

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 597 441**

51 Int. Cl.:

**C07D 239/48** (2006.01)  
**C07D 401/12** (2006.01)  
**C07D 403/12** (2006.01)  
**C07D 413/12** (2006.01)  
**C07D 417/12** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 9/00** (2006.01)  
**A61K 31/506** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2009 PCT/US2009/002420**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.12.2009 WO09145856**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2009 E 09755219 (4)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016 EP 2321283**

54 Título: **2,6-diamino-pirimidin-5-il-carboxamidas como inhibidores de las syk o JAK quinasas**

30 Prioridad:

**05.12.2008 US 120348 P**  
**05.12.2008 US 120344 P**  
**16.04.2008 US 45417 P**  
**16.04.2008 US 45406 P**  
**05.12.2008 US 120341 P**  
**16.04.2008 US 45399 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.01.2017**

73 Titular/es:

**PORTOLA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)**  
**270 East Grand Avenue Suite 22 South San Francisco**  
**California 94080, US**

72 Inventor/es:

**BAUER, SHAWN, M.;**  
**JIA, ZHAOZHONG, J.;**  
**SONG, YONGHONG;**  
**XU, QING;**  
**MEHROTRA, MUKUND;**  
**ROSE, JACK, W.;**  
**HUANG, WOLIN;**  
**VENKATARAMANI, CHANDRASEKAR y**  
**PANDEY, ANJALI**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 597 441 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

2,6-diamino-pirimidin-5-il-carboxamidas como inhibidores de las syk o JAK quinasas

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a compuestos de pirimidina-5-carboxamida que actúan como inhibidores de la tirosina quinasa del bazo (syk) y/o las JAK quinasas. Esta invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen compuestos de pirimidina-5-carboxamida y a los métodos de uso de los compuestos o composiciones para tratar una afección caracterizada por trombosis no deseada. La invención también se refiere a métodos para preparar los compuestos descritos en el presente documento.

15 Estado de la técnica

20 Las proteína quinasas constituyen una gran familia de enzimas relacionadas estructuralmente que son responsables del control de una diversidad de procesos de transducción de señales dentro de las células (véase, por ejemplo, Hardie y Hanks, *The Protein Kinase Facts Book*, I y II, Academic Press, San Diego, Calif., 1995). Se piensa que las proteína quinasas han evolucionado a partir de un gen ancestral común debido a la conservación de su estructura y función catalítica. Casi todas las quinasas contienen un dominio catalítico similar de 250-300 aminoácidos. Las quinasas se pueden categorizar en familias por los sustratos que fosforilan (por ejemplo, proteína-tirosina, proteína-serina/treonina, lípidos, etc.). Se han identificado motivos de secuencia que en general corresponden con cada una de estas familias (véase, por ejemplo, Hanks y Hunter, (1995), *FASEB J.* 9: 576-596; Knighton *et al.*, (1991), *Science* 253: 407-414; Hiles *et al.*, (1992), *Cell* 70: 419-429; Kunz *et al.*, (1993), *Cell* 73: 585-596; Garcia-Bustos *et al.*, (1994), *EMBO J.* 13: 2352-2361).

30 Muchas enfermedades están asociadas con respuestas celulares anómalas desencadenadas por sucesos mediados por proteína quinasas. Estas enfermedades incluyen enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, enfermedades óseas, enfermedades metabólicas, enfermedades neurológicas y neurodegenerativas, cáncer, enfermedades cardiovasculares, alergias, asma, enfermedad de Alzheimer y enfermedades relacionadas con las hormonas. En consecuencia, ha habido esfuerzos sustanciales en la química de fármacos para encontrar inhibidores de las proteína quinasas para su uso como agentes terapéuticos.

35 La señalización mediada por motivos de activación de inmunorreceptores por tirosina (ITAM) ha emergido como un suceso principal en las rutas de señalización responsables de patologías humanas. La señalización mediada por ITAM es responsable de la retransmisión de señales de activación iniciadas en receptores inmunitarios clásicos tales como los receptores de linfocitos T, receptores de linfocitos B, receptores Fc, en células inmunitarias y en GPVI y FcγRIIa en las plaquetas hacia moléculas intracelulares aguas abajo tales como syk y ZAP-70 (Underhill, D.M y Goodridge, H. S., *Trends Immunol.*, 28: 66-73, 2007).

45 La unión de un ligando a un receptor que contiene ITAM desencadena sucesos de señalización que permiten la incorporación de proteínas de una familia de tirosina quinasas no receptoras denominadas la familia Src. Estas quinasas fosforilan restos de tirosina dentro de la secuencia ITAM, una región con la que interactúan los dominios SH2 en tándem en ya sea syk o ZAP-70.

50 Syk, junto con Zap-70, es un miembro de la familia syk de proteínas tirosina quinasas. La interacción de syk o de ZAP-70 con secuencias de ITAM difosforiladas induce un cambio de la conformación en las quinasas que permite la fosforilación de tirosinas en la propia quinasa. Los miembros de la familia Syk fosforilados activan una multitud de proteínas de la ruta de señalización aguas abajo, que incluye la fosfoproteína específica de leucocitos de 76 kDa (SLP-76), el Enlazador de Activación de linfocitos T (LAT) y la PLC (fosfolipasa C) γ2, que contienen el dominio de homología con Src 2 (SH2).

55 Las patologías humanas atribuidas a la señalización mediada por ITAM disfuncional incluye enfermedades autoinmunitarias tales como artritis reumatoide, lupus sistémico, esclerosis múltiple, anemia hemolítica, púrpura trombocitopénica inmunitaria y trombocitopenia inducida por heparina, y arteriosclerosis. Cabe destacar que se piensa que muchas de las enfermedades anteriormente mencionadas se producen a través del entrecruzamiento de receptores Fc mediante anticuerpos que, a través de syk, activan una cascada de señalización en mastocitos, basófilos y otras células inmunitarias, lo que da como resultado la liberación de mediadores celulares responsables de reacciones inflamatorias. La liberación de mediadores y la producción de citocinas en reacciones alérgicas e inflamatorias dependientes de la estimulación por IgE a partir de mastocitos y de basófilos se puede controlar mediante la inhibición de la actividad tirosina quinasa de syk (Rossi, A.B. *et al.*, *J Allergy Clin Immunol.*, 118: 749-755, 2006). En la trombocitopenia inmunitaria, el bazo retira anticuerpos unidos a las plaquetas por un proceso mediado por receptor Fc/ITAM/syk (Crow, A.R. *et al.*, *Blood*, 106: resumen 2165, 2005). La trombocitopenia inducida por fármacos, provocada por complejos inmunitarios de heparina-factor de plaquetas 4 que activan al FcγRIIa de plaquetas, también implica la señalización de syk aguas abajo de la interacción del receptor (Reilly, M.P., *Blood*, 98:

2442-2447, 2001).

Los agonistas de plaquetas inducen la señalización de integrinas dentro-fuera dando como resultado la unión de fibrinógeno y la agregación de plaquetas. Esto inicia la señalización dentro-fuera que produce estimulación adicional de las plaquetas. Syk se activa durante ambas fases de la señalización de integrinas y la inhibición de syk se ha demostrado que inhibe la adhesión de plaquetas a proteínas inmovilizadas (Law, D.A. *et al.*, Blood, 93: 2645-2652, 1999). La liberación de ácido araquidónico y de serotonina, y la agregación de plaquetas inducida por colágeno, está claramente inhibida en plaquetas obtenidas de ratón deficiente en syk (Poole, A. *et al.*, EMBO J., 16: 2333-2341, 1997). Por lo tanto, los inhibidores de syk también poseen acción de anticoagulación.

Debido al papel que desempeña syk en las activaciones de plaquetas inducidas por Ig, es probable que sea importante en la arteriosclerosis y la reestenosis. La arteriosclerosis es una clase de enfermedad caracterizada por el engrosamiento y el endurecimiento de las paredes arteriales de los vasos sanguíneos. Aunque todos los vasos sanguíneos son susceptibles a esta seria afección degenerativa, la aorta y las arterias coronarias que sirven al corazón son las más frecuentemente afectadas. La arteriosclerosis tiene una profunda importancia clínica puesto que puede aumentar el riesgo de ataques cardíacos, infartos de miocardio, ictus y aneurismas.

El tratamiento tradicional para la arteriosclerosis incluye procedimientos de recanalización vascular para los bloqueos menos graves y derivación coronaria quirúrgica para los bloqueos importantes. Un efecto grave de los procedimientos intravasculares es que, en un número significativo de individuos tratados, algunos o todos de los vasos tratados vuelven a sufrir reestenosis (es decir, vuelven a estrecharse). Por ejemplo, la reestenosis de una arteria coronaria aterosclerótica después de la ACTP se produce en el 10-50 % de los pacientes que se someten a este procedimiento y, posteriormente, requiere angioplastia adicional o un injerto de derivación de arterias coronarias. Además, la reestenosis de una arteria coronaria aterosclerótica después de la colocación de estents se produce en el 10-20 % de los pacientes que se someten a este procedimiento y posteriormente requiere tratamientos repetidos para mantener la circulación sanguínea adecuado a través de la arteria afectada. En general, la reestenosis se produce en un periodo de tiempo relativamente breve, por ejemplo, aproximadamente menor de seis meses, después del tratamiento.

Aunque no se han determinado los procesos hormonales y celulares exactos que promueven la reestenosis, se piensa que la reestenosis se debe en parte a la lesión mecánica de las paredes de los vasos sanguíneos provocada por el catéter con globo u otro dispositivo intravascular. Por ejemplo, el procedimiento de ACTP, además de abrir la arteria obstruida también lesiona células de músculo liso (CML) de las arterias coronarias residentes. En respuesta a esta lesión, las plaquetas adherentes, los macrófagos infiltrantes, los leucocitos o las mismas células de músculo liso, liberan factores de crecimiento derivados de células tal como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), con la posterior proliferación y migración de CML medias a través de la lámina elástica interna, hacia la zona de la íntima del vaso. La proliferación adicional y la hiperplasia de las CML de la íntima y, más significativamente, la producción de grandes cantidades de matriz extracelular durante de un periodo de tres a seis meses, da como resultado el llenado y estrechamiento del espacio vascular, suficiente para obstruir de forma significativa la circulación sanguínea.

Además del papel que desempeña syk en las activaciones de plaquetas inducidas por Ig, syk desempeña un papel muy importante en la señalización mediada por colágeno. La proteína de adhesión principal responsable de la adhesión y activación de plaquetas es el colágeno. El colágeno es una proteína filamentososa contenida en las obstrucciones fibróticas de los ateromas, que quedan expuestas a la sangre durante la ruptura de la placa. El colágeno funciona de forma inicial uniendo el factor de von Willebrand, que amarra a las plaquetas a través de la unión a GPIb de la membrana plaquetaria. El colágeno funciona de forma secundaria interaccionando con los dos receptores de colágeno en las plaquetas, GPVI y la integrina  $\alpha 2\beta 1$ .

GPVI existe en las membranas de las plaquetas como un complejo con FcR $\gamma$ , una interacción necesaria para la expresión de GPVI. La activación del Fc $\gamma$ R1a sobre las plaquetas da como resultado el cambio de la forma de la plaqueta, secreción y trombosis. La señalización mediante el complejo GPVI/FcR $\gamma$  se inicia por la fosforilación de tirosinas del dominio ITAM del FcR $\gamma$  seguido de la incorporación de syk. La activación de GPVI conduce a la inducción de múltiples funciones plaquetarias que incluyen: activación de las integrinas  $\alpha 2\beta 1$  para conseguir la firme adhesión plaquetaria y GP IIb-IIIa que media la agregación plaquetaria y el crecimiento de la trombosis, la secreción de plaquetas, que permite el suministro de proteínas inflamatorias tales como CD40L, RANTES y TGF $\beta$  a la pared vascular; y la expresión de P-selectina, que permite la incorporación de leucocitos. Por lo tanto, se cree que los inhibidores de syk pueden inhibir los sucesos trombóticos mediados por la adhesión, activación y agregación plaquetaria.

Se ha notificado que la fosforilación de tirosinas de proteínas intracelulares (activación) inducida por la estimulación de un receptor de anticuerpos IgG, Fc $\gamma$ R, y la fagocitosis mediada por Fc $\gamma$ R, está inhibida de forma considerable en macrófagos obtenidos de ratón deficiente en syk (Crowley, M.T. *et al.*, J. Exp. Med., 186: 1027-1039, 1997). Esto sugiere que syk tiene un papel claramente importante en la fagocitosis mediada por Fc $\gamma$ R de macrófagos.

También se ha notificado que un oligonucleótido antisentido de syk suprime la inhibición de la apoptosis de eosinófilos inducida por GM-CSF (Yousefi, S. *et al.*, J. E. Med., 183: 1407-1414, 1996), mostrando que syk es esencial para la señal de extensión de la vida de los eosinófilos provocada por GM-CSF y similares. Puesto que la extensión de la vida de los eosinófilos está estrechamente relacionada con la transición de enfermedades a estados crónicos en trastornos alérgicos, tales como el asma, los inhibidores de syk también pueden servir como agentes terapéuticos para la inflamación eosinofílica crónica.

Syk es importante para la activación de linfocitos B a través del receptor de antígeno de linfocitos B y está implicada en el metabolismo del fosfatidilinositol y en el aumento de la concentración de calcio intracelular provocada por la estimulación del receptor de antígeno (Hutchcroft, J. E. *et al.*, J. Biol. Chem., 267: 8613-8619, 1992; y Takata, M. *et al.*, EMBO J., 13: 1341-1349, 1994). Por lo tanto, los inhibidores de syk se pueden utilizar para controlar la función de los linfocitos B y, por lo tanto, se espera que sirvan como agentes terapéuticos para enfermedades relacionadas con anticuerpos.

Syk se une a un receptor de antígeno de linfocitos T, rápidamente experimenta fosforilación de las tirosinas a través del entrecruzamiento del receptor y actúa de forma sinérgica sobre las señales intracelulares mediadas por las tirosina quinasas Src tales como Lck (Couture, C. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 5301-5305, 1994; y Couture, C. *et al.*, Mol. Cell. Biol., 14: 5249-5258, 1994). Syk está presente en poblaciones de linfocitos T maduros, tales como linfocitos T  $\gamma\delta$  intraepiteliales y linfocitos T  $\alpha\beta$  sin exposición previa, y se ha notificado que tienen la capacidad de fosforilar múltiples componentes de la cascada de señalización del TCR (Latour, S. *et al.*, Mol Cell Biol., 17: 4434-4441, 1997). En consecuencia, los inhibidores de syk pueden servir como agentes para la inhibición de la inmunidad celular mediada por el receptor de antígeno de los linfocitos T.

Estudios recientes de hibridación genómica comparativos han identificado a syk como otro gen importante en la patogenia del Linfoma de Células del Manto (LCM) (Chen, R. *et al.* Journal of Clinical Oncology, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition). Vol 25, n.º 18S (suplemento del 20 de junio), 2007: 8056). El LCM representa el 5-10 % de todos los linfomas no Hodgkin y es una forma de linfoma difícil de tratar. Tiene el peor pronóstico entre los linfomas de linfocitos B con una supervivencia media de tres años. Se ha notificado que Syk está sobreexpresada en el LCM (Rinaldi, A, *et al.*, Br. J. Haematol., 2006; 132:303-316) y que Syk media en las señales de supervivencia de mTOR (diana de la Rapamicina en mamífero) en el linfoma folicular, de células del manto, de Burkitt y difuso de linfocitos B grandes (Leseux, L., *et al.*, Blood, 2006; 108: 4156-4162).

Varias líneas de evidencia sugieren que muchos linfomas de linfocitos B dependen de señales de supervivencia mediadas por el receptor de linfocitos B (BCR). La señalización del BCR induce la oligomerización del receptor y la fosforilación de los motivos de activación de inmunorreceptor I $\alpha$  y  $\beta$  mediante las quinasas de la familia SRC. La fosforilación del ITAM da como resultado la incorporación y activación de syk, que inicia los sucesos aguas abajo y amplifica la señal original del BCR. Dado el papel de la señalización del BCR tónica en linfocitos B normales y la supervivencia dependiente de syk de las líneas celulares de linfoma no Hodgkin *in vitro* (Chen, L., *et al.*, Blood, 2006; 108: 3428-3433), la inhibición de syk es una diana de tratamiento razonable prometedor para determinados linfomas de linfocitos B y leucemia linfocítica crónica (LLC) (Stefania Gobessi, Luca Laurenti, Pablo Longo, Laura Carsetti, Giuseppe Leone, Dimitar G. Efremov, Constitutive activation of the protein tyrosine kinase Syk in Chronic Lymphocytic Leukemia B-cells, Blood, 2007, 110, Resumen 1123). Datos recientes muestran que la administración de un inhibidor de múltiples quinasas que inhibe a syk, puede tener actividad clínica significativa en pacientes con LLC (Friedberg JW *et al.*, Blood 2008; 112(11), Resumen 3).

El potencial oncogénico de la tirosina quinasa del bazo (Syk) se ha descrito en varios contextos distintos. Clínicamente, la expresión aumentada de Syk se describe en el Linfoma de Células del Manto (Rinaldi, A, *et al.*, Br. J. Haematol., 2006; 132: 303-316) y la proteína de fusión TEL-Syk (Leucemia del ETS Traslocado) que genera una translocación cromosómica (t(9;12)(q22;p12)) conduce a la actividad aumentada de Syk y se asocia con el síndrome mielodisplásico (Kuno, Y., *et al.*, Blood, 2001; 97:1050-1055). Las células de médula ósea transferidas de forma adoptiva que expresan TEL-Syk humana inducen leucemia en ratones (Wossning, T., JEM, 2006; 203: 2829-2840). Adicionalmente, en células de médula ósea primarias de ratón, la expresión aumentada de Syk da como resultado el crecimiento en cultivo independiente de IL-7 (Wossning, T., *et al.*, JEM, 2006; 203: 2829-2840).

Cabe destacar que la señalización de Syk parece ser necesaria para el desarrollo y la supervivencia de los linfocitos B en el ser humano y el ratón. La pérdida inducible del receptor de linfocitos B (Lam, K., *et al.*, Cell, 1997; 90: 1073-1083) o de I $\alpha$  (Kraus, M., *et al.*, Cell, 2004; 117: 787-800) da como resultado la pérdida de linfocitos B periféricos en ratones. La expresión aumentada de la proteína tirosina fosfatasa de PTP-RO, la cual se sabe que regula de forma negativa la actividad de Syk, inhibe la proliferación e induce la apoptosis de líneas celulares obtenidas de linfomas no Hodgkin (Chen, L., *et al.*, Blood, 2006; 108: 3428-3433). Para finalizar, los linfomas de linfocitos B raramente presentan pérdida de expresión del BCR y la terapia antidiotipo raramente conduce a resistencia (Kuppers, R. Nat Rev Cancer, 2005; 5:251-262).

El reconocimiento del receptor específico de antígeno de linfocitos B (BCR) activa múltiples rutas de señalización que en última instancia regulan el estado de activación de las células, promoviendo la supervivencia y la expansión clonal. La señalización a través del BCR se hace posible por su asociación con otros dos miembros de la

superfamilia de las inmunoglobulinas, Ig $\alpha$  e Ig $\beta$ , cada uno portando un inmuno-dominio de activación basado en tirosina (ITAM) (Jumaa, Hendriks *et al.* *Annu Rev Immunol* 23: 415-45 (2005)). En respuesta al reconocimiento del BCR, la quinasa de la familia Src fosforila de forma directa el dominio ITAM. La tirosina quinasa del bazo (Syk) se acopla con el ITAM y lo fosforila, un proceso que potencia su actividad quinasa, dando como resultado la autofosforilación de Syk y la fosforilación de tirosinas de múltiples sustratos aguas abajo (Rolli, Gallwitz *et al.* *Mol Cell* 10(5): 1057-69 (2002)). Esta ruta de señalización esta activa en los linfocitos B al comienzo de la transición de la fase pro- a pre-linfocito B del desarrollo, cuando se expresa el pre-BCR recientemente formado. De hecho, en ratones genosuprimidos para Syk el desarrollo de los linfocitos B se detiene en la etapa de linfocito pro-B (Cheng, Rowley *et al.* 1995; Turner, Mee *et al.* *Nature* 378(6554): 303-6 (1995)). La pérdida inducible del receptor de linfocitos B (Lam, Kuhn *et al.* *Cell* 90(6): 1073-83 (1997)) o de Ig $\alpha$  (Kraus, Alimzhanov *et al.* *Cell* 117(6): 787-800 (2004)) da como resultado la pérdida de linfocitos B periféricos en ratones. Los linfocitos B de ser humano también parecen necesitar a Syk para la proliferación y supervivencia. La expresión aumentada de la proteína tirosina fosfatasa PTP-RO, un regulador negativo de la actividad de Syk, inhibe la proliferación e induce la apoptosis en líneas celulares obtenidas de linfomas no Hodgkin (LNH) (Chen, Juszczynski *et al.* *Blood* 108(10): 3428-33 (2006)). La genosupresión de Syk mediante ARNip en la línea de LNH SUDHL-4 condujo a un bloqueo en la transición G1/S del ciclo celular (Gururajan, Dasu *et al.* *J Immunol* 178(1): 111-21 (2007)). Juntos, estos datos sugieren que la señalización de Syk es necesaria para el desarrollo, proliferación e incluso la supervivencia de linfocitos B de ser humano y de ratón.

A la inversa, el potencial oncogénico de Syk se ha descrito en varios contextos distintos. Clínicamente, la expresión aumentada de Syk se describió en el Linfoma de Células del Manto (Rinaldi, Kwee *et al.* *Br J Haematol* 132(3): 303-16 (2006) y la proteína de fusión TEL-Syk (Leucemia del ETS Traslocado) generada por una translocación cromosómica (t(9;12)(q22;p12)) conduce a la actividad aumentada de Syk y se asocia con el síndrome mielodisplásico (Kuno, Abe *et al.* *Blood* 97(4): 1050-5 (2001)). Las células de medula ósea transferidas de forma adoptiva que expresan TEL-Syk humana inducen leucemia en ratones (Wossning, Herzog *et al.* *J Exp Med* 203(13): 2829-40 (2006)). Adicionalmente, en células de medula ósea primarias de ratón, la expresión aumentada de Syk da como resultado el crecimiento en cultivo independiente de IL-7 (Wossning, Herzog *et al.* 2006). Consecuentemente, se ha descrito que Syk media las señales de supervivencia de mTOR (diana de la Rapamicina en mamíferos) en LNH folicular, de células del manto, de Burkitt y de linfocitos B grandes difusos (Leseux, Hamdi *et al.* *Blood* 108(13): 4156-62 (2006)). Además, estudios recientes adicionales sugieren que las señales de supervivencia dependientes de Syk pueden desempeñar un papel en los cánceres de linfocitos B, incluyendo LDCBG, linfoma de células del manto y linfoma folicular (Gururajan, Jennings *et al.* 2006; Irish, Czerwinski *et al.* *J Immunol* 176(10): 5715-9 (2006)). Dado el papel de la señalización tónica del BCR en linfocitos B normales y la supervivencia dependiente de Syk de líneas celulares de LNH *in vitro*, la inhibición específica de Syk podría resultar prometedora para el tratamiento de determinados linfomas de linfocito B.

Recientemente, se describió que R406 (Rigel Pharmaceuticals) inhibe la señalización del ITAM en respuesta a diversos estímulos, incluyendo Fc $\epsilon$ R1 y BCR inducido por la activación de Syk (Brasemann, Taylor *et al.* *J Pharmacol Exp Ther* 319(3): 998-1008 (2006)). Cabe destacar que este inhibidor de Syk competitivo de ATP también fue activo frente a las Flt3, cKit y JAK quinasa, pero no frente a la Src quinasa (Brasemann, Taylor *et al.* 2006). La activación de mutaciones de Flt3 está asociada con la LMA y la inhibición de esta quinasa está actualmente bajo desarrollo clínico (Burnett and Knapper *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007: 429-34 (2007)). El aumento de la activación de la tirosina quinasa cKit también está asociada con cánceres hematológicos y es una diana para la terapia del cáncer (Heinrich, Griffith *et al.* *Blood* 96(3): 925-32 (2000)). De manera similar, la señalización de JAK3 está implicada en leucemias y linfomas, y actualmente se está explotando como una diana terapéutica potencial (Heinrich, Griffith *et al.* 2000). Hay que destacar que la actividad inhibitoria multiquinasas de R406 atenúa la señalización del BCR en las líneas celulares de linfoma y en muestras de linfoma humano primario, dando como resultado la apoptosis de estas (Chen, Monti *et al.* *Blood* 111(4): 2230-7 (2008)). Adicionalmente, un ensayo clínico de fase II notificó resultados favorables para este compuesto en el LNH refractario y en leucemia linfocítica crónica (Friedberg JW *et al.*, *Blood* 2008; 112(11), Resumen 3). Aunque el mecanismo preciso de acción para R406 no está claro, los datos sugieren que la inhibición de las quinasa que median las señales de supervivencia en linfocitos es clínicamente beneficiosa.

Además, estudios adicionales recientes sugieren que las señales de supervivencia dependientes de syk pueden desempeñar un papel en los cánceres de linfocitos B, incluyendo el LDCBG, linfoma de células del manto y linfoma folicular (véase por ejemplo, S. Linfengshen *et al.* *Blood*, Feb. 2008; 111: 2230-2237; J. M. Irish *et al.* *Blood*, 2006; 108: 3135-3142; A. Renaldi *et al.* *Brit J. Haematology*, 2006; 132: 303-316; M. Guruoajan *et al.* *J. Immunol*, 2006; 176: 5715-5719; L. Laseux *et al.* *Blood*, 2006; 108: 4156-4162).

Las JAK quinasa (Quinasa Janus) son una familia de proteínas tirosina quinasa citoplasmáticas que incluye a JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. Las JAK desempeñan un papel crucial en la señalización de citocinas. Cada una de las JAK quinasa es selectiva para los receptores de determinadas citocinas, si bien múltiples JAK quinasa pueden estar afectadas por citocinas o rutas de señalización particulares. Los estudios sugieren que JAK3 se asocia con la cadena gamma del receptor de citocinas común (fcy o  $\gamma$ c) de diversos receptores de citocinas. JAK3 en particular se une a receptores de forma selectiva y es parte de la ruta de señalización de citocinas para, y activada por, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21. JAK1 interactúa con, entre otros, los receptores para las citocinas IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-

21, mientras que JAK2 interactúa con, entre otros, los receptores para IL-9 y TNF- $\alpha$ . Después de la unión de determinadas citocinas a sus receptores (por ejemplo, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21), se produce la oligomerización del receptor, dando como resultado que las colas citoplasmáticas de las JAK quinasas asociadas se coloquen de forma proximidad y faciliten la transfosforilación de los restos de tirosina en la JAK quinasa. Esta transfosforilación da como resultado la activación de la JAK quinasa.

Los sustratos aguas abajo de las quinasas de la familia JAK incluyen a las proteínas transductoras de señal y activadoras de la transcripción (STAT). Las JAK quinasas fosforiladas se unen a diversas proteínas STAT (Transductoras de Señal y Activadoras de la Transcripción). Las proteínas STAT, que son proteínas de unión a ADN activadas mediante la fosforilación de residuos de tirosina, funcionan como moléculas de señalización y factores de transcripción y en última instancia se unen a secuencias de ADN específicas presentes en los promotores de los genes sensibles a citocinas (Leonard *et al.*, (2000), *J. Allergy Clin. Immunol.* 105: 877-888).

Se ha implicado a la señalización JAK/STAT en la mediación de muchas respuestas inmunitarias anómalas tales como alergias, asma, enfermedades autoinmunitarias tales como rechazo de trasplante (aloinjerto), artritis reumatoide, esclerosis lateral amiotrófica y esclerosis múltiple, así como en cánceres sólidos y hematológicos tales como leucemias y linfomas. Para una revisión de la intervención farmacéutica de la ruta JAK/STAT véase Frank, (1999), *Mol. Med.* 5:432-456 y Seidel *et al.*, (2000), *Oncogene* 19:2645-2656.

En particular, se ha implicado a JAK3 en una diversidad de procesos biológicos. Por ejemplo, la proliferación y supervivencia de mastocitos murinos inducida por IL-4 e IL-9 se ha demostrado que es dependiente de la señalización de JAK3 y de la cadena gamma (Suzuki *et al.*, (2000), *Blood* 96: 2172-2180). JAK3 también desempeña un papel crucial en las respuestas de degranulación de mastocitos mediada por el receptor de IgE (Malaviya *et al.*, (1999), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257: 807-813), y la inhibición de la JAK3 quinasa ha demostrado prevenir las reacciones de la hipersensibilidad de tipo I, incluyendo anafilaxia (Malaviya *et al.*, (1999), *J. Biol. Chem.* 274: 27028-27038). También se ha demostrado que la inhibición de JAK3 da como resultado la supresión inmunitaria para el rechazo de aloinjertos (Kirken, (2001), *Transpl. Proc.* 33: 3268-3270). También se ha implicado a las JAK3 quinasas en el mecanismo implicado en las etapas temprana y tardía de artritis reumatoide (Muller-Ladner *et al.*, (2000), *J. Immunol.* 164: 3894-3901); la esclerosis lateral amiotrófica familiar (Trieu *et al.*, (2000), *Biochem Biophys. Res. Commun.* 267: 22-25); la leucemia (Sudbeck *et al.*, (1999), *Clin. Cancer Res.* 5: 1569-1582); la micosis fungoide, una forma de linfoma de linfocitos T (Nielsen *et al.*, (1997), *Prac. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6764-6769) y el crecimiento celular anómalo (Yu *et al.*, (1997), *J. Immunol.* 159: 5206-5210; Catlett-Falcone *et al.*, (1999), *Immunity* 10: 105-115).

JAK1, JAK2 y TYK2 se expresan de forma ubicua, mientras que JAK3 se expresa de forma predominante en células hematopoyéticas. Las JAK quinasas, incluyendo JAK3, se expresan de forma abundante en células de leucemia primarias de niños con leucemia linfoblástica aguda, la forma más común de cáncer en la infancia, y los estudios han correlacionado la activación de STAT en determinadas células con señales que regulan la apoptosis (Demoulin *et al.*, (1996), *Mol. Cell. Biol.* 16: 4710-6; Jurlander *et al.*, (1997), *Blood.* 89: 4146-52; Kaneko *et al.*, (1997), *Clin. Exp. Immun.* 109: 185-193 y Nakamura *et al.*, (1996), *J. Biol. Chem.* 271: 19483-8). Además se sabe que son importantes para la diferenciación, función y supervivencia de linfocitos. JAK-3 en particular desempeña un papel esencial en la función de linfocitos, macrófagos y mastocitos. Dada la importancia de esta JAK quinasa, los compuestos que modulan la ruta de JAK, incluyendo los selectivos para JAK3, pueden ser útiles para el tratamiento de enfermedades o trastornos donde está implicada la función de linfocitos, macrófagos o mastocitos (Kudlacz *et al.*, (2004) *Am. J. Transplant* 4: 51-57; Changelian (2003) *Science* 302: 875-878). Los trastornos en los que se contempla que la acción sobre la ruta de JAK o la modulación de las JAK quinasas, en particular de JAK3, sea terapéuticamente útil incluyen, leucemia, linfoma, rechazo de trasplante (por ejemplo, rechazo de trasplante de islotes pancreáticos, aplicaciones en trasplantes de médula ósea (por ejemplo, enfermedad injerto contra el hospedador), enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo, diabetes, artritis reumatoide, lupus, psoriasis) e inflamación (por ejemplo, asma, reacciones alérgicas). Más adelante se discuten con más detalle los trastornos que se pueden beneficiar de la inhibición de JAK3. Se han notificado datos recientes sobre la inhibición de JAK en pacientes de aloinjerto de riñón tratados con CP-690.550, y muestran que los marcadores de respuesta alógena (interferón gamma) pueden estar reducidos (Van Gorp EA *et al.* (2009) *Transplantation* 87: 79-86).

A la vista de las numerosas afecciones que se contempla que se beneficien del tratamiento que implica la modulación de la ruta de JAK, es inmediatamente obvio que los compuestos nuevos que modulan las rutas de JAK y los métodos de uso de estos compuestos deberían proporcionar sustanciales beneficios terapéuticos a una amplia diversidad de pacientes. Se proporcionan en el presente documento compuestos de 2,4-pirimidina diamina nuevos para su uso en el tratamiento de afecciones en las que la acción sobre la ruta de JAK o la inhibición de las JAK quinasas, en particular de JAK3, sea terapéuticamente útil.

Las patentes y solicitudes de patente relacionadas con la modulación de la ruta de JAK incluyen: las Patentes de Estados Unidos n.º 5.728.536; 6.080.747; 6.080.748; 6.133.305; 6.177.433; 6.210.654; 6.313.130; 6.316.635; 6.433.018; 6.486.185; 6.506.763; 6.528.509; 6.593.357; 6.608.048; 6.610.688; 6.635.651; 6.677.368; 6.683.082; 6.696.448; 6.699.865; 6.777.417; 6.784.195; 6.825.190; 6.506.763; 6.784.195; 6.528.509; 6.608.048; 7.105.529; 6.699.865; 6.825.190; 6.815.439; 6.949.580; 7.056.944; 6.998.391; 7.074.793; 6.969.760; Solicitudes de Patente de

Estados Unidos n.º 2001/0007033 A1; 2002/0115173 A1; 2002/0137141 A1; 2003/0236244 A1; 2004/0102455 A1; 2004/0142404 A1; 2004/0147507 A1 y 2004/0214817 A1; y las Solicitudes de Patente Internacional WO 95/03701A1; WO 99/15500A1; WO 00/00202A1; WO 00/10981A1; WO 00/47583A1; WO 00/51587A2; WO 00/55159A2; WO 01/42246A2; WO 01/45641A2; WO 01/52892A2; WO 01/56993A2; WO 01/57022A2; WO 01/72758A1; WO 02/00661A1; WO 02/43735A1; WO 02/48336A2; WO 02/060492A1; WO 02/060927A1; WO 02/096909A1; WO 02/102800A1; WO 03/020698A2; WO 03/048162A1; WO 03/101989A1; WO 2004/016597A2; WO 2004/041789A1; WO 2004/041810A1; WO 2004/041814A1; WO 2004/046112A2; WO 2004/046120A2; WO 2004/047843A1; WO 2004/058749A1; WO 2004/058753A1; WO 2004/085388A2; WO 2004/092154A1; WO 2005/009957A1; WO 2005/016344A1; WO 2005/028475A2 y WO 2005/033107A1.

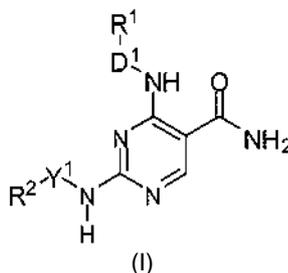
Las patentes y solicitudes de patente que describen compuestos de pirimidina diamina sustituidas incluyen: la solicitud de Estados Unidos n.º de Ser. 10/355.543 presentada el 31 de enero de 2003 (US2004/0029902A1), la solicitud internacional n.º de Serie PCT/US03/03022 presentada el 31 de enero de 2003 (WO 03/063794), la solicitud de Estados Unidos n.º de Ser. 10/631.029 presentada el 29 de junio de 2003, la solicitud internacional n.º de Serie PCT/US03/24087 (WO 04/014382), la solicitud de Estados Unidos n.º de Ser. 10/903.263 presentada el 30 de julio de 2004 y la solicitud internacional n.º de Serie PCT/US2004/24716 (WO 05/016893). Los compuestos de pirimidina diamina sustituidas también se describen en las solicitudes de patente internacional números de publicación: WO 02/059110, WO 03/074515, WO 03/106416, WO 03/066601, WO 03/063794, WO 04/046118, WO 05/016894, WO 05/122294, WO 05/066156, WO 03/002542, WO 03/030909, WO 00/39101, WO 05/037800 y la patente de Estados Unidos n.º de publicación 2003/0149064.

El documento WO 2008/009458 A1 describe compuestos de pirimidina tales como compuestos de 2,4-di(arilamino)-pirimidina-5-carboxamida que presentan actividades de inhibición de las JAK-3 y JAK-2 quinastas. El documento EP1518855 A1 describe compuestos de diaminopirimidina carboxamida que se pueden utilizar para la prevención o el tratamiento de enfermedades respiratorias en las que STAT 6 está implicado, tales como asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y similares. El documento US 2004/0029902 A1 describe compuestos de 2,4-pirimidina diamina que inhiben las cascadas de señalización de los receptores de IgE y/o IgG, junto con métodos de síntesis de tales compuestos y métodos para el uso de tales compuestos en métodos de tratamiento médico.

Aunque se han hecho progresos en este campo, todavía existe una necesidad en la técnica de compuestos que inhiban la syk y/o JAK quinasa, así como de métodos para el tratamiento de afecciones en un paciente, tales como la reestenosis, la trombosis y/o la inflamación, que puedan beneficiarse de tal inhibición. Además, también sería conveniente la disponibilidad de compuestos que inhiban de forma selectiva una de estas quinastas en comparación con otras quinastas. La presente invención satisface esta y otras necesidades.

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona compuestos nuevos que tienen actividad como inhibidores de la actividad de syk (también denominados en el presente documento como "inhibidores de syk") y/o de la actividad de la JAK quinasa (también denominados en el presente documento como "inhibidores de JAK"), así como métodos para su preparación y uso, y composiciones farmacéuticas que contienen los mismos. Tales compuestos tienen la siguiente estructura (I):



o un tautómero, sal o estereoisómero de los mismo farmacéuticamente aceptable, en la que D<sup>1</sup>, R<sup>1</sup>, Y<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son como se definen más adelante.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un transportador y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Los compuestos de la presente invención tienen utilidad sobre un amplio intervalo de aplicaciones terapéuticas y pueden utilizarse para tratar una diversidad de afecciones, mediadas al menos en parte por la actividad de syk, tanto en hombres como en mujeres, así como en un mamífero en general (también denominado en el presente documento como un "sujeto"). Por ejemplo, tales trastornos incluyen, pero sin limitación, los asociados con enfermedad cardiovascular, enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria. En concreto, los compuestos de la presente

invención tienen utilidad para el tratamiento de afecciones o trastornos que incluyen, pero sin limitación: reestenosis, trombosis, inflamación, trombocitopenia inducida por heparina, miocardiopatía dilatada, anemia de células falciformes, aterosclerosis, infarto de miocardio, inflamación vascular, angina inestable, síndromes coronarios agudos, alergia, asma, artritis reumatoide, enfermedades mediadas por linfocitos B tales como linfomas no Hodgkin ,

5

10

síndrome antifosfolípido, lupus, psoriasis, esclerosis múltiple, nefropatía terminal, anemia hemolítica, púrpura trombocitopénica inmunitaria y leucemia linfocítica crónica. Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona un compuesto de fórmula (I), normalmente en la forma de una composición farmacéutica, para su uso en el tratamiento de un sujeto que lo necesite, incluyendo dicho tratamiento la administración de una cantidad eficaz de dicho compuesto.

15

20

Las afecciones asociadas con enfermedad cardiovascular se seleccionan del grupo que consiste en síndrome coronario agudo, infarto de miocardio, angina inestable, angina resistente, trombosis coronaria oclusiva que se presenta después de la terapia trombolítica o angioplastia poscoronaria, un síndrome cerebrovascular mediado de forma trombótica, ictus embólico, ictus trombótico, crisis isquémicas transitorias, flebotrombosis, flebotrombosis profunda, embolia pulmonar, coagulopatía, coagulación intravascular diseminada, púrpura trombocitopénica trombótica, tromboangitis obliterante, enfermedad trombótica asociada con trombocitopenia inducida por heparina, complicaciones trombóticas asociadas con la circulación extracorpórea, complicaciones trombóticas asociadas con la instrumentación tales como el cateterismo cardíaco u otros cateterismos cardiovasculares, globo de contrapulsación aórtica, estent coronario o válvula cardíaca, y afecciones que necesitan el ajuste de dispositivos protésicos.

25

Los compuestos de la presente invención también pueden utilizarse en un método para la inhibición de la actividad de syk de una muestra sanguínea, que comprende poner en contacto dicha muestra con un compuesto de la presente invención.

30

La presente invención proporciona adicionalmente compuestos en forma purificada, así como intermediarios químicos.

#### Breve descripción de los dibujos

35

Estos y otros aspectos, objetivos, características y ventajas de la invención serán obvios tras la referencia a la siguiente descripción detallada y las figuras. Para tal fin, se exponen en el presente documento diversas referencias que describen con más detalle determinada información anterior, procedimientos, compuestos y/o composiciones.

40

La Figura 1 muestra cómo Syk sirve como un mediador clave de la señalización mediada por el receptor Fc en la biología celular y en múltiples enfermedades.

La Figura 2 muestra cómo la manipulación genética dirigida de Syk indica que Syk sirve como un mediador clave en la biología de plaquetas arteriales y una diana selectiva para el tratamiento de la trombosis arterial.

La Figura 3 muestra una síntesis general de los compuestos de la presente invención.

45

La Figura 5 proporciona la Tabla 2, que ilustra los compuestos de la presente invención y las  $CI_{50}$  de Syk.

La Figura 8 muestra una serie de compuestos que se identificaron como que inhiben de forma selectiva a Syk en ensayos de quinasa purificada. Figura 8A) Compuestos de la serie específica para Syk (P459-72 y P505-15) y de la serie de multiquinasas (ejemplo 100b) se exploraron a 300 nM frente al panel de quinastas purificadas de Millipore (270 quinastas analizadas con ATP 10  $\mu$ M) para determinar la potencia y la selectividad por Syk. Los datos se representan como un mapa de calor, definido en la parte inferior. Figura 8B) Subconjunto de quinastas purificadas que tuvieron una inhibición > 80 % para cualquiera de los tres compuestos. P459-72 solamente inhibió a Syk y MLK1. P505-15 a 50 nM (~10x mayor que su  $CI_{50}$  para Syk) sólo inhibió a Syk. El ejemplo 100b inhibió a múltiples quinastas, incluyendo a Syk, JAK2 y JAK3. La  $CI_{50}$  de la inhibición de Syk se notifica para cada compuesto a la derecha del mapa de calor. La inhibición de quinasa porcentual se proporciona en cada panel dentro del mapa de calor.

50

55

La Figura 9 muestra la inhibición selectiva de Syk en líneas celulares de linfoma no Hodgkin. Los linfocitos B se estimularon con anticuerpo anti BCR en presencia de las concentraciones indicadas de los inhibidores específicos de Syk, P459-72 y P505-15 (Figura 9A y Figura 9B) o el inhibidor dual de Syk/JAK, el ejemplo 100b (Figura 9C). Después, se realizaron análisis por transferencia de Western de lisados de célula completa para evaluar la actividad de la Syk quinasa (pBLNK Y84 y BLNK total; los dos geles de la parte superior) y la actividad de la Src quinasa (pSyk Y352 y Syk total; los dos geles de la parte inferior). Los experimentos se realizaron 2-3 veces cada uno, los gráficos de barras representan la media  $\pm$  D.T. de pBLNK Y84. Las  $CI_{50}$  calculadas para la inhibición de la Syk quinasa se presentan encima de los gráficos.

60

La Figura 10 proporciona una comparación de la inhibición específica de Syk y dual de Syk/JAK en líneas celulares de LNH. Se estimularon linfocitos B con anti BCR (Figura 10A) o IL-4 (Figura 10B) durante 15 min en

presencia de diversas concentraciones de cada inhibidor, según se indica. Después, se evaluó en las células la inhibición de las rutas de señalización por fosfo-citometría de flujo. Figura 10A) Los gráficos de barras (media  $\pm$  D.T., n=3) representan la actividad de Src (IFM de pSyk Y352) y la actividad de Syk (IFM de pERK Y204) después de la estimulación del BCR en diversas condiciones de tratamiento. Figura 10B) Los gráficos de barras representan IFM de pSTAT-6 Y641 (media  $\pm$  D.T., n=3) después de la estimulación con IL-4 en presencia de diversas concentraciones de cada inhibidor, según se indica.

La Figura 11 muestra cómo los inhibidores específicos de Syk alteran la proliferación y supervivencia, e inducen la apoptosis, en líneas celulares de LNH. Las líneas celulares de LNH "de tipo BCR" dependientes de Syk y "de tipo no BCR" independiente de Syk se describieron anteriormente (Polo, Juszczynski *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 104(9): 3207-12 (2007). Figura 11A) Las células se trataron durante 72 h con el inhibidor P505-15 específico de Syk a 1 y 3  $\mu$ M. La apoptosis se determinó mediante análisis de FACS de la caspasa 3 activa; los datos se representan como histogramas. Figura 11B) Se analizó la sensibilidad específica de Syk (P459-72 y P505-15) en líneas celulares adicionales frente a la inhibición dual de Syk/JAK (ejemplo 100b). Los gráficos de barras representan la media  $\pm$  D.T. (n=3) del porcentaje de células positivas para caspasa 3 siguiendo cada condición.

#### Descripción detallada de la invención

Como se usa en el presente documento, los términos a continuación tienen los siguientes significados, a menos que se especifique otra cosa:

##### 1. Abreviaturas y definiciones

Las abreviaturas usadas en el presente documento son convencionales, a menos que se indique otra cosa. Se usan las siguientes abreviaturas: AcOH = ácido acético, AIBN = azobisisobutironitrilo (también azobisisobutylonitrilo), ac. = acuoso, Boc = t-butilcarboxi, Bz - bencilo, BOP = hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)-fosfonio, BPO = peróxido de benzoílo, nBuOH = n-butanol, CBr<sub>4</sub> = tetrabromometano, mCPBA = ácido m-cloroperoxibenzoico, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> o DCM = diclorometano, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> = carbonato de cesio, CuCl<sub>2</sub> = cloruro de cobre; DIBAL = hidruro de diisobutilaluminio, DIEA = base de Hunig o diisopropil etilamina, DME = dimetil éter, DMF = dimetil formamida, DMSO = dimetilsulfóxido, DPPA = difenil fosforil azida, Et<sub>3</sub>N = trietilamina, EtOAc = acetato de etilo, g = gramo, HATU = hexafluorofosfato de 2-(1H 7-Azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil uronio, H<sub>2</sub> = hidrógeno; H<sub>2</sub>O = agua; HBr = bromuro de hidrógeno; HCl = cloruro de hidrógeno, VIH = virus de la inmunodeficiencia humana, HPLC = cromatografía líquida de alta presión, h = hora, IgE = inmunoglobulina E, IC<sub>50</sub> = La concentración de un inhibidor que se requiere para una inhibición al 50 % de una enzima *in vitro*, IPA = alcohol isopropílico, kg = kilogramo, KCN = cianuro potásico, KOH = hidróxido potásico, K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = fosfato potásico, LDA = diisopropilamina de litio, LiAlH<sub>4</sub> = hidruro de litio y aluminio = LiOH: hidróxido de litio; MeCN = acetonitrilo; MS = Espec. de masas, m/z = relación masa-carga, MHz = Megahertzio, MeOH = metanol,  $\mu$ M = micromolar,  $\mu$ l = microlitro, mg = miligramo, mm = milímetro, mM = milimolar, mmol = milimol, ml = mililitro, mOD/min = unidades de densidad milióptica por minuto, min = minuto, M = molar, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> = carbonato sódico, ng = nanogramo, NaHCO<sub>3</sub> = bicarbonato sódico; NaNO<sub>2</sub> = nitrito sódico; NaOH = hidróxido sódico; Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = bisulfato sódico; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = sulfato sódico; NBS = N-bromosuccinamida; NH<sub>4</sub>Cl = cloruro de amonio; NH<sub>4</sub>OAc = acetato amónico; NaSMe = metiltiolato sódico, NBS = N-bromosuccinamida, n-BuLi = n-butil litio, nm = nanómetro, nM = nanomolar, N = Normal, NMP = N-metilpirrolidina, RMN = resonancia magnética nuclear, Pd/C = paladio sobre carbono, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> = *Tetraquis*-(trifenilfosfina)-paladio, pM = picomolar, Pin = pinacolato, PEG = polietilenglicol, PPh<sub>3</sub> o Ph<sub>3</sub>P = trifenil fosfina, RLV = virus de la leucemia Rauscher, Ra-Ni = Níquel Raney, SOCl<sub>2</sub> = cloruro de tionilo, TA = temperatura ambiente, TEA = trietilamina, THF = tetrahidrofurano, TFA = ácido trifluoroacético, TLC = cromatografía de capa fina, TMS = trimetilsililo, Tf = trifluorometilsulfonilo y TSC = citrato trisódico.

Se aprecia aquí que, como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, la formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen la referencia en plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

"Alquilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, se refiere, a menos que se indique otra cosa, a un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificada, completamente saturado alifático que tiene el número de átomos de carbono designado. Por ejemplo, "alquilo C<sub>1-8</sub>" se refiere a un radical hidrocarburo lineal o ramificado, que contiene de 1 a 8 átomos de carbono que se obtiene por la eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono de un alcano precursor. La expresión "alquilo sin sustituir" se refiere a grupos alquilo que no contienen grupos distintos de los radicales hidrocarburo alifáticos completamente saturados. Por lo tanto, la frase incluye grupos alquilo de cadena lineal tales como metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo y similares. La expresión también incluye isómeros de cadena ramificada de grupos alquilo de cadena lineal tales como isopropilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, y similares. Los grupos alquilo representativos incluyen grupos alquilo de cadena lineal y ramificada que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 átomos de carbono. Los grupos alquilo representativos adicionales incluyen grupos alquilo de cadena lineal y ramificada que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 átomos de carbono.

"Alquenilo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente, se refiere a una cadena lineal o ramificada, que puede ser mono o poliinsaturada, que tiene el número de átomos de carbono designado. Por ejemplo, "alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>" se refiere a un radical alquenilo que tiene de 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 átomos que se obtiene mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono de un alcano precursor. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación vinilo, 2-propenilo, es decir-CH=C(H)(CH<sub>3</sub>), -CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)=C(H)<sub>2</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)=C(H)(CH<sub>3</sub>), -C(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)=CH<sub>2</sub>, butadienilo, por ejemplo, 2-(butadienilo), pentadienilo, por ejemplo 2,4-pentadienilo y 3-(1,4-pentadienilo), y hexadienilo, entre otros, y homólogos superiores y estereoisómeros de los mismos. Un grupo alquenilo "sustituido" incluye grupos alquenilo en los que un átomo no carbono o no hidrógeno está unido a un carbono doble unido a otro carbono y aquellos en los que uno de los átomos no carbono o no hidrógeno está unido a un carbono no implicado en un doble enlace a otro carbono. Cada sitio de insaturación puede ser de configuración cis o trans sobre el doble o dobles enlaces.

El término "alquinilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificada, que puede estar mono o poliinsaturado, que tiene el número de átomos de carbono designado. Por ejemplo, "alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>" se refiere a un radical alquinilo que tiene de 2 a 8 átomos de carbono que se obtiene por la eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono de un alcano precursor. "Alquinilo sin sustituir" se refiere a grupos de cadena lineal y ramificada tales como los descritos con respecto a los grupos alquilo sin sustituir como se ha definido anteriormente, excepto que existe al menos un triple enlace entre dos átomos de carbono. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, etinilo, por ejemplo, -C≡C(H), 1-propinilo, por ejemplo, -C≡C(CH<sub>3</sub>), -C≡C(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), -C(H)<sub>2</sub>C≡C(H), -C(H)<sub>2</sub>C≡C(CH<sub>3</sub>), y -C(H)<sub>2</sub>C≡C(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) entre otros, y homólogos superiores e isómeros de los mismos. Un grupo alquinilo "sustituido" incluye grupos alquinilo en los que un átomo no carbono o no hidrógeno está unido a un triple carbono unido a otro carbono y aquellos en los que un átomo no carbono o no hidrogeno está unido a un carbono no implicado en un triple enlace a otro carbono.

"Alquileo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un radical divalente obtenido a partir de un alcano, como se ilustra por -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-. Típicamente, un grupo alquileo tendrá 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 átomos de carbono, que se obtiene por la eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono de un alquilo precursor.

"Cicloalquilo" o "carbociclo", por sí mismos o junto con otros términos, representan, a menos que se indique otra cosa, versiones cíclicas de "alquilo", "alquenilo" y "alquinilo" en las que todos los átomos en el anillo son carbono. "Cicloalquilo" o "carbociclo" se refiere a un grupo mono o policíclico. Cuando se usa junto con sustituyentes cicloalquilo, el término "policíclico" se refiere en el presente documento a estructuras cíclicas alquilo condensadas o no condensadas. "Cicloalquilo" o "carbociclo" puede formar un anillo puenteado o un anillo espiro. El grupo cicloalquilo puede tener uno o más dobles o triples enlaces. El término "cicloalquenilo" se refiere a un grupo cicloalquilo que tiene al menos un sitio de insaturación alquenilo entre los vértices anulares. El término "cicloalquinilo" se refiere a un grupo cicloalquilo que tiene al menos un sitio de insaturación alquinilo entre los vértices anulares. Cuando "cicloalquilo" se usa junto con "alquilo", como en cicloalquil C<sub>3-8</sub>-alquileo C<sub>3-8</sub>-, la porción cicloalquilo tiene que tener el número indicado de átomos de carbono (por ejemplo, de tres a ocho átomos de carbono), mientras que la porción alquileo tiene de uno a ocho átomos de carbono. Los sustituyentes cicloalquilo típicos tienen de 3 a 8 átomos en el anillo. Los ejemplos de cicloalquilo incluyen ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo, y similares.

"Ariilo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un grupo hidrocarburo poliinsaturado, aromático, que contiene de 6 a 14 átomos de carbono, que puede ser un único anillo o múltiples anillos (hasta tres anillos) que están condensados entre sí o unidos covalentemente. Por lo tanto, la frase incluye, pero sin limitación, grupos tales como fenilo, bifenilo, antraceno, naftilo a modo de ejemplo. Los ejemplos no limitantes de grupos ariilo sin sustituir incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo y 4-bifenilo. "Grupo ariilo sustituido" incluye, por ejemplo, -CH<sub>2</sub>OH (un átomo de carbono y un heteroátomo que reemplaza un átomo de carbono) y -CH<sub>2</sub>SH. El término "heteroalquileo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un radical divalente obtenido a partir de heteroalquilo, como se ilustra por -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- y -CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-. Para los grupos heteroalquileo, los heteroátomos también pueden ocupar cualquiera o ambos de los extremos de la cadena (por ejemplo, alquileooxi, alquileoiodo, alquileoamino, alquileoamino, y similares). Aún adicionalmente, para los grupos de unión de alquileo y heteroalquileo, no está implicada ninguna orientación del grupo de unión.

Las expresiones "heterociclo", "heterociclilo" o "heterocíclico" se refiere a un grupo cíclico saturado o insaturado no aromático que contiene al menos un heteroátomo. Como se usa en el presente documento, el término "heteroátomo" pretende incluir oxígeno (O), nitrógeno (N), azufre (S) y silicio (Si). Cada heterociclo puede estar unido en cualquier carbono o heteroátomo del anillo disponible. Cada heterociclo puede tener uno o más anillos. Cuando están presentes múltiples anillos, pueden condensarse entre sí o unirse covalentemente. Cada heterociclo contiene típicamente 1, 2, 3, 4 o 5, heteroátomos independientemente seleccionados. Preferiblemente, estos grupos contienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 átomos de carbono, 0, 1, 2, 3, 4 o 5 átomos de nitrógeno, 0, 1 o 2 átomos de azufre y 0, 1 o 2 átomos de oxígeno. Más preferiblemente, estos grupos contienen 1, 2 o 3 átomos de nitrógeno, 0-1 átomos de azufre y 0-1 átomos de oxígeno. Los ejemplos no limitantes de grupos heterociclo incluyen morfolin-3-ona, piperazin-2-ona, piperazin-1-óxido, piridin-2-ona, piperidina, morfolina, piperazina, isoxazolina, pirazolina, imidazolina, pirazol-5-ona, pirrolidin-2,5-diona, imidazolidin-2,4-diona, pirrolidina, tetrahydroquinolinilo,

decahidroquinolinilo, tetrahidrobenzooxazepinil dihidrodibenzooxepin y similares.

"Heteroarilo" se refiere a un radical aromático cíclico o policíclico que contiene de uno a cinco heteroátomos seleccionados entre N, O y S, en el que los átomos de nitrógeno y azufre están opcionalmente oxidados, y el átomo o átomos de nitrógeno están opcionalmente cuaternizados. Un grupo heteroarilo puede estar unido al resto de la molécula a través de un heteroátomo o a través de un átomo de carbono, y puede contener de 5 a 10 átomos de carbono. Los ejemplos no limitantes de grupos heteroarilo incluyen 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 1-pirazolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo y 4-pirimidilo. Si no se indica específicamente, los sustituyentes para cada uno de los sistemas anulares arilo y heteroarilo indicados anteriormente se seleccionan entre el grupo de sustituyentes aceptables descritos en el presente documento. "Heteroarilo sustituido" se refiere a un grupo heteroarilo sin sustituir como se ha definido anteriormente, en el que uno o más de los miembros en el anillo están unidos a un átomo no hidrógeno, tal como se ha descrito anteriormente con respecto a los grupos alquilo sustituidos y los grupos arilo sustituidos. Los sustituyentes representativos incluyen grupos alquilo de cadena lineal y ramificada -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -CH<sub>2</sub>OH, -OH, -OCH<sub>3</sub>, -OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -OCF<sub>3</sub>, -OC(=O)CH<sub>3</sub>, -OC(=O)NH<sub>2</sub>, -OC(=O)N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CN, -NO<sub>2</sub>, -C(=O)CH<sub>3</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CONH<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -NHCOCH<sub>3</sub>, NHC(=O)OCH<sub>3</sub>, -NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> y halo.

"Heteroarilo bicíclico" se refiere a un radical aromático bicíclico que contiene de uno a cinco heteroátomos seleccionados entre N, O y S, en el que los átomos de nitrógeno y azufre están oxidados opcionalmente, y el átomo o átomos de nitrógeno están opcionalmente cuaternizados. Un grupo heteroarilo bicíclico puede unirse al resto de la molécula a través de un heteroátomo o a través de un átomo de carbono, y puede contener de 5 a 10 átomos de carbono. Los ejemplos no limitantes de grupos heteroarilo bicíclicos incluyen 5-benzotiazolilo, purinilo, 2-bencimidazolilo, benzopirazolilo, 5-indolilo, azaindol, 1-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 2-quinoxalinilo, 5-quinoxalinilo, 3-quinolilo y 6-quinolilo. Si no se indica específicamente, los sustituyentes para cada uno de los sistemas anulares arilo y heteroarilo indicados anteriormente se seleccionan entre el grupo de sustituyentes aceptables descritos en el presente documento.

En cada una de las realizaciones anteriores, la designación de un número de átomos, por ejemplo "C<sub>1-8</sub>" pretende incluir todas las realizaciones posibles que tienen un átomo menos. Los ejemplos no limitantes incluyen C<sub>1-7</sub>, C<sub>2-8</sub>, C<sub>2-7</sub>, C<sub>3-8</sub>, C<sub>3-7</sub> y similares.

Cada de los términos en el presente documento (por ejemplo, "alquilo", "heteroalquilo", "arilo" y "heteroarilo") pretende incluir tanto formas "sin sustituir" como opcionalmente "sustituidas" del radical indicado, a menos que se indique otra cosa. Típicamente, cada radical está sustituido con 0, 1, 2, 3, 4 o 5 sustituyentes, a menos que se indique otra cosa. A continuación se proporcionan ejemplos de sustituyentes para cada tipo de radical.

"Sustituido" se refiere a un grupo como se define en el presente documento, en el que uno o más enlaces a uno o más carbono o uno o más hidrógeno se reemplazan por un enlace a "sustituyentes" de átomos no hidrógeno y no carbono, tal como, pero sin limitación, un átomo de halógeno, tal como F, Cl, Br e I; un átomo de oxígeno en grupos tales como grupos hidroxilo, grupos alcoxi, grupos ariloxi y grupos aciloxi; un átomo de azufre en grupos tales como grupos tiol, grupos sulfuro de alquilo y arilo, grupos sulfona, grupos sulfonilo, y grupos sulfóxido; un átomo de nitrógeno en grupos tales como amino, alquilaminas, dialquilaminas, arilaminas, alquilarilaminas, diarilaminas, alcóxiamino, hidroxiamino, acilamino, sulfonilamino, N-óxidos, imidas y enaminas; y otros heteroátomos en diversos grupos diferentes. Los "sustituyentes" también incluyen grupos en los que uno o más enlaces a un átomo de uno o más carbono o hidrógeno se reemplazan por un enlace de orden superior (por ejemplo, un enlace doble o triple) a un heteroátomo, tal como oxígeno en grupos oxo, acilo, amido, alcóxicarbonilo, aminocarbonilo, carboxilo y éster; nitrógeno en grupos tales como iminas, oximas, hidrazonas y nitrilos. Los "sustituyentes" incluyen adicionalmente grupos en los que uno o más enlaces a uno o más átomos de carbono o hidrógeno se reemplazan por un enlace a un grupo cicloalquilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo. Los "sustituyentes" representativos incluyen, entre otros, grupos en los que uno o más enlaces a un átomo de carbono o hidrógeno se reemplazan por uno o más enlaces a un grupo flúor, cloro o bromo. Otro "sustituyente" representativo es el grupo trifluorometilo y otros grupos que contienen el grupo trifluorometilo. Otros "sustituyentes" representativos incluyen aquellos en los que uno o más enlaces a un átomo de carbono o hidrógeno se reemplazan por un enlace a un átomo de oxígeno de tal forma que el grupo alquilo sustituido contiene un grupo hidroxilo, alcoxi o ariloxi. Otros "sustituyentes" representativos incluyen grupos alquilo que tienen una amina, o un grupo alquilamina sustituida o sin sustituir, dialquilamina, arilamina, (alquil)(aril)amina, diarilamina, heterocicililamina, diheterocicililamina, (alquil)(heterocicilil)amina, o (aril)(heterocicilil)amina. Aún otros "sustituyentes" representativos incluyen aquellos en los que uno o más enlaces a uno o más átomos de carbono o hidrógeno se reemplazan por un enlace a un grupo alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo o heterociclilo.

Los grupos definidos en el presente documento pueden incluir prefijos y/o sufijos que se usan comúnmente en la técnica para crear grupos de sustituyentes ya reconocidos adicionales. Como ejemplos, "alquilamino" se refiere a un grupo de la fórmula -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>. A menos que se indique otra cosa, para los siguientes grupos que contienen R<sup>a</sup>, R<sup>b</sup>, R<sup>c</sup>, R<sup>d</sup> y R<sup>e</sup>: cada uno de R<sup>a</sup>, y R<sup>b</sup> se selecciona independientemente entre H, alquilo, alcoxi, tioalcoxi, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, o heterociclilo o están opcionalmente unidos junto con el átomo o átomos a los que están unidos para

formar un grupo cíclico. Cuando R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> están unidos al mismo átomo de nitrógeno, pueden combinarse con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 o 7 miembros. Por ejemplo, -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup> pretende incluir 1-pirrolidino y 4-morfolino.

- 5 Cada uno de R<sup>c</sup>, R<sup>d</sup>, R<sup>e</sup> y R<sup>f</sup> se selecciona independientemente entre alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno, arilo, heteroarilo, heterociclilo o alquenoarilo como se define en el presente documento.

10 Típicamente, un radical particular tendrá 0, 1, 2 o 3 sustituyentes, siendo preferidos en la presente invención aquellos grupos que tienen dos o menos sustituyentes. Más preferiblemente, un radical estará sin sustituir o monosustituido. Más preferiblemente, un radical estará sin sustituir.

15 Los "sustituyentes" para los radicales alquilo y heteroalquilo (así como aquellos grupos denominados como alqueno, alqueno, heteroalqueno, heteroalqueno, alquino, cicloalquilo, heterociclilo) pueden ser una diversidad de grupos seleccionados entre: -OR<sup>a</sup>, =O, =NR<sup>a</sup>, =N-OR<sup>a</sup>, -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -SR<sup>a</sup>, halógeno, -SiR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>R<sup>c</sup>, -OC(O)R<sup>a</sup>, -C(O)R<sup>a</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -OC(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>b</sup>C(O)R<sup>a</sup>, -NR<sup>a</sup>-C(O)NR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>, -NR<sup>a</sup>-SO<sub>2</sub>NR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>, -NR<sup>b</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -NH-C(NH<sub>2</sub>)=NH, -NR<sup>a</sup>C(NH<sub>2</sub>)=NH, -NH-C(NH<sub>2</sub>)=NR<sup>a</sup>, -S(O) R<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>b</sup>SO<sub>2</sub>R, -CN y -NO<sub>2</sub>, en un número que varía de cero a tres, siendo particularmente preferidos aquellos grupos que tengan cero, uno o dos sustituyentes.

20 En algunas realizaciones, los "sustituyentes" para los radicales alquilo y heteroalquilo se seleccionan entre: -OR<sup>a</sup>, =O, -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -SR<sup>a</sup>, halógeno, -SiR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>R<sup>c</sup>, -OC(O)R<sup>a</sup>, -C(O)R<sup>a</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -OC(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>b</sup>C(O)R<sup>a</sup>, -NR<sup>b</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -NR<sup>a</sup>-SO<sub>2</sub>NR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>, -S(O) R<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>c</sup>SO<sub>2</sub>R, -CN y -NO<sub>2</sub>, donde R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> son como se han definido anteriormente. En algunas realizaciones, los sustituyentes se seleccionan entre: -OR<sup>a</sup>, =O, -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, halógeno, -OC(O) R<sup>a</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -OC(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>b</sup>C(O)R<sup>a</sup>, -NR<sup>b</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -NR<sup>a</sup>-SO<sub>2</sub>NR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>c</sup>SO<sub>2</sub>R, -CN y -NO<sub>2</sub>.

25 Los ejemplos de alquilo sustituido son: -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>3</sub>), -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>C(=CH<sub>2</sub>)CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>C(=O)CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>S(=O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>H. Los ejemplos de sustituyentes de alquilo sustituido son: CH<sub>2</sub>OH, -OH, -OCH<sub>3</sub>, -OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -OCF<sub>3</sub>, -OC(=O)CH<sub>3</sub>, -OC(=O)NH<sub>2</sub>, -OC(=O)N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CN, NO<sub>2</sub>, -C(=O)CH<sub>3</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CONH<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -NHCOCH<sub>3</sub>, -NHC(=O)OCH<sub>3</sub>, -NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, y halo.

30 De forma análoga, los "sustituyentes" para los grupos arilo y heteroarilo son variados y se seleccionan entre: -halógeno, -OR<sup>a</sup>, -OC(O) R<sup>a</sup>, -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -SR<sup>a</sup>, -R<sup>a</sup>, -CN, -NO<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -C(O) R<sup>a</sup>, -OC(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>b</sup>C(O) R<sup>a</sup>, -NR<sup>b</sup>C(O)<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -NR<sup>a</sup>-C(O)NR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>, -NH-C(NH<sub>2</sub>)=NH, -NR<sup>a</sup>C(NH<sub>2</sub>)=NH, -NH-C(NH<sub>2</sub>)=NR<sup>a</sup>, -S(O) R<sup>a</sup>, -S(O)<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -S(O)<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -N<sub>3</sub>, -CH(Ph)<sub>2</sub>, perfluoroalcoxi C<sub>1-8</sub>, y perfluoroalquilo C<sub>1-8</sub>, en un número que varía de cero al número total de valencias abiertas en el sistema anular aromático; y donde R<sup>a</sup>, R<sup>b</sup> y R<sup>c</sup> se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub> y heteroalquilo, arilo y heteroarilo sin sustituir, (aril sin sustituir)-alquilo C<sub>1-8</sub>, y (aril sin sustituir)oxi-alquilo C<sub>1-8</sub>.

40 Dos de los "sustituyentes" en átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden reemplazarse opcionalmente con un sustituyente de la fórmula -T-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-U-, en la que T y U son independientemente -NH-, -O-, -CH<sub>2</sub>- o un enlace sencillo, y q es 0, 1 o 2. Como alternativa, dos de los sustituyentes en los átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden reemplazarse opcionalmente con un sustituyente de la fórmula -A-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-B-, en la que A y B son independientemente -CH<sub>2</sub>-, -O-, -NH-, -S-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>- o un enlace sencillo, y r es 1, 2 o 3. Uno de los enlaces sencillos del nuevo anillo formado de este modo puede reemplazarse opcionalmente con un doble enlace. Como alternativa, dos de los sustituyentes en los átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden reemplazarse opcionalmente con un sustituyente de la fórmula -(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>-X-(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-, donde s y t son independientemente números enteros de 0 a 3, y X es -O-, -NR<sup>a</sup>-, -S-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, o -S(O)<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>-. El sustituyente R<sup>a</sup> en -NR<sup>a</sup>- y -S(O)<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>- se selecciona entre hidrógeno o alquilo C<sub>1-6</sub> sin sustituir. De otro modo, R' es como se ha definido anteriormente.

50 A menos que se indique otra cosa, la nomenclatura de los sustituyentes que no se definen explícitamente en el presente documento se obtiene nombrando la porción terminal de la funcionalidad seguido de la funcionalidad adyacente hacia el punto de unión. Por ejemplo, el sustituyente "arilalquiloalcoxi" se refiere al grupo (aril)-(alquil)-O-C(O)-.

55 El término "acilo" se refiere al grupo -C(=O)R<sub>c</sub>, donde R<sub>c</sub> es alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno, arilo, heteroarilo o heterociclilo. Acilo incluye el grupo "acetilo" -C(=O)CH<sub>3</sub>.

60 "Acilamino-" se refiere al grupo -NR<sup>a</sup>C(=O)R<sub>c</sub>, donde R<sub>c</sub> es alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno, arilo, heteroarilo o heterociclilo.

"Aciloxi" se refiere a -OC(=O)-R<sub>c</sub>, donde R<sub>c</sub> es alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno, arilo, heteroarilo o heterociclilo.

65 "Alcoxi" se refiere a -OR<sub>d</sub>, en la que R<sub>d</sub> es alquilo como se define en el presente documento. Los ejemplos representativos de grupos alcoxi incluyen metoxi, etoxi, *t*-butoxi, trifluorometoxi, y similares.



medicinal junto con la divulgación en el presente documento.

"Aminocarbonilamino" se refiere al grupo  $-NR^aC(O)NR^aR^b$ , en el que  $R^a$  es hidrógeno o alquilo y  $R^a$  y  $R^b$  independientemente se seleccionan entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, cicloalquilo, cicloalqueno, heteroarilo, heterocíclico, y donde  $R^a$  y  $R^b$  están unidos opcionalmente junto con el nitrógeno unido a los mismos para formar un grupo heterocíclico o heterocíclico sustituido.

"Aminosulfonilo" se refiere a  $-S(O)_2NR^aR^b$  donde R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalqueno, cicloalqueno sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, y donde  $R^a$  y  $R^b$  están unidos opcionalmente junto con el nitrógeno unido a los mismos para formar un grupo heterocíclico o heterocíclico sustituido y alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalqueno, cicloalqueno sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido son como se definen en el presente documento.

"Aminosulfoniloxi" se refiere al grupo  $-O-SO_2NR^aR^b$ , en el que  $R^a$  y  $R^b$  independientemente se seleccionan entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, cicloalquilo, cicloalqueno, heteroarilo y heterocíclico;  $R^a$  y  $R^b$  están unidos opcionalmente junto con el nitrógeno unido a los mismos para formar un grupo heterocíclico o heterocíclico sustituido.

"Aminosulfonilamino" se refiere al grupo  $-NR^a-SO_2NR^bR^c$ , en el que  $R^a$  es hidrógeno o alquilo y  $R^b$  y  $R^c$  independientemente se seleccionan entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalqueno, cicloalqueno sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, y heterocíclico sustituido, y donde  $R^b$  y  $R^c$  están unidos opcionalmente junto con el nitrógeno unido a los mismos para formar un grupo heterocíclico o heterocíclico sustituido, y en el que alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalqueno, cicloalqueno sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido son como se definen en el presente documento.

"Aminotiocarbonilo" se refiere al grupo  $-C(S)NR^aR^b$ , en el que  $R^a$  y  $R^b$  independientemente se seleccionan entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalqueno, cicloalqueno sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, y heterocíclico sustituido, y donde  $R^a$  y  $R^b$  están unidos opcionalmente junto con el nitrógeno unido a los mismos para formar un grupo heterocíclico o heterocíclico sustituido, y en el que alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalqueno, cicloalqueno sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, y heterocíclico sustituido son como se definen en el presente documento.

"Aminotiocarbonilamino" se refiere al grupo  $-NR^aC(S)NR^aR^b$ , en el que  $R^a$  es hidrógeno o alquilo y  $R^b$  y  $R^c$  están unidos opcionalmente junto con el nitrógeno unido a los mismos para formar un grupo heterocíclico o heterocíclico sustituido.

"Arlcarbonilo" se refiere al grupo  $-C(=O)R_c$ , donde  $R_c$  es arilo.

"Arlcarbonilamino" se refiere a  $-NR^aC(=O)R_c$ , en la que  $R_c$  es arilo.

"Arlcarboniloxi" se refiere a  $-OC(=O)-R_c$ , donde  $R_c$  es arilo.

"Arlloxi" se refiere a  $-OR_d$ , donde  $R_d$  es arilo. Los ejemplos representativos de grupos ariloxi incluyen fenoxi, naftoxi, y similares.

"Arlloxicarbonilo" se refiere a  $-C(=O)OR_d$ , en la que  $R_d$  es arilo.

"Arlloxicarbonilamino" se refiere a  $-NR^aC(=O)OR_d$ , en la que  $R_d$  es arilo.

"Arlsulfanilo", "arilitio" o "tioariloxi" se refiere al grupo  $S-R^d$ , donde  $R^d$  es arilo.

"Arlsulfonilo" se refiere a  $-S(=O)_2R^e$ , donde  $R^e$  es arilo.

"Arlsulfonilamino" se refiere a  $NR^aS(=O)_2R^e$  en la que  $R^e$  es arilo.

"Arilitio" se refiere al grupo  $-S$ -arilo, en el que arilo es como se define en el presente documento. En otras realizaciones, el azufre puede oxidarse para dar los restos  $-S(O)-$  o  $-SO_2-$ . El sulfóxido puede existir como uno o más estereoisómeros.

- "Azido" se refiere a  $-N_3$ .
- "Enlace" cuando se usa un elemento en un grupo Markush, significa que el grupo correspondiente no existe, y los grupos de ambos lados están unidos directamente.
- 5 "Carbonilo" se refiere al grupo divalente  $-C(=O)-$ .
- "Carboxi" o "carboxilo" se refiere al grupo  $-CO_2H$ .
- 10 "Carboxil éster" o "carboxi éster" se refiere a los grupos  $-C(=O)OR^c$ .
- "(Carboxil éster)amino" se refiere a los grupos  $-NR^a-C(=O)OR^c$ , donde  $R^a$  es alquilo o hidrógeno.
- 15 "(Carboxil éster)oxi" o "Carbonato éster" se refiere a los grupos  $-O-C(=O)OR^c$ .
- "Ciano" se refiere a  $-CN$ .
- "Cicloalcoxi" se refiere a  $-OR^d$  donde  $R^d$  es cicloalquilo.
- 20 "Cicloalcoxycarbonilo" se refiere a  $-C(=O)OR_d$ , en la que  $R_d$  es cicloalquilo.
- "Cicloalcoxycarbonilamino" se refiere a  $NR^aC(=O)OR_d$ , en la que  $R_d$  es cicloalquilo.
- 25 "Cicloalquilalquileno" se refiere a un radical  $-R^xR^y$  en el que  $R^x$  es un grupo alquileno y  $R^y$  es un grupo cicloalquilo como se define en el presente documento, por ejemplo, ciclopropilmetilo, ciclohexenilpropilo, 3-ciclohexil-2-metilpropilo, y similares.
- "Cicloalquilcarbonilo" se refiere al grupo  $-C(=O)R^c$  donde  $R^c$  es cicloalquilo.
- 30 "Cicloalquilcarbonilamino" se refiere a  $NR^aC(=O)R^c$  en la que  $R^c$  es cicloalquilo.
- "Cicloalquilcarboniloxi" se refiere a  $-OC(=O)-R^c$  donde  $R^c$  es cicloalquilo.
- 35 "Cicloalquilsulfonilamino" se refiere a  $NR^aS(=O)_2-R^e$  en la que  $R^e$  es cicloalquilo.
- "Cicloalquiltio" se refiere a  $-S$ -cicloalquilo. En otras realizaciones, el azufre puede oxidarse para dar los restos  $-S(O)-$  o  $-SO_2-$ . El sulfóxido puede existir en forma de uno o más estereoisómeros.
- 40 "Cicloalquenilox" se refiere a  $-O$ -cicloalquenilo.
- "Cicloalqueniltio" se refiere a  $-S$ -cicloalquenilo. En otras realizaciones, el azufre puede oxidarse para dar los restos sulfinilo o sulfonilo. El sulfóxido puede existir en forma de uno o más estereoisómeros.
- 45 "Éster" se refiere a  $-C(=O)OR_d$ , en la que  $R_d$  es alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, o heterociclilo.
- "Guanidino" se refiere al grupo  $-NHC(=NH)NH_2$ .
- 50 "Halo" o "halógeno", por sí mismos o como parte de otro sustituyente, se refieren, a menos que se indique otra cosa, a un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo. Además, los términos tales como "haloalquilo", pretenden incluir alquilo en el que uno o más hidrógenos están sustituidos con átomos de halógeno que pueden ser iguales o diferentes, en un número que varía de uno hasta el número máximo de halógenos permitido, por ejemplo, para alquilo,  $(2m'+1)$ , donde  $m'$  es el número total de átomos de carbono en el grupo alquilo. Por ejemplo, el término "haloalquilo  $C_{1-8}$ " pretende incluir trifluorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 4-clorobutilo, 3-bromopropilo, y similares. El término "perhaloalquilo" se refiere, a menos que se indique otra cosa, a alquilo sustituido con  $(2m'+1)$  átomos de halógeno, donde  $m'$  es el
- 55 número total de átomos de carbono en el grupo alquilo. Por ejemplo, el término "perhaloalquilo  $C_{1-8}$ ", pretende incluir trifluorometilo, pentacloroetilo, 1,1,1-trifluoro-2-bromo-2-cloroetilo, y similares. Además, el término "haloalcoxi" se refiere a un radical alcoxi sustituido con uno o más átomos de halógeno.
- 60 "Heteroalquilo" se refiere a un radical alquilo como se define en el presente documento, con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados independientemente entre ciano,  $-OR^w$ ,  $-NR^xR^y$ , y  $-S(O)_nR^z$  (donde  $n$  es un número entero de 0 a 2), con el entendimiento de que el punto de unión del radical heteroalquilo es a través de un átomo de carbono del radical heteroalquilo.  $R^w$  es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloalquil-alquilo, arilo, araalquilo, alcoxycarbonilo, ariloxycarbonilo, carboxamido, o mono- o di-alquilcarbamoilo.  $R^x$  es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloalquil-alquilo, arilo o araalquilo.  $R^y$  es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloalquil-alquilo, arilo, araalquilo, alcoxycarbonilo, ariloxycarbonilo, carboxamido, mono- o di-alquilcarbamoilo o alquilsulfonilo.  $R^z$  es hidrógeno (siempre que  $n$  sea 0), alquilo, cicloalquilo, cicloalquil-alquilo, arilo, araalquilo, amino, mono-alquilamino, di-
- 65

- alquilamino, o hidroxialquilo. Los ejemplos representativos incluyen, por ejemplo, 2-hidroxiethyl, 2,3-dihidroxi-propilo, 2-metoxiethyl, benciloximetilo, 2-cianoethyl y 2-metilsulfonil-ethyl. Para cada uno de los anteriores,  $R^w$ ,  $R^x$ ,  $R^y$ , y  $R^z$  pueden estar sustituidos adicionalmente por amino, flúor, alquilamino, di-alquilamino, OH o alcoxi. Además, el prefijo que indica el número de átomos de carbono (por ejemplo,  $C_1$ - $C_{10}$ ) se refiere al número total de átomos de carbono en la porción del grupo heteroalquilo exclusiva de las porciones ciano,  $-OR^w$ ,  $-NR^xR^y$ , o  $-S(O)_nR^z$ .
- 5 "Heteroarilcarbonilo" se refiere al grupo  $-C(=O)R^c$ , donde  $R^c$  es heteroarilo.
- "Heteroarilcarbonilamino" se refiere a  $-NR^aC(=O)R^c$  en la que  $R^c$  es heteroarilo.
- 10 "Heteroarilcarboniloxi" se refiere a  $-OC(=O)-R^c$  donde  $R^c$  es heteroarilo.
- "Heteroariloxi" se refiere a  $-OR_d$ , donde  $R_d$  es heteroarilo.
- 15 "Heteroariloxicarbonilo" se refiere a  $-C(=O)OR_d$ , en la que  $R_d$  es heteroarilo.
- "Heteroariloxicarbonilamino" se refiere a  $NR^aC(=O)OR_d$ , en la que  $R_d$  es heteroarilo.
- "Heteroarilsulfonilamino" se refiere a  $NR^aS(=O)_2-R_e$ , en la que  $R_e$  es heteroarilo.
- 20 "Heteroariltio" se refiere al grupo  $--S$ -heteroarilo. En otras realizaciones, el azufre puede oxidarse para dar los restos  $-S(O)-$  o  $-SO_2-$ . El sulfóxido puede existir en forma de uno o más estereoisómeros.
- "Heterociclilalquilo" o "Cicloheteroalquil-alquilo" significa un radical  $-R^xR^y$  donde  $R^x$  es un grupo alquileo y  $R^y$  es un grupo heterociclilo como se define en el presente documento, por ejemplo, tetrahidropiran-2-ilmetilo, 4-(4-sustituido-fenil)piperazin-1-ilmetilo, 3-piperidiniletilo, y similares.
- 25 "Heterocicloxicarbonilamino" se refiere a  $NR^aC(=O)OR_d$ , en la que  $R_d$  es heterociclilo.
- 30 "Heterociclilcarbonilo" se refiere a  $-C(=O)R_c$ , donde  $R_c$  es heterociclilo.
- "Heterociclilcarbonilamino" se refiere a  $NR^aC(=O)R^c$  en la que  $R^c$  es heterociclilo.
- "Heterociclilcarboniloxi" se refiere a  $-OC(=O)-R_c$ , donde  $R_c$  es heterociclilo.
- 35 "Heterocicliloxi" se refiere a  $-OR_d$ , donde  $R_d$  es heterociclilo.
- "Heterocicliloxicarbonilo" se refiere a  $-C(=O)OR_d$ , en la que  $R_d$  es heterociclilo.
- 40 "Heterociclilsulfonilo" se refiere a  $-S(=O)_2R^e$  donde  $R^e$  es heterociclilo.
- "Heterociclilsulfonilamino" se refiere a  $NR^aS(=O)_2-R_e$ , en la que  $R_e$  es heterociclilo.
- 45 "Heterocicliltio" se refiere al grupo  $-S$ -heterociclilo. En otras realizaciones, el azufre puede oxidarse para dar los restos  $-S(O)-$  o  $-SO_2-$ . El sulfóxido puede existir en forma de uno o más estereoisómeros.
- "Hidroxi" o "hidroxilo" se refiere al grupo  $-OH$ .
- 50 "Hidroxiamino" se refiere al grupo  $NHOH$ .
- "Nitro" se refiere a  $-NO_2$ .
- "Nitroso" se refiere al grupo  $--NO$ .
- 55 Las expresiones "opcional" u "opcionalmente" como se usan a lo largo de toda la memoria descriptiva significan que el evento o circunstancia descrita posteriormente puede no ocurrir necesariamente, y que la descripción incluye casos en los que el evento o circunstancia se produce y casos en los que no. Por ejemplo, "grupo heterociclo opcionalmente mono o di-sustituido con un grupo alquilo" significa que el alquilo puede no estar presente necesariamente, y la descripción incluye situaciones en las que el grupo heterociclo está mono o disustituido con un grupo alquilo y situaciones en las que el grupo heterociclo no está sustituido con el grupo alquilo.
- 60 "Opcionalmente sustituido" significa un anillo que está opcionalmente sustituido independientemente con sustituyentes. Un sitio de un grupo que está sin sustituir puede sustituirse con hidrógeno.
- 65 "Oxo" se refiere al grupo divalente  $=O$ .

"Sulfanilo" se refiere al grupo  $-SR^f$  donde  $R^f$  es como se define en el presente documento.

"Sulfinilo" se refiere al grupo  $-S(=O)-R^c$  donde  $R^c$  es como se define en el presente documento.

5 "Ácido sulfónico" se refiere al grupo  $-S(O)_2-OH$ .

"Sulfonilo" se refiere al grupo  $-S(O)_2-R^e$  donde  $R^e$  es como se define en el presente documento.

10 "Sulfonilamino" se refiere a  $NR^aS(=O)_2-R^e$  donde  $R^a$  se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, heteroarilo y heterociclilo y  $R^e$  es como se define en el presente documento.

"Sulfoniloxi" se refiere al grupo  $-OSO_2-R^c$ .

15 Los compuestos que tienen la misma fórmula molecular pero que difieren en la naturaleza o secuencia de unión de sus átomos o en la disposición de sus átomos en el espacio se denominan "isómeros". Los isómeros que difieren en la disposición de sus átomos en el espacio se denominan "estereoisómeros". Los términos "estereoisómero" y "estereoisómeros" se refieren a compuestos que existen en diferentes formas estereoisoméricas si tienen uno o más centros asimétricos o un doble enlace con sustitución asimétrica y, por lo tanto, pueden producirse como estereoisómeros individuales o como mezclas. Los estereoisómeros incluyen enantiómeros y diastereómeros. Los estereoisómeros que no son imágenes especulares entre sí se denominan "diastereómeros" y aquellos que son imágenes especulares no superponibles entre sí se denominan "enantiómeros". Cuando un compuesto tiene un centro asimétrico, por ejemplo, si está unido a cuatro grupos diferentes, es posible un par de enantiómeros. Un enantiómero puede caracterizarse por la configuración absoluta de su centro asimétrico, y se describe de acuerdo con las reglas de secuenciación de R y S de Cahn y Prelog, o mediante la manera en que la molécula hace rotar el plano de la luz polarizada y se designa como dextrógiro o levógiro (es decir, como isómeros (+) o (-), respectivamente). Un compuesto quiral puede existir ya sea como un enantiómero individual o como una mezcla del mismo. Una mezcla que contiene iguales proporciones de los enantiómeros se denomina "mezcla racémica". A menos que se indique otra cosa, la descripción tiene por objeto incluir tanto los estereoisómeros individuales, así como las mezclas. Los métodos para la determinación de la estereoquímica y la separación de los estereoisómeros se conocen bien en la técnica (véase el análisis en el Capítulo 4 de ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY, 4ª edición, J. March, John Wiley and Sons, Nueva York, 1992) y difieren en la quiralidad de uno o más estereocentros.

35 "Tioacilo" se refiere a los grupos  $R^a-C(S)-$ .

"Tiol" se refiere al grupo  $--SH$ .

40 "Tautómero" se refiere a formas alternativas de una molécula que difieren en la posición de un protón, tales como los tautómeros enol-ceto e imina-enamina, o las formas tautoméricas de grupos heteroarilo que contienen una disposición de átomos anulares  $-N=C(H)-NH-$ , tales como pirazoles, imidazoles, bencimidazoles, triazoles y tetrazoles. Un experto en la técnica reconocerá que son posibles otras disposiciones de átomos anulares tautoméricos.

45 Se entenderá que en todos los grupos sustituidos que se han definido anteriormente, los polímeros a los que se llega definiendo sustituyentes con otros sustituyentes a sí mismos (por ejemplo, arilo sustituido que tiene un grupo arilo sustituido que a su vez está sustituido con un grupo arilo sustituido, etc.) no pretenden incluirse en el presente documento. En tales casos, el número máximo de tales sustituciones es de tres. Por ejemplo, las sustituciones en serie de grupos arilo sustituidos están limitadas a -arilo sustituido-(arilo sustituido)-arilo sustituido.

50 "Grupo protector" se refiere a un grupo de átomos que, cuando están unidos a un grupo funcional reactivo en una molécula, enmascaran, reducen o impiden la reactividad del grupo funcional. Típicamente, un grupo protector puede eliminarse selectivamente según se desee durante el transcurso de una síntesis. Pueden encontrarse ejemplos de grupos protectores en Greene y Wuts, Protective Groups in Organic Chemistry, 3ª Ed., 1999, John Wiley & Sons, NY y Harrison y col., Compendium of Synthetic Organic Methods, Vol. 1-8, 1971-1996, John Wiley & Sons, NY. Los grupos protectores amino representativos incluyen, pero sin limitación, formilo, acetilo, trifluoroacetilo, bencilo, benciloxicarbonilo ("CBZ"), terc-butoxicarbonilo ("Boc"), trimetilsililo ("TMS"), 2-trimetilsilil-etanosulfonilo ("TES"), tritilo y grupos tritilo sustituidos, aliloxicarbonilo, 9-fluorenilmetiloxicarbonilo ("Fmoc"), nitro-veratriloxicarbonilo ("NVOC") y similares. Los grupos protectores hidroxilo representativos incluyen, pero sin limitación, aquellos en los que el grupo hidroxilo está acilado o alquilado, tal como éteres bencilícos y tritílicos, así como éteres alquílicos, tetrahidropiraniol éteres, trialkilsilil éteres (por ejemplo, grupos TMS o TIPPS) y éteres alílicos.

65 La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" pretende incluir sales de los compuestos activos que se preparan con ácidos o bases relativamente no tóxicos, dependiendo de los sustituyentes particulares encontrados en los compuestos descritos en el presente documento. Cuando los compuestos de la presente invención contienen funcionalidades relativamente ácidas, las sales de adición de bases se pueden obtener poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente de la base deseada, pura o en un disolvente inerte

apropiado. Los ejemplos de sales derivadas de bases inorgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen aluminio, amonio, calcio, cobre, férrico, ferroso, litio, magnesio, mangánico, manganeso, potasio, sodio, cinc y similares. Las sales derivadas de bases orgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, incluyendo aminas sustituidas, aminas cíclicas, las aminas de origen natural, y similares, tales como arginina, betaína, cafeína, colina, N,N'-dibenciletilendiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilendiamina, N-etilmorfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperidina, resinas de poliamina, procaína, purines, teobromo, trietilamina, trimetilamina, tripropilamina, trometamina y similares. Cuando compuestos de la presente invención contienen funcionalidades relativamente básicas, pueden obtenerse sales de adición de ácidos poniendo en contacto la forma neutra de dichos compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, ya sea puro o en un solvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas obtenidas a partir de ácidos inorgánicos como ácido clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrogenofosfórico, dihidrogenofosfórico, sulfúrico, monohidrogenosulfúrico, yodhídrico, o fosforoso y similares, así como las sales obtenidas a partir de ácidos orgánicos relativamente no tóxicos como acético, propiónico, isobutírico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, *p*-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metanosulfónico, y similares. También se incluyen sales de aminoácidos tales como arginato y similares, y sales de ácidos orgánicos como ácido glucurónico o galactunónico y similares (véase, por ejemplo, Berge, S.M. y col., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Science, 66: 1-19, 1977). Ciertos compuestos específicos de la presente invención contienen funcionalidades tanto básicas como ácidas que permiten que los compuestos se conviertan en sales de adición de bases o ácidos.

Las formas neutras de los compuestos se pueden regenerar poniendo en contacto la sal con una base o ácido y aislando el precursor de la manera convencional. La forma precursora del compuesto difiere de las distintas formas de sal en ciertas propiedades físicas, tales como solubilidad en disolventes polares, pero de otro modo, las sales son equivalentes a la forma precursora del compuesto para los fines de la presente invención.

Además de las formas de sal, la presente invención proporciona compuestos que están en una forma éster del profármaco. "Profármacos" de los compuestos descritos en el presente documento son los compuestos que experimentan fácilmente cambios químicos en condiciones fisiológicas para proporcionar los compuestos de la presente invención. De forma adicional, los profármacos se pueden convertir en los compuestos de la presente invención mediante métodos químicos y bioquímicos en un entorno *ex vivo*. Por ejemplo, los profármacos pueden convertirse de forma lenta en los compuestos de la presente invención cuando se colocan en un depósito de parche transdérmico con una enzima o reactivo químico adecuado. Los profármacos con frecuencia, pero no necesariamente, están farmacológicamente inactivos hasta convertirse en fármacos activos. Normalmente, los profármacos se obtienen enmascarando un grupo funcional en el fármaco que se cree que es en parte necesario para la actividad, con un progrupo (definido a continuación), para formar un proresiduo que experimenta una transformación, tal como una escisión, en las condiciones específicas de uso para liberar al grupo funcional y, por lo tanto, al fármaco activo. La escisión de proresiduo puede desarrollarse de forma espontánea, tal como por medio de una reacción de hidrólisis, o se puede catalizar o inducir mediante otro agente, tal como mediante una enzima, mediante luz, mediante ácido o base, o mediante un cambio de, o la exposición a, un parámetro físico o del entorno, tal como un cambio de temperatura. El agente puede ser endógeno para las condiciones de uso, tal como una enzima presente en las células a las que se administra el profármaco o las condiciones ácidas del estómago, o puede proporcionarse de forma exógena.

"Progrupo" se refiere a un tipo de grupo protector que, cuando se utiliza para enmascarar un grupo funcional dentro de un fármaco activo para formar un proresiduo, convierte al fármaco en un profármaco. Normalmente, los profármacos están unidos al grupo funcional del fármaco a través de enlaces que pueden escindirse en condiciones de uso especificadas. Por lo tanto, un progrupo es la porción de un proresiduo que se escinde para liberar al grupo funcional en las condiciones especificadas de uso. Como ejemplo específico, un proresiduo amida de la fórmula  $\text{-NH-C(O)CH}_3$  comprende el progrupo  $\text{-C(O)CH}_3$ .

Son bien conocidos en la técnica una amplia diversidad de progrupos, así como los proresiduos resultantes, adecuados para enmascarar grupos funcionales en los compuestos inhibidores selectivos de syk y/o JAK activos para producir profármacos. Por ejemplo, un grupo hidroxilo funcional se puede enmascarar como un residuo sulfonato, éster (tal como acetato o maleato) o carbonato, que pueden hidrolizarse *in vivo* para proporcionar el grupo hidroxilo. Un grupo funcional amino se puede enmascarar como un proresiduo amida, carbamato, imina, urea, fosfofenilo, fosforilo o sulfenilo, que pueden hidrolizarse *in vivo* para proporcionar el grupo amino. Un grupo carboxilo puede enmascararse como un proresiduo éster (que incluye metilo, etilo, pivaloiloximetilo, ésteres de sililo y tioésteres), amida o hidracida, que pueden hidrolizarse *in vivo* para proporcionar el grupo carboxilo. La invención incluye los ésteres y grupos acilo conocidos en la técnica para modificar la solubilidad o las características de hidrólisis para su uso como formulaciones de liberación sostenida o de profármaco. Serán obvios para los expertos en la materia otros ejemplos específicos de progrupos adecuados y sus respectivos proresiduos.

Determinados compuestos de la presente invención pueden existir en formas no solvatadas así como en formas solvatadas, incluyendo formas hidratadas. "Solvato" se refiere a un complejo formado por la combinación de

moléculas de disolvente con moléculas o iones del soluto. Un disolvente puede ser un compuesto orgánico, un compuesto inorgánico o una mezcla de ambos. Algunos ejemplos de disolventes incluyen, pero sin limitación, metanol, N,N-dimetilformamida, tetrahidrofurano, dimetilsulfóxido y agua. En general, las formas solvatadas son equivalentes a las formas no solvatadas y se pretende que estén abarcadas dentro del ámbito de la presente invención. Determinados compuestos de la presente invención pueden existir en múltiples formas cristalinas o amorfas. En general, todas las formas físicas son equivalentes para los usos contemplados en la presente invención y se pretende que estén dentro del ámbito de la presente invención.

Determinados compuestos de la presente invención poseen átomos de carbono asimétricos (centros ópticos) o enlaces dobles; se pretende que todos los racematos, diastereómeros, isómeros geométricos, regioisómeros e isómeros individuales (por ejemplo, enantiómeros separados) estén abarcados dentro del ámbito de la presente invención. Estos isómeros pueden resolverse o sintetizarse de forma asimétrica utilizando métodos convencionales para dar los isómeros "ópticamente puros", es decir, sustancialmente libres de sus otros isómeros. Si, por ejemplo, se desea un enantiómero particular de un compuesto de la presente invención, este se puede preparar mediante síntesis asimétrica o mediante derivación con un auxiliar quirral, donde la mezcla diastereomérica resultante se separa y el grupo auxiliar se escinde para proporcionar los enantiómeros puros deseados. Como alternativa, cuando la molécula contiene un grupo funcional básico, tal como amino, o un grupo funcional ácido, tal como carboxilo, las sales diastereoméricas se forman con un ácido o base ópticamente activo apropiado, seguido de la resolución de los diastereómeros así formados por cristalización fraccional o por medios cromatográficos bien conocidos en la técnica, y la posterior recuperación de los enantiómeros puros.

Además, los compuestos de la presente invención pueden contener proporciones no naturales de isótopos atómicos en uno o más átomos de los átomos que constituyen tales compuestos. Por ejemplo, los compuestos pueden estar radiomarcados con isótopos radioactivos, tales como por ejemplo tritio ( $^3\text{H}$ ), yodo 125 ( $^{125}\text{I}$ ) o carbono 14 ( $^{14}\text{C}$ ). Todas las variantes isotópicas de los compuestos de la presente invención, ya sean radioactivas o no, se pretende que estén abarcadas dentro del ámbito de la presente invención.

El término "administrar" se refiere a la administración oral, administración como un supositorio, contacto tópico, administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intralesional, intranasal o subcutánea, o la implantación de un dispositivo de liberación lenta por ejemplo, una bomba miniosmótica, en un sujeto. La administración es mediante cualquier vía, incluyendo la parenteral y la transmucosa (por ejemplo, bucal, sublingual, palatal, gingival, nasal, vaginal, rectal o transdérmica). La administración parenteral incluye, por ejemplo, la intravenosa, intramuscular, intrarteriolar, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular e intracraneal. Otros modos de suministro incluyen, pero sin limitación, el uso de formulaciones liposomales, infusión intravenosa, parches transdérmicos, etc.

Un "agonista" o "activador" se refiere a un agente o molécula que se une a un receptor de la invención, estimula, aumenta, abre, activa, facilita, potencia la activación o la actividad enzimática, sensibiliza o regula de forma positiva la actividad de un receptor de la invención.

Un "antagonista" o "inhibidor" se refiere a un agente o molécula que inhibe o se une a, bloquea de forma parcial o total la estimulación o actividad, disminuye, cierra, previene, retrasa la activación o la actividad enzimática, inactiva, desensibiliza o regula de forma negativa la actividad de un receptor de la invención. Como se usa en la presente invención, "antagonista" también incluye un agonista reverso o inverso.

Como se usa en la presente invención, la expresión "afección o trastorno sensible a la modulación de syk y/o JAK" y los términos y frases relacionados, se refieren a una afección o trastorno asociado con actividad inadecuada, por ejemplo, menor de o mayor de lo normal, de syk y/o JAK y al menos parcialmente sensible a, o afectado por, la modulación de syk y/o JAK (por ejemplo, los antagonistas o agonistas de syk y/o JAK dan como resultado algo de mejora en el bienestar del paciente en al menos algunos pacientes). La actividad funcional inadecuada de syk y/o JAK podría aparecer como resultado de la expresión de syk y/o JAK en células que normalmente no expresan el receptor, mayor que la producción normal de syk y/o JAK, o más lenta que la inactivación o eliminación metabólica normal de syk y/o JAK o de sus metabolitos activos, la expresión de syk y/o JAK o el grado de activación intracelular (lo que conduce a, por ejemplo, trastornos y afecciones inflamatorias e inmuno-relacionados) aumentados o la expresión disminuida de syk y/o JAK. Una afección o trastorno asociado con syk y/o JAK puede incluir una "afección o trastorno mediado por syk y/o JAK".

Como se usa en el presente documento, las frases "una afección o trastorno mediado al menos en parte por la actividad syk o JAK quinasa", y las frases y términos relacionados, se refieren a una afección o trastorno caracterizado por la actividad inadecuada, por ejemplo, mayor de lo normal, de syk y/o JAK. La actividad funcional inadecuada de syk y/o JAK podría aparecer como resultado de la expresión de syk y/o JAK en células que normalmente no expresan syk y/o JAK o de la expresión o grado de activación intracelular de syk y/o JAK aumentados (lo que conduce a, por ejemplo, trastornos y afecciones inflamatorias e inmuno-relacionados). Una afección o trastorno mediado al menos en parte por la actividad de la syk o JAK quinasa puede estar mediado de forma completa o parcial por la actividad funcional inadecuada de syk y/o JAK. Sin embargo, una afección o trastorno mediado al menos en parte por la actividad de la syk o JAK quinasa es uno en que la modulación de syk y/o JAK da como resultado algún efecto sobre la afección o trastorno subyacente (por ejemplo, un antagonista de

syk y/o JAK da como resultado alguna mejora en el bienestar del paciente en al menos algunos pacientes).

El término "inflamación" como se utiliza en el presente documento se refiere a la infiltración de glóbulos blancos (por ejemplo, leucocitos, monocitos, etc.) en la zona tratada por reestenosis.

5 El término "intervención" se refiere a una acción que produce un efecto o que se pretende que altere el curso del proceso de la enfermedad. Por ejemplo, "intervención vascular" se refiere al uso de un procedimiento intravascular tal como una angioplastia o un estent para abrir un vaso sanguíneo obstruido.

10 La expresión "dispositivo intravascular" se refiere a un dispositivo útil para un procedimiento de recanalización vascular para restablecer la circulación sanguínea a través de un vaso sanguíneo obstruido. Los ejemplos de dispositivos intravasculares incluyen, pero sin limitación, estents, catéteres con globo, injertos venosos/arteriales autólogos, injertos venosos/arteriales protésicos, catéteres vasculares y desviaciones vasculares.

15 Como se usa en el presente documento, el término "JAK" se refiere a una quinasa Janus (n.º de acceso de RefSeq P-43408) o una variante de la misma que tenga la capacidad de mediar la expresión génica *in vitro* o *in vivo*. Las variantes de JAK incluyen proteínas sustancialmente homologas a JAK nativa, es decir, proteínas que tienen una o más deleciones, inserciones o sustituciones de aminoácidos de origen natural o que no son de origen natural (por ejemplo, derivados, homólogos y fragmentos de JAK). La secuencia de aminoácidos de la variante de JAK preferentemente es al menos aproximadamente el 80% idéntica a una JAK nativa, más preferentemente al menos aproximadamente el 90 % idéntica y muy preferentemente al menos aproximadamente el 95% idéntica.

20 El término "leucocito" se refiere a cualquiera de las diversas células sanguíneas que tienen un núcleo y un citoplasma, que se separan en una fina capa blanca cuando se centrifuga la sangre completa, y que ayudan a proteger al cuerpo de las infecciones y enfermedades. Los ejemplos de leucocitos incluyen, sin limitación, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos.

25 El término "mamífero" incluye, pero sin limitación, seres humanos, animales domésticos (por ejemplo, perros o gatos), animales de granja (vacas, caballos o cerdos), monos, conejos, ratones y animales de laboratorio.

30 El término "modular", "modulación" y similares, se refiere a la capacidad de un compuesto para aumentar o disminuir la función y/o la expresión de syk y/o JAK, en donde tal función puede incluir actividad reguladora de la transcripción y/o la unión a proteínas. La modulación puede producirse *in vitro* o *in vivo*. La modulación, como se define en el presente documento, incluye la inhibición, antagonismo, antagonismo parcial, activación, agonismo o agonismo parcial de una función o característica asociada con syk y/o JAK, ya sea de forma directa o indirecta, y/o la regulación por aumento o disminución de la expresión de syk y/o JAK, ya sea de forma directa o indirecta. En una realización preferente, la modulación es directa. Los inhibidores o antagonistas son compuestos que, por ejemplo, se unen a, bloquean de forma parcial o total la estimulación, disminuyen, previenen, inhiben, retrasan la activación, inactivan, desensibilizan o regulan de forma negativa la transducción de señales. Los activadores o agonistas son compuestos que, por ejemplo, se unen a, estimulan, aumentan, abren, activan, facilitan, potencian la acción, activan, sensibilizan o regulan de forma positiva la transducción de señales. La capacidad de un compuesto para inhibir la función de syk y/o JAK se puede demostrar en un ensayo bioquímico, por ejemplo, un ensayo de unión, o un ensayo basado en células, por ejemplo, un ensayo de transfección transitoria.

35 "Moduladores" de actividad se utiliza para referirse a "ligandos", "antagonistas" y "agonistas" identificados utilizando ensayos *in vitro* e *in vivo* para actividad, o sus homólogos y miméticos. Los moduladores incluyen ligandos, antagonistas, agonistas, moléculas y similares, de origen natural y sintéticos. Los ensayos para identificar antagonistas y agonistas incluye, por ejemplo, aplicar a células supuestos compuestos moduladores, en presencia o ausencia de un receptor de la invención y, después, determinar los efectos funcionales sobre un receptor de la actividad de la invención. Las muestras o ensayos que comprenden un receptor de la invención, que se tratan con un activador, inhibidor o modulador potencial, se comparan con muestras de control sin el inhibidor, activador o modulador, para examinar el grado del efecto. A las muestras de control (no tratadas con moduladores) se les asigna un valor de actividad relativa del 100 %. La inhibición se consigue cuando el valor de actividad de un receptor de la invención con respecto al control es de aproximadamente el 80 %, opcionalmente el 50 % o 25-1 %. La activación se consigue cuando el valor de actividad de un receptor de la invención con respecto al control es el 110 %, opcionalmente el 150 %, opcionalmente el 200-500 % o el 1000-3000 % más elevado.

45 "Paciente" se refiere a animales humano o que no humanos, en especial mamíferos. Los ejemplos de pacientes incluyen, pero sin limitación, seres humanos, vacas, perros, gatos, cabras, ovejas, cerdos y conejos.

60 Respecto a las composiciones de la invención, la expresión "transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un transportador o excipiente que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que en general es segura, no tóxica y ni biológica ni de otra forma no conveniente, e incluye un transportador o excipiente que es aceptable para el uso veterinario así como para el uso farmacéutico en el ser humano. Un "transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable" como se utiliza en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, incluye uno o más de uno de tales transportadores o excipientes.

Las expresiones “cantidad farmacéuticamente eficaz”, “cantidad terapéuticamente eficaz” o “dosis terapéuticamente eficaz”, se refieren a la cantidad del compuesto objeto que suscitará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano, que busca el investigador, veterinario, doctor en medicina u otro facultativo. La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” incluye la cantidad de un compuesto que, cuando se administra, es suficiente para prevenir el desarrollo de, o aliviar en algún grado, uno o más de los síntomas de la afección o trastorno a tratar. La cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo del compuesto, el trastorno o afección y su gravedad, y la edad, peso, etc. del mamífero a tratar.

El término “plaqueta” se refiere a una célula diminuta, anucleada, discoidal encontrada en el plasma sanguíneo de los mamíferos, que funciona para promover la coagulación sanguínea.

Los términos “prevenir”, “que previene”, “prevención” y variaciones gramaticales de los mismos como se usan en el presente documento, se refieren a un método para retrasar o impedir, de forma parcial o completa, el inicio o recurrencia de un trastorno o afección y/o uno o más de los síntomas que la acompañan, o impedir que un sujeto adquiera o readquiera un trastorno o afección, o reducir el riesgo de un sujeto de adquirir o readquirir un trastorno o afección o uno o más de los síntomas que lo acompañan.

El término “recanalización” se refiere a un procedimiento para reestablecer el flujo para, o reunir, un canal interrumpido del cuerpo, tal como un vaso sanguíneo.

El término “reestenosis” se refiere a un estrechamiento o bloqueo de una arteria en el mismo sitio donde se ha realizado el tratamiento, tal como una angioplastia o un procedimiento de estent.

La frase “de forma selectiva” o “de forma específica”, cuando se refieren a la unión a un receptor, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia del receptor, a menudo en una población heterogénea de receptores u otros productos biológicos. Por lo tanto, en condiciones específicas, los compuestos se unen a un receptor particular al menos dos veces el fondo y más normalmente más de 10 a 100 veces el fondo. La unión específica de un compuesto en tales condiciones necesita un compuesto que se seleccione por su especificidad por un receptor particular. Por ejemplo, pueden explorarse moléculas orgánicas pequeñas para obtener solo los compuestos que se unen de forma específica o selectiva a un receptor seleccionado y no a otros receptores o proteínas. Se puede utilizar para seleccionar compuestos que sean selectivos para un receptor particular una diversidad de formatos de ensayo. Por ejemplo, para seleccionar compuestos que sean selectivos para un receptor particular se utilizan de forma rutinaria ensayos de exploración de alto rendimiento.

Como se usa en el presente documento, la expresión “anemia falciforme” se refiere a un trastorno hereditario de los glóbulos rojos en el que ambos alelos de la hemoglobina codifican para la proteína hemoglobina falciforme (S), es decir, el genotipo S/S. La presencia de hemoglobina anómala da como resultado la producción de células con forma inusual, que no sobreviven el periodo de tiempo usual en la circulación sanguínea. Por lo tanto, resulta en anemia. “Anemia” se refiere a una reducción del número de glóbulos rojos y/o de hemoglobina en la sangre.

La expresión “anemia de células falciformes” se refiere a un trastorno hereditario de los glóbulos rojos en el que un alelo de la hemoglobina codifica la proteína hemoglobina falciforme (S), y el otro alelo codifica otra proteína hemoglobina inusual, tal como hemoglobina (S), (C), (D), (E) y ( $\beta$ Tha1). Los ejemplos de genotipos de anemia de células falciformes incluyen, pero sin limitación, los genotipos S/S, S/C, S/D, S/E y S/ $\beta$ Tha1. Los tipos más comunes de anemia de células falciformes incluyen anemia de células falciformes, enfermedad de la hemoglobina C, beta talasemia + y beta talasemia 0.

El “sujeto” como se define en el presente documento para incluir animales tales como mamíferos, incluye, pero sin limitación, primates (por ejemplo, seres humanos), vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, ratas, ratones y similares. En realizaciones preferentes, el sujeto es un ser humano.

Como se usa en el presente documento, el término “syk” se refiere a una tirosina quinasa del bazo (n.º de Acceso de RefSeq P-043405) o una variante de la misma que tenga la capacidad de mediar una respuesta celular para receptores de linfocitos T *in vitro* o *in vivo*. Las variantes de syk incluyen proteínas sustancialmente homologas a syk nativa, es decir, proteínas que tienen una o más deleciones, inserciones o sustituciones de aminoácidos de origen natural o que no son de origen natural (por ejemplo, derivados, homólogos o fragmentos de syk). La secuencia de aminoácidos de la variante de syk preferentemente es al menos aproximadamente el 80 % idéntica a una syk nativa, más preferentemente al menos aproximadamente el 90 % idéntica y muy preferentemente al menos aproximadamente el 95 % idéntica.

La expresión “inhibidor de syk” se refiere a cualquier agente que inhibe la actividad catalítica de la tirosina quinasa del bazo.

El término “trombosis” se refiere al bloqueo o coagulación de un vaso sanguíneo provocado por una acumulación de células, dando como resultado la obstrucción de la circulación sanguínea. El término “trombosis” se refiere al coagulo que se forma dentro del vaso sanguíneo.

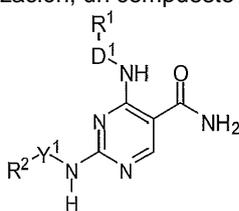
El término “tratar”, “que trata”, “tratamiento” y las variaciones gramaticales de los mismos como se usan en el presente documento, incluyen el retraso, alivio, mitigación o reducción, de forma parcial o total, de la intensidad de uno o más síntomas acompañantes de un trastorno o afección y/o el alivio, mitigación o impedimento de una o más de las causas de un trastorno o afección. Los tratamientos de acuerdo con la invención se pueden aplicar de forma preventiva, profiláctica, paliativa o curativa.

El término “vasos” se refiere a cualquier canal para transportar un fluido, tal como una arteria o vena. Por ejemplo, un “vaso sanguíneo” se refiere a cualquiera de los vasos a través de los cuales circula la sangre en el cuerpo. La luz de un vaso sanguíneo se refiere al espacio abierto interno o cavidad del vaso sanguíneo.

## 2. Realizaciones de la invención

### a. Compuestos

La presente invención proporciona en una realización, un compuesto que tiene la fórmula I:



(I)

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

D<sup>1</sup> es

(a) cicloalquilo C<sub>3-8</sub>, opcionalmente sustituido con 1 a 4 sustituyentes seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en: alquilo C<sub>1-8</sub>, amino, hidroxilo, alquilcarbonilo C<sub>1-8</sub>, aminocarbonilo, alcoxicarbonilamino C<sub>1-8</sub>, arilalcoxicarbonilamino C<sub>1-8</sub>, fenilo y heterociclil-alquilenilo C<sub>1-8</sub>;

R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1-8</sub>, amino, aminocarbonilo, hidroxilo, alcoxi C<sub>1-8</sub>, haloalquilo C<sub>1-8</sub>, alqueno C<sub>2-8</sub>, alquinilo C<sub>2-8</sub>, oxo, ciano, alcoxicarbonilo C<sub>1-8</sub>, cicloalquilo C<sub>3-8</sub>, arilo y heterociclilo; y cada heterociclilo está opcionalmente sustituido con 1 a 4 sustituyentes seleccionados entre el grupo que consiste en: alquilo C<sub>1-8</sub>, halo, oxo, amino, alcoxi C<sub>1-8</sub>, alquilcarbonilo C<sub>1-8</sub>, arilalcoxicarbonilo C<sub>1-8</sub>, aminocarbonilo, arilalquilenocarbonilo C<sub>1-8</sub> y alquilsulfonilo C<sub>1-8</sub>

Y<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en

(a) arilo; opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes, R<sup>4a</sup>, independientemente seleccionados entre el grupo que consiste en alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>-alquilo C<sub>1-8</sub>, aminocarbonil-, hidroxilo, oxo, halógeno, hidroxilo, alcoxi C<sub>1-8</sub> y alquilsulfonilo C<sub>1-8</sub>;

(b) heteroarilo, opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes, R<sup>4a</sup>, independientemente seleccionados entre el grupo que consiste en alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>-alquilo C<sub>1-8</sub>, aminocarbonil-, hidroxilo, oxo, halógeno, hidroxilo, alcoxi C<sub>1-8</sub> y alquilsulfonilo C<sub>1-8</sub>;

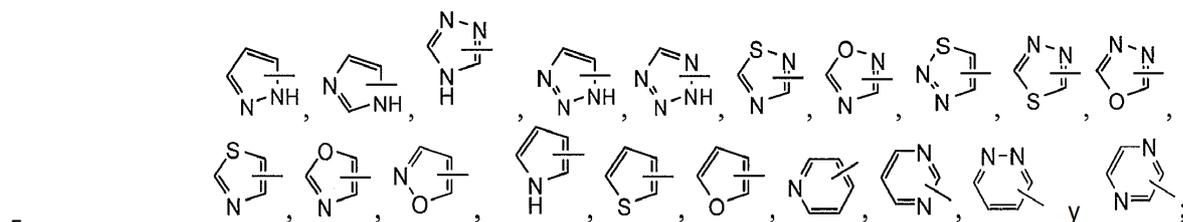
R<sup>2</sup> es un heterociclilo o heteroarilo, sustituido con al menos un grupo, R<sup>3</sup>, seleccionado entre el grupo que consiste en aminoalquil C<sub>1-8</sub>-, alcoxi C<sub>1-8</sub>-alquil C<sub>1-8</sub>-, oxo-, alquilcarbonilo C<sub>1-8</sub>, cicloalquilcarbonilo C<sub>3-8</sub>, heterociclilcarbonilo, alquilcarbonilamino C<sub>1-8</sub>, cicloalquilcarbonilamino C<sub>3-8</sub>, heterociclilcarbonilamino, alquilsulfonilo C<sub>1-8</sub>, cicloalquilsulfonilo C<sub>3-8</sub> y heterociclilsulfonilo;

y en la que R<sup>2</sup> está opcionalmente sustituido adicionalmente con 1 a 2 sustituyentes, R<sup>4c</sup>, independientemente seleccionados entre el grupo que consiste en alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>, halo, aminocarbonilo, oxo, hidroxilo, aminoalquilenilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>-alquilenilo C<sub>1-8</sub>, alquilcarbonilo C<sub>1-8</sub>, cicloalquilcarbonilo C<sub>3-8</sub>, heterociclilcarbonilo, alquilcarbonilamino C<sub>1-8</sub>, cicloalquilcarbonilamino C<sub>3-8</sub>, heterociclilcarbonilamino, alquilsulfonilo C<sub>1-8</sub>, cicloalquilsulfonilo C<sub>3-8</sub>, heterociclilsulfonilo, cicloalquilo C<sub>3-8</sub>, alquilcicloalquilenilo C<sub>1-8</sub>, heteroarilo; en la que cicloalquilo se refiere a un grupo hidrocarburo mono o policíclico alquilo, alqueno o alquinilo que puede formar un grupo puenteado o un anillo espiro, y que puede tener uno o más dobles o triples enlaces.

En un grupo de realizaciones, Y<sup>1</sup> es arilo. En otro grupo de realizaciones, Y<sup>1</sup> es fenilo. En otro grupo de realizaciones, Y<sup>1</sup> es heteroarilo. En otro grupo de realizaciones, Y<sup>1</sup> es piridinilo.

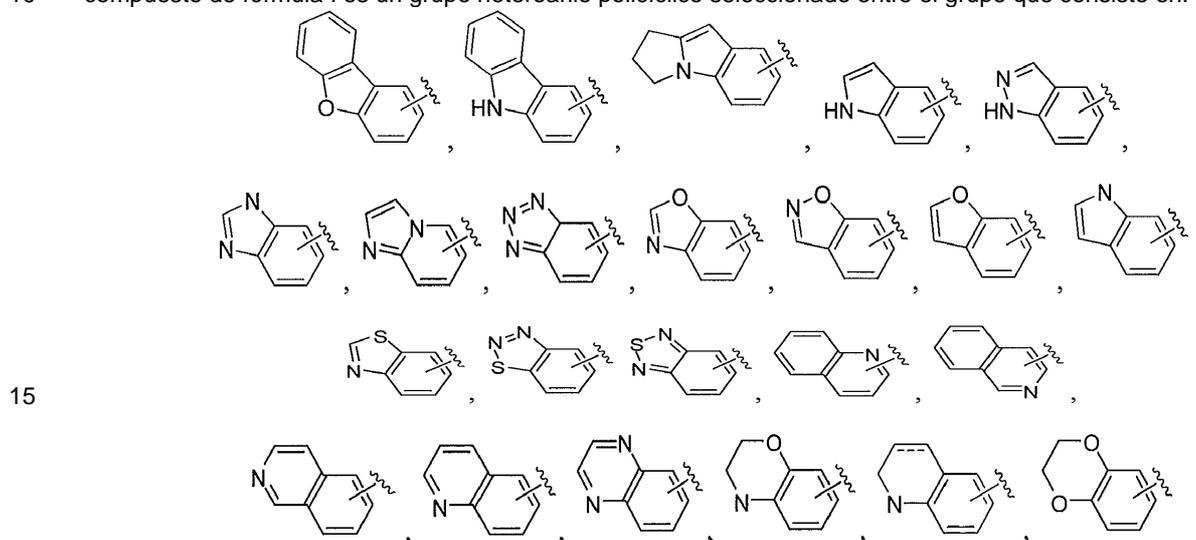
En un grupo de realizaciones, R<sup>2</sup> es heterociclilo. En otro grupo de realizaciones, R<sup>2</sup> es heteroarilo.

La presente invención proporciona en otro grupo de realizaciones, un compuesto en el que un grupo heteroarilo del compuesto de fórmula I se selecciona entre el grupo que consiste en:



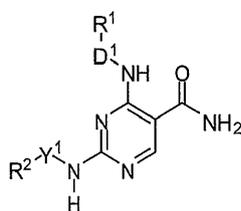
cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido como se describe en el presente documento.

10 La presente invención proporciona en otro grupo de realizaciones, un compuesto en el que un grupo heteroarilo del compuesto de fórmula I es un grupo heteroarilo policíclico seleccionado entre el grupo que consiste en:



opcionalmente sustituidos como se describe en el presente documento; y la línea ondulada indica el punto de unión al resto de la molécula.

25 La presente invención proporciona en una realización, un compuesto que tiene la fórmula I:



(I)

o un tautómero, sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

30  $D^1$  es cicloalquilo  $C_{3-8}$ , opcionalmente sustituido con 1 a 4 sustituyentes seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en: alquilo  $C_{1-8}$ , amino, hidroxilo, alquilcarbonilo  $C_{1-8}$ , aminocarbonilo, alcocarbonilamino  $C_{1-8}$ , arilalcocarbonilamino  $C_{1-8}$ , fenilo y heterociclicil-alquilenos  $C_{1-8}$ ;  
 $R^1$  se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo  $C_{1-8}$ , amino, aminocarbonilo, hidroxilo, alcoxi  $C_{1-8}$ ,

haloalquilo C<sub>1-8</sub>, alqueno C<sub>2-8</sub>, alquino C<sub>2-8</sub>, oxo, ciano, alcocarbonilo C<sub>1-8</sub>, cicloalquilo C<sub>3-8</sub>, arilo y heterociclilo; y cada heterociclilo está opcionalmente sustituido con 1 a 4 sustituyentes seleccionados entre el grupo que consiste en: alquilo C<sub>1-8</sub>, halo, oxo, amino, alcoxi C<sub>1-8</sub>, alquilcarbonilo C<sub>1-8</sub>, arilalcocarbonilo C<sub>1-8</sub>, aminocarbonilo, arilalquilenocarbonilo C<sub>1-8</sub> y alquilsulfonilo C<sub>1-8</sub>

5 Y<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en

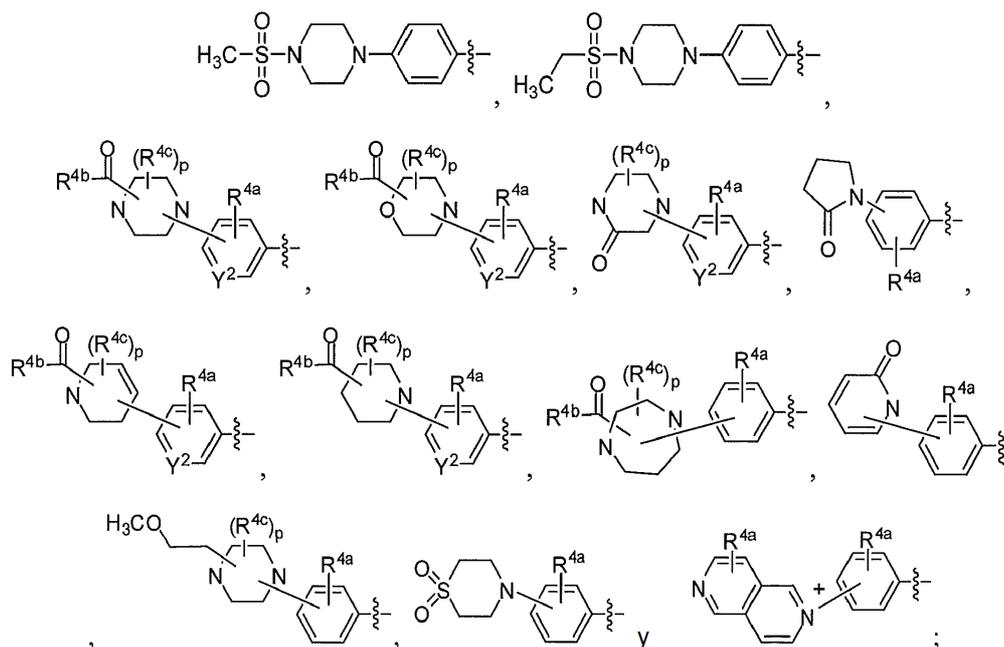
(a) arilo; opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes, R<sup>4a</sup>, independientemente seleccionados entre el grupo que consiste en alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>-alquilo C<sub>1-8</sub>, aminocarbonil-, hidroxilo, oxo, halógeno, hidroxilo, alcoxi C<sub>1-8</sub> y alquilsulfonilo C<sub>1-8</sub>;

10 (b) heteroarilo, opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes, R<sup>4a</sup>, independientemente seleccionados entre el grupo que consiste en alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>-alquilo C<sub>1-8</sub>, aminocarbonil-, hidroxilo, oxo, halógeno, hidroxilo, alcoxi C<sub>1-8</sub> y alquilsulfonilo C<sub>1-8</sub>;

R<sup>2</sup> es heterociclilo;

15 en la que R<sup>2</sup> está sustituido con al menos un grupo, R<sup>3</sup>, seleccionado entre el grupo que consiste en aminoalquil C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>-alquil C<sub>1-8</sub>, oxo-, alquilcarbonilo C<sub>1-8</sub>, cicloalquilcarbonilo C<sub>3-8</sub>, heterociclicarbonilo, alquilcarbonilamino C<sub>1-8</sub>, cicloalquilcarbonilamino C<sub>3-8</sub>, heterociclicarbonilamino, alquilsulfonilo C<sub>1-8</sub>, cicloalquilsulfonilo C<sub>3-8</sub>, heterociclicilsulfonilo; y en la que R<sup>2</sup> está opcionalmente sustituido adicionalmente con 1 a 2 sustituyentes, R<sup>4c</sup>, independientemente seleccionados entre el grupo que consiste en alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>, halo, aminocarbonilo, oxo, hidroxilo, aminoalqueno C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>-alqueno C<sub>1-8</sub>, alquilcarbonilo C<sub>1-8</sub>, cicloalquilcarbonilo C<sub>3-8</sub>, heterociclicarbonilo, alquilcarbonilamino C<sub>1-8</sub>, cicloalquilcarbonilamino C<sub>3-8</sub>, heterociclicarbonilamino, alquilsulfonilo C<sub>1-8</sub>, cicloalquilsulfonilo C<sub>3-8</sub>, heterociclicilsulfonilo, cicloalquilo C<sub>3-8</sub> y alquilcicloalqueno C<sub>1-8</sub>.

25 La presente invención proporciona en otra realización, un compuesto en el que el resto -Y<sup>1</sup>-R<sup>2</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en:



Y<sup>2</sup> es N, CH o C;

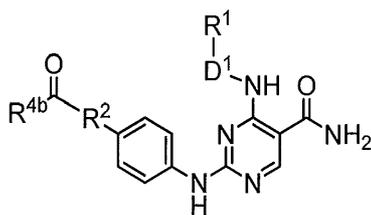
R<sup>4a</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H y alquilo C<sub>1-8</sub>;

cada R<sup>4c</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en alquilo C<sub>1-8</sub>, aminocarbonil-, hidroxilo, oxo, alcoxi C<sub>1-8</sub> y halo;

40 cada R<sup>4b</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en alquilo C<sub>1-8</sub> y heterociclilo; el subíndice p es 0, 1, 2 o 3; y

la línea ondulada indica el punto de unión al resto de la molécula.

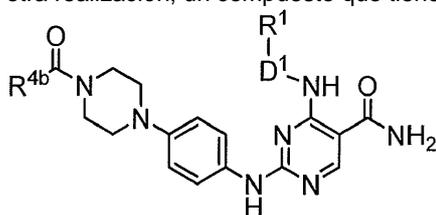
45 La presente invención proporciona en otra realización, un compuesto que tiene la fórmula Id:



(Id)

o una sal, estereoisómero o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

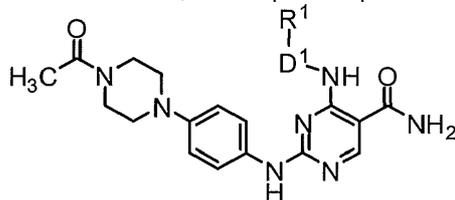
- 5 La presente invención proporciona en otra realización, un compuesto que tiene la fórmula Id1:



(Id1)

o una sal, estereoisómero o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 10 La presente invención proporciona en otra realización, un compuesto que tiene la fórmula Id2:



(Id2)

o una sal, estereoisómero o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

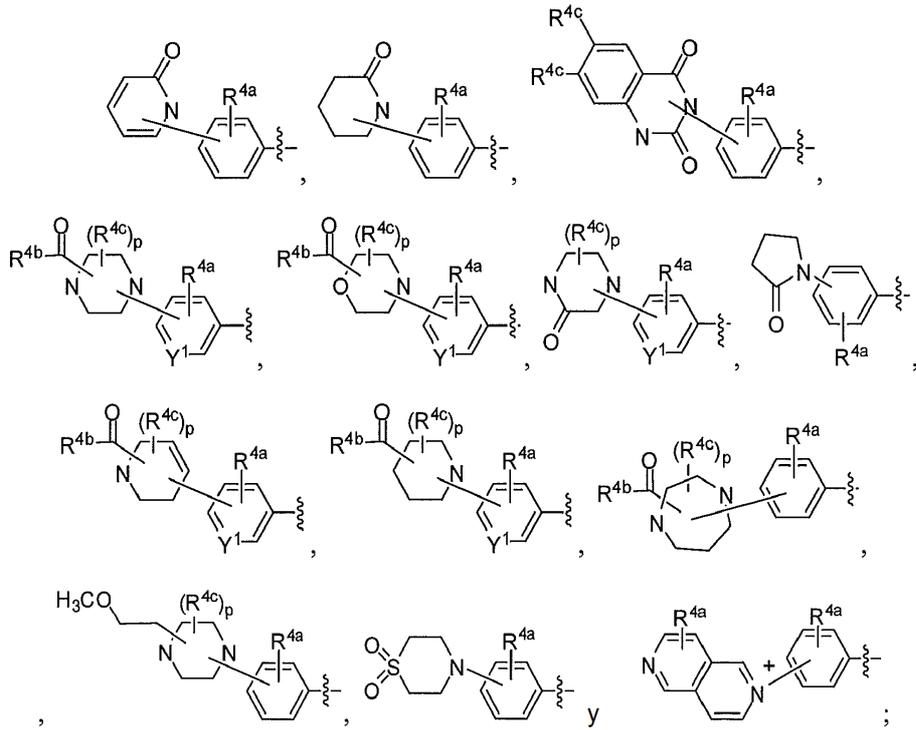
- 15 La presente invención proporciona un compuesto en el que: D<sup>1</sup> es cicloalquilo C<sub>3-8</sub>, opcionalmente sustituido con 1 a 4 sustituyentes seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en: alquilo C<sub>1-8</sub>, amino, hidroxilo, alquilarbonilo C<sub>1-8</sub>, aminocarbonilo, alcocarbonilamino C<sub>1-8</sub>, arilo alcocarbonilamino C<sub>1-8</sub>, fenilo y heterociclilalquileno C<sub>1-8</sub>.

- 20 La presente invención proporciona en otra realización, un compuesto en el que: D<sup>1</sup> es ciclopropilo.

La presente invención proporciona en otra realización, un compuesto en el que: D<sup>1</sup> es ciclobutilo.

- 25 La presente invención proporciona en otra realización, un compuesto en el que: D<sup>1</sup> es ciclopentilo. La invención también proporciona un compuesto de fórmula I en la que D<sup>1</sup> es ciclohexilo.

La presente invención proporciona en otra realización, un compuesto en el que -Y<sup>1</sup>-R<sup>2</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en:



5

$Y^2$  es N o C;

10 cada  $R^{4a}$  se selecciona entre el grupo que consiste en H y halo;

cada  $R^{4c}$  se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en alquilo  $C_{1-8}$ ;

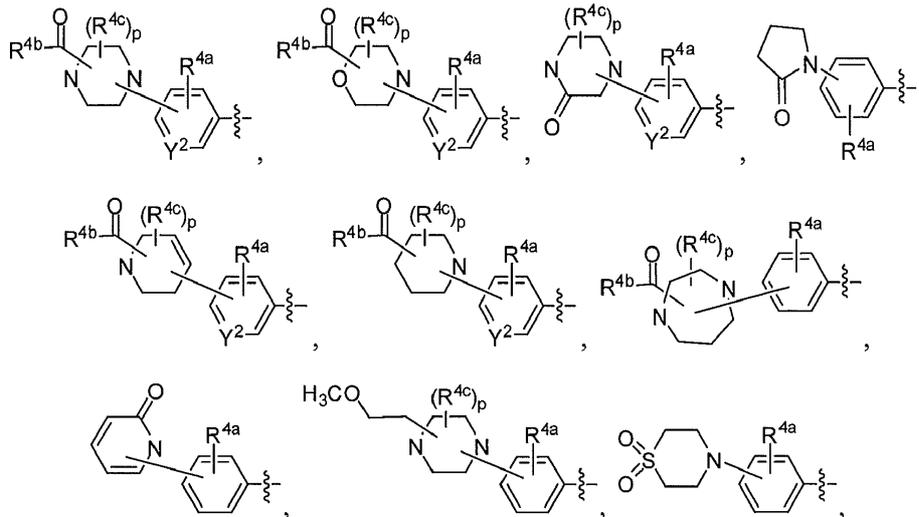
cada  $R^{4b}$  se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en alquilo  $C_{1-8}$ ;

y

15 el subíndice p es 0, 1, 2 o 3; y

la línea ondulada indica el punto de unión al resto de la molécula.

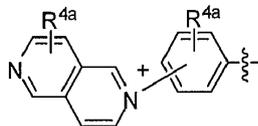
La presente invención proporciona en otra realización, un compuesto en el que el resto  $-Y^1-R^2$  se selecciona entre el grupo que consiste en:



20

25

y



$Y^2$  es N o C;

cada  $R^{4a}$  se selecciona entre el grupo que consiste en H y alquilo  $C_{1-8}$ ;

cada  $R^{4c}$  se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en alquilo  $C_{1-8}$ , aminocarbonil-, hidroxilo, oxo, alcoxi  $C_{1-8}$  y halo;

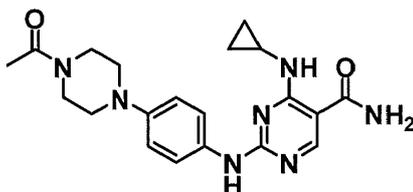
5 cada  $R^{4b}$  se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en alquilo  $C_{1-8}$ , y heterocicilo;

y

el subíndice p es 0, 1, 2 o 3; y la línea ondulada indica el punto de unión al resto de la molécula.

La presente invención proporciona en otra realización, un compuesto que tiene la fórmula:

10



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 La presente invención proporciona en otra realización un compuesto en el que  $R^1$  es



;

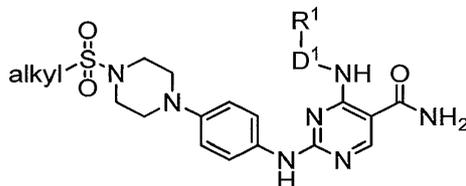
opcionalmente sustituido con  $CONH_2$  o alquilsulfonilo  $C_{1-8}$ ; y la línea ondulada indica el punto de unión al resto de la molécula.

20

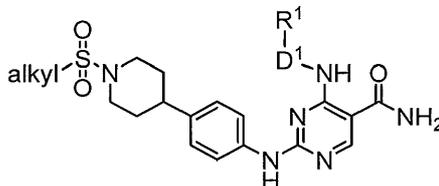
La presente invención proporciona en otra realización un compuesto en el que  $R^1$  es alquilsulfonilo  $C_{1-8}$ .

La presente invención proporciona en otra realización un compuesto que tiene la fórmula:

25



o

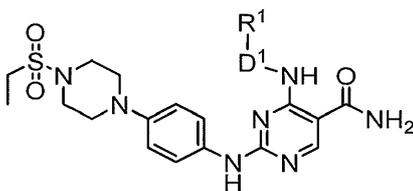


30

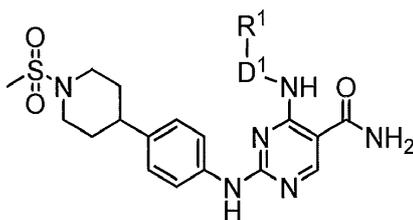
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:  $D^1$  es cicloalquilo  $C_{3-8}$ .

La presente invención proporciona en otra realización un compuesto que tiene la fórmula:

35



o



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que: D<sup>1</sup> es cicloalquilo C<sub>3-8</sub>.

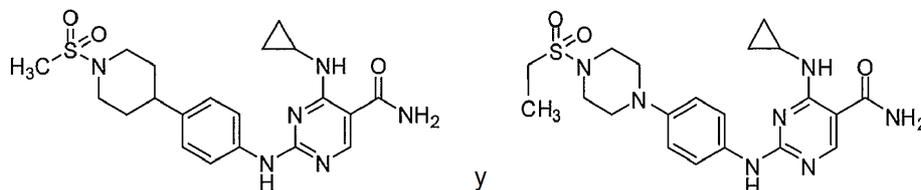
5 La presente invención proporciona en otra realización un compuesto en el que D<sup>1</sup> es ciclopropilo o ciclobutilo.

La presente invención proporciona en otra realización un compuesto en el que D<sup>1</sup> es ciclopropilo.

La presente invención proporciona en otra realización un compuesto en el que D<sup>1</sup> es ciclobutilo.

10

La presente invención proporciona en otra realización un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en :



15 La presente invención proporciona en otra realización, un compuesto en el que el compuesto se encuentra en los Ejemplos. Por ejemplo, la invención proporciona un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en:

- 20 2-(4-(4-acetilpiperazin-1-il)fenilamino)-4-(ciclobutilamino)pirimidin-5-carboxamida;
- 2-(4-(4-acetilpiperazin-1-il)-3-clorofenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida;
- 4-(ciclopropilamino)-2-(4-(4-propionilpiperazin-1-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida;
- 2-(4-(4-(ciclopropanocarbonil)piperazin-1-il)fenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida;
- 2-(4-(4-acetil-2-oxopiperazin-1-il)fenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida;
- 2-(4-(4-acetilpiperazin-1-il)-3-fluorofenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida;
- 2-(4-(4-acetil-2-carbamoilpiperazin-1-il)fenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida;
- 25 (R)-2-(4-(4-acetil-3-metilpiperazin-1-il)fenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida;
- (R)-2-(4-(4-acetil-2-metilpiperazin-1-il)fenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida;
- 2-(6-(4-acetilpiperazin-1-il)piridin-3-ilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida;
- 4-(ciclopropilamino)-2-(4-(1-(metilsulfonil)piperidin-4-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida;
- 4-(ciclopropilamino)-2-(4-(4-(metilsulfonil)piperazin-1-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida;
- 30 4-(ciclopropilamino)-2-(4-(4-(etilsulfonil)piperazin-1-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida;
- 4-(ciclobutilamino)-2-(4-(4-(metilsulfonil)piperazin-1-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida;
- 2-(4-(1-acetilpiperidin-4-il)fenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida;
- (ciclopropilamino)-2-(4-(4-(pirrolidin-1-carbonil)piperidin-1-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida;
- 4-(ciclopropilamino)-2-(4-(4-(morfolin-4-carbonil)piperidin-1-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida;
- 35 4-(ciclopropilamino)-2-(4-(4-(ciclopropilsulfonil)piperazin-1-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida;
- 2-(4-(4-acetil-1,4-diazepan-1-il)fenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida;
- 2-(4-(4-acetamidopiperidin-1-il)fenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida;
- 4-(ciclopropilamino)-2-(4-(4-dioxotiomorfolinofenilamino)pirimidin-5-carboxamida);
- 4-(ciclopropilamino)-2-(4-(4-(2-metoxietil)piperazin-1-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida;
- 40 4-(ciclopropilamino)-2-(4-(4-(N-metilacetamido)piperidin-1-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida; y
- 2-(4-(4-(aminometil)piperidin-1-il)fenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida.

La presente invención proporciona en otra realización, un compuesto que tiene la estructura observada en las tablas.

45 La presente invención también proporciona un compuesto para su uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia. La presente invención proporciona una composición que comprende un compuesto en combinación con un transportador o diluyente farmacéuticamente aceptable. La presente invención también proporciona un compuesto para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección seleccionada del grupo que consiste en enfermedad cardiovascular, enfermedad inflamatoria, enfermedad autoinmunitaria y trastorno proliferativo celular.

50

La presente invención también proporciona un compuesto para su uso en el tratamiento de:

una enfermedad cardiovascular seleccionada del grupo que consiste en reestenosis, trombosis, púrpura trombocitopénica inmunitaria, trombocitopenia inducida por heparina, cardiomiopatía dilatada, enfermedad de células falciformes, aterosclerosis, infarto de miocardio, inflamación vascular, angina inestable y síndromes coronarios agudos;

5 una enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en alergia, asma, artritis reumatoide, enfermedades mediadas por linfocitos B tales como linfomas no Hodgkin, síndrome antifosfolipídico, lupus, psoriasis, esclerosis múltiple, nefropatía terminal y enfermedad de Crohn;

una enfermedad autoinmunitaria seleccionada del grupo que consiste en anemia hemolítica, púrpura trombocitopénica inmunitaria, esclerosis múltiple, psoriasis y síndrome de Sjogren; o

10 un trastorno proliferativo celular seleccionado del grupo que consiste en leucemia, un linfoma, trastornos mieloproliferativos, cánceres hematológicos y mielofibrosis idiopática crónica.

La presente invención también proporciona un kit que comprende un envasado e instrucciones para su uso.

15 Se comprende que en otro grupo de realizaciones, cualquiera de las realizaciones anteriores también puede combinarse con otras realizaciones enumeradas en el presente documento, para formar otras realizaciones de la invención.

#### 20 b. Métodos de síntesis

Los compuestos de la presente invención pueden prepararse mediante técnicas de síntesis orgánica conocidas, incluyendo los métodos descritos en más detalle en los Ejemplos. En general, los compuestos de la estructura (I) anterior pueden hacerse mediante la siguiente figura 3, en la que todos los sustituyentes son como se han definido anteriormente a menos que se indique otra cosa.

25 Los compuestos que tienen la fórmula I pueden prepararse de acuerdo con la figura 3. El ácido carboxílico 1.1 se convierte en cloruro de ácido 1.2 a través de un procedimiento de una etapa por tratamiento con un agente de cloración, tal como cloruro de tionilo, y esterificación con un alcohol, tal como etanol, para formar el compuesto 1.3 usando condiciones similares a las descritas a continuación. El éster 1.3 se diclora con un agente de cloración, tal como oxiclorigenato de fósforo. El desplazamiento selectivo del grupo 4-cloro de la 2,4-dicloropirimidina por una amina apropiada, tal como  $R^1-D^1-NH_2$  (disponible en el mercado o sintetizada usando métodos conocidos por los expertos en la técnica), en condiciones básicas, tal como con diisopropilamina (DIA), proporciona los compuestos de fórmula 1.5. La hidrólisis posterior del éster, el desplazamiento del segundo grupo cloro con EDC y el tratamiento con amoníaco proporcionan el compuesto 1.7. También puede prepararse el compuesto benzotriazolil éter 1.7 a través de una ruta lineal. El desplazamiento del grupo benzotriazolil éter con una amina apropiada, tal como  $R^2-Y^1-NH_2$  (disponible en el mercado o sintetizada usando métodos conocidos por los expertos en la técnica), da el producto deseado I, en el que  $R^1$  y  $R^2$  son como se han definido anteriormente.

40 Un experto en la técnica reconocerá que en ciertas realizaciones de la estructura (I), cuando  $R^1-D^1$  o  $R^2-Y^1$  comprende un heteroátomo terminal, puede ser ventajoso usar una estrategia de grupo protector. El grupo protector puede eliminarse usando métodos conocidos por los expertos en la técnica para producir los compuestos de la estructura (1).

45 Los compuestos de la presente invención pueden utilizarse generalmente en forma de la base libre. Como alternativa, los compuestos de esta invención pueden usarse en forma de sales de adición de ácidos como se describe a continuación.

#### 50 c. Inhibición de las syk y JAK quinasas

La actividad de un compuesto específico como un inhibidor de una JAK quinasa se puede evaluar *in vitro* o *in vivo*. En algunas realizaciones, la actividad de un compuesto específico se puede analizar en un ensayo celular. La selectividad también podría establecerse en ensayos bioquímicos con quinasas aisladas.

55 Para evaluar la actividad inhibidora de la JAK quinasa y para determinar el grado de selectividad del compuesto particular en comparación con la quinasa syk, pueden utilizarse tipos similares de ensayos. Un medio para evaluar tal inhibición es la detección del efecto de los compuestos de la presente invención sobre la regulación positiva de productos génicos aguas abajo. En el ensayo Ramos/IL4, se estimulan linfocitos B con la citocina Interleucina-4 (IL-4) lo que conduce a la activación de la ruta JAK/Stat a través de la fosforilación de la familia de las JAK quinasas, JAK1 y JAK3, que a su vez fosforilan y activan el factor de transcripción Stat-6. Uno de los genes que Stat-6 regula de forma positiva es el receptor de IgE de baja afinidad, CD23. Para estudiar el efecto de los inhibidores (por ejemplo, los compuestos 2,4-pirimidina diamina sustituidos descritos en el presente documento) sobre las JAK1 y JAK3 quinasas, se estimulan linfocitos B Ramos de ser humano con IL-4. 10' después de la estimulación, las células se someten a citometría de flujo intracelular para medir el grado de fosforilación de STAT-6. 20 a 24 horas postestimulación, las células se tiñen para la regulación positiva de CD23 y se analizan usando citometría de flujo. 60 Una reducción de la cantidad de STAT-6 fosforilada y/o de CD23 presente en la superficie celular en comparación con las condiciones de control indica que el compuesto de prueba inhibe de forma activa la ruta de la JAK quinasa.

De forma adicional, la estimulación con IL-6 de los linfocitos B Ramos induce JAK 1, 2 y Tyk2, lo que conduce a la fosforilación de Stat-3 y Erk. 10' posestimulación, las células se someten a citometría de flujo intracelular para medir la capacidad del compuesto para inhibir estos acontecimientos de fosforilación. Para medir de forma específica la actividad de JAK2, se utilizará la línea celular CellSensor irfl-bla HEL que expresa el gen indicador beta lactamasa, controlado por Stat5 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Estas células expresan un mutante de JAK2 activo de forma constitutiva (JAK2V617F), encontrado de forma natural en neoplasias mieloproliferativas (Constantinescu, S., *et. al*, Trends Biochem Sci., 2008; 33:122-31). La reducción de la cantidad de la expresión del gen indicador beta-lactamasa se utiliza como una medida de la actividad inhibidora de JAK2 de los compuestos.

La actividad de los compuestos de la invención puede caracterizarse de forma adicional evaluando el efecto de los compuestos de la presente invención descritos en el presente documento, sobre las células epiteliales de pulmón A549 y las células U937. Las células epiteliales de pulmón A549 y las células U937 regulan de forma positiva la expresión en superficie de ICAM-1 (CD54) en respuesta a una diversidad de estímulos distintos. Por lo tanto, utilizando la expresión de ICAM-1 como lectura, se pueden evaluar en el mismo tipo celular los efectos del compuesto de prueba sobre distintas rutas de señalización. La estimulación con IL-1 $\beta$  a través del receptor de IL-1  $\beta$  activa la ruta de TRAF6/NF $\kappa$ B, dando como resultado una regulación positiva de ICAM-1. IFN.gamma induce la regulación positiva de ICAM-1 a través de la activación de la ruta de JAK1/JAK2. La regulación positiva de ICAM-1 se puede cuantificar mediante citometría de flujo a través de una curva de dosis-respuesta del compuesto y se calculan los valores de la CE<sub>50</sub>.

La actividad de los compuestos de la invención puede de forma adicional caracterizarse ensayando sobre las células epiteliales de pulmón A549 y las células U937 el efecto de los compuestos de la presente invención descritos en el presente documento. Las células epiteliales de pulmón A549 y las células U937 regulan de forma positiva la expresión en superficie de ICAM-1 (CD54) en respuesta a una diversidad de estímulos distintos. Por lo tanto, utilizando la expresión de ICAM-1 como lectura, se pueden evaluar los efectos del compuesto de prueba sobre distintas rutas de señalización en el mismo tipo celular. La estimulación con IL-1 $\beta$  a través del receptor de IL-1  $\beta$  activa la ruta de TRAF6/NF $\kappa$ B dando como resultado la regulación positiva de ICAM-1. IFN.gamma induce la regulación positiva de ICAM-1 a través de la activación de la ruta de JAK1/JAK2. La regulación positiva de ICAM-1 se puede cuantificar mediante citometría de flujo a través de una curva de dosis-respuesta del compuesto y se calculan los valores de la CE<sub>50</sub>. En los Ejemplos se describen ensayos ejemplares de este tipo con mayor detalle.

En general, se describen en el presente documento compuestos activos que inhiben la ruta de la JAK quinasa con una CI<sub>50</sub> en el intervalo de aproximadamente 1 mM o menos, como se mide en los ensayos descritos en el presente documento. Por supuesto, los expertos en la materia apreciarán que los compuestos que presentan menores CI<sub>50</sub>, (en el orden, por ejemplo, de 100  $\mu$ M, 75  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 40  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 500 nM, 100 nM, 10 nM, 1 nM o incluso menor) pueden ser particularmente útiles en aplicaciones terapéuticas. En los casos en donde se desee una actividad específica para un tipo celular particular, se puede ensayar la actividad del compuesto con el tipo celular deseado y contraexplorar para una carencia de actividad frente a otros tipos celulares. El grado deseado de "inactividad" en tales contraexploraciones, o la proporción deseada de actividad frente a inactividad, puede variar para distintas situaciones y se puede seleccionar por el usuario.

Además, normalmente los compuestos activos inhiben en linfocitos B la expresión de CD23 estimulada por IL-4, con una CI<sub>50</sub> en el intervalo de aproximadamente 20  $\mu$ M o menos, normalmente en el intervalo de aproximadamente 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 500 nM, 100 nM, 10 nM, 1 nM o incluso menos. Un ensayo adecuado que puede utilizarse es el ensayo descrito en los Ejemplos, "Ensayo para la línea de linfocitos B Ramos estimulada con IL-4". En determinadas realizaciones, los compuestos activos de la presente invención pueden tener en el ensayo descrito en los Ejemplos una CI<sub>50</sub> de menos de o igual a 5  $\mu$ M, mayor de 5  $\mu$ M pero menor de 20  $\mu$ M, mayor de 20  $\mu$ M, o mayor de 20  $\mu$ M pero menor de 50  $\mu$ M.

Además, los compuestos activos normalmente inhiben la expresión de la expresión de ICAM1 (CD54) inducida por IFN.gamma en células U937 o A549 con una CI<sub>50</sub> en el intervalo de aproximadamente 20  $\mu$ M o menor, normalmente en el intervalo de aproximadamente 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 500 nM, 100 nM, 10 nM, 1 nM o incluso más bajo. La CI<sub>50</sub> frente a la expresión de ICAM (CD54) en células estimuladas con IFN.gamma se puede determinar con un ensayo celular funcional en la línea celular A549 o la U937 aislada. Los ensayos adecuados que pueden utilizarse son los ensayos descritos en los Ejemplos, "La línea epitelial A549 estimulada con IFN $\gamma$ " y "Ensayo de FACS de ICAM1 por IFN.gamma en U937", respectivamente. En determinadas realizaciones, en los ensayos descritos en los Ejemplos los compuestos activos de la presente invención tienen una CI<sub>50</sub> de menos de o igual a 20  $\mu$ M, más grande de 20  $\mu$ M o más grande de 20  $\mu$ M pero menor de 50  $\mu$ M.

#### d. Composiciones y métodos de administración

La presente invención proporciona adicionalmente composiciones que comprenden uno o más compuestos de fórmula (I) o una sal, éster o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, y un transportador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Se apreciará que los compuestos de fórmula (I) en la presente invención, se pueden derivatizar en grupos funcionales para proporcionar derivados de profármaco que sean capaces de convertirse de nuevo a los compuestos parentales *in vivo*. Los ejemplos de tales profármacos incluyen los derivados éster

fisiológicamente aceptables y metabólicamente inestables, tales como metoximetil ésteres, metiltiometil ésteres o pivaloiloximetil ésteres obtenidos de un grupo hidroxilo del compuesto o un residuo carbamilo obtenido de un grupo amino del compuesto. De forma adicional, cualquiera de los equivalentes fisiológicamente aceptable de los compuestos de fórmula (I) similares a ésteres o carbamatos metabólicamente inestables, que tienen la capacidad de producir los compuestos parentales de fórmula (I) *in vivo*, están dentro del ámbito de la presente invención.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a cualquier sal de adición de ácido o base cuyos contraiones no son tóxicos para el paciente en las dosis farmacéuticas de las sales. Los hospedadores de sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en el campo farmacéutico. Si se utilizan en estas composiciones las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención, las sales preferentemente se obtienen de ácidos y bases inorgánicos u orgánicos. Entre tales sales ácidas están incluidas las siguientes: acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, sulfonato de benceno, bisulfato, butirato, citrato, canforato, canfor sulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, lucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clorhidrato, bromohidrato, hidroyoduro, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato, undecanoato, hidroácidos (por ejemplo, clorhidratos y bromohidratos), sulfatos, fosfatos, nitratos, sulfamatos, malonatos, salicilatos, metilen-bis-b-hidroxinaftoatos, gentisatos, isetionatos, di-p-toluolitartratos, etanosulfonatos, ciclohexilsulfamatos, quinatos y similares. Las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación, las obtenidas de álcali o de bases metálicas alcalinotérreas o bases orgánicas convencionales, tales como trietilamina, piridina, piperidina, morfolina, N-metilmorfolina, sales de amonio, sales metálicas de alcalinas, tales como sales de sodio y potasio, sales metálicas alcalinotérreas, tales como sales de calcio y magnesio, sales con bases orgánicas, tales como sales de dicitclohexilamina, N-metil-D-glucamina y sales con aminoácidos tales como arginina, lisina, etcétera.

Además, los grupos que contienen nitrógeno básicos pueden cuaternizarse con agentes del tipo haluros de alquilo inferiores, tales como cloruros de metilo, etilo, propilo y butilo, bromuros y yoduros; dialquilsulfatos, tales como dimetil, dietil, dibutil y diamilsulfatos, haluros de cadena larga, tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo; haluros de aralquilo, tales como bromuros de bencilo y fenetilo, y otros. Los productos solubles en agua o aceite o dispersables se obtienen de este modo.

Los compuestos utilizados en las composiciones y métodos de la presente invención también se pueden modificar adicionando funcionalidades apropiadas para potenciar propiedades biológicas selectivas. Tales modificaciones son conocidas en la técnica e incluyen las que aumentan la penetración biológica en un dado sistema biológico (por ejemplo, sangre, sistema linfático, sistema nervioso central, etc.), aumentan la disponibilidad oral, aumentan la solubilidad para permitir la administración mediante inyección, alteran el metabolismo y alteran la tasa de excreción.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden fabricar por métodos bien conocidos en la técnica tales como granulación, mezclado, disolución, encapsulado, liofilización o procesos de emulsificación convencionales, entre otros. Las composiciones pueden producirse en diversas formas, incluyendo gránulos, precipitados o partículas, polvos, incluyendo polvos liofilizados, secados por rotación o por pulverización, polvos amorfos, comprimidos, cápsulas, jarabes, supositorios, inyecciones, emulsiones, elixires, suspensiones o soluciones. Las formulaciones pueden de forma opcional contener estabilizadores, modificadores del pH, tensioactivos, modificadores de la biodisponibilidad y combinaciones de estos.

La expresión "forma farmacéutica unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de fármaco, calculada para producir el inicio, tolerabilidad y/o los efectos terapéuticos deseados, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado (por ejemplo, una ampolla). Además, se pueden preparar composiciones más concentradas, a partir de las cuales después se pueden producir composiciones farmacéuticas unitarias más diluidas. Las composiciones más concentradas contendrán así sustancialmente más de, por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces la cantidad de uno o más inhibidores de syk y/o JAK.

Los métodos para preparar tales formas farmacéuticas son conocidos para los expertos en la materia (véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18ª ED., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)). Además, se pueden preparar las sales farmacéuticamente aceptables de los inhibidores de syk y/o JAK de la presente invención (por ejemplo, sales de adición de ácido) e incluirlas en las composiciones utilizando procedimientos convencionales conocidos para los expertos en la materia de la química orgánica sintética y que se describen, por ejemplo, en J. March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure*, 4ª Ed. (New York: Wiley-Interscience, 1992).

Las composiciones normalmente incluyen un transportador o excipiente farmacéutico convencional y pueden incluir adicionalmente otros agentes curativos, transportadores, adyuvantes, diluyentes, potenciadores de la penetración tisular, solubilizantes y similares. Preferentemente, la composición contendrá aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 90 %, preferentemente aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 75 %, más preferentemente aproximadamente el 0,1 % al 50 %, todavía más preferentemente aproximadamente el 0,1 % al

10 % en peso de uno o más inhibidores de syk y/o JAK, con lo restante consistiendo en transportadores y/o excipientes farmacéuticos adecuados. Los excipientes apropiados pueden adaptarse para la composición particular y la vía de administración por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, *REMMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES*, citado anteriormente.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden utilizarse en estas composiciones incluyen intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas de suero, tales como seroalbúmina humana, sustancias tamponadoras, tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicérido parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, fosfato de hidrógeno de disódico, fosfato de hidrógeno potásico, cloruro de sodio, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliacrilatos, ceras, polímeros de bloque polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y lanolina.

Los ejemplos de excipientes adecuados incluyen, pero sin limitación, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, solución salina, jarabe, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y ácidos poliacrílicos tales como carbopoles. Las composiciones pueden incluir adicionalmente agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes de humectación; agentes emulsionantes; agentes de suspensión; agentes conservantes tales como metil-, etil- y propil-hidroxi-benzoatos; agentes para ajustar el pH tales como ácidos y bases inorgánicos y orgánicos; agentes edulcorantes y agentes saborizantes.

La administración de una composición que comprende uno o más inhibidores de syk y/o JAK con uno o más excipientes farmacéuticos adecuados según sea ventajoso, se puede llevar a cabo a través de cualquiera de los modos aceptados de administración. Por lo tanto, la administración puede ser, por ejemplo, oral, tópica, intravenosa, subcutánea, transcutánea, transdérmica, intramuscular, intraarticular, parenteral, intraarteriolar, intradérmica, intraventricular, intracraneal, intraperitoneal, intralesional, intranasal, rectal, vaginal, mediante inhalación o a través de un depósito implantado. El término "parenteral", como se utiliza en el presente documento, incluye inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal o técnicas de infusión. Preferentemente, las composiciones se administran por vía oral o intravenosa. Las formulaciones de la invención se pueden designar como de acción corta, de liberación rápida o de acción prolongada. Aún más, los compuestos pueden administrarse por medios locales antes que sistémicos, tales como la administración (por ejemplo, inyección) como una formulación de liberación sostenida. De acuerdo con una realización representativa, las composiciones de la presente invención se formulan para la administración farmacéutica a un mamífero, preferentemente un ser humano.

Las composiciones de la presente invención que contienen uno o más inhibidores de syk y/o JAK se pueden administrar de forma repetida, por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más veces, o la composición se puede administrar mediante infusión continua. Los sitios de administración adecuados incluyen, pero sin limitación, en la piel, bronquial, gastrointestinal, anal, vaginal, el ojo y el oído. Las formulaciones pueden tomar forma de polvo sólido, semisólido, liofilizado, o formas farmacéuticas líquidas, tales como, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones, emulsiones, supositorios, enemas de retención, cremas, pomadas, lociones, geles, aerosoles o similares, preferentemente en formas farmacéuticas unitarias adecuadas para la administración simple de dosificaciones precisas.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden estar en cualquier forma farmacéutica oralmente aceptable, incluyendo comprimidos, cápsulas, obleas, emulsiones, suspensiones, soluciones, jarabes, elixires, pulverizaciones, bolos, pastillas para chupar, polvos, gránulos y formulaciones de liberación sostenida. Los excipientes adecuados para la administración oral incluyen calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa, gelatina, sacarosa, carbonato de magnesio y similares. En el caso de comprimidos para el uso oral, los transportadores que se utilizan normalmente incluyen lactosa y almidón de maíz. También se añaden normalmente agentes de lubricación, tales como estearato de magnesio. Para una fórmula en cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se necesitan suspensiones acuosas para el uso oral, el principio activo se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, también se pueden añadir determinados agentes edulcorantes, saborizantes o colorantes.

En algunas realizaciones, las composiciones toman la forma de una píldora, comprimido o cápsula y, por lo tanto, la composición puede contener, junto con uno o más inhibidores de syk y/o JAK, un diluyente tal como lactosa, sacarosa, fosfato de dicalcio y similares; un disgregante tal como almidón o derivados del mismo; un lubricante tal como estearato de magnesio y similares; y/o un aglutinante tal como un almidón, goma arábiga, polivinilpirrolidona, gelatina, celulosa y derivados de los mismos. Un comprimido puede prepararse mediante cualquier proceso de compresión o de moldeado conocido para los expertos en la materia. Los comprimidos compactados pueden prepararse compactando en una máquina adecuada los inhibidores de syk y/o JAK en una forma fluida, por ejemplo, un polvo o gránulos, mezclados de forma opcional con ingredientes accesorios, por ejemplo, agentes aglutinantes, lubricantes, diluyentes, disgregantes o de dispersión. Los comprimidos moldeados se pueden preparar moldeando en una máquina adecuada una mezcla de los inhibidores de syk y/o JAK en polvo con cualquier transportador adecuado.

Como alternativa, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden estar en la forma de supositorios para la administración rectal. Estos pueden prepararse mezclando el agente con un excipiente no irritante adecuado que está sólido a temperatura ambiente pero líquido a la temperatura del recto, y por lo tanto se fundirá en el recto para liberar el fármaco. Tales materiales incluyen manteca de cacao, cera de abeja, polietilenglicol (PEG), grasa dura y/o cocoglicérido hidrogenado. Las composiciones adecuadas para la administración rectal pueden también comprender una unidad de enema rectal que contenga uno o más inhibidores de syk y/o JAK y vehículos farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, etanol acuoso al 50 % o una solución salina acuosa) que sean fisiológicamente compatibles con el recto y/o el colon. La unidad de enema rectal contiene una punta aplicadora protegida por una cubierta inerte, preferentemente compuesta de polietileno, lubricada con un lubricante tal como vaselina blanca y preferentemente protegida por una válvula de una vía para prevenir el reflujos de la fórmula dispensada. Además, la unidad de enema rectal tiene el largo suficiente, preferentemente de 5,8 cm, para insertarla en el colon a través del ano.

Las composiciones líquidas se pueden preparar disolviendo o dispersando uno o más inhibidores de syk y/o JAK y, opcionalmente, uno o más adyuvantes farmacéuticamente aceptables en un transportador tal como, por ejemplo, solución salina acuosa, dextrosa acuosa, glicerol, etanol y similares, para formar una solución o suspensión, por ejemplo, para la administración oral, tópica o intravenosa. Las formulaciones farmacéuticas se pueden preparar como suspensiones o soluciones líquidas utilizando un líquido estéril, tal como aceite, agua, alcohol y combinaciones de los mismos. Se pueden añadir para la administración oral o parenteral tensioactivos, agentes de suspensión o agentes emulsionantes farmacéuticamente adecuados. Las suspensiones pueden incluir aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de sésamo, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz y aceite de oliva. La preparación de suspensión puede contener también ésteres de ácidos grasos, tales como etiloleato, miristato de isopropilo, glicéridos de ácidos grasos y glicéridos de ácidos grasos acetilados. Las formulaciones de la suspensión pueden incluir alcoholes, tales como etanol, alcohol isopropílico, hexadecil alcohol, glicerol y propilenglicol. Los éteres, tales como poli(etilenglicol), hidrocarburos de petróleo, tales como aceite mineral y vaselina y agua, también pueden utilizarse en las formulaciones de suspensión.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden estar en una forma tópica, especialmente cuando la diana del tratamiento incluye zonas u órganos fácilmente accesibles mediante la aplicación tópica, incluyendo enfermedades del ojo, la piel o del tracto intestinal inferior. Las formulaciones tópicas adecuadas se preparan fácilmente para cada una de estas áreas u órganos. Para la administración tópica, la composición que contiene uno o más inhibidores de syk y/o JAK puede estar en la forma de emulsiones, lociones, geles, espumas, cremas, gelatinas, soluciones, suspensiones, pomadas y parches transdérmicos.

La aplicación tópica para el tracto intestinal inferior se puede efectuar en una formulación de supositorio rectal (véase más arriba) o en una formulación de enema adecuada. Además pueden utilizarse parches tópicos transdérmicos. Para aplicaciones tópicas, las composiciones farmacéuticas se pueden formular en una pomada adecuada que contenga el principio activo suspendido o disuelto en uno o más transportadores. Los transportadores para la administración tópica de los compuestos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, polioxietileno, compuesto de polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Como alternativa, las composiciones farmacéuticas se pueden formular en una loción o crema adecuada que contenga los componentes activos suspendidos o disueltos en uno o más transportadores farmacéuticamente aceptables. Los transportadores adecuados incluyen aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, ésteres de cetilo, ceras, alcohol cetílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

Además, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar mediante aerosol o inhalación nasal. Para el suministro por inhalación, las composiciones se pueden suministrar como un polvo seco o en forma líquida a través de un nebulizador. Tales composiciones se preparan de acuerdo con las técnicas conocidas en la técnica de formulación farmacéutica y se pueden preparar como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para potenciar la biodisponibilidad, fluorocarbonos y/u otros agentes solubilizantes o de dispersión convencionales.

Para el uso oftálmico, las composiciones farmacéuticas se pueden formular como suspensiones micronizadas en solución salina isotónica estéril con pH ajustado o, preferentemente, como soluciones en solución salina estéril con pH ajustado isotónica, con o sin un conservante, tal como cloruro de benzalconio. Como alternativa, para usos oftálmicos, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en una pomada, tal como vaselina.

Para la administración parenteral, las composiciones pueden estar en la forma de soluciones inyectables estériles y polvos envasados estériles. Preferentemente, las soluciones inyectables se formulan en un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,5.

Las formas inyectables estériles de las composiciones de la presente invención pueden ser suspensiones acuosas u oleaginosas. Estas suspensiones pueden formularse de acuerdo con las técnicas conocidas en la técnica, utilizando agentes de dispersión o humectantes y agentes de suspensión adecuados. Además, la preparación inyectable estéril puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que

pueden emplearse están el agua, la solución de Ringer y la solución de cloruro de sodio isotónica. Además, se emplean de forma convencional como un disolvente o medio de suspensión aceites no volátiles estériles. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite no volátil suave incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Son útiles en la preparación de inyectables los ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados de glicérido, como lo son los aceites farmacéuticamente aceptables naturales, tales como el aceite de oliva o el aceite de ricino, en especial en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones en aceite pueden contener también un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga, tal como carboximetil celulosa o agentes de dispersión similares que se utilizan comúnmente en la formulación de formas farmacéuticas farmacéuticamente aceptables, incluyendo emulsiones y suspensiones. También pueden utilizarse para los fines de formulación otros tensioactivos usados comúnmente, tales como Tweens, Spans u otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad que se utilizan comúnmente en la fabricación de formas farmacéuticas sólidas, líquidas u otras farmacéuticamente aceptables. Los compuestos pueden formularse para la administración parenteral mediante inyección tal como inyección por bolo o infusión continua. Una forma farmacéutica unitaria para inyección puede estar en ampollas o en recipientes de multidosis.

Las composiciones de la presente invención también pueden proporcionarse en una forma liofilizada. Tales composiciones pueden incluir un tampón, por ejemplo, bicarbonato, para la reconstitución antes de la administración, o el tampón puede estar incluido en la composición liofilizada para la reconstrucción con, por ejemplo, agua. La composición liofilizada puede adicionalmente comprender un vasoconstrictor adecuado, por ejemplo, epinefrina. La composición liofilizada puede proporcionarse en una jeringa, de forma opcional envasada en combinación con el tampón para la reconstitución, de forma tal que la composición reconstituida pueda administrarse de forma inmediata a un paciente.

Cualquiera de las formas farmacéuticas anteriores que contienen cantidades eficaces, están dentro de los límites de la experimentación habitual y dentro del ámbito de la invención. Una dosis terapéuticamente eficaz puede variar dependiendo de la vía de administración y de la forma farmacéutica. El compuesto o compuestos representativos de la invención es una formulación que presenta un alto índice terapéutico. El índice terapéutico es la proporción de dosis entre los efectos tóxico y terapéutico, que puede expresarse como la proporción entre la  $DL_{50}$  y la  $DE_{50}$ . La  $DL_{50}$  es la dosis letal para el 50 % de la población y la  $DE_{50}$  es la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población. La  $DL_{50}$  y la  $DE_{50}$  se determinan mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares animales o en animales experimentales.

Además de las formas farmacéuticas representativas descritas anteriormente, los excipientes y transportadores farmacéuticamente aceptables y las formas farmacéuticas son en general conocidas para los expertos en la materia y están incluidos en la invención. Debería entenderse que una dosificación y régimen de tratamiento específicos para cualquier paciente particular dependerán de una diversidad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente, y el tiempo de administración, tasa de excreción, combinación de fármacos, juicio del facultativo responsable y la gravedad de la enfermedad particular a tratar. La cantidad de compuesto activo (o compuestos activos) también dependerá del compuesto particular y otros agentes terapéuticos en la composición, si están presentes.

#### e. Métodos de uso

La invención proporciona métodos para la inhibición o disminución de la actividad de syk y/o JAK, así como se proporcionan compuestos como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento o la mejora de un estado, síntoma, afección, trastorno o enfermedad asociado con syk y/o JAK en un paciente que lo necesite (por ejemplo, humano o no humano). En una realización, el estado, síntoma, afección, trastorno o enfermedad asociado con syk y/o JAK está mediado, al menos en parte, por la actividad de syk y/o JAK quinasa. En realizaciones más específicas, la presente invención proporciona compuestos como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de una afección o trastorno mediado, al menos en parte, por la actividad de syk y/o JAK quinasa, tal como una enfermedad cardiovascular, enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria.

En una realización, la invención proporciona compuestos para su uso en la prevención o el tratamiento de una afección en un mamífero, caracterizada por trombosis no deseada, que comprende la etapa de administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención. Tales afecciones incluyen, pero sin limitación, reestenosis, síndrome coronario agudo, infarto de miocardio, angina inestable, angina refractaria, trombosis coronaria oclusiva que se presenta después de la terapia trombolítica o después de la angioplastia coronaria, un síndrome cerebrovascular mediado de forma trombótica, ictus embólico, ictus trombótico, ataques isquémicos transitorios, trombosis venosa, trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, coagulopatía, coagulación intravascular diseminada, púrpura trombocitopénica trombótica, tromboangitis obliterante, enfermedad trombótica asociada con trombocitopenia inducida por heparina, complicaciones trombóticas asociadas con la circulación extracorpórea, complicaciones trombóticas asociadas con la instrumentación tal como el cateterismo cardiaco u otro cateterismo intravascular, globo de contrapulsación aórtica, estent coronario o válvula cardiaca, afecciones que necesiten el ajuste de dispositivos protésicos, y similares.

En una realización adicional, la presente invención proporciona compuestos para su uso en el tratamiento de la trombosis, púrpura trombocítica inmunitaria, trombocitopenia inducida por heparina, cardiomiopatía dilatada, enfermedad de células falciformes, aterosclerosis, infarto de miocardio, inflamación vascular, angina inestable o síndromes coronarios agudos.

5 En otra realización, la presente invención también proporciona compuestos para su uso en el tratamiento de alergia, asma, artritis reumatoide, enfermedad mediada por linfocitos B tales como linfomas no Hodgkin, síndrome antifosfolípido, lupus, psoriasis, esclerosis múltiple, nefropatía terminal o leucemia linfocítica crónica.

10 En otra realización, la presente invención proporciona compuestos para su uso en el tratamiento de la anemia hemolítica o púrpura trombocitopénica inmunitaria.

Los compuestos descritos en el presente documento son también inhibidores potentes y/o selectivos de las JAK quinasa. Como consecuencia de esta actividad, los compuestos pueden utilizarse en una diversidad de contextos *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*, para regular o inhibir la actividad JAK quinasa, las cascadas de señalización en las que las JAK quinasa desempeñan un papel y las respuestas biológicas efectuadas por tales cascadas de señalización. Por ejemplo, en una realización, los compuestos se pueden utilizar para inhibir a la JAK quinasa, ya sea *in vitro* o *in vivo*, en prácticamente cualquier tipo celular que exprese la JAK quinasa, tal como en células hematopoyéticas en las que, por ejemplo, JAK3 se expresa de forma predominante. También pueden utilizarse para regular las cascadas de transducción de señales en las que desempeñan un papel las JAK quinasa, en particular JAK3. Tales cascadas de transducción de señales dependientes de JAK incluyen, pero sin limitación, las cascadas de señalización de los receptores de citocinas que implican a la cadena gamma común, tales como, por ejemplo, las cascadas de señalización de los receptores de IL-4, IL-7, IL-5, IL-9, IL-15 e IL-21 o IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21. Además, los compuestos pueden utilizarse *in vitro* o *in vivo* para regular, y en particular para inhibir, las respuestas celulares o biológicas afectadas por tales cascadas de transducción de señales dependientes de JAK. Tales respuestas celulares o biológicas incluyen, pero sin limitación, la regulación positiva de IL-4/ramos CD23 y la proliferación de linfocitos T mediada por IL-2. Notablemente, los compuestos pueden utilizarse para inhibir las JAK quinasa *in vivo*, como una estrategia terapéutica orientada al tratamiento o prevención de enfermedades mediadas, ya sea por completo o en parte, por una actividad JAK quinasa (denominada en el presente documento como "enfermedades mediadas por la JAK quinasa"). Los ejemplos no limitativos de enfermedades mediadas por la JAK quinasa que pueden tratarse o prevenirse con los compuestos incluyen, pero sin limitación, los siguientes: alergias; asma; enfermedades autoinmunitarias tales como rechazo de trasplantes (por ejemplo, riñón, corazón, pulmón, hígado, páncreas, piel, intestino delgado, intestino grueso, reacción del hospedador contra el injerto (RHCI) y reacción del injerto contra al hospedador (RICH), artritis reumatoide y esclerosis lateral amiotrofia; enfermedades autoinmunitarias mediadas por linfocitos T tales como esclerosis múltiple, psoriasis y síndrome de Sjogren; enfermedades inflamatorias del Tipo II tales como inflamación vascular (incluyendo vasculitis, arteritis, aterosclerosis y enfermedad arterial coronaria); enfermedades del sistema nervioso central tales como ictus; enfermedades pulmonares tales como bronquitis obliterante e hipertensión pulmonar primaria; reacciones de hipersensibilidad del Tipo IV sólida retardada; y cánceres hematológicos tales como leucemia y linfomas.

Los ejemplos de enfermedades que están mediadas al menos en parte por JAK quinasa, que pueden tratarse o prevenirse de acuerdo con los métodos incluyen, pero sin limitación, alergias, asma, enfermedades autoinmunitarias tales como rechazo de trasplante (por ejemplo, riñón, corazón, pulmón, hígado, páncreas, piel, reacción del hospedador contra el injerto (RHCI), etc.), artritis reumatoide y esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, psoriasis y síndrome de Sjogren, enfermedad inflamatoria del Tipo II tal como inflamación vascular (incluyendo vasculitis, arteritis, aterosclerosis y enfermedad arterial coronaria) u otras enfermedades inflamatorias tales como osteoartritis, enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal idiopática, síndrome del intestino irritable, colon irritable, mala cicatrización (por ejemplo, esclerodermia, fibrosis aumentada, queloides, cicatrices posquirúrgicas, fibrosis pulmonar, espasmos vasculares, migraña, lesión por reperfusión y posinfarto de miocardio), complejo o síndrome de las mucosas secas, enfermedades del sistema nervioso central tales como ictus, enfermedades pulmonares tales como bronquitis obliterante y primaria, e hipertensión pulmonar primaria, hipersensibilidad del Tipo IV retardada o mediada por células y cánceres sólidos y hematológicos tales como leucemias y linfomas.

55 También se describe un método para la inhibición de una JAK quinasa, que comprende poner en contacto la JAK quinasa con una cantidad de un compuesto eficaz para inhibir una actividad de la JAK quinasa, en donde el compuesto se selecciona de los compuestos de la invención. El método puede llevarse a cabo *in vivo*.

60 También se describe un método para la inhibición de una actividad de una JAK quinasa, que comprende poner en contacto *in vitro* una JAK3 quinasa con una cantidad de un compuesto eficaz para inhibir una actividad de la JAK quinasa, en donde el compuesto se selecciona de los compuestos de la invención.

65 En una realización específica, los compuestos pueden utilizarse para tratar y/o prevenir el rechazo en receptores de trasplantes de órganos y/o tejidos (es decir, tratar y/o prevenir el rechazo de aloinjerto). Los aloinjertos pueden rechazarse a través de una reacción inmunitaria mediada por células o humoral del receptor frente a antígenos del trasplante (histocompatibilidad) presentes en las membranas de las células del donante. Los antígenos más fuertes

están dirigidos por un complejo de locus genéticos llamados antígenos leucocitarios humanos del grupo A (HLA). Junto con los antígenos de los grupos sanguíneos ABO, son los principales antígenos de trasplante detectables en los seres humanos.

- 5 El rechazo después del trasplante en general puede dividirse en tres categorías: hiperagudo que se produce horas a días después del trasplante; agudo, que se produce días a meses después del trasplante y crónico, que se produce meses a años después del trasplante.

10 El rechazo hiperagudo está provocado principalmente por la producción de anticuerpos del hospedador que atacan al tejido del injerto. En una reacción de rechazo hiperagudo, se observan anticuerpos en la vasculatura del trasplante muy pronto después del trasplante. Poco después, se produce la coagulación vascular, conduciendo a isquemia, eventual necrosis y muerte. El infarto de injerto no es sensible a terapias inmunosupresoras conocidas. Debido a que los antígenos del HLA se pueden identificar *in vitro*, la exploración pretrasplante se utiliza para reducir de forma significativa el rechazo hiperagudo. Como consecuencia de esta exploración, el rechazo hiperagudo es  
15 relativamente poco común hoy en día.

Se piensa que el rechazo agudo está mediado por la acumulación de células antigénicas específicas en el tejido del injerto. La reacción inmunitaria mediada por linfocitos T frente a estos antígenos (es decir, RHCI o RICH) es el mecanismo principal del rechazo agudo. La acumulación de estas células conduce al daño del tejido del injerto. Se cree que están implicados en el proceso tanto los linfocitos T auxiliares CD4+ como los linfocitos T citotóxicos CD8+ y que las células dendríticas del donante y el hospedador presentan el antígeno. Los linfocitos T auxiliares CD4+ ayudan a incorporar otras células efectoras, tales como macrófagos y eosinófilos, al injerto. También está implicado el acceso a cascadas de transducción de señales de activación de linfocitos T (por ejemplo, cascadas de CD28, CD40L y CD2).  
20

25 El rechazo agudo mediado por células puede revertirse en muchos casos intensificando la inmunoterapia. Después de la reversión satisfactoria, los elementos gravemente dañados del injerto se curan mediante fibrosis y el resto del injerto aparece normal. Después de la resolución del rechazo agudo, las dosificaciones de los fármacos inmunosupresores se pueden reducir a niveles muy bajos.  
30

El rechazo crónico, que es un problema particular en trasplantes de riñón, a menudo progresa de forma insidiosa a pesar de la terapia inmunosupresora aumentada. Se piensa que es debido, en gran parte, a la hipersensibilidad de Tipo IV mediada por células. El perfil patológico difiere del rechazo agudo. Está principalmente implicado el endotelio arterial, con extensa proliferación que puede ocluir de forma gradual la luz del vaso, conduciendo a isquemia, fibrosis, una íntima engrosada y cambios ateroscleróticos. El rechazo crónico principalmente se debe a la obliteración progresiva de la vasculatura del injerto y se asemeja a un proceso vasculítico lento.  
35

En la hipersensibilidad de tipo IV, los linfocitos T citotóxicos CD8 y los linfocitos T auxiliares CD4 reconocen el antígeno sintetizado intracelular o extracelular cuando está formando complejo con, respectivamente, moléculas del MHC de Clase I o Clase II. Los macrófagos funcionan como células presentadoras de antígeno y liberan IL-1, lo que promueve la proliferación de los linfocitos T auxiliares. Los linfocitos T auxiliares liberan interferón gamma e IL-2, que juntos regulan las reacciones de hiperactividad retrasada mediada por la activación de macrófagos y la inmunidad mediada por linfocitos T. En el caso del trasplante de órganos, los linfocitos T citotóxicos destruyen las células del injerto en contacto.  
40

45 Dado que la JAK quinasas desempeñan un papel crítico en la activación de linfocitos T, los compuestos descritos en el presente documento pueden utilizarse para tratar y/o prevenir muchos aspectos del rechazo de trasplantes, y son particularmente útiles en el tratamiento y/o la prevención de las reacciones de rechazo que están mediadas, al menos en parte, por linfocitos T, tales como RHCI o RICH. Los compuestos también pueden utilizarse para tratar y/o prevenir el rechazo crónico en receptores de trasplante y, en particular, en receptores de trasplante de riñón. El compuesto también puede administrarse a un tejido o un órgano antes del trasplante del tejido u órgano en el receptor del trasplante.  
50

55 En otra realización, la presente invención proporciona compuestos para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria mediada por linfocitos T, que comprende administrar a un paciente que padece tal enfermedad autoinmunitaria una cantidad de un compuesto eficaz para tratar la enfermedad autoinmunitaria en la que el compuesto se selecciona de los compuestos de la invención. En determinadas realizaciones, la enfermedad autoinmunitaria es esclerosis múltiple (EM), psoriasis o síndrome de Sjogran. Tal enfermedad autoinmunitaria incluye, pero sin limitación, las enfermedades autoinmunitarias que se designan con frecuencia como trastornos autoinmunitarios de un único órgano o de único tipo celular y las enfermedades autoinmunitarias que con frecuencia se designan como que implican trastorno autoinmunitario sistémico. Los ejemplos no limitativos de enfermedades designadas con frecuencia como trastornos autoinmunitarios de un único órgano único o de un único tipo celular incluyen; tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica autoinmunitaria, gastritis atrófica autoinmunitaria de anemia perniciosa, encefalomielititis autoinmunitaria, orquitis autoinmunitaria, enfermedad de Goodpasture, trombocitopenia autoinmunitaria, oftalmía simpática, miastenia grave, enfermedad de Grave, cirrosis biliar primaria, hepatitis agresiva crónica, colitis ulcerosa y glomerulopatía membranosa. Los ejemplos no limitativos de enfermedades designadas  
60  
65

con frecuencia como que implican trastorno autoinmunitario sistémico incluyen: lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome Sjogren, síndrome de Reiter, polimiositis-dermatomiositis, esclerosis sistémica, poliarteritis nodular, esclerosis múltiple y pénfigo vesicular. Las enfermedades autoinmunitarias adicionales, que pueden ser basadas en linfocitos beta (humorales) o basadas en linfocitos T, incluyen síndrome de Cogan, espondilitis anquilosante, granulomatosis de Wegener, alopecia autoinmunitaria, diabetes de Tipo I o de inicio juvenil, y tiroiditis.

Los tipos de enfermedades autoinmunitarias que pueden tratarse o prevenirse con tales profármacos en general incluyen los trastornos que implican lesión tisular que se produce como resultado de una respuesta humoral y/o mediada por células contra inmunógenos o antígenos de origen endógeno y/o exógeno. Tales enfermedades con frecuencia se denominan como enfermedades que implican reacciones de hipersensibilidad no anafiláctica (es decir, de Tipo II, Tipo III y/o Tipo IV).

Las reacciones de hipersensibilidad de Tipo I en general son el resultado de la liberación de principios farmacológicamente activos, tales como histamina, a partir de mastocitos y/o basófilos después del contacto con un antígeno exógeno específico. Como se mencionó anteriormente, tales reacciones de Tipo I desempeñan un papel en numerosas enfermedades, que incluyen asma alérgica, rinitis alérgica, etc.

Las reacciones de hipersensibilidad de Tipo II (también denominadas como reacciones de hipersensibilidad citotóxicas, citolíticas dependiente del complemento o estimuladoras de células) resultan cuando las inmunoglobulinas reaccionan con componentes antigénicos de células o tejidos, o con un antígeno o hapteno que se ha acoplado de forma íntima con células o tejidos. Las enfermedades que están asociadas comúnmente con las reacciones de hipersensibilidad de Tipo II incluyen, pero sin limitación, anemia hemolítica autoinmunitaria, eritroblastosis fetal y enfermedad de Goodpasture.

Las reacciones de hipersensibilidad de Tipo III (también denominadas como reacciones de hipersensibilidad complejas tóxicas, complejas solubles o complejas inmunitarias) son el resultado de la deposición en vasos o en tejidos de complejos antígeno-inmunoglobulina circulantes solubles, acompañado de reacciones inflamatorias agudas en el sitio de depósito de los complejos inmunitarios. Los ejemplos no limitativos de enfermedades de reacción de Tipo III prototípicas incluyen la reacción de Arthus, artritis reumatoide, enfermedad del suero, lupus eritematoso sistémico, determinados tipos de glomerulonefritis, esclerosis múltiple y pénfigo vesicular.

Las reacciones de hipersensibilidad de Tipo IV (con frecuencia llamadas reacciones de hipersensibilidad celular, mediadas por célula, retrasada o del tipo tuberculina) están provocadas por linfocitos T sensibilizados que son el resultado del contacto con un antígeno específico. Los ejemplos no limitativos de enfermedades citadas como que implican reacciones de Tipo IV son la dermatitis por contacto y el rechazo de aloinjerto.

Las enfermedades autoinmunitarias asociadas con cualquiera de las reacciones de hipersensibilidad no anafiláctica pueden tratarse o prevenirse con los profármacos de acuerdo con la fórmula estructural (I) y (Ia). En particular, los compuestos descritos en el presente documento pueden utilizarse para tratar o prevenir las enfermedades autoinmunitarias caracterizadas de forma frecuente como trastornos autoinmunitarios de un único órgano o de un único tipo celular que incluyen, pero sin limitación: tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica autoinmunitaria, gastritis atrófica autoinmunitaria de anemia perniciosa, encefalomiéلتis autoinmunitaria, orquitis autoinmunitaria, enfermedad de Goodpasture, trombocitopenia autoinmunitaria, oftalmía simpática, miastenia grave, enfermedad de Graves, cirrosis biliar primaria, hepatitis agresiva crónica, colitis ulcerosa y glomerulopatía membranosa, así como las enfermedades autoinmunitarias caracterizadas con frecuencia como que implican trastorno inmunitario sistémico, que incluyen, pero sin limitación: lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide, síndrome Sjogren, síndrome de Reiter, polimiositis-dermatomiositis, esclerosis sistémica, poliarteritis nodular, esclerosis múltiple y pénfigo vesicular.

Un experto en la materia apreciará que muchas de las enfermedades autoinmunitarias enumeradas anteriormente están asociadas con síntomas graves, la mejora de las cuales proporciona un beneficio terapéutico significativo, incluso en los casos en donde la enfermedad autoinmunitaria subyacente podría no mejorarse.

Un compuesto descrito en el presente documento para su uso en terapia puede aplicarse sólo, o puede aplicarse en combinación con o complementario a otras terapias inmunosupresoras comunes, tales como, por ejemplo, las siguientes: mercaptopurina; corticosteroides tales como prednisona; metilprednisolona y prednisolona; agentes alquilantes tales como ciclofosfamida; inhibidores de la calcineurina tales como ciclosporina, sirolimús y tacrolimus; inhibidores de la inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) tales como micofenolato, micofenolato de mofetilo y azatioprina; y agentes designados para suprimir la inmunidad celular mientras dejan la respuesta inmunológica humoral del receptor intacta, incluyendo diversos anticuerpos (por ejemplo, globulina antilinfocitos (GAL), globulina antitimocitos (GAT), anticuerpos monoclonales anti linfocitos (OKT3)) e irradiación. Estos diversos agentes pueden utilizarse de acuerdo con sus dosificaciones convencionales o comunes, como se especifica en la información de prescripción que acompaña las formas de los fármacos disponibles de forma comercial (véase también: la información de prescripción en la Edición de 2006 de The Physician's Desk Reference). La azatioprina está actualmente disponible de Salix Pharmaceuticals, Inc., bajo el nombre comercial AZASAN; la mercaptopurina está disponible actualmente de Gate Pharmaceuticals, Inc., bajo el nombre comercial PURINETHOL; la prednisona y la

5 prednisolona están disponibles actualmente de Roxane Laboratories, Inc.; la metil prednisolona está disponible actualmente de Pfizer; sirolimús (rapamicina) está disponible actualmente de Wyeth-Ayerst bajo el nombre comercial RAPAMUNE; tacrolimus está disponible actualmente de Fujisawa bajo el nombre comercial PROGRAF; la ciclosporina está disponible actualmente de Novartis bajo el nombre comercial SANDIMMUNE y de Abbott bajo el nombre comercial GENGRAF; los inhibidores de la IMPDH tales como el micofenolato de mofetilo y el ácido micofenólico están disponibles actualmente de Roche bajo el nombre comercial CELLCEPT y de Novartis bajo el nombre comercial MYFORTIC; la azatioprina está disponible actualmente de Glaxo Smith Kline bajo el nombre comercial IMURAN y los anticuerpos están disponibles actualmente de Ortho Biotech bajo el nombre comercial ORTHOCLONE, de Novartis, bajo el nombre comercial SIMULECT (basiliximab), y de Roche bajo el nombre comercial ZENAPAX (daclizumab).

15 En otra realización, los compuestos podrían administrarse ya sea en combinación o de forma complementaria con un inhibidor de una syk quinasa. La syk quinasa es una tirosina quinasa conocida por desempeñar un papel crítico en la señalización del receptor de Fcy, así como en otras cascadas de señalización, tales como las que implican la señalización del receptor de linfocitos B (Turner *et al.*, (2000), *Immunology Today* 21: 148-154) y las integrinas beta (1), beta (2) y beta (3) en neutrófilos (Mocsai *et al.*, (2002), *Immunity* 16: 547-558). Por ejemplo, la syk quinasa desempeña un papel esencial en la señalización del receptor de IgE de alta afinidad en mastocitos, que conduce a la activación y posterior liberación de múltiples mediadores químicos que desencadenan ataques alérgicos. Sin embargo, a diferencia de las JAK quinasas, que ayudan a regular las rutas implicadas en las reacciones de hipersensibilidad de Tipo IV retrasada o mediada por células, la syk quinasa ayuda a regular las rutas implicadas en las reacciones de hipersensibilidad inmediata de Tipo I mediada por IgE. Determinados compuestos que afectan la ruta de syk pueden o no afectar las rutas de JAK.

25 Los compuestos inhibidores de syk adecuados se describen, por ejemplo, en los documentos n.º de Ser. 10/355.543 presentado el 31 de enero de 2003 (n.º de publicación 2004/0029902); WO 03/063794; n.º de Ser. 10/631.029 presentado el 29 de julio de 2003; WO 2004/014382; n.º de Ser. 10/903.263 presentado el 30 de julio de 2004; PCT/LTS2004/24716 presentado el 30 de julio de 2004 (WO005/016893); n.º de Ser. 10/903.870 presentado el 30 de julio de 2004; PCT/LTS2004/24920 presentado el 30 de julio de 2004; n.º de Ser. 60/630.808 presentado el 24 de noviembre de 2004; n.º de Ser. 60/645.424 presentado el 19 de enero de 2005 y n.º de Ser. 60/654.620, presentado el 18 de febrero de 2005.

30 Los compuestos descritos en el presente documento e inhibidores de syk podrían utilizarse solos o en combinación con uno o más tratamientos del rechazo de trasplante convencionales, como se describe anteriormente.

35 En una realización específica, los compuestos pueden utilizarse para tratar o prevenir estas enfermedades en pacientes que de forma inicial sean no sensibles (resistentes), o que se hayan hecho no sensibles, al tratamiento con un compuesto inhibidor de syk o uno de los otros tratamientos actuales para la enfermedad particular. Además, los compuestos podrían utilizarse en combinación con otros compuestos inhibidores de syk en pacientes que son resistentes o no sensibles a compuestos para syk. Se proporcionan más adelante los compuestos inhibidores de syk adecuados con los que pueden administrarse los compuestos.

40 En otra realización, la presente invención proporciona compuestos para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria mediada por linfocitos T, que comprende administrar a un paciente que padece tal enfermedad autoinmunitaria una cantidad de un compuesto eficaz para tratar la enfermedad inmunitaria, en la que el compuesto se selecciona de los compuestos de la invención, como se describe en el presente documento, y el compuesto se administra en combinación con, o de forma complementaria a, un compuesto que inhibe la syk quinasa con una  $IC_{50}$  en el intervalo de al menos 10  $\mu$ M.

50 En otra realización, la presente invención proporciona compuestos para su uso en el tratamiento o prevención del rechazo de trasplante de aloinjerto en un receptor del trasplante, que comprende administrar al receptor del trasplante una cantidad de un compuesto eficaz para tratar o prevenir el rechazo, en el que el compuesto se selecciona de los compuestos de la invención, como se describe en el presente documento. En una realización adicional, el compuesto se administra a un tejido o un órgano antes del trasplante del tejido u órgano en el receptor del trasplante.

55 En otra realización, la presente invención proporciona compuestos para su uso en el tratamiento o prevención del rechazo de trasplante de aloinjerto en un receptor de trasplante, en el que el rechazo es rechazo agudo, que comprende administrar al receptor del trasplante una cantidad de un compuesto eficaz para tratar o prevenir el rechazo, en el que el compuesto se selecciona de los compuestos de la invención.

60 En otra realización, la presente invención proporciona compuestos para su uso en el tratamiento o prevención del rechazo de trasplante de aloinjerto en un receptor de trasplante, en el que el rechazo es rechazo crónico, que comprende administrar al receptor del trasplante una cantidad de un compuesto eficaz para tratar o prevenir el rechazo, en el que el compuesto se selecciona de los compuestos de la invención.

65 En otra realización, la invención proporciona compuestos para su uso en el tratamiento o prevención del rechazo de trasplante de aloinjerto en un receptor de trasplante, en el que el rechazo está mediado por RHCI o RICH, que

comprende administrar al receptor del trasplante una cantidad de un compuesto eficaz para tratar o prevenir el rechazo, en el que el compuesto se selecciona de los compuestos de la invención, como se describe en el presente documento.

5 En otra realización, la invención proporciona compuestos para su uso en el tratamiento o prevención del rechazo de trasplante de aloinjerto en un receptor de trasplante, en el que el trasplante de aloinjerto se selecciona de un riñón, un corazón, un hígado y un pulmón, que comprende administrar al receptor del trasplante una cantidad de un compuesto eficaz para tratar o prevenir el rechazo, en el que el compuesto se selecciona de los compuestos de la invención, como se describe en el presente documento.

10 En otra realización, la presente invención proporciona compuestos para su uso en el tratamiento o prevención del rechazo de trasplante de aloinjerto en un receptor de trasplante, en el que el trasplante de aloinjerto se selecciona de un riñón, un corazón, un hígado y un pulmón, que comprende administrar al receptor del trasplante una cantidad de un compuesto eficaz para tratar o prevenir el rechazo, en el que el compuesto se selecciona de los compuestos de la invención, como se describe en el presente documento, en que el compuesto se administra en combinación con, o de forma complementaria a, otro inmunosupresor.

15 En otra realización, la presente invención proporciona compuestos para su uso en el tratamiento o prevención del rechazo de trasplante de aloinjerto en un receptor de trasplante, en que el trasplante de aloinjerto se selecciona de un riñón, un corazón, un hígado y un pulmón, que comprende administrar al receptor del trasplante una cantidad de un compuesto eficaz para tratar o prevenir el rechazo, en el que el compuesto se selecciona de los compuestos de la invención, como se describe en el presente documento, en que el compuesto se administra en combinación con, o de forma complementaria a, otro inmunosupresor en que el inmunosupresor se selecciona de ciclosporina, tacrolimus, sirolimús, un inhibidor de la IMPDH, micofenolato, micofenolato de mofetilo, un anticuerpo anti linfocitos T y OKT3.

20 Los compuestos descritos en el presente documento son moderadores de citocina de la señalización de IL-4. En consecuencia, los compuestos podrían enlentecer la respuesta de las reacciones de hipersensibilidad de Tipo I. Por lo tanto, en una realización específica, los compuestos podrían utilizarse para tratar tales reacciones y, por lo tanto, las enfermedades asociadas con, mediadas por, o provocadas por tales reacciones de hipersensibilidad (por ejemplo, alergias) de forma profiláctica. Por ejemplo, una persona que padece alergia podría tomar uno o más de los compuestos selectivos para JAK descritos en el presente documento, antes de la exposición prevista a alérgenos, para retrasar el inicio o progreso de, o eliminar del todo, una respuesta alérgica.

25 Cuando se utilizan para tratar o prevenir tales enfermedades, los compuestos se pueden administrar individualmente, como mezclas de uno o más compuestos, o en mezcla o combinación con otros agentes útiles para tratar tales enfermedades y/o los síntomas asociados con tales enfermedades. Los compuestos también pueden administrarse en mezcla o en combinación con agentes útiles para tratar otros trastornos o dolencias, tales como esteroides, estabilizadores de membrana, inhibidores de la 5-lipoxigenasa (5LO), inhibidores de la síntesis y del receptor de leucotrienos, inhibidores del cambio de isotipo de IgE o de la síntesis de IgE, cambio de isotipo de IgG o síntesis de IgG, beta-agonistas, inhibidores de la triptasa, aspirina, inhibidores de la ciclooxigenasa (COX), metotrexato, fármacos anti TNF, anticuerpo anti CD20, inhibidores de PD4, inhibidores de p38, inhibidores de PDE4 y antihistaminas, por nombrar algunos. Los compuestos se pueden administrar *per se* en forma de profármacos o como composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto activo o profármaco.

30 En otra realización, la invención proporciona compuestos para su uso en el tratamiento o prevención de una reacción de hipersensibilidad de Tipo IV, que comprende administrar a un sujeto una cantidad de un compuesto eficaz para tratar o prevenir la reacción de hipersensibilidad, en el que el compuesto se selecciona de compuestos de la presente invención, como se describe en el presente documento.

35 En otra realización, la presente invención proporciona compuestos para su uso en el tratamiento o prevención de una reacción de hipersensibilidad de Tipo IV, que se práctica de forma profiláctica, que comprende administrar a un sujeto una cantidad de un compuesto eficaz para tratar o prevenir la reacción de hipersensibilidad, en el que el compuesto se selecciona de los compuestos de la presente invención, como se describe en el presente documento, y se administra antes de la exposición a un alérgeno.

40 En otra realización, la presente invención proporciona compuestos para su uso en la inhibición de una cascada de transducción de señal en que la JAK3 quinasa desempeña un papel, que comprende poner en contacto con un compuesto una célula que expresa un receptor implicado en tal cascada de señalización, en el que el compuesto se selecciona de los compuestos de la presente invención, como se describe en el presente documento.

45 En otra realización, la presente invención proporciona compuestos para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad mediada por la JAK quinasa, que comprende administrar a un sujeto una cantidad de compuesto eficaz para tratar o prevenir la enfermedad mediada por la JAK quinasa, en el que el compuesto se selecciona de los compuestos de la presente invención, como se describe en el presente documento.

En otra realización, la presente invención proporciona compuestos para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad mediada por la JAK quinasa, en que la enfermedad mediada por JAK es RHCI o RICH, que comprende administrar a un sujeto una cantidad de compuesto eficaz para tratar o prevenir la enfermedad mediada por la JAK quinasa, en el que el compuesto se selecciona de los compuestos de la presente invención, como se describe en el presente documento.

En otra realización, la presente invención proporciona compuestos para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad mediada por la JAK quinasa, en que la enfermedad mediada por JAK es rechazo de aloinjerto agudo, que comprende administrar a un sujeto una cantidad de compuesto eficaz para tratar o prevenir la enfermedad mediada por la JAK quinasa, en el que el compuesto se selecciona de los compuestos de la invención, como se describe en el presente documento.

En otra realización, la invención proporciona compuestos para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad mediada por la syk y/o JAK quinasa, en que la enfermedad mediada por JAK es rechazo de aloinjerto crónico, que comprende administrar a un sujeto una cantidad de compuesto eficaz para tratar o prevenir la enfermedad mediada por la JAK quinasa, en el que el compuesto se selecciona de los compuestos de la invención, como se describe en el presente documento.

Los compuestos activos de la invención normalmente presentan la ruta de syk y/o JAK/Stat. La actividad de un compuesto especificado como un inhibidor de una syk y/o JAK quinasa se puede evaluar *in vitro* o *in vivo*. En algunas realizaciones, la actividad de un compuesto especificado se puede analizar en un ensayo celular.

"Trastorno proliferativo celular" se refiere a un trastorno caracterizado por la proliferación anómala de células. Un trastorno proliferativo no implica ninguna limitación con respecto a la velocidad de crecimiento celular, sino que simplemente indica la pérdida de los controles normales que afectan al crecimiento y la división celular. Por lo tanto, en algunas realizaciones, las células de un trastorno proliferativo pueden tener las mismas velocidades de división celular que las células normales, pero no responden a las señales que limitan tal crecimiento. Dentro del ámbito de "trastorno proliferativo celular" está la neoplasia o tumor, que es un crecimiento anómalo de tejido. Cáncer se refiere a cualquiera de las diversas neoplasias malignas caracterizadas por la proliferación de células que tienen la capacidad de invadir el tejido circundante y/o de producir metástasis en nuevos sitios de colonización.

En general, los trastornos proliferativos celulares que son tratables con los compuestos divulgados en el presente documento se relacionan con cualquier trastorno caracterizado por proliferación celular anormal. Estos incluyen diversos tumores y cánceres, benignos o malignos, metastásicos o no metastásicos. Las propiedades específicas de los cánceres, tales como invasividad de tejidos o metástasis, pueden tomarse como objetivo utilizando los compuestos descritos en el presente documento. Los trastornos proliferativos celulares incluyen una diversidad de cánceres, que incluyen, entre otros, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer gastrointestinal, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, carcinoma escamoso de pulmón y adenocarcinoma.

En algunas realizaciones, el trastorno proliferativo celular tratado es una neoplasia hematopoyética, que es el crecimiento anormal de células del sistema hematopoyético. Los cánceres hematopoyéticos pueden tener sus orígenes en células madre pluripotentes, células progenitoras multipotentes, células progenitoras comprometidas oligopotentes, células precursoras y células diferenciadas de forma terminal implicadas en hematopoyesis. Se cree que algunos cánceres hematológicos surgen a partir de células madre hematopoyéticas, que tienen la capacidad de autorrenovación. Por ejemplo, las células que tienen la capacidad de desarrollar subtipos específicos de leucemia mielóide aguda (LMA) (Cynthia K. Hahn, Kenneth N. Ross, Rose M. Kakoza, Steven Karr, Jinyan Du, Shao-E Ong, Todd R. Golub, Kimberly Stegmaier, Syk is a new target for LMA differentiation, *Blood*, 2007, 110, Resumen 209) después del trasplante presentan marcadores de superficie celular de células madre hematopoyéticas, implicando a las células madre hematopoyéticas como la fuente de células leucémicas. Los blastocitos que no tienen un marcador celular característico de células madre hematopoyéticas parecen no tener la capacidad de establecer tumores después del trasplante (Blair *et al.*, 1997, *Blood* 89: 3104-3112). El origen en células madre de determinados cánceres hematológicos también encuentra apoyo en la observación de que pueden encontrarse anomalías cromosómicas específicas asociadas con tipos particulares de leucemia en células normales del linaje hematopoyético así como en blastocitos leucémicos. Por ejemplo, la translocación recíproca t(9q34;22q11), asociada con aproximadamente el 95 % de las leucemias mielógenas crónicas, parece estar presente en células del linaje mielóide, eritroide y linfóide, lo que sugiere que la anomalía cromosómica se origina en células madre hematopoyéticas. Un subgrupo de células en determinados tipos de LMC presenta el fenotipo del marcador celular de las células madre hematopoyéticas.

Aunque las neoplasias hematopoyéticas a menudo se originan a partir de células madre, las células progenitoras comprometidas o las células diferenciadas de forma más terminal de un linaje del desarrollo también pueden ser la fuente de algunas leucemias. Por ejemplo, la expresión forzada de la proteína de fusión Bcr/Abl (asociada con la leucemia mielógena crónica) en células progenitoras mieloides o progenitoras de granulocito/macrófago comunes produce una afección similar a la leucemia. Además, algunas anomalías cromosómicas asociadas con subtipos de leucemia no se encuentran en la población celular con un fenotipo marcador de células madre hematopoyéticas, pero se encuentran en una población celular que presenta marcadores de un estado más diferenciado de la ruta

hematopoyética (Turhan *et al.*, 1995, Blood 85: 2154-2161). Por lo tanto, aunque las células progenitoras comprometidas y otras células diferenciadas pueden tener sólo un potencial limitado para la división celular, las células leucémicas pueden haber adquirido la capacidad de crecer de forma no regulada, en algunos casos mimetizando las características de autorrenovación de las células madres hematopoyéticas (Passegue *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100: 11842-9).

En algunas realizaciones, la neoplasia hematopoyética tratada es una neoplasia linfoide, donde las células anómalas derivan de, y/o presentan, el fenotipo característico de células del linaje linfoide. Las neoplasias linfoides pueden subdividirse en neoplasias de linfocitos B, neoplasias de linfocitos T y NK, y linfoma de Hodgkin. Las neoplasias de linfocitos B pueden subdividirse adicionalmente en neoplasia de linfocitos B precursores y neoplasia de linfocitos B maduros/periféricos. Las neoplasias de linfocitos B ejemplares son leucemias/linfomas linfoblásticas B precursoras (leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B precursores) mientras que las neoplasias de linfocitos B maduros/periféricos ejemplares son la leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico pequeño de linfocitos B, leucemia prolinfocítica de linfocitos B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de linfocitos B de la zona esplénica marginal, tricoleucemia, mieloma/plasmocitoma de células plasmáticas, linfoma de linfocitos B de la zona marginal extranodular del tipo MALT, linfoma de linfocitos B de la zona marginal nodular, linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma de linfocitos B grandes difuso, linfoma de linfocitos B grandes del mediastino, linfoma de derrame primario y linfoma de Burkitt/leucemia de células Burkitt. Las neoplasias de linfocitos T y linfocitos NK se subdividen adicionalmente en neoplasia de linfocitos T precursores y neoplasias de linfocitos T maduros (periféricos). Las neoplasias de linfocitos T precursores ejemplares son el linfoma/leucemia de T linfoblásticos precursores (leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T precursores) mientras que las neoplasias de linfocitos T maduros (periféricos) ejemplares son la leucemia prolinfocítica de linfocitos T, leucemia linfocítica granular de linfocitos T, leucemia de linfocitos NK agresiva, linfoma/leucemia de linfocitos T del adulto (HTLV-1), linfoma de linfocitos NK/T extranodular, del tipo nasal, linfoma de linfocitos T del tipo enteropatía, linfoma de linfocitos T gamma-delta hepatosplénico, linfoma de linfocitos T similar a paniculitis subcutánea, micosis fungoide/síndrome de Sezary, linfoma anaplásico de células grandes, de células T/nulas, del tipo cutáneo primario, linfoma de linfocitos T periférico no caracterizado de otra forma, linfoma de linfocitos T angioinmunoblástico, linfoma anaplásico de células grandes, de células T/nulas de tipo sistémico primario. El tercer miembro de neoplasias linfoides es el linfoma de Hodgkin, también denominado como enfermedad de Hodgkin. El diagnóstico ejemplar de esta clase que puede tratarse con los compuestos incluye, entre otros, linfoma de Hodgkin predominante en linfocitos nodular y diversas formas clásicas de la enfermedad de Hodgkin, cuyos miembros ejemplares son el linfoma de Hodgkin con esclerosis nodular (grados 1 y 2), el linfoma de Hodgkin clásico rico en linfocitos, el linfoma de Hodgkin de celularidad mixta y el linfoma de Hodgkin de empobrecimiento de linfocitos. En diversas realizaciones, cualquiera de las neoplasias linfoides que están asociadas con la actividad anormal de JAK se puede tratar con los compuestos inhibidores de syk y/o JAK.

En algunas realizaciones, la neoplasia hematopoyética tratada es una neoplasia mieloides. Este grupo comprende una clase grande de trastornos proliferativos celulares o que presentan el fenotipo característico de las células del linaje mieloides. Las neoplasias mieloides se pueden subdividir en enfermedades mieloproliferativas, enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, síndromes mielodisplásicos y leucemias mieloides agudas. Las enfermedades mieloproliferativas ejemplares son la leucemia mielógena crónica (por ejemplo, leucemia neutrofílica crónica con cromosoma Filadelfia positivo (t(9;22)(qq34;q11)), leucemia eosinofílica crónica/síndrome hipereosinofílico, mielofibrosis idiopática crónica, policitemia verdadera y trombocitemia esencial. Los trastornos mielodisplásicos/mieloproliferativos ejemplares son la leucemia mielomonocítica crónica, leucemia mielógena crónica atípica y leucemia mielomonocítica juvenil. Los síndromes mielodisplásicos ejemplares son anemia refractaria, con sideroblastos en anillo y sin sideroblastos en anillo, citopenia refractaria (síndrome mielodisplásico) con displasia de multilineaje, anemia refractaria (síndrome mielodisplásico) con blastos en exceso, síndrome 5q y síndrome mielodisplásico. En diversas realizaciones, cualquiera de las neoplasias mieloides que están asociadas con actividad anormal de syk y/o JAK se puede tratar con los compuestos inhibidores de syk y/o JAK.

En algunas realizaciones, los compuestos se pueden utilizar para tratar leucemias mieloides agudas (LMA), que representan una gran clase de neoplasias mieloides que tienen su propia subdivisión de trastornos. Estas subdivisiones incluyen, entre otras, las LMA con translocaciones citogenéticas recurrentes, LMA con displasia multilineaje y otras LMA no categorizadas de otra forma. Las LMA ejemplares con translocaciones citogenéticas recurrentes incluyen, entre otras, LMA con t(8;21)(q22;q22), LMA1(CBF-alfa)/ETO, leucemia promielocítica aguda (LMA con t(15;17)(q22;q11-12) y variantes, PML/RAR-alfa), LMA con eosinófilos de la médula ósea anormales (inv(16)(p13q22) o t(16;16)(p13;q11), CBFb/MYH11X), y LMA con anomalías 11q23 (MLL). Las LMA con displasia de multilineaje ejemplares son las que están asociadas con o sin síndrome mielodisplásico anterior. Otras leucemias mieloides agudas no clasificadas dentro de algún grupo definible incluyen, LMA mínimamente diferenciada, LMA sin maduración, LMA con maduración, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia monocítica aguda, leucemia eritroide aguda, leucemia megacariocítica aguda, leucemia basofílica aguda y panmielosis aguda con mielofibrosis.

"Tratar" dentro del contexto de la invención significa un alivio de los síntomas asociados con un trastorno o enfermedad, o detener la progresión adicional o el empeoramiento de los síntomas, o la prevención o profilaxis de la enfermedad o trastorno.

El término "mamífero" incluye organismos que expresan syk y/o JAK. Los ejemplos de mamíferos incluyen ratones, ratas, vacas, ovejas, cerdos, cabras, caballos, osos, monos, perros, gatos y, preferentemente, seres humanos. También se incluyen en esta definición los organismos transgénicos que expresan syk y/o JAK.

5 La invención proporciona compuestos como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal, comprendiendo dicho uso administrar a un mamífero o animal no humano una cantidad eficaz de un compuesto o composición descrito en el presente documento. Como se usa en el presente documento, "cantidad eficaz" de un compuesto o composición de la invención incluye las cantidades que antagonizan o inhiben syk y/o JAK. Una cantidad que antagoniza o inhibe a syk y/o JAK es detectable, por ejemplo, por cualquier ensayo que tiene la capacidad de determinar la actividad de syk y/o JAK, incluyendo el descrito a continuación como un método de análisis ilustrativo. Las cantidades eficaces también pueden incluir las cantidades que alivian los síntomas de un trastorno asociado con syk y/o JAK tratable mediante la inhibición de syk y/o JAK. Por consiguiente, "antagonistas de syk" o "antagonistas de JAK" incluyen compuestos que interactúan con syk o JAK, respectivamente, y modulan, por ejemplo, inhiben o disminuyen, la capacidad de un segundo compuesto, por ejemplo otro ligando de syk o JAK, para interactuar con la syk o JAK, respectivamente. Los compuestos de unión a syk o JAK son preferentemente antagonistas de syk o JAK, respectivamente. Las expresiones "compuestos de unión a syk " y "compuestos de unión a JAK " (por ejemplo, que presenta afinidad de unión al receptor) incluyen los compuestos que interactúan con syk o JAK dando como resultado la modulación de la actividad de syk o JAK, respectivamente. Los compuestos de unión a syk y/o JAK pueden identificarse utilizando un método *in vitro* (por ejemplo, basado en células o no basado en células) o *in vivo*. A continuación se proporciona una descripción de los métodos *in vitro*.

La cantidad de compuesto presente, cuando se utiliza como se describe en el presente documento o en composiciones como se describe en el presente documento, debería ser suficiente para provocar una disminución detectable en la gravedad del trastorno, como se mide por cualquiera de los ensayos descritos en los ejemplos. La cantidad del modulador de syk y/o JAK necesaria dependerá de la eficacia del modulador para el tipo celular dado y el periodo de tiempo necesario para tratar el trastorno. En determinadas realizaciones, las composiciones de la presente invención pueden comprender adicionalmente otro agente terapéutico. Cuando se utiliza un segundo agente, el segundo agente puede administrarse ya sea como una forma farmacéutica separada o como parte de una forma farmacéutica unitaria con los compuestos o composiciones de la presente invención. Aunque uno o más de los compuestos de la invención se pueden utilizar en una aplicación de monoterapia para tratar un trastorno, enfermedad o síntoma, también pueden utilizarse en terapia de combinación, en donde el uso de un compuesto o composición de la invención (agente terapéutico) se combina con el uso de uno o más de otros agentes terapéuticos, para el tratamiento de los mismos y/o de otros tipos de trastornos, síntomas y enfermedades. La terapia de combinación incluye la administración de dos o más agentes terapéuticos de forma simultánea o secuencial. Los agentes se pueden administrar en cualquier orden. Como alternativa, los múltiples agentes terapéuticos se pueden combinar en una única composición que se puede administrar al paciente. Por ejemplo, una única composición farmacéutica podría comprender el compuesto o la sal, éster o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la fórmula I, otro agente terapéutico (por ejemplo, metotrexato) o una sal, éster o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente o transportador farmacéuticamente aceptable.

La invención comprende un compuesto que tiene la fórmula I. También se describe un método para preparar un compuesto de la invención y un método para preparar una composición farmacéutica de al menos un compuesto de la invención en al menos un transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable. La invención también proporciona un compuesto como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de una diversidad de trastornos, síntomas y enfermedades (por ejemplo, inflamatoria, autoinmunitaria, neurológica, neurodegenerativa, oncológica y cardiovascular), tal como AR, osteoartritis, enfermedad del intestino irritable EII, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica EPOC y EM. Los compuestos de la invención y sus sales y/o composiciones neutras farmacéuticamente aceptables, se pueden formular junto a un excipiente o transportador farmacéuticamente aceptable y la composición resultante se puede administrar a mamíferos *in vivo*, tal como hombres, mujeres y animales, para tratar una diversidad de trastornos, síntomas y enfermedades. Además, los compuestos de la invención se pueden utilizar para preparar un medicamento que sea útil para el tratamiento de una diversidad de trastornos, síntomas y enfermedades.

55 Todos los compuestos de la presente invención son inhibidores potentes de las syk y/o JAK quinasas, presentando las  $CI_{50}$  en el ensayo respectivo en el intervalo de menos de 5  $\mu M$ , con la mayoría estando en el intervalo de nanomolar, y varios en el de subnanomolar. En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención pueden ser inhibidores de syk/JAK "duales" en el aspecto que inhiben en algún grado tanto a syk como a JAK quinasa. En otras realizaciones, los compuestos de la presente invención pueden inhibir de forma selectiva a la syk quinasa, pero no inhiben de forma apreciable a una o más JAK quinasas. En otras realizaciones, los compuestos de la presente invención pueden inhibir de forma selectiva a JAK quinasa, pero no inhiben de forma apreciable una o más syk quinasas.

65

## f. Kits

Todavía otro aspecto de la presente invención es proporcionar un kit que comprende recipientes separados en un único envase, en el que los compuestos, composiciones y/o sales de los mismos, farmacéuticos de la invención, se usan, por lo tanto, en combinación con transportadores farmacéuticamente aceptables para tratar estados, trastornos, síntomas y enfermedades en donde syk y/o JAK desempeñan un papel.

**Ejemplos**

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar, la invención reivindicada.

Los materiales de partida y reactivos usados en la preparación de estos compuestos se encuentran por lo general disponibles a partir de proveedores comerciales, tales como Aldrich Chemical Co., o se preparan mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica siguiendo los procedimientos expuestos en referencias tales como Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis; Wiley & Sons: Nueva York, 1967-2004, Volúmenes 1-22; Rodd's Chemistry of Carbon Compounds, Elsevier Science Publishers, 1989, Volúmenes 1-5 y Suplementos; y Organic Reactions, Wiley & Sons: Nueva York, 2005, Volúmenes 1-65.

Si se desea, los materiales de partida y intermedios de los esquemas de las reacciones de síntesis pueden aislarse y purificarse mediante técnicas convencionales que incluyen, pero sin limitación, filtración, destilación, cristalización, cromatografía y similares. Dichos materiales pueden caracterizarse mediante medios convencionales, INCLUYENDO constantes físicas y datos espectrales.

A menos que se especifique otra cosa, las reacciones descritas en el presente documento se realizan preferiblemente en una atmósfera inerte a presión atmosférica y a un intervalo de temperaturas de reacción de aproximadamente -78 °C a aproximadamente 150 °C, más preferiblemente de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 125 °C, y más preferiblemente y convenientemente a temperatura ambiente, por ejemplo, de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 75 °C.

Con referencia a los siguientes ejemplos, los compuestos de la presente invención se sintetizaron usando los métodos descritos el presente documento, u otros métodos, que se conocen bien en la técnica.

Los compuestos y/o intermedios pueden caracterizarse por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) usando una sistema de cromatografía Waters Alliance con un módulo de separación 2695 (Milford, Mass.). Las columnas analíticas pueden ser columnas C-18 SpeedROD RP-18E de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). Como alternativa, la caracterización puede realizarse usando un sistema Waters Unity (UPLC) con columnas Waters Acquity UPLC BEH C-18 2,1 mm x 15 mm. Puede usarse un gradiente de elución, típicamente partiendo de acetonitrilo al 5 %/agua al 95 % y continuando hasta acetonitrilo al 95 % durante un periodo de 5 minutos para el sistema Alliance y 1 minuto para el sistema Acquity. Todos los disolventes pueden contener ácido trifluoroacético al 0,1 % (TFA). Los compuestos pueden detectarse por absorción de luz ultravioleta (UV) a 220 nm o 254 nm. Los disolventes de HPLC pueden ser de EMD Chemicals, Inc. (Gibbstown, NJ). En algunos casos, la pureza puede evaluarse por cromatografía de capa fina (TLC) usando placas de vidrio con respaldo de gel de sílice, tales como, por ejemplo, placas EMD de gel de sílice 60 2,5 cm x 7,5 cm. Los resultados por TLC pueden detectarse fácilmente de forma visual bajo luz ultravioleta, o empleando técnicas ya conocidas de vapor de yodo y otras diversas técnicas de tinción.

Los análisis de espectrometría de masas pueden realizarse en uno de dos instrumentos Agilent 1100 serie LCMS con acetonitrilo/agua como fase móvil. Un sistema puede usar TFA como el modificador y medir en modo de ión positivo [indicado como MH<sup>+</sup>, (M+1) o (M+H)<sup>+</sup>] y el otro puede usar ácido fórmico o acetato amónico y medir tanto en modo de ión positivo [indicado como MH<sup>+</sup>, (M+1) o (M+H)<sup>+</sup>] como negativo [indicado como M<sup>-</sup>, (M-1) o (M-H)].

El análisis de resonancia magnética nuclear (RMN) puede realizarse en algunos de los compuestos con un Varian 400 MHz RMN (Palo Alto, Calif.). La referencia espectral puede ser TMS o el desplazamiento químico conocido del disolvente.

La pureza de algunos de los compuestos de la invención puede evaluarse mediante análisis elementales (Robertson Microlit, Madison, NJ.).

Los puntos de fusión pueden determinarse en un aparato de Laboratory Devices Mel-Temp (Holliston, Mass.).

Las separaciones preparativas pueden realizarse según sea necesario, usando un sistema de cromatografía Sg16x o Sg100c y columnas de gel de sílice rellenas previamente, todo adquirido en Teledyne Isco, (Lincoln, NE). Como alternativa, los compuestos e intermedios pueden purificarse por cromatografía en columna ultrarrápida usando material de relleno de gel de sílice (malla 230-400), o por HPLC usando una columna de fase inversa C-18. Los disolventes típicos empleados para los sistemas Isco y la cromatografía en columna ultrarrápida pueden ser diclorometano, metanol, acetato de etilo, hexano, acetona, hidroxiamina acuosa y trietil amina. Los disolventes típicos empleados para la HPLC de fase inversa pueden ser de concentraciones variables de acetonitrilo y agua con

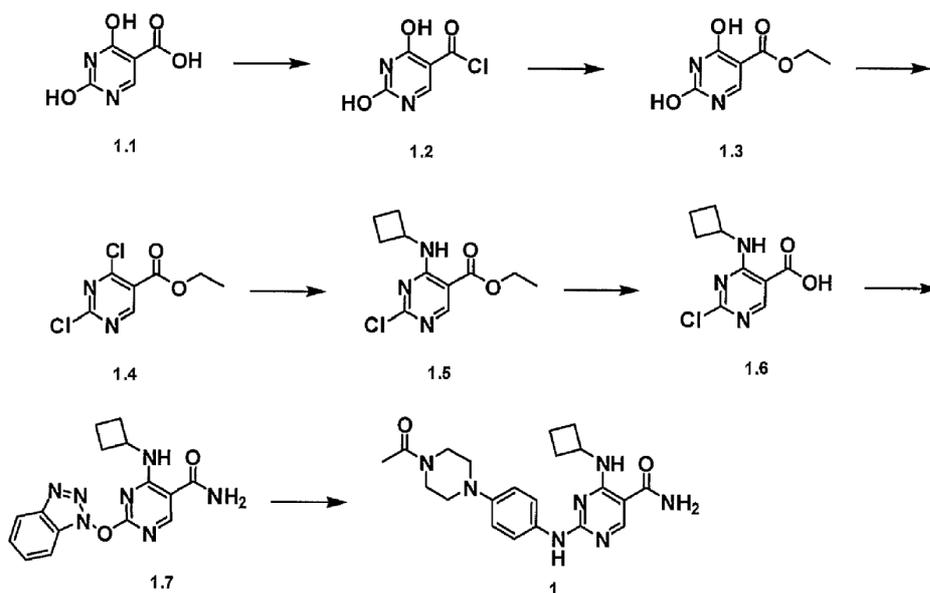
ácido trifluoroacético al 0,1 %.

### Métodos generales

5 Los siguientes esquemas de reacción sintéticos son simplemente ilustrativos de algunos métodos mediante los cuales pueden sintetizarse los compuestos de la presente invención, y pueden hacerse diversas modificaciones a estos esquemas de reacción sintéticos y se sugerirán a un experto en la técnica que haga referencia a la divulgación contenida en esta solicitud.

### 10 Ejemplo 1. 2-(4-(4-acetilpiperazin-1-il)fenilamino)-4-(ciclobutilamino)pirimidin-5-carboxamida 1

Esquema 1:



15 Etapa 1: A una solución en agitación de ácido carboxílico 1.1 (85 g, 540 mmol) en cloruro de tionilo (425 ml) se le añadió lentamente piridina (8,5 ml, 0,11 mmol). La reacción se agitó a 75 °C durante una noche, momento en el que se concentró y se secó al vacío para dar un polvo de color amarillo claro que se usó inmediatamente en la siguiente etapa.

20 Etapa 2: El sólido de color amarillo de la etapa anterior se diluyó lentamente con 750 ml de etanol y se calentó a reflujo durante una noche. El día siguiente se determinó que la reacción estaba completa por HPLC y después se enfrió en un baño de hielo, y el sólido filtrado y se lavó con éter dietílico proporcionando el éster etílico deseado (1.3) en forma de un polvo blanquecino (91 g, 87 % en dos etapas). MS encontrado para  $C_7H_8N_2O_4$  como  $(M+H)^+$  185,0.

25 Etapa 3: El éster 1.3 (22 g, 120 mmol) se disolvió en oxiclورو de fósforo (60 ml, 600 mmol) y la mezcla se trató con N,N-dietilanilina (27 ml, 167 mmol) y la mezcla se calentó a 105 °C hasta que se determinó que la reacción estaba completa por HPLC. Después, se enfrió a ta y se añadió lentamente a 1 l de hielo picado dando como resultado la formación de un precipitado de color beige que se recogió por filtración y se seco al vacío proporcionando el dicloruro deseado (1.4) en forma de un polvo de color amarillo claro (22,5 g, 85 %).  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  9,13 (s, 1H), 4,37 (c, 2H), 1,32 (t, 3H).

30 Etapa 4: Se disolvió dicloropirimidina 1,4 (5,9 g, 27 mmol) en acetonitrilo (50 ml), se trató secuencialmente con diisopropilamina (5,2 ml, 30 mmol) seguido de ciclobutil amina (1,9 g, 27 mmol) y se agitó a ta hasta que todo el material de partida se había consumido. Después, la mezcla de reacción se diluyó con agua hasta un volumen total de 150 ml y el precipitado se recogió por filtración proporcionando el producto deseado en forma de un sólido de color amarillo claro (6,02 g, 87 %).  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  8,60 (s, 1H), 8,48 (d, 1H), 4,52 (m, 1H), 4,29 (c, 2H), 2,30 (m, 2H), 2,04 (m, 2H), 1,73 (m, 2H), 1,30 (t, 3H).

40 Etapa 5: Se diluyó éster etílico 1.5 (6,02 g, 24 mmol) con 1,4-dioxano (26 ml) seguido de hidróxido de litio acuoso (1,0 M, 26 ml, 26 mmol) y se agitó a ta hasta que todo el material de partida se había convertido para dar el ácido carboxílico. Después, la reacción se diluyó con agua hasta un volumen total de 100 ml y se acidificó a pH = 2 con HCl 6 M. Después, la suspensión resultante se filtró y se secó por aspiración dando 3,51 g del ácido carboxílico (64 %).  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  8,64 (d, 1H), 8,74 (s, 1H), 4,50 (m, 1H), 2,31 (m, 2H), 2,03 (m, 2H), 1,72 (m,

2H).

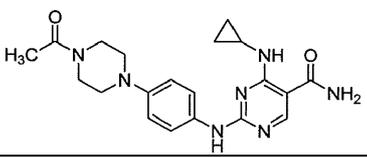
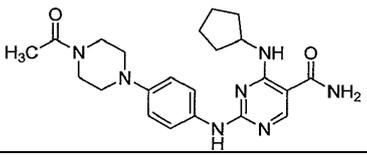
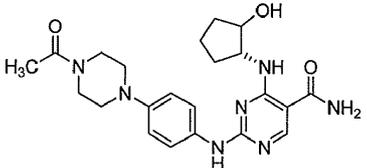
5 Etapa 6: Se disolvió ácido carboxílico 1.6 (3,15 g, 15 mmol) se disolvió en N,N-dimetilformamida (70 ml) y se trato con HOBt (3,13 g, 23 mmol) y EDC (4,4 g, 23 mmol). Después de agitar durante aprox. 25 min se añadió amoniaco (0,5 M en 1,4-dioxano, 72 ml, 36 mmol) y la reacción se agitó durante una noche. A la siguientes mañana, la reacción se diluyó con agua para dar un volumen total de 500 ml y el producto deseado se recogió por filtración proporcionando 3,62 g (74 %) de un sólido de color beige claro. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 9,30 (d, 1H), 8,54 (s, 1H), 8,15 (d, 1H), 8,09 (s, 1H), 7,74 (d, 1H), 7,64 (m, 2H), 7,51 (t, 1H), 3,77 (m, 1H), 1,79 (m, 2H), 1,74 (m, 2H), 1,53 (m, 1H), 1,41 (m, 1H).

10 Etapa 7: Se diluyeron benzotriazolil éter 1.7 (50 mg, 0,17 mmol), 1-(4-(4-aminofenil)piperazin-1-il)etanona (preparada de 1-acetilpiperazina y 4-fluoronitrobenzo en dos etapas) (45 mg, 0,20 mmol) y ácido p-toluenosulfónico (30 mg, 0,17 mmol) con 1,4-dioxano (5 ml) y se agitó a 120 °C hasta que todo el material de partida se había consumido. La reacción se enfrió a ta, se diluyó con agua y se purificó directamente por HPLC preparativa proporcionando el producto deseado, 1, después de la liofilización. MS encontrado para C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub> como (M+H)<sup>+</sup>410,2.

15 El siguiente compuesto se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1 con el reactivo A en lugar de ciclobutilamina en la Etapa 4.

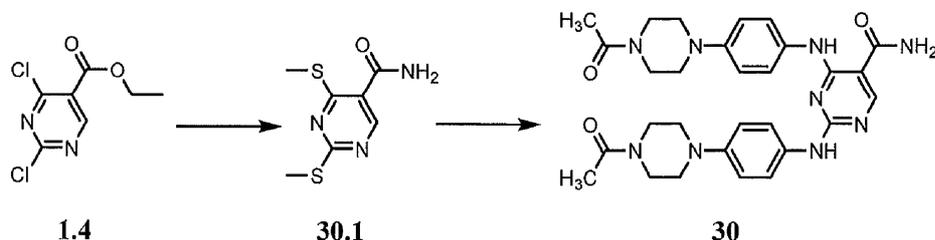
20

Tabla 6

Ej. n.º	Estructura	Reactivo A	PM	MS	Nombre
3		ciclopropilamina	395,4 67	396	2-(4-(4-acetilpiperazin-1-il)fenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida
4		ciclopentilamina	423,5 21	424	2-(4-(4-acetilpiperazin-1-il)fenilamino)-4-(ciclopentilamino)pirimidin-5-carboxamida
22		<i>trans</i> -2-hidroxi ciclopropilamina racémica	439,5 2	440,5	2-(4-(4-acetilpiperazin-1-il)fenilamino)-4-((1R)-2-hidroxiciclopentilamino)pirimidin-5-carboxamida

Ejemplo de referencia 32. 2,4-bis(4-(4-acetilpiperazin-1-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida

Esquema 2:



5

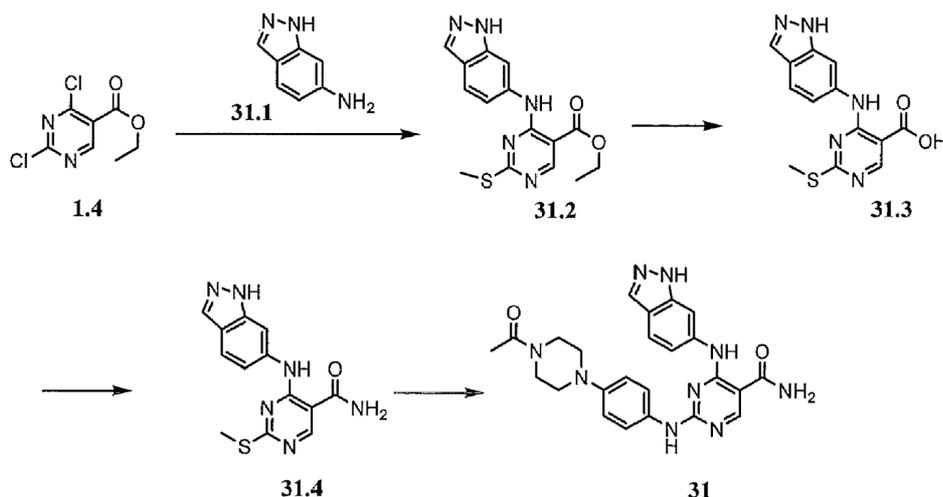
Etapa 1: El Compuesto 1.4 (Ejemplo 1, 1,05 g, 4,8 mmol) se disolvió en 40 ml de acetonitrilo. A éste se le añadió tiometóxido sódico (0,74 g, 10,5 mmol). Se agitó durante una noche, se diluyó con acetato de etilo, se lavó con salmuera tres veces, se secó y se concentró al vacío. Después, se puso en 20 ml de dioxano y 10 ml de agua. A esto se le añadieron 500 mg de LiOH hidrato. La mezcla se agitó durante 4 horas. A la mezcla se le añadió HCl 1 N hasta que el pH alcanzó 3. Se concentró y se extrajo con acetato de etilo tres veces. Las fases orgánicas se combinaron, se secaron y se concentraron al vacío para proporcionar un sólido de color blanco. Después, este sólido se disolvió en 30 ml de DMF seca. A éste se le añadieron clorhidrato de EDC (1,10 g, 5,7 mmol) y HOBt (0,77 g, 5,7 mmol). La mezcla se agitó durante 30 min, y a ésta se le añadió amoniaco (solución 0,5 N comercial en dioxano, 29 ml, 14,5 mmol). La mezcla se agitó durante una noche, se concentró al vacío, se diluyó con acetato de etilo, se lavó con salmuera tres veces, se secó y se concentró al vacío para dar el compuesto en bruto 30,1. MS encontrado para  $C_7H_9N_3OS_2$  como  $(M+H)^+$  216,1.

Etapa 2: El Compuesto en bruto 30.1 (42 mg, 0,20 mmol) se disolvió en 4 ml de NMP. A éste se le añadió MCPBA (133 mg, 0,50 mmol). Se agitó a TA durante 1 hora. A éste se le añadieron 1-(4-(4-aminofenil)piperazin-1-il)etanona (175 mg, 0,80 mmol) y DIEA (140  $\mu$ l, 0,80 mmol). Después, la mezcla se agitó en un baño a 120 °C durante 90 min. Después, la mezcla se sometió a HPLC preparativa de fase inversa para aislar el compuesto del título. MS encontrado para  $C_{29}H_{35}N_9O_3$  como  $(M+H)^+$  558,2.

Ejemplo de referencia 33. 4-(1H-indazol-6-ilamino)-2-(4-(4-acetilpiperazin-1-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida

25

Esquema 3:



Etapa 3: Se disolvió dicloropirimidina 1.4 (véase el Ejemplo 1; 1,04 g, 4,7 mmol) en NMP (30 ml) y se agitó en un baño de hielo. A esto se le añadieron 6-aminoindazol 31.1 (690 mg, 5,2 mmol) y después gota a gota etildisopropilamina (DIEA, 1,64 ml, 9,4 mmol). La mezcla se agitó durante 40 minutos, y a ésta se le añadió tiometóxido sódico (660 mg, 9,4 mmol). La mezcla se agitó durante una noche, se diluyó con acetato de etilo, se lavó con salmuera tres veces, y se concentró al vacío para dar el compuesto en bruto 31.2 en forma de un sólido de color pardo claro con rendimiento cuantitativo. MS encontrado para  $C_{15}H_{15}N_5O_2S$  como  $(M+H)^+$  330,1.

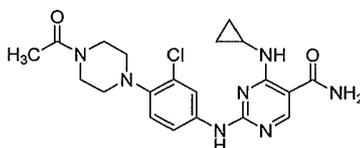
Etapa 4: Se disolvió éster etílico 31.2 (4,7 mmol) en 60 ml de THF. hidróxido de litio hidrato (236 mg, 5,6 mmol) y

20 ml de agua. La mezcla se agitó durante una noche y a ésta se le añadió cuidadosamente una solución 1 N HCl hasta que el pH alcanzó 2. La mezcla se concentró al vacío para retirar THF. El sólido de color blanco se formó y se aisló usando un embudo de Büchner. Se lavó con agua y se secó en un horno de vacío para dar el compuesto 31.3 (1,14 g, 81 %) en forma de un sólido de color blanco. MS encontrado para  $C_{13}H_{11}N_5O_2S$  como  $(M+H)^+$  302,1.

Etapa 5: Se disolvió ácido carboxílico 31.3 (1,14 g, 3,8 mmol) en 30 ml de DMF. A esto se le añadieron clorhidrato de EDC (1,09 g, 5,7 mmol) y HOBt hidrato (770 mg, 5,7 mmol). La mezcla se agitó a TA durante 1 hora. Después a ésta se le añadió amoníaco (solución 0,5 N comercial en dioxano, 22 ml, 11,4 mmol). La mezcla se agitó durante 2 horas. Después, se concentró al vacío y se recogió en agua y acetato de etilo. La fase orgánica se separó y se lavó con salmuera cuatro veces. Después, la fase orgánica se secó sobre  $MgSO_4$  y se concentró al vacío para proporcionar el compuesto 31.4 en forma de un sólido de color amarillo claro (820 mg, 72 %). MS encontrado para  $C_{13}H_{12}N_6OS$  como  $(M+H)^+$  301,1.

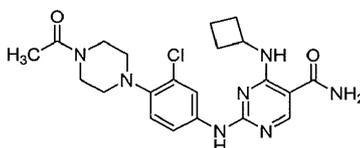
Etapa 6: El Compuesto 31.4 (36 mg, 0,12 mmol) se disolvió en 3 ml de NMP. A éste se le añadió MCPBA (puro al 65 %, 48 mg, 0,18 mmol). Se agitó a TA durante 30 minutos. Después, a esto se le añadieron 1-(4-(4-aminofenil)piperazin-1-il)etanona (53 mg, 0,24 mmol) y pTSA (21 mg, 0,12 mmol). La mezcla se agitó durante 90 minutos en un baño de 120 °C. Después, esta mezcla se sometió a HPLC preparativa para aislar el compuesto del título 31. MS encontrado para  $C_{24}H_{25}N_9O_2$  como  $(M+H)^+$  472,2.

Ejemplo 34. 2-(4-(4-acetilpiperazin-1-il)-3-clorofenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida



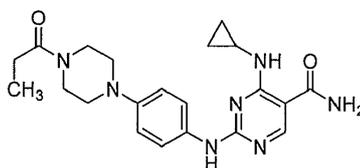
El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1 con ciclopropilamina en lugar de ciclobutilamina en la Etapa 4. La síntesis de la cloropiperazinilánilina se realizó por cloración del intermedio nitropiperazinilo, sintetizado de manera similar a la descrita en el Ejemplo 36, con NCS, seguido de reducción usando platino sulfurado. MS encontrado para  $C_{20}H_{24}N_7O_2Cl$  como  $(M+H)^+$  430,0. UV:  $\lambda = 290$

Ejemplo 35. 2-(4-(4-acetilpiperazin-1-il)-3-clorofenilamino)-4-(ciclobutilamino)pirimidin-5-carboxamida



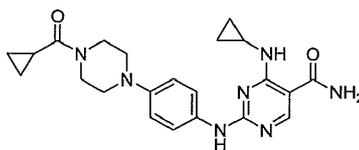
El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 32. MS encontrado para  $C_{21}H_{26}N_7O_2Cl$  como  $(M+H)^+$  444,0. UV:  $\lambda = 211, 290$

Ejemplo 36. 4-(ciclopropilamino)-2-(4-(4-propionilpiperazin-1-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida



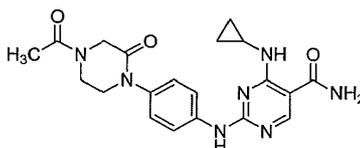
El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1 con ciclopropilamina en lugar de ciclobutilamina. La piperazinilánilina se sintetizó a partir de Boc piperazina y 4-fluoronitrobenzeno, seguido de desprotección usando HCl en dioxano y acilación usando cloruro de propionilo, y finalmente hidrogenación usando Pd/C. MS encontrado para  $C_{21}H_{27}N_7O_2$  como  $(M+H)^+$  410,3.  $^1H$  RMN ( $CD_3OD$ , 400 MHz):  $\delta$  8,22 (s, 1H), 7,49 (s ancho, 2H), 7,06 (d, 2H), 3,73 (m, 4H), 3,22 (m, 4H), 2,47 c, 2H), 3,03 (m, 1H), 1,12 (t, 3H), 0,90 (m, 2H), 0,70 (m, 2H).

Ejemplo 37. 2-(4-(4-(ciclopropanocarbonil)piperazin-1-il)fenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida



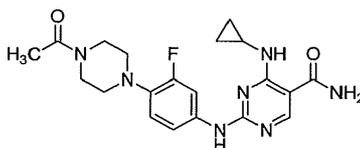
5 El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 36 con cloruro de ciclopropilcarbonilo en lugar de cloruro de propionilo. MS encontrado para  $C_{22}H_{27}N_7O_2$  como  $(M+H)^+422,4$ .  $^1H$  RMN ( $CD_3OD$ , 400 MHz):  $\delta$  8,22 (s, 1H), 7,45 (s ancho, 2H), 7,08 (d, 2H), 3,93 (m, 4H), 3,73 (m, 4H), 3,02 (m, 1H), 2,01 (m, 1H), 0,88 (m, 6H), 0,69 (m, 2H). UV:  $\lambda = 203, 273$ .

Ejemplo 39. 2-(4-(4-acetil-2-oxopiperazin-1-il)fenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida



10 El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1 con ciclopropilamina en lugar de ciclobutilamina en la Etapa 4. La oxopiperazinil anilina se sintetizó a partir de 4-nitroiodobenceno y 4-Boc-2-oxopiperidina usando condiciones catalizadas con yoduro de cobre/dimetiletilendiamina. Después, el grupo Boc se eliminó usando HCl en dioxano, la amina resultante se aciló usando cloruro de acetilo, y finalmente el grupo nitro se redujo usando hidrógeno y Pd/C. MS encontrado para  $C_{20}H_{23}N_7O_3$  como  $(M+H)^+410,2$ . UV:  $\lambda = 275$ .

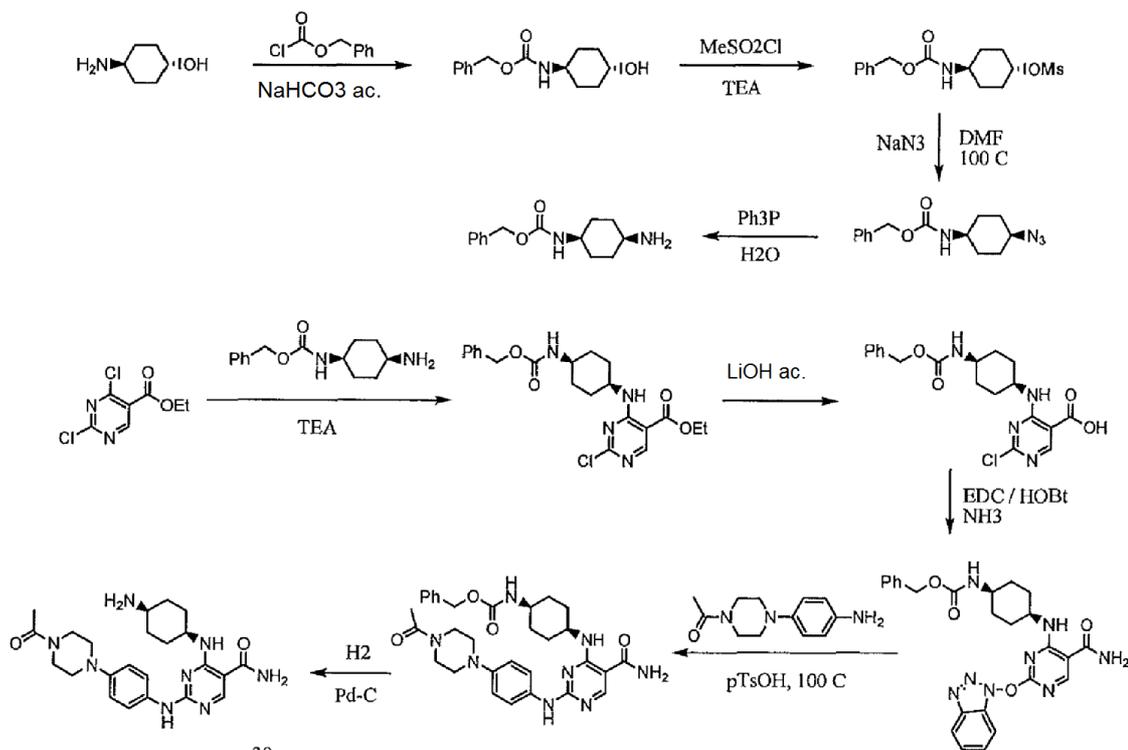
Ejemplo 40. 2-(4-(4-acetilpiperazin-1-il)-3-fluorofenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida



20 El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1 con ciclopropilamina en lugar de ciclobutilamina en la Etapa 4. La anilina se sintetizó a partir de la carboxil azida correspondiente por calentamiento en agua/DMF. La azida se sintetizó últimamente a partir de ácido 3,4-difluorobenzoico. MS encontrado para  $C_{20}H_{24}N_7O_2F$  como  $(M+H)^+414,2$ . UV:  $\lambda = 293$ .

Ejemplo 41. 2-(4-(4-acetilpiperazin-1-il)fenilamino)-4-((1s,4s)-4-aminociclohexilamino)pirimidin-5-carboxamida

Esquema 4:



39

5 A una mezcla de trans-4-aminociclohexanol (2,07 g, 13,6 mmol) y NaHCO<sub>3</sub> (3,50 g, 41,7 mmol) en H<sub>2</sub>O (20 ml) a temperatura ambiente, se le añadió una solución de cloroformato de bencilo (1,92 ml, 13,6 mmol) en dioxano (15 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. El precipitado de color blanco se recogió en forma de (1R,4R)-4-hidroxyciclohexilcarbamato de bencilo (3,37 g).

10 A una suspensión de (1R,4R)-4-hidroxyciclohexilcarbamato de bencilo (1,14 g, 4,58 mmol) y trietilamina (1,30 ml, 9,34 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 ml) a temperatura ambiente, se añadió cloruro de metanosulfonilo (0,425 ml, 5,49 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. Se añadió más cantidad de cloruro de metanosulfonilo (0,425 ml, 5,49 mmol) y trietilamina (1,00 ml). La agitación se continuó durante 48 h. La solución de reacción se lavó con NaHCO<sub>3</sub> al 5 %, y después con HCl 1 N. La fase orgánica se separó, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se concentró al vacío para dar metanosulfonato de (1R,4R)-4-(benciloxicarbonil)ciclohexilo en forma de un sólido (1,13 g).

15 Una mezcla de metanosulfonato de (1R,4R)-4-(benciloxicarbonil)ciclohexilo (1,13 g, 3,46 mmol) y NaN<sub>3</sub> (0,674 g, 10,4 mmol) en DMF (10 ml) se agitó a 100 °C durante 20 h. Se añadieron agua y EtOAc. La fase orgánica se separó, se lavó con agua, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se concentró al vacío para dar (1s,4s)-4-azidociclohexilcarbamato de bencilo (0,819 g).

20 A una solución de (1s,4s)-4-azidociclohexilcarbamato de bencilo (0,410 g, 1,50 mmol) en THF (8 ml) y H<sub>2</sub>O (0,100 ml, 5,56 mmol) a temperatura ambiente, se le añadió Ph<sub>3</sub>P (0,590 g, 2,25 mmol). La solución se agitó a 70 °C durante 20 h. Se añadieron EtOAc y HCl 1 N. La fase acuosa se separó, se lavó con EtOAc. Después, se acidificó con NaOH 5 N a pH 12. El producto de amina libre se extrajo con EtOAc. La solución de EtOAc se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró al vacío para dar (1s,4s)-4-aminociclohexilcarbamato de bencilo (0,270 g).

25 Una mezcla de 2,4-dicloropirimidin-5-carboxilato de etilo (0,241 g, 1,09 mmol), (1s,4s)-4-aminociclohexilcarbamato de bencilo (0,270 g, 1,09 mmol) y trietilamina (0,300 ml, 2,16 mmol) en CH<sub>3</sub>CN (10 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. Se añadieron agua y EtOAc. La fase orgánica se separó, se lavó con HCl 1 N, después con NaHCO<sub>3</sub> al 5 %, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se concentró al vacío para dar 4-((1s,4s)-4-(benciloxicarbonil)ciclohexilamino)-2-cloropirimidin-5-carboxilato de etilo (0,458 g).

30 A una solución de 4-((1s,4s)-4-(benciloxicarbonil)ciclohexilamino)-2-cloropirimidin-5-carboxilato de etilo (0,458 g, 1,06 mmol) en THF (5 ml) se le añadió LiOH ac. 1 N (1,16 ml, 1,16 mmol). Después de agitarse durante 3 h, se le añadió agua (10 ml). La solución se acidificó con HCl 1 N (2 ml) a pH 1-2. El producto se extrajo con EtOAc. La

35

solución de EtOAc se lavó con salmuera, se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentró al vacío para dar ácido 4-((1s,4s)-4-(benciloxycarbonil)ciclohexilamino)-2-cloropirimidin-5-carboxílico en forma de un sólido (0,409 g).

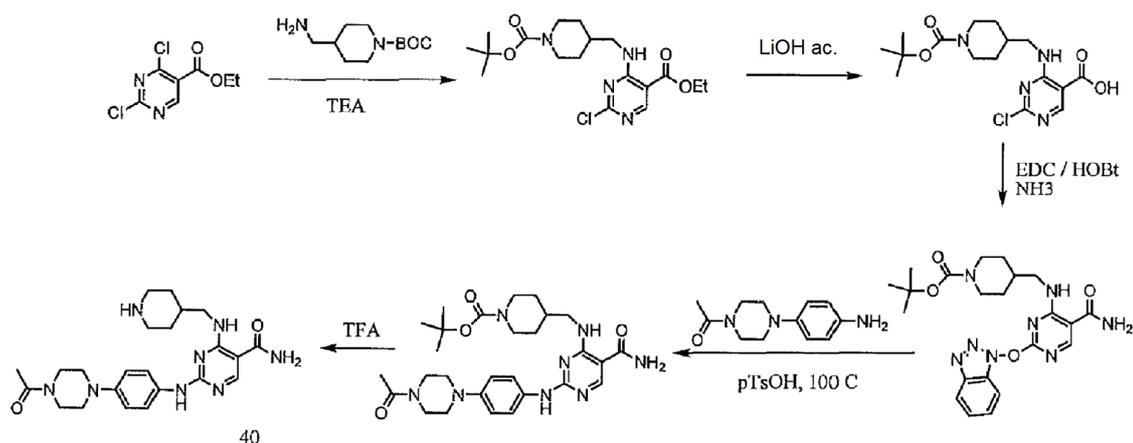
A una solución de ácido 4-((1s,4s)-4-(benciloxycarbonil)ciclohexilamino)-2-cloropirimidin-5-carboxílico (0,409 g, 1,01 mmol) y HOBt (0,232 g, 1,52 mmol) en DMF (5 ml) se le añadió EDC (0,291 g, 1,52 mmol). Después de agitarse durante 2 h, se añadió  $\text{NH}_3$  (0,5 M en dioxano, 6,0 ml, 3,00 mmol). La mezcla se agitó durante 20 h. Se añadieron agua y EtOAc. La fase orgánica se separó, se lavó con HCl 1 N, después con  $\text{NaHCO}_3$  al 5 %, se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentró al vacío para dar (1s,4s)-4-(2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-iloxi)-5-carbamoilpirimidin-4-ilamino)ciclohexilcarbamato de bencilo en forma de un sólido (0,440 g).

Una mezcla de (1s,4s)-4-(2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-iloxi)-5-carbamoilpirimidin-4-ilamino)ciclohexilcarbamato de bencilo (0,220 g, 0,438 mmol), 1-(4-(4-aminofenil)piperazin-1-il)etanona (0,192 g, 0,877 mmol) y pTsOH monohidrato (0,083 g, 0,437 mmol) en dioxano (4 ml) se agitó a 100 °C durante 3 h. Después, la mezcla se purificó por HPLC para dar (1s,4s)-4-(2-(4-(4-acetilpiperazin-1-il)fenilamino)-5-carbamoilpirimidin-4-ilamino)ciclohexilcarbamato de bencilo (0,123 g).

Una mezcla de (1s,4s)-4-(2-(4-(4-acetilpiperazin-1-il)fenilamino)-5-carbamoilpirimidin-4-ilamino)ciclohexilcarbamato de bencilo (0,123 g, 0,21 mmol) y Pd-C (10 %, 40 mg) en MeOH (5 ml, que contenía tres gotas de HCl 6 N), se hidrogenó en un globo de  $\text{H}_2$  durante 4 h. La mezcla se filtró a través de celite, y el filtrado se concentró al vacío para dar el compuesto del título en forma de un sólido. MS 453,45 (M+H).

Ejemplo de referencia 42. 2-(4-(4-acetilpiperazin-1-il)fenilamino)-4-(piperidin-4-ilmetilamino)pirimidin-5-carboxamida

Esquema 5:



Una mezcla de 2,4-dicloropirimidin-5-carboxilato de etilo (0,221 g, 1,00 mmol), clorhidrato de 1-Boc-4-aminometilpiperidina (0,251 g, 1,00 mmol) y trietilamina (0,556 ml, 4,00 mmol) en  $\text{CH}_3\text{CN}$  (10 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. Se añadieron agua y EtOAc. La fase orgánica se separó, se lavó con HCl 1 N, después con  $\text{NaHCO}_3$  al 5 %, se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentró al vacío para dar 4-((1-(terc-butoxicarbonil)piperidin-4-il)metilamino)-2-cloropirimidin-5-carboxilato de etilo (0,390 g).

A una solución de 4-((1-(terc-butoxicarbonil)piperidin-4-il)metilamino)-2-cloropirimidin-5-carboxilato de etilo (0,390 g, 0,979 mmol) en THF (5 ml) se le añadió LiOH ac. 1 N (1,10 ml, 1,10 mmol). Después de agitarse durante 20 h, se añadió agua (10 ml). La solución se acidificó con HCl 1 N (2 ml) a pH 1-2. El producto se extrajo con EtOAc. La solución de EtOAc se lavó con salmuera, se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentró al vacío para dar ácido 4-((1-(terc-butoxicarbonil)piperidin-4-il)metilamino)-2-cloropirimidin-5-carboxílico en forma de un sólido (0,353 g).

A una solución de ácido 4-((1-(terc-butoxicarbonil)piperidin-4-il)metilamino)-2-cloropirimidin-5-carboxílico (0,353 g, 0,953 mmol) y HOBt (0,219 g, 1,43 mmol) en DMF (5 ml) se le añadió EDC (0,274 g, 1,43 mmol). Después de agitarse durante 1 h, se añadió  $\text{NH}_3$  (0,5 M en dioxano, 5,5 ml, 2,75 mmol). La mezcla se agitó durante 20 h. Se añadieron agua y EtOAc. La fase orgánica se separó, se lavó con HCl 1 N, después con  $\text{NaHCO}_3$  al 5 %, se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentró al vacío para dar 4-((2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-iloxi)-5-carbamoilpirimidin-4-ilamino)metil)piperidin-1-carboxilato de terc-butilo en forma de un sólido (0,410 g).

Una mezcla de 4-((2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-iloxi)-5-carbamoilpirimidin-4-ilamino)metil)piperidin-1-carboxilato de terc-butilo (0,205 g, 0,438 mmol), 1-(4-(4-aminofenil)piperazin-1-il)etanona (0,192 g, 0,877 mmol) y pTsOH

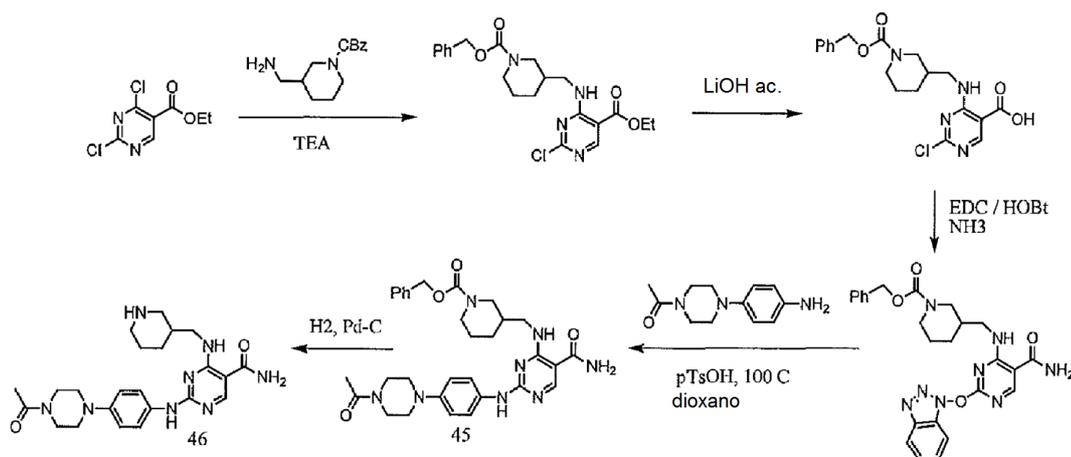
monohidrato (0,166 g, 0,874 mmol) en dioxano (4 ml) se agitó a 100 °C durante 3 h. Después, la mezcla se purificó por HPLC para dar 4-((2-(4-(4-acetilpiperazin-1-il)fenilamino)-5-carbamoilpirimidin-4-ilamino)metil)piperidin-1-carboxilato de terc-butilo (0,105 g).

- 5 Una solución de 4-((2-(4-(4-acetilpiperazin-1-il)fenilamino)-5-carbamoilpirimidin-4-ilamino)metil)piperidin-1-carboxilato de terc-butilo (0,105 g, 0,190 mmol) en TFA (2 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. El TFA se retiró al vacío. El residuo se purificó por HPLC para dar el compuesto del título (90 mg). MS 453,41 (M+H).

Ejemplo de referencia 48. 2-(4-(4-acetilpiperazin-1-il)fenilamino)-4-(piperidin-3-ilmetilamino)pirimidin-5-carboxamida

10

Esquema 6:



- 15 Una mezcla de 2,4-dicloropirimidin-5-carboxilato de etilo (0,221 g, 1,00 mmol), 3-aminometil-1-N-CBz-piperidina (0,248 g, 1,00 mmol) y trietilamina (0,300 ml, 2,15 mmol) en CH<sub>3</sub>CN (10 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. Se añadieron agua y EtOAc. La fase orgánica se separó, se lavó con HCl 1 N, después con NaHCO<sub>3</sub> al 5 %, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró al vacío para dar 4-((1-(benciloxicarbonil)piperidin-3-il)metilamino)-2-cloropirimidin-5-carboxilato de etilo (0,382 g).

- 20 A una solución de 4-((1-(benciloxicarbonil)piperidin-3-il)metilamino)-2-cloropirimidin-5-carboxilato de etilo (0,382 g, 0,88 mmol) en THF (5 ml) se le añadió LiOH ac. 1 N (1,00 ml, 1,00 mmol). Después de agitarse durante 20 h, se añadió agua (10 ml). La solución se acidificó con HCl 1 N (2 ml) a pH 1-2. El producto se extrajo con EtOAc. La solución de EtOAc se lavó con salmuera, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró al vacío para dar ácido 4-((1-(benciloxicarbonil)piperidin-3-il)metilamino)-2-cloropirimidin-5-carboxílico (0,350 g).

- 25 A una solución de ácido 4-((1-(benciloxicarbonil)piperidin-3-il)metilamino)-2-cloropirimidin-5-carboxílico (0,350 g, 0,87 mmol) y HOBt (0,200 g, 1,31 mmol) en DMF (5 ml) se le añadió EDC (0,250 g, 1,30 mmol). Después de agitarse durante 1 h, se añadió NH<sub>3</sub> (0,5 M en dioxano, 6,0 ml, 3,0 mmol). La mezcla se agitó durante 20 h. Se añadieron agua y EtOAc. La fase orgánica se separó, se lavó con HCl 1 N, después con NaHCO<sub>3</sub> al 5 %, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró al vacío para dar 3-((2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-iloxi)-5-carbamoilpirimidin-4-ilamino)metil)piperidin-1-carboxilato de bencilo (0,404 g).

- 35 Una mezcla de 3-((2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-iloxi)-5-carbamoilpirimidin-4-ilamino)metil)piperidin-1-carboxilato de bencilo (0,404 g, 0,805 mmol), 1-(4-(4-aminofenil)piperazin-1-il)etanona (0,220 g, 1,00 mmol) y pTsOH monohidrato (0,167 g, 0,879 mmol) en dioxano (8 ml) se agitó a 100 °C durante 3 h. Después, la mezcla se purificó por HPLC para dar 3-((2-(4-(4-acetilpiperazin-1-il)fenilamino)-5-carbamoilpirimidin-4-ilamino)metil)piperidin-1-carboxilato de bencilo 45 (0,270 g).

- 40 Una mezcla de 3-((2-(4-(4-acetilpiperazin-1-il)fenilamino)-5-carbamoilpirimidin-4-ilamino)metil)piperidin-1-carboxilato de bencilo (90 mg, 0,15 mmol) y Pd-C (10 %, 30 mg) en MeOH (10 ml, que contenía 4 gotas de HCl 6 N) se hidrogenó en un globo de H<sub>2</sub> durante 4 h. La mezcla se filtró a través de celite. El filtrado se concentró al vacío para dar el compuesto del título 46 (56 mg). MS 453,45 (M+H).

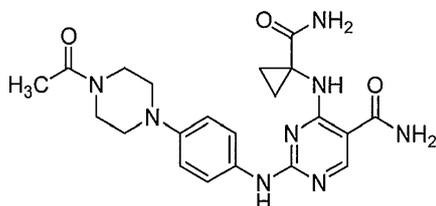
Ejemplo de referencia 51. (S)-2-(4-(4-acetilpiperazin-1-il)fenilamino)-4-(1-hidroxiopropan-2-ilamino)pirimidin-5-carboxamida

45



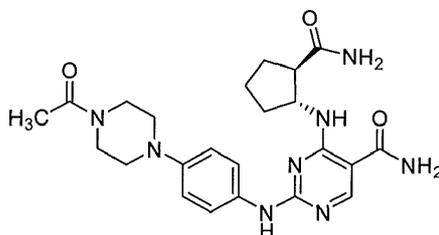
El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1 con ciclopropilamina en lugar de ciclobutilamina. MS encontrado para  $C_{21}H_{27}N_7O_2$  como  $(M+H)^+$  410,4.

5 Ejemplo 61. 2-(4-(4-acetilpiperazin-1-il)fenilamino)-4-(1-carbamoilciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida



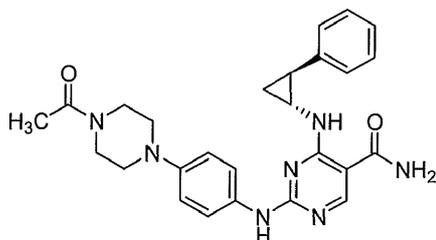
10 El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1. MS encontrado para  $C_{21}H_{26}N_8O_3$  como  $(M+H)^+$  439,3.

Ejemplo 63. 2-(4-(4-acetilpiperazin-1-il)fenilamino)-4-((1R,2R)-2-carbamoilciclopentilamino)pirimidin-5-carboxamida



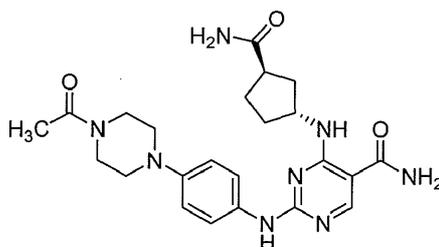
15 El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 51 usando una amina preparada usando el procedimiento de An Efficient Route to Either Enantiomer of *trans*-2-Aminocyclopentanecarboxylic Acid. LePlae, P. R.; Umezawa, N.; Lee, H.-S.; Gellman, S. H. J. Org. Chem.; (Note); 2001; 66(16); 5629-5632. MS encontrado para  $C_{23}H_{30}N_8O_3$  como  $(M+H)^+$  467,4. UV:  $\lambda = 202,258$ .

20 Ejemplo 64. 2-(4-(4-acetilpiperazin-1-il)fenilamino)-4-(-2-*trans*-fenilciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida



25 El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 51. MS encontrado para  $C_{26}H_{29}N_7O_2$  como  $(M+H)^+$  472,3.

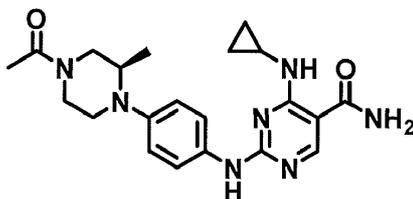
Ejemplo 70. 2-(4-(4-acetilpiperazin-1-il)fenilamino)-4-((1R,3R)-3-carbamoilciclopentilamino)pirimidin-5-carboxamida



30 El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 51 usando un ácido (1R, 3R)-3-aminociclopentanocarboxílico Boc protegido derivado de amina. MS encontrado para  $C_{23}H_{30}N_8O_3$  como  $(M+H)^+$  467,4.

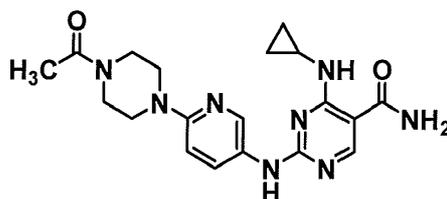
35

Ejemplo 74. (R)-2-(4-(4-acetil-2-metilpiperazin-1-il)fenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida



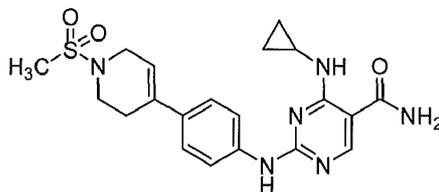
5 El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Esquema 1 usando ciclopropilamina en lugar de ciclobutilamina. MS encontrado para  $C_{21}H_{27}N_7O_2$  como  $(M+H)^+$  410,4. UV:  $\lambda = 209,265$ .

Ejemplo 93. 2-(6-(4-acetilpiperazin-1-il)piridin-3-ilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida



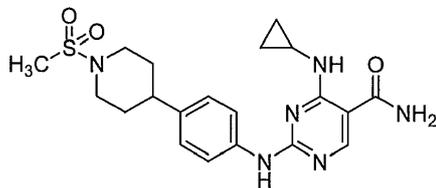
10 El compuesto anterior se preparó usando un intermedio sintetizado como se ha descrito en el Esquema 1 con ciclopropilamina en lugar de ciclobutilamina, y 1-(4-(5-aminopiridin-2-il)piperazin-1-il)etanona (preparada a partir de 1-acetilpiperazina y 2-cloro-5-nitropiridina en dos etapas). MS encontrado para  $C_{19}H_{24}N_8O_2$  como  $(M+H)^+$  397,0.  $^1H$  RMN ( $CD_3OD$ , 400 MHz):  $\delta$  8,62 (s, 1H), 8,41 (s, 1H), 8,08 (s ancho, 1H), 7,17 (d, 1H), 3,64 - 3,78 (m, 8H), 2,98 (n, 1H), 2,15 (s, 3H), 0,96 (m, 2H), 0,70 (m, 2H).

20 Ejemplo 96. 4-(ciclopropilamino)-2-(4-(1-(metilsulfonil)-1,2,3,6-tetrahidropiridin-4-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida



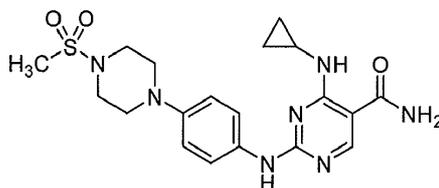
25 El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Esquema 1 usando ciclopropilamina en lugar de ciclobutilamina. MS encontrado para  $C_{20}H_{24}N_6O_3S$  como  $(M+H)^+$  429,3.

Ejemplo 97. 4-(ciclopropilamino)-2-(4-(1-(metilsulfonil)piperidin-4-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida



30 El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Esquema 1 usando ciclopropilamina en lugar de ciclobutilamina. MS encontrado para  $C_{20}H_{26}N_6O_3$  como  $(M+H)^+$  431,3.

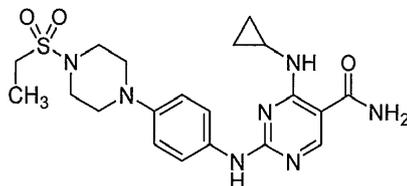
Ejemplo 99. 4-(ciclopropilamino)-2-(4-(4-(metilsulfonil)piperazin-1-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida



35

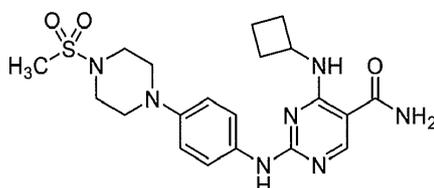
El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Esquema 1, usando ciclopropilamina en lugar de ciclobutilamina. MS encontrado para  $C_{19}H_{25}N_7O_3S$  como  $(M+H)^+$  432,0.

Ejemplo 100a. 4-(ciclopropilamino)-2-(4-(4-(etilsulfonil)piperazin-1-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida



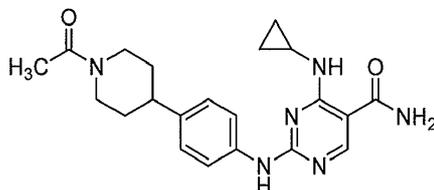
El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Esquema 1, usando ciclopropilamina en lugar de ciclobutilamina. MS encontrado para  $C_{20}H_{27}N_7O_3S$  como  $(M+H)^+$  446,2.  $^1H$  RMN ( $CD_3OD$ , 400 MHz):  $\delta$  8,37 (s, 1H), 7,59 (s ancho, 2H), 7,09 (d, 2H), 3,45 (m, 4H), 3,50 (m, 4H), 3,12 (c, 2H), 3,07 (m, 1H), 1,35 (t, 3H), 0,93 (m, 2H), 0,73 (m, 2H). UV:  $\lambda = 275$ .

Ejemplo 100b. 4-(ciclobutilamino)-2-(4-(4-(metilsulfonil)piperazin-1-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida



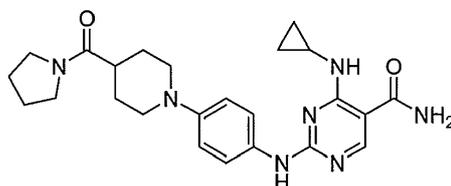
El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1. MS encontrado para  $C_{20}H_{27}N_7O_3S$  como  $(M+H)^+$  446,0.

Ejemplo 113. 2-(4-(1-acetilpiperidin-4-il)fenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida



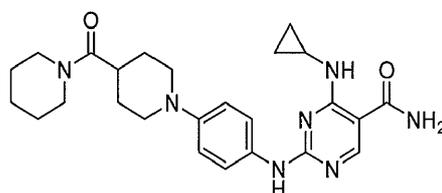
El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Esquema 1 usando ciclopropilamina en lugar de ciclobutilamina. MS encontrado para  $C_{21}H_{26}N_6O_2$  como  $(M+H)^+$  395,3.

Ejemplo 114. (ciclopropilamino)-2-(4-(4-(pirrolidin-1-carbonil)piperidin-1-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida



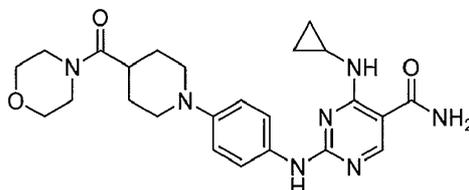
El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Esquema 1 usando ciclopropilamina en lugar de ciclobutilamina y una anilina obtenida a partir de 4-fluoronitrobenzenu e isonipecotato de etilo. MS encontrado para  $C_{24}H_{30}N_7O_2$  como  $(M+H)^+$  450,3. UV:  $\lambda = 271$ .

Ejemplo 115. 4-(ciclopropilamino)-2-(4-(4-(piperidin-1-carbonil)piperidin-1-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida



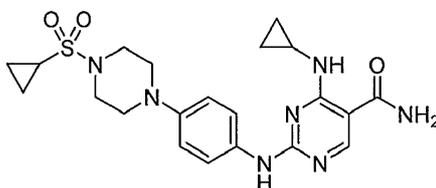
El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Esquema 1 usando ciclopropilamina en lugar de ciclobutilamina y una anilina obtenida a partir de 4-fluoronitrobenzenu e isonipecotato de etilo. MS encontrado para  $C_{25}H_{33}N_7O_2$  como  $(M+H)^+464,3$ . UV:  $\lambda = 201, 271$ .

5 Ejemplo 116. 4-(ciclopropilamino)-2-(4-(4-(morfolin-4-carbonil)piperidin-1-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida



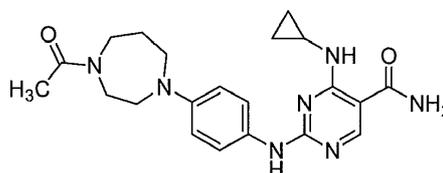
10 El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Esquema 1 usando ciclopropilamina en lugar de ciclobutilamina y una anilina obtenida a partir de 4-fluoronitrobenzenu e isonipecotato de etilo. MS encontrado para  $C_{24}H_{31}N_7O_3$  como  $(M+H)^+466,3$ . UV:  $\lambda = 201, 230, 285$ .

Ejemplo 117. 4-(ciclopropilamino)-2-(4-(4-(ciclopropilsulfonil)piperazin-1-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida



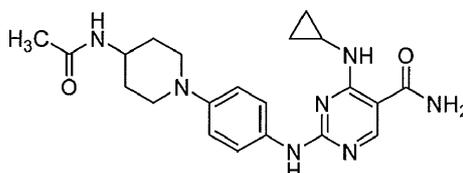
15 El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Esquema 1. MS encontrado para  $C_{21}H_{27}N_7O_3S$  como  $(M+H)^+458,2$ . UV:  $\lambda = 201, 231, 282$ .

20 Ejemplo 118. 2-(4-(4-acetil-1,4-diazepan-1-il)fenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida



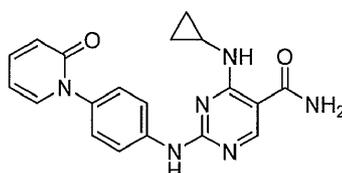
25 El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Esquema 1. MS encontrado para  $C_{21}H_{27}N_7O_2$  como  $(M+H)^+410,2$ . UV:  $\lambda = 234, 258$ .

Ejemplo 119. 2-(4-(4-acetamidopiperidin-1-il)fenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida



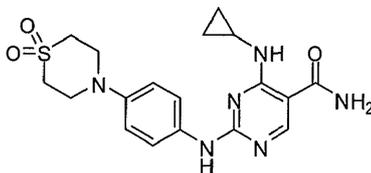
30 El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Esquema 1 usando una anilina obtenida a partir de 4-Boc aminopiperidina y 4-fluoronitrobenzenu que se convirtió en el acetilo después de desprotección Boc, después el grupo nitro se redujo para dar la anilina usando hidrogenación. MS encontrado para  $C_{21}H_{27}N_7O_2$  como  $(M+H)^+410,2$ .

35 Ejemplo 120. 4-(ciclopropilamino)-2-(4-(2-oxopiridin-1(2H)-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida



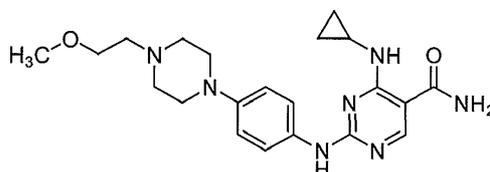
El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Esquema 1 usando una anilina obtenida a partir de 4-yodoanilina y 2-hidroxipiridina que se acoplaron usando CuI y un ligando adecuado. MS encontrado para  $C_{21}H_{27}N_7O_2$  como  $(M+H)^+$  363,2. UV:  $\lambda = 201, 274$ .

5 Ejemplo 121. 4-(ciclopropilamino)-2-(4-(4-dioxotiomorfolinofenilamino)pirimidin-5-carboxamida



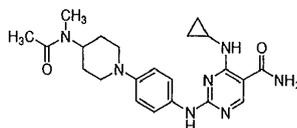
10 El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Esquema 1. MS encontrado para  $C_{18}H_{22}N_6O_2S$  como  $(M+H)^+$  403,2.

Ejemplo 122. 4-(ciclopropilamino)-2-(4-(4-(2-metoxietil)piperazin-1-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida



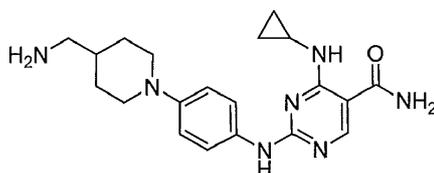
15 El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Esquema 1 usando ciclopropilamina en lugar de ciclobutilamina y una anilina obtenida a partir de 4-fluoronitrobenzenu y 1-metoxietilpiperazina en dos etapas. MS encontrado para  $C_{21}H_{29}N_7O_2$  como  $(M+H)^+$  412,0.

20 Ejemplo 124. 4-(ciclopropilamino)-2-(4-(4-(N-metilacetamido)piperidin-1-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida



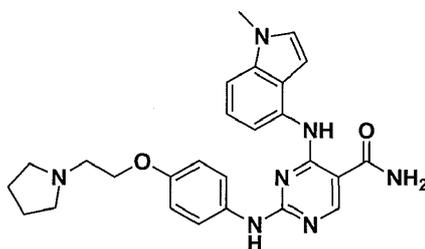
25 El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Esquema 1 usando ciclopropilamina en lugar de ciclobutilamina y una anilina descrita previamente con la metilación del grupo N-acetilo ( $CH_3I$ ,  $CS_2CO_3$ , DMF) realizándose antes de la etapa de reducción nitro. MS encontrado para  $C_{22}H_{29}N_7O_2$  como  $(M+H)^+$  424,2

30 Ejemplo 135. 2-(4-(4-(aminometil)piperidin-1-il)fenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida

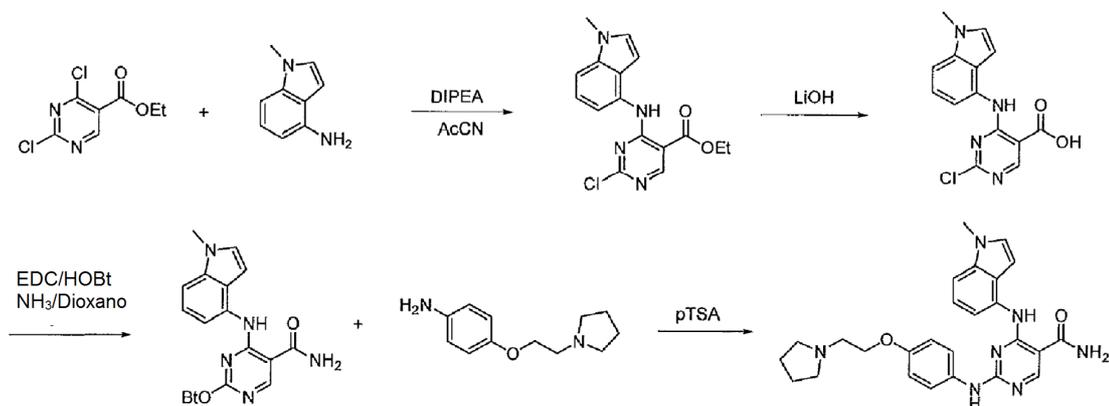


35 El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Esquema 1 con ciclopropilamina en lugar de ciclobutilamina. MS encontrado para  $C_{20}H_{27}N_7O$  como  $(M+H)^+$  382,5.

Ejemplo de referencia 151. 4-(1-metil-1H-indol-4-ilamino)-2-(4-(2-(pirrolidin-1-il)etoxi)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida



Esquema 9:



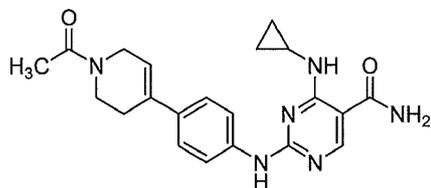
5 Etapa 1: A una solución de 2,4-dicloropirimidin-5-carboxilato de etilo (328 mg, 1,48 mmol) y 1-metil-1H-indol-4-amina (260 mg, 1,78 mmol) en CH<sub>3</sub>CN (6 ml) a temperatura ambiente, se le añadió DIEA (0,4 ml, 2,22 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Se añadió agua (15 ml) para inducir la precipitación. El precipitado se recogió y se secó al vacío para dar 2-cloro-4-(1-metil-1H-indol-4-ilamino) pirimidin-5-carboxilato de etilo en forma de un sólido.

10 Etapa 2: A una solución de 2-cloro-4-(1-metil-1H-indol-4-ilamino) pirimidin-5-carboxilato de etilo (en bruto de la etapa 1) en THF (4 ml), se le añadió LiOH ac. 1 N (2,25 ml, 2,25 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Tras la acidificación de la mezcla con HCl 1 N, se retiraron por precipitación sólidos de color blanco, que se recogieron, y se secaron al vacío para dar ácido 2-cloro-4-(1-metil-1H-indol-4-ilamino)pirimidin-5-carboxílico (325 mg). MS 303,3, 305,3 (M+H, patrón Cl)

15 Etapa 3: A una solución de ácido 2-cloro-4-(1-metil-1H-indol-4-ilamino)pirimidin-5-carboxílico (325 mg, 1,08 mmol) y HOBt (198 mg, 1,29 mmol) en DMF (4 ml) se le añadió EDC (248 mg, 1,29 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. Se añadió amoníaco (0,5 M en dioxano, 8,00 ml, 4,00 mmol). Se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Se añadieron agua y EtOAc. La fase orgánica se separó, se lavó con HCl 1 N, después con NaHCO<sub>3</sub> al 5 %, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró al vacío para dar 2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-iloxi)-4-(1-metil-1H-indol-4-ilamino)pirimidin-5-carboxamida (378 mg). MS 401,4 (M+H)

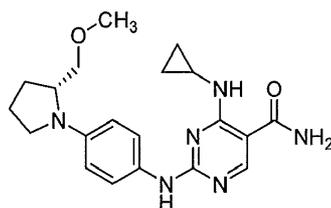
25 Etapa 4: A una solución de 2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-iloxi)-4-(1-metil-1H-indol-4-ilamino)pirimidin-5-carboxamida (62 mg, 0,15 mmol) en NMP (1 ml) se le añadieron 4-(2-(pirrolidin-1-il)etoxi)anilina (31 mg, 0,15 mmol) y ácido p-toluenosulfónico hidrato (28 mg, 0,15 mmol). Se calentó a 100 °C durante 4 h, y se purificó por HPLC preparativa para dar 4-(1-metil-1H-indol-4-ilamino)-2-(4-(2-(pirrolidin-1-il)etoxi)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida (32 mg). MS encontrado para C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub> como (M+H)<sup>+</sup> 472,4. UV: λ = 216,9, 257,0.

30 Ejemplo 189. 2-(4-(1-acetil-1,2,3,6-tetrahidropiridin-4-il)fenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida



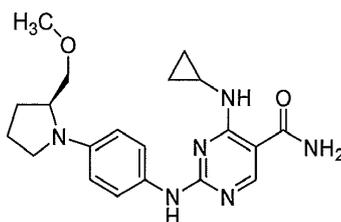
35 El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Esquema 1 con ciclopropilamina en lugar de ciclobutilamina. MS encontrado para C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> como (M+H)<sup>+</sup> 393,3.

Ejemplo 190. (R)-4-(ciclopropilamino)-2-(4-(2-(metoximetil)pirrolidin-1-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida



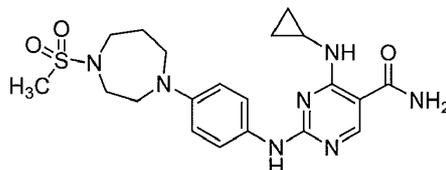
5 El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Esquema 1 con ciclopropilamina en lugar de ciclobutilamina y usando una anilina preparada en dos etapas a partir de 4-fluoronitrobenzoceno y (R)-2-metoximetilpirrolidina. MS encontrado para  $C_{20}H_{26}N_6O_2$  como  $(M+H)^+$  383,3.

Ejemplo 191. (S)-4-(ciclopropilamino)-2-(4-(2-(metoximetil)pirrolidin-1-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida



10 El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 190 usando (S)-2-metoximetilpirrolidina en lugar del isómero (R). MS encontrado para  $C_{20}H_{26}N_6O_2$  como  $(M+H)^+$  383,3.  $^1H$  RMN ( $CD_3OD$ , 400 MHz):  $\delta$  8,21 (s, 1H), 7,38 (s ancho, 2H), 6,78 (d, 2H), 3,89 (m, 1H), 3,49 (m, 2H), 3,33 (s, 3H), 3,18 (m, 2H), 3,03 (m, 1H), 2,03 (m, 4H), 0,93 (m, 2H), 0,72 (m, 2H).

15 Ejemplo 196 4-(ciclopropilamino)-2-(4-(4-(metilsulfonil)-1,4-diazepan-1-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida



20 El compuesto anterior se preparó usando un procedimiento similar al descrito en el Esquema 1 con ciclopropilamina en lugar de ciclobutilamina y una anilina obtenida a partir de homopiperazina Boc protegida y 4-fluoronitrobenzoceno. MS encontrado para  $C_{20}H_{27}N_7O_3S$  como  $(M+H)^+$  446,2.

25 Ejemplo 332

Este ejemplo ilustra los métodos para la evaluación de los compuestos de la invención, junto con los resultados obtenidos para tales ensayos. Las actividades de syk *in vitro* e *in vivo* de los compuestos de la invención se pueden determinar mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica, tales como una prueba para su capacidad de inhibir la actividad de syk en plasma humano. Las potentes afinidades para la inhibición de syk humana mostradas por los compuestos de la invención, se puede medir mediante un valor de  $CI_{50}$  (en nM). El valor de la  $CI_{50}$  es la concentración (en nM) del compuesto necesaria para proporcionar el 50 % de inhibición de la actividad proteolítica de syk humana. Cuanto menor es el valor  $CI_{50}$ , más activo (potente) es un compuesto para inhibir la actividad de syk.

35 Un ensayo *in vitro* para detectar y medir la actividad de inhibición frente a syk es como sigue:

#### Inhibición de la actividad de fosforilación de tirosinas de syk

40 La potencia de las moléculas candidatas para inhibir la actividad de fosforilación de tirosinas de syk se evalúa midiendo la capacidad de un compuesto de prueba para inhibir la fosforilación de tirosinas mediada por syk de un sustrato específico de syk.

45 La actividad de fosforilación de tirosinas de SYK se mide utilizando la Tecnología LANCE™ desarrollada por Perkin Elmer Life and Analytical Sciences (Boston, MA). LANCE™ se refiere a aplicaciones de fluorometría homogénea resuelta en el tiempo utilizando técnicas tales como el ensayo de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia resuelta en el tiempo (TR-FRET) (para los procedimientos véase en general la Nota de Aplicación de Perkin Elmer - How to Optimize a Tyrosine Kinase Assay Using Time Resolved Fluorescence-Based LANCE

Detection, [www.perkinelmer.com/lifesciences](http://www.perkinelmer.com/lifesciences)). El principio del ensayo implica la detección de un sustrato fosforilado utilizando transferencia de energía de un anticuerpo marcado con europio fosfoespecífico a estreptavidina-alofocianina como receptor.

5 Para analizar la capacidad de las moléculas candidatas para inhibir la actividad de fosforilación de tirosinas de SYK, las moléculas se reconstituyen en DMSO al 30 % y se diluyen en serie 1:3 con la dilución final conteniendo DMSO en ausencia de la molécula candidata. La concentración final de DMSO en el ensayo es del 3 %. Los ensayos de quinasa se realizan como una reacción en dos partes. La primera reacción es una reacción de quinasa y que comprende una molécula candidata, enzima SYK recombinante activa de longitud completa (Millipore, CA) y sustrato específico de SYK marcado con biotina, biotina-DEEDYESP-OH. La segunda reacción implica la finalización de la reacción de quinasa y la adición simultánea de los reactivos de detección- reactivo antifosfotirosina marcado con europio (Eu-W1024-PY100, Perkin Elmer, Boston, MA) y reactivo de detección estreptavidina-alofocianina (SA-APC, Prozyme, CA). La reacción de quinasa se realiza en una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo en U negra. El volumen de reacción final es de 50  $\mu$ l y contiene una concentración final de enzima SYK activa 1 nM, sustrato de SYK 550 nM y ATP 100  $\mu$ M diluido en un tampón que contiene Tris 50 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y DTT 1 mM. Se permite que la reacción transcurra durante 1 hora a temperatura ambiente. El tampón de interrupción de la reacción contiene Tris 100 mM pH 7,5, NaCl<sub>2</sub> 300 mM, EDTA 20 mM, Brij35 al 0,02 % y BSA al 0,5 %. Los reactivos de detección se añaden a la mezcla de reacción a las siguientes diluciones. - 1:500 para Eu-W1024-PY100 y 1:250 para SA-APC. La reacción de quinasa se termina mediante la adición de 50  $\mu$ l de tampón de interrupción conteniendo los reactivos de detección. Se permite que la detección transcurra durante 1 h a temperatura ambiente. La detección del sustrato fosforilado en ausencia y presencia de inhibidores se mide en el instrumento de TR-FRET, Analyst HT (Molecular Probes, Sunnyvale, CA) y la condición para las medidas se prepara utilizando CriterionHost Release 2.0 (Molecular Probes, Sunnyvale, CA). Los ajustes utilizados son como sigue: excitación 360 nm, emisión 665 - 7.5 nm, divisor de rayos 350 nm 50/50, destello 100 pulsos, retraso 60 us, integración 400 us, altura 2 mm. La inhibición de la actividad tirosina quinasa de SYK se calcula como la respuesta máxima observada con inhibidor, en comparación con la de sin inhibidor. Las CI<sub>50</sub> se obtienen mediante análisis de regresión no lineal.

Se utilizó fosfo-citometría de flujo intracelular para analizar la inhibición del compuesto sobre la actividad de Syk en las líneas celulares de linfoma no Hodgkin Ramos y SUDHL-6 intactas. Se alicuotaron 10x10<sup>6</sup> células en fase de crecimiento logarítmico; la Syk quinasa se activa incubando las células durante 10 minutos con anticuerpo específico para receptor de linfocitos B 3  $\mu$ g/ml. Inmediatamente después, las células se fijan en paraformaldehído al 1 % durante 5 minutos a temperatura ambiente, se lavan en solución salina tamponada con fosfato y después se permeabilizan mediante la incubación durante 2 horas en metanol enfriado en hielo. Las células se lavan otra vez en solución salina tamponada con fosfato, después se incuban durante 30 minutos con anticuerpo específico para Erk (Y204) y BLNK (Y84) fosforiladas, que son indicadores de la actividad Syk quinasa, y Syk (Y352) fosforilada, como una medida de la actividad quinasa de la familia Src. Todos los anticuerpos utilizados se adquieren de BD Pharmingen (San José, CA). Después de la incubación con los anticuerpos, las células se lavan otra vez y se someten a citometría de flujo. En la Tabla 1 se muestran los datos representativos detallando la inhibición de la señalización del receptor de linfocitos B mediante los compuestos, como intervalos de CI<sub>50</sub>.

También se evaluaron los efectos antiproliferativos de los compuestos sobre las líneas de linfocitos B de linfoma no Hodgkin SUDHL-4, SUDHL-6 y Toledo. Para el crecimiento y supervivencia SUDHL-4 y SUDHL-6 necesitan la señalización del receptor de linfocitos B, aunque la línea celular Toledo (que sirve aquí como control negativo) no. Las células se alicuotaron en cada pocillo de la placa de 96 pocillos y se incubaron con concentraciones crecientes de compuesto durante 72 horas, tras lo cual se determinó la supervivencia y proliferación celular utilizando el ensayo MTT (Chemicon International, Inc., Temecula, CA) siguiendo los protocolos suministrados por el fabricante. Los datos se detallan en la Tabla 2 como valores de CI<sub>50</sub> más o menos las desviaciones típicas, a partir de 5 o 6 experimentos independientes.

La inducción de apoptosis en las líneas de linfocitos B de linfoma no Hodgkin SUDHL-4, SUDHL-6 y Toledo, se evaluó midiendo el marcador de apoptosis Caspasa 3. Las células se incubaron con el compuesto a 1, 3 o 10  $\mu$ M durante 24, 48 y 72 horas. Al acabar cada punto de tiempo, las células se procesaron para análisis de citometría de flujo utilizando el kit de Anticuerpo Monoclonal Anti Caspasa 3 Activa de Conejo y los protocolos relacionados (BD Pharmingen). En las Tablas 3A y 3B se presentan los datos de dos experimentos independientes, que representan el porcentaje de células totales que experimentan apoptosis después de la incubación con los compuestos en las condiciones indicadas.

La actividad de Syk no sólo es necesaria para la señalización, proliferación y supervivencia de los linfocitos T, como se muestra, sino que también es crítica para la activación celular después del entrecruzamiento del receptor de linfocitos B. La activación de linfocitos B conduce a la expresión en la superficie celular aumentada de varias proteínas implicadas en señalización celular, presentación antigénica y adhesión. Entre estas, para determinar el estado de activación de los linfocitos B se miden comúnmente CD80, CD86 y CD69. Por lo tanto, se alicuotaron linfocitos B de ratón primarios aislados de bazo y se incubaron con concentraciones crecientes del compuesto (0,05 a 2  $\mu$ M) en presencia de IgD anti ratón en cabra (eBiosciences, Inc., San Diego, CA) durante 20 horas para entrecruzar el receptor de linfocitos B. Después, las células se lavaron e incubaron durante 30 minutos en hielo con anticuerpos específicos para los marcadores de activación celular CD80, CD86 y CD69. Los linfocitos B se

## ES 2 597 441 T3

identificaron en la población agrupada tiñendo con el marcador de linfocitos B CD45RO. Todos los anticuerpos se adquirieron en BD Pharmingen. La Tabla 4 representa el intervalo de  $CI_{50}$  en que los compuestos inhibieron la activación inducida del receptor de linfocitos B, de linfocitos B primarios de ratón.

- 5 En la Tabla a continuación, se proporciona la actividad en los ensayos de Syk y/o Jak como sigue: +++++ =  $CI_{50} < 0,0010 \mu\text{M}$ ; ++++ =  $0,0010 \mu\text{M} < CI_{50} < 0,010 \mu\text{M}$ , +++ =  $0,010 \mu\text{M} < CI_{50} < 0,10 \mu\text{M}$ , ++ =  $0,10 \mu\text{M} < CI_{50} < 1 \mu\text{M}$ , + =  $CI_{50} > 1 \mu\text{M}$ .

Tabla 7:

Ejemplo	UV	PM	MH+	CI50 de Syk
1		409,49	410,0 410,2	+++
3		395,47	396,0 396,3 396,4	+++
			ES (+) MS M+H=396	
4		423,52	424	++
34		429,91	430,0, 432,0	+++
35		443,94	444,0, 446,0	+++
36	256, 249,5	409,49	410,3 420,2 420,4 ES(+) MS [M+1]=410 MS Turbo Spray [M+1]=410	+++
37		421,51	422,4	+++
39		409,45	410,2	++
40		413,46	414,2	+++
41		452,56	453,45	++++
55		438,49	439,4	+++
56		409,49	410,4	+++
63		466,55	467,4	++
64		471,57	472,3	++
70		466,55	467,4	+++
93		396,46	397	++
96		428,52	429,3 (M+1)	+++
97		430,53	431,3 (M+1)	+++
99		431,52	432,0 432,2 ES (+) MS [M+1]=432 ES(+) MS [M+H]=432 MS Turbo Spray [M+1]=432 MS Turbo Spray [M+1]=432	+++
100		445,55	426(M+H) 446 446,2 446,2(M+H) 446,4 ES(+) MS [M+1]=446 MS Turbo Spray [M+1]=446	+++
113		394,48	395,3 (M+1)	+++
114		449,56	450,3	++
115		463,59	464,3	++
116		465,56	466,3	++
117		457,56	458,2	+++
118		409,49	410,2	+++
119		409,49	410,2	++
120		362,39	363,2	++
121		402,48	403,2	+++
122		411,51	M+1=412	++

Ejemplo	UV	PM	MH+	CI50 de Syk
124		423,52	424,2	+++
135		381,48	382,5 (M+1)	+++
189		392,46	393,3 (M+1)	+++
191		382,47	383,3	++
196		445,55	446,2	+++

#### Inhibición de la función de plaquetas mediada por GPVI *In Vitro*

- 5 La capacidad de las moléculas candidatas para inhibir las funciones de las plaquetas mediadas por syk, se analizó midiendo la inhibición de la movilización de calcio o la agregación de plaquetas humanas inducida por el agonista Calvuxina específico de GPV. La movilización de calcio se evalúa en plaquetas humanas lavadas en un formato de microtitulación de 96 pocillos. La agregación se evalúa en un ensayo de microtitulación de 96 pocillos (véanse, en general, los procedimientos en Jantzen, H. M. *et al.* (1999) *Thromb. Hemost.* 81: 111-117) o en agregometría de transmitancia luminosa de cubeta convencional, utilizando plasma rico en plaquetas humano (PRP).

#### Inhibición de la movilización de calcio en plaquetas mediada por Convulxina *In Vitro*

- 15 La inhibición de la movilización de calcio inducida por Convulxina se determinó en plaquetas humanas lavadas, utilizando el kit de ensayo FLIRP Calcium 3 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Para la preparación de plaquetas lavadas, se recogió sangre venosa humana de voluntarios libres de fármaco sanos en ACD (citrato de sodio 85 mM, glucosa 111 mM, ácido cítrico 71,4 mM) que contenía PGI<sub>2</sub> (1,25 ml de ACD conteniendo PGI<sub>2</sub> 0,2 µM final; PGI<sub>2</sub> procedía de Sigma, St. Louis, MO). El plasma rico en plaquetas (PRP) se prepara mediante centrifugación a 160 X g durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las plaquetas lavadas se prepararon centrifugando PRP durante 10 minutos a 730 g y resuspendiendo el sedimento de plaquetas en CGS (citrate de sodio 13 mM, glucosa 30 mM, NaCl 120 mM; 2 ml de CGS/10 ml de volumen de sangre original). Tras la incubación a 37 °C durante 15 minutos, las plaquetas se recogen mediante centrifugación a 730 g durante 10 minutos y se resuspenden a una concentración de 3 X 10<sup>8</sup> plaquetas/ml en tampón de Hepes-Tyrode (Hepes 10 mM, NaCl 138 mM, glucosa 5,5 mM, KCl 2,9 mM, NaHCO<sub>3</sub> 12 mM, pH 7,4). Esta suspensión de plaquetas se mantiene >45 minutos a temperatura ambiente antes de su uso en los ensayos de movilización de calcio.

- 25 Para los experimentos de movilización de calcio en placas de 96 pocillos, se incubaron volúmenes equivalentes de 3 X 10<sup>8</sup> plaquetas lavadas/ml con volúmenes equivalentes del Reactivo de Ensayo Calcio-3 A resuspendido en Solución Salina Balanceada de Hank 1 X, pH 7,4, tampón Hepes 20 mM. El volumen total de reacción de 0,2 ml/pocillo incluye la mezcla de plaquetas lavadas 1,5 x 10<sup>8</sup>/ml/reactivo de Ensayo Calcio-3 A, Eptifibatida 10 µM (Millennium Pharmaceuticals Inc, Cambridge, MA), diluciones en serie (1:3) de los compuestos de prueba en DMSO al 0,75 %. Se añade sólo DMSO a 1 pocillo de cada conjunto de 8 para permitir una lectura de movilización de calcio máxima. Tras 20 minutos de preincubación a temperatura ambiente se carga el lector de microplacas de 96 pocillos en la FlexStation (Molecular Devices, Sunnyvale, Calif). Las condiciones experimentales de FlexStation para medir la movilización de calcio se ajustan utilizando SOFTMax Pro. Los parámetros utilizados se detallan a continuación. Modo de los parámetros del ensayo de fluorescencia: *flex*, excitación 485 nM, 525 nM con un límite de 515 nM; parámetros- sensibilidad de TFS- 6, alto de pipeta 230 µl, tiempo de lectura 2 minutos y 40 segundos, intervalos de lectura 2 segundos, temperatura-23-25 °C. Tras 18 segundos de lectura basal, la movilización de calcio se inicia mediante la adición de Convulxina a una concentración final de 125 ng/ml. La inhibición de la movilización de calcio se calculó como la respuesta máxima observada con inhibidor, en comparación con la de sin inhibidor. Las CI<sub>50</sub> se obtuvieron mediante análisis de la regresión no lineal.

#### Inhibición de la agregación de plaquetas mediada por Convulxina *In Vitro*

- 45 Para la preparación de plasma rico en plaquetas humano para los ensayos de agregación, se recogió sangre venosa humana de voluntarios libres de fármaco sanos, en citrato de sodio al 0,38 % (0,013 M, pH 7,0 final). Se prepara plasma rico en plaquetas (PRP) mediante centrifugación de sangre entera a 160 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente. La capa de PRP se retira, se transfiere a un tubo nuevo y se ajusta el recuento de plaquetas, si es ventajoso, para conseguir una concentración de plaquetas de ~3 x 10<sup>8</sup> plaquetas/ml utilizando plasma pobre en plaquetas (PPP). El PPP se prepara mediante centrifugación de la muestra de sangre restante (después de retirar el PRP) durante 20 minutos a 800 x g. Después, puede utilizarse la preparación de PRP para los ensayos de agregación en placas de 96 pocillos o en agregometría de cubeta convencional.

- 55 La inhibición de la agregación inducida por Convulxina se determina en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos, utilizando un agitador de placas de microtitulación y un lector de placas, similar al procedimiento descrito en Frantantoni *et al.*, *Am. J. Clin. Pathol.* 94, 613 (1990). Todas las etapas se realizan a temperatura ambiente. Para la agregación en placas de 96 pocillos utilizando plasma rico en plaquetas (PRP), el volumen de reacción total de 0,2 ml/pocillo incluye 190 µl de PRP (~3 x 10<sup>8</sup> plaquetas/ml, véase anteriormente), y 5 µl de dilución en serie de los compuestos de prueba en DMSO al 30 % o tampón (para los pocillos de control). Después de 20 minutos de

preincubación a temperatura ambiente, se añaden a cada pocillo 5 µl de agonista Convulxina 320 ng/ml para dar una concentración final de Convulxina 8 ng/ml. Después, las placas se agitan durante 5 min en un agitador de placas de microtitulación y se obtiene la lectura de 5 minutos en el lector de placas de microtitulación (Softmax, Molecular Devices, Menlo Park, Calif.). La agregación se calcula a partir de la reducción de la DO a 650 nm a t=5 minutos. Las  $Cl_{50}$  se obtienen mediante análisis de regresión no lineal.

La inhibición de la agregación inducida por Convulxina también se determinó para los ensayos de agregación de transmitancia luminosa en cubeta, se prepararon diluciones en serie (1:2) del compuesto de prueba en DMSO al 30 % en una placa de fondo en V de 96 pocillos (la concentración de DMSO final en la cubeta fue del 0,3 %). El compuesto de prueba (5 µl de diluciones en serie en DMSO) se preincubó con PRP durante 20 minutos, antes del inicio de las reacciones de agregación, que se realizan en un agregómetro ChronoLog mediante la adición de agonista (Convulxina 125-250 ng/ml) a 495 µl de PRP, a 37 °C. La reacción de agregación se registra durante 4 m, y el grado máximo de agregación se determina por la diferencia del grado de agregación basal en comparación con la agregación máxima que se produce durante el periodo de 4 minutos del ensayo. La inhibición de la agregación se calculó como la agregación máxima observada con inhibidor, en comparación con la de sin inhibidor. Las  $Cl_{50}$  se obtuvieron mediante análisis de regresión no lineal.

En las Tablas 1-5 se proporcionan los ejemplos de compuestos y sus valores de  $Cl_{50}$  de syk y PRP.

#### 20 Ensayo de flujo de calcio en células Ramos inducido por entrecruzamiento del BCR

3 o 4 días antes de los experimentos se subcultivan células Ramos (2G6.4C10, linfoma de Burkitt, Número de Artículo de la ATCC: CRL-1923) a  $5 \times 10^5$  células/ml en medio recién preparado. Las células se recogen y resuspenden en medio fresco a  $8 \times 10^6$  células/ml antes de la carga de colorante. Se añade un volumen equivalente de colorante de carga de Calcio 3 (Molecular Device) y se mezcla en la suspensión celular. Las células de carga se dispensan en una placa de 96 pocillos y se incuban 30 m. Después, se añaden los compuestos en las células cargadas con colorante y se incuban durante otros 30 m. Se centrifuga a 1000 rpm durante 3 min antes de la medida de fluorescencia en FlexStation. La estimulación del BCR se efectúa mediante la adición de anticuerpo 5 µg/ml (fragmento  $F(ab)_2$  anti IgM humana de burro AffiniPure, Jackson ImmunoResearch Laboratories).

#### 30 Ensayo de flujo de calcio en células Jurkat inducido por el entrecruzamiento del TCR

El protocolo es muy similar al de flujo de calcio de linfocitos B como se describe en la sección anterior. Las únicas diferencias son que los linfocitos T (clon E6-1, leucemia de linfocitos T aguda, Número de Artículo de la ATCC: Tib-152) y el anti CD3 humano (anti CD3 humano purificado para calidad funcional, clon OKT3, eBioscience, n.º 16-0037) reemplazan a los linfocitos B y al anti IgM humana. La densidad celular se mantiene igual pero el anticuerpo se utiliza a una concentración de 100 ng/ml.

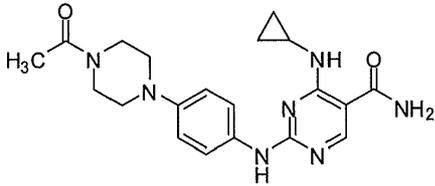
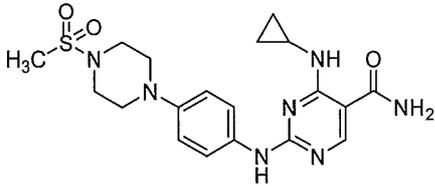
#### Secreción de IL-2 en células Jurkat inducida por el entrecruzamiento del TCR

Los procedimientos de propagación de células Jurkat y de incubación del compuesto son los mismos que los descritos en el ensayo de flujo de calcio de Jurkat en la sección anterior. El anticuerpo (anti CD3, OKT3) se recubre en una placa nueva (sin células) a 100 ng/pocillo. Las células se suspenden a  $8 \times 10^6$  células/ml y se incuban con los compuestos durante 30 min en una placa separada. Al final de la incubación, las células se transfieren a la placa recubierta con anticuerpo y se incuban durante 16 horas. Para la medición de IL-2 después de la incubación, se utilizan 100 µl de medio de células después de la incubación. El nivel de IL-2 se determina utilizando un kit de ELISA de IL-2 (kit de ELISA de IL-2 humana II, BD Bioscience, n.º. 550611).

#### Ejemplo 333 Exploración de Upstate KinaseProfiler™ de Millipore

Este ensayo es una medición directa del efecto del compuesto sobre la actividad catalítica de JAK3. Se obtuvo de células de insecto la secuencia (resto 781 - extremo C) de la JAK3 humana purificada (GenBank AF513860). La hidrólisis catalítica del ATP se mide utilizando un método de unión de filtro radiométrico. La incubación de la quinasa con  $^{33}P$ ATP y sustrato conduce a la incorporación de  $^{33}P$  en el sustrato, que después puede separarse de los otros componentes de la reacción mediante filtración. Los ensayos se realizaron utilizando ATP 10 µM y ausencia o presencia de compuesto 1, 0,3 o 0,1 µM. La actividad se expresó como % de inhibición del control.

Tabla 8: inhibición (%) de la actividad catalítica de JAK3 por el compuesto a 1, 0,3 o 0,1  $\mu\text{M}$ , como se determinó por Millipore utilizando su ensayo KinaseProfiler.

Compuesto	Concentración ( $\mu\text{M}$ )		
	1 $\mu\text{M}$	0,3 $\mu\text{M}$	0,1 $\mu\text{M}$
	98	96	97
	100	84	ND
ND: no determinado			

#### Ejemplo 334 Exploración Ambit KinomeScan

5 Este ensayo es un ensayo de unión de competición, dependiente de sitio de ATP, en el que las quinasas humanas de interés se fusionan a una etiqueta patentada (bacteriófago T7). La cantidad de quinasa unida a un ligando dirigido a sitio activo inmovilizado se mide en presencia y ausencia del compuesto de prueba. Los ensayos de JAK de Ambit utilizan dominios de quinasa y no las proteínas de longitud completa. El dominio utilizado para la unión de JAK1 es el pseudodominio quinasa mientras que el de la unión a JAK3 es el dominio catalítico (Mazen W Karaman, Sanna Herrgard, Daniel K Treiber, *et al.* A Quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. Nature Biotechnology, 2008, Volumen 26, n.º 1, Página 127-132).

10

Tabla 9a: Valores de KD (nM) para la inhibición por la unión del compuesto de JAK1 y JAK3 a ligando inmovilizado en el ensayo KinomeScan de Ambit.

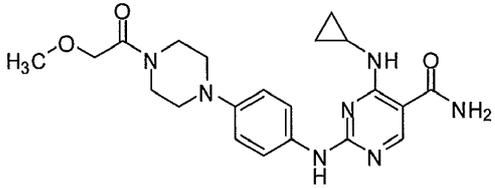
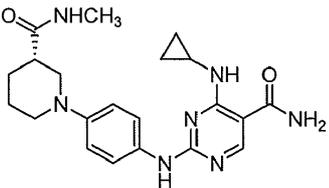
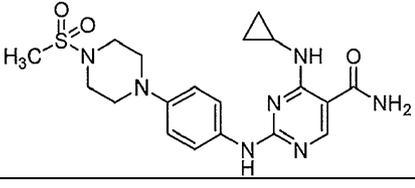
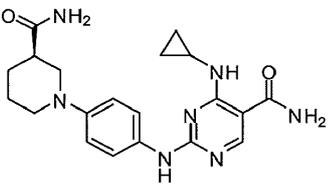
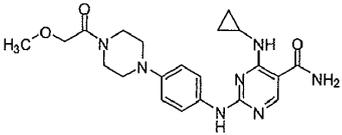
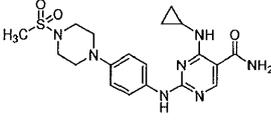
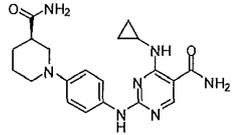
Compuesto	JAK1	JAK3
	6,7	2,9
Referencia		
	11	3
Referencia		
	4,7	2,7
Referencia		
	14	4,1
Referencia		

Tabla 9b Potencia y especificidad de la inhibición de las quinasas (CI50 en nM)

Compuesto	Syk	Jak 1	Jak 2	Jak 3
EJEMPLO 99	15	6,7	3,2	0,8
P420-89	31	6,2	2,0	0,6

Tabla 10: Inhibición de las cinasas en Kd (nM) (Ambit Panel)

			
	Referencia		Referencia
JAK1 (Dom. Quin. 1)	<b>6,7</b>	<b>4,7</b>	<b>14</b>
JAK2 (Dom. Quin. 2)	<b>5,1</b>	<b>5,1</b>	<b>10</b>
JAK3 (Dom. Quin. 2)	<b>2,9</b>	<b>2,7</b>	<b>4,1</b>
Syk	<b>98</b>	<b>4,5</b>	<b>9,4</b>

## Ejemplo 335 ensayo celular de JAK3/STAT6

La estimulación de linfocitos B Ramos por interleucina 4 (IL4) conduce a la señalización a través de JAK1/JAK3, lo que da como resultado la fosforilación de STAT6 (transductores de señal y activadores de la transcripción). El efecto de los compuestos sobre la inhibición de JAK3 y/o JAK1 se puede evaluar midiendo la cantidad de STAT6 fosforilada. Esto se realiza mediante transferencia de Western utilizando un anticuerpo específico fosfo-STAT6.

Los linfocitos B Ramos se suspenden en medio RPMI tamponado con Hepes 10 mM ( $2 \times 10^7$  células/ml). Las células (90  $\mu$ l) se incubaron con 10  $\mu$ l de interleucina 4 (R & D Systems Inc, n.º de cat. 204-IL; concentración final: 0,33  $\mu$ g/ml) 3,3  $\mu$ g/ml. Las incubaciones fueron durante 10 min a 37 °C en ausencia o presencia de 2  $\mu$ l de compuesto diluido en DMSO al 30 %. Las reacciones se finalizaron mediante la adición de un volumen equivalente de tampón de lisis 2x (TRIS-HCl 100 mM pH 8,0, Triton-X-100 al 2 %, EDTA 5 mM, NaCl 250 mM, glicerol al 20 %, PMSF 1,25 mM, ortovanadato de sodio 5 mM,  $\beta$ -glicerofosfato 5 mM, cóctel inhibidor de proteasas de EDTA mini completo (Sigma)).

Las muestras se incubaron con 1  $\mu$ l de la nucleasa benzonasa (Novagen, n.º de cat. 71205-3) durante 1 hora, a temperatura ambiente y después se añadieron 50  $\mu$ l de tampón de carga 5x (TRIS 330 mM pH 6,8, SDS al 9,5 %, glicerol al 34 %, azul de bromofenol al 0,01 %, beta-mercaptoetanol al 10 %).

Los lisados celulares (15  $\mu$ l) se sometieron a SDS-PAGE (geles de TRIS-glicina al 4-12 % Novex, Invitrogen) en condiciones reductoras, seguido de electro-transferencia a membranas de nitrocelulosa. Después, las membranas se incubaron en tampón de bloqueo Zymed (Invitrogen) durante 1 h a temperatura ambiente (TA), después una noche a 4 °C con el anticuerpo primario anti fosfotirosina-STAT6 (Cell Signaling Technology, n.º de cat. 9364) 1:500 en tampón de bloqueo Zymed. A continuación de 5 x 10 min lavados con solución salina tamponada con Tris, NP40 al 0.25 % (TBSN), las transferencias se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en presencia del anticuerpo secundario anti conejo en burro conjugado a HRP (Amersham Biosciences, n.º de cat. NA934V) 1:10.000 en tampón de bloqueo Zymed. Después de 4 x 10 min lavados con TBSN, las transferencias se visualizaron por ECL (Pierce Western Lightening, Perkin Elmer n.º de cat. NEL101). Para determinar el contenido total de  $\beta$ 3, las transferencias se separaron, se lavaron 4 x con TBSN, y se resondearon con anticuerpo C3A 1:2000 en tampón de bloqueo durante una noche a 4 °C. Después de 4 x 10 min lavados con TBSN, las transferencias se incubaron con el anticuerpo secundario anti ratón en cabra 1:10.000 en tampón de bloqueo, se lavaron 4 veces más con TBSN y se expusieron al reactivo Western Lightening. Los niveles de estimulación por encima del fondo y el grado de inhibición del compuesto se determinan por densitometría.

## Ejemplo 336 Ensayo de inhibición de la actividad de la JAK quinasa para la línea de linfocitos B Ramos estimulada con IL-4

Estos ejemplos ilustran los métodos para evaluar las actividades de JAK quinasa humana de los compuestos de la invención *in vitro* e *in vivo*, que se pueden determinar mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica, tales como una prueba de su capacidad para inhibir la actividad de la JAK quinasa de plasma humana. Las potentes afinidades para la inhibición de la JAK quinasa humana presentadas por los compuestos de la invención se pueden medir mediante un valor  $CI_{50}$  (en nM). El valor  $CI_{50}$  es la concentración (en nM) del compuesto necesaria para proporcionar el 50 % de inhibición de la actividad de JAK quinasa humana. Cuanto menor es el valor de  $CI_{50}$ , más activo (potente) es un compuesto para la inhibición de la actividad de la JAK quinasa.

Un ensayo *in vitro* para la detección y medición de la actividad de inhibición frente a la JAK quinasa es como sigue:

La actividad de los compuestos para las JAK quinasas se confirma en ensayos celulares diseñado para analizar la inhibición de JAK. Brevemente, la inhibición de JAK se analiza en linfocitos T Ramos humanos activados con la citocina interleucina-4 (IL-4). Veinte a 24 horas posestimulación, las células se tiñen para la regulación positiva de CD23 y se analizan mediante FACS. La estimulación de los linfocitos B con IL-4 conduce a la activación de la ruta JAK/STAT a través de la fosforilación de la JAK quinasas JAK1 y JAK3, que a su vez fosforilan y activan los factores de transcripción STAT-5 y STAT-6. STAT-5 activado regula de forma positiva el receptor de IgE (CD23) de baja afinidad.

Para el ensayo, se cultivan linfocitos B Ramos humanos (ATCC, n.º de catálogo CRL-1596) en medio RPMI 1640 (Cellgro, n.º de catálogo 10-040-CM) conteniendo suero fetal bovino al 10 % (JRH, n.º de catálogo 12106-500M) de acuerdo con el protocolo de propagación suministrado con las células, y se mantienen a una densidad de aproximadamente  $3,5 \times 10^5$  células/ml. El día antes del ensayo, las células se diluyen hasta  $3,5 \times 10^5$  células/ml para asegurar que están en la fase de crecimiento logarítmico. Las células se centrifugan y resuspenden en medio RPMI 1640 (Cellgro, MediaTech, Inc., Herndon, Va., n.º de cat. 10-040-CM) conteniendo suero fetal bovino (SFB) al 5-10 %, inactivado por calor (JRH Biosciences, Inc, Lenexa, Kans., n.º de cat. 12106-500M) de acuerdo con el protocolo de propagación de la ATCC. Las células se mantienen a una densidad de  $3,5 \times 10^{4-5}$  células/ml. El día antes del experimento, los linfocitos B Ramos se diluyen hasta  $3,5 \times 10^5$  células/ml para asegurar que están en una fase de crecimiento logarítmico y se dispensan alícuotas en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos. Las células se incuban con el compuesto de prueba (disuelto en DMSO) o en DMSO (control) durante 1 h a 37 °C y

después se estimulan con IL-4 (Pepotech, n.º de catálogo 200-04) durante 20-24 horas (la concentración final es 50 unidades/ml).

Las células se centrifugan y resuspenden en RPMI con suero al 5 %. Se utilizan  $5 \times 10^4$  células por punto en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos. Las células se preincuban con compuesto o con control de vehículo de DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., n.º de cat. D2650) durante 1 hora en una incubador a 37 °C. Después, las células se estimulan con IL-4 (Peprotech Inc., Rocky Hill, N.J., n.º de cat. 200-04) a una concentración final de 50 unidades/ml durante 20-24 horas. Después, las células se centrifugan y se tiñen con anti CD23-PE (BD Pharmingen, San Diego, Calif., n.º de cat. 555711) y se analizan mediante FACS. La detección se realiza utilizando un citómetro de flujo BD LSR I System, adquirido en Becton Dickinson Biosciences de San José, Calif.

La proliferación se mide utilizando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo.RTM. (Promega), que determina el número de células viables en cultivo a base de la cuantificación del ATP presente, como un indicador de las células metabólicamente activas. El sustrato se descongela y se deja que llegue a temperatura ambiente. Después de mezclar el reactivo Cell Titer-Glo y el diluyente juntos, se añaden 100 µl a cada pocillo. Las placas se mezclan en un agitador orbital durante dos minutos para inducir la lisis, y se incuban a temperatura ambiente durante diez minutos adicionales para permitir que se equilibre la señal. La detección se realiza utilizando un contador de multimarca Wallac Victor2 1420 adquirido en Perkin Elmer, Shelton, Conn.

En el día dos, las células A549 se preincuban con un compuesto de prueba de 2,4-pirimidindiamina o DMSO (control) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., n.º de catálogo D2650) durante 1 hora. Después, las células se estimulan con IFN $\gamma$  (75 ng/ml) (Peprotech Inc., Rocky Hill, N.J., n.º de cat. 300-02) y se deja incubando durante 24 horas. El intervalo de dosis de compuesto de prueba final es 30 µM a 14 nM en 200 µl de medio F12K conteniendo SFB al 5 %, DMSO al 0,3 %.

En el día tres, el medio celular se retira y las células se lavan con 200 µl de PBS (solución salina tamponada con fosfato). Se trata cada pocillo con tripsina para disociar las células, después se neutraliza mediante la adición de 200 µl de medio F12K completo. Las células se sedimentan y se tiñen con un anticuerpo anti ICAM-1 (CD54) humana en ratón conjugado a APC (BD Pharmingen, San Diego, Calif., n.º de catálogo 559771) durante 20 minutos a 4 °C. Las células se lavan con tampón FACS (PBS + SFB al 2 %) enfriado en hielo y la expresión en superficie de ICAM-1 se analiza mediante citometría de flujo. La detección se realiza utilizando un citómetro de flujo BD LSR I System, adquirido en BD Biosciences de San José, Calif. Los eventos se seleccionan por la dispersión en vivo y se calcula la media geométrica (programa informático CellQuest versión 3.3 de Becton-Dickinson, Franklin Lakes, N.J.). Las medias geométricas se representan frente a la concentración de compuesto para generar una curva de dosis-respuesta.

Ejemplo 337: Inhibición de la transducción de señal mediada por Syk a través del receptor de linfocitos B en líneas celulares de linfoma no Hodgkin

Las células se pretrataron durante 1 hora con o sin compuesto (0,02 a 2 µM) antes de la estimulación de la señalización del receptor de linfocitos B mediante la incubación de células con anticuerpo anti  $\mu$  3 µg/ml durante 10 minutos a 37 °C. El flujo de  $Ca^{2+}$  se midió utilizando el colorante de carga Calcio 3 y la FlexStation (Molecular Device). La señalización del receptor de linfocitos B se ensayó mediante fosfo-citometría de flujo intracelular, siguiendo protocolos suministrados por BD Pharmingen (San José, CA). La activación de Syk se midió mediante la inducción de la fosforilación de tirosinas de BLNK en la posición de aminoácido 84 (pBLNK Y84) y la inducción de la fosforilación de tirosinas de ERK1/2 en la posición de aminoácido 204 (pERK Y204). La activación del miembro de la familia Src Lyn se midió mediante la inducción de la fosforilación de tirosinas de Syk en la posición de aminoácido 352 (pSyk Y352). Los datos se presentan como las  $CI_{50}$  µM. Cada compuesto inhibió de forma eficaz el flujo de  $Ca^{2+}$  inducido por el receptor de linfocitos B y la activación de Syk, pero no al miembro de la familia Src Lyn.

Ejemplo 338: la inhibición de Syk ejerce un efecto antiproliferativo sobre líneas celulares de linfoma no Hodgkin.

Las células se incubaron con concentraciones crecientes de cada compuesto, después se evaluó a las 72 horas la extensión de la proliferación utilizando el ensayo MTT (empresa, ciudad, país) siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante. Los datos se presentan como valores de  $CI_{50}$  µM, que representan la media más/menos la desviación típica de 5 o 6 experimentos independientes. Cada compuesto inhibió la proliferación de las líneas celulares SUDHL-4 y -6, que dependen de Syk para las señales de supervivencia y crecimiento, en el intervalo de µM bajo. Las células Toledo, que no necesitan Syk, fueron notablemente menos sensibles a los efectos antiproliferativos de la inhibición de Syk.

Ejemplo 339: la inhibición de Syk induce apoptosis en líneas celulares de linfoma no Hodgkin.

Los datos representan dos experimentos independientes para evaluar el efecto de la inhibición de Syk y Syk/JAK sobre la supervivencia de líneas de linfocitos B de linfoma no Hodgkin difuso largas. Las líneas celulares SUDHL-4 y SUDHL-6 dependen para la supervivencia de la señalización del receptor de linfocitos B mediada por Syk, mientras que las células Toledo no. Las células se incubaron con compuestos en la concentración y tiempos indicados; la

inducción de la apoptosis se midió mediante citometría de flujo utilizando el kit de detección de Caspasa 3 (Sigma-Aldrich, Saint Luis, MO). Los datos se presentan como el porcentaje de células positivas totales para el marcador de apoptosis Caspasa 3. Como se esperaba, la inhibición de Syk dio como resultado la inducción de la apoptosis en las líneas celulares SUDHL-4 y -6, pero no en la línea celular Toledo.

5

Ejemplo 340: Inhibición de la activación de linfocitos B primarios de ratón por los inhibidores de Syk

Se pretrataron esplenocitos primarios de ratón durante 1 hora con concentraciones crecientes de cada compuesto (0,05-2  $\mu$ M) antes de la adición de control o de suero anti IgD de ratón en cabra. La activación de los linfocitos B inducida por anti IgD se midió 16 horas más tarde mediante citometría de flujo, tiñendo los marcadores de activación CD80/86 y CD69.

10

Ejemplo 341: Modelo de ratón de trombocitopenia inmunomediada

La trombocitopenia inmunomediada está provocada por anticuerpos dirigidos frente a glucoproteínas de superficie de plaquetas, anticuerpos frente a complejos que contienen fármaco sobre la superficie de plaquetas o mediante células recubiertas de anticuerpo o inmunocomplejos que interactúan con la superficie de las plaquetas. Se evalúa la capacidad de los compuestos seleccionados para inhibir la eliminación de plaquetas en un modelo de ratón de trombocitopenia mediada por anticuerpos. En este modelo, una rápida eliminación de plaquetas circulantes (aproximadamente el 50 %) resulta de la administración intravenosa de un anticuerpo anti GPIIb de ratón en rata (clon MWReg30) (BD Biosciences, Pharmingen). Para evaluar la capacidad de inhibición de la eliminación de plaquetas, los compuestos se suspendieron en metilcelulosa al 0,5 % en agua y se administraron a través de sonda oral (100  $\mu$ l/ratón) en un momento antes de la inyección del anticuerpo, cuando el compuesto alcanzaría la máxima concentración en plasma (normalmente 1 - 2 horas a base de experimentos de farmacocinética distintos para cada compuesto individual). A las 4 y 8 horas después de la inyección del anticuerpo, se obtuvieron muestras de sangre terminales de los grupos de ratones tratados con vehículo y con el artículo de prueba (n=5 - 10 ratones/grupo) a través de punción cardiaca. La sangre se anticoaguló utilizando citrato trisódico o EDTA. Se midió en un analizador hematológico el recuento de plaquetas en las muestras de sangre entera (Hemavet, Drew Scientific). La sangre restante se procesó para obtener plasma y se midieron las concentraciones de compuesto mediante espectrometría de masas.

15

20

25

30

La eliminación de plaquetas se determinó midiendo la diferencia en el número de plaquetas entre el grupo de tratamiento sin anticuerpo promedio y los animales a los que se administró el anticuerpo anti GPIIb de ratón en rata. La inhibición de la eliminación de plaquetas se determinó comparando la diferencia entre la eliminación de plaquetas de los animales tratados con vehículo y con el compuesto.

35

Ejemplo 342: Modelo de ratón de artritis inducida por anticuerpos para colágeno

La actividad inhibidora de los compuestos seleccionados se investigó en un modelo de ratón de artritis inducida por anticuerpos para colágeno (AIAC). La artritis inducida por colágeno está mediada por autoanticuerpos contra el colágeno de tipo II y el complemento, por lo tanto la artritis se puede inducir mediante la administración de anticuerpos policlonales o una mezcla de anticuerpos monoclonales contra el colágeno de tipo II. El modelo AIAC (Chondrex, Inc., Redmond, WA) utiliza una mezcla de 4 clones que reconoce epítomos individuales agrupados dentro de un fragmento peptídico de 83 aminoácidos del colágeno de tipo II. Estos epítomos comparten secuencias de aminoácidos comunes del colágeno de tipo II de muchas especies distintas, que incluyen pollo, ratón, rata, bovino, porcino, mono y ser humano. El modelo utiliza un cóctel de anticuerpos monoclonales seguido de lipopolisacárido bacteriano (LPS) para inducir al cabo de 7 días una grave y consistente artritis en ratones. Este modelo se desarrolló a base de la hipótesis de que las toxinas bacterianas absorbidas a través del tracto gastrointestinal desempeñan un papel sinérgico y patológico con los autoanticuerpos contra el colágeno de tipo II, en el desencadenamiento de artritis en pacientes con Artritis Reumatoide.

40

45

50

Para estos experimentos, el cóctel de anticuerpos monoclonales (n.º de Lote OC-708) se inyectó por vía intravenosa a través de la vena de la cola a una dosis de 4 mg/ratón (40 mg/ml) en el día 0, seguido de inyección intraperitoneal de LPS diluida en solución salina normal a una dosis de 25  $\mu$ g/ratón en ratones Balb/C hembra de 8 semanas de edad (Charles River, Inc.). La dosificación de los artículos de prueba se inició justo antes o después de la inyección IV del cóctel de anticuerpos. Los compuestos se suspendieron en metilcelulosa al 0,5 % en agua y se administraron a través de sonda oral (100  $\mu$ l/ratón) de forma diaria durante el estudio de 7-10 días. Las puntuaciones de inflamación clínica se obtuvieron de forma diaria. Las puntuaciones de la inhibición de inflamación clínica se determinaron al final del experimento a base de la diferencia entre los ratones tratados con vehículo y con el artículo de prueba. Las concentraciones en plasma representan la concentración pico a una hora después de la última dosis en el día de finalización del estudio.

55

60

Ejemplo 343: Inhibición de la fosforilación de Stat-6 por JAK1/3 inducida por IL-4 en linfocitos B Ramos

Se pretrataron linfocitos B Ramos durante 1 hora con concentraciones crecientes de compuesto, como se indica, antes de la adición de IL-4. Las células se incubaron con IL-4 durante 10 minutos y después se sometieron a

65

citometría de flujo intracelular para medir el porcentaje de inhibición de Stat-6 inducido por IL-4.

Ejemplo 344: Inhibición de la fosforilación de Stat-6 por JAK1/3 inducida por IL-4 en linfocitos B Ramos

- 5 Se pretrataron linfocitos B Ramos durante 1 hora con concentraciones crecientes de compuesto, como se indica, antes de la adición de IL-4. Las células se incubaron con IL-4 durante 10 minutos, y después se sometieron a citometría de flujo intracelular para medir el porcentaje de inhibición de Stat-6 inducido por IL-4.

Ejemplo 345: Ensayo de proliferación de linfocitos T humanos primarios estimulados con IL-2

- 10 Los linfocitos T humanos primarios obtenidos de sangre periférica y preactivados a través de la estimulación del receptor de linfocitos T y CD28 proliferan *in vitro* en respuesta a la citocina Interleucina-2 (IL-2). Esta respuesta proliferativa es dependiente de la activación de las tirosina quinasas JAK-1 y JAK-3, que fosforilan y activan al factor de transcripción Stat-5.

- 15 Los linfocitos T primarios humanos se preparan como sigue. Se obtiene sangre entera de un voluntario sano, se mezcla 1:1 con PBS, deposita sobre Ficoll Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J., n.º de catálogo 17-1440-03) en una proporción de sangre/PBS:ficoll 2:1 y se centrifuga durante 30 min a 4 °C a 1750 rpm. Se recuperan los linfocitos en la interfase suero:ficoll y se lavan dos veces con 5 volúmenes de PBS. Las células se resuspenden en medio de Yssel (Gemini Bio-products, Woodland, Calif., n.º de catálogo 400-103) conteniendo IL2 recombinante (R and D Systems, Minneapolis, Minn., n.º de catálogo 202-IL (20 µg)) 40 U/ml y se siembran en un  
20 matraz prerrecubierto con anti CD3 (BD Pharmingen, San Diego, Calif., n. de catálogo 555336) 1 µg/ml y anti CD28 (Immunotech, Beckman Coulter of Brea Calif., n.º de catálogo IM1376) 5 µg/ml. Los linfocitos T primarios se estimulan durante 3 a 4 días, después se transfieren a un matraz reciente y se mantienen en RPMI con SFB al 10 %  
25 e IL-2 40 U/ml.

- Los linfocitos T primarios se lavan dos veces con PBS para eliminar la IL-2 y se resuspenden en medio de Yssel a  $2 \times 10^6$  células/ml. Se añaden 50 µl de suspensión de células conteniendo IL-2 80 U/ml a cada pocillo de una placa negra de 96 pocillos de fondo plano. Para el control no estimulado, se omite IL-2 en la última columna de la placa.  
30 Los compuestos se diluyen en serie con dimetilsulfóxido (DMSO puro al 99,7 %, probado en cultivo celular, Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., N.º de catálogo D2650) desde 5 mM en diluciones en serie con factor 3, y después se diluyen 1:250 en medio de Yssel. Se añaden 50 µl del compuesto 2X por pocillo por duplicado y se permite que las células proliferen durante 72 horas a 37 °C.

- 35 La proliferación se mide utilizando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo.RTM. (Promega), que determina el número de células viables en cultivos a base de la cuantificación del ATP presente, como un indicador de células metabólicamente activas. El sustrato se descongela y se permite que alcance la temperatura ambiente. Después de mezclar el reactivo de Cell Titer-Glo y el diluyente juntos, se añaden 100 µl a cada pocillo. Las placas se mezclan sobre un agitador orbital durante dos minutos para inducir la lisis y se incuban a temperatura ambiente  
40 durante diez minutos adicionales para permitir que se equilibre la señal. La detección se realiza utilizando un contador de multimarca Wallac Victor2 1420 adquirido en Perkin Elmer, Shelton, Conn.

Ejemplo 346. Línea epitelial A549 estimulada con IFN $\gamma$

- 45 Las células epiteliales de pulmón A549 regulan de forma positiva la expresión en superficie de ICAM-1 (CD54) en respuesta a una diversidad de estímulos distintos. Por lo tanto, utilizando la expresión de ICAM-1 como lectura, se pueden evaluar en el mismo tipo celular los efectos del compuesto sobre distintas rutas de señalización. IFN $\gamma$  regula de forma positiva a ICAM-1 a través de la activación de la ruta JAK/Stat. En este ejemplo, se evalúa la regulación positiva de ICAM-1 por IFN $\gamma$ .

- 50 La línea celular de carcinoma epitelial de pulmón A549 se origina en la Colección Americana de Cultivos Tipo. El cultivo de rutina es con medio F12K (Mediatech Inc., Lenexa, Kans., n.º de Cat. 10-025-CV) con suero fetal bovino al 10 %, penicilina 100 U.I. y estreptomycin 100 ng/ml (medio F12k completo). Las células se incuban en una atmósfera humidificada de CO $_2$  al 5 % a 37 °C. Antes del uso en el ensayo, las células A549 se lavan con PBS y se  
55 tratan con tripsina (Mediatech Inc., n.º de Cat. 25-052-CI) para levantar las células. La suspensión celular con tripsina se neutraliza con medio F12K completo y se centrifuga para sedimentar las células. El sedimento celular se resuspende en medio F12K completo a una concentración de  $2,0 \times 10^5$ /ml. Se siembran 20.000 células por pocillo, en un volumen total de 100 µl, en una placa de cultivo de tejidos de fondo plano y se permite que se adhieran durante una noche.

- 60 Al segundo día, las células A549 se preincuban con un compuesto de prueba de 2,4-pirimidina diamina o DMSO (control) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., n.º de catálogo D2650) durante 1 hora. Después, las células se estimulan con IFN $\gamma$  (75 ng/ml) (Peptotech Inc., Rocky Hill, N.J., n.º de Cat. 300-02) y se permite la incubación durante 24 horas. El intervalo de dosis del compuesto de prueba final es 30 µM a 14 nM en 200 µl de medio F12K conteniendo  
65 SFB al 5 %, DMSO al 0,3 %.

El día tres, el medio celular se retira y las células se lavan con 200  $\mu$ l de PBS (solución salina tamponada con fosfato). Cada pocillo se trata con tripsina para disociar las células, después se neutraliza mediante la adición de 200  $\mu$ l de medio F12K completo. Las células se sedimentan y se tiñen con un anticuerpo anti ICAM-1 (CD54) humano en ratón conjugado a APC (BD Pharmingen, San Diego, Calif., n.º de catálogo 559771) durante 20 minutos a 4 °C. Las células se lavan con tampón de FACS (PBS + SFB al 2 %) enfriado en hielo y la expresión en superficie de ICAM-1 se analiza mediante citometría de flujo. La detección se realiza utilizando el citómetro de flujo BD LSR I System, adquirido en BD Biosciences de San José, California. Los sucesos se clasifican por la dispersión en vivo y se calculan las medias geométricas (programa informático CellQuest versión 3.3 de Becton-Dickinson, Franklin Lakes, N.J.). Las medias geométricas se representan frente a la concentración de compuesto para generar una curva de dosis-respuesta.

#### Ejemplo 347. Ensayo de FACS de ICAM1 por IFN $\gamma$ en U937

Las células monocíticas humanas U937 regulan de forma positiva la expresión en superficie de ICAM-1 (CD54) en respuesta a una diversidad de estímulos distintos. Por lo tanto, utilizando la expresión de ICAM-1 como lectura, se pueden evaluar en el mismo tipo celular los efectos del compuesto sobre distintas rutas de señalización. IFN $\gamma$  regula de forma positiva a ICAM-1 a través de la activación de la ruta JAK/Stat. En este ejemplo, se evalúa la regulación positiva de ICAM-1 mediante IFN $\gamma$ .

La línea de células monocíticas humanas U937 se obtiene de la ATCC de Rockville, Md., número de catálogo CRL-1593.2, y se cultiva en medio RPMI-1640 conteniendo SFT al 10 % (v/v). Las células U937 se crecen en RPMI al 10 %. Después, las células se siembran en placa a una concentración de 100.000 células por 160  $\mu$ l, en placas de fondo plano de 96 pocillos. Después, se diluyen los compuestos de prueba como sigue: el compuesto de prueba 10 mM se diluye en DMSO 1:5 (3  $\mu$ l de compuesto de prueba 10 mM en 12  $\mu$ l de DMSO), seguido de una dilución en serie 1:3 del compuesto de prueba en DMSO (6  $\mu$ l del compuesto de prueba diluido en serie en 12  $\mu$ l de DMSO para dar diluciones con factor 3). Después, se transfieren 4  $\mu$ l del compuesto de prueba a 76  $\mu$ l de RPMI al 10 % dando como resultado una solución 10X (compuesto de prueba 100  $\mu$ M, DMSO al 5 %). Para los pocillos de control, se diluyen 4  $\mu$ l de DMSO en 76  $\mu$ l de RPMI al 10 %.

El ensayo se realiza por duplicado con 8 puntos (8 concentraciones en diluciones con factor 3 desde 10  $\mu$ l) y con 4 pocillos sólo con DMSO (pocillos de control) en condiciones estimuladas y 4 pocillos con solo DMSO en condiciones no estimuladas.

La placa de compuesto diluida se mezcla 2X utilizando un multimek (Beckman Coulter de Brea, Calif.) y después se transfieren 20  $\mu$ l de los compuestos diluidos a la placa de 96 pocillos conteniendo 160  $\mu$ l de células, que después se mezclan otra vez dos veces a velocidades bajas. Después, las células y los compuestos se preincuban durante 30 minutos a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 %.

La mezcla de estimulación 10X se prepara preparando una solución de IFN $\gamma$  humana 100 ng/ml en RPMI al 10 %. Después, las células y el compuesto se estimulan con 20  $\mu$ l de mezcla de estimulación de IFN $\gamma$  para dar una concentración final de IFN $\gamma$  10 ng/ml, compuesto de prueba 10  $\mu$ M y DMSO al 0,5 %. Las células se mantienen en condiciones para la estimulación durante 18-24 horas a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 %.

Para la tinción las células se transfieren a una placa de fondo redondeado de 96 pocillos y después se mantienen en hielo durante la duración del procedimiento de tinción. Las células se centrifugan a 1000 rpm durante 5 minutos a 4 °C, después de lo cual el sobrenadante se retira. Después de retirar del sobrenadante, se añade 1  $\mu$ l de anticuerpo anti ICAM-1 humano en ratón, conjugado a APC por 100  $\mu$ l de tampón FACS. Después, las células se incuban en hielo en oscuridad durante 30 minutos. Después de la incubación, se añaden 150  $\mu$ l de tampón FACS y las células se centrifugan a 1000 rpm durante 5 minutos a 4 °C, después de lo cual se retira el sobrenadante. Después de retirar del sobrenadante, se añaden 200  $\mu$ l de tampón de FACS y las células se resuspenden. Después de la suspensión, las células se centrifugan a 1000 rpm durante 5 min a 4 °C. Después, el sobrenadante se retira antes de la resuspensión de las células en 150  $\mu$ l de tampón FACS.

La detección se realiza utilizando un citómetro de flujo BD LSR I System, adquirido en BD Biosciences de San José, California. Las células vivas se seleccionan por dispersión en vivo y se mide la media geométrica de ICAM-APC (programa informático CellQuest versión 3.3 de Becton-Dickinson, Franklin Lakes, N.J.). Se analiza el % de células vivas y de expresión de ICAM-1. Los ensayos para los compuestos de prueba se llevan a cabo en paralelo con un compuesto de control de actividad conocida. Normalmente la CE<sub>50</sub> para el compuesto de control es 40-100 nM.

#### Ejemplo 348. Análisis de la señalización de linfocitos B:

Las líneas de linfocitos B de linfoma no Hodgkin humanas SUDHL-4 (n.º ACC 495), SUDHL-6 (n.º ACC572) y Karpas-422 (n.º ACC32) se obtuvieron de DSMZ (Braunschweig, Alemania); las Toledo (n.º CRL-2631) y Ramos (n.º CRL-1596) se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; Manassas, VA). Todas las células se mantuvieron en medio RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con suero de ternera fetal al 10 % (ATCC) y penicilina/estreptomocina (Invitrogen), y se mantuvieron a 37 °C en un incubador de cultivo de tejidos

humidificado. Los anticuerpos utilizados en estos estudios incluyen el anticuerpo policlonal de cabra F(ab)<sup>2</sup> anti IgG humana (H+L) y anti IgM humana (BioSource, Camarillo, CA); el anti Syk humana de conejo, el anti fosfo-Syk (Y525/526) humana de conejo, anti fosfo-Syk (Y352) humana en conejo, anti BLNK humana, anti fosfo-BLNK (Y84) humana se obtuvieron de Cell Signaling Technologies, Inc. (Danvers, MA). Para la fosfo citometría de flujo se obtuvieron los siguientes anticuerpos de Becton Dickinson (San José, CA): anti fosfo-STAT6 (Y641) humano de ratón conjugado a Alexa flúor 488; anti fosfo-Zap70 (Y319)/Syk(Y352) humano de ratón conjugado a ficoeritrina (PE) y anti fosfo-ERK1/2 (T202/Y204) humano de ratón conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC).

La fosfocitometría de flujo se realizó esencialmente como se describe en otros sitios (Irish, Czerwinski *et al.* Blood 108(9): 3135-42 (2006). Se estimularon  $0,5 \times 10^6$  células en medio de cultivo con anticuerpo anti- $\mu$  o anti- $\gamma$  1  $\mu\text{g/ml}$  durante 10 minutos. La señalización inducida se finalizó inmediatamente después del tiempo indicado, mediante la adición de paraformaldehído (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) hasta una concentración final del 1 %. Las células se incubaron con paraformaldehído durante 5 minutos a temperatura ambiente, se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS), después se resuspendieron e incubaron durante una noche a 4 °C en metanol preenfriado (-80 °C) (empresa, dirección). Posteriormente las células fijadas y permeabilizadas se lavaron una vez en PBS, una segunda vez en PBS que contenía seroalbúmina bovina (BSA) al 1 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), y después se tiñeron con los anticuerpos indicados diluidos 1:20 en PBS + BSA al 1 %. Tras 30 minutos, las células se lavaron una vez en PBS y se sometieron a citometría de flujo utilizando FACS Calibur (Becton Dickinson). Para los análisis de transferencia de Western, se estimularon  $10^6$  células durante 30 minutos con 2  $\mu\text{g/ml}$  de los anticuerpos específicos para el BCR indicados. La señalización se finalizó resuspendiendo las células en tampón de lisis e incubando en hielo durante 1 hora. Los residuos celulares se eliminaron por centrifugación y los lisados de proteína clarificados se resolvieron en SDS-PAGE al 10 % y se sondearon con los anticuerpos indicados siguiendo las recomendaciones hechas por los fabricantes. Cuando se indica, las células se pretrataron durante 1 hora a 37 °C con inhibidores de Syk o con control de vehículo (DMSO al 0,5 %) a varias concentraciones antes de la estimulación con anticuerpo anti BCR.

Ejemplo 349. Inhibición selectiva de la actividad de Syk.

Se analizó la capacidad de los compuestos para inhibir a Syk purificada. Se encontró que P459-72 y P505-15 (dos compuestos de una serie específica para Syk como se muestra en la Tabla 9b) y el ejemplo 100b (de una serie con actividades inhibitoras de Syk y JAK duales) suprimen la actividad de la Syk quinasa con las CI<sub>50</sub> de 43 nM, 6 nM y 31 nM, respectivamente. La selectividad de estos compuestos por Syk se determinó explorando cada uno frente a un panel de 270 quinasas purificadas independientes a 300 nM (Millipore). Se calculó el porcentaje de inhibición con respecto al vehículo de control y los números se convirtieron a un mapa de calor; la no inhibición se representa como verde, la mezcla creciente con rojo indica porcentaje de inhibición creciente con el amarillo representando el 50 % de inhibición y el rojo representando el 100 % de inhibición (Figura 8). Como se representa en la Figura 8A, P459-72 y P505-15 fueron altamente específicos para Syk (primera y segunda filas, respectivamente) mientras que el ejemplo 100b inhibió a múltiples quinasas (tercera fila). El subconjunto de quinasas que se inhibieron en  $\geq 80$  % por cualquiera de los tres compuestos se muestran en la Figura 8B. El ejemplo 100b inhibió a Syk y MLK-1 (primera fila). A 300 nM, P505-15 inhibió 10 quinasas distintas (segunda fila). Cuando se reanalizó a 50 nM (aproximadamente 10x por encima de su valor CI<sub>50</sub> de Syk de 6 nM), sin embargo, Syk no fue la única quinasa que se mantuvo inhibida (tercera fila). P420-89 inhibió Syk, JAK2 y JAK3, junto con varias de otras quinasas (cuarta fila).

Empleando el panel Millipore de quinasas purificadas, P505-15 (CI<sub>50</sub> = 1 nM) inhibió el 98 % de la actividad de la quinasa Syk purificada a 50 nM. Los valores de CI<sub>50</sub> se determinaron para las quinasas que se inhibieron en  $>80$  % a 300 nM en el panel de quinasas de Millipore.

Quinasa	CI <sub>50</sub> (nM)
Syk(h)	1
MLK1	60
Fgr(h)	81
Yes(h)	123
Flt3(h)	139
PAK5	166
Lyn(h)	199
cSRC(h)	244
Lck(h)	300

En cambio, el inhibidor de multiquinasas P420-89 es más semejante a R788 de Rigel. A 300 nM, P420-89 inhibió a Syk en el 88 %, junto con  $> 80$  % de inhibición de 32 quinasas adicionales. Entre estas estaban JAK 2 y 3 (inhibidas el 93 % y el 85 %, respectivamente), Flt-3 (inhibidas el 83-92 %) y cKit (inhibidas el 95-97 %), todas dianas para la manipulación terapéutica de la función linfocítica.

Ejemplo 350. Ensayo de flujo de calcio e inhibición selectiva de Syk en líneas de linfocitos B de linfoma no Hodgkin.

Las células Ramos se cultivaron (manteniendo aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  células/ml) en medio de cultivo 3 a 4 días antes de los experimentos. Las células se recogieron y se resuspendieron en medio recién preparado a  $8 \times 10^6$  células/ml antes de la carga de colorante. Se añadió a las suspensiones celulares un volumen equivalente de colorante de carga Calcio 3 (Molecular Device, Sunnyvale, CA). Las células cargadas se dispensaron en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 20 minutos. Después, los inhibidores de Syk se añadieron a las células cargadas y se incubaron durante otros 30 minutos. Los linfocitos B se estimularon con anticuerpo anti  $\mu$  5  $\mu\text{g/ml}$ . Los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se midieron utilizando la FlexSTATION (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

La selectividad y potencia de la inhibición de Syk en linfocitos B se investigó inicialmente mediante transferencia de Western, midiendo la inducción de pSyk Y525/526 y pBLNK Y84 mediada por el BCR, ambas medidas de la actividad de la Syk quinasa, y la inducción de pSyk Y352, una medida de la actividad de la Src quinasa. Los linfocitos B SUDHL-6 se estimularon con anticuerpo específico anti BCR durante 30 minutos en presencia o ausencia de cada uno de los inhibidores de Syk o de control de vehículo. El tratamiento con 0,16 o 1  $\mu\text{M}$  de cada compuesto redujo la autofosforilación de Syk (Y525/526) inducida por BCR en aproximadamente el 40 % y el 60 %, respectivamente, como se estimó mediante densitometría (datos no mostrados). Se utilizó un intervalo expandido de concentraciones para evaluar adicionalmente el efecto de estos compuestos sobre la actividad de Syk y Src quinasa inducida por el BCR. Como se muestra en la Figura 9, A-C, cada compuesto inhibió la actividad de Syk (pBLNK Y84) con valores de CI50 que varían desde 0,16 a 1  $\mu\text{M}$ , aunque no se observó efecto sobre la actividad de Src (pSyk Y352) a tan alto como 2,5  $\mu\text{M}$ .

También se midió la capacidad de cada compuesto para suprimir los sucesos de señalización más distantes del BCR. Las células se estimularon otra vez mediante el anticuerpo anti BCR en presencia o ausencia de diversas concentraciones de cada inhibidor de Syk. La inducción de pSyk Y352 se midió como un control de especificidad, mientras que la de pERK1/2 T202/Y204 se utilizó como una medida de la señalización dependiente de Syk más distante (Jiang, Craxton *et al.* J Exp Med 188(7): 1297-306 (1998)). La Figura 12C muestra las representaciones de FACS representativos que representan el efecto del inhibidor más específico y potente de Syk de los tres, P505-15, sobre la señalización del BCR. A 125 nM, la activación de ERK1/2 se suprimió de forma completa, mientras que las células estimuladas todavía se teñían de forma positiva para Syk Y352. Este experimento se repitió, en donde se determinó el efecto de los tres compuestos sobre la actividad de Src y Syk (Figura 10A). Fueron suficientes concentraciones menores de 125 nM para suprimir la señalización de Syk inducida por el BCR para ERK1/2. En cambio, se necesitaron concentraciones mucho más elevadas para provocar una supresión modesta de la actividad de Src; un efecto sobre Src que no se observó mediante transferencia de Western (Figura 9, A-C). Ninguno de estos inhibidores de Syk suprimió la fosforilación de tirosinas de ERK1/2 inducida por PMA, lo que demuestra que estos compuestos no inhiben sucesos de señalización aguas abajo de la PKC.

Mientras que P459-72 y P505-15 inhiben de forma específica Syk en ensayos sobre purificada y celular, el ejemplo 100b demostró de forma adicional actividad frente a JAK quinasa purificadas. Se analizó la inhibición de la señalización de IL-4 para STAT-6 a través de JAK1/3 en linfocitos B para estos compuestos, una ruta de señalización que no necesita Syk. Los compuestos específicos para Syk no suprimieron la señalización de IL4 a concentraciones tan altas como 2  $\mu\text{M}$ . Al contrario, el ejemplo 100b si suprimió la señalización de IL4, con una CI50 de alrededor de 125 nM (Figura 10B).

Esto muestra que la inhibición selectiva de Syk suprimió el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por el BCR en linfocitos B con valores de CI50 de alrededor de 100 nM. Esto sugiere que, mediante la inhibición de Syk, estos compuestos suprimen la ruta de señalización bloqueando la respuesta celular.

La inhibición selectiva de Syk es suficiente para suprimir la señalización del BCR sin afectar a Src (Figuras 11 y 12) o JAK (Figura 10B). De forma adicional, P505-15 y el ejemplo 100b inducen por igual la apoptosis en estas células (Figura 11B). Este dato demuestra que el papel de la señalización de Syk en la supervivencia de las líneas celulares de LNH, y demuestra que no se necesita para conseguir este efecto la inhibición de las quinasa que no son Syk.

Ejemplo 351. Ensayos de Caspasa 3 y de proliferación: la inhibición de Syk altera la proliferación y la supervivencia de las líneas de linfocitos B de linfoma no Hodgkin.

La inducción de la apoptosis se midió utilizando el kit de apoptosis de anticuerpo monoclonal para Caspasa 3 activa conjugado a PE (Becton Dickinson) siguiendo el protocolo suministrado. Las células se suspendieron en medio de cultivo ( $0,5 \times 10^6$  células/ml) y se trataron con las concentraciones indicadas de cada inhibidor de Syk o control de vehículo durante 24, 48 o 72 horas antes del análisis de FACS. El ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, un tetrazol) (empresa nombre) se utilizó como una medida de la viabilidad y crecimiento celular, siguiendo los protocolos suministrados por el fabricante. Las células se trataron con las concentraciones indicadas de cada inhibidor de Syk o con control de vehículo durante 72 horas.

Las células SUDHL-4 y SUDHL-6 se clasificaron de forma previa como "de tipo BCR " (Monti, Savage *et al.* Blood 105(5): 1851-61 (2005); Polo, Juszczynski *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A 104(9): 3207-12 (2007)) y como sensibles a la inhibición de Syk mediante R406 (Chen, Monti *et al.* 2008). Las líneas celulares Toledo y Karpas-422, que carecen de la expresión del BCR y de BLNK, respectivamente (Gabay, Ben-Bassat *et al.* Eur J Haematol 63(3): 180-91 (1999); Sprangers, Feldhahn *et al.* Oncogene 25(36): 5056-62 (2006)), habiéndose adaptado, por lo tanto, a la supervivencia independiente de las señales del BCR, fueron insensibles a R406 (Chen, Monti *et al.* 2008). Se analizó la proliferación de estas líneas celulares cuando se cultivaron en presencia o ausencia de diversas concentraciones de cada inhibidor de Syk durante 72 horas.

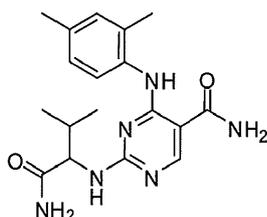
La inhibición selectiva de Syk fue suficiente para inducir la apoptosis en líneas celulares de LNH "de tipo BCR". Las células se incubaron con el inhibidor 1 o 3  $\mu\text{M}$  durante 72 h. Como se demuestra en la Figura 11A, las células SUDHL-4 y -6 experimentaron cada una apoptosis, mientras que las células Toledo y Karpas-422 no (Figura 11A). En experimentos repetidos, la inhibición específica de Syk por P459-72 y P505-15 indujo apoptosis sólo en las líneas celulares SUDHL y Ramos. En comparación, el ejemplo 100b, que inhibe de forma potente a las Syk y JAK quinasas, indujo apoptosis en todas las líneas celulares "de tipo BCR", así como en Karpas-422 y JLN-3, una línea celular de mieloma múltiple que carece del BCR, y la expresión de BLNK (Sprangers, Feldhahn *et al.* Oncogene 25(36): 5056-62 (2006)). Las células Toledo permanecieron insensibles a los tres compuestos (Figura 11B). En un experimento distinto, se encontró que las células SUDHL-6 y Toledo eran sensibles por igual a la inducción de la apoptosis mediante el tratamiento de 72 h con PMA 1  $\mu\text{M}$ . Estos datos demuestran la necesidad específica de Syk para la supervivencia de ciertas líneas celulares de LNH.

Ejemplo 352. Estudios de xenoinjerto y análisis de la concentración en tumor y plasma.

La inhibición de Syk protege frente a la formación de tumores en un modelo de ratón de xenoinjerto. Se recibieron los ratones (empresa) y se aclimataron en las instalaciones al menos tres días antes del uso. Las células Ramos ( $3 \times 10^6$ ) se inyectaron por vía subcutánea en la zona de flanco trasero de ratones conscientes utilizando una aguja de diámetro 27 en un volumen de inyección de menos de 0,5 ml. Después de la inyección los ratones se separaron aleatoriamente en grupos de tratamiento ( $n = 15$ ) y se dosificaron dos veces al día mediante sonda oral con el vehículo o 10, 15 o 20 mg/kg del inhibidor. Al menos una vez por semana se obtuvieron pesos corporales y se determinaron dos veces por semana mediciones por calibrador de los tumores, comenzando cuando se formaron tumores palpables, hasta la finalización del estudio. El volumen tumoral se evaluó mediante medición con calibrador utilizando una fórmula [longitud máxima x ancho x alto x  $\pi/6$ ]. La dosificación dos veces al día de vehículo o de inhibidor continuó hasta que el vehículo o cualquier grupo de tratamiento presentó tumores que excedían los 1,5 gramos de tamaño. En el momento de la finalización (5 semanas después de la inoculación de Ramos), los ratones se anestesiaron con un cóctel de ketamina. Se obtuvo una muestra de sangre a través de punción cardiaca para hemograma y para la determinación de la concentración en plasma, y los ratones se sometieron a eutanasia a través de dislocación cervical. Después, los tumores se extirparon y pesaron. Una mitad del tumor se congeló de forma instantánea en nitrógeno líquido para la determinación de la concentración del inhibidor en el tejido tumoral y la otra mitad se colocó en formalina tamponada al 10 % para la investigación histológica.

Se evaluó el efecto de la inhibición de Syk sobre la formación de tumor de Ramos en un modelo de ratón de xenoinjerto. Los ratones se dosificaron dos veces al día con P505-15 10, 15 o 20 mg/kg o control de vehículo, comenzando el día de inoculación de células tumorales. Las mediciones con calibrador se iniciaron cuando los tumores comenzaron a formarse, aproximadamente tres semanas después de la inoculación del tumor, y se repitieron cada tres días hasta la finalización del estudio. El estudio se finalizó cuando los pesos tumorales comenzaron a alcanzar aproximadamente 1,5 mg, momento en el que los tumores se extirparon y pesaron. Las muestras de tumor y de plasma se sometieron a análisis farmacocinético.

Cada muestra de tumor se homogeneizó en 3 ml de solución salina por gramo de tumor utilizando los vástagos y el motor de Kontes® Microtube Pellet Pestle® (Kimble Chase, Vineland, NJ). Se analizó en las muestras de plasma y tumor la concentración de P505-15 utilizando un espectrómetro de masas en tándem con cromatografía líquida (LC/MS/MS). Brevemente, las muestras de plasma y tumor se procesaron en una placa filtro de 96 pocillos Captiva™ (0,2  $\mu\text{M}$ , Varian, Inc., Palo Alto, CA). Se precipitaron alícuotas de las muestras de plasma y de tumor homogeneizado con acetonitrilo conteniendo 200 ng/ml de:



Compuesto A,

el patrón interno. La mezcla se agitó con formación de vórtice y se refrigeró a 4 °C durante 30 minutos para permitir la precipitación completa de las proteínas. La mezcla se filtró en una placa de recolección de 96 pocillos. El filtrado se inyectó en un LC/MS/MS Sciex API3000 equipado con una fuente de *spray* iónico turbo. P505-15 y el Compuesto A se separaron en una columna HILIC Luna Phenomenex de 5  $\mu$  (4,6 x 100 mm, 5 mm; Phenomenex, Torrance, CA). Se programó durante de 1,1 minutos un gradiente de fase móvil mezcla de la fase móvil A al 10 % (ácido fórmico al 0,1 % en agua) y fase móvil B al 90 % (ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo al 90 %, agua al 10 %) hasta fase móvil B al 65 %, seguido de un gradiente de fase móvil B del 65 % al 90 % durante 0,01 minutos. Las áreas pico de la m/z 394/360 del ion producto de P505-15 se midieron frente a las m/z 357/295 del ion producto del Compuesto A (patrón interno) en modo de ion positivo. El intervalo analítico fue de 2 a 5000 ng/ml.

El análisis farmacocinético reveló que en el estado estacionario, las concentraciones tumorales de P505-15 siguieron los perfiles de concentración-tiempo vistos para plasma en los grupos de dosis 10, 15 y 20 mg/kg. Los aumentos no lineales en la  $C_{m\acute{a}x}$ , el ABC (0-8) y la  $C_{min}$  tumoral se observaron a medida que se aumentó la dosis, pero no se observó un aumento proporcional a la dosis en la  $C_{min}$  de plasma. La  $C_{m\acute{a}x}$  media y el ABC (0-8) en plasma fue al menos 2 veces mayor que las de en tumor para todas las dosis examinadas; sin embargo, las concentraciones mínimas (nadir) medias ( $C_{min}$ ) fueron más elevadas en tumor que en plasma (Tabla 11A), indicando acumulación de P505-15 en el compartimento tumoral.

Tabla 11A

Determinado a partir de plasma				
Régimen de dosificación	T <sub>máx</sub> (h)	C <sub>min</sub> (ng/ml)	C <sub>máx</sub> (ng/ml)	ABC (0-8) (ng*h/ml)
10 mg/kg dos veces al día	1,50	17,6	179	738
15 mg/kg dos veces al día	1,50	26,6	343	1671
20 mg/kg dos veces al día	4,00	39,5	570	3191
Determinado a partir de tumor				
Régimen de dosificación	T <sub>máx</sub> (h)	C <sub>min</sub> (ng/ml)	C <sub>máx</sub> (ng/ml)	ABC (0-8) (ng*h/ml)
10 mg/kg dos veces al día	8,00	24,5	55,2	353
15 mg/kg dos veces al día*	4,00	67,8	163	475
20 mg/kg dos veces al día	4,00	125	252	1453

Tabla 11B

Régimen de dosificación	Proporción tumor/plasma		
	Basado en el ABC	Basado en la C <sub>máx</sub>	Basado en la C <sub>min</sub>
10 mg/kg dos veces al día	0,478	0,308	1,39
*15 mg/kg dos veces al día	0,284	0,475	2,55
20 mg/kg dos veces al día	0,455	0,442	3,15

Nota: las muestras de nadir (0), 1,5, 4 y 8 h se tomaron en el día de la recogida tras la dosis de la mañana (AM). La segunda dosis no se administró en el día de la recogida; por lo tanto, los valores farmacocinéticos anteriores se determinaron tras una única dosis por la mañana (AM) en el estado estacionario.  
\*sólo una muestra de tumor estuvo disponible para el punto de tiempo de 8 h y puede haber sido un valor atípico (concentraciones tumorales a las 8 h – 608 ng/ml); por lo tanto, los parámetros farmacocinéticos se determinaron entre 0 y 4 h para el grupo de dosificación de dos veces al día de P505-15 15 mg/kg. Como resultado, el ABC (0-8) y la proporción tumor/plasma basada en el ABC para este grupo puede estar subestimada.

La diferencia entre la  $C_{min}$  del plasma y del tumor se hizo más notable a medida que se aumentó la dosis, como se indica por el aumento de las proporciones tumor/plasma determinadas a partir de la  $C_{min}$  (Tabla 11B). Las proporciones tumor/plasma determinadas a partir de la  $C_{m\acute{a}x}$  y el ABC (0-8) fueron similares a lo largo de diversos grupos de dosis. Las concentraciones de tumor se mantuvieron por encima de 60, 170 y 640 nM a lo largo del intervalo de dosificación total en la fase estacionaria para P505-15 a 10, 15 y 20 mg/kg, respectivamente.

Los ratones dosificados con las tres concentraciones de P505-15 estuvieron protegidos para el crecimiento del tumor Ramos *in vivo*. Esto fue evidente primero a partir de las mediciones por calibrador (datos no mostrados), lo que reveló una velocidad reducida de crecimiento tumoral en presencia del inhibidor de Syk. Después de la finalización del estudio, los ratones se sometieron a eutanasia y los tumores se extirparon y pesaron. De forma concordante con las mediciones con calibrador, se consiguió en todos los grupos de dosificación una reducción estadísticamente significativa del promedio de peso tumoral, en comparación con el control de vehículo.

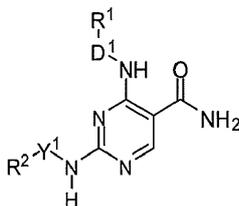
Además, se analizó la actividad del inhibidor específico para Syk P505-15 en un modelo de xenoinjerto de ratón de tumor Ramos. En todas las concentraciones analizadas, se observaron reducciones estadísticamente significativas del tamaño tumoral en ratones dosificados dos veces al día con P505-15. La concentración más baja analizada fue de 10 mg/kg, consiguiendo concentraciones tumorales variando desde 64 a 140 nM a lo largo del curso del día. La supresión del crecimiento tumoral a estas concentraciones *in vivo* concuerda con las concentraciones de < 125 nM que se encuentran que suprimen el flujo de Ca<sup>2+</sup> inducido por el BCR y la señalización del BCR distante para pERK Y204 (Figuras 12). La inhibición farmacológica selectiva de Syk da como resultado efectos sobre las proliferaciones y supervivencia de las líneas celulares de LNH. Estos datos sugieren que la acción selectiva sobre Syk puede tener, de manera similar, beneficio clínico en una diversidad de trastornos proliferativos de linfocitos B.

Como se detalla en el presente documento, se ha implicado de forma experimental a Syk en el desarrollo, proliferación y supervivencia de los linfocitos B. Además, Syk está implicado como oncogén. La expresión de Syk activa de forma constitutiva en células de médula ósea transferidas de forma adoptiva induce leucemia en ratones, y la sobreactividad de Syk está asociada con una diversidad de linfomas en seres humanos. Dado el papel de Syk en la biología de los linfocitos B, su inhibición selectiva podría ser suficiente para proporcionar beneficio clínico en trastornos proliferativos de linfocitos B, mientras se reducen las toxicidades que puede surgir debido a la supresión de otras quinasas que no son diana.

La presente invención proporciona varias realizaciones. Es obvio que los ejemplos pueden alterarse para proporcionar otras realizaciones de la presente invención. Por lo tanto, se apreciará que las reivindicaciones adjuntas, en lugar de las realizaciones específicas que se han representado a modo de ejemplo, definirán el ámbito de la presente invención.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula I:



(I)

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

D<sup>1</sup> es cicloalquilo C<sub>3-8</sub>, opcionalmente sustituido con 1 a 4 sustituyentes seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en: alquilo C<sub>1-8</sub>, amino, hidroxilo, alquilcarbonilo C<sub>1-8</sub>, aminocarbonilo, alcoxicarbonilamino C<sub>1-8</sub>, arilalcoxicarbonilamino C<sub>1-8</sub>, fenilo y heterociclil-alquilenos C<sub>1-8</sub>;

10 R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1-8</sub>, amino, aminocarbonilo, hidroxilo, alcoxi C<sub>1-8</sub>, haloalquilo C<sub>1-8</sub>, alqueno C<sub>2-8</sub>, alquino C<sub>2-8</sub>, oxo, ciano, alcoxicarbonilo C<sub>1-8</sub>, cicloalquilo C<sub>3-8</sub>, arilo y heterociclilo; y cada heterociclilo está opcionalmente sustituido con 1 a 4 sustituyentes seleccionados entre el grupo que consiste en: alquilo C<sub>1-8</sub>, halo, oxo, amino, alcoxi C<sub>1-8</sub>, alquilcarbonilo C<sub>1-8</sub>, arilalcoxicarbonilo C<sub>1-8</sub>, aminocarbonilo, arilalquilenocarbonilo C<sub>1-8</sub> y alquilsulfonilo C<sub>1-8</sub>;

15 Y<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en

(a) arilo; opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes, R<sup>4a</sup>, independientemente seleccionados entre el grupo que consiste en alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>-alquilo C<sub>1-8</sub>, aminocarbonil-, hidroxilo, oxo, halógeno, hidroxilo, alcoxi C<sub>1-8</sub> y alquilsulfonilo C<sub>1-8</sub>;

20 (b) heteroarilo, opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes, R<sup>4a</sup>, independientemente seleccionados entre el grupo que consiste en alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>-alquilo C<sub>1-8</sub>, aminocarbonil-, hidroxilo, oxo, halógeno, hidroxilo, alcoxi C<sub>1-8</sub> y alquilsulfonilo C<sub>1-8</sub>;

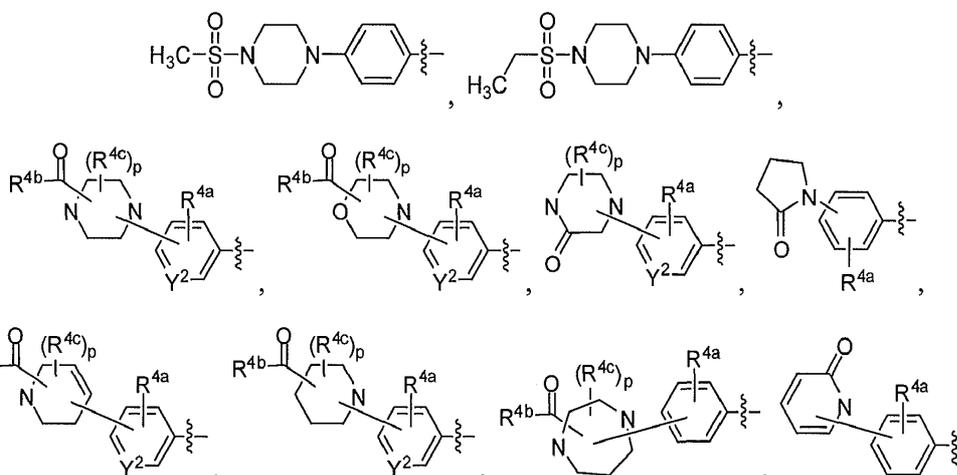
R<sup>2</sup> es un heterociclilo o heteroarilo sustituido con al menos un grupo, R<sup>3</sup>, seleccionado entre el grupo que consiste en aminoalquil C<sub>1-8</sub>-, alcoxi C<sub>1-8</sub>-alquil C<sub>1-8</sub>-, oxo-, alquilcarbonilo C<sub>1-8</sub>, cicloalquilcarbonilo C<sub>3-8</sub>, heterociclilcarbonilo, alquilcarbonilamino C<sub>1-8</sub>, cicloalquilcarbonilamino C<sub>3-8</sub>, heterociclilcarbonilamino, alquilsulfonilo C<sub>1-8</sub>, cicloalquilsulfonilo C<sub>3-8</sub> y heterociclilsulfonilo;

25 y en la que R<sup>2</sup> está opcionalmente sustituido adicionalmente con 1 a 2 sustituyentes, R<sup>4c</sup>, independientemente seleccionados entre el grupo que consiste en alquilo C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>, halo, aminocarbonilo, oxo, hidroxilo, aminoalquilenos C<sub>1-8</sub>, alcoxi C<sub>1-8</sub>-alquilenos C<sub>1-8</sub>, alquilcarbonilo C<sub>1-8</sub>, cicloalquilcarbonilo C<sub>3-8</sub>, heterociclilcarbonilo, alquilcarbonilamino C<sub>1-8</sub>, cicloalquilcarbonilamino C<sub>3-8</sub>, heterociclilcarbonilamino, alquilsulfonilo C<sub>1-8</sub>, cicloalquilsulfonilo C<sub>3-8</sub>, heterociclilsulfonilo, cicloalquilo C<sub>3-8</sub>, alquilcicloalquilenos C<sub>1-8</sub>, heteroarilo;

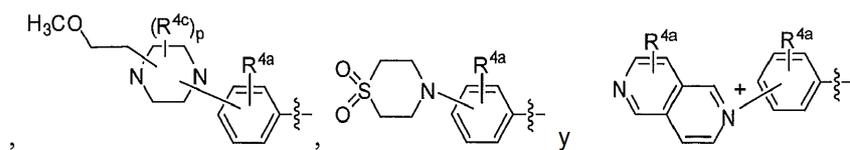
30 donde cicloalquilo se refiere a un grupo hidrocarburo mono o policíclico alquilo, alqueno o alquino que puede formar un anillo puenteado o un anillo espiro, y que puede tener uno o más dobles o triples enlaces.

35

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el resto -Y<sup>1</sup>-R<sup>2</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en:



40



Y<sup>2</sup> es N, CH o C;

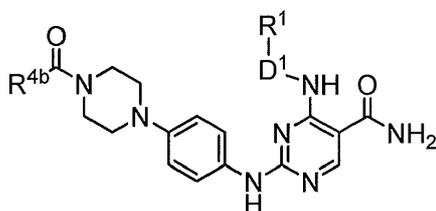
R<sup>4a</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H y alquilo C<sub>1-8</sub>;

cada R<sup>4c</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en alquilo C<sub>1-8</sub>, aminocarbonil-, hidroxilo, oxo, alcoxi C<sub>1-8</sub> y halo;

cada R<sup>4b</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en alquilo C<sub>1-8</sub> y heterocicilo; el subíndice p es 0, 1, 2 o 3; y

la línea ondulada indica el punto de unión al resto de la molécula.

3. El compuesto de la reivindicación 2 que tiene la fórmula Id1:



(Id1)

o un tautómero, sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo.

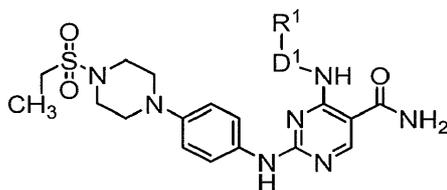
4. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que: D<sup>1</sup> es ciclopropilo.

5. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que: D<sup>1</sup> es ciclobutilo.

6. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que: D<sup>1</sup> es ciclopentilo.

7. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que: D<sup>1</sup> es ciclohexilo.

8. El compuesto de la reivindicación 1 que tiene la fórmula:



o



o un tautómero, sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo.

9. El compuesto de la reivindicación 1 selección entre el grupo que consiste en:

2-(4-(4-acetilpiperazin-1-il)fenilamino)-4-(ciclobutilamino)pirimidin-5-carboxamida;

2-(4-(4-acetilpiperazin-1-il)-3-clorofenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida;

4-(ciclopropilamino)-2-(4-(4-propionilpiperazin-1-il)fenilamino)pirimidine-5-carboxamida;

- 2-(4-(4-(ciclopropanocarbonil)piperazin-1-il)fenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida;  
 2-(4-(4-acetil-2-oxopiperazin-1-il)fenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida;  
 2-(4-(4-acetilpiperazin-1-il)-3-fluorofenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida;  
 2-(4-(4-acetil-2-carbamoiipiperazin-1-il)fenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida;  
 5 (R)-2-(4-(4-acetil-3-metilpiperazin-1-il)fenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida;  
 (R)-2-(4-(4-acetil-2-metilpiperazin-1-il)fenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida;  
 2-(6-(4-acetilpiperazin-1-il)piridin-3-ilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida;  
 4-(ciclopropilamino)-2-(4-(1-(metilsulfonyl)piperidin-4-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida;  
 4-(ciclopropilamino)-2-(4-(4-(metilsulfonyl)piperazin-1-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida;  
 10 4-(ciclopropilamino)-2-(4-(4-(etilsulfonyl)piperazin-1-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida;  
 4-(ciclobutilamino)-2-(4-(4-(metilsulfonyl)piperazin-1-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida;  
 2-(4-(1-acetilpiperidin-4-il)fenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida;  
 (ciclopropilamino)-2-(4-(4-(pirrolidin-1-carbonil)piperidin-1-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida;  
 4-(ciclopropilamino)-2-(4-(4-(morfolin-4-carbonil)piperidin-1-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida;  
 15 4-(ciclopropilamino)-2-(4-(4-(ciclopropilsulfonyl)piperazin-1-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida;  
 2-(4-(4-acetil-1,4-diazepan-1-il)fenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida;  
 2-(4-(4-acetamidopiperidin-1-il)fenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida;  
 4-(ciclopropilamino)-2-(4-(4-dioxiomorfolinofenilamino)pirimidin-5-carboxamida;  
 4-(ciclopropilamino)-2-(4-(4-(2-metoxietil)piperazin-1-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida;  
 20 4-(ciclopropilamino)-2-(4-(4-(N-metilacetamido)piperidin-1-il)fenilamino)pirimidin-5-carboxamida; y  
 2-(4-(4-(aminometil)piperidin-1-il)fenilamino)-4-(ciclopropilamino)pirimidin-5-carboxamida.

10. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia.

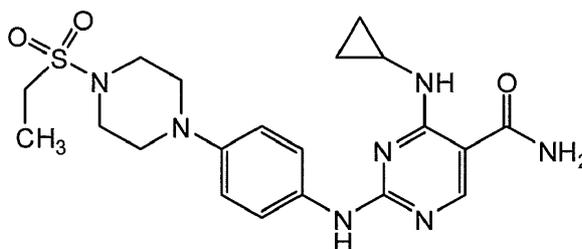
25 11. Una composición que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en combinación con un transportador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

30 12. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección seleccionada del grupo que consiste en enfermedad cardiovascular, enfermedad inflamatoria, enfermedad autoinmunitaria y trastorno proliferativo celular.

35 13. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en el tratamiento de:  
 una enfermedad cardiovascular seleccionada del grupo que consiste en reestenosis, trombosis, púrpura trombocitopénica inmunitaria, trombocitopenia inducida por heparina, cardiomiopatía dilatada, enfermedad de células falciformes, aterosclerosis, infarto de miocardio, inflamación vascular, angina inestable y síndromes coronarios agudos;  
 una enfermedad inflamatoria que se selecciona del grupo que consiste en alergia, asma, artritis reumatoide,  
 40 enfermedades mediadas por linfocitos B tales como Linfoma no Hodgkin, síndrome antifosfolípido, lupus, psoriasis, esclerosis múltiple, nefropatía terminal y enfermedad de Crohn;  
 una enfermedad autoinmunitaria seleccionada del grupo que consiste en anemia hemolítica, púrpura trombocitopénica inmunitaria, esclerosis múltiple, psoriasis y síndrome de Sjogren; o  
 un trastorno proliferativo celular seleccionado del grupo que consiste en leucemia, un linfoma, trastornos mieloproliferativos, cánceres hematológicos y mielofibrosis idiopática crónica.

14. Un kit que comprende una composición de la reivindicación 11, envasado e instrucciones para su uso.

50 15. Un Compuesto de la reivindicación 1, que tiene la estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

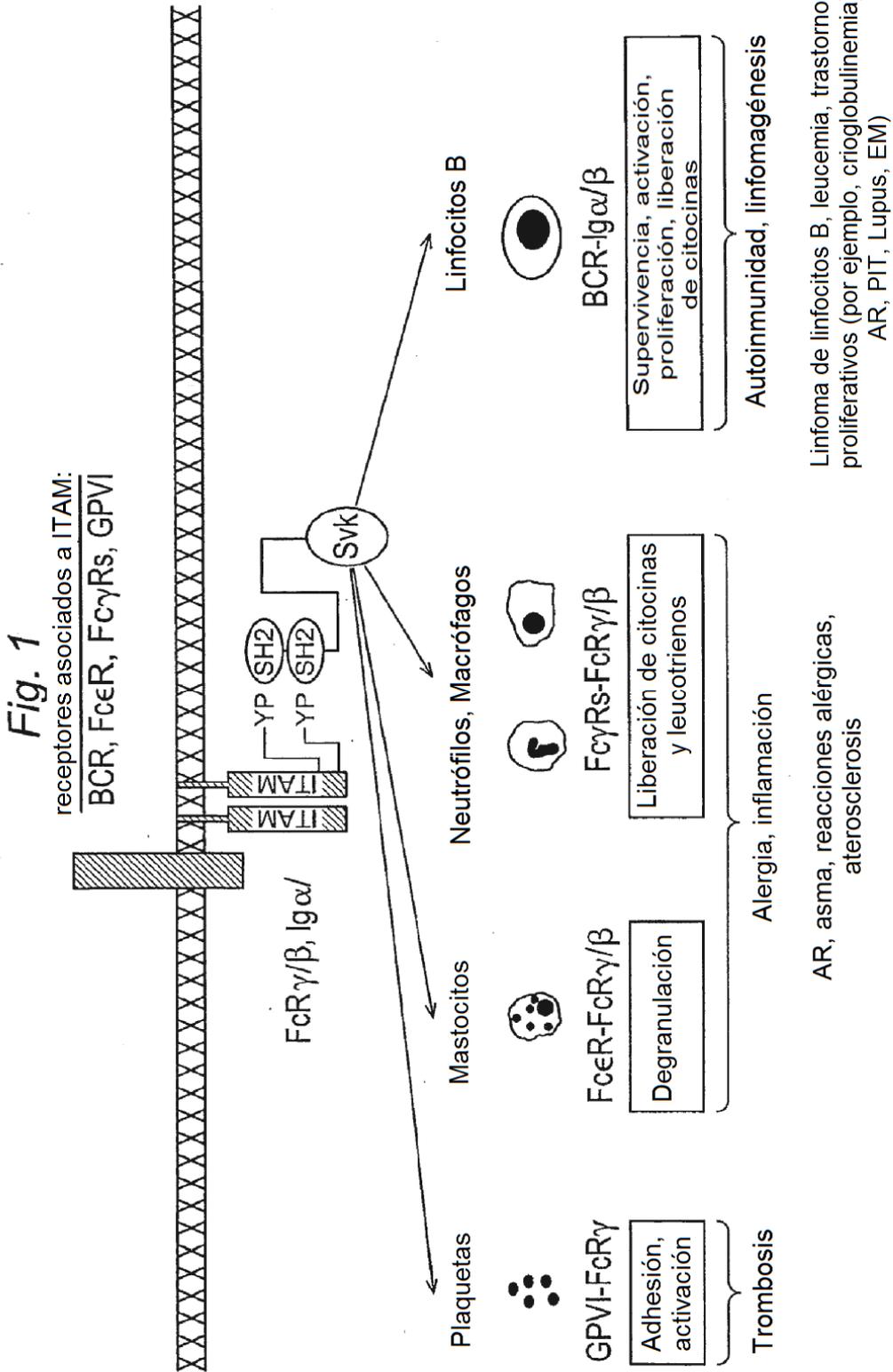


Fig. 2 (Hoja 1)

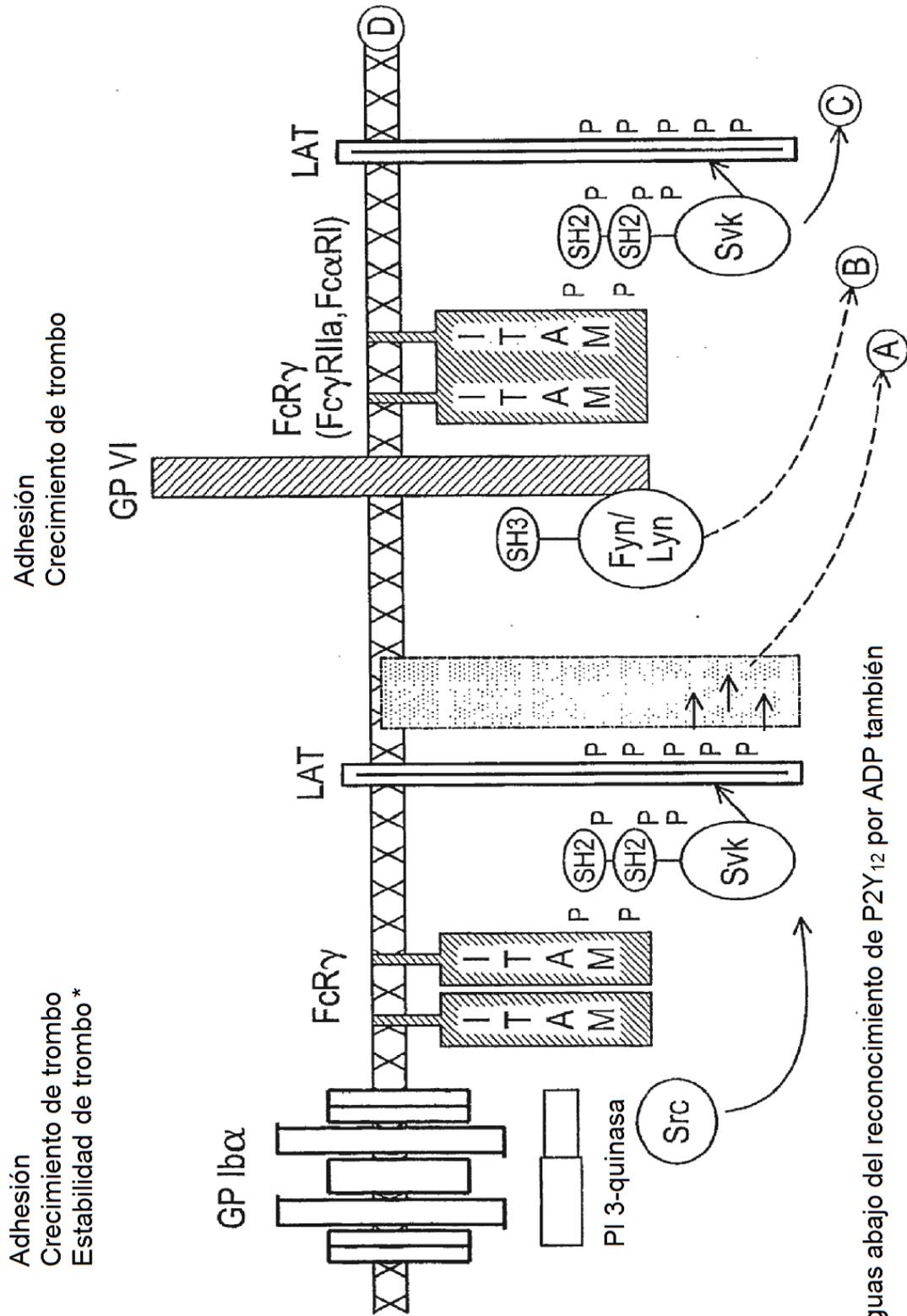
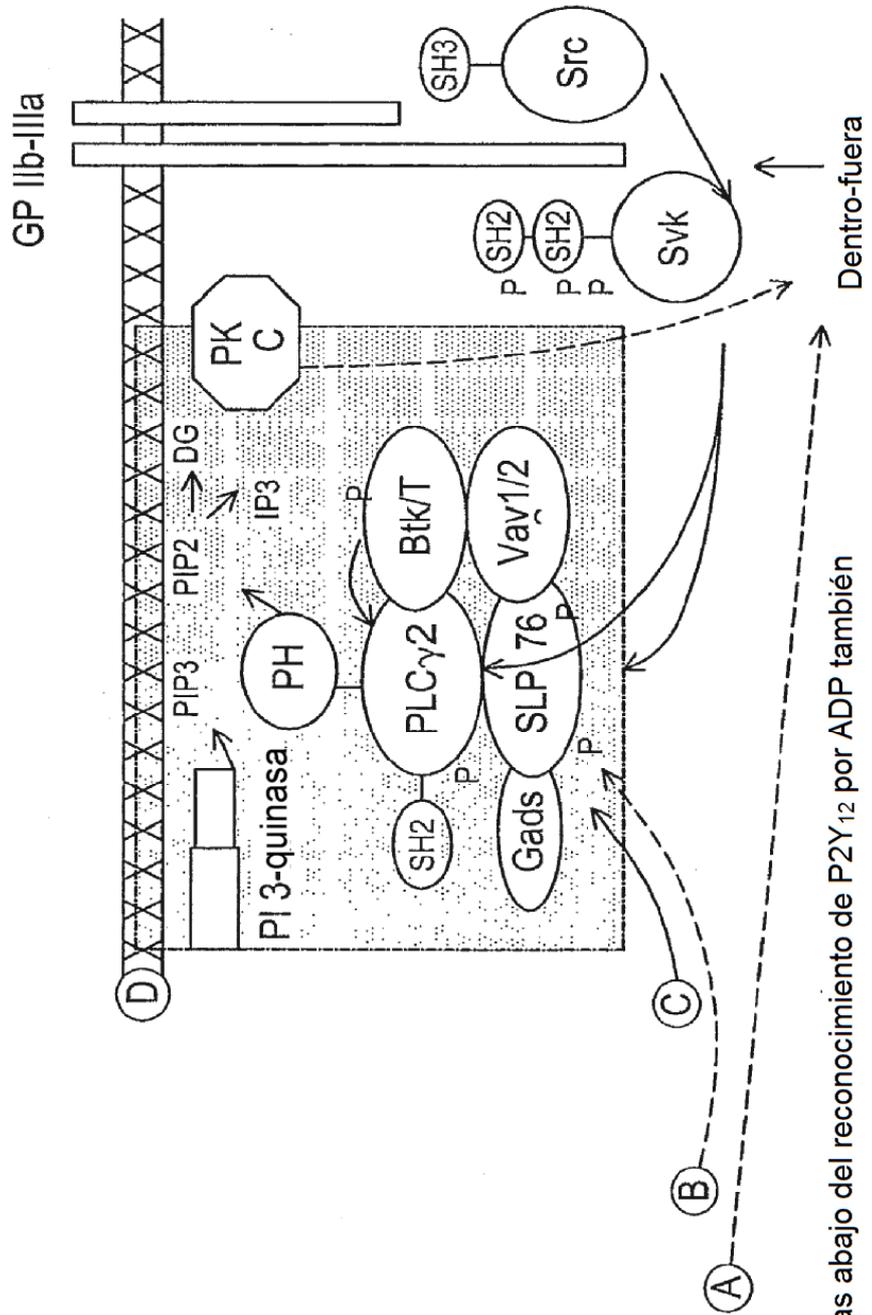


Fig. 2 (Hoja 2)

Adhesión  
Crecimiento de trombo  
Estabilidad de trombo\*



\* Syk aguas abajo del reconocimiento de P2Y<sub>12</sub> por ADP también

Fig. 3

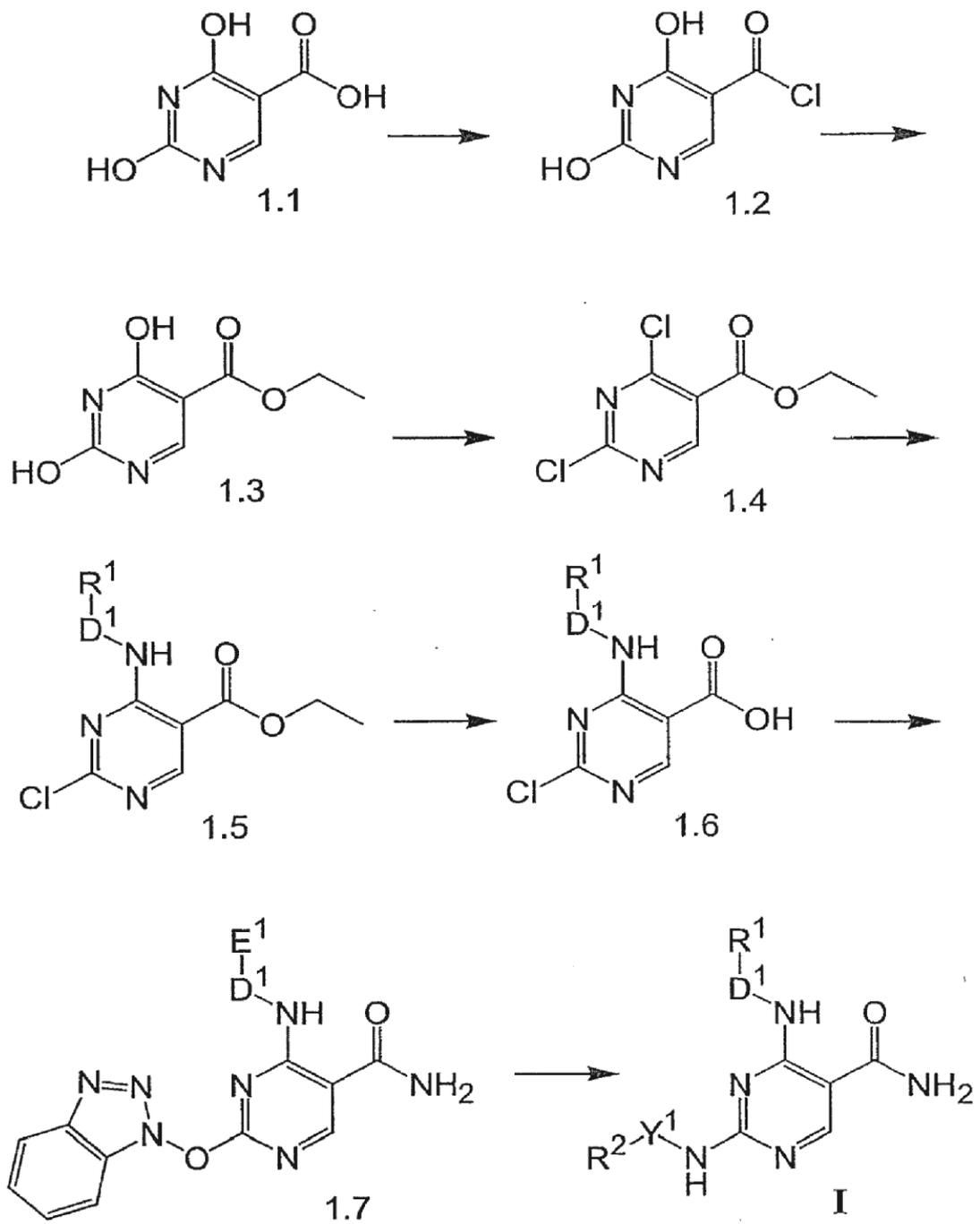


Fig. 5 (Hoja 1)

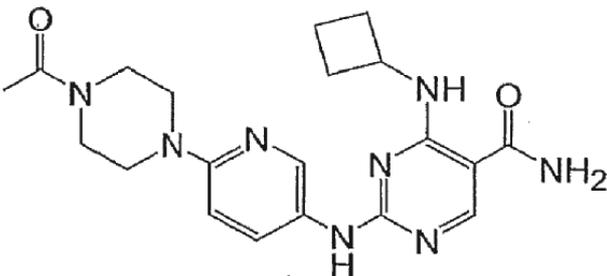
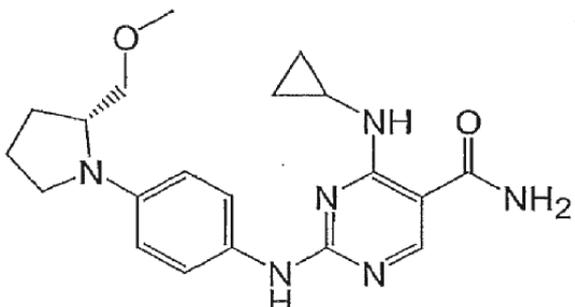
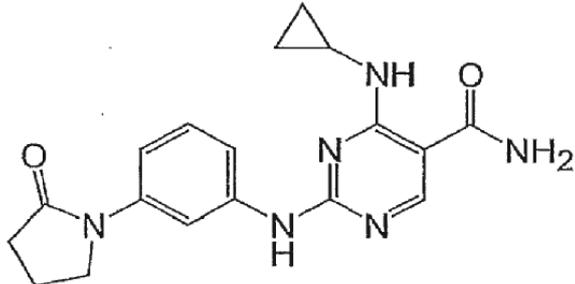
Ejemplo n.º	Estructura	PM	MH+	Código de C150 de Syk
482		410,48	411	++
490		382,47	383,3	+++
501		352,4	MS: 353,5 (M+H)	++

Fig. 5 (Hoja 2)

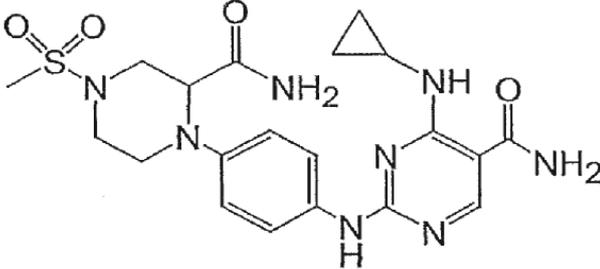
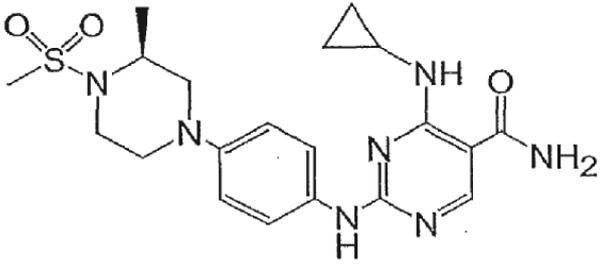
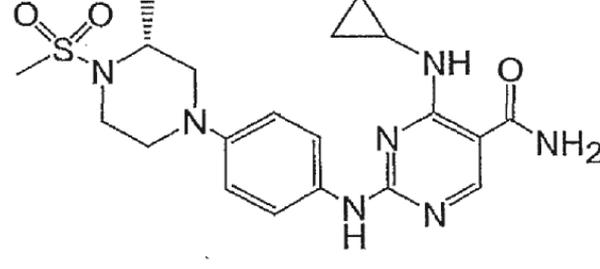
Ejemplo n.º	Estructura	PM	MH+	Código de CI50 de Syk
511		474,54	475,3	+++
514		445,55	446,3	+++
515		445,55	446,3	+++

Fig. 5 (Hoja 3)

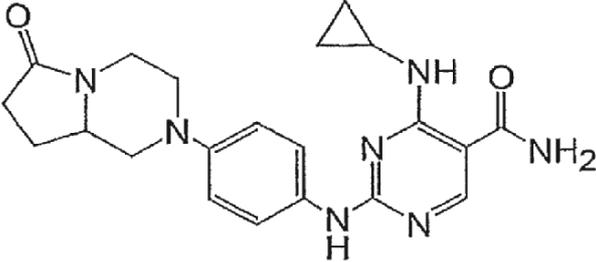
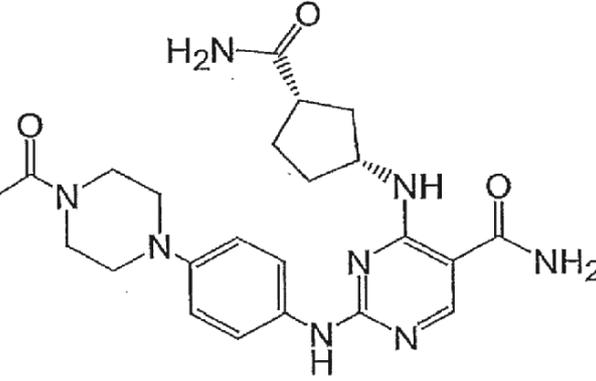
Ejemplo n.º	Estructura	PM	MH+	Código de CI50 de Syk
518		407,48	MS+ 408	+++
519		466,55	467,4	+++

Fig. 5 (Hoja 4)

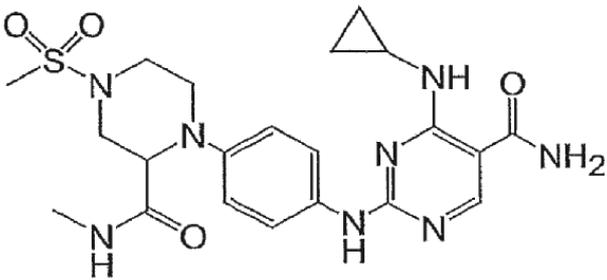
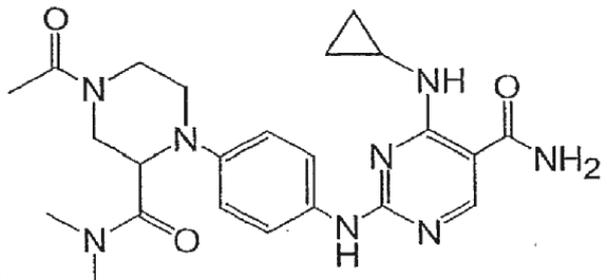
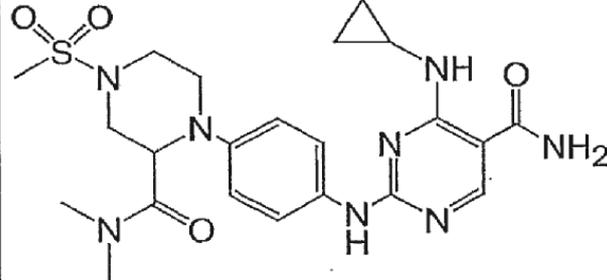
Ejemplo n.º	Estructura	PM	MH+	Código de CI50 de Syk
522		488,57	489,3	++
523		466,55	467,2	++
524		502,6	503,3	++

Fig. 5 (Hoja 5)

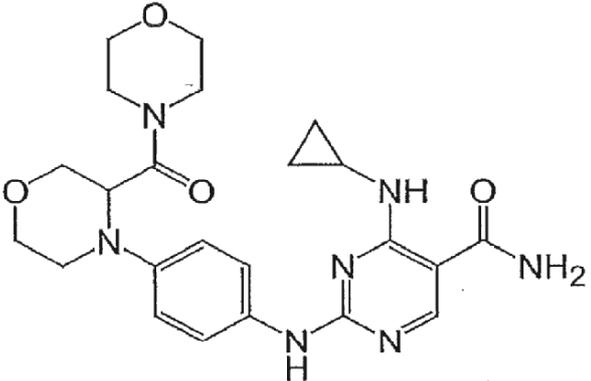
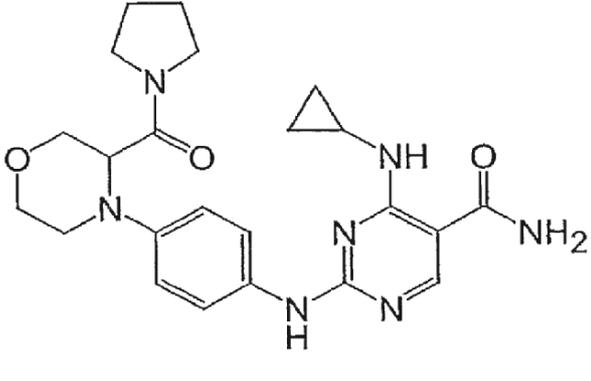
Ejemplo n.º	Estructura	PM	MH+	Código de CI50 de Syk
531	 <p>The structure of compound 531 consists of a central pyrimidine ring. At the 2-position of the pyrimidine, there is a cyclopropylamino group (-NH-cyclopropyl). At the 4-position, there is an amide group (-C(=O)NH<sub>2</sub>). At the 6-position, there is a 4-(morpholin-4-yl)phenylamino group (-NH-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-N(morpholine)). The morpholine ring is attached to the nitrogen atom of the phenyl ring.</p>	467,53	468,3	++
530	 <p>The structure of compound 530 is identical to compound 531, but the morpholine ring is replaced by a pyrrolidine ring. The rest of the molecule, including the pyrimidine core, the cyclopropylamino group, and the amide group, remains the same.</p>	451,53	452,4	++

Fig. 5 (Hoja 6)

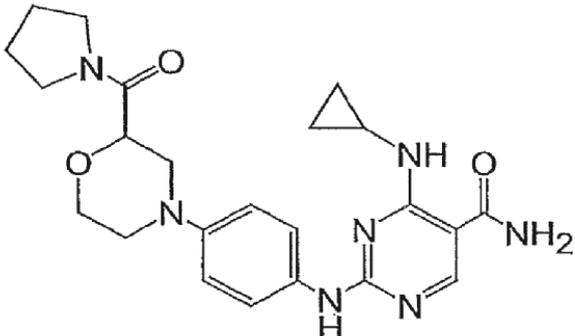
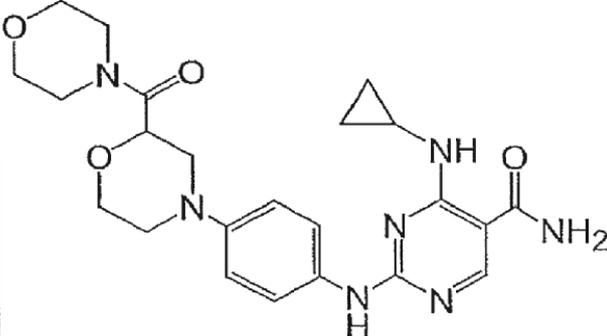
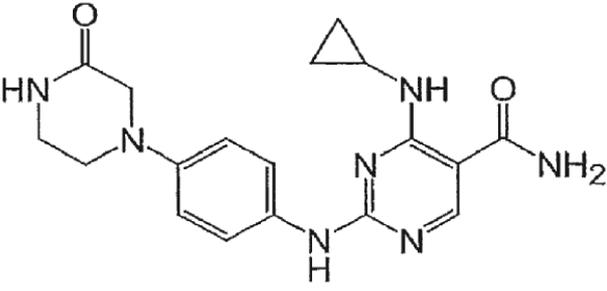
Ejemplo n.º	Estructura	PM	MH+	Código de CI50 de Syk
537		451,53	452,3 452,5	+++
538		467,53	468,4	+++
539		367,41	368,2	++

Fig. 5 (Hoja 7)

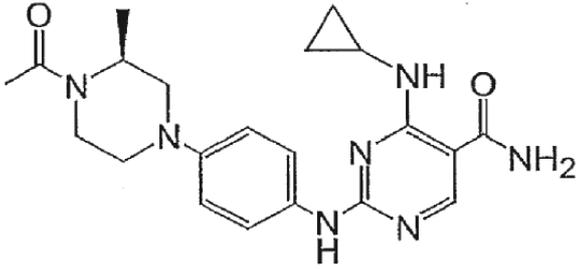
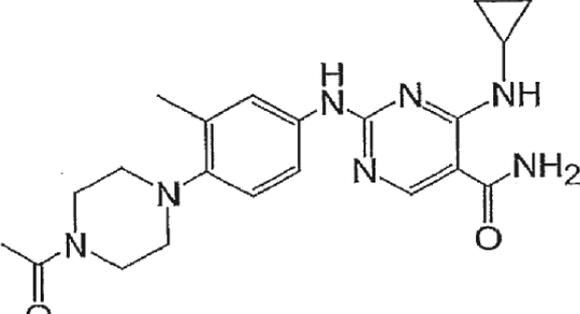
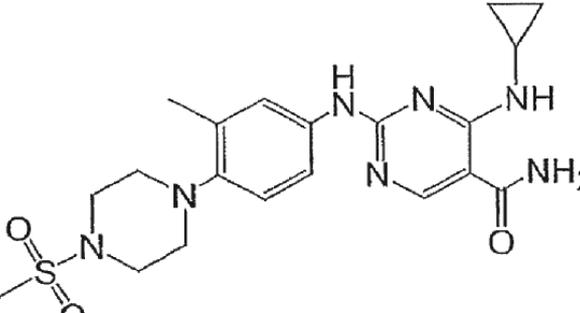
Ejemplo n.º	Estructura	PM	MH+	Código de CI50 de Syk
540		409,49	410,4	+++
543		409,49	ES(+) MS [M+1]= 410	+++
544		445,55	ES(+) MS [M+1]= 446	+++

Fig. 5 (Hoja 8)

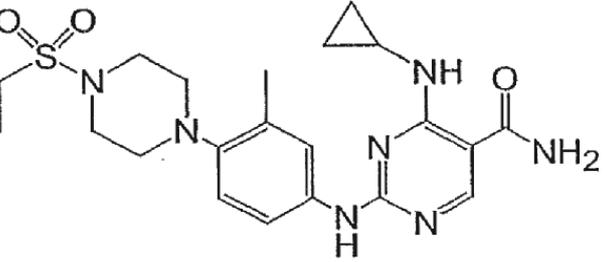
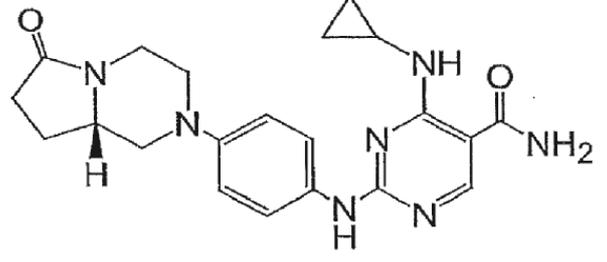
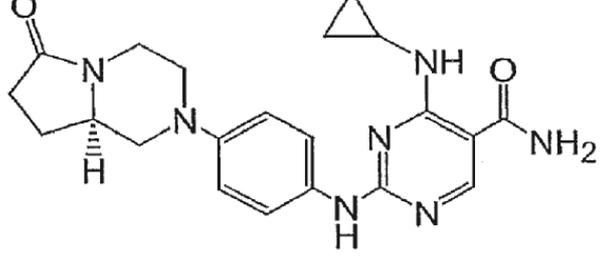
Ejemplo n.º	Estructura	PM	MH+	Código de CI50 de Syk
561		459,57	460,3	+++
567		407,48	408 MS+ 408	+++
569		407,48	MS+ 408	+++

Fig. 5 (Hoja 9)

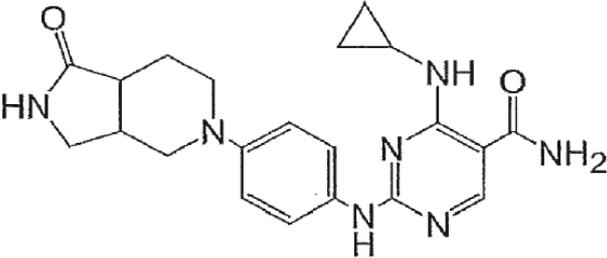
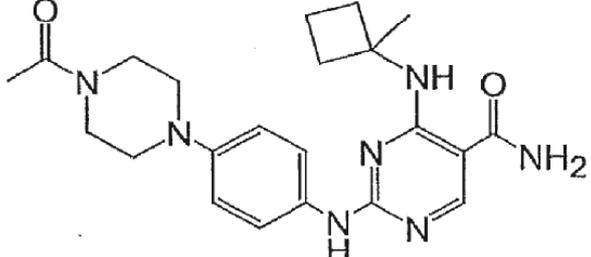
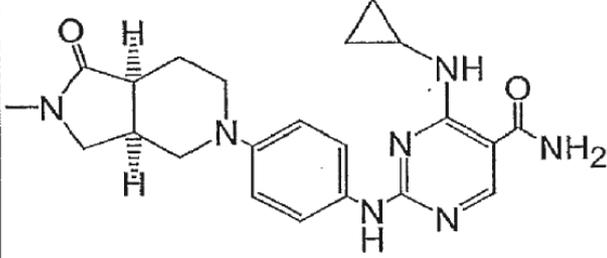
Ejemplo n.º	Estructura	PM	MH+	Código de CI50 de Syk
571		407,48	MS+ 408	++
572		423,52	424,3	++
573		421,51	MS+ 422	+

Fig. 5 (Hoja 10)

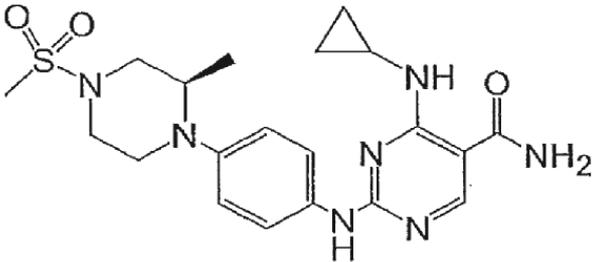
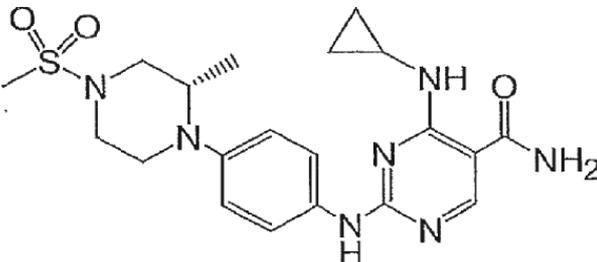
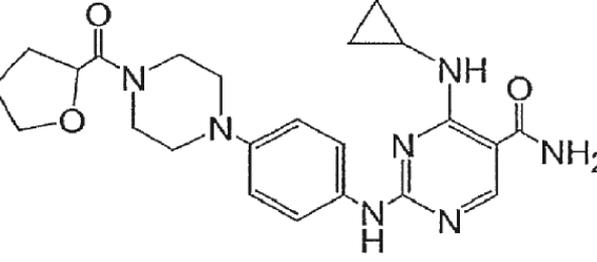
Ejemplo n.º	Estructura	PM	MH+	Código de CI50 de Syk
595		445,55	446,4	++
598		445,55	446,4	+++
604		451,53	452,4	+++

Fig. 5 (Hoja 11)

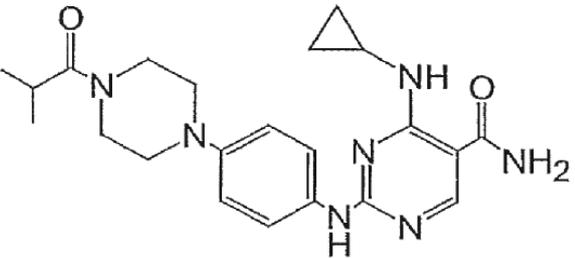
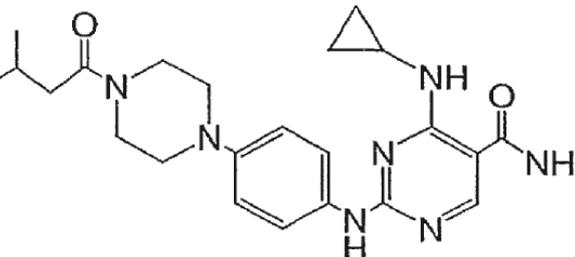
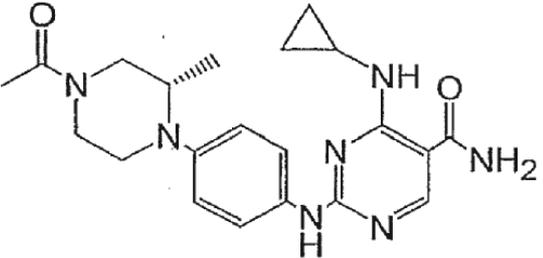
Ejemplo n.º	Estructura	PM	MH+	Código de C150 de Syk
607		423,52	424	++
608		437,55	438	++
611		409,49	410,4	+++

Fig. 5 (Hoja 12)

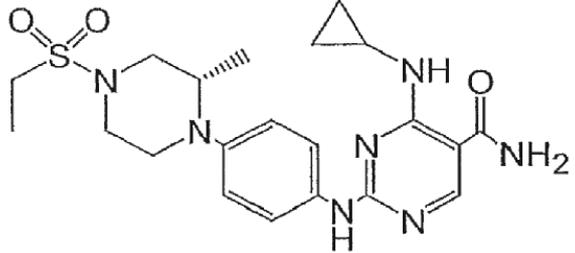
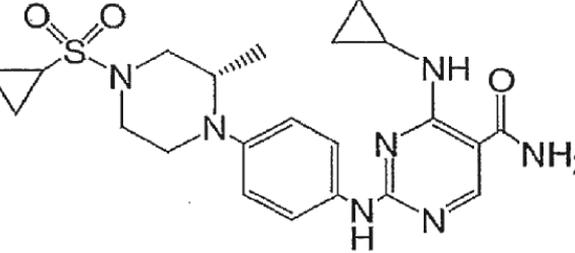
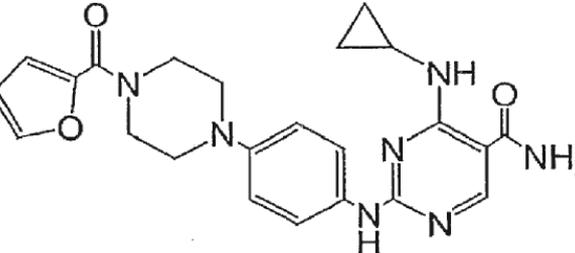
Ejemplo n.º	Estructura	PM	MH+	Código de C150 de Syk
613		459,57	460,4	+++
614		471,58	472,4	+++
617		447,5	448,3	++

Fig. 5 (Hoja 13)

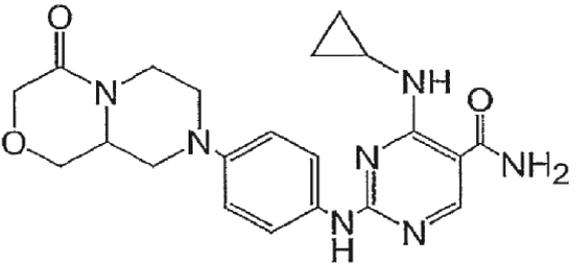
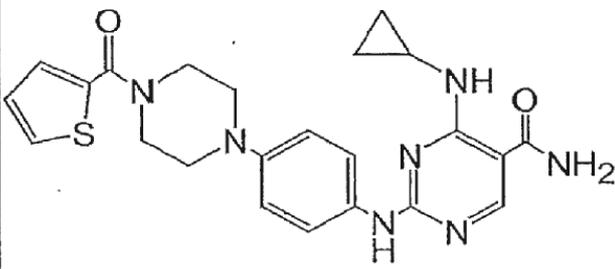
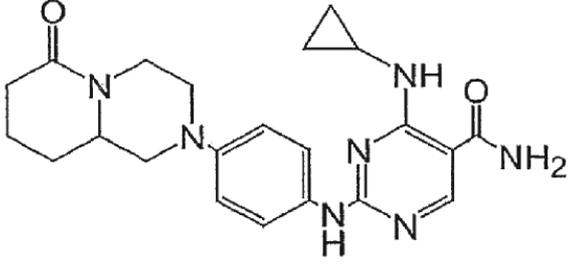
Ejemplo n.º	Estructura	PM	MH+	Código de CI50 de Syk
618		423,48	424	+++
619		463,56	464	++
620		421,51	422,5	+++

Fig. 5 (Hoja 14)

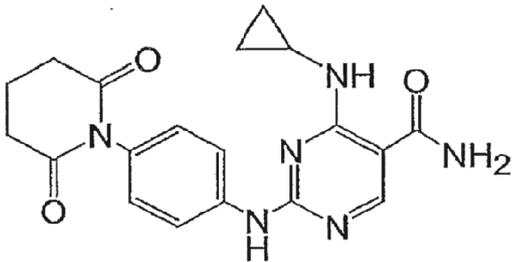
	Estructura	PM	MH+	Código de CI50 de Syk
621	 <p>The chemical structure of compound 621 consists of a central pyrimidine ring. At the 2-position of the pyrimidine, there is a cyclopropylamino group (-NH-CH2-CH2-CH2). At the 4-position, there is a primary amide group (-NH2). At the 6-position, there is a 4-oxo-1,2,3,6-tetrahydropyridin-1-yl group, which is a six-membered ring containing a nitrogen atom and two carbonyl groups. The pyrimidine ring is also substituted at the 5-position with a hydrogen atom.</p>	380,41	381	++

Fig. 8 (Hoja 1)

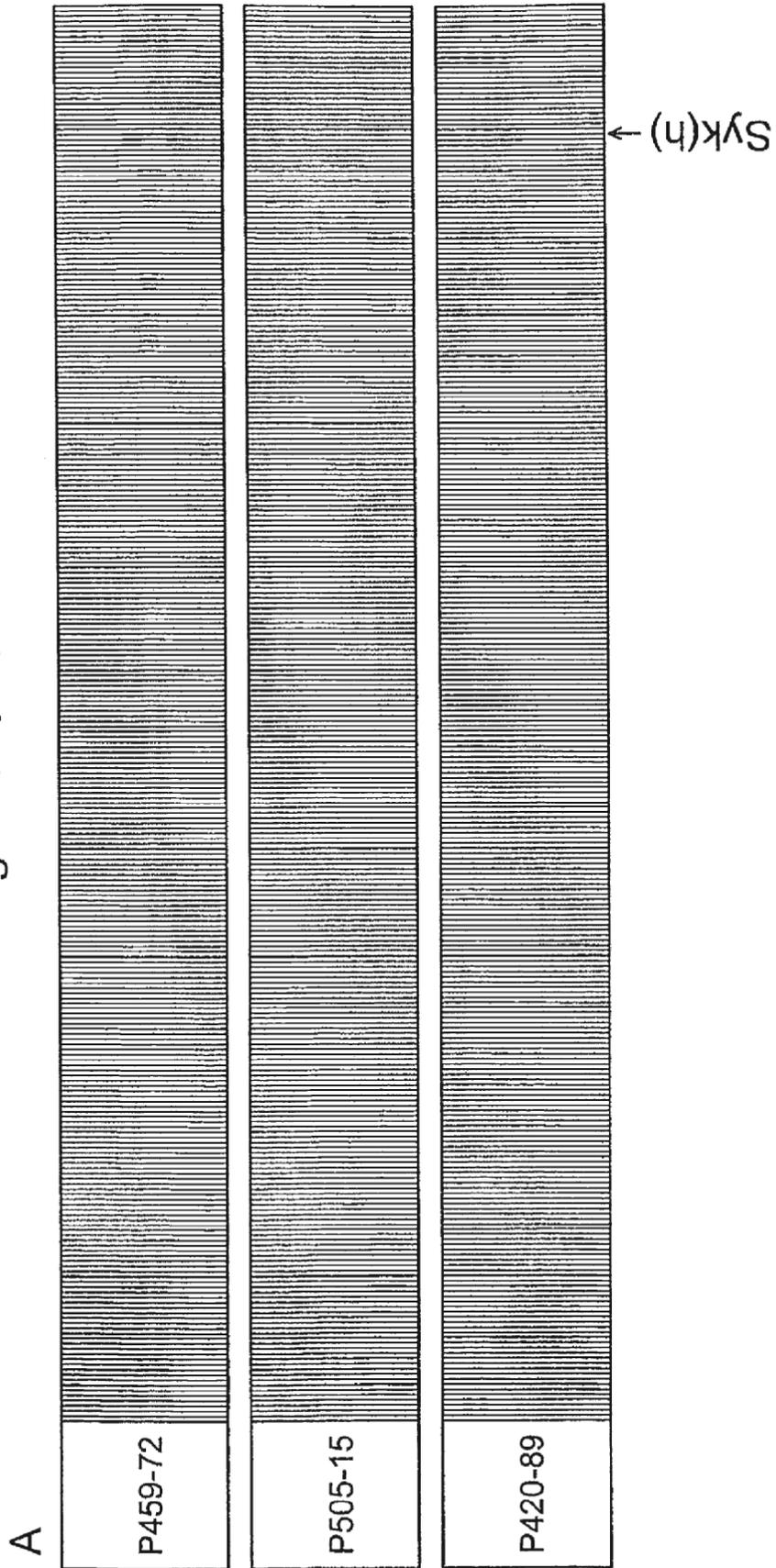


Fig. 8 (Hoja 2)

<p><b>B</b></p> <p>A AMPK(r)</p> <p>B ARK5(h)</p> <p>C CHK1(h)</p> <p>D cKit(D816H)(h)</p> <p>E cKit(V560G)(h)</p> <p>F cKit(V654A)(h)</p> <p>G FGFR1(V561M)(h)</p> <p>H Flt3(D835Y)(h)</p> <p>I Flt3(h)</p> <p>J Flt4(h)</p> <p>K Fms(h)</p> <p>L GCK(h)</p>	<p>M Itk(h)</p> <p>N IAK2(h)</p> <p>O IAK3(h)</p> <p>P INK3(h)</p> <p>Q MARK1(h)</p> <p>R MELK(h)</p> <p>S MLK1(h)</p> <p>T MST1(h)</p> <p>U MST2(h)</p> <p>V PAKS</p> <p>W PAR</p>	<p>X PGDF</p> <p>Y PDGFRa(V561D)(h)</p> <p>Z Ret(h)</p> <p>AA Ret(V804L)(h)</p> <p>AB Ret(V804M)(h)</p> <p>AC Rsk2(h)</p> <p>AD Rsk4(h)</p> <p>AE Src(T341M)(h)</p> <p>AF Syk(h)</p> <p>AG TBK1(h)</p> <p>AH TSSK1(h)</p>
---	---	---

①	P459-72	0	17	4	28	11	39	0	46	56	2	5	44	0	0	2	0	0	86	6	2	51	0	4	14	20	4	28	0	0	13	87	0	26			
		②	P505-15	14	0	11	45	25	46	9	66	62	12	16	22	0	12	4	3	8	5	39	2	10	61	5	36	16	28	12	34	33	0	34	98	4	18
				③	P420-89	91	97	83	95	95	97	98	97	83	93	91	81	89	98	93	85	92	98	95	96	79	90	88	94	93	95	98	83	85	93	88	94

① CI50 de Syk del ej. 596 = 43 nM % de inhib. a 300 nM

② CI50 de Syk del ej. 587 = 46 nM % de inhib. a 50 nM

③ CI50 de Syk de P-420-89 = 31 nM % de inhib. a 300 nM

Fig. 8 (Hoja 3)

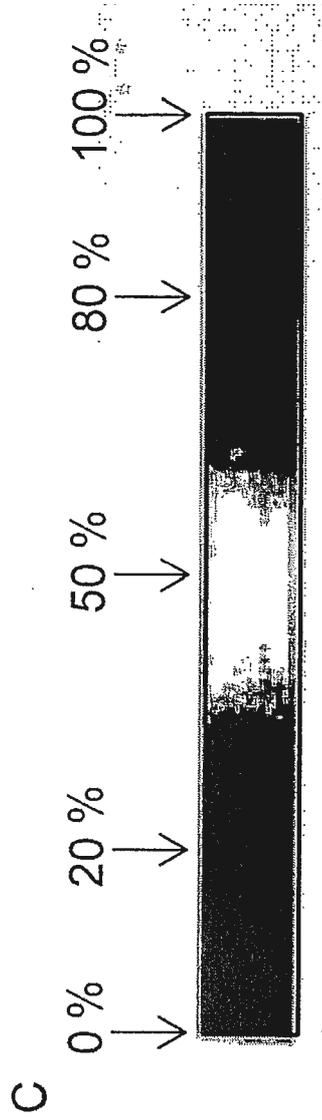


Fig. 9 (Hoja 1)

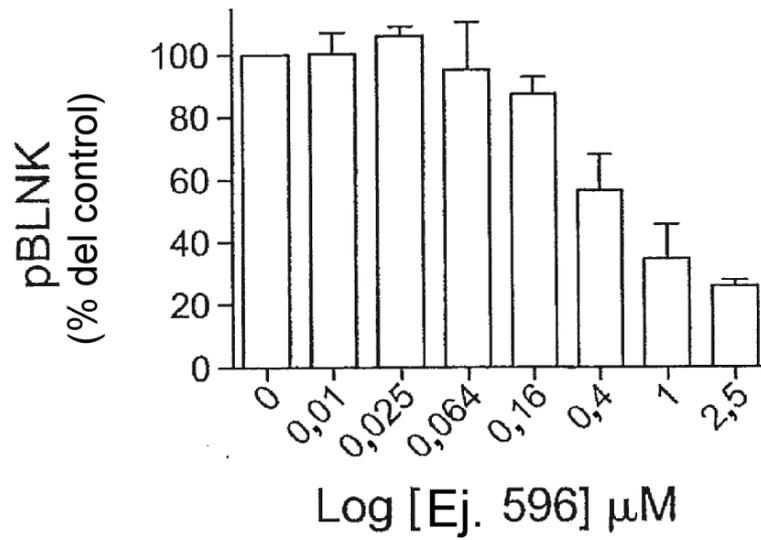
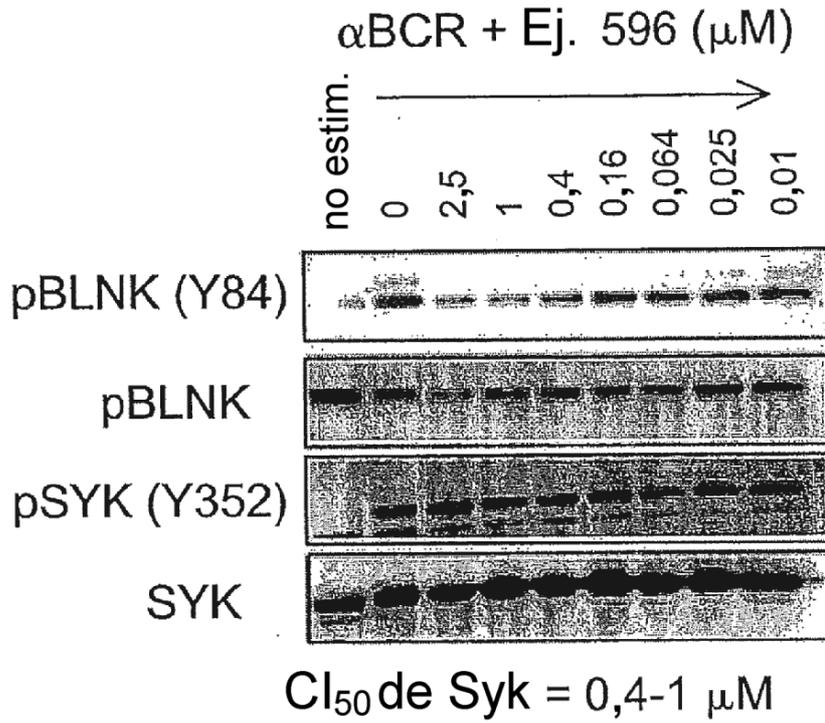
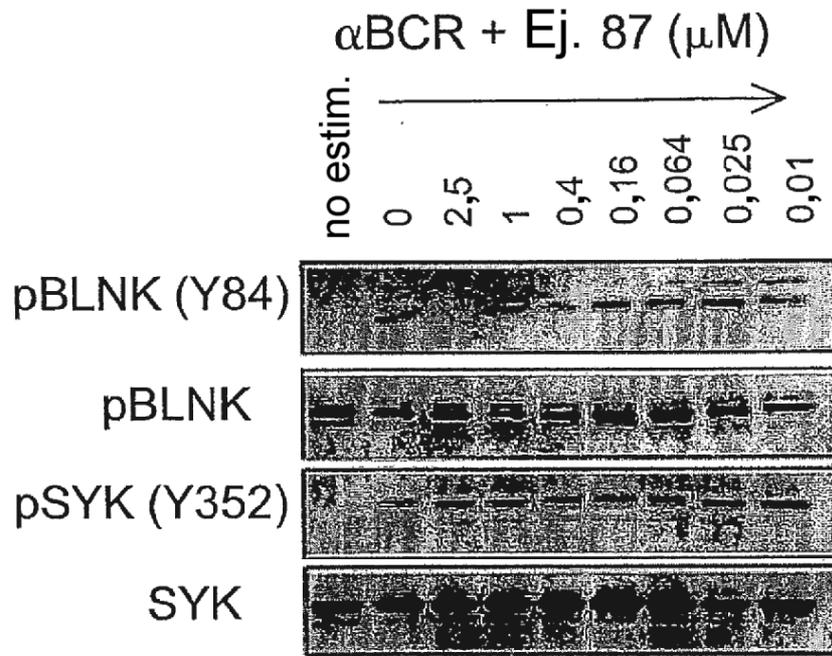
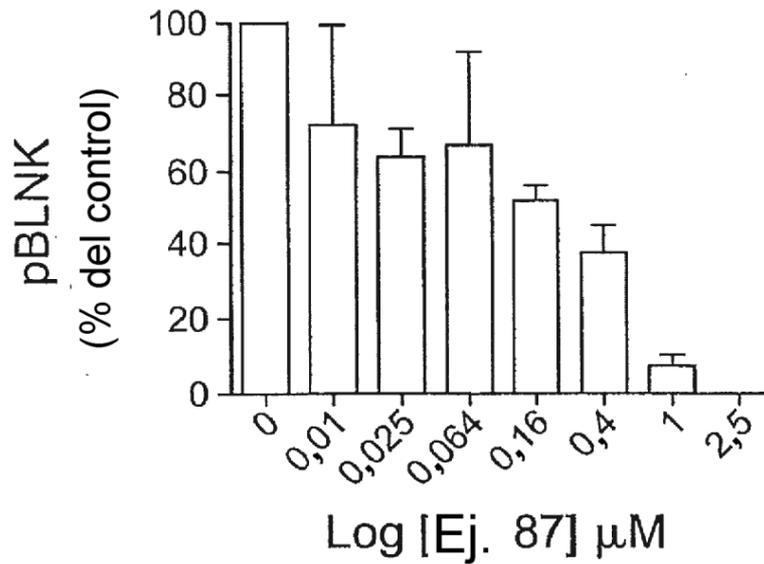


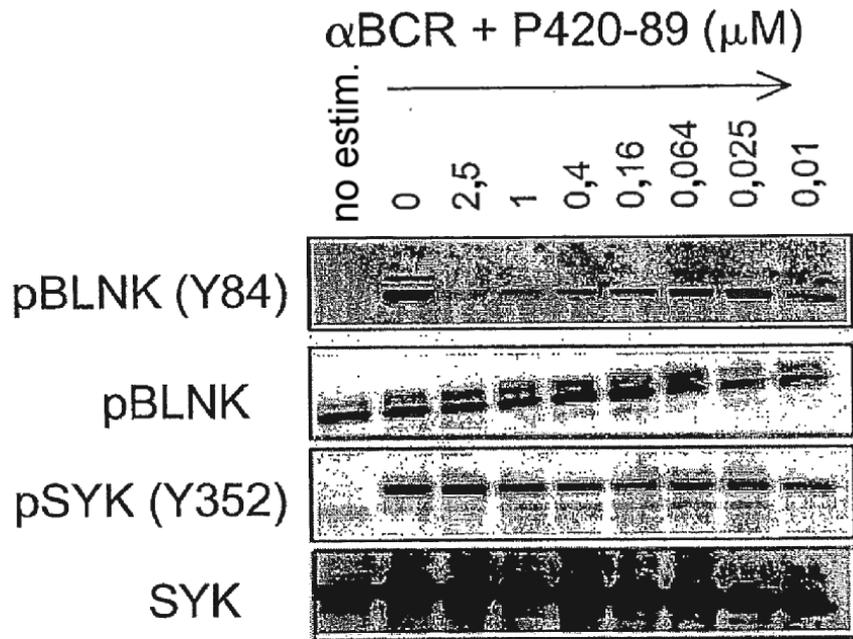
Fig. 9 (Hoja 2)



$CI_{50}$  de Syk = 0,16-0,4  $\mu$ M



**Fig. 9 (Hoja 3)**



$Cl_{50}$  de Syk = 0,16-0,4  $\mu$ M

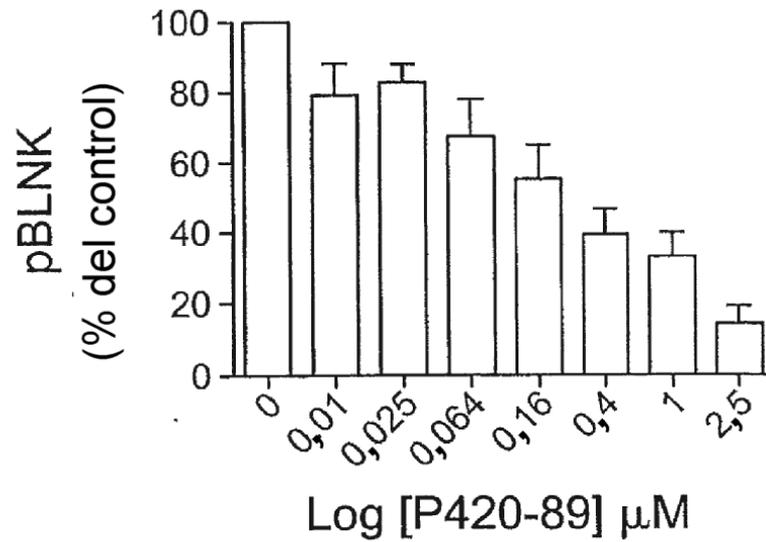


Fig 10 (Hoja 1)

Señalización de BCR

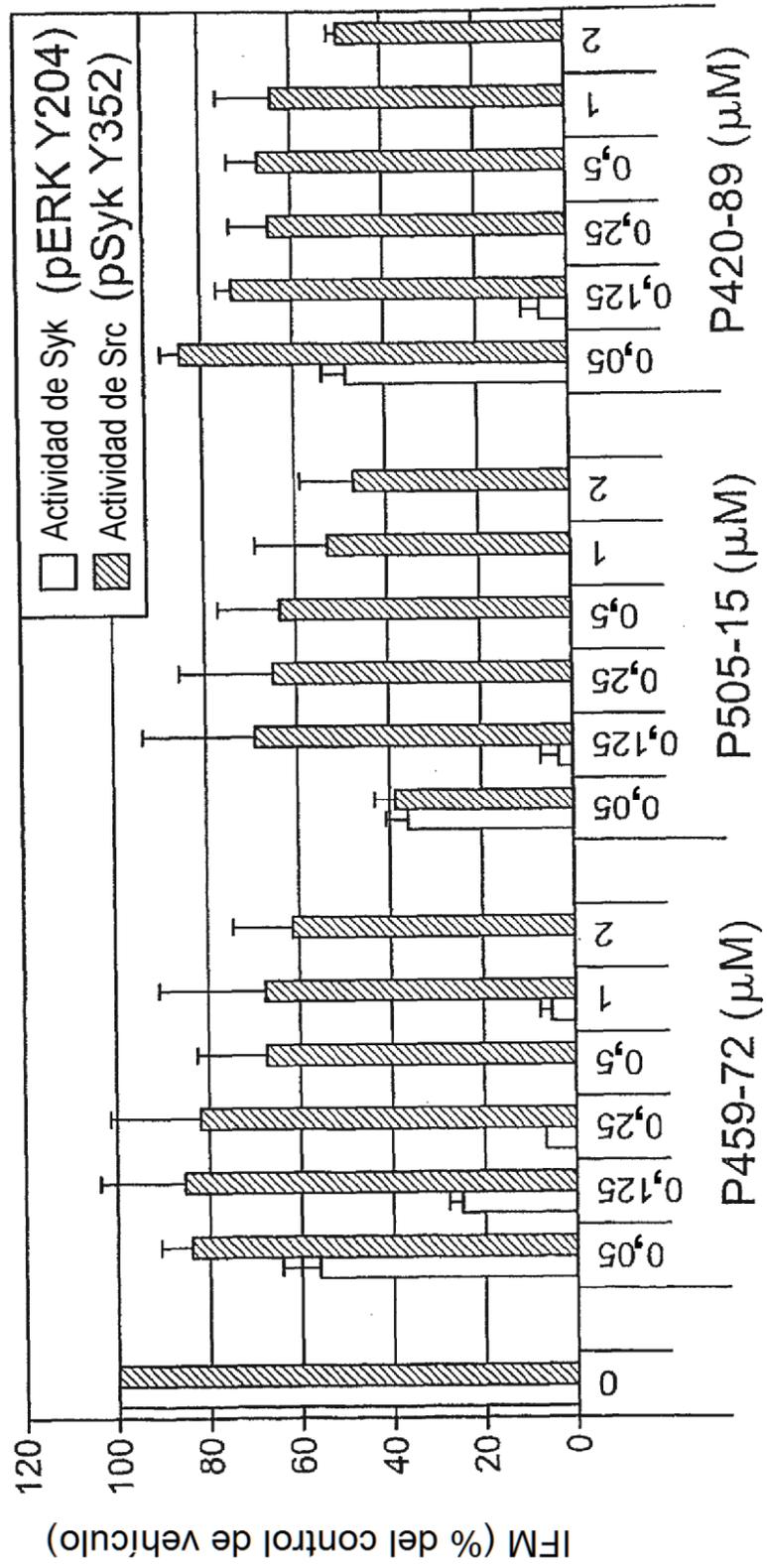
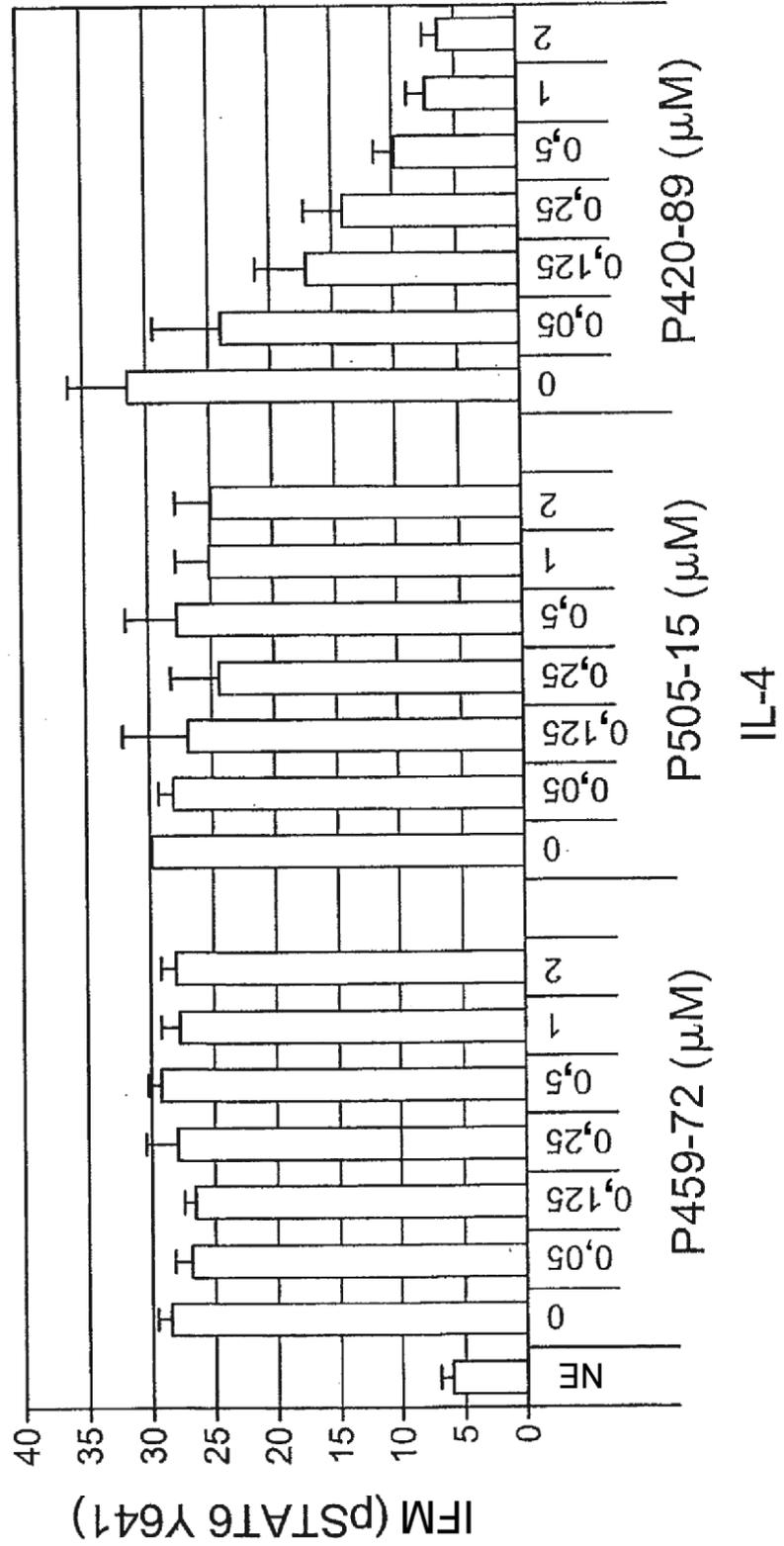


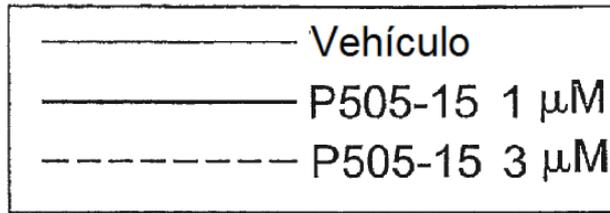
Fig 10 (Hoja 2)

Señalización de IL-4

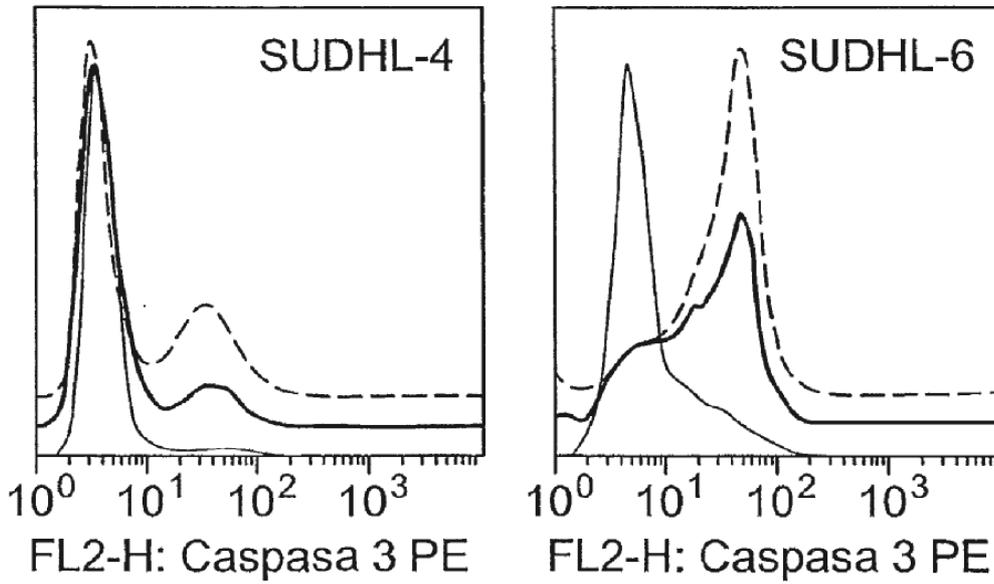


*Fig. 11 (Hoja 1)*

A



Líneas celulares de LNH de tipo BCR



Líneas celulares de LNH de tipo no BCR

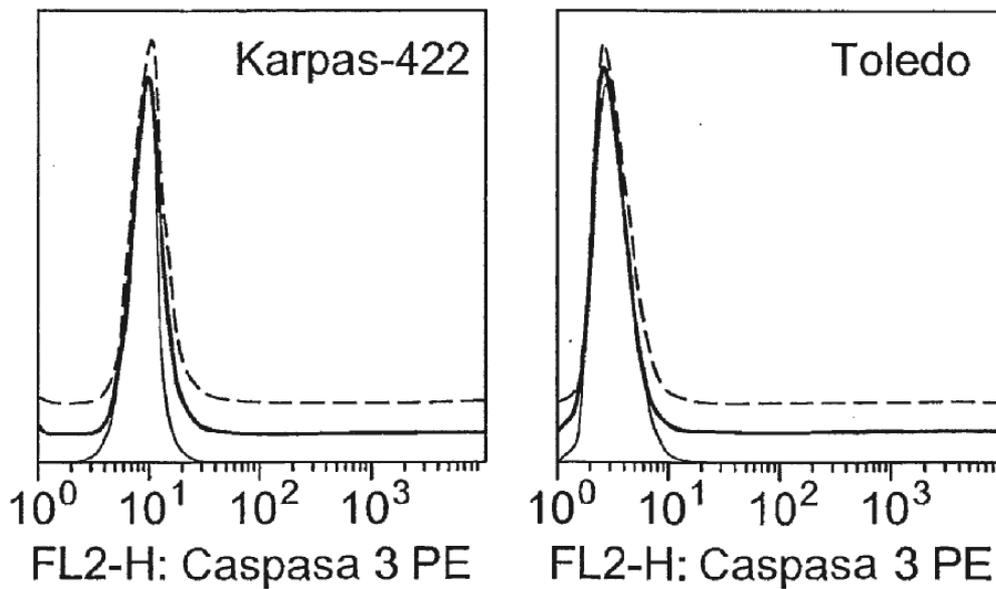
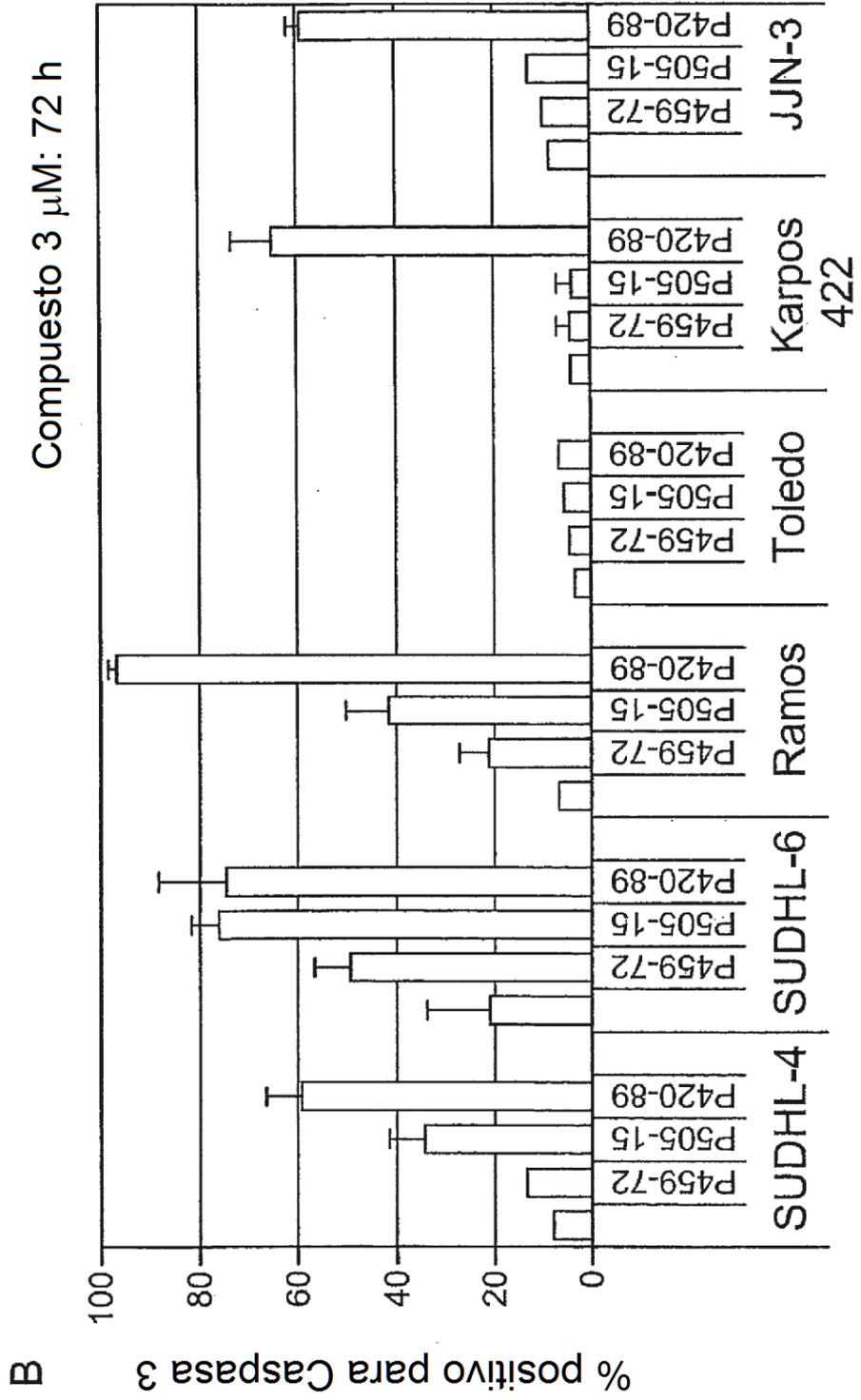


Fig 11 (Hoja 2)



*Fig. 11 (Hoja 3)*

C

Compuesto	CI50 ( $\mu\text{M}$ ) media $\pm$ DT		
	SUDHL-4	SUDHL-6	Toledo
Ejemplo 596(Syk)	5,4 $\pm$ 1,8	2,6 $\pm$ 1,4	38 $\pm$ 19
Ejemplo 87(Syk)	1,8 $\pm$ 0,7	1,1 $\pm$ 0,4	9,3 $\pm$ 4,0
Ejemplo x (Syk/JAK)	1,8 $\pm$ 0,6	0,9 $\pm$ 0,3	9,3 $\pm$ 5,4