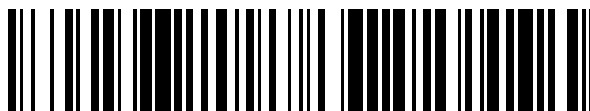


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 635**

51 Int. Cl.:

C07D 417/14 (2006.01)

A61K 31/445 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2013** **PCT/EP2013/075887**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2014** **WO14090715**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2013** **E 13805327 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016** **EP 2931721**

54 Título: **Derivados tiazol como inhibidores de tirosina quinasa de Bruton**

30 Prioridad:

13.12.2012 US 201261736631 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.04.2017

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

HUBY, NICHOLAS JOHN SILVESTER;
LOPEZ-TAPIA, FRANCISCO JAVIER y
SO, SUNG-SAU

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 607 635 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Derivados tiazol como inhibidores de tirosina quinasa de Bruton

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la utilización de nuevos compuestos que inhiben la Btk y que resultan útiles para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias causadas por la activación aberrante de las células B.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las proteína quinasas constituyen una de las familias más grandes de enzimas humanos y regulan muchos procesos de señalización diferentes mediante la adición de grupos fosfato a proteínas (T. Hunter, Cell 50:823-829, 1987). Específicamente, las tirosina quinasas fosforilan proteínas en la fracción fenólica de los residuos tirosina. La familia de tirosina quinasa incluye elementos que controlan el crecimiento, migración y diferenciación celulares. Se ha implicado la actividad anormal de quinasa en una diversidad de enfermedades humanas, incluyendo cánceres, y enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias. Debido a que las proteína quinasas son reguladores clave de la señalización celular, proporcionan una diana para modular la función celular con inhibidores moleculares pequeños de quinasa y, de esta manera, constituyen buenas dianas de fármacos de diseño. Además del tratamiento de procesos de enfermedad mediados por quinasa, los inhibidores selectivos y eficaces de la actividad de quinasa también resultan útiles para la investigación de los procesos de señalización celular y para la identificación de otras dianas celulares de interés terapéutico.

Existe buena evidencia de que las células B desempeñan un papel clave en la patogénesis de las enfermedades autoinmunitarias y/o inflamatorias. Los terapéuticos basados en proteínas que reducen el número de células B, tales como el Rituxan, resultan eficaces contra enfermedades inflamatorias reguladas por autoanticuerpos, tales como la artritis reumatoide (Rastetter et al., Annu. Rev. Med. 55:477, 2004). Por lo tanto, los inhibidores de la proteína quinasas que desempeñan una función en la activación de las células B seguramente resultarán ser terapéuticos útiles para las patologías mediadas por las células B, tales como la producción de autoanticuerpos.

La señalización a través del receptor de células B (RCB) controla un abanico de respuestas de las células B, entre ellas la proliferación y diferenciación en células productoras de anticuerpos maduras. El RCB es un punto regulador clave para la actividad de las células B y la señalización aberrante puede provocar la proliferación de células B desregulada y la formación de autoanticuerpos patogénicos que conducen a múltiples enfermedades autoinmunitarias y/o inflamatorias. La tirosina quinasa de Bruton (Btk) es una quinasa no asociada a RCB situada próxima a la membrana e inmediatamente después del RCB. Se ha demostrado que la falta de Btk bloquea la señalización del RCB y, por lo tanto, la inhibición de la Btk podría ser un enfoque terapéutico útil para bloquear los procesos de enfermedad mediados por células B.

La Btk es un miembro de la familia Tec de tirosina quinasas y se ha demostrado que es un regulador crucial del desarrollo temprano de las células B y de la activación y supervivencia de las células B maduras (Khan et al., Immunity 3:283, 1995; Ellmeier et al., J. Exp. Med. 192:1611, 2000). La mutación de Btk en el ser humano conduce a la condición de la agammaglobulinemia ligada al X (ALX) (revisada en Rosen et al., New Eng. J. Med. 333:431, 1995, y Lindvall et al., Immunol. Rev. 203:200, 2005). Estos pacientes se encuentran inmunocomprometidos y muestran una maduración alterada de las células B, niveles reducidos de inmunoglobulinas y células B periféricas, respuestas inmunológicas independientes de las células T disminuidas, así como una movilización atenuada del calcio tras la estimulación de RCB.

También se ha obtenido evidencia del papel de la Btk en las enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias en modelos de ratón deficiente en Btk. En modelos murinos preclínicos de lupus eritematoso sistémico (LES), los ratones deficientes en Btk muestran un alivio marcado de la progresión de la enfermedad. Además, los ratones deficientes en Btk son resistentes a la artritis inducida por colágeno (Jansson y Holmdahl, Clin. Exp. Immunol. 94:459, 1993). Se ha demostrado que un inhibidor selectivo de Btk presenta eficacia dependiente de la dosis en un modelo de artritis de ratón (Z. Pan et al., Chem. Med. Chem. 2:58-61, 2007). Med. Chem. 2:58-61, 2007).

Btk también se expresa en otras células aparte de las células B que podrían participar en procesos patológicos. Por ejemplo, la Btk se expresa en mastocitos y los mastocitos derivados de médula ósea deficientes en Btk muestran una desgranulación inducida por antígeno alterada (Iwaki et al., J. Biol. Chem. 280:40261, 2005). Lo anterior demuestra que la Btk podría resultar útil para tratar respuestas patológicas de mastocitos, tales como alergias y asma. También los monocitos de los pacientes de XLA, en los que se encuentra ausente la actividad de Btk, muestran una producción de TNF-alfa reducida tras la estimulación (Horwood et al., J. Exp. Med. 197:1603, 2003). Por lo tanto, la inflamación mediada por TNF-alfa podría estar modulada por inhibidores de Btk de molécula pequeña. Además, se ha informado de que Btk desempeña un papel en la apoptosis (Islam y Smith, Immunol. Rev.

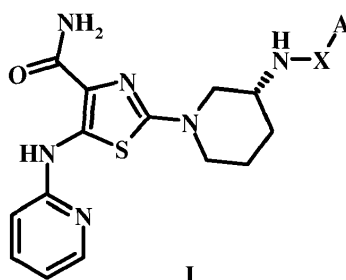
178:49, 2000) y, de esta manera, los inhibidores de Btk podrían resultar útiles en el tratamiento de determinados linfomas de células B y leucemias (Feldhahn et al., J. Exp. Med. 201:1837, 2005).

El documento nº WO 2010/068788 da a conocer amidas heterocíclicas como inhibidores de Btk.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

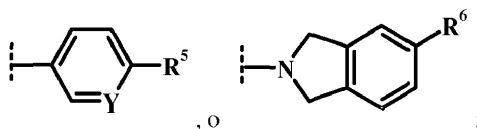
La presente solicitud proporciona compuestos inhibidores de Btk de fórmula I, los compuestos para la utilización en métodos de tratamiento y composiciones de los mismos, tal como se indica posteriormente en la presente memoria.

La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I:

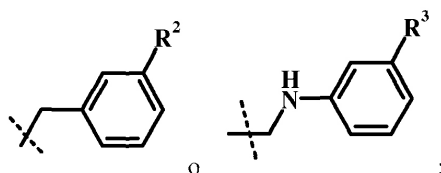


en la que:

A es alquilo inferior, fenilo, CH_2R^1 , OR^4 ,



R^1 es H,



R^2 es H o halo,

R^3 es halo,

R^4 es alquilo inferior,

R^5 es alquilo inferior,

R^6 es H o halo,

X es $\text{C}(=\text{O})$ o $\text{S}(=\text{O})_2$, y

Y es CH o N,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I para la utilización en un método de tratamiento de una condición inflamatoria y/o autoinmunitaria que comprende administrar en el paciente que lo requiera, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de fórmula I.

La solicitud proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula I, mezclado con por lo menos un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

5 El término "un" o "una" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una o más de dicha entidad, por ejemplo un compuesto se refiere a uno o más compuestos o a por lo menos un compuesto. De esta manera, los términos "un" (o "una"), "uno o más" y "por lo menos uno" pueden utilizarse intercambiabilmente en la presente memoria.

10 La expresión "tal como se ha definido anteriormente en la presente memoria" se refiere a la definición más amplia para cada grupo tal como se proporciona en la descripción resumida de la invención o en la reivindicación más amplia. En todas las demás realizaciones proporcionadas posteriormente, los sustituyentes que pueden encontrarse presentes en cada realización y que no se definen explícitamente conservan la definición más amplia proporcionada en la descripción resumida de la invención.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, en una expresión de transición o en el cuerpo de una reivindicación, las expresiones "que comprende(n)" y "comprendiendo" debe interpretarse que presentan un significado abierto.

20 Es decir, los términos deben interpretarse como sinónimos de las expresiones "que presenta por lo menos" o "que incluye por lo menos". En el caso de que se utilice en el contexto de un procedimiento, la expresión "que comprende" se refiere a que el procedimiento incluye por lo menos las etapas indicadas, aunque puede incluir etapas adicionales. En el caso de que se utilice en el contexto de un compuesto o composición, la expresión "que comprende" se refiere a que el compuesto o composición incluye por lo menos los elementos o componentes indicados, aunque puede incluir además elementos o componentes adicionales.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, a menos que se indique específicamente lo contrario, el término "o" se utiliza en el sentido "inclusivo" de "y/o" y no el sentido "exclusivo" de "cualquiera de/o".

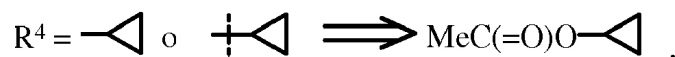
30 El término "independientemente" se utiliza en la presente memoria para indicar que una variable se aplica en un caso cualquiera con independencia de la presencia o ausencia de una variable que presenta la misma definición o una definición diferente dentro del mismo compuesto. De esta manera, en un compuesto en el que R" aparece dos veces y se define como "independientemente carbono o nitrógeno" ambos R" pueden ser carbonos, ambos R" pueden ser nitrógeno o un R" puede ser carbono y el otro, nitrógeno.

35 En el caso de que cualquier variable aparezca más de una vez en cualquier fracción o fórmula que ilustre y describe compuestos utilizados o reivindicados en la presente invención, su definición en cada aparición será independiente de su definición en todas las demás apariciones. Además, las combinaciones de sustituyentes y/o variables son permisibles únicamente en el caso de que dichos compuestos resulten en compuestos estables.

40 Los símbolos "*" al final de un enlace o de "-----" a través de un enlace se refieren, cada uno, al punto de unión de un grupo funcional u otra fracción química al resto de la molécula de la que forma parte. De esta manera, por ejemplo:

45 MeC(=O)OR^4

en la que



50 Un enlace dibujado en un sistema de anillos (no conectado en un vértice determinado) indica que el enlace puede unirse a cualquiera de los átomos anulares adecuados.

55 El término "opcional" u "opcionalmente" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a que el suceso o circunstancia seguidamente indicado puede producirse o no producirse y que la descripción incluye casos en los que el suceso o circunstancia se produce y casos en los que no se produce. Por ejemplo, "opcionalmente sustituido" se refiere a que la fracción opcionalmente sustituida puede incorporar un hidrógeno o un sustituyente.

60 La expresión "enlace opcional" se refiere a que el enlace puede encontrarse presente o no y que la descripción incluye enlaces sencillos, dobles o triples. En el caso de que se designe que un sustituyente sea un "enlace" o esté "ausente", los átomos unidos a los sustituyentes se encuentran conectados directamente.

El término "aproximadamente" se utiliza en la presente memoria para referirse a en la región de, más o menos o en el entorno de. En el caso de que el término "aproximadamente" se utilice conjuntamente con un intervalo numérico, modifica ese intervalo extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos indicados. En general, el término "aproximadamente" se utiliza en la presente memoria para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor indicado en una varianza de 20%.

Determinados compuestos de fórmulas I pueden mostrar tautomerismo. Los compuestos tautoméricos pueden existir en forma de dos o más especies interconvertibles. Los tautómeros prototrópicos resultan de la migración de un átomo de hidrógeno unido covalentemente entre dos átomos. Los tautómeros generalmente existen en equilibrio y los intentos para aislar un tautómero individual habitualmente producen una mezcla cuyas propiedades químicas y físicas son consistentes con una mezcla de compuestos. La posición del equilibrio depende de las características químicas de la molécula. Por ejemplo, en muchos aldehídos y cetonas alifáticas, tales como el acetaldehído, la forma ceto es predominante, mientras que, en los fenols, predomina la forma enol. Entre los tautómeros prototrópicos comunes se incluyen los tautómeros ceto/enol ($-C(=O)-CH_2- \rightleftharpoons -C(OH)=CH-$), amida/ácido amídico ($-C(=O)-NH- \rightleftharpoons -C(OH)=N-$) y amidina ($-C(=NR)-NH- \rightleftharpoons -C(NHR)=N-$). Los últimos dos son particularmente comunes en los anillos heteroarilo y heterocíclico y la presente invención comprende todas las formas tautoméricas de los compuestos.

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan los mismos significados entendidos comúnmente por el experto en la materia a la que se refiere la presente invención, a menos que se indique lo contrario. En la presente memoria se hace referencia a diversas metodologías y materiales conocidos por el experto en la materia. Entre las obras de referencia estándares que proporcionan principios generales de farmacología se incluyen *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, de Goodman y Gilman, 10a ed., McGraw Hill Companies Inc., New York, 2001. Puede utilizarse cualesquiera materiales y/o métodos adecuados que conozca el experto en la materia durante la puesta en práctica de la presente invención. Sin embargo, se describen materiales y métodos preferentes. Los materiales, reactivos y similares a los que se hace referencia en la descripción y ejemplos a continuación pueden obtenerse de fuentes comerciales, a menos que se indique lo contrario.

Las definiciones proporcionadas en la presente memoria pueden enlazarse para formar combinaciones químicamente relevantes, tales como "heteroalquilario", "haloalquilheteroarilo", "arilalquilheterocíclico", "alquilcarbonilo", "alcoxilalquilo" y similares. En el caso de que el término "alquilo" se utilice como sufijo tras otro término, tal como en "fenilalquilo" o "hidroxialquilo", pretende referirse a un grupo alquilo, tal como se ha definido anteriormente, que se sustituye con uno a dos sustituyentes seleccionados del otro grupo nombrado específicamente. De esta manera, por ejemplo, "fenilalquilo" se refiere a un grupo alquilo que presenta uno a dos sustituyentes fenilo, y de esta manera incluye bencilo, feniletilo y bifenilo. Un "alquilaminoalquilo" es un grupo alquilo que presenta uno a dos sustituyentes alquilamino. El término "hidroxialquilo" incluye 2-hidroxietilo, 2-hidroxipropilo, 1-(hidroximetil)-2-metilpropilo, 2-hidroxibutilo, 2,3-dihidroxibutilo, 2-(hidroximetilo), 3-hidroxipropilo, etc. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, tal como se utiliza en la presente memoria, el término "hidroxialquilo" se utiliza para definir un subgrupo de grupos heteroarilo definido posteriormente. El término $-(ar)alquilo$ se refiere a un grupo alquilo o aralquilo no sustituido. El término (hetero)arilo o (het)arilo se refiere a un grupo arilo o heteroarilo.

El término "espirocicloalquilo", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un grupo cicloalquilo espirocíclico, tal como, por ejemplo, espiro[3.3]heptano. El término "espiroheterocicloalquilo", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a heterocicloalquilo espirocíclico, tal como, por ejemplo, 2,6-diaza-spiro[3.3]heptano.

El término "acilo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un grupo de fórmula $-C(=O)R$, en la que R es hidrógeno o alquilo inferior tal como se define en la presente memoria. El término "alquilcarbonilo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un grupo de fórmula $-C(=O)R$, en la que R es alquilo tal como se define en la presente memoria. El término acilo C_{1-6} se refiere a un grupo $-C(=O)R$ que contiene 6 átomos de carbono. El término "arilcarbonilo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un grupo de fórmula $C(=O)R$, en la que R es un grupo arilo; el término "benzoilo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un grupo "arilcarbonilo" en el que R es fenilo.

El término "éster" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un grupo de fórmula $-C(=O)R$, en la que R es alquilo inferior tal como se define en la presente memoria.

El término "alquilo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un residuo hidrocarburo monovalente saturado de cadena no ramificada o ramificada que contiene 1 a 10 átomos de carbono. La expresión "alquilo inferior" se refiere a un residuo hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que contiene 1 a 6 átomos de carbono. El término "alquilo C_{1-10} " tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un alquilo compuesto de 1 a 10 carbonos. Entre los ejemplos de grupos alquilo se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, grupos de alquilo inferior, entre ellos metilo, etilo, propilo, i-propilo, n-butilo, i-butilo, t-butilo o pentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo, heptilo y octilo.

En el caso de que el término "alquilo" se utilice como sufijo tras otro término, tal como en "fenilalquilo" o "hidroxialquilo", pretende referirse a un grupo alquilo, tal como se ha definido anteriormente, que se sustituye con uno a dos sustituyentes seleccionados del otro grupo nombrado específicamente. De esta manera, por ejemplo "fenilalquilo" se refiere al radical R'R"-, en el que R' es un radical fenilo y R" es un radical alquileno tal como se define en la presente memoria, en el entendimiento de que el punto de unión de la fracción fenilalquilo se encontrará en el radical alquileno. Entre los ejemplos de radical arilalquilo se incluyen, aunque sin limitación, bencilo, feniletilo y 3-fenilpropilo. Los términos "arilalquilo" y "aralquilo" se interpretan de manera similar, excepto en que R' es un radical arilo. Los términos "(het)arilalquilo" y "(het)aralquilo" se interpretan de manera similar, excepto en que R' es opcionalmente un radical arilo o heteroarilo.

Las expresiones "haloalquilo" o "halo-alquilo inferior" o "haloalquilo inferior" se refieren a un residuo hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que contiene 1 a 6 átomos de carbono en el que se sustituye uno o más átomos de carbono con uno o más átomos de halógeno.

El término "alquileno" o "alquilenilo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un radical hidrocarburo lineal saturado divalente de 1 a 10 átomos de carbono (por ejemplo $(CH_2)_n$) o un radical hidrocarburo divalente saturado ramificado de 2 a 10 átomos de carbono (por ejemplo $-CHMe-$ o $-CH_2CH(i-Pr)CH_2-$), a menos que se indique lo contrario. Excepto en el caso del metileno, las valencias abiertas de un grupo alquileno no se unen al mismo átomo. Entre los ejemplos de radical alquileno se incluyen, aunque sin limitación, metileno, etileno, propileno, 2-metil-propileno, 1,1-dimetil-etileno, butileno y 2-etilbutileno.

El término "alcoxi" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un grupo -O-alquilo, en el que alquilo es tal como se ha definido anteriormente, tal como metoxi, etoxi, n-propiloxi, i-propiloxi, n-butiloxi, i-butiloxi, t-butiloxi, pentiloxi, hexiloxi, incluyendo los isómeros de los mismos. La expresión "alcoxi inferior" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un grupo alcoxi con un grupo "alquilo inferior" tal como se ha definido anteriormente. El término "alcoxi C_{1-10} " tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un -O-alquilo en el que el alquilo es C_{1-10} .

El término "PCy₃" se refiere a una fosfina trisustituida con tres fracciones cíclicas.

Las expresiones "haloalcoxi" o "halo-alcoxi inferior" o "haloalcoxi inferior" se refieren a un grupo alcoxi inferior en el que se sustituye uno o más átomos de carbono por uno o más átomos de halógeno.

El término "hidroxialquilo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un radical alquilo definidos en la presente memoria en los que uno a tres átomos de hidrógeno en diferentes átomos de carbono se sustituyen por grupos hidroxilo.

Los términos "alquilsulfonilo" y "arilsulfonilo" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a un grupo de fórmula $-S(=O)_2R$, en la que R es alquilo o arilo, respectivamente, y alquilo y arilo son tal como se define en la presente memoria. El término "heteroalquilsulfonilo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un grupo de fórmula $-S(=O)_2R$, en la que R es "heteroalquilo" tal como se define en la presente memoria.

Los términos "alquilsulfonilamino" y "arilsulfonilamino" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a un grupo de fórmula $-NR'S(=O)_2R$, en la que R es alquilo o arilo, respectivamente, R' es hidrógeno o alquilo C_{1-3} y alquilo y arilo son tal como se define en la presente memoria.

El término "cicloalquilo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anillo carbocíclico saturado que contiene entre 3 y 8 átomos de carbono, es decir ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo o ciclooctilo. El término "cicloalquilo C_{3-7} " tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un cicloalquilo compuesto de 3 a 7 carbonos en el anillo carbocíclico.

El término "carboxi-alquilo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una fracción alquilo en la que un átomo de hidrógeno ha sido sustituido por un carboxilo, bajo la condición de que el punto de unión del radical heteroalquilo sea a través de un átomo de carbono. El término "carboxi" o "carboxilo" se refiere a una fracción $-CO_2H$.

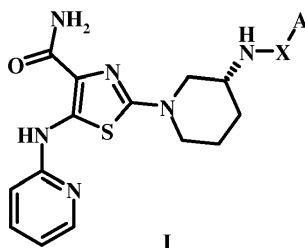
El término "heteroarilo" o "heteroaromático" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un radical monocíclico o bicíclico de 5 a 12 átomos anulares que presenta por lo menos un anillo aromático o parcialmente insaturado que contiene cuatro a ocho átomos en cada anillo, que incorpora uno o más heteroátomos N, O o S, siendo de carbono los átomos anulares restantes, bajo la condición de que el punto de unión del radical heteroarilo se encuentre en un anillo aromático o parcialmente insaturado. Tal como es bien conocido por el experto en la materia, los anillos heteroarilo presentan un menor carácter aromático que sus contrapartidas de sólo carbonos. De esta manera, para los fines de la invención, un grupo heteroarilo sólo necesita presentar cierto grado de carácter aromático. Entre los ejemplos de fracciones heteroarilo se incluyen heterociclos aromáticos monocíclicos que

presentan entre 5 y 6 átomos anulares y 1 a 3 heteroátomos, incluyendo piridinilo, pirimidinilo, pirazinilo, oxazinilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, oxazolilo, 4,5-dihidro-oxazolilo, 5,6-dihidro-4H-[1,3]oxazolilo, isoxazol, tiazol, isotiazol, triazolina, tiadiazol y oxadiazolina, que pueden encontrarse opcionalmente sustituidos con uno o más, preferentemente uno o dos sustituyentes seleccionados de entre hidroxilo, ciano, alquilo, alcoxi, tio, haloalcoxi inferior, alquiltio, halógeno, haloalquilo inferior, alquilsulfonilo, alquilsulfonilo, halógeno, amino, alquilamino, dialquilamino, aminoalquilo, alquilaminoalquilo y dialquilaminoalquilo, nitro, alcóxicarbonilo y carbamoilo, alquilcarbamoilo, dialquilcarbamoilo, arilcarbamoilo, alquilcarbamilamino y arilcarbamilamino. Entre los ejemplos de fracciones bicíclicas se incluyen, aunque sin limitación, quinolinilo, isoquinolinilo, benzofurilo, benzotiofenilo, benzoxazol, bencisoxazol, benzotiazol, naftiridinilo, 5,6,7,8-tetrahidro-[1,6]naftiridinilo y bencisotiazol. Las fracciones bicíclicas pueden sustituirse opcionalmente en cualquiera de los anillos; sin embargo, el punto de unión se encuentra en un anillo que contiene un heteroátomo.

El término "heterociclilo", "heterocicloalquilo" o "heterociclo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un radical cíclico saturado monovalente que consiste de uno o más anillos, preferentemente uno a dos anillos, que incluyen sistemas de anillos espirocíclicos, de tres a ocho átomos en cada anillo, que incorporan uno o más heteroátomos anulares (seleccionados de entre N, O o S(O)₀₋₂) y que pueden opcionalmente sustituirse independientemente con uno o más, preferentemente uno o dos, sustituyentes seleccionados de entre hidroxilo, oxo, ciano, alquilo inferior, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, alquiltio, halógeno, haloalquilo inferior, hidroxialquilo, nitro, alcóxicarbonilo, amino, alquilamino, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilaminosulfonilo, arilaminosulfonilo, alquilsulfonilamino, arilsulfonilamino, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alquilcarbamilamino, arilcarbamilamino, y formas iónicas de los mismos, a menos que se indique lo contrario. Entre los radicales heterocíclicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, morfolinilo, piperazinilo, piperidinilo, azetidinilo, pirrolidinilo, hexahidroazepinilo, oxetanilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotiofenilo, oxazolidinilo, tiazolidinilo, isoxazolidinilo, tetrahidropiranilo, tiomorfolinilo, quinuclidinilo e imidazolinilo, y formas iónicas de los mismos. Los ejemplos también pueden ser bicíclicos, tales como, por ejemplo, 3,8-diaza-biciclo[3.2.1]octano, 2,5-diaza-biciclo[2.2.2]octano u octahidropirazino[2,1-c][1,4]oxazina.

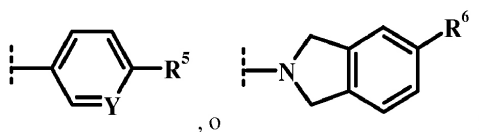
Inhibidores de Btk

La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I:

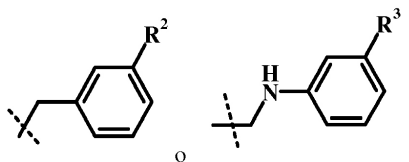


en la que:

A es alquilo inferior, fenilo, CH₂R¹, OR⁴,



R¹ es H,



R² es H o halo,

R³ es halo,

R⁴ es alquilo inferior,

R⁵ es alquilo inferior,

R⁶ es H o halo,

X es C(=O) o S(=O)₂, y

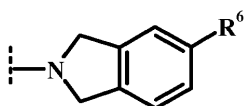
Y es CH o N,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

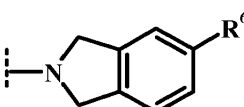
Además, debe entenderse que cada realización referente a un residuo específico A, R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, Y y X tal como se da a conocer en la presente memoria puede combinarse con cualquier otra realización referente a otro residuo A, R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, Y y X tal como se da a conocer en la presente memoria.

La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I, en la que X es C(=O).

La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I, en la que A es:



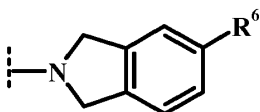
La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I, en la que X es C(=O) y A es:



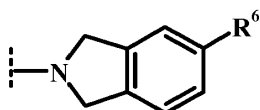
La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I, en la que R⁶ es H.

La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I, en la que R⁶ es Cl.

La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I, en la que R⁶ es H, X es C(=O) y A es:



La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I, en la que R⁶ es Cl, X es C(=O) y A es:



La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I, en la que A es metilo o OR⁴ y R⁴ es *t*-butilo.

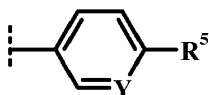
La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I, en la que A es metilo.

La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I, en la que A es metilo u OR y R⁴ es *t*-butilo.

La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I, en la que X es C(=O) y A es metilo.

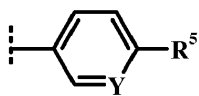
La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I, en la que X es C(=O), A es metilo o OR⁴ y R⁴ es *t*-butilo.

La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I, en la que A es:



y R⁵ es *t*-butilo.

La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I, en la que X es C(=O), A es:

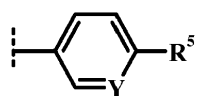


y R⁵ es *t*-butilo.

La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I, en la que Y es N.

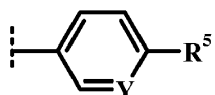
La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I, en la que Y es CH.

La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I, en la que Y es N, X es C(=O), A es:



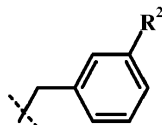
y R⁵ es *t*-butilo.

La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I, en la que Y es CH, X es C(=O), A es:



y R⁵ es *t*-butilo.

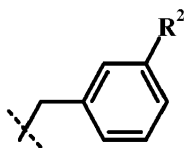
La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I, en la que A es:



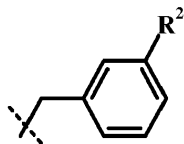
La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I, en la que R² es H.

La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I, en la que R² es *t*-butilo.

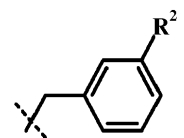
La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I, en la que X es C(=O) y A es:



La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I, en la que X es C(=O), R² es H, y A es:



La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I, en la que X es C(=O), R² es *t*-butilo y A es:



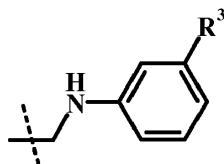
La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I, en la que X es S(=O)₂ y A es metilo, isopropilo o fenilo.

La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I, en la que X es S(=O)₂ y A es metilo.

5 La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I, en la que X es S(=O)₂ y A es isopropilo.

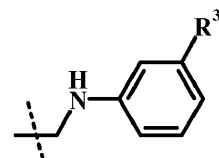
La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I, en la que X es S(=O)₂ y A es fenilo.

10 La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I, en la que A es:



y R³ es Cl.

15 La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I, en la que X es C(=O), A es:



y R³ es Cl.

20 La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I, seleccionado de entre el grupo que consiste de:
 {(R)-1-[4-carbamoyl-5-(piridin-2-ilamino)-tiazol-2-il]-piperidín-3-il}-amida de ácido 1,3-dihidro-isoindol-2-carboxílico,
 {(R)-1-[4-carbamoyl-5-(piridin-2-ilamino)-tiazol-2-il]-piperidín-3-il}-amida de ácido 5-cloro-1,3-dihidro-isoindol-2-carboxílico,
 25 terc-butil-éster de ácido {(R)-1-[4-carbamoyl-5-(piridin-2-ilamino)-tiazol-2-il]-piperidín-3-il}-carbámico,
 6-terc-butil-N-[(R)-1-[4-carbamoyl-5-(piridin-2-ilamino)-tiazol-2-il]-piperidín-3-il]-nicotinamida,
 amida de ácido 2-[(R)-3-fenilacetilamino-piperidín-1-il]-5-(piridin-2-ilamino)-tiazol-4-carboxílico,
 amida de ácido 5-(piridin-2-ilamino)-2-[(R)-3-(2-m-tolil-acetilamino)-piperidín-1-il]-tiazol-4-carboxílico,
 30 amida de ácido 2-[(R)-3-(4-terc-butil-benzoilamino)-piperidín-1-il]-5-(piridin-2-ilamino)-tiazol-4-carboxílico,
 amida de ácido 2-[(R)-3-metanosulfonilamino-piperidín-1-il]-5-(piridin-2-ilamino)-tiazol-4-carboxílico,
 amida de ácido 2-[(R)-3-bencenosulfonilamino-piperidín-1-il]-5-(piridin-2-ilamino)-tiazol-4-carboxílico,
 amida de ácido 2-[(R)-3-(propano-2-sulfonilamino)-piperidín-1-il]-5-(piridin-2-ilamino)-tiazol-4-carboxílico,
 amida de ácido 2-[(R)-3-[2-(3-cloro-fenilamino)-acetilamino]-piperidín-1-il]-5-(piridin-2-ilamino)-tiazol-4-carboxílico
 y
 35 amida de ácido 2-[(R)-3-acetilamino-piperidín-1-il]-5-(piridin-2-ilamino)-tiazol-4-carboxílico.

La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I para la utilización en un método de tratamiento de una condición inflamatoria y/o autoinmunitaria que comprende administrar en el paciente que lo requiera, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de fórmula I.

40 La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I para la utilización en un método de tratamiento de la artritis reumatoide que comprende administrar en el paciente que lo requiera, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de fórmula I.

45 La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I para la utilización en un método de tratamiento del asma que comprende administrar en el paciente que lo requiera, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de fórmula I.

La solicitud proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula I.

50 La solicitud proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula I, mezclado con por lo menos un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La solicitud proporciona el compuesto indicado anteriormente como sustancia terapéuticamente activa.

55 La solicitud proporciona una utilización del compuesto de fórmula I en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un trastorno inflamatorio.

La solicitud proporciona una utilización del compuesto de fórmula I en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un trastorno autoinmunitario.

5 La solicitud proporciona una utilización del compuesto de fórmula I en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de la artritis reumatoide.

10 La solicitud proporciona una utilización del compuesto de fórmula I en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del asma.

La solicitud proporciona el compuesto indicado anteriormente para el tratamiento de una condición inflamatoria y/o autoinmunitaria.

15 La solicitud proporciona el compuesto indicado anteriormente para el tratamiento de la artritis reumatoide.

La solicitud proporciona el compuesto indicado anteriormente para el tratamiento del asma.

20 La solicitud proporciona el compuesto indicado anteriormente para la utilización en el tratamiento de una condición inflamatoria y/o autoinmunitaria.

La solicitud proporciona un compuesto indicado anteriormente para la utilización en el tratamiento de la artritis reumatoide o del asma.

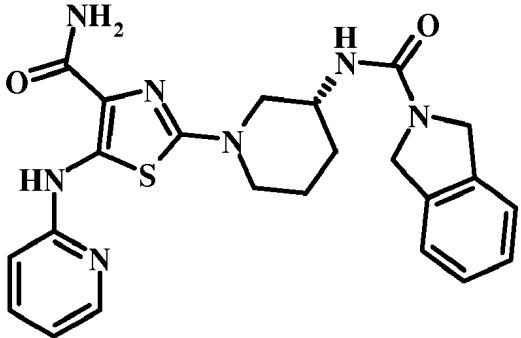
25 La solicitud proporciona un compuesto o composición tal como se indica en la presente memoria.

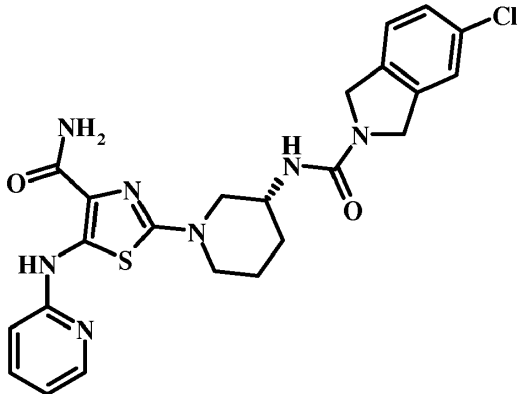
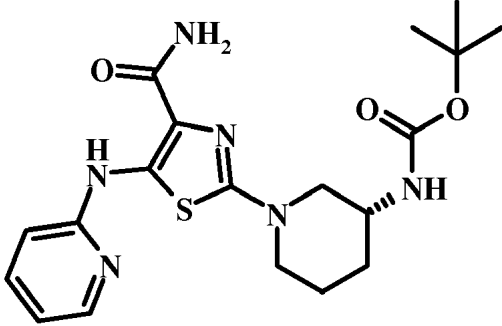
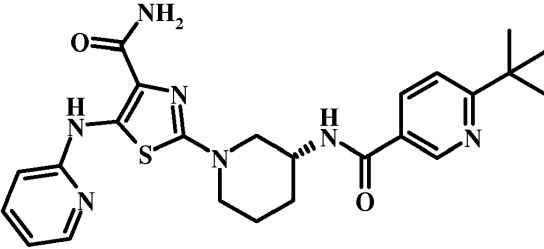
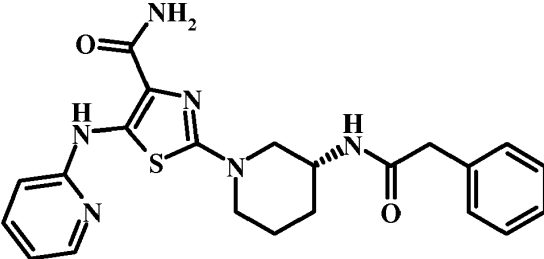
Compuestos y preparación

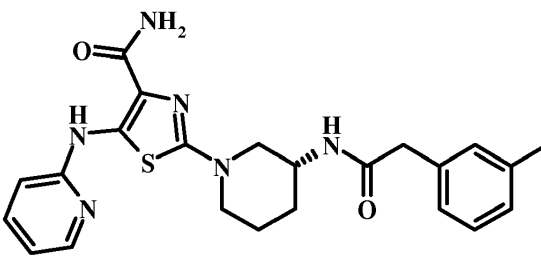
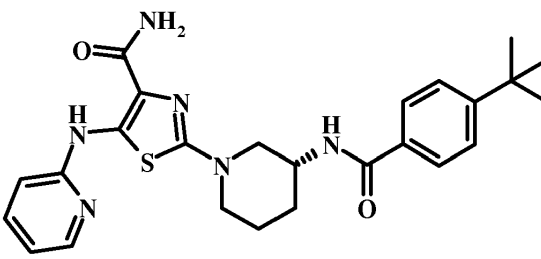
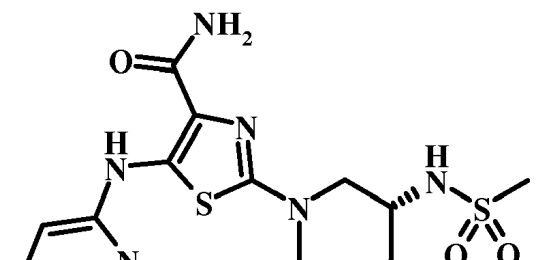
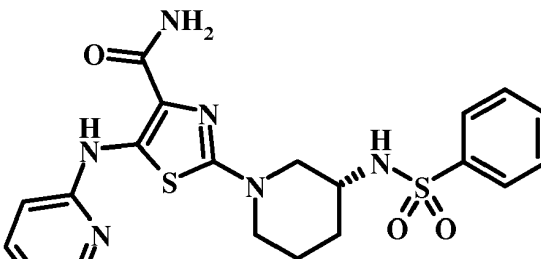
30 Se proporcionan en la Tabla, posteriormente, ejemplos de compuestos representativos comprendidos en la presente invención y dentro del alcance de la misma. Estos ejemplos y preparaciones, proporcionados posteriormente, se proporcionan para permitir que el experto en la materia entienda más claramente y ponga en práctica la presente invención. No deben considerarse limitativos del alcance de la invención, sino meramente ilustrativos y representativos de la misma.

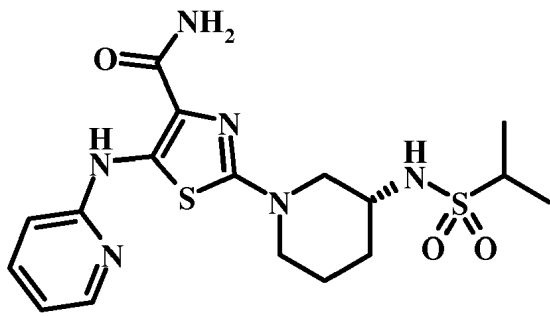
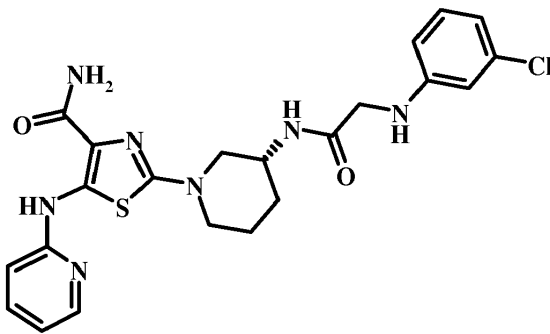
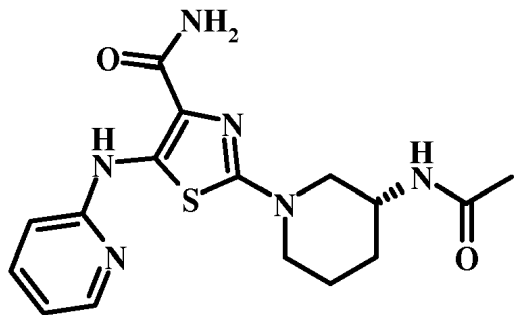
35 En general, la nomenclatura utilizada en la presente solicitud se basa en AutoNomTM v.4.0, un sistema computerizado del Beilstein Institute para la generación de nomenclatura sistemática de la IUPAC. En caso de una discrepancia entre una estructura ilustrada y un nombre dado a dicha estructura, la estructura ilustrada debe recibir más peso. Además, en el caso de que la estereoquímica de una estructura o de una parte de una estructura no se encuentre indicada mediante, por ejemplo, negrita o líneas discontinuas, la estructura o la parte de la estructura debe interpretarse que comprende la totalidad de los estereoisómeros de la misma.

40 La TABLA I ilustra ejemplos de compuestos según la fórmula genérica I:

TABLA I		
Compuesto	Nomenclatura	Estructura
1	{{(R)-1-[4-carbamoyl-5-(piridin-2-ilamino)-tiazol-2-il]-piperidin-3-il}-amida de ácido 1,3-dihidroisoindol-2-carboxílico	

2	{{(R)-1-[4-carbamoyl-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-2-il]-piperidín-3-il}-amida de ácido 5-cloro-1,3-dihidroisoindol-2-carboxílico	
3	terc-butil-éster de ácido {{(R)-1-[4-carbamoyl-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-2-il]-piperidín-3-il}-carbámico	
4	6-terc-butil-N- {{(R)-1-[4-carbamoyl-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-2-il]-piperidín-3-il}-nicotinamida	
5	amida de ácido 2-((R)-3-fenilacetilamino-piperidín-1-il)-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-4-carboxílico	

6	amida de ácido 5-(piridín-2-ilamino)-2-[(R)-3-(2-m-tolil-acetilamino)-piperidín-1-il]-tiazol-4-carboxílico	
7	amida de ácido 2-[(R)-3-(4-terc-butil-benzoilamino)-piperidín-1-il]-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-4-carboxílico	
8	amida de ácido 2-((R)-3-metanosulfonilamino-piperidín-1-il)-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-4-carboxílico	
9	amida de ácido 2-((R)-3-bencenosulfonilaminopiperidín-1-il)-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-4-carboxílico	

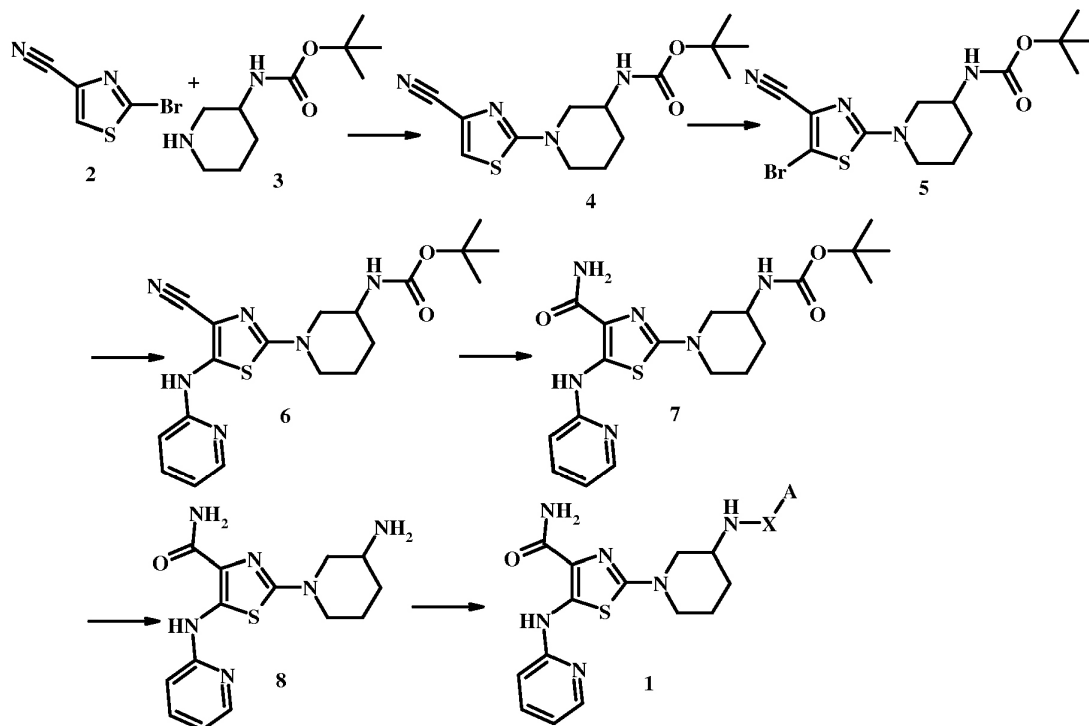
10	amida de ácido 2-[(R)-3-(propano-2-sulfonilamino)-piperidin-1-il]-5-(piridin-2-ilamino)-tiazol-4-carboxílico	
11	amida de ácido 2-[(R)-3-[2-(3-clorofenilamino)-acetilamino]-piperidin-1-il]-5-(piridin-2-ilamino)-tiazol-4-carboxílico	
12	amida de ácido 2-[(R)-3-acetilaminopiperidin-1-il]-5-(piridin-2-ilamino)-tiazol-4-carboxílico	

Esquemas sintéticos generales

5 Los compuestos de la presente invención pueden prepararse mediante cualesquiera medios convencionales. Se proporcionan procedimientos adecuados para sintetizar dichos compuestos en los Ejemplos. Generalmente, los compuestos de la invención pueden prepararse según los Esquemas, posteriormente.

10 Los compuestos reivindicados en la presente invención pueden prepararse mediante la ruta mostrada en el Esquema 1.

Esquema 1



En la primera etapa de la secuencia sintética se combinó 2-bromotiazol-4-carbonitrilo 2 disponible comercialmente con un derivado piperidina sustituido apropiadamente, tal como terc-butil-éster de ácido piperidín-3-ilcarbámico 3, formando los derivados tiazol 2-piperidinil-sustituidos de fórmula 4. El acoplamiento de la amina secundaria cíclica de piperidina con un 2-bromotiazol puede llevarse a cabo bajo catálisis con paladio (0) en presencia de un ligando basado en fosfina adecuado que estimula el acoplamiento cruzado eficiente entre los 2 sustratos orgánicos. Muchas variaciones de las condiciones para el acoplamiento eficiente de haluros y aminas heteroaromáticos son conocidas de la literatura química (Chem. Sci. 2:27, 2011) e incluyen la variación en el precursor de catalizador de paladio (0), ligando de fosfina, base, temperatura de reacción, solvente, estequiometría y concentración de los reactivos. Las condiciones preferentes para llevar a cabo el acoplamiento de 2-bromotiazol 2 y piperidina sustituida 3 son la utilización de tris-(dibencilidén-acetona)dipaladio (0) (CAS número 51364-51-3) como fuente de paladio (0), 2-(díciclohexilfosfino)-3,6-dimetoxi-2',4',6'-triisopropil-1,1'-bifenilo (BrettPhos, CAS número 1070663-78-3) como ligando de fosfina, carbonato de cesio como base y llevando a cabo la reacción en terc-butanol bajo calentamiento a 95°C.

En la segunda etapa de la secuencia sintética se introdujo un átomo de bromo en la posición 5 del anillo tiazol en el compuesto 4. Las condiciones preferentes para llevar a cabo dicha transformación son la utilización de un ligero exceso estequiométrico de N-bromosuccinimida en DMF. Bajo dichas condiciones, el bromuro de tiazol 5 puede obtenerse limpiamente con un buen rendimiento con tiempos de reacción cortos. Las condiciones alternativas de bromuración que utilizan diferentes reactivos de transferencia de átomo de bromo y/o condiciones de reacción puede ser igualmente eficientes.

En la tercera etapa de la secuencia sintética, el bromuro de tiazol 5 se hace reaccionar con una amina para sustituir el átomo de bromo por un átomo de nitrógeno sustituido y formar un tiazol amino-sustituido. En el caso en que la reacción de la amina es 2-aminopiridina, el producto es el tiazol sustituido con 2-aminopiridina 6. Esta transformación se lleva a cabo mejor catalíticamente utilizando la catálisis con paladio (0) en presencia de un ligando basado en fosfina adecuado que estimula el acoplamiento cruzado eficiente entre los 2 sustratos orgánicos. Muchas variaciones de las condiciones para el acoplamiento eficiente de haluros y aminas heteroaromáticos son conocidas de la literatura química (Chem. Sci. 2:27, 2011) e incluyen la variación en el precursor de catalizador de paladio (0), ligando de fosfina, base, temperatura de reacción, solvente, estequiometría y concentración de los reactivos. Las condiciones preferentes para llevar a cabo el acoplamiento de 5-bromotiazol 5 con 2-aminopiridina son la utilización de tris-dibencilidén-acetona de dipaladio como la fuente de paladio (0), 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno (Xantfos, CAS número 161265-03-8) como ligando de fosfina, fosfato potásico tribásico como base y la realización de la reacción en p-dioxano bajo calentamiento a 110°C.

En la cuarta etapa de la secuencia sintética, el nitrilo en la posición 4 del anillo tiazol en el compuesto 6 se convierte en una carboxamida primaria. Se ha informado de numerosas condiciones para la hidrólisis de los nitrilos con el fin

de formar carboxamidas primarias, incluyendo la utilización de base o ácido acuoso. Las condiciones preferentes para llevar a cabo dicha reacción, las cuales son compatibles con otra funcionalidad presente en el material de partida 6 y el producto 7, son la utilización de hidruro(ácido dimetilfosfinoso-kP) [hidrógeno bis(dimetilfosfino-kP)]platino (II) (catalizador de Parkins, CAS número 173416-05-2, J. Mol. Catal. A: Chem. 160:249, 2000; Organic Letters 9:227, 2007) en una mezcla bajo calentamiento de tetrahidrofurano y agua.

Con el fin de funcionalizar el nitrógeno exocíclico en el anillo piperidina, el grupo terc-butiloxycarbonilo se elimina en la quinta etapa de la secuencia sintética. El grupo terc-butiloxycarbonilo típicamente se elimina bajo condiciones ácidas. Las condiciones preferentes para la eliminación del grupo terc-butiloxycarbonilo del nitrógeno exocíclico en el compuesto 7 son el tratamiento con una mezcla 1:1 de ácido trifluoroacético en diclorometano a temperatura ambiente. Bajo estas condiciones, la amina primaria 8 se forma inicialmente como la sal trifluoroacetato correspondiente, que puede convertirse en la base libre en una etapa separada, tal como la separación entre un solvente orgánico y una solución acuosa de una base apropiada, tal como hidrogenocarbonato sódico. Alternativamente, la neutralización de 8 puede llevarse a cabo in situ conjuntamente con la funcionalización de la amina primaria mediante la adición de una base amina terciaria orgánica, tal como trietilamina o diisopropiletilamina.

Los compuestos reivindicados en la presente memoria, los compuestos de fórmula general 1, se preparan mediante derivatización de la amina primaria presente en el compuesto 8. En el caso de que la amina primaria deba convertirse en una amida, la amina puede hacerse reaccionar con un agente acilante, tal como un cloruro de acilo, en presencia de una base amina terciaria, para secuestrar el ácido liberado, o condensarse con un ácido carboxílico en presencia de un reactivo de acoplamiento de péptido, tal como hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU, CAS número 94790-37-1). Alternativamente, la amina primaria también puede convertirse en una sulfonamida mediante la reacción con un cloruro de sulfonilo. Alternativamente, la amina primaria puede convertirse en una urea mediante reacción con un isocianato preformado, mediante conversión de la amina en un isocianato, seguido de la reacción con un reactivo que contiene una segunda amina primaria o secundaria, o mediante reacción con un carbonato que contiene 2 grupos lábiles unidos al carbonilo, de manera que la amina 8 reacciona con el carbonato formando inicialmente un carbamato reactivo que puede reaccionar con un segundo equivalente de una amina primaria o secundaria, formando una urea. En el caso de que se sustituya un alcohol por el segundo equivalente de amina, el producto resultante es un carbamato. Alternativamente, la amina primaria puede convertirse en un carbamato directamente mediante reacción de la amina primaria con un cloroformato sustituido o reactivo equivalente.

Resultará evidente para el experto en la materia de la química orgánica que la secuencia sintética mostrada en el Esquema 1 es únicamente una manera de preparar los compuestos reivindicados en la presente solicitud y que los reactivos y condiciones sugeridos para las transformaciones implicadas en cada etapa pueden no ser óptimas para derivados particulares. Se espera que el experto en la materia de la química orgánica pueda derivar condiciones o encontrar un reactivo adecuado para llevar a cabo las transformaciones indicadas en el Esquema 1 haciendo referencia a los ejemplos proporcionados en la presente solicitud y mediante la referencia a ejemplos adecuados en otras publicaciones de la literatura química.

Composiciones farmacéuticas y administración

Los compuestos de la presente invención pueden formularse en una amplia diversidad de formas y portadores de administración oral. La administración oral puede llevarse a cabo en forma de tabletas, tabletas recubiertas, grageas, cápsulas de gelatina dura y blanda, soluciones, emulsiones, jarabes o suspensiones. Los compuestos de la presente invención resultan eficaces al administrarse por otras vías de administración, incluyendo la administración continua (goteo intravenoso), tópica, parenteral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, transdérmica (que puede incluir un agente de potenciación de la penetración), bucal, nasal, mediante inhalación y mediante supositorios, entre otras vías de administración. El modo de administración preferente generalmente es oral al utilizar un régimen de administración diaria conveniente que puede ajustarse según el grado de la aflicción y la respuesta del paciente al ingrediente activo.

Puede introducirse uno o más compuestos de la presente invención, así como sus sales farmacéuticamente aceptables, conjuntamente con uno o más excipientes, portadores o diluyentes convencionales, en la forma de composiciones farmacéuticas y dosis unitarias. Las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación unitaria pueden comprender ingredientes convencionales en proporciones convencionales, con o sin compuestos o principios activos adicionales y las formas de dosificación unitaria pueden contener cualquier cantidad eficaz adecuada del ingrediente activo proporcionales al intervalo de dosis diaria que se pretende utilizar. Las composiciones farmacéuticas pueden utilizarse como sólidos, tales como tabletas o cápsulas rellenas, semisólidos, polvos, formulaciones de liberación sostenida, o líquidos tales como soluciones, suspensiones, emulsiones, elixires o cápsulas rellenas para la utilización oral, o en forma de supositorios para la administración rectal o vaginal o en forma de soluciones inyectables estériles para la utilización parenteral. Una preparación típica contiene entre aproximadamente 5% y aproximadamente 95% de compuesto o compuestos activos (p/p). El término "preparación" o "forma de dosificación" pretende incluir formulaciones tanto sólidas como líquidas del compuesto activo, y el

experto en la materia apreciará que puede existir un ingrediente activo en preparaciones diferentes dependiendo del órgano o tejido diana y de la dosis deseada y parámetros farmacocinéticos.

El término "excipiente" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un compuesto que resulta útil para preparar una composición farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica y que no resulta no deseable biológicamente o de otro modo, e incluye excipientes que resultan aceptables para el uso veterinario así como el uso farmacéutico humano. Los compuestos de la presente invención pueden administrarse solos, aunque generalmente se administran mezclados con uno o más excipientes, diluyentes o portadores farmacéuticos adecuados seleccionados según la vía de administración deseada y la práctica farmacéutica estándar.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a que resulta útil para preparar una composición farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica y que no resulta indeseable biológicamente o de otro modo y que resulta aceptable para el uso veterinario así como farmacéutico humano.

Una forma de "sal farmacéuticamente aceptable" de un ingrediente activo también puede proporcionar inicialmente una propiedad farmacocinética deseada al ingrediente activo que se encuentra ausente en la forma no salina, y puede incluso afectar positivamente a la farmacodinámica del ingrediente activo con respecto a su actividad terapéutica en el cuerpo. La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" de un compuesto se refiere a una sal que es farmacéuticamente aceptable y que presenta la actividad farmacológica deseada del compuesto parental. Entre dichas sales se incluyen: (1) sales de adición de ácido, formadas con ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido fosfórico, y similares, o formadas con ácidos orgánicos, tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etano-disulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 4-clorobencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-toluenosulfónico, ácido canforsulfónico, ácido 4-metilbencilo[2.2.2]-oct-2-en-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido butilacético terciario, ácido laurilsulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico, y similares o (2) sales formadas en el caso de que un protón ácido presente en el compuesto parental sea sustituido por un ión metálico, por ejemplo un ión de metal alcalino, un ión de alcalino-térreo, o un ión de aluminio, o coordinados con una base orgánica, tal como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina y similares.

Entre las preparaciones en forma sólida se incluyen polvos, tabletas, píldoras, cápsulas, sellos, supositorios y gránulos dispersables. Un portador sólido puede ser una o más sustancias que también pueden actuar como diluyentes, agentes saborizantes, solubilizadores, lubricantes, agentes de suspensión, ligantes, conservantes, agentes desintegrantes de tableta o un material de encapsulado. En forma de polvos, el portador generalmente es un sólido finamente dividido que es una mezcla con el componente activo finamente dividido. En tabletas, el componente activo generalmente se mezcla con el portador que presenta la capacidad ligante necesaria en proporciones adecuadas y se compacta en la forma y tamaño deseados. Entre los portadores adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, una cera de bajo punto de fusión, manteca de cacao y similares. Las preparaciones en forma sólida pueden contener, además del componente activo, colorantes, saborizantes, estabilizadores, tampones, edulcorantes artificiales y naturales, dispersantes, espesantes, agentes solubilizadores y similares.

Entre las formulaciones líquidas que también resultan adecuadas para la administración oral se incluyen formulaciones líquidas, incluyendo emulsiones, jarabes, elixires, soluciones acuosas y suspensiones acuosas. Entre ellas se incluyen preparaciones en forma sólida destinadas a ser convertidas en preparaciones en forma líquida poco antes de ser utilizadas. Pueden prepararse emulsiones en soluciones, por ejemplo en soluciones acuosas de propilenglicol o pueden contener agentes emulsionantes, tales como la lecitina, el monooleato de sorbitán o la acacia. Pueden prepararse soluciones acuosas mediante la disolución del componente activo en agua y la adición de colorantes adecuados, saborizantes, estabilizantes y agentes espesantes. Pueden prepararse suspensiones acuosas mediante la dispersión del componente activo finamente dividido en agua con material viscoso, tal como gomas naturales o sintéticas, resinas, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y otros agentes de suspensión bien conocidos.

Los compuestos de la presente invención pueden formularse para la administración parenteral (por ejemplo mediante inyección, por ejemplo la inyección de bolo o la infusión continua) y pueden presentarse en forma de dosis unitaria en ampollas, jeringas prerrellenas, infusiones de volumen reducido o recipientes multidosis con un conservante añadido. Las composiciones pueden presentar dichas formas, tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, por ejemplo soluciones en polietilenglicol acuoso. Entre los ejemplos de portadores, diluyentes, solventes o vehículos aceitosos o no acuosos se incluyen propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales (por ejemplo aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables (por ejemplo oleato de etilo) y pueden contener agentes de formulación, tales como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes o de suspensión,

estabilizadores y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede encontrarse en forma de polvos, obtenidos mediante aislamiento aséptico de un sólido estéril o mediante liofilización a partir de solución para la constitución antes de la utilización con un vehículo adecuado, por ejemplo agua estéril sin pirógenos.

5 Los compuestos de la presente invención pueden formularse para la administración tópica en la epidermis como pomadas, cremas o lociones, o como parche transdérmico. Las pomadas y cremas pueden, por ejemplo, formularse con una base acuosa o aceitosa con la adición de agentes espesantes y/o gelificantes adecuados. Las lociones
10 pueden formularse con una base acuosa o aceitosa y en general contendrán además uno o más agentes emulsionantes, agentes estabilizadores, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes o agentes colorantes. Entre las formulaciones adecuadas para la administración tópica en la boca se incluyen pastillas que comprenden agentes activos en una base saborizada, habitualmente sacarosa y acacia o tragacanto; pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia, y lavados bucales que comprenden el ingrediente activo en un portador líquido adecuado.

15 Los compuestos de la presente invención pueden formularse para la administración como supositorios. Una cera de bajo punto de fusión, tal como una mezcla de glicéridos de ácido graso o manteca de cacao en primer lugar se funde y el componente activo se dispersa homogéneamente, por ejemplo mediante agitación. La mezcla homogénea fundida seguidamente se vierte en moldes de tamaño conveniente, se dejan enfriar y solidificar.

20 Los compuestos de la presente invención pueden formularse para la administración vaginal. Los pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o sprays que contienen además del ingrediente activo, son portadores que es conocido de la técnica que resultan apropiados.

25 Los compuestos de la presente invención pueden formularse para la administración nasal. Las soluciones o suspensiones se aplican directamente en la cavidad nasal por medios convencionales, por ejemplo con un cuentagotas, pipeta o spray. Las formulaciones pueden proporcionarse en forma de dosis individual o multidosis. En este último caso, de un cuentagotas o pipeta, lo anterior puede ser llevado a cabo por el paciente administrando un volumen predeterminado apropiado de la solución o suspensión. En el caso de un pulverizador, lo anterior puede llevarse a cabo, por ejemplo mediante una bomba de pulverización-atomización dosificadora.

30 Los compuestos de la presente invención pueden formularse para la administración de aerosol, particularmente en el tracto respiratorio e incluyendo la administración intranasal. El compuesto generalmente presenta un tamaño de partícula reducido, por ejemplo del orden de cinco (5) micrómetros o inferior. Dicho tamaño de partícula puede obtenerse por medios conocidos de la técnica, por ejemplo mediante micronización. El ingrediente activo se
35 proporciona en un paquete presurizado con un propelente adecuado, tal como clorofluorocarbono (CFC), por ejemplo diclorodifluorometano, triclorofluorometano o diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono u otro gas adecuado. El aerosol puede contener también convenientemente un surfactante tal como lecitina. La dosis de fármaco puede controlarse con una válvula dosificadora. Alternativamente, los ingredientes activos pueden proporcionarse en una forma de polvos secos, por ejemplo una mezcla de polvos del compuesto en una base de
40 polvos adecuada, tal como lactosa, almidón, derivados de almidón, tal como hidroxipropilmetilcelulosa y polivinilpirrolidona (PVP). El portador de polvos formará un gel en la cavidad nasal. La composición de polvos puede presentarse en forma de dosis unitaria, por ejemplo en cápsulas o cartuchos de, por ejemplo, gelatina, o paquetes blíster a partir de los que pueden administrarse los polvos mediante un inhalador.

45 En caso de que se desee, las formulaciones pueden prepararse con recubrimientos entéricos adaptados para la administración de liberación sostenida o controlada del ingrediente activo. Por ejemplo, los compuestos de la presente invención pueden formularse en dispositivos de administración transdérmica o subcutánea de fármaco. Estos sistemas de administración resultan ventajosos en el caso de que resulte necesaria la liberación sostenida del compuesto y en el caso de que el cumplimiento del paciente de un régimen de tratamiento resulte crucial. Los
50 compuestos en los sistemas de administración transdérmica frecuentemente se unen a un soporte sólido adhesivo en la piel. El compuesto de interés también puede combinarse con un intensificador de la penetración, por ejemplo azona (1-dodecil-azacicloheptán-2-ona). Los sistemas de administración de liberación sostenida se insertan subcutáneamente en la capa subdérmica mediante cirugía o inyección. Los implantes subdérmicos encapsulan el compuesto en una membrana soluble en lípidos, por ejemplo goma de silicona, o un polímero biodegradable, por
55 ejemplo ácido poliláctico.

Se describen formulaciones adecuadas conjuntamente con portadores, diluyentes y excipientes farmacéuticos, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy 1995, editado por E. W. Martin, Mack Publishing Company, 19a
60 edición, Easton, Pennsylvania. Un técnico de formulación experto podría modificar las formulaciones dentro de las enseñanzas de la memoria con el fin de proporcionar numerosas formulaciones para una vía particular de administración sin que las composiciones de la presente invención se conviertan en inestables y sin comprometer su actividad terapéutica.

65

La modificación de los presentes compuestos para convertirlos en más solubles en agua o en otro vehículo, por ejemplo, puede conseguirse fácilmente mediante modificaciones menores (formulación de sal, esterificación, etc.), que se encuentran perfectamente comprendidas dentro de los conocimientos del experto ordinario en la materia. También se encuentra perfectamente comprendido dentro de los conocimientos del experto ordinario en la materia

modificar la vía de administración y el régimen de administración de un compuesto particular con el fin de controlar la farmacocinética de los presentes compuestos para el máximo efecto beneficioso en el paciente.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una cantidad requerida para reducir los síntomas de la enfermedad en un individuo. La dosis se ajustará a los requisitos individuales en cada caso particular. La dosis puede variar dentro de amplios límites dependiendo de numerosos factores, tales como la gravedad de la enfermedad que debe tratarse, la edad y el estado general de salud del paciente, otros medicamentos con los que está siendo tratado el paciente, la vía y forma de administración y las preferencias y experiencia del médico implicado. Para la administración oral debería resultar apropiada una dosis diaria de entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 1.000 mg/kg de peso corporal al día en monoterapia y/o en terapia de combinación. Una dosis diaria preferente es de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal, más preferentemente de entre 0,1 y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, y más preferentemente de entre 1,0 y aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal al día. De esta manera, para la administración en una persona de 70 kg, un intervalo de dosis sería de entre aproximadamente 7 mg y 0,7 g al día. La dosis diaria puede administrarse en forma de una dosis individual o en dosis divididas, típicamente entre 1 y 5 dosis al día. Generalmente el tratamiento se inicia con dosis más pequeñas que son inferiores a la dosis óptima del compuesto. A continuación, se incrementa la dosis en incrementos pequeños hasta alcanzar el efecto óptimo para el paciente individual. El experto ordinario en la materia del tratamiento de las enfermedades indicadas en la presente memoria podrá, sin necesidad de experimentación indebida y basándose en los propios conocimientos personales, la experiencia y la exposición de la presente solicitud, determinar una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos de la presente invención para una enfermedad y paciente dados.

Las preparaciones farmacéuticas preferentemente se presentan en formas de administración unitaria. En dicha forma, la preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del componente activo. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación empaquetada, conteniendo el paquete cantidades discretas de preparación, tales como tabletas empaquetadas, cápsulas y polvos en viales o ampollas. Además, la forma de dosificación unitaria puede ser una cápsula, tableta, oblea o pastilla, o puede ser el número apropiado de cualquiera de ellas en forma empaquetada.

Indicaciones y métodos de tratamiento

Los compuestos de fórmula genérica I inhiben la tirosina quinasa de Bruton (Btk). La activación de la Btk por quinasas anteriores resulta en la activación de la fosfolipasa Cy, que, a su vez, estimula la liberación de mediadores proinflamatorios. Los compuestos de fórmulas I resultan útiles en el tratamiento de la artritis y de otras enfermedades antiinflamatorias y autoinmunológicas. Los compuestos según las fórmulas I resultan, de acuerdo con lo anteriormente expuesto, útiles en el tratamiento de la artritis. Los compuestos de fórmula I resultan útiles para inhibir la Btk en las células y para modular el desarrollo de las células B. La presente invención comprende además composiciones farmacéuticas que contienen compuestos de fórmulas I mezclados con portadores, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos indicados en la presente memoria son inhibidores de quinasa, en particular inhibidores de Btk. Estos inhibidores pueden resultar útiles para tratar una o más enfermedades sensibles a la inhibición de quinasa, incluyendo enfermedades sensibles a la inhibición de Btk y/o a la inhibición de la proliferación de las células B, en mamíferos. Sin deseo de restringirse a ninguna teoría en particular, se cree que la interacción de los compuestos de la invención con Btk resulta en la inhibición de la actividad de Btk y, de esta manera, en la utilidad farmacéutica de estos compuestos. De acuerdo con lo anterior, la invención incluye un método de tratamiento de un mamífero, por ejemplo un ser humano, que presenta una enfermedad sensible a la inhibición de la actividad de Btk y/o que inhibe la proliferación de las células B, que comprende administrar en el mamífero que presenta dicha enfermedad, una cantidad eficaz de por lo menos una entidad química proporcionada en la presente memoria. Puede determinarse experimentalmente una concentración eficaz, por ejemplo mediante el ensayo de la concentración sanguínea del compuesto, o teóricamente, mediante el cálculo de la biodisponibilidad. Entre otras quinasas que pueden resultar afectadas además de Btk se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, otras tirosina quinasas y serina/treonina quinasas.

Las quinasas desempeñan funciones notables en rutas de señalización que controlan procesos celulares fundamentales tales como la proliferación, la diferenciación y la muerte (apoptosis). La actividad de quinasa anormal se ha implicado en un amplio abanico de enfermedades, incluyendo múltiples cánceres, enfermedades autoinmunológicas y/o inflamatorias, y reacciones inflamatorias agudas. La función polifacética de las quinasas en rutas de señalización celular clave proporciona una oportunidad significativa para identificar nuevos fármacos con diana en quinasas y rutas de señalización.

Una realización incluye un compuesto para la utilización en un método de tratamiento de un paciente que presenta una enfermedad autoinmunitaria y/o inflamatoria, o una reacción inflamatoria aguda sensible a la inhibición de la actividad de Btk y/o de la proliferación de las células B.

5 Entre las enfermedades autoinmunitarias y/o inflamatorias que pueden resultar afectadas utilizando compuestos y composiciones según la invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellas: soriasis, alergia, enfermedad de Crohn, síndrome del intestino irritable, enfermedad de Sjögren, rechazo tisular del injerto y rechazo hiperagudo de órganos trasplantados, asma, lupus eritematoso sistémico (y glomerulonefritis asociada), dermatomiositis, esclerosis múltiple, escleroderma, vasculitis (asociada a ANCA y otras vasculitis), estados hemolíticos y trombocitopénicos autoinmunitarios, síndrome de Goodpasture (y glomerulonefritis y hemorragias pulmonares asociadas), aterosclerosis, artritis reumatoide, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) crónica, enfermedad de Addison, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, diabetes, choque séptico y miastenia grave.

15 Se indican en la presente memoria métodos de tratamiento en los que por lo menos una entidad química proporcionada en la presente memoria se administra en combinación con un agente antiinflamatorio. Entre los agentes antiinflamatorios se incluyen los AINE, inhibidores de enzima ciclooxigenasa no específicos y específicos de COX-2, compuestos de oro, corticoesteroides, metotrexato, antagonistas de receptores del factor de necrosis tumoral (FNT), inmunosupresores y metotrexato.

20 Entre los ejemplos de AINE se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, ibuprofeno, flurbiprofeno, naproxeno y naproxeno sódico, diclofenac, combinaciones de diclofenac sódico y misoprostol, sulindac, oxaprozina, diflunisal, piroxicam, indometacina, etodolac, fenoprofeno cálcico, quetoprofeno, nabumetona sódica, sulfasalazina, tolmetina sódica e hidroxycloquin. Entre los ejemplos de NSAID se incluyen además inhibidores específicos de COX-2, tales como celecoxib, valdecoxib, lumiracoxib y/o etoricoxib.

25 En algunas realizaciones, el agente antiinflamatorio es un salicilato. Entre los salicilatos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el ácido acetilsalicílico o aspirina, el salicilato sódico y la colina y los salicilatos de magnesio.

30 El agente antiinflamatorio también puede ser un corticoesteroide. Por ejemplo, el corticoesteroide puede ser cortisona, dexametasona, metilprednisolona, prednisolona, fosfato de prednisolona sódica, o prednisona.

En realizaciones adicionales, el agente antiinflamatorio es un compuesto de oro, tal como tiomolato sódico de oro o auranofina.

35 La solicitud incluye además realizaciones en las que el agente antiinflamatorio es un inhibidor metabólico, tal como un inhibidor de dihidrofolato reductasa, tal como metotrexato o un inhibidor de dihidroorotato deshidrogenasa, tal como leflunomida.

40 Otras realizaciones de la invención se refieren a combinaciones en las que por lo menos un compuesto antiinflamatorio es un anticuerpo monoclonal anti-C5 (tal como eculizumab o pexelizumab), un antagonista de FNT, tal como entanercept, o infliximab, que es un anticuerpo monoclonal anti-FNT-alfa.

Todavía otras realizaciones de la invención se refieren a combinaciones en las que por lo menos un agente activo es un compuesto inmunosupresor, tal como un compuesto inmunosupresor seleccionado de entre metotrexato, leflunomida, ciclosporina, tacrolimus, azatioprina y micofenolato mofetilo.

45 Las células B y los precursores de las células B que expresan Btk han sido implicados en la patología de las neoplasias de células B, incluyendo el linfoma de células B, el linfoma (incluyendo el linfoma de Hodgkin y no de Hodgkin), el linfoma de células pilosas, el mieloma múltiple, la leucemia mielógena crónica y aguda, y la leucemia linfocítica crónica y aguda.

50 Se ha demostrado que Btk es un inhibidor del complejo de señalización Fas/APO-1 inductor de muerte (CD-95) (DISC) en las células linfoides del linaje B. El destino de las células leucémicas/linfóicas puede residir en el equilibrio entre los efectos opuestos proapoptótico de las caspasas activadas por el DISC y un mecanismo regulador antiapoptótico anterior que implica Btk y/o sustratos de la misma (Vassilev et al., J. Biol. Chem. 274:1646-1656, 1998).

60 También se ha descubierto que los inhibidores de Btk resultan útiles como agentes quimiosensibilizadores y, de esta manera, que resultan útiles en combinación con otros fármacos quimioterapéuticos, en particular fármacos que inducen apoptosis. Entre los ejemplos de otros fármacos quimioterapéuticos que pueden utilizarse en combinación con inhibidores de Btk quimiosensibilizadores se incluyen inhibidores de topoisomerasa (camptotecina o topotecán), inhibidores de topoisomerasa II (por ejemplo daunomicina y etopósido), agentes alquilantes (por ejemplo ciclofosfamida, melfalán y BCNU), agentes dirigidos a la tubulina (por ejemplo taxol y vinblastina) y agentes biológicos (por ejemplo anticuerpos tales como anticuerpo anti-CD20, IDEC 8, inmunotoxinas y citoquinas).

65

La actividad de Btk también se ha asociado a algunas leucemias que expresan el gen de fusión *bcr-abl* resultante de la traslocación de partes de los cromosomas 9 y 22. Esta anomalía se observa comúnmente en la leucemia mielógena crónica. Btk se fosforilada constitutivamente por la quinasa *bcr-abl*, que inicia señales de supervivencia posteriores que evitan la apoptosis en células *bcr-abl* (N. Feldhahn et al. J. Exp. Med. 201(11):1837-1852, 2005).

Métodos de tratamiento

La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I para la utilización en un método de tratamiento de una condición inflamatoria y/o autoinmunitaria que comprende administrar en el paciente que lo requiera, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de fórmula I.

La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I para la utilización en un método de tratamiento de una condición inflamatoria, que comprende administrar en el paciente que lo requiera, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de fórmula I.

La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I para la utilización en un método de tratamiento de la artritis reumatoide que comprende administrar en el paciente que lo requiera, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de fórmula I.

La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I para la utilización en un método de tratamiento del asma que comprende administrar en el paciente que lo requiera, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de fórmula I.

La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I para la utilización en un método de tratamiento de una condición inflamatoria y/o autoinmunitaria que comprende administrar en el paciente que lo requiera, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto inhibidor de Btk de fórmula I.

La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I para la utilización en un método de tratamiento de la artritis que comprende administrar en el paciente que lo requiera, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto inhibidor de Btk de fórmula I.

La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I para la utilización en un método de tratamiento del asma que comprende administrar en el paciente que lo requiera, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto inhibidor de Btk de fórmula I.

La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I para la utilización en un método de tratamiento de la proliferación de células B, que comprende administrar en el paciente que lo requiera, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto inhibidor de Btk de fórmula I.

La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I para la utilización en un método para la inhibición de la actividad de Btk, que comprende administrar el compuesto inhibidor de Btk de fórmula I, en el que el compuesto inhibidor de Btk muestra una IC_{50} de 50 micromolar o inferior en un ensayo bioquímico in vitro de la actividad de Btk.

En una variación del método anteriormente indicado, el compuesto inhibidor de Btk muestra una IC_{50} de 100 nanomolar o inferior en un ensayo bioquímico in vitro de actividad de Btk.

En otra variación del método anteriormente indicado, el compuesto muestra una IC_{50} de 10 nanomolar o inferior en un ensayo bioquímico in vitro de actividad de Btk.

La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I para la utilización en un método de tratamiento de una condición inflamatoria, que comprende administrar en el paciente que lo requiera, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de fórmula I.

La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I para la utilización en un método de tratamiento de la artritis, que comprende administrar en el paciente que lo requiera, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto antiinflamatorio en combinación con el compuesto inhibidor de Btk de fórmula I.

La solicitud proporciona un compuesto de fórmula I para la utilización en un método de tratamiento de un linfoma o de una leucemia BCR-ABL¹⁺ mediante la administración en el paciente que lo requiera de una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto inhibidor de Btk de fórmula I.

Ejemplos

Abreviaturas generales

- 5 Entre las abreviaturas utilizadas comúnmente se incluyen: acetilo (Ac), azo-*bis*-isobutirilnitrilo (AIBN), atmósferas (Atm), 9-borabicyclo[3.3.1]nonano (9-BBN o BBN), 2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftilo (BINAP), *tert*-butoxicarbonilo (Boc), pirocarbonato de di-*tert*-butilo o anhídrido de boc (BOC₂O), bencilo (Bn), butilo (Bu), número de registro de Chemical Abstracts (CASRN), benciloxycarbonilo (CBZ o Z), carbonil-diimidazol (CDI), 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO), trifluoruro de dietilamino-azufre (DAST), dibencylidén-acetona (dba), 1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-eno (DBN), 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU), N,N'-diciohexilcarbodiimida (DCC), 1,2-dicloroetano (DCE),
10 diclorometano (DCM), 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ), azodicarboxilato de dietilo (DEAD), di-*iso*-propilazodicarboxilato (DIAD), hidruro de di-*iso*-butilaluminio (DIBAL o DIBAL-H), di-*iso*-propiletilamina (DIPEA), N,N'-dimetil acetamida (DMA), 4-N,N'-dimetilaminopiridina (DMAP), N,N'-dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), 1,1'-*bis*-(difenilfosfino)etano (dppe), 1,1'-*bis*-(difenilfosfino)ferroceno (dppf), hidrocloreuro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDCI), 2-etoxi-1-etoxycarbonil-1,2-dihidroquinolina (EEDQ), etilo (Et), acetato de etilo (EtOAc), etanol (EtOH), etil-éster de ácido 2-etoxi-2*H*-quinolín-1-carboxílico (EEDQ), éter dietílico (Et₂O), éter etil-isopropílico (EtOiPr), hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio ácido acético (HATU), ácido acético (HOAc), 1-N-hidroxibenzotriazol (HOBt), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC),
15 *iso*-propanol (IPA), cloruro de isopropilmagnesio (iPrMgCl), hexametildisilazano (HMDS), cromatografía líquida-espectrometría de masas (CL-EM), hexametildisilazano de litio (LiHMDS), ácido metacloroperóxibenzoico (m-CPBA), metanol (MeOH), punto de fusión (pf), MeSO₂- (mesilo o Ms), metilo (Me), acetonitrilo (MeCN), ácido *m*-cloroperbenzoico (MCPBA), espectro de masas (em), éter metil *t*-butilico (MTBE), metiltetrahidrofurano (MeTHF), N-bromosuccinimida (NBS), n-butil-litio (nBuLi), N-carboxianhídrido (NCA), N-clorosuccinimida (NCS), N-metilmorfolina (NMM), N-metilpirrolidona (NMP), clorocromato de piridinio (PCC), dicloro-((bis-difenilfosfino)ferrocenil) paladio(II) (Pd(dppf)Cl₂), acetato de paladio(II) (Pd(OAc)₂), tris(dibencilidén-acetona)dipaladio (0) (Pd₂(dba)₃), dicromato de piridinio (PDC), fenilo (Ph), propilo (Pr), *iso*-propilo (*i*-Pr), libras por pulgada cuadrada (psi), piridina (pyr), 1,2,3,4,5-pentafenil-1'-(di-*tert*-butilfosfino)ferroceno (Q-Phos), temperatura de laboratorio (temperatura ambiente, ta o TA),
20 sec-butil-litio (sBuLi), *tert*-butildimetilsililo o *t*-BuMe₂Si (TBDMS), fluoruro de tetra-n-butilamonio (TBAF), trietilamina (TEA o Et₃N), 2,2,6,6-tetrametilpiperidín-1-oxilo (TEMPO), trimetilsililetoximetilo (SEM), triflato o CF₃SO₂-(Tf), ácido trifluoroacético (TFA), 1,1'-*bis*-2,2,6,6-tetrametilheptano-2,6-diona (TMHD), tetrafluoroborato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU), cromatografía de capa fina (CCF), tetrahidrofurano (THF), trimetilsililo o Me₃Si (TMS), monohidrato de ácido p-toluenosulfónico (TsOH o pTsOH), 4-Me-C₆H₄SO₂- o tosilo (Ts), y N-uretano-N-carboxianhídrido (UNCA). La nomenclatura convencional, incluyendo los prefijos *normal* (*n*), *iso* (*i*), *secundaria* (*sec*), *terciaria* (*tert*-) y *neo* presenta sus significados habituales al utilizarlos con una fracción alquilo (J. Rigaudy y D. P. Klesney, Nomenclature in Organic Chemistry, IUPAC 1979, Pergamon Press, Oxford).

Condiciones generales

- 40 Los compuestos de la presente invención pueden prepararse partiendo de materias primas disponibles comercialmente, mediante la utilización de técnicas y procedimientos sintéticos generales conocidos por el experto en la materia. Posteriormente se proporcionan esquemas de reacción adecuados para preparar dichos compuestos. Se proporcionan ejemplos adicionales en los ejemplos específicos.

Abreviaturas específicas

- 45 boc *tert*-butoxicarbonilo
CH₂Cl₂ diclorometano
Cs₂CO₃ carbonato de cesio
DCM diclorometano
50 DMF N,N'-dimetilformamida
DMSO dimetilsulfóxido
EtOAc acetato de etilo
HATU hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
base de Hunig N,N'-diisopropiletilamina
55 HCl ácido clorhídrico
CL-EM cromatografía líquida-espectrometría de masas
HPLC cromatografía líquida de alto rendimiento
MeOH alcohol metílico
MgSO₄ Sulfato de magnesio
60 nBuLi n-butil-litio
NaCl cloruro sódico
Na₂CO₃ carbonato sódico
NaOMe metóxido sódico
Na₂SO₄ sulfato sódico
65 NH₄OH hidróxido amónico

NMP	1-metil-2-pirrolidinona
RMN	resonancia magnética nuclear
Pd(OAc) ₂	acetato de paladio (II)
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
CCF	cromatografía de capa fina
TMSCI	cloruro de trimetilsililo

Datos experimentales generales

Los reactivos se obtuvieron de Aldrich, Oakwood, Matrix, o de otros proveedores, y se utilizaron sin purificación adicional. Las reacciones utilizando la irradiación de microondas para el calentamiento se llevaron a cabo utilizando un Personal Chemistry Emrys Optimizer System o un CEM Discovery System. La purificación a escala de miligramo a multi-gramo se llevó a cabo mediante métodos conocidos por el experto en la materia, tales como la elución de una columna flash de gel de sílice; las preparaciones en columna flash preparativa también se llevaron a cabo en algunos casos mediante la utilización de columnas de gel de sílice multigramo preempaquetadas desechables (RediSep) eluidas con un sistema CombiFlash. Biotage™ e ISCO™ también son instrumentos de columna flash que pueden utilizarse en la presente invención para la purificación de intermediarios.

Para el propósito de evaluar la identidad y pureza de compuestos, se registraron los espectros de CL/EM (cromatografía líquida/espectroscopía de masas) utilizando el sistema siguiente. Para la medición de los espectros de masas, el sistema consistía de un espectrómetro Micromass Platform II: ionización por EP en modo positivo (intervalo de masas: 150 -1200). La separación cromatográfica simultánea se llevó a cabo con el sistema de HPLC siguiente: ES Industries Chromegabond WR C-18 3u 120 Å (3,2 x 30mm) cartucho de columna, fase móvil A: agua (TFA al 0,02%) y fase B: acetonitrilo (TFA al 0,02%); gradiente de 10% de B a 90% de B en 3 minutos; tiempo de equilibrado: 1 minuto; caudal: 2 ml/minuto.

Muchos compuestos de fórmula 1 se purificaron también mediante HPLC de fase inversa utilizando métodos bien conocidos por el experto en la materia. En algunos casos, se llevó a cabo la purificación en HPLC preparativa utilizando un espec. de masas PE Sciex 150 EX controlando un colector Gilson 215 incorporado a un sistema HPLC preparativo Shimadzu y un autoinyector Leap. Los compuestos se recolectaron del flujo de elución mediante detección de CL/EM en el modo de detección de iones positivos. La elución de los compuestos de las columnas C-18 (2,0 x 10 cm eluyendo a 20 ml/min.) se llevó a cabo utilizando un modo apropiado de gradación lineal durante 10 minutos de solvente (A) TFA al 0,05%/H₂O y solvente (B) TFA al 0,035%/acetonitrilo. Para la inyección en sistemas de HPLC, las muestras en bruto se disolvieron en mezclas de metanol, acetonitrilo y DMSO.

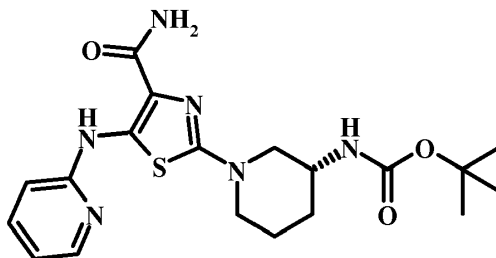
Los compuestos se caracterizaron mediante RMN-¹H utilizando un espectrómetro de RMN de 400 MHz Bruker.

Los compuestos de la presente invención pueden sintetizarse según técnicas conocidas. Los ejemplos y referencias siguientes se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención. Sin embargo, los ejemplos no pretenden limitar la invención, el alcance de la cual es proporcionado en las reivindicaciones adjuntas. Los nombres de los productos finales en los ejemplos se generaron utilizando Isis AutoNom 2000.

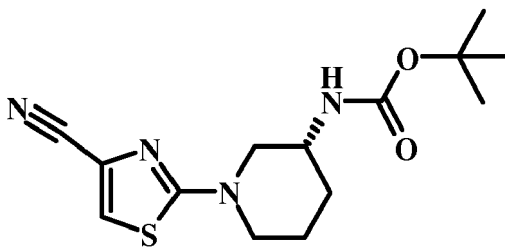
Ejemplos preparativos

Ejemplo 1

terc-butil-éster de ácido {(R)-1-[4-carbamoyl-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-2-il]-piperidín-3-il}-carbámico

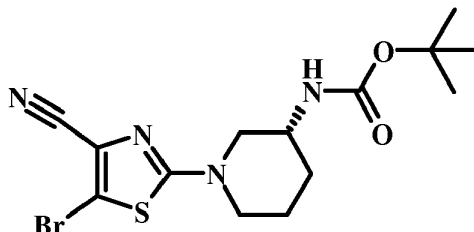


Etapla 1: preparación terc-butil-éster de ácido [(R)-1-(4-ciano-tiazol-2-il)-piperidín-3-il]-carbámico

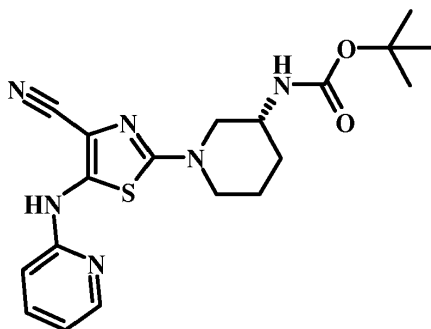


- 5 A un matraz de fondo redondo de 500 ml se añadió terc-butil-éster de ácido (R)-piperidín-3-il-carbámico (10,3 g, 51,6 mmoles), carbonato de cesio (33,6 g, 103 mmoles), 2-(díciclohexilfosfino)-3,6-dimetoxi-2',4',6'-trisisopropil-1,1'-bifenilo (BrettPhos, CAS número 1070663-78-3) (369 mg, 688 µmoles) y 2-bromotiazol-4-carbonitrilo (6,5 g, 34,4 mmoles) seguido de terc-butanol (225 ml). La mezcla se desgasificó bajo vacío (~50 mmHg) sonicando simultáneamente y después el matraz se cargó con argón. Se repitió la desgasificación dos veces. Se añadió tris-(dibencilidén-
- 10 acetona)dipaladio (0) (CAS número 51364-51-3) (315 mg, 344 µmoles) y el matraz se evacuó y se recargó con argón. Se repitió la operación anterior dos veces. El matraz de reacción se transfirió a un sistema de calefacción de bloque de aluminio y se calentó bajo reflujo de argón durante 5 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se vertió en agua (1 l), se extrajo con acetato de etilo (3x200 ml), los extractos orgánicos agrupados se lavaron con solución hipersalina (2x200 ml), se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía utilizando un gradiente de columna de sílice de
- 15 330 g, eluyendo de 10% hasta 40% de acetato de etilo en hexanos a un caudal de 100 ml/min. Se agruparon las fracciones que contenían el producto y se concentraron al vacío, proporcionando terc-butil-éster de ácido [(R)-1-(4-ciano-tiazol-2-il)-piperidín-3-il]-carbámico en forma de un sólido blanquecino (8,75 g, 78%).
- 20 CL/EM: *m/z* calculado para $C_{14}H_{20}N_4O_2S$ ($[M+H-Boc]^+$): 209,3. Observado: 209,1 (ionización mediante electropulverización en modo positivo).

Etapla 2: preparación de terc-butil-éster de ácido [(R)-1-(5-bromo-4-ciano-tiazol-2-il)-piperidín-3-il]-carbámico



- 25 A una solución de terc-butil-éster de ácido [(R)-1-(4-ciano-tiazol-2-il)-piperidín-3-il]-carbámico (13,0 g, 42,2 mmoles) en N,N-dimetilformamida (250 ml) se añadió N-bromosuccinimida (8,25 g, 46 mmoles) y la mezcla se agitó bajo argón a temperatura ambiente durante 30 minutos. El análisis mediante cromatografía de capa fina (fase estacionaria de sílice eluida con acetato de etilo al 25% v/v en hexanos) indicó la conversión limpia de terc-butil-éster de ácido [(R)-1-(4-ciano-tiazol-2-il)-piperidín-3-il]-carbámico en un compuesto ligeramente menos polar. La mezcla de reacción se vertió en agua (1 l) y se extrajo con acetato de etilo (3x250 ml), los extractos orgánicos agrupados se lavaron con solución hipersalina (2x200 ml), se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron al vacío, proporcionando un sólido blanquecino. El producto en bruto se trituró con éter dietílico/éter de petróleo 1:1 v/v (volumen total: 300 ml). Se obtuvo terc-butil-éster de ácido [(R)-1-(5-bromo-4-ciano-tiazol-2-il)-piperidín-3-il]-carbámico en forma de un sólido incoloro mediante filtración, lavando con éter dietílico/éter de petróleo 1:2 v/v y secando mediante el paso de aire (14,33 g, 88%). Se obtuvo una cantidad adicional de terc-butil-éster de ácido [(R)-1-(5-bromo-4-ciano-tiazol-2-il)-piperidín-3-il]-carbámico mediante purificación del residuo obtenido a partir de la concentración de los licores madre mediante cromatografía utilizando un gradiente de columna de gel de sílice de
- 30 5% hasta 40% v/v de acetato de etilo en hexanos. Las fracciones que contenían producto se agruparon y se concentraron al vacío, obteniendo terc-butil-éster de ácido [(R)-1-(5-bromo-4-ciano-tiazol-2-il)-piperidín-3-il]-carbámico adicional en forma de un sólido incoloro (1,18 g, 7%).
- 35 CL/EM: *m/z* calculado para $C_{14}H_{19}BrN_4O_2S$ ($[M+H-Boc]^+$): 288,2. Observado: 287 y 289 (proporción 1:1, consistente con la presencia de 1 átomo de bromo) (ionización mediante electropulverización en modo positivo).
- 45

Etapla 3: preparación de terc-butil-éster de ácido {(R)-1-[4-ciano-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-2-il]-piperidín-3-il}-carbámico

Un recipiente de presión de tapa enroscable se evacuó y se cargó con argón. Al recipiente de reacción se añadió terc-butil-éster de ácido [(R)-1-(5-bromo-4-ciano-tiazol-2-il)-piperidín-3-il]-carbámico (1,00 g, 2,58 mmoles), 2-aminopiridina (384 mg, 3,87 mmoles), 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno (Xantfos, CAS número 161265-03-8) (462 mmoles, 775 μ moles) y fosfato potásico tribásico (1,64 g, 7,75 mmoles) seguido de p-dioxano (20 ml). El recipiente de reacción se desgasificó mediante sonicación bajo vacío (~50 mmHg) y el recipiente seguidamente se recargó con argón. Se repitió la desgasificación dos veces más. Se añadió tris-(dibencilidén-acetona)dipaladio (0) (CAS número 51364-51-3) (241 mg, 258 μ moles) y el matraz se evacuó y se recargó con argón. Se repitió la operación anterior dos veces. Se selló el recipiente y se introdujo en un baño de aceite precalentado a 110°C durante 16 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se vertió en agua (200 ml), se extrajo con acetato de etilo/tetrahidrofurano 1:1 v/v (3x100 ml), los extractos orgánicos agrupados se lavaron con solución hipersalina (2x75 ml), se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía utilizando un gradiente de sílice eluido con 0% a 10% v/v de metanol en diclorometano. Las fracciones que contenían producto se agruparon y se concentraron al vacío, proporcionando el producto parcialmente purificado en forma de un sólido rojo/marrón (429 mg). El material parcialmente purificado se introdujo en isopropanol/acetato de etilo 2:1 v/v (volumen total: 150 ml) y se añadió carbono activado. Tras dejar en reposo a temperatura ambiente durante 10 minutos, la mezcla se filtró a través de medio filtrante de tierra diatomácea y el filtrado se concentró al vacío, proporcionando terc-butil-éster de ácido {(R)-1-[4-ciano-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-2-il]-piperidín-3-il}-carbámico en forma de un sólido marrón pálido/amarillo (0,38 g, 35%).

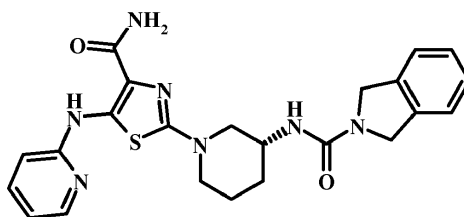
CL/EM: m/z calculado para $C_{19}H_{24}N_6O_2S$ ($[M+H]^+$): 401,5. Observado: 401,2 (ionización mediante electropulverización en modo positivo).

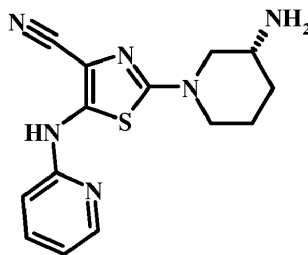
Etapla 4: preparación de terc-butil-éster de ácido {(R)-1-[4-carbamoil-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-2-il]-piperidín-3-il}-carbámico

Una solución de terc-butil-éster de ácido {(R)-1-[4-ciano-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-2-il]-piperidín-3-il}-carbámico (455 mg, 1,14 mmoles) en tetrahidrofurano/agua 10:1 v/v (volumen total: 16,5 ml) se desgasificó mediante burbujeo en argón durante 10 minutos bajo agitación. Se añadió hidruro(ácido dimetilfosfinoso-kP)[hidrógeno bis(dimetilfosfino-kP)platino (II) (CAS número 173416-05-2) (78 mg, 183 μ moles) y la mezcla se calentó a 150°C con microondas durante 45 minutos. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se vertió en agua (150 ml) y se extrajo con tetrahidrofurano/acetato de etilo 1:1 v/v (4x50 ml), los extractos orgánicos agrupados se lavaron con solución hipersalina (2x40 ml), se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron al vacío hasta producir un sólido amarillo. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía utilizando un gradiente de sílice eluido con 30% a 70% v/v de acetato de etilo en hexanos. Las fracciones que contenían producto se agruparon y se concentraron al vacío, obteniendo terc-butil-éster de ácido {(R)-1-[4-carbamoil-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-2-il]-piperidín-3-il}-carbámico en forma de un sólido blanquecino (362 mg, 76%). CL/EM: m/z calculado para $C_{19}H_{26}N_6O_3S$ ($[M+H]^+$): 417,5. Observado: 417,4 (ionización mediante electropulverización en modo negativo).

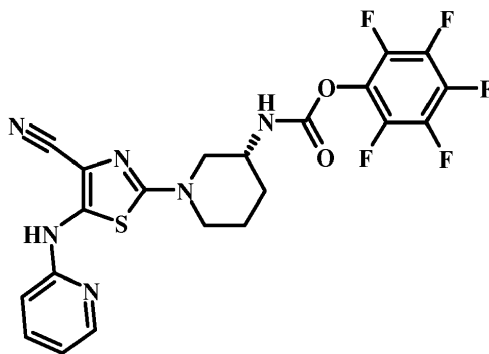
Ejemplo 2

{(R)-1-[4-carbamoil-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-2-il]-piperidín-3-il}-amida de ácido 1,3-dihidro-isoindol-2-carboxílico

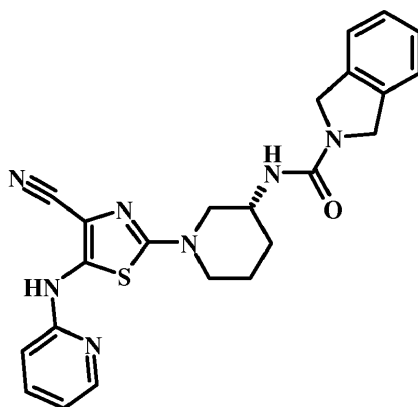


Etapla 1: preparación de 2-((R)-3-amino-piperidín-1-il)-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-4-carbonitrilo

A una solución de terc-butil-éster de ácido {(R)-1-[4-ciano-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-2-il]-piperidín-3-il}-carbámico (preparada tal como se indica en el Ejemplo 1, etapa 3) (20,2 mg, 50,4 μ moles) en diclorometano (0,5 ml) se añadió ácido trifluoroacético (1 ml, 13 mmoles) y la mezcla se agitó bajo argón a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el 2-((R)-3-amino-piperidín-1-il)-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-4-carbonitrilo en bruto se llevó a la etapa siguiente en la síntesis sin purificación adicional. CL/EM: m/z calculado para $C_{14}H_{16}N_6S$ ($[M+H]^+$): 301,4. Observado: 301,2 (ionización mediante electropulverización en modo positivo).

Etapla 2: preparación de pentafluorofenil-éster de ácido {(R)-1-[4-ciano-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-2-il]-piperidín-3-il}-carbámico

A una solución de 2-((R)-3-amino-piperidín-1-il)-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-4-carbonitrilo en bruto (~15 mg, ~50 μ moles) en tetrahidrofurano (1 ml) a 0°C bajo argón se añadió diisopropiletilamina (18 μ l, 100 μ moles) seguido de dipentafluorofenil-éster de ácido carbónico (22 mg, 55 μ moles). Se dejó que la mezcla de reacción se calentase lentamente hasta la temperatura ambiente y después se agitó durante 1 hora adicional. Se analizó una alícuota mediante CL-EM para garantizar que se completaba la reacción antes de someter la mezcla de reacción a la etapa siguiente en la secuencia sintética. CL/EM: m/z calculado para $C_{21}H_{15}F_5N_6O_2S$ ($[M+H]^+$): 511,5. Observado: 511,2 (ionización mediante electropulverización en modo positivo).

Etapla 3: preparación de {(R)-1-[4-ciano-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-2-il]-piperidín-3-il}-amida de ácido 1,3-dihidro-isoindol-2-carboxílico

Una solución de pentafluorofenil-éster de ácido {(R)-1-[4-ciano-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-2-il]-piperidín-3-il}-carbámico en bruto (~50 μ moles) en tetrahidrofurano (1 ml) se enfrió a 0°C bajo una atmósfera de argón e

isoindolina (12,6 mg, 106 μ moles) y diisopropiletilamina (20 μ l, 115 μ moles). Se agitó la mezcla de reacción a 0°C durante 1 hora y después se calentó hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora adicional. La reacción se desactivó mediante la adición de solución acuosa saturada de cloruro amónico (2 ml), se vertió en agua (10 ml) y se extrajo con acetato de etilo (4x5 ml). Los extractos orgánicos agrupados se lavaron con solución hipersalina (2x5 ml), se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía de fase inversa utilizando un gradiente de columna C-18 de 12 g eluyendo desde 10% de acetonitrilo en agua hasta 100% de acetonitrilo. Las fracciones que contenían producto se agruparon y se concentraron al vacío, produciendo un sólido amarillo. El sólido amarillo se introdujo en diclorometano, se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró al vacío, proporcionando {(R)-1-[4-ciano-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-2-il]-piperidín-3-il}-amida de ácido 1,3-dihidro-isoindol-2-carboxílico en forma de un aceite viscoso amarillo (11,3 mg, 50%).

CL/EM: m/z calculado para $C_{23}H_{23}N_7OS$ ($[M+H]^+$): 446,6. Observado: 446,3 (ionización mediante electropulverización en modo positivo).

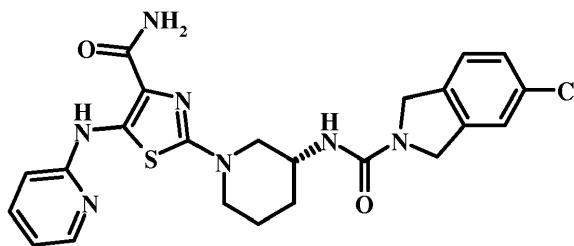
Etapas 4: preparación de {(R)-1-[4-carbamoil-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-2-il]-piperidín-3-il}-amida de ácido 1,3-dihidro-isoindol-2-carboxílico

A una solución de {(R)-1-[4-ciano-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-2-il]-piperidín-3-il}-amida de ácido 1,3-dihidro-isoindol-2-carboxílico (11,3 mg, 25,4 μ moles) en tetrahidrofurano/agua 10:1 v/v (volumen total: 2,75 ml) se añadió hidruro(ácido dimetilfosfinoso-kP)[hidrógeno bis(dimetilfosfino-kP)]platino (II) (CAS número 173416-05-2) (1,1 mg, 2,5 μ moles) y la mezcla se calentó bajo reflujo de argón. Tras 8 horas, la CL/EM indicó una conversión de aproximadamente ~30% en un único producto principal que mostraba el ión molecular del producto esperado. La mezcla de reacción se transfirió a un tubo resellable, se añadió una alícuota adicional de hidruro(ácido dimetilfosfinoso-kP)[hidrógeno bis(dimetilfosfino-kP)]platino (II) (1 mg, 2,3 μ moles) y el tubo se calentó a 80°C durante la noche. La CL-EM indicó el producto esperado como componente principal presente en la mezcla de reacción, aunque todavía se encontraba presente algo de material de partida. Se añadió una alícuota adicional de hidruro(ácido dimetilfosfinoso-kP)[hidrógeno bis(dimetilfosfino-kP)]platino (II) (1 mg, 2,3 μ moles) y el recipiente de reacción se calentó a 100°C durante 3,5 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía de fase inversa utilizando un gradiente de columna C-18 desde 10% de acetonitrilo en agua hasta 100% de acetonitrilo. Las fracciones que contenían producto se agruparon y se concentraron al vacío, obteniendo {(R)-1-[4-carbamoil-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-2-il]-piperidín-3-il}-amida de ácido 1,3-dihidroisoindol-2-carboxílico en forma de un sólido amarillo. Se purificó adicionalmente mediante HPLC de fase inversa utilizando un gradiente en columna C-18 de 30% a 100% de acetonitrilo en agua para eliminar una impureza que migraba en un nivel próximo. Las fracciones que contenían producto se agruparon y se concentraron al vacío y el residuo se liofilizó a partir de acetonitrilo/agua, obteniendo {(R)-1-[4-carbamoil-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-2-il]-piperidín-3-il}-amida de ácido 1,3-dihidroisoindol-2-carboxílico en forma de un sólido amarillo pálido (2,1 mg, 18%).

CL/EM: m/z calculado para $C_{23}H_{25}N_7O_2S$ ($[M+H]^+$): 464,6. Observado: 464,3 (ionización mediante electropulverización en modo positivo).

Ejemplo 3

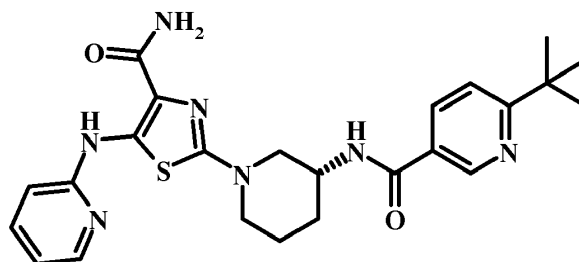
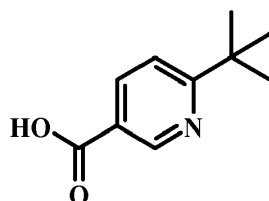
(R)-2-(3-(5-cloroisoindolín-2-carboxamido)piperidín-1-il)-5-(piridín-2-ilamino)tiazol-4-carboxamida



Se preparó mediante la misma ruta sintética indicada en el Ejemplo 2, excepto en que (i) en la etapa 3, se utilizó hidrobromuro de 5-cloroisoindolina y 3 equivalentes de diisopropiletilamina en lugar de isoindolina y 1,1 equivalentes de diisopropiletilamina, e (ii) en la etapa 4, se llevó a cabo la reacción con 0,2 equivalentes de hidruro(ácido dimetilfosfinoso-kP)[hidrógeno bis(dimetilfosfino-kP)]platino (II) bajo calentamiento a 150°C con microondas en un tubo sellado. Tras la purificación mediante HPLC de fase inversa y la liofilización de las fracciones que contenían el producto, éste se obtuvo en forma de un sólido amarillo pálido.

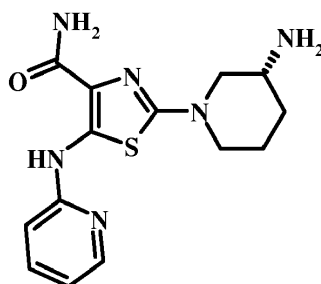
CL/EM: m/z calculado para $C_{23}H_{24}ClN_7O_2S$ ($[M+H]^+$): 499,0. Observado: 498,3 y 500,3 (proporción de intensidades 3:1, consistente con la presencia de 1 átomo de cloro) (ionización mediante electropulverización en modo positivo).

Ejemplo 4

(R)-2-(3-(6-terc-butilnicotinamido)piperidín-1-il)-5-(piridín-2-ilamino)tiazol-4-carboxamidaEtapas 1: preparación de ácido 6-terc-butilnicotínico

A una suspensión de ácido nicotínico (2,00 g, 16,2 mmoles) en agua (250 ml) se añadió ácido sulfúrico concentrado (1 ml, 18,8 mmoles) y la mezcla se agitó bajo nitrógeno para formar una solución transparente. Se añadió ácido píválico (1,83 g, 17,9 mmoles) y se continuó la agitación bajo nitrógeno a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadió nitrato de plata (125 mg, 0,74 mmoles) seguido de persulfato amónico (295 mg, 1,3 mmoles); el matraz se envolvió en hoja de aluminio para excluir la luz y la mezcla se calentó a 90°C bajo nitrógeno. Tras 2 horas, la mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y la mezcla acuosa se concentró al vacío formando un sólido incoloro. Se trituró el sólido con tetrahidrofurano y se filtró. Se retrituyó el residuo sólido con metanol y se filtró. Se agruparon ambos filtrados y se concentraron al vacío. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía de fase inversa utilizando un gradiente de columna C-18 de 85 g eluyendo desde 10% de acetonitrilo en agua hasta 100% de acetonitrilo. Las fracciones que contenían producto se agruparon y se concentraron al vacío. El residuo se liofilizó a partir de agua, proporcionando ácido 6-terc-butilnicotínico en forma de un sólido incoloro (139 mg, 4%).

CL/EM: m/z calculado para $C_{10}H_{13}NO_2$ ($[M+H]^+$): 180,2. Observado: 180,1 (ionización mediante electropulverización en modo positivo).

Etapas 2: preparación de amida de ácido 2-((R)-3-amino-piperidín-1-il)-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-4-carboxílico

A una suspensión de terc-butil-éster de ácido {1-[4-carbamoyl-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-2-il]-piperidín-3-il}-carbámico (preparada tal como se indica en el Ejemplo 1) (359 mg, 0,86 mmoles) en diclorometano (10 ml) se añadió ácido trifluoroacético (10 ml, 130 mmoles), formando una solución amarilla. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se evaporó a sequedad al vacío. El residuo se introdujo en diclorometano (25 ml) y se lavó con solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato sódico (100 ml). Se separó la capa orgánica y la capa acuosa se extrajo con diclorometano (5x20 ml) hasta que ya no pudo extraerse más color amarillo en la capa orgánica. Los extractos orgánicos agrupados se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron al vacío, proporcionando amida de ácido 2-((R)-3-amino-piperidín-1-il)-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-4-carboxílico en forma de un sólido amarillo (280 mg).

CL/EM: m/z calculado para $C_{14}H_{18}N_6OS$ ($[M+H]^+$): 319,4. Observado: 319,1 (ionización mediante electropulverización en modo positivo).

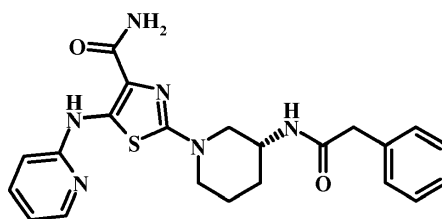
Etapas 3: preparación de (R)-2-(3-(6-terc-butilnicotinamido)piperidín-1-il)-5-(piridín-2-ilamino)tiazol-4-carboxamida

A una solución de ácido 6-terc-butilnicotínico (23,5 mg, 131 μ moles) y amida de ácido 2-((R)-3-amino-piperidín-1-il)-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-4-carboxílico (38 mg, 119 μ moles) en N,N-dimetilformamida (1 ml) se añadió diisopropiletilamina (35 μ l, 200 μ moles) seguido de hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (61 mg, 161 μ moles). Tras agitar a temperatura ambiente durante la noche bajo una atmósfera de argón, la reacción se desactivó mediante la adición de solución acuosa saturada de cloruro amónico (2 ml), la mezcla se vertió en agua (5 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3x3 ml). Los extractos orgánicos agrupados se lavaron con solución hipersalina (2x2 ml), se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron al vacío, formando un sólido amarillo. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía utilizando un gradiente de columna C-18 de 13 g eluyendo desde 10% de acetonitrilo en agua hasta 100% de acetonitrilo. Las fracciones que contenían producto se agruparon y se concentraron al vacío y el residuo se liofilizó a partir de acetonitrilo/agua, obteniendo (R)-2-(3-(6-terc-butilnicotinamido)piperidín-1-il)-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-4-carboxamida en forma de un sólido amarillo pálido (37,8 mg, 66%).

CL/EM: m/z calculado para $C_{24}H_{29}N_7O_2S$ ($[M+H]^+$): 480,6. Observado: 480,3 (ionización mediante electropulverización en modo positivo).

Ejemplo 5

(R)-2-(3-(2-fenilacetamido)piperidín-1-il)-5-(piridín-2-ilamino)tiazol-4-carboxamida

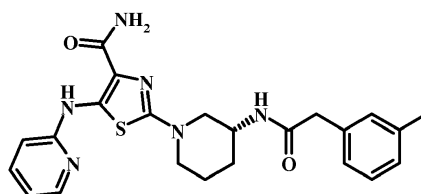


Se preparó mediante la ruta sintética indicada en el Ejemplo 4, excepto en que se utilizó ácido 2-fenilacético (17,9 mg, 131 μ moles) en lugar de ácido 6-terc-butilnicotínico. Se obtuvo (R)-2-(3-(2-fenilacetamido)piperidín-1-il)-5-(piridín-2-ilamino)tiazol-4-carboxamida en forma de un sólido amarillo pálido (59%).

CL/EM: m/z calculado para $C_{22}H_{24}N_6O_2S$ ($[M+H]^+$): 437,5. Observado: 437,3 (ionización mediante electropulverización en modo positivo).

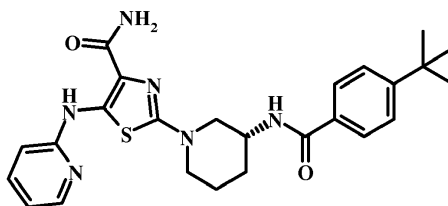
Ejemplo 6

(R)-5-(piridín-2-ilamino)-2-(3-(2-m-tolilacetamido)piperidín-1-il)tiazol-4-carboxamida



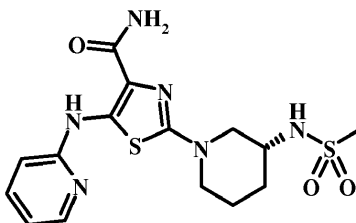
Se preparó mediante la ruta sintética indicada en el Ejemplo 4, excepto en que se utilizó ácido 2-m-tolil-acético (19,7 mg, 131 μ moles) en lugar de ácido 6-terc-butilnicotínico. Se obtuvo (R)-5-(piridín-2-ilamino)-2-(3-(2-m-tolilacetamido)piperidín-1-il)tiazol-4-carboxamida en forma de un sólido amarillo pálido (49%).

CL/EM: m/z calculado para $C_{23}H_{26}N_6O_2S$ ($[M+H]^+$): 451,6. Observado: 451,3 (ionización mediante electropulverización en modo positivo).

Ejemplo 7(R)-2-(3-(4-terc-butilbenzamido)piperidín-1-il)-5-(piridín-2-ilamino)tiazol-4-carboxamida

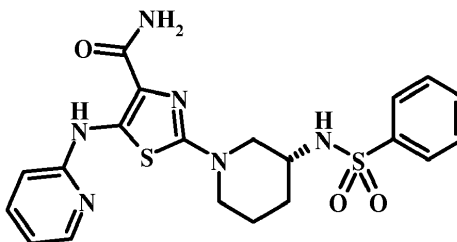
Se preparó mediante la ruta sintética indicada en el Ejemplo 4, excepto en que se utilizó ácido 4-terc-butilbenzoico (23,4 mg, 131 μ moles) en lugar de ácido 6-terc-butilnicotínico. Se obtuvo (R)-2-(3-(4-terc-butilbenzamido)piperidín-1-il)-5-(piridín-2-ilamino)tiazol-4-carboxamida en forma de un sólido amarillo pálido (68%).

CL/EM: m/z calculado para $C_{25}H_{30}N_6O_2S$ ($[M+H]^+$): 479.6. Observado: 479,3 (ionización mediante electropulverización en modo positivo).

Ejemplo 8(R)-2-(3-(2-metilsulfonamido)piperidín-1-il)-5-(piridín-2-ilamino)tiazol-4-carboxamida

A una suspensión de amida de ácido 2-((R)-3-amino-piperidín-1-il)-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-4-carboxílico (preparada tal como se indica en el Ejemplo 4) (5,6 mg, 171 μ moles) en tetrahidrofurano (1 ml) se añadió N,N-dimetilformamida (0,5 ml), formando una solución transparente. Se añadió diisopropiletilamina (59,9 μ l, 343 μ moles) seguido de cloruro de metanosulfonilo (20 μ l, 257 μ moles) y la mezcla se dejó bajo agitación durante la noche a temperatura ambiente bajo argón. La mezcla de reacción se desactivó mediante la adición de solución acuosa saturada de cloruro amónico (2 ml), se vertió en agua (5 ml) y se extrajo con acetato de etilo (5x2 ml), los extractos orgánicos agrupados se lavaron con solución hipersalina (2x2 ml), se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía de fase inversa utilizando un gradiente de columna C-18 eluyendo desde 10% de acetonitrilo en agua hasta 100% de acetonitrilo. Las fracciones que contenían producto se agruparon y se concentraron al vacío. El residuo se liofilizó a partir de agua/etanol, proporcionando (R)-2-(3-(metilsulfonamido)piperidín-1-il)-5-(piridín-2-ilamino)tiazol-4-carboxamida en forma de unos polvos liofilizados blanquecinos (41 mg, 60%).

CL/EM: m/z calculado para $C_{15}H_{20}NO_3S_2$ ($[M+H]^+$): 397.5. Observado: 397,2 (ionización mediante electropulverización en modo positivo).

Ejemplo 9(R)-2-(3-(fenilsulfonamido)piperidín-1-il)-5-(piridín-2-ilamino)tiazol-4-carboxamida

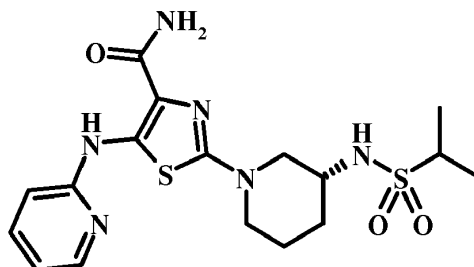
Se preparó mediante la ruta sintética indicada en el Ejemplo 8, excepto en que se utilizó cloruro de bencenosulfonilo (33 μ l, 257 μ moles) en lugar de cloruro de metanosulfonilo. Se obtuvo (R)-2-(3-(fenilsulfonamido)piperidín-1-il)-5-(piridín-2-ilamino)tiazol-4-carboxamida en forma de un sólido amarillo pálido (23%).

CL/EM: m/z calculado para $C_{20}H_{22}N_6O_3S_2$ ($[M+H]^+$): 459.6. Observado: 459,3 (ionización mediante electropulverización en modo positivo).

Ejemplo 10

5

(R)-2-(3-(1-metilsulfonamido)piperidín-1-il)-5-(piridín-2-ilamino)tiazol-4-carboxamida

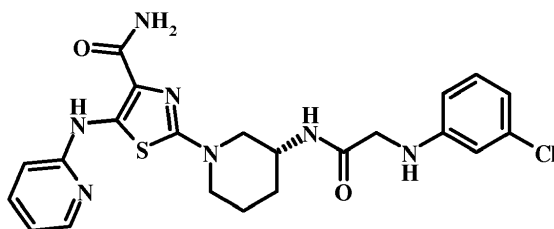


10 Se preparó mediante la ruta sintética indicada en el Ejemplo 8, excepto en que se utilizó cloruro de propano-2-sulfonilo (30 μ l, 257 μ moles) en lugar de cloruro de metanosulfonilo. Se obtuvo (R)-2-(3-(1-metiletilsulfonamido)piperidín-1-il)-5-(piridín-2-ilamino)tiazol-4-carboxamida en forma de un sólido amarillo pálido (4%).

15 CL/EM: m/z calculado para $C_{17}H_{24}N_6O_3S_2$ ($[M+H]^+$): 425.6. Observado: 425,3 (ionización mediante electropulverización en modo positivo).

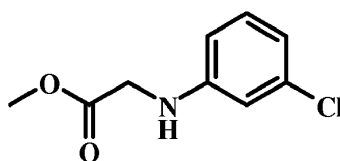
Ejemplo 11

20 (R)-2-(3-(2-(3-clorofenilamido)acetamido)piperidín-1-il)-5-(piridín-2-ilamino)tiazol-4-carboxamida



Etapas 1: preparación de metil-éster de ácido (3-cloro-fenilamino)-acético

25



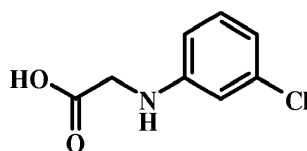
30 Se disolvió bromoacetato de metilo (8,3 g, 54,3 mmoles), 3-cloroanilina (8,31 g, 65,1 mmoles) y diisopropiletilamina (7,01 g, 54,3 mmoles) en N,N-dimetilformamida (20 ml), proporcionando una solución amarillo pálido, y la mezcla de reacción se calentó a 60°C durante la noche. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se diluyó con acetato de etilo y se lavó con solución hipersalina. La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró al vacío, proporcionando metil-éster de ácido (3-cloro-fenilamino)-acético en forma de un sólido que se lavó con hexanos, se filtró y se secó (10,2 g, 96%).

35

CL/EM: m/z calculado para $C_9H_{10}ClNO_2$ ($[M+H]^+$): 200.6. Observado: 200,0 (ionización mediante electropulverización en modo positivo).

Etapas 2: preparación de ácido (3-cloro-fenilamino)-acético

40



Se agrupó metil-éster de ácido (3-cloro-fenilamino)-acético (4 g, 20,0 mmoles) e hidróxido sódico (4,00 g, 100 mmoles) en etanol (60,0 ml) y agua (10 ml), proporcionando una solución amarillo pálido que se calentó a 60°C durante 4 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se diluyó con acetato de etilo y se lavó con ácido hidroclicórico acuoso 1 M. Se separó la capa orgánica, se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró al vacío, proporcionando ácido (3-cloro-fenilamino)-acético en forma de un sólido marrón (3,20 g, 86%).

CL/EM: m/z calculado para $C_8H_8ClNO_2$ ($[M+H]^+$): 186.0. Observado: 186,0 (ionización mediante electropulverización en modo positivo).

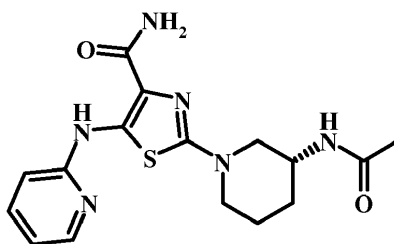
Etapas 3: preparación de (R)-2-(3-(2-(3-clorofenilamido)acetamido)piperidín-1-il)-5-(piridín-2-ilamino)tiazol-4-carboxamida

Se preparó mediante la ruta sintética indicada en el Ejemplo 4, excepto en que se utilizó ácido (3-cloro-fenilamino)-acético en lugar de ácido 6-terc-butilnicotínico. Se obtuvo (R)-2-(3-(2-(3-clorofenilamido)acetamido)piperidín-1-il)-5-(piridín-2-ilamino)tiazol-4-carboxamida en forma de un sólido amarillo pálido (63%).

CL/EM: m/z calculado para $C_{22}H_{24}ClN_7O_2S$ ($[M+H]^+$): 487.0. Observado: 486,3 y 488,3 (proporción de intensidades 3:1, consistente con la presencia de 1 átomo de cloro) (ionización mediante electropulverización en modo positivo).

Ejemplo 12

(R)-2-(3-acetamidopiperidín-1-il)-5-(piridín-2-ilamino)tiazol-4-carboxamida



Se preparó mediante la ruta sintética indicada en el Ejemplo 4, excepto en que se utilizó ácido acético en lugar de ácido 6-terc-butilnicotínico. Se obtuvo (R)-2-(3-acetamidopiperidín-1-il)-5-(piridín-2-ilamino)tiazol-4-carboxamida en forma de un sólido amarillo pálido (75%).

CL/EM: m/z calculado para $C_{16}H_{20}N_6O_2S$ ($[M+H]^+$): 361.4. Observado: 361,3 (ionización mediante electropulverización en modo positivo).

Ejemplo biológicos

Ensayo de inhibición de tirosina quinasa de Bruton (Btk)

El ensayo es una captura de producto fosforilado con ^{33}P radioactivo mediante filtración. Las interacciones de Btk, sustrato de péptido SH₂ biotinilado (homología de Src) y ATP condujeron a la fosforilación del sustrato peptídico. El producto biotinilado es ligado por las perlas de sefarosa con estreptavidina. Los productos marcados radioactivamente ligados son detectados con un contador de centelleo.

Las placas sometidas a ensayo de 96 pocillos de polipropileno (Greiner) y de 96 pocillos de filtración de 1,2 µm de PVDF hidrofílico (Millipore). Las concentraciones que se indican en la presente memoria son concentraciones de ensayo finales: compuestos 10 a 100 µM en DMSO (Burdick y Jackson), enzima Btk 5 a 10 nM (etiquetada con His, de longitud completa), sustrato peptídico 30 µM (Biotina-Aca-AAEEIYGEI-NH₂), ATP 100 µM (Sigma), imidazol 8 mM (Sigma, pH 7,2), glicerol-2-fosfato 8 mM (Sigma), EGTA 200 µM (Roche Diagnostics), MnCl₂ 1 mM (Sigma), MgCl₂ 20 mM (Sigma), BSA 0,1 mg/ml (Sigma), DTT 2 mM (Sigma), ^{33}P -ATP 1 µCi (Amersham), perlas de sefarosa-estreptavidina al 20% (Amersham), EDTA 50 mM (Gibco), NaCl 2 M (Gibco), NaCl 2 M con ácido fosfórico al 1% (Gibco), microscint-20 (Perkin Elmer).

Las determinaciones de IC₅₀ se realizaron a partir de 10 puntos de datos de cada compuesto, utilizando datos producidos en un molde de ensayo de placa estándar de 96 pocillos. Se sometieron a ensayo un compuesto de control y siete inhibidores desconocidos en cada placa y se utilizó cada placa dos veces. Típicamente los compuestos se diluyeron semilogarítmicamente partiendo de 100 µM y finalizando en 3 nM. El compuesto de control era estaurosporina. Se obtuvo un conteo del nivel de fondo en ausencia de sustrato peptídico. Se determinó la actividad total en presencia de sustrato peptídico. Se utilizó el protocolo siguiente para determinar la inhibición de Btk.

1) Preparación de muestras: los compuestos de ensayo se diluyeron en incrementos semilogarítmicos en tampón de ensayo (imidazol, glicerol-2-fosfato, EGTA, MnCl_2 , MgCl_2 , BSA).

2) Preparación de perlas:

a.) enjuagar las perlas mediante centrifugación a 500 g

b.) reconstituir las perlas con PBS y EDTA para producir una suspensión de perlas al 20%

3) Preincubación de la mezcla de reacción sin sustrato (tampón de ensayo, DTT, ATP, $\text{ATP-}^{33}\text{P}$) y mezcla con sustrato (tampón de ensayo, DTT, ATP, $\text{ATP-}^{33}\text{P}$, sustrato peptídico) a 30°C durante 15 min.

4) Para iniciar el ensayo, preincubar 10 ml de Btk en tampón enzimático (imidazol, glicerol-2-fosfato, BSA) y 10 μl de compuestos de ensayo durante 10 min. a TA.

5) Adición de 30 μl de mezcla de reacción sin o con sustrato a Btk y compuestos.

6) Incubación de 50 μl de mezcla de ensayo total durante 30 min. a 30°C.

7) Transferencia de 40 μl de ensayo a 150 μl de suspensión de perlas en la placa de filtración para detener la reacción.

8) Lavado de placa de filtración tras 30 min., con las etapas siguientes:

a. 3 x 250 μl de NaCl

b. 3 x 250 μl de NaCl que contenía ácido fosfórico al 1%

c. 1 x 250 μl de H_2O

9) Secado de la placa durante 1 h a 65°C o durante la noche a TA

10) Adición de 50 μl de microscint-20 y recuento de cpm de ^{33}P en el contador de centelleo.

Cálculo del porcentaje de actividad a partir de los datos en bruto, en cpm:

$$\text{porcentaje de actividad} = (\text{muestra-fondo}) / (\text{actividad total-fondo}) \times 100$$

Cálculo de la IC_{50} a partir del porcentaje de actividad, utilizando un modelo sigmoidal de dosis-respuesta de un sitio

$$y = A + ((B - A) / (1 + ((x / C)^D)))$$

x = conc. de comp., y = % de actividad, A = min, B = max, C = IC_{50} , D = 1 (pendiente de Hill)

Ensayo de TR-FRET (FRET con resolución temporal) de inhibición de tirosina quinasa de Bruton (Btk)

Este ensayo de competición de Btk mide la potencia del compuesto (IC_{50}) con el estado inactivado de la tirosina quinasa de Bruton utilizando tecnología de FRET (transferencia de energía por resonancia fluorescente/de Förster). Se incubó el complejo Btk-Eu sobre hielo durante una hora antes de utilizarlo a una concentración inicial de 50 nM de Btk-Bioease[™]: Eu-estreptavidina 10 nM (Perkin-Elmer n° de catálogo AD0062). El tampón de ensayo consistía de HEPES 20 mM (pH 7,15), DTT 0,1 mM, MgCl_2 10 mM, BSA 0,5 mg/ml con estabilizador de quinasa al 3% (Fremont Biosolutions, n° de catálogo STB-K02). Tras 1 h, la mezcla de reacción anterior se diluyó 10 veces en tampón de ensayo, preparando Btk 5 nM: complejo de Eu-estreptavidina 1 nM (fluoróforo donante). A continuación, se dispensaron 18 μl de una mezcla de Btk-Eu 0,11 nM y trazador quinasa 178 0,11 nM (Invitrogen, n° de catálogo PV5593) con Btk-Eu solo como control negativo, en placas de fondo plano de 384 pocillos (Greiner, 784076). Se prepararon los compuestos que debían someterse a ensayo, como concentraciones 10x y se llevó a cabo la dilución en serie en incrementos semilogarítmicos en DMSO para generar curvas de 10 puntos. Para iniciar la reacción de FRET, los compuestos preparados como solución madre 10x en DMSO se añadieron a las placas y éstas se incubaron durante 18 a 24 h a 14°C.

Tras la incubación, se leyeron las placas en un lector de placas fluorescentes BMG Pherastar (o equivalente) y se utilizó para medir la energía de emisión a partir del fluoróforo donante europio (emisión a 620 nm) y la FRET (emisión a 665 nm). Los valores de los pocillos de control negativo se promediaron para obtener el mínimo medio. Los valores de los pocillos de control positivo "no inhibidor" se promediaron para obtener el máximo medio. Se calculó el porcentaje de FRET máxima utilizando la ecuación siguiente:

$$\% \text{ de FRET}_{\text{max.}} = 100 \times [(FSR_{\text{comp.}} - FSR_{\text{min. media}}) / (FSR_{\text{max. media}} + FSR_{\text{min. media}})]$$

en la que FSR = proporción de señales de FRET. Se representaron en una gráficas las curvas de FRET de % del máx. en Activity Base (Excel) y se determinaron la IC₅₀ (%), la pendiente de Hill, z' y CV(%). La IC₅₀ media y la desviación estándar se obtuvieron a partir de curvas por duplicado (curvas de inhibición de singulete de dos diluciones independientes) utilizando Microsoft Excel.

5

Los datos de compuestos representativos para dicho ensayo se listan a continuación, en la Tabla II.

TABLA II

Compuesto	IC ₅₀ de FRET (μmoles)
1	0,2543
2	7,7352
3	1,2146
4	1,7288
5	6,2360
6	7,5064
7	0,4699
8	5,0651
9	1,6148
10	5,8038
11	5,3686
12	6,0271

10

Inhibición de la activación de las células B en sangre completa medida a partir de la expresión de CD69

Un procedimiento para someter a ensayo la capacidad de los inhibidores de Btk de suprimir la activación mediada por receptores de células B en la sangre humana es el siguiente:

15

Se obtuvo sangre humana completa (SHC) de voluntarios sanos, con las restricciones siguientes: no fumadores libres de fármacos durante 24 h. Se recolectó sangre mediante venipunción en tubos Vacutainer anticoagulados con heparina sódica. Se diluyeron los compuestos de ensayo a diez veces la concentración inicial deseada de fármaco en PBS (20x), seguido de diluciones en serie de tres veces en DMSO al 10% en PBS, produciendo una curva de dosis-respuesta de nueve puntos. Se añadieron 5,5 μl de cada dilución de compuesto por duplicado a una placa de fondo V de 96 pocillos de 2 ml (Analytical Sales and Services, n° 59623-23); se añadieron 5,5 μl de DMSO al 10% en PBS a los pocillos de control y sin estímulo. Se añadió SHC (100 μl) a cada pocillo y tras mezclas las placas, se incubaron a 37°C, con 5% de CO₂, 100% de humedad durante 30 minutos. Se añadió F(ab')₂ de cabra anti-IgM humana (Southern Biotech, n° 2022-14) (10 μl de una solución 500 μg/ml, concentración final: 50 μg/ml) a cada pocillo (excepto los pocillos sin estímulo) bajo agitación y las placas se incubaron durante 20 horas adicionales.

20

25

Al final de la incubación de 20 horas, las muestras se incubaron con anticuerpos marcados con sonda fluorescente (15 μl de anticuerpo de ratón anti-CD20 humano PE, BD Pharmingen, n° 555623 y/o 20 μl de anticuerpo de ratón anti-CD69 humano APC, BD Pharmingen, n° 555533) durante 30 minutos, a 37°C, con 5% de CO₂ y 100% de humedad. Se incluyeron control inducido, no teñidos y tinciones únicas para los ajustes compensatorios y configuración de voltaje inicial. A continuación, se lisaron las muestras con 1 ml de tampón de lisis 1X Pharmingen (BD Pharmingen, n° 555899) y las placas se centrifugaron a 1.800 rpm durante 5 minutos. Se eliminaron los sobrenadantes mediante succión y los pellets restantes se lisaron nuevamente con otro 1 ml de tampón de lisis 1x Pharmingen y se pelletizaron las placas tal como anteriormente. Se aspiraron los sobrenadantes y los pellets remanentes se lavaron en tampón FACS (PBS + FBS al 1%). Tras una centrifugación final, se eliminaron los sobrenadantes y los pellets se resuspendieron en 180 μl de tampón FACS. Se transfirieron las muestras a una placa de 96 pocillos adecuada para analizarla en el sistema de 96 pocillos HTS en el citómetro de flujo BD LSR II.

30

35

Utilizando longitudes de onda de excitación y emisión apropiadas para los fluoróforos utilizados, se adquirieron los datos y se obtuvieron los valores de porcentaje de celdas positivas se obtuvieron utilizando el software Cell Quest. Los resultados se analizaron inicialmente con el software de análisis de FACS (Flow Jo). La IC₅₀ de los compuestos de ensayo se define como la concentración que reduce en 50% el porcentaje de células positivas para CD69 que también son positivas para CD20 tras la estimulación con anti-IgM (media de 8 pocillos de control, tras restar la media de 8 pocillos de fondo sin estímulo). Los valores de IC₅₀ se calcularon utilizando el software XLfit, versión 3, ecuación 201.

40

45

Inhibición de la activación de las células B: ensayo FLIPR de células B en células Ramos

Se demostró la inhibición de la activación de las células B por parte de compuestos de la presente invención mediante la determinación del efecto de los compuestos de ensayo sobre respuestas de células B estimuladas por anti-IgM.

50

El ensayo FLIPR de células B es un método funcional celular para determinar el efecto de potenciales inhibidores del incremento del calcio intracelular a partir de la estimulación por un anticuerpo anti-IgM. Se cultivaron células Ramos (línea celular humana de linfoma de Burkitt, ATCC nº CRL-1596) en medio de crecimiento (descrito posteriormente). Un día antes del ensayo, las células Ramos se resuspendieron en medio de crecimiento fresco (el mismo que anteriormente) y se fijó una densidad de $0,5 \times 10^6$ /ml en matraces de cultivo de tejidos. El día del ensayo se realizó un recuento de las células y se fijó una densidad de 1×10^6 /ml en medio de crecimiento complementado con FLUO-3AM 1 μ M (TefLabs, nº de cat. 0116, preparado en DMSO anhidro y ácido plurónico al 10%) en un matraz de cultivo de tejidos, y se incubaron a 37°C (con 4% de CO₂) durante una h. Para eliminar el pigmento extracelular, se recolectaron las células mediante centrifugación (5 min., 1.000 rpm), se resuspendieron en tampón FLIPR (descrito posteriormente) a una densidad de 1×10^6 células/ml y después se dispensaron en placas negras/transparentes de 96 pocillos recubiertos con poli-D-lisina (BD, nº de cat. 356692) a una densidad de 1×10^5 células en cada pocillo. Se añadieron los compuestos de ensayo a diversas concentraciones comprendidas entre 100 μ M y 0,03 μ M (7 concentraciones, más información posteriormente) y se dejaron bajo incubación con células durante 30 min. a TA. Se estimuló la señalización de Ca²⁺ de las células Ramos mediante la adición de 10 μ g/ml de anti-IgM (Southern Biotech, nº de cat. 2020-01) y se midió en un FLIPR (Molecular Devices, imágenes de captura de placas de 96 pocillos utilizando una cámara CCD con un láser de argón a una longitud de onda de excitación de 480 nm).

Medios/tampones:

Medio de crecimiento: medio RPMI 1640 con L-glutamina (Invitrogen, nº de cat. 61870-010), suero de feto bovino al 10% (FBS, Summit Biotechnology, nº de cat. FP-100-05), piruvato sódico 1 mM (Invitrogen, nº de cat. 11360-070).

Tampón de FLIPR: HBSS (Invitrogen, nº de cat. 141175-079), CaCl₂ 2 mM (Sigma, nº de cat. C-4901), HEPES (Invitrogen, nº de cat. 15630-080), probenecid 2,5 mM (Sigma, nº de cat. P-8761), BSA al 0,1% (Sigma, nº de cat. A-7906), glucose 11mM (Sigma, nº de cat. G-7528).

Datos de dilución de compuestos:

Con el fin de conseguir la concentración de ensayo final más alta de 100 μ M, se añadieron 24 μ l de solución madre de compuesto 10 mM (preparada en DMSO) directamente en 576 μ l de tampón de FLIPR. Los compuestos de ensayo se diluyeron en tampón de FLIPR (utilizando un pipeteador robotizado Biomek 2000), resultando en el esquema de dilución siguiente: vehículo, $1,00 \times 10^{-4}$ M, $1,00 \times 10^{-5}$, $3,16 \times 10^{-6}$, $1,00 \times 10^{-6}$, $3,16 \times 10^{-7}$, $1,00 \times 10^{-7}$ y $3,16 \times 10^{-8}$.

Ensayo y análisis:

Los incrementos intracelulares de calcio se informaron utilizando un estadístico max-min (restando la línea base del pico causado por la adición del anticuerpo estimulador utilizando software de exportación de estadísticas y de control de FLIPR de Molecular Devices). Se determinó la IC₅₀ utilizando un ajuste de curvas no lineal (software GraphPad Prism).

Artritis inducida por colágeno en ratón (AICm)

El día 0 se inyectó en la base de la cola o en varios puntos del lomo de los ratones una emulsión de colágeno de tipo II (i.d.) en adyuvante completo de Freund (ACF). Tras la inmunización de colágeno, los animales desarrollan artritis tras aproximadamente 21 a 35 días. La aparición de la artritis está sincronizada (reforzada) por la administración sistémica de colágeno en adyuvante incompleto de Freund (AIF, i.d.) el día 21. Se examinaron los animales diariamente después del día 20 para cualquier inicio de artritis leve (puntuación de 1 o 2; ver la descripción de la puntuación posteriormente) que era la señal para realizar el refuerzo. Tras el refuerzo, se puntuaron los ratones y recibieron una dosis de agente terapéutico candidato durante el tiempo prescrito (típicamente 2 a 3 semanas) y la frecuencia de dosificación, diaria (QD) o dos veces al día (BID).

Artritis inducida por colágeno en rata (AICr)

El día 0 las ratas recibieron una inyección de una emulsión de colágeno de tipo II bovino en adyuvante incompleto de Freund (AIF), inyectado intradérmicamente (i.d.) en varios sitios del lomo. Se proporcionó una inyección de refuerzo de emulsión de colágeno aproximadamente el día 7 (i.d.) en la base de la cola o en sitios alternativos en el lomo. Se observó artritis generalmente 12 a 14 días después de la inyección inicial de colágeno. Los animales pueden evaluarse para el desarrollo de artritis tal como se indica posteriormente (evaluación de artritis) desde el día 14 y posteriormente. Los animales recibieron dosis de agentes terapéuticos candidatos de manera preventiva desde el momento del reto secundario y durante el tiempo prescrito (típicamente 2 a 3 semanas) y frecuencia de dosificación, diariamente (QD) o dos veces al día (BID).

Evaluación de la artritis:

En ambos modelos, se cuantificó el desarrollo de inflamación de las patas y articulaciones de las extremidades utilizando un sistema de puntuación que incluía la evaluación de las 4 patas siguiendo los criterios indicados a continuación:

- puntuación: 1=hinchazón y/o enrojecimiento de pata o un dedo.
- 2=hinchazón en dos o más articulaciones.
- 3=hinchazón gruesa de la pata con afectación de más de dos articulaciones.
- 4=artritis severa de la pata entera y dedos.

Las evaluaciones se realizaron el día 0 para la medición de la línea base y nuevamente empezando con los primeros signos de hinchazón durante hasta tres veces a la semana hasta el final del experimento. Se obtuvo el índice artrítico de cada ratón mediante la adición de las cuatro puntuación de las patas individuales, proporcionando una puntuación máxima de 16 a cada animal.

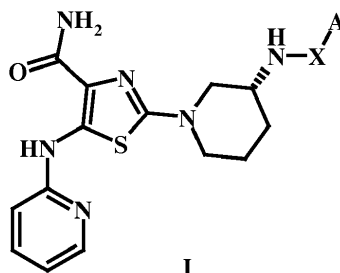
Modelo de asma *in vivo* en rata

Se sensibilizaron ratas Brown-Norway macho mediante inyección i.p. de 100 µg de OA (ovoalbúmina) en 0,2 ml de alúmina una vez cada semana durante tres semanas (días 0, 7 y 14). El día 21 (una semana después de la última sensibilización), las ratas recibieron una dosis q.d. de vehículo o de formulación de compuesto por vía subcutánea 0,5 horas antes del reto de aerosol de OA (OA al 1% durante 45 minutos) y fueron sacrificadas 4 o 24 horas después del reto. En el momento del sacrificio se recolectaron suero y plasma de todos los animales para análisis serológico y FC, respectivamente. Se insertó una cánula traqueal y se lavaron los pulmones 3X con PBS. Se analizó el líquido BAL para el número total de leucocitos y recuento diferencial de leucocitos. Se determinó el número total de leucocitos en una alícuota de las células (20 a 100 µl) con un contador Coulter. Para los recuentos diferenciales de leucocitos, se centrifugaron 50 a 200 µl de muestra en un Cytospin y el portaobjetos de tiñó con Diff-Quik. Se realizó un recuento de las proporciones de monocitos, eosinófilos, neutrófilos y linfocitos bajo microscopía óptica utilizando criterios morfológicos estándares y se expresaron como porcentajes. Los inhibidores representativos de Btk mostraban un recuento reducido del número total de leucocitos en el BAL de ratas sensibilizadas y retadas con OA comparado con los niveles de control.

La invención se ha descrito en cierto detalle a título ilustrativo y ejemplar, con fines de claridad y comprensión. Resultará evidente para el experto en la materia que los cambios y modificaciones que pueden llevarse a cabo dentro del alcance según las reivindicaciones adjuntas. Por lo tanto, debe entenderse que la descripción anteriormente proporcionada pretende ser ilustrativa y no limitativa. Por lo tanto, el alcance de la invención debe determinarse no en referencia a la descripción anteriormente proporcionada sino, por el contrario, debe determinarse en referencia a las reivindicaciones adjuntas a continuación.

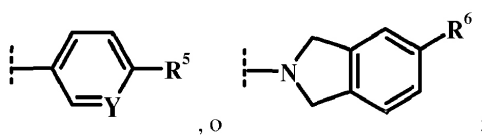
REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula I:

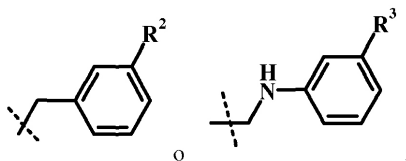


en la que:

A es alquilo C₁₋₆, fenilo, CH₂R¹, OR⁴,



R¹ es H,



R² es H o halo,

R³ es halo,

R⁴ es alquilo C₁₋₆,

R⁵ es alquilo C₁₋₆,

R⁶ es H o halo,

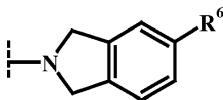
X es C(=O) o S(=O)₂, y

Y es CH o N,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que X es C(=O).

3. Compuesto según la reivindicación 1 o 2, en el que A es:

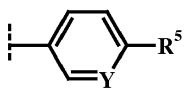


4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R⁶ es H.

5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R⁶ es Cl.

6. Compuesto según la reivindicación 2, en el que A es metilo o OR⁴ y R⁴ es *t*-butilo.

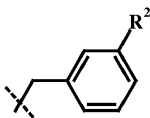
7. Compuesto según la reivindicación 2, en el que A es:



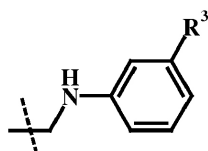
y R⁵ es *t*-butilo.

8. Compuesto según la reivindicación 7, en el que Y es N.
9. Compuesto según la reivindicación 7, en el que Y es CH.

5 10. Compuesto según la reivindicación 2, en el que A es:



- 10 11. Compuesto según la reivindicación 10, en el que R^2 es H.
12. Compuesto según la reivindicación 10, en el que R^2 es t-butilo.
13. Compuesto según la reivindicación 1, en el que $S(=O)_2$ y A es metilo, isopropilo o fenilo.
15 14. Compuesto según la reivindicación 2, en el que A es:



y R^3 es Cl.

20 15. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, seleccionado de entre el grupo que consiste de:

25 {(R)-1-[4-carbamoyl-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-2-il]-piperidín-3-il}-amida de ácido 1,3-dihidro-isoindol-2-carboxílico,
30 {(R)-1-[4-carbamoyl-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-2-il]-piperidín-3-il}-amida de ácido 5-cloro-1,3-dihidro-isoindol-2-carboxílico,
terc-butil-éster de ácido {(R)-1-[4-carbamoyl-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-2-il]-piperidín-3-il}-carbámico,
6-terc-butil-N-[(R)-1-[4-carbamoyl-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-2-il]-piperidín-3-il]-nicotinamida,
amida de ácido 2-[(R)-3-fenilacetilamino-piperidín-1-il]-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-4-carboxílico,
35 amida de ácido 5-(piridín-2-ilamino)-2-[(R)-3-(2-m-tolil-acetilamino)-piperidín-1-il]-tiazol-4-carboxílico,
amida de ácido 2-[(R)-3-(4-terc-butil-benzoilamino)-piperidín-1-il]-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-4-carboxílico,
amida de ácido 2-[(R)-3-metanosulfonilamino-piperidín-1-il]-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-4-carboxílico,
amida de ácido 2-[(R)-3-bencenosulfonilamino-piperidín-1-il]-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-4-carboxílico,
40 amida de ácido 2-[(R)-3-(propano-2-sulfonilamino)-piperidín-1-il]-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-4-carboxílico,
amida de ácido 2-[(R)-3-[2-(3-cloro-fenilamino)-acetilamino]-piperidín-1-il]-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-4-carboxílico y
amida de ácido 2-[(R)-3-acetilamino-piperidín-1-il]-5-(piridín-2-ilamino)-tiazol-4-carboxílico.

40 16. Composición farmacéutica que comprende el compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, mezclada con por lo menos un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

17. Utilización de un compuesto de fórmula I según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una condición inflamatoria y/o autoinmunitaria.

45 18. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para la utilización en el tratamiento de una condición inflamatoria y/o autoinmunitaria.

19. Compuesto para la utilización según la reivindicación 18 para el tratamiento de la artritis reumatoide.

50 20. Compuesto para la utilización según la reivindicación 18 para el tratamiento del asma.