

El compuesto del título (68,3 g) que tenía los valores de propiedades físicas indicados a continuación se obtuvo siguiendo la misma plantilla de proceso que en el Ejemplo 2, usando el compuesto (45,5 g) producido en el Ejemplo 1 y usando 4-(aminometil)piperidina-1-carboxilato de terc-butilo (27,5 g) en lugar de 3-aminoazetidina-1-carboxilato de terc-butilo. TLC: Rf 0,56 (hexano : acetato de etilo = 2 : 1).

Ejemplo 18 (referencia)

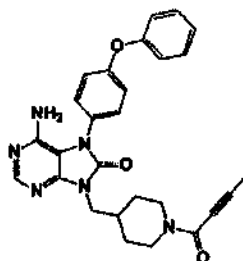
Diclorhidrato de 6-amino-7-(4-fenoxifenil)-9-(piperidin-4-ilmetil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona

El compuesto del título (1,66 g) que tenía los valores de propiedades físicas indicados a continuación se obtuvo siguiendo la misma plantilla de proceso que en el Ejemplo 10, usando el compuesto producido en el Ejemplo 17 y usando ácido p-fenoxifenilbórico (19 g). TLC: Rf 0,10 (acetato de etilo : metanol : trietilamina = 18 : 2 : 1).

Ejemplo 19 (referencia)

6-amino-9-[[1-(2-butinoil)-4-piperidinil]metil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona

[C 31]



5

Se añadieron ácido 2-butinoico (34 mg), clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) (78 mg), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (62 mg), y trietilamina (114 µl) a una solución en dimetilformamida (3 ml) del compuesto (100 mg) preparado en el Ejemplo 18, seguido de agitación durante 3 horas a temperatura ambiente. Se añadió agua a la mezcla de reacción y se llevó a cabo una extracción con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico y con una solución acuosa saturada de cloruro sódico y a continuación se secó sobre sulfato sódico anhidro y el disolvente se retiró por destilación. El residuo se purificó por cromatografía en capa fina (diclorometano : metanol : amoníaco acuoso al 28 % = 90 : 10 : 1) para obtener el compuesto del título (75 mg) que tenía los valores de propiedades físicas que se indican a continuación.

10

15

TLC: R_f 0,43 (acetato de etilo : metanol = 19 : 1); RMN ¹H (CDCl₃) : δ 1,21-1,45, 1,71-1,83, 1,99, 2,18-2,36, 2,59-2,72, 2,99-3,94, 4,34-4,61, 7,05-7,24, 7,36-7,43, 8,24.

Ejemplo 19(2)

20

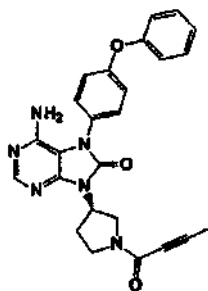
El compuesto a modo de ejemplo que se da a continuación se obtuvo siguiendo la misma plantilla de proceso que en el Ejemplo 9 → Ejemplo 10 → Ejemplo 19, usando el compuesto preparado en el Ejemplo 1, usando el correspondiente derivado de amina de (3R)-3-aminopiperidina-1-carboxilato de terc-butilo, y usando ácido p-fenoxifenilbórico.

25

Ejemplo 19(2)

6-amino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona

[C 32]



30

TLC: R_f 0,68 (acetato de etilo : metanol = 9 : 1);
RMN ¹H (CDCl₃): δ 1,94-2,03, 2,23-2,39, 2,80-3,01, 3,50-3,63, 3,67-3,80, 3,86-4,02, 4,03-4,18, 4,23-4,33, 4,42-4,51, 5,11-5,25, 7,04-7,23, 7,34-7,45, 8,20-8,23.

35

[Ejemplos experimentales farmacológicos] Ejemplo Biológico 1

Medición (ensayos *in vitro*) de la actividad inhibidora de Btk y la selectividad para Btk

40

La actividad inhibidora de la enzima Btk se midió, basándose en el protocolo proporcionado por el fabricante, usando Btk (Invitrogen Corporation) y el Ensayo de Quinasa Z'-LYTE™ de péptido Kit-Tyr1 (Invitrogen Corporation), que contenía los siguientes reactivos: péptido Tyr-1, fosfopéptido Thy-1, tampón de quinasa 5x, ATP, reactivo revelado B, tampón revelado, y reactivo de parada.

- Se dispensaron 5 µl/pocillo de una solución del compuesto de ensayo diluida con dimetilsulfóxido (DMSO), o DMSO, y 10 µl/pocillo de la solución de mezcla de sustrato/enzima a una placa de ensayo de 96 pocillos y se llevó a cabo una reacción durante 20 minutos a 30 °C. La solución de mezcla de sustrato/enzima se preparó por dilución con el tampón de quinasa (DL-ditiotreitol (DTT, 2,7 mM), tampón de quinasa 1,33x) para proporcionar una concentración final para el péptido Tyr-1 de 4 µM y una concentración final de Btk de 5 nM. A continuación se añadieron 5 µl/pocillo del trifosfato de adenosina (ATP, concentración final = 36 µM) y se llevó a cabo la reacción durante 1 hora a 30 °C. Después de la finalización de la reacción, se añadieron 10 µl de una solución de revelado, proporcionada por dilución del reactivo de revelado B hasta 128x usando tampón de revelado, y se llevó a cabo una reacción durante un período adicional de 1 hora a 30 °C. La reacción enzimática se detuvo a continuación por adición de 10 µl de la solución de parada. Se midió la intensidad de fluorescencia a 445 nm y 520 nm en cada pocillo usando un lector de fluorescencia en placa Fusion Universal Microplate Analyzer (PerkinElmer Inc.). Se determinó el porcentaje de fosforilación usando la proporción de la emisión a 445 nm (emisión de cumarina) con respecto a la emisión a 520 nm (emisión de fluoresceína) de acuerdo con el protocolo proporcionado con el kit.
- Se calculó el porcentaje de inhibición (%) por parte del compuesto de ensayo usando la siguiente ecuación.

[E1]

$$\text{porcentaje de inhibición (\%)} \text{ de fosforilación} = 1 - \{ (A_c - A_x) / (A_c - A_B) \} \times 100$$

- A_x : % de fosforilación cuando se añadió el compuesto de ensayo
 A_B : % de fosforilación en ausencia de adición de ATP (blanco)
 A_c : % de fosforilación cuando se añadió solo DMSO (control)

- El valor del 50 % de inhibición (valor de CI_{50}) para el compuesto de ensayo se determinó a partir de la curva de inhibición basada en el % de inhibición para cada concentración del compuesto de ensayo.

Se midió la actividad inhibidora para otras quinasas (por ejemplo, Lck, Fyn, y LynA (todas de Invitrogen Corporation) de la misma forma que se ha descrito anteriormente usando la quinasa particular en lugar de la Btk.

- De acuerdo con los resultados, los valores de CI_{50} para los compuestos de la presente invención fueron, por ejemplo, 0,007 µM para el compuesto del Ejemplo 19(2).

- Además, se calculó la actividad inhibidora selectiva de Btk de los compuestos de la presente invención para otras quinasas, y particularmente para Lck, Fyn, y LynA, como la proporción de los valores de CI_{50} de las quinasas individuales y se da en la siguiente Tabla 1.

[Tabla 1]

Número de ejemplo	Lck[CI_{50}]/ Btk[CI_{50}]	Fyn[CI_{50}]/ Btk[CI_{50}]	LynA[CI_{50}]/ Btk[CI_{50}]
19 (2)	114	762	471

- Estos resultados muestran que los compuestos de la presente invención no solo tienen actividad inhibidora de Btk, sino que también tienen una actividad inhibidora selectiva de Btk con respecto a otras quinasas.

Ejemplo Biológico 2

Medida de la activación de linfocitos B o la activación de linfocitos T usando PBMC humanas

- Se dispuso una solución 10 mmol/l del compuesto de ensayo en DMSO en una placa de 96 pocillos (Nunc) y se preparó una dilución en serie 5x usando DMSO. Se preparó una solución de dilución del compuesto de ensayo a concentración 100x por dilución adicional 10x con medio RPMI1640 (que contenía HI-FBS al 10 %, penicilina al 1 %). Se diluyeron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) con el medio para proporcionar una densidad de 2×10^6 células/ml. Se añadieron 396 µl de la suspensión de células a una placa de 96 pocillos en la que ya se habían introducido 4 µl de la solución de dilución del compuesto de ensayo a concentración 100x o el disolvente (DMSO al 10 %) y se llevó a cabo una incubación durante 10 minutos a 37 °C y 5 % de CO_2 . Se añadieron 10 µl de una solución de anticuerpo anti-IgM (Southern Biotech)/IL-4 (R & D Systems) o una suspensión de perlas de anticuerpo anti-CD3/CD28 (Invitrogen Corporation) a una placa de 96 pocillos y también se añadieron 90 µl de la suspensión de células preparada como se ha descrito anteriormente (concentraciones finales: anticuerpo anti-IgM = 1 µg/ml, IL-4 = 3 ng/ml, y perlas de anticuerpo anti-CD3/CD28 = 2×10^6 perlas/ml). Se añadieron 10 µl del medio a pocillos de muestra sin estimular en lugar de estas sustancias estimulantes, y se llevó a cabo una incubación a 37 °C y 5 % de CO_2 de nuevo. La incubación se llevó a cabo durante 16 horas en el caso de la evaluación de la activación de linfocitos T y durante 22 horas en el caso de la evaluación de la activación de linfocitos B. Se añadieron 100 µl de Tampón Cytfix (BD Biosciences); se llevó a cabo una incubación durante 15 minutos a 37 °C; se llevó a cabo una centrifugación durante 10 minutos a 1500 rpm; y se retiró el sobrenadante. Se añadieron 200 µl de tampón Perm II (BD Biosciences) a -20 °C; se llevó a cabo una incubación durante 30 minutos

en hielo; se llevó a cabo una centrifugación durante 10 minutos a 1500 rpm; y se retiró el sobrenadante. Se añadieron 0,5 ml de tampón de Tinción (BD Biosciences) y se llevó a cabo una centrifugación durante 10 minutos a 1500 rpm. Se añadieron 100 µl de una solución mixta de anticuerpo y se llevó a cabo una incubación durante 30 minutos en hielo en oscuridad. El anticuerpo fue la dilución 10x con Tampón de Tinción de la mezcla 1 : 1 : 1 de anticuerpo anti-CD3 marcado con PerCP (BD Biosciences), anticuerpo anti-CD20 marcado con AF488 (BD Biosciences), y anticuerpo anti-CD69 marcado con PE (BD Biosciences). Se añadieron 0,4 ml de Tampón de Tinción y se retiró el sobrenadante. Se añadieron 0,3 ml de Tampón de Tinción y el sedimento de células se suspendió para preparar una muestra para medición de FACS. El análisis de FACS usó un equipo BD FACS-Calibur (BD Biosciences) y un software de análisis de datos CELLQuest versión 3.3 (BD Biosciences). Se midió la señal CD69-positivo (intensidad de fluorescencia promedio) de las células CD20-positivo CD3-negativo (linfocitos B) o las células CD3-positivo CD20-negativo (linfocitos T). Después de restar el valor para la muestra sin estimular, se determinó el % de inhibición por referencia al valor para la muestra de control estimulada. El % de inhibición se representó gráficamente usando Prism (ver. 5.01J, GraphPad Software) y se determinó el valor de CI_{50} .

De acuerdo con los resultados, los valores de CI_{50} de compuestos de la presente invención para la señal CD69-positivo para linfocitos B fueron, por ejemplo, 0,061 µM para el compuesto del Ejemplo 19(2). Por otro lado, los valores de CI_{50} de compuestos de la presente invención para la señal CD69-positivo para linfocitos T fueron > 10 µM para el compuesto precedente. Por lo tanto, los compuestos de la presente invención mostraron tener una acción inhibidora selectiva sobre la activación de linfocitos B.

Ejemplo Biológico 3

Evaluación de la estabilidad en microsomas hepáticos de rata y humanos

(1) Preparación de la solución de compuesto de ensayo

Se preparó una solución 0,25 mmol/l por dilución del compuesto de ensayo (solución 10 mmol/l en DMSO, 5 µl) con una solución acuosa al 50 % de acetonitrilo (195 µl).

(2) Preparación de la muestra la reacción del minuto 0

Se añadieron 245 µl de un tampón fosfato 0,1 mol/l (pH 7,4) que contenía 0,5 mg/ml de microsomas de rata y humanos (XenoTe-ch) y cofactor de NADPH (BD Biosciences) a un reactor que se había calentado previamente a 37 °C; se llevó a cabo una incubación previa durante 5 minutos; y se añadió la solución del compuesto de ensayo indicada anteriormente (5 µl) y se inició la reacción. Se recogieron 20 µl inmediatamente después del comienzo y la reacción se detuvo mediante la adición de 180 µl de acetonitrilo que contenía un estándar interno (warfarina). Se agitaron 20 µl de esta solución con 180 µl de una solución acuosa al 50 % de acetonitrilo sobre una placa de filtro para la depleción de proteínas seguido de filtración por succión, y el filtrado se usó como la muestra estándar.

(3) Preparación de la muestra de reacción del minuto 15

La solución de reacción indicada anteriormente se incubó durante 15 minutos a 37 °C, y a continuación se añadieron 20 µl a 180 µl de acetonitrilo frío (que contenía el estándar interno de warfarina) para detener la reacción. Se agitaron 20 µl de esto con 180 µl de una solución acuosa al 50 % de acetonitrilo sobre una placa de filtro para la depleción de proteínas seguido de filtración por succión, y el filtrado se usó como la muestra estándar.

(4) Método de evaluación y resultados

Se calculó la proporción residual (%) por inyección de 1 µl de la solución de muestra en un equipo de LC-MS/MS; división de la proporción de área de pico para la muestra de reacción (área de pico para el compuesto de ensayo/área de pico para el estándar interno) por la proporción de área de pico para la muestra estándar; y multiplicación del valor resultante por 100.

Se usaron los siguientes compuestos como compuestos de ensayo: compuestos de la presente invención y 1-((3R)-3-[4-amino-3-(4-fenoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]-1-piperidinil)-2-propen-1-ona (compuesto comparativo A) y 1-((3R)-3-[4-amino-3-(4-fenoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]-1-pirrolidinil)-2-propin-1-ona (compuesto comparativo B), que son compuestos a modo de ejemplo descritos en el Documento de Patente 1 que tienen un esqueleto de pirazolopirimidina. La proporción residual (%) de los compuestos de ensayo en los microsomas hepáticos de rata y humanos fue la que se muestra en la siguiente Tabla 2.

[Tabla 2]

Compuesto	Proporción residual (%) en el microsoma hepático de rata	Proporción residual (%) en el microsoma hepático humano
Compuesto comparativo	0	0

A		
Compuesto comparativo B	50,6	55,9
Ejemplo 19(2)	86,4	100

Los resultados muestran que los compuestos de la presente invención son mucho más estables en microsomas hepáticos de rata y humanos que los compuestos comparativos.

5 Ejemplo Biológico 4

Medición de la actividad inhibidora en enzimas metabolizadoras de fármacos (acción inhibidora en CYP2C8 humana y CYP2C19 humana)

10 [Método experimental]

La reacción se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos. Las sustancias de control positivo (CYP2C8: ketoconazol, CYP2C19: tranilcipromina) se ajustaron (CYP2C8: 0,6 y 6 mmol/l, CYP2C19: 0,9 y 9 mmol/l) con DMSO a concentraciones que fueron 300 veces la concentración final, y se prepararon soluciones (CYP2C8: 8 y 80 µmol/l, CYP2C19: 12 y 120 µmol/l) por dilución 75x con agua purificada que contenía un 2,7 % de acetonitrilo. Los compuestos de ensayo se ajustaron a 0,3 y 3 mol/l con DMSO y se ajustaron a 4 y 40 µmol/l por dilución 75x con agua purificada que contenía un 2,7 % de acetonitrilo. A continuación se preparó una mezcla de reacción (los valores numéricos son las concentraciones finales) mediante la adición de tampón fosfato potásico (pH 7,4), cloruro de magnesio (5 mol/l), sustrato (CYP2C8: dibencilfluoresceína 1 µmol/l, CYP2C19: 3-ciano-7-etoxicumarina 25 µmol/l), y CYP2C8 (Cypex, 10 pmol/l) y CYP2C19 (Cypex, 3 pmol/l) de microsoma hepático expresadas en *E. coli*. Se dispensaron en cada pocillo 100 µl de esta mezcla de reacción y 50 µl del compuesto de ensayo preparados como se ha descrito anteriormente y la solución de control positivo preparada como se ha descrito anteriormente y se llevó a cabo una incubación previa durante 10 minutos a 37 °C. La reacción se inició mediante la adición de 50 µl de solución de NADPH (concentración final = 1 mmol/l) y se llevó a cabo una incubación durante 30 minutos a 37 °C. Se midió la intensidad de fluorescencia (CYP2C8: longitud de onda de excitación = 485 nm, longitud de onda de fluorescencia = 538 nm; CYP2C19: longitud de onda de excitación = 409 nm, longitud de onda de fluorescencia = 460 nm) inmediatamente después de la adición de NADPH y después de incubación durante 30 minutos. Se tomó el % como el % de declinación (% de inhibición) en la intensidad de fluorescencia en comparación con un control en el que se añadió DMSO en lugar de la solución de compuesto de ensayo y se llevó a cabo la reacción y se calculó usando la siguiente fórmula.

Inhibición (%) = 100 - { (intensidad de fluorescencia después de la reacción del compuesto de ensayo - intensidad de fluorescencia antes de la reacción del compuesto de ensayo)/(intensidad de fluorescencia después de la reacción del control - intensidad de fluorescencia antes de la reacción de control) x 100}

Se tomó el valor de CI_{50} para que fuera < 1 µM cuando el % de inhibición a 1 µmol/l fue al menos un 50 %; se tomó para que fuera > 10 µmol/l cuando el % de inhibición a 10 µmol/l fue no más de un 50 %; y los valores intermedios a los precedentes (no más de un 50 % a 1 µmol/l y al menos un 50 % a 10 µmol/l) se calcularon usando la siguiente fórmula

$$CI_{50} = (50 - b)/a$$

en la que a y b son la pendiente y la ordenada en el origen de la recta de regresión lineal $y = ax + b$ que pasa a través de los dos puntos siguientes: la concentración de 1 µmol/l, % de inhibición y la concentración de 10 µmol/l, % de inhibición.

Los valores de CI_{50} de los compuestos comparativos y los compuestos de la presente invención se midieron usando el método de medición descrita anteriormente.

Los resultados son los que siguen a continuación: para el compuesto comparativo A y el compuesto comparativo B, los valores de CI_{50} para CYP2C8 fueron 4,7 µM y 6,9 µM, respectivamente, y los valores de CI_{50} para CYP2C19 fueron 5,6 µM y 8,1 µM, respectivamente. Por otro lado, los compuestos de la presente invención, por ejemplo, el compuesto del Ejemplo 19(2), tuvieron valores de CI_{50} para CYP2C8 y CYP2C19 de > 10 µM. Por lo tanto, los compuestos de la presente invención mostraron tener una menor actividad inhibidora de CYP que los compuestos comparativos.

Ejemplo Biológico 5

Medición de la citotoxicidad y la capacidad de reducir el potencial de membrana mitocondrial en células cultivadas de hepatoma humano

Se conoce que el tejido que mantiene un equilibrio aeróbico, por ejemplo, de riñones y corazón, y el tejido que se expone a altas concentraciones del fármaco y lleva a cabo el metabolismo del fármaco, por ejemplo, el hepático, es sensible a disfunción mitocondrial (Drug Discovery Today, 12 (17-18), 777-785, 2007). La reducción o extinción del potencial de membrana mitocondrial mediante un fármaco está causada por la inhibición directa del sistema de transporte de electrones, desacoplamiento del transporte de electrones de la ATP sintasa, o la apertura de un poro de transición de permeabilidad de membrana mitocondrial. Como consecuencia, la medición del potencial de membrana mitocondrial de células hepáticas puede proporcionar un parámetro para la hepatotoxicidad.

Se sembraron células hepáticas humanas en una placa de 96 pocillos revestida con colágeno con una densidad celular de 30.000 células/pocillo y se llevó a cabo una incubación durante una noche en una incubadora a 37 °C en 5 % de CO₂-95 % de aire. Las células cultivadas se tiñeron durante 1 hora con yoduro de 5,5',6,6'-tetrahidro-1,1',3,3'-tetrametil-benzamidazolocarboianina (JC-1) seguido de tratamiento con el compuesto de ensayo. El compuesto de ensayo se disolvió en DMSO y a continuación se diluyó con el medio de cultivo líquido Hepatocyte Culture Medium (HCM) y se añadió a las células. Las concentraciones de tratamiento del compuesto de ensayo fueron 0, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200, y 400 µmol/l. Después de la exposición al compuesto de ensayo durante 24 horas, se llevó a cabo una medición con un lector de placas SpectraMax (Molecular Devices, LLC) a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de fluorescencia de 538 nm y una longitud de onda de excitación de 544 nm y una longitud de onda de fluorescencia de 590 nm. El potencial de membrana se determinó mediante la proporción entre el valor de medición de 544 nm/590 nm y el valor de medición de 485 nm/538 nm. Después de esto, se midió la concentración de ATP en las células usando un kit de ensayo luminescente Celltiter Glo (Promega Corporation) con el fin de evaluar la toxicidad celular en el compuesto de ensayo. Las células se lisaron mediante el tampón de ensayo proporcionado con el kit de medición y se midió la concentración del ATP liberado por las células usando como índice la actividad enzimática de luciferina-luciferasa. La emisión se midió usando un lector de placas SpectraMax. La capacidad del compuesto de ensayo para disminuir el potencial de membrana mitocondrial y la citotoxicidad del compuesto de ensayo se representaron mediante la concentración (valor de Cl₅₀) que causó un 50 % de disminución en el potencial de membrana mitocondrial y la concentración de ATP, respectivamente. La capacidad para disminuir el potencial de membrana mitocondrial de los compuestos de ensayo y la citotoxicidad de los compuestos de ensayos se dan en la siguiente Tabla 3.

[Tabla 3]

Compuesto	Capacidad para disminuir el potencial de membrana mitocondrial (Cl ₅₀ (mM))	Toxicidad para células hepáticas humanas (Cl ₅₀ (mM))
Compuesto comparativo A	39	78
Compuesto comparativo B	< 6,25	< 6,25
Ejemplo 19(2)	200	135

Los resultados mostraron que ambos valores de Cl₅₀ fueron inferiores para el compuesto de la presente invención que para los compuestos comparativos.

[Ejemplos de formulación]

Ejemplo de Formulación 1

Los componentes indicados a continuación se mezclaron mediante un método convencional y a continuación se conformaron en comprimidos para obtener 10.000 comprimidos que contenían 10 mg de cada componente activo en cada comprimido.

- 6-amino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona 100 g
- carboximetilcelulosa de calcio (disgregante) 20 g
- estearato de magnesio (lubricante) 10 g
- celulosa microcristalina 870 g

Aplicabilidad industrial

Los compuestos de la presente invención son compuestos que, además de tener actividad inhibidora selectiva de Btk, exhiben una excelente estabilidad metabólica y pueden evitar hepatotoxicidad, y en consecuencia son útiles como agentes terapéuticos muy seguros para enfermedades en las que participan linfocitos B o mastocitos.

REIVINDICACIONES

1. 6-Amino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, o una sal de la misma.
- 5 2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que es 6-amino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenoxifenil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona.