

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 670**

51 Int. Cl.:

C07D 239/60 (2006.01)
C07D 239/38 (2006.01)
C07D 239/56 (2006.01)
C07D 239/47 (2006.01)
C07D 495/04 (2006.01)
C07D 403/12 (2006.01)
A61K 31/54 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.08.2010 PCT/US2010/045817**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **24.02.2011 WO11022440**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2010 E 10810519 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 2467142**

54 Título: **Derivados de 2-(pirimidin-5-il)-tiopirimidina como moduladores de Hsp70 y Hsc70 para el tratamiento de trastornos proliferativos**

30 Prioridad:
17.08.2009 US 272101 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.04.2017

73 Titular/es:
**MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER (100.0%)
1275 York Avenue
New York, NY 10065, US**

72 Inventor/es:
**CHIOSIS, GABRIELA;
TALDONE, TONY;
RODINA, ANNA;
PATEL, PALLAV y
KANG, YANLONG**

74 Agente/Representante:
LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 608 670 T3

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

DESCRIPCIÓN

Derivados de 2-(pirimidin-5-il)-tiopirimidina como moduladores de Hsp70 y Hsc70 para el tratamiento de trastornos proliferativos

5 La materia en el presente documento se hizo en parte con la ayuda gubernamental en virtud de NIH R01 CA119001. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

Campo

10 Se describen en la presente compuestos representados por las fórmulas generales divulgadas en la presente o una sal farmacológicamente aceptable del mismo; las composiciones farmacéuticas que contiene el compuesto; métodos para producir el compuesto; a métodos para usar el compuesto para tratar y/o prevenir varias malignidades o enfermedades de proliferación; métodos para usar el compuesto para identificar materia que trata y/o previene varias malignidades o trastornos de proliferación; métodos para usar el compuesto para identificar biomarcadores para el desarrollo clínico de materia para tratar y/o prevenir varias malignidades o trastornos de proliferación; y a métodos para usar el compuesto para identificar su uso racional en terapias de combinación. En particular, la presente materia se refiere a un compuesto de la reivindicación 1 que es un modulador de molécula pequeña de la proteína 70 de choque térmico (Hsp70). En otra modalidat, la materia se refiere a métodos para identificar, caracterizar, y usar esta molécula pequeña, de acuerdo con la reivindicación 12.

Antecedentes

20 Las células de cáncer expresan frecuentemente altos niveles de varias proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés) que aumentan la agresividad de estos tumores y también permite que las células sobrevivan a condiciones letales, incluyendo aniquilación por terapias. Además de conferir resistencia al tratamiento, la expresión elevada de HSP también facilita el cáncer al inhibir la muerte celular programada y el promover crecimiento autónomo.

25 Entre las HSP principales, están Hsp90 y Hsp70, proteínas que actúan de una manera interconectada pero también distinta para regular el fenotipo maligno. La Hsp90 mantiene la capacidad transformadora de varias onco-proteínas, entre las cuales HER2, AKT, RAF1, IGF-1R, y HIF-1, función facilitada por las isoformas de Hsc70, la Hsp70 constitutiva, Hsp70 inducible. En la inhibición de Hsp90, las onco-proteínas cliente de Hsp90 se llegan a desestabilizar y se degradan por una ruta proteosómica (Figura 1a). El factor de transcripción HSF-1, el principal regulador de la respuesta de choque térmico, es otro cliente de Hsp90, y diferentes onco-proteínas, se llegan a activar cuando se inhibe Hsp90. La activación de HSF-1 conduce a un incremento de los niveles de Hsp70, una respuesta de retroalimentación que limita la potencia de inhibidores de Hsp90 en ciertos tumores. La Hsp70 en sí misma es una poderosa molécula anti-apoptótica, sugiriendo que la inhibición de las vías apoptóticas tanto intrínsecas como extrínsecas por los niveles incrementados de Hsp70 puede ser responsable de reducir el efecto de la inhibición Hsp90. Además de inhibir la apoptosis y de ayudar a Hsp90, la Hsp70 y sus isoformas citosólicas altamente homólogas, sirven para muchas otras funciones chaperonas traslapadas y en algunos casos pueden sustituirse entre sí.

35 El complejo multi-chaperón de Hsp90 también llamada la maquinaria súper-chaperona de Hsp90, tiene papeles importantes en el desarrollo y progreso de transformación celular patogénica a través de la regulación de varias proteínas cliente de soporte e impulsión de malignidad. La actividad del sistema multi-chaperón de Hsp90 se mantiene y ejecuta por un sistema complejo de chaperones. Las Hsp70 (Hsc70 constitutivamente expresada y la Hsp70-1 y Hsp70-6 térmicamente inducible) participan en los pasos preliminares, en tanto que Hsp90 participa en etapas posteriores (Figura 1a). Su función requiere una multitud de co-chaperones, tal como los reguladores de Hsp70, Hsp40, Hsp110, BAG y HIP; la proteína organizadora de HSP (HOP), comprendida en la formación del complejo chaperón molecular intermedio donde el cliente se hace pasar de Hsp70 a Hsp90, y otros tal como p23, cdc37 e immunofilinas, que actúan en el complejo final o maduro de Hsp90 (Figura 1a). La inhibición de la maquinaria de Hsp90 a través de agentes que actúan por la unión directa a la cavidad reguladora de ATPasa de Hsp90, tal como geldanamicina (GM) y derivados PU PU24FC1 y PU-H71 (Figura 1b), interfiere con la formación de complejos maduros, dirigiendo las proteínas cliente hacia degradación proteosómica (Figura 1a). De manera interesante, la reducción en la actividad de Hsp90, pero no en la expresión de Hsp70 o los co-chaperones HOP, HIP, p23, y Hsp40, se reportó que activa dramáticamente HSF-1. Un resultado intrigante de esta observación es que la activación de HSF-1 no requiere Hsp70, diferente de los clientes de onco-proteína de la maquinaria de Hsp90.

50 En tanto que el significado de la inhibición directa de Hsp90 ahora está bien entendido, y se ha implementado en el desarrollo de inhibidores de molécula pequeña actualmente en evaluación clínica para múltiples cánceres, se conoce poco acerca de las maneras alternativas para intervenir en la actividad de la maquinaria Hsp90. La interferencia con la maquinaria de chaperones de manera diferente de la inhibición directa de Hsp90 puede diferenciar entre varias de sus funciones, y conferir actividades biológicas específicas.

55 El documento US 4 552 900 A se refiere a 3-(pirimidin-5-il-oxifenil)-1-benzoil-(tio)ureas, procesos para su preparación y su uso como agentes de combate de plagas, en particular como artropodocidas, por ejemplo, insecticidas.

- El documento US 2005/277654 A1 se refiere a 2-arilpirimidinas 4,5-disustituidas y al uso de tales compuestos para tratar una variedad de trastornos inflamatorios y del sistema inmunitario y como sondas para la localización de receptores de C5a.
- 5 El documento US 2005/070712 A1 se refiere a compuestos que son moduladores del receptor de grelina, la preparación de los compuestos, composiciones que contienen los compuestos y al uso de los compuestos en la prevención o el tratamiento de trastornos regulados por grelina.
- El documento US 2003/153584 A1 desvela métodos y compuestos útiles para la inhibición de trastornos convulsivos, que incluyen epilepsia. Los métodos y compuestos del documento US 2003/153584 A1 inhiben o previenen la icotogénesis y/o epileptogénesis. También se describen métodos de preparación de los compuestos.
- 10 El documento US 5 707 930 A se refiere a compuestos de pirimidina 4-cicloalquil-5-sustituidos que presentan actividad herbicida.
- El documento US 5 948 551 A se refiere al uso de compuestos conjugados que contienen dos o más anillos de pirimidina como parte del sistema conjugado como materiales de electroluminiscencia. Los compuestos conjugados que contienen anillos de pirimidina tienen una alta estabilidad térmica y una alta fotoestabilidad. Son parcialmente solubles en ácidos, que también hace posible el procesamiento de la disolución, además de por deposición de vapor.
- 15 El documento WO 2009/023846 A2 proporciona un método de tratamiento de un cáncer dependiente de Hsp70, que incluye: proporcionar al menos una célula cancerosa dependiente de Hsp70; poner en contacto la al menos una célula con una concentración subeficaz de un compuesto de dihidropirimidina; y poner en contacto la al menos una célula con una concentración subeficaz de un inhibidor del proteasoma, en el que la concentración subeficaz del compuesto de dihidropirimidina y la concentración subeficaz del inhibidor del proteasoma tienen un efecto sinérgico sobre la al menos una célula.
- 20 El documento WO 2007/131034 A1 se refiere a la identificación y uso de compuestos que modulan la actividad de Hsp70. Por ejemplo, el documento WO 2007/131034 A1 proporciona moléculas pequeñas y composiciones, además de composiciones terapéuticas y usos de compuestos de molécula pequeña específicos.
- 25 El documento WO 2005/021552 A1 se refiere a compuestos de tieno[2,3-d]pirimidina bicíclica sustituida (denominada en el presente documento 'pirimidotiofeno') que tienen actividad inhibidora de HSP90, al uso de tales compuestos en medicina, en relación con enfermedades que son sensibles a la inhibición de actividad de HSP90 tal como cánceres, y a composiciones farmacéuticas que contienen tales compuestos.
- 30 El documento WO 2009/067081 A1 se refiere a derivados de pirimidina, procesos para su preparación, composiciones farmacéuticas que los contienen y a su uso en terapia.
- El documento WO 02/060450 A1 desvela compuestos, y sales, solvatos y profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos, útiles en tratar terapéuticamente y/o profilácticamente pacientes con una enfermedad. Tales enfermedades incluyen cáncer, e infecciones secundarias producidas por *Pneumocystis carinii*, *Toxoplasma gondii*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium avium*. Los propios compuestos, métodos de preparación de estos compuestos, y métodos de uso de estos compuestos se desvelan todos. Los compuestos incluyen 5-tiapirimidinas.
- 35 El documento WO 02/24681 A2 proporciona derivados de pirazina que inhiben la actividad de tirosina cinasa. Ciertos derivados de pirazina son inhibidores selectivos de la tirosina cinasa del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). El documento WO 02/24681 A2 también proporciona formulaciones farmacéuticas que contienen los derivados de pirazina y métodos de uso de estas formulaciones como agentes antitumorales y para tratar cánceres de tumor sólido, angiogénesis, retinopatía diabética, artritis reumatoide, endometriosis y psoriasis.
- 40 El documento WO 2006/101977 A2 se refiere generalmente al uso de compuestos para tratar una variedad de trastornos, enfermedades y afecciones patológicas, y más específicamente al uso de compuestos de pirimidina para tratar diversos trastornos.
- 45 El documento WO 2008/153042 A1 desvela un agente antitumoral que comprende, como principio activo, un derivado de pirazol o un profármaco o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- El documento WO 2008/026768 A1 se refiere a novedosos derivados de aminopiridina que son útiles en el campo farmacéutico, y más particularmente, a aquellos que inhiben el crecimiento de células tumorales basándose en una acción inhibidora selectiva de Aurora A y presentan un efecto antitumoral, y también a un inhibidor selectivo de Aurora A y un agente antitumoral que los contiene.
- 50 El documento US 4 552 900 A se refiere a 3-(pirimidin-5-il-oxifenil)-1-benzoil-(tio)ureas, procesos para su preparación y

su uso como agentes de combate de plagas, en particular como artropodicidas, por ejemplo, insecticidas.

El documento US 2005/277654 A1 se refiere a 2-arilpirimidinas 4,5-disustituidas y al uso de tales compuestos para tratar una variedad de trastornos inflamatorios y del sistema inmunitario y como sondas para la localización de receptores de C5a.

5 El documento US 2005/070712 A1 se refiere a compuestos que son moduladores del receptor de grelina, la preparación de los compuestos, composiciones que contienen los compuestos y al uso de los compuestos en la prevención o el tratamiento de trastornos regulados por grelina.

10 El documento US 2003/153584 A1 desvela métodos y compuestos útiles para la inhibición de trastornos convulsivos, que incluyen epilepsia. Los métodos y compuestos del documento US 2003/153584 A1 inhiben o previenen la icogénesis y/o epileptogénesis. También se describen métodos de preparación de los compuestos.

El documento US 5 707 930 A se refiere a compuestos de pirimidina 4-cicloalquil-5-sustituidos que presentan actividad herbicida.

15 El documento US 5 948 551 A se refiere al uso de compuestos conjugados que contienen dos o más anillos de pirimidina como parte del sistema conjugado como materiales de electroluminiscencia. Los compuestos conjugados que contienen anillos de pirimidina tienen una alta estabilidad térmica y una alta fotoestabilidad. Son parcialmente solubles en ácidos, que también hace posible el procesamiento de la disolución, además de por deposición de vapor.

20 El documento WO 2009/023846 A2 proporciona un método de tratamiento de un cáncer dependiente de Hsp70, que incluye: proporcionar al menos una célula cancerosa dependiente de Hsp70; poner en contacto la al menos una célula con una concentración subeficaz de un compuesto de dihidropirimidina; y poner en contacto la al menos una célula con una concentración subeficaz de un inhibidor del proteasoma, en el que la concentración subeficaz del compuesto de dihidropirimidina y la concentración subeficaz del inhibidor del proteasoma tienen un efecto sinérgico sobre la al menos una célula.

25 El documento WO 2007/131034 A1 se refiere a la identificación y uso de compuestos que modulan la actividad de Hsp70. Por ejemplo, el documento WO 2007/131034 A1 proporciona moléculas pequeñas y composiciones, además de composiciones terapéuticas y usos de compuestos de molécula pequeña específicos.

El documento WO 2005/021552 A1 se refiere a compuestos de tieno[2,3-d]pirimidina bicíclica sustituida (denominada en el presente documento 'pirimidotiofeno') que tienen actividad inhibidora de HSP90, al uso de tales compuestos en medicina, en relación con enfermedades que son sensibles a la inhibición de actividad de HSP90 tal como cánceres, y a composiciones farmacéuticas que contienen tales compuestos.

30 El documento WO 2009/067081 A1 se refiere a derivados de pirimidina, procesos para su preparación, composiciones farmacéuticas que los contienen y a su uso en terapia.

35 El documento WO 02/060450 A1 desvela compuestos, y sales, solvatos y profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos, útiles en tratar terapéuticamente y/o profilácticamente pacientes con una enfermedad. Tales enfermedades incluyen cáncer, e infecciones secundarias producidas por Pneumocystis carinii, Toxoplasma gondii, Mycobacterium tuberculosis y Mycobacterium avium. Los propios compuestos, métodos de preparación de estos compuestos, y métodos de uso de estos compuestos se desvelan todos. Los compuestos incluyen 5-tiapirimidinas.

40 El documento WO 02/24681 A2 proporciona derivados de pirazina que inhiben la actividad de tirosina cinasa. Ciertos derivados de pirazina son inhibidores selectivos de la tirosina cinasa del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). El documento WO 02/24681 A2 también proporciona formulaciones farmacéuticas que contienen los derivados de pirazina y métodos de uso de estas formulaciones como agentes antitumorales y para tratar cánceres de tumor sólido, angiogénesis, retinopatía diabética, artritis reumatoide, endometriosis y psoriasis.

El documento WO 2006/101977 A2 se refiere generalmente al uso de compuestos para tratar una variedad de trastornos, enfermedades y afecciones patológicas, y más específicamente al uso de compuestos de pirimidina para tratar diversos trastornos.

45 El documento WO 2008/153042 A1 desvela un agente antitumoral que comprende, como principio activo, un derivado de pirazol o un profármaco o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

El documento WO 2008/026768 A1 se refiere a novedosos derivados de aminopiridina que son útiles en el campo farmacéutico, y más particularmente, a aquellos que inhiben el crecimiento de células tumorales basándose en una acción inhibitoria selectiva de Aurora A y presentan un efecto antitumoral, y también a un inhibidor selectivo de Aurora A y un agente antitumoral que los contiene.

5 Resumen

Tomadas conjuntamente, considerando la interacción compleja entre las HSP en cáncer y la dependencia intrínseca de células tumorales en estas proteínas, no es sorprendente que, en la inhibición de HSP, las células desarrollan mecanismos para equilibrar su pérdida funcional por la acción de otra HSP. En consecuencia, es más probable que tengan éxito de forma terapéutica los planteamientos tal como aquellos descritos en la materia de la presente que tienen como objetivo simultáneamente más de una HSP.

De esta manera, la presente materia proporciona compuestos y métodos para diferenciar las dos funciones de la maquinaria molecular de Hsp90, específicamente la regulación de onco-proteínas y la supresión de HSF-1, al modular específicamente los chaperones Hsp70.

Se describen en la presente nuevos compuestos, y métodos para producir y usar los mismos. En una modalidad, los compuestos descritos en la presente pueden ser útiles para modular el crecimiento células, tal como por ejemplo, inhibir células malignas y/o incrementar la citotoxicidad contra células de cáncer. En otra modalidad, los compuestos descritos en la presente pueden funcionar como moduladores de la proteína 70 de choque térmico (Hsp70). Como tal, se ha descubierto que la modulación farmacológica de Hsp70 usando estos u otros compuestos tiene consecuencias benéficas sustanciales y muy amplias en células de cáncer. En aún otras modalidades, los compuestos descritos en la presente pueden perturbar la formación de los complejos de onco-proteína/maquinaria de Hsp90, que conduce a degradación proteosómica de varias onco-proteínas, sin interrumpir ni degradar las cinasas no oncogénicas. En modalidades adicionales, los efectos anti-cáncer de los compuestos descritos en la presente pueden comprender, por ejemplo, la inhibición de la proliferación, el bloque específico de la transformación del ciclo celular, la inducción de la apoptosis o la reducción de la capacidad de invasión.

En otra modalidad de esta materia se describe que se puede lograr una importante actividad como se describe en la presente por composiciones de materia que interactúan ya sea por un modo de unión reversible o irreversible. En una modalidad particular, estos compuestos interactúan con Hsp70. En aún otra modalidad, interactúan con un sitio alostérico descrito en la presente en Hsp70.

En una modalidad, se presenta un modelo de homología de Hsp70 humana. En otra modalidad, el modelo de homología se usa para diseñar de forma racional compuestos que modulan la actividad de Hsp70 de mamífero. Este modelo de homología será útil para el descubrimiento de compuestos de la presente materia por métodos que incluyen pero no se limitan a diseño racional de fármacos y examen virtual.

En modalidades adicionales, se presenta una cavidad alostérica localizada fuera del sitio de unión a nucleósido de Hsp70 y Hsc70. No se conocen para esta cavidad ligandos naturales o sintéticos de molécula pequeña. En aún otras modalidades, se presenta que la ocupación de esta cavidad con un ligando de molécula pequeña dará por resultado, por ejemplo, la inhibición de la proliferación, del bloque específico de transformación del ciclo celular, la inducción de la apoptosis, o la reducción de la capacidad de invasión. Esta cavidad será útil para el descubrimiento de compuestos de la presente materia. Un compuesto candidato se puede proporcionar por cómputo por varios métodos. Los ejemplos de estos métodos incluyen montar fragmentos moleculares en compuestos candidatos, diseñar un compuesto candidato de novo, modificar un compuesto que se conoce que se une al sitio, incluir la composición descrita en la presente para formar un compuesto candidato, y no finalmente, al examinar una base de datos para un compuesto candidato.

De acuerdo con otra modalidad, una cavidad en la proteína Hsp70 que no tiene ligando conocido que se presente de forma natural o que se cree de forma sintética, cuando se ocupa por un compuesto de la presente materia como se describe en la presente, da por resultado la inhibición del crecimiento de células malignas, la inhibición del progreso del ciclo celular anormal, la degradación e inhibición de varias onco-proteínas, la inducción de apoptosis y reducción en el potencial invasivo de células de cáncer a dosis que no son tóxicas a células normales. De acuerdo con otra modalidad, la ocupación de aún esta cavidad no explorada por otros ligandos de molécula pequeña conducirá a todos o un subconjunto de los siguientes efectos, pero no se limitan a: inhibición de crecimiento de células malignas, inhibición del progreso del ciclo celular anormal, degradación e inhibición de varias onco-proteínas, inducción de apoptosis y reducción en el potencial invasivo de células de cáncer a dosis que no son tóxicas a células normales.

En modalidades adicionales, se presentan métodos para el descubrimiento de ligandos que ocupan esta cavidad. En aún otras modalidades, se presenta que la ocupación de esta cavidad como un ligando de molécula pequeña dará por resultado una inhibición dual de las vías oncogénicas de Hsp90 y Hsp70. La nueva capacidad de unión y el modo de interacción en las Hsp70, descrito en la presente, también representa un trampolín valioso para el diseño de inhibidores con un mecanismo similar de acción y uso terapéutico. En tanto que se tiene como objetivo una HSP a la vez tiene su

significado terapéutico claro, las modalidades presentadas en la presente muestran que al inhibir simultáneamente Hsp70 y Hsc70, se pueden cosechar los efectos benéficos de la inhibición de Hsp90, específicamente el agotamiento de tumores de onco-proteínas que impulsan procesos malignos, tal como proliferación, supervivencia y metástasis, y los efectos apoptóticos de la inhibición de Hsp70. En conclusión, una modalidad describe una nueva estrategia para combatir cáncer por inhibición de una cavidad alostérica localizada fuera del sitio de unión a nucleótido de Hsp70 y Hsc70.

En otras modalidades, se presenta una estrategia que comprende uno o más de varios métodos para evaluar la capacidad de un compuesto candidato para actuar con las consecuencias benéficas sustanciales y muy amplias en células de cáncer de los compuestos descritos en la presente de la presente materia. La estrategia incluye probar un resultado fenotípico descrito en la presente en células de cáncer seleccionadas, realizar un ensayo competitivo de polarización de fluorescencia para probar la unión de Hsp90 y Hsp70 como se describe en la presente, y evaluar por cómputo el ajuste estructural del compuesto candidato en la cavidad mencionada en la presente. La prueba fenotípica incluye, pero no se limita a, prueba para inhibición de crecimiento en un panel grande células de cáncer, degradación por HER2 y Raf-1 en células de cáncer de mama HER2+ SKBr3, inactivación por FLT3 y p-STAT5 en células MOLM-13 AML, inactivación por p-STAT3 y p-PDK1 en células de cáncer de mama triple-negativas MDA-MB-468, degradación de AR mutante en células de cáncer de próstata LNCaP, escisión por PARP en un gran panel de células de cáncer, activación de caspasa 3,7 en células MOLM-13, aumento del efecto apoptótico de interferón y TNF en células de cáncer de mama, y carencia de inducción de Hsp70 en un gran panel de células de cáncer. Los ensayos competitivos de Hsp70 y Hsp90 prueban la unión competitiva de los compuestos candidatos a HSP expresada en células de cáncer.

En otras modalidades, se muestra que los compuestos descritos en la presente aíslan Hsp70 en complejos con su carga proteica de onco-cliente. Una versión inmovilizada en soporte sólido de un compuesto descrito en la presente confiere por lo tanto la posibilidad sin precedente de investigar la interactoma de Hsp70 de cáncer en un ambiente celular endógeno.

En otras modalidades, los compuestos de la materia descrita en la presente también se pueden derivatizar para formar compuestos que contienen biotina que se pueden unir sobre cuentas de estreptavidina o avidina, o se pueden enlazar directamente a una resina correspondientemente funcionalizada, tal como, pero no limitada a agarosa, sefrosa y resina de matrigel.

En aún otra modalidad, los compuestos descritos en la presente se pueden derivatizar con un tinte fluorescente, tal como, pero no limitado a Cy3B, FITC y BODiPY. Cuando se usa en el contexto del ensayo de polarización de fluorescencia descrito en la presente, este compuesto se puede usar para examinar compuestos candidatos que interactúan con Hsp70 de una manera similar a los compuestos de la presente materia descrita en la presente.

En modalidades adicionales, el compuesto inmovilizado en soporte sólido descrito en la presente se usa para identificar que componentes tumor por tumor de vías oncogénicamente activadas están en complejo con Hsp70. La adición de composiciones descritas en la presente a células específicas de cáncer da por resultado la desestabilización de estos complejos, la degradación o inhibición de onco-proteínas, y la muerte e inhibición del crecimiento de células de cáncer. Estos eventos de etapa posterior de la inhibición de Hsp70 de tumor se pueden usar para monitorizar funcionalmente el efecto de los compuestos de la presente materia descrita en la presente. El método descrito en la presente proporciona de esta manera análisis efectivo de biomarcadores moleculares funcionales asociados con respuesta a los compuestos descritos de la presente materia y otra terapia que actúa al ocupar la cavidad alostérica descrita en la presente o que se identifica a través del ensayo descrito en la presente. Se propone que estos biomarcadores son útiles en el desarrollo clínico de composiciones de materia descrito en la presente, de composiciones de materia que ocupan la cavidad descrita en la presente o de composiciones de materia que se identifican por los ensayos descritos en la presente.

De manera interesante, sólo la reducción en la actividad de Hsp90, pero no de sus co-chaperones de la maquinaria de Hsp90, tal como Hsp70, HOP, HIP, p23, o Hsp40, activa dramáticamente HSF-1, y el uso de los compuestos de la presente materia es posible para diferenciar las dos funciones de la maquinaria molecular al regular específicamente sus co-chaperones. Diferente de un inhibidor directo de Hsp90, los compuestos de la presente materia no pueden por ejemplo, activar HSF-1 ni inducir una respuesta de choque térmico, de retroalimentación, protectora. En una modalidad, los compuestos interrumpen la formación de los complejos de onco-proteína/maquinaria de Hsp90 sin activar HSF-1 y/o sin inducir una respuesta protectora de retroalimentación de choque térmico.

En comparación a la inhibición directa de Hsp90, la administración farmacológica de los compuestos en algunas modalidades da por resultado citotoxicidad incrementadas, pero aún selectiva contra células de cáncer, debido por ejemplo a la apoptosis. La consecuencia biológica de la inhibición farmacológica de Hsp70 se ha caracterizado en células malignas al usar los compuestos de la presente materia. Se ha encontrado que Hsp70 modula la desfosforilación del supresor tumoral STAT1 en células de cáncer de mama, un nuevo mecanismo de inactivación del supresor tumoral STAT1. En otra modalidad, los compuestos descritos en la presente inhiben o inactivan la aceleración por Hsp70 de la desfosforilación de STAT1 en células de cáncer de mama, promoviendo de este modo la supresión tumoral mediante la actividad continua del supresor tumoral STAT1.

STAT1 es un efector principal de la señalización de interferón (IFN) γ . IFN γ es una citocina producida por células T y células aniquiladoras naturales con una función inmunoestimuladora esencial que proporciona defensa contra el desarrollo de tumores. En una modalidad adicional, se encuentra que las composiciones de materia presentadas en la presente aumentan el efecto de IFN γ y de otra citocina, TNF α y pueden permitir respuestas inmunitarias para exterminar de manera mucho más potente tumores. Esto es un hallazgo sorprendente para experimentos de terapia de vacuna, sugiriendo que la co-administración del interferón biológicamente activo con un compuesto de la presente materia descrita en la presente, es decir, con un compuesto de la presente materia que ocupa la cavidad descrita o con un compuesto de la presente materia que se identifica por el ensayo descrito en la presente, puede mejorar la eficiencia de la vacuna y puede permitir el uso de una dosis más pequeña de vacunación.

10 **Breve Descripción de las Figuras**

Figura 1. Varios aspectos del ciclo de chaperones de la maquinaria de Hsp90. a) El ciclo de chaperones de Hsp90 es un proceso dinámico en el cual se presentan proteínas clientes a Hsp90 en un complejo intermedio que contiene Hsp70, Hsp40, HIP y HOP. En la unión por ATP e hidrólisis, la Hsp90 forma un complejo maduro, que contiene p23, p50/cdc37 e inmunofilinas (IP), que catalizan la maduración conformacional de proteínas clientes de Hsp90. Los fármacos inhibidores de Hsp90, tal como geldanamicina (GM) y los derivados de estructura de purina PU-H71 y PU24FC1, se unen a la cavidad N-terminal de unión a ATP de la Hsp90 e inhiben la hidrólisis y unión a ATP, bloqueando de este modo la Hsp90 en el complejo intermedio. La proteína cliente se ubiquitina subsiguientemente (posiblemente por una E3 ubiquitina-ligasa tal como CHIP) y se dirige al proteosoma para degradación. Esto es una representación esquemática basada en un entendimiento actual del proceso. b) Estructuras de inhibidores de Hsp90 representativos.

Figura 2. Diseños de los interactores de Hsp70 clase YK y el modelo computacional del complejo YK5-Hsp70. a) Sitios putativos de unión de Hsp70 se predijeron por el programa SiteMap v2.2 de Maestro 8.5 (Schrodinger L.L.C., NY). Se configuró SiteMap para retornar hasta 5 sitios probables clasificados de acuerdo a la puntuación de sitio y puntuación de convertibilidad a fármaco. En este estudio todos los otros parámetros de SiteMap se ajustaron a parámetros por defecto. La estructura representada es un modelo de homología construida usando el dominio N-terminal de Hsp70 de humano (PDB ID: 1S3X), la DnaK de E. coli (PDB ID: 2kho) y la secuencia de proteína de Hsp70 de humano. Varios compuestos basados en la estructura de 2,5'-tiodipirimidina (*derecha*) se diseñaron de forma racional para interactuar con Hsp70. La estructura de 2,5'-tiodipirimidina se presenta con enlaces en negritas para facilidad de reconocimiento. b) Estructuras de interactores de proteína de molécula pequeña que modifican cisteína. La funcionalidad de acrilamida se pone en círculo para facilidad de reconocimiento. c) Interacción propuesta de YK5 con modelo de homología de Hsp70 humana como se revela por modelado molecular usando Maestro 8.5 y Glide 4.0 (Schrodinger).

Figura 3. Estrategias de prueba para el descubrimiento de YK5. a, b) Células SKBr3 se trataron durante 24 horas con las concentraciones indicadas de inhibidores y las células se lisaron para análisis por Western Blot (WB). Se usó β -actina como control de carga. Los datos son consistentes con aquellos obtenidos de múltiples experimentos de repetición ($n \geq 3$). c) La capacidad de los inhibidores indicados para competir con GM-Cy3B para la unión a Hsp90 en extractos de células SKBr3 se examinó por polarización en fluorescencia. Los valores registrados en las concavidades con inhibidor adicionales se normalizaron a valores leídos de celdas de control y graficaron contra la concentración del inhibidor probado. Se valoraron los fármacos en triplicado. Todos los compuestos se usaron como concentraciones en DMSO. Puntos, media; barras, s.d. d) inhibición de crecimiento: se incubaron células SKBr3 en triplicado con concentraciones crecientes del compuesto y se valoró el crecimiento durante 72 horas. Los valores del eje Y por abajo de 0 % representan muerte celular de la población de inicio. Se analizó la degradación de HER2 como en la figura a), y los geles se cuantificaron por densitometría. Los valores registrados se normalizaron a control (células tratadas sólo con vehículo) y los datos se graficaron contra la concentración de YK5. Las barras de error representan la s.d. de la media ($n=3$).

Figura 4. YK5 interactúa selectivamente con Hsp70 y Hsc70. a) Estructura de YK5 biotinilada. b) Se trataron células K562 con las concentraciones indicadas de YK55 durante 6 horas antes de la lisis y precipitación de complejos de proteína en cuentas de estreptavidina (50 μ l) durante 1 hora a 4°C. Las cuentas se lavaron con amortiguador de alta concentración de sal (NaCl 1 M), las proteínas se eluyeron al ebullición en SDS al 2 %, se separaron en un gel desnaturalizante y se tiñeron con plata. Se usaron rebajas de BB70 Ab para indicar la posición de los Hsp70s (BB70 IP; 2 μ l). Este anticuerpo reconoce varias isoformas de Hsp70, tal como Hsp70, Hsc70, Grp75 y Grp78. HC = cadena pesada. c) se trataron células SKBr3 durante 24 horas con las concentraciones indicadas de YK5 y se lisaron las células. Los complejos de proteína se aislaron a través de precipitación química al incubar el extracto celular (500 μ g) con cuentas de YK55 (50 μ l), se eluyeron con SDS al 2 %, se separaron en un gel desnaturalizante y se visualizaron como se indica. Las cuentas de YK55 se produjeron al incubar YK55 (50 μ M) con cuentas de estreptavidina (50 μ l). d) Los complejos de proteína de los extractos de células SKBr3 (500 μ g) se aislaron a través de precipitación química con cuentas de YK55 o una molécula inerte, D-biotina. Se produjeron cuentas al incubar las concentraciones indicadas de YK55 o D-biotina con cuentas de estreptavidina (50 μ l). Entonces se separaron las proteínas en un gel desnaturalizante y se analizaron por Western Blot. e) Complejos de Hsp70 precipitados de extractos de SKBr3 (500 μ g) con cuentas de YK55 (YK55 100 μ M adicionada a 50 μ l de cuentas de estreptavidina) o un Hsp70 Ab (5 μ l de Ab adicionados a 30 μ l de cuentas de proteína G) se analizaron por WB. HC = cadena pesada (*izquierda*). La unión de los complejos de proteína a cuentas de YK55 se probó en extractos de células SKBr3 en los cuales se redujeron los niveles de Hsp/c70 por

inmunoprecipitación con BB70 Ab o IgG, respectivamente. Las proteínas se analizaron por WB (*derecha*). f) Se incubaron los extractos de SKBr3 durante 3 horas a 4°C con las concentraciones indicadas de YK5, seguido por precipitación de los complejos de Hsp70 en cuentas de YK55 (100 µM YK55 adicionados a cuentas de estreptavidina de 50 µl). Las proteínas se analizaron por WB. Los datos son consistentes con aquellos obtenidos para múltiples experimentos de repetición ($n \geq 3$).

Figura 5. YK5 forma un enlace covalente con Cys267 en la unión a Hsp70. a) Se trataron células K562 durante los tiempos indicados con YK55 (25 µM), antes de la lisis y precipitación de complejos de proteína en cuentas de estreptavidina (50 µl) durante 1 hora a 4°C. Las cuentas se lavaron con amortiguador de alta concentración de sal (NaCl 1 M), las proteínas se eluyeron al hervir en SDS al 2 %, se separaron en un gel desnaturizante y se tiñeron con plata. Se usaron reducciones de BB70 Ab para indicar la posición de las Hsp70 (BB70 IP; 2 µl). Este anticuerpo reconoce Hsp70, Hsc70, Grp75 y Grp78. HC = cadena pesada. b) El escenario experimental fue similar a la Figura a) pero las proteínas se analizaron por WB. c) Se trataron células K562 con YK55 o D-biotina (50 µM) durante 6 horas y se lisaron. Se incubaron los extractos (500 µg) durante 1 hora a 4°C con cuentas de estreptavidina (ST) y reducciones lavadas con amortiguador de alto contenido de sal (NaCl 1M). Las proteínas se eluyeron al hervir en amortiguador A o B, como se describe en métodos. Después de la separación en un gel desnaturizante, las proteínas se visualizaron por WB. Los datos son consistentes con aquellos obtenidos de múltiples experimentos de repetición ($n \geq 2$). d) Análisis por MALDI-reTOF-MS/MS de la unión de YK55 a las Hsp70 en células de cáncer. Se trataron células K562 durante 4 horas con YK55 100 µM y se lisaron. El extracto celular tratado con YK55 (500 µg) se incubó con cuentas de estreptavidina-agarosa durante 1 hora a 4°C. Las cuentas se lavaron con amortiguador de alto contenido de sal (NaCl 1 M), las proteínas se eluyeron al hervir en SDS al 2 %, se separaron en un gel desnaturizante y se tiñeron con Coomassie. Las proteínas resueltas en gel se digirieron con tripsina y se identificaron los péptidos como se indica en métodos.

Figura 6. YK5 inhibe funciones bioquímicas de núcleo de las Hsp70 e interrumpen la interacción Hsp90/Hsp70. a) replegado de luciferasa desnaturizada por Hsc70 y DJA2 a 30°C se midió para los tiempos indicados en la presencia de YK5 (100 µM) o vehículo (*izquierda*), o a 60 minutos en la presencia de las concentraciones indicadas de YK5 (*derecha*). b) Se midieron las velocidades de Hsc70-ATPasa para reacciones a 30°C con las combinaciones indicadas de Hsc70 y co-chaperones en la presencia de vehículo (DMSO) o YK5 (100 µM). Se monitorizó la producción de ADP por separación de cromatografía de capa delgada de ADP radiomarcado de ATP y análisis de fosforación de imágenes (*inferior*). Los datos son consistentes con aquellos obtenidos de múltiples experimentos de repetición ($n \geq 2$). c, d) Se trataron células SKBr3 durante 24 horas con vehículo o las concentraciones indicadas de YK5 (c) o durante los tiempos indicados con YK5 (10 µM) (d). Las proteínas aisladas con anticuerpos anti-Hsp90 y las Hsp70 (IP: Hsp90 o Hsp70), o presentes en el extracto celular (Lisado) se analizaron por WB. Se probó la especificidad de unión con una IgG de control. HC = cadena pesada; DJA1 y Hdj1 = isoformas de Hsp40. e) Diferente de los inhibidores de Hsp90, YK5 falla en activar HSF-1. Células SKBr3 conmovieron técnicamente durante 45 minutos a 42°C o se incubaron con vehículo, YK5 o PU24FC1 (5 µM) durante 3 horas. Las proteínas se aplicaron a un gel nativo y se analizaron por inmunotransferencia. Los datos son consistentes con aquellos obtenidos de múltiples experimentos de repetición ($n \geq 3$). f) Se probó YK5 en el examen scanMAX (Ambit) contra 359 cinasas. El mapa de interacción TREEspot^{MR} para YK5 se presenta. Sólo c-Met (punto rojo en el árbol de cinasa) parece un acierto potencial de cinasa de baja afinidad de YK5.

Figura 7. YK5 interrumpe los complejos de Hsp90/Hsp70/proteína onco-cliente dando por resultado la desestabilización de las oncoproteínas y la degradación subsiguiente por el proteasoma. a) Se trataron células SKBr3 durante los tiempos indicados con YK5 (10 µM). Las proteínas aisladas con anticuerpo anti-Hsp90 (IP: Hsp90), o presentes en el extracto celular (Lisado) se analizaron por WB. La especificidad de unión se probó con una IgG de control. HC = cadena pesada. b) Se trataron células SKBr3 durante los tiempos indicados con el inhibidor de biosíntesis de proteína, cicloheximida (100 µg/ml) en la presencia de vehículo (DMSO) o YK5 (10 µM). Después del análisis por WB, se cuantificó la expresión de proteína por densitometría y se graficó contra el tiempo de tratamiento. Puntos, media; barras, s.d. c) Se pre-trataron células SKBr3 con los inhibidores indicados de la maquinaria de proteólisis antes de la adición de YK5 (10 µM) como se describe en métodos. Después de 24 horas de tratamiento, por Western Blot se determinó la expresión de proteína en las fracciones tanto solubles como insolubles en detergente. Los efectos de los inhibidores solos en el procesamiento de proteína se presentan en el panel del lado derecho.

Figura 8. Relación de estructura-actividad en la serie de YK. a) Se trataron células de cáncer de mama SKBr3 durante 24 horas con las concentraciones indicadas de derivados de YK y proteínas analizadas por Western Blot. b) Se incubaron células Kasumi-1 con concentraciones crecientes de derivados de YK y se analizó la inhibición del crecimiento celular con el ensayo de azul de Alamar como se indica en métodos. Puntos, media; barras, s.d. Los valores del eje Y por abajo de 0 % representan muerte celular de la población de inicio. c) Se incubaron cuentas de estreptavidina (50 µl) con las concentraciones indicadas de YK55, YK56 o D-biotina para inmovilizar los correspondientes compuestos en las cuentas. Se graficaron las cuentas (50 µl) con extractos de células SKBr3 (500 µg), y la Hsp70 precipitada se analizó por Western Blot y se cuantificó por dosimetría. Los resultados de tres experimentos independientes se graficaron para determinar la afinidad relativa de unión de las YK. Puntos, media; barras, s.d. d) La estructura de las YK representativas. YK55 y YK56 son los derivados biotinilados de YK54 y YK57, respectivamente.

Figura 9. (a) Ejemplos de los compuestos de la presente materia reducen de una manera dependiente de la dosis los niveles de estado estable de las onco-cinasas HER2 y Raf-1 en células de cáncer de mama SKBr3 que sobreexpresan

HER2, e inducen apoptosis como se indica por escisión de PARP. Se trataron células duran 24 horas con las concentraciones indicadas de YK149 y YK5. Las células se lisaron y las proteínas se analizaron por Western Blot. b) Ejemplos de los compuestos de la presente materia inhiben la actividad del STAT3 oncogénico en células de cáncer de mama MDA-MB-468 triplemente negativas. Las células se trataron durante los tiempos indicados con compuestos o vehículo y las proteínas se analizaron por Western Blot. (c) Ejemplos de los compuestos de la presente materia inducen de una manera dependiente de la dosis apoptosis en células de leucemia mieloide aguda MOLM13. Las células se trataron durante 24 horas con la concentración indicada de compuestos y se midió el incremento en la actividad de caspasa-3,7 y se comparó a células tratadas sólo con vehículo (DMSO). La actividad de caspasa-3,7 fue una medida de la potencia del compuesto en la escisión del sustrato de caspasa Z-DEVD-R110 y en la liberación de rodamina. El porcentaje de incremento en las células apoptóticas se calculó al comparar las lecturas de fluorescencia obtenidas de compuestos con aquellos obtenidos de células tratadas con el vehículo (DMSO).

Figura 10. (a) Ejemplos de los compuestos de la presente materia reducen de manera dependiente de la dosis los niveles de estado estable de la onco-cinasa Raf-1 en células de cáncer de mama triple-negativas MDA-MB-468, e inducen apoptosis como se indica por escisión de PARP. Los ejemplos de los compuestos de la presente materia reducen de manera dependiente de la dosis los niveles de estado estable de las onco-cinasas HER2 y Raf-1 en células de cáncer de mama SKBr3 que sobreexpresan HER2, e inducen apoptosis como se indica por escisión de caspasa-3 y PARP. No se observa inducción asociada de Hsp70. El ejemplo de los compuestos de la presente materia reduce de forma dependiente de la dosis los niveles en estado estable de FLT3 y p-STAT5 en células MOLM-13 mutantes de leucemia mieloide aguda que expresan FLT3. Se trataron células durante 24 horas con las concentraciones indicadas de compuestos o durante los tiempos indicados con la concentración indicada de compuestos. Las células se lisaron y las proteínas se analizaron por Western Blot. (b) Los ejemplos de los compuestos de la presente materia inducen de manera dependiente de la dosis apoptosis en células MOLM13 de leucemia mieloide aguda. Las células se trataron durante 24 horas con la concentración indicada de los compuestos y el incremento en la actividad de caspasa-3,7 se midió y comparó a células tratadas sólo con vehículo (DMSO). La actividad de Caspasa-3,7 fue una medida de la potencia del compuesto en la escisión del sustrato de caspasa Z-DEVD-R110 y la liberación de rodamina. El porcentaje de incremento en células apoptóticas se calculó al comparar las lecturas de fluorescencia obtenidas de compuestos con aquellas obtenidas de células tratadas con vehículo (DMSO).

Figura 11. (a) Ejemplos de los compuestos de la presente materia reducen de manera dependiente de la dosis los niveles de estado estable de las oncocinasas HER2 y Raf-1 en células de cáncer de mama SKBr3 que sobreexpresan HER2, e inducen apoptosis como se indica por escisión de PARP. Las células se trataron durante 24 horas con las concentraciones indicadas del agente. Las células se lisaron y las proteínas se analizaron por Western Blot. (b) Los ejemplos de los compuestos de la presente materia inhiben la actividad del STAT3 oncogénico, reducen los niveles en estado estable de Raf-1 e inducen la apoptosis en células de cáncer de mana triple-negativas MDA-MB-468. Las células se trataron durante 24 horas con los compuestos indicados o durante los tiempos indicados con las concentraciones indicadas de los compuestos, y las proteínas se analizaron por Western Blot.

Figura 12. YK5 afecta las características principales del cáncer: inhibe la proliferación y capacidad de invasión y detiene las células de cáncer en el ciclo celular. (a) Las células de cáncer indicadas se incubaron con concentraciones crecientes de inhibidores y se valoró el crecimiento durante 72 horas. Los valores del eje Y por abajo de 0 % representan muerte celular de la población de inicio. Se valoraron los fármacos en triplicado. (b) Ratones (n = 5) que tienen tumores subcutáneamente senoinjertados (s.c.) de MDA-MB-468 que alcanzaron un volumen de aproximadamente 100-200 mm³, se administraron i.t. con YK5 o vehículo como se describe en métodos. Se estimó el volumen tumoral (mm³) por mediciones de calibrador. (c) Se trataron células durante 24 horas con las concentraciones indicadas de YK5. Se analizó el contenido de ADN por tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo (*izquierda*), en tanto que las proteínas por Western Blot (*derecha*). (d) proteínas cliente de Hsp70 aisladas por cuentas con YK55 de extractos de SKBr3 y MDA-MB-468 (500 µg) se analizaron por Western Blot. Cuentas de control que contienen D-biotina (100 µM) unida. (e) células de cáncer de mama MDA-MB-231 se trataron durante 24 horas con YK5 (1 µM) y los extractos de proteína se sometieron a inmunotransferencia (*superior*) o se pre-trataron durante 24 horas con vehículo o YK5, y células viables capaces de emigrar a través de Matrigel durante un período de 20 horas se cuantificaron y los datos se graficaron (*inferior*). Puntos, media; barras, s.d. Los datos son consistentes con aquellos obtenidos de múltiples experimentos de repetición (n ≥ 3).

Figura 13. YK5 tiene un mayor efecto apoptótico que los inhibidores de Hsp90 en tumores seleccionados. (a-d) Se trataron células con las concentraciones indicadas de inhibidores durante los tiempos presentados. (a, b) Se cuantificaron las células apoptóticas por tinción dual con naranja de acridina/bromuro de etidio como se describe en métodos. (c, d). Se analizaron marcadores moleculares de apoptosis (escisión de PARP) en células tratadas durante 24 horas con las concentraciones indicadas de inhibidores (c) o durante los tiempos indicados con la concentración indicada de inhibidores (d) por Western Blot. (e) se trataron con vehículo células MDAMB-468, TNFα (20 ng/ml), YK5 (1 µM), pretratadas con YK5 durante 2 horas antes de TNFα o co-trataron, y las células se lisaron para análisis por Western Blot (*izquierda*), o se cuantificó la muerte celular al analizar la población hipodiploide en tinción con propidio-yodo (*derecha*). Los datos son consistentes con aquellos obtenidos de múltiples experimentos de repetición (n ≥ 3). Puntos, media; barras, s.d.

Figura 14. YK5 tiene una mayor afinidad para Hsp70 de tumor y aniquila selectivamente células de cáncer. (a-c) Se trataron células con las concentraciones indicadas de inhibidores para los tiempos presentados, y células metabólicamente viables por captación con azul de Alamar como se describe en métodos (a). Se analizaron marcadores moleculares de apoptosis (escisión de PARP y caspasa-3) en células tratadas durante 24 horas con las concentraciones indicadas de inhibidores por transferencia western (b, c). La morfología de las células tratadas durante 24 horas con vehículo o los inhibidores indicados se analizó por microscopía con luz (c). (d) Se incubaron extractos (500 µg) durante la noche con cuentas que contienen D-biotina (75 µM) o las concentraciones indicadas de YK55 adicionadas a 50 µl de cuentas de estreptavidina. HS = perturbadas térmicamente. (e) Los extractos de SKBr3 (200 µg) y MRC-5 (400 µg) y la Hsp70 humana recombinante (2 µg) se incubaron durante 3 horas con las concentraciones indicadas de YK5, seguido por precipitación de complejos de Hsp70 en cuentas de YK55 (50 µM YK55 adicionada a 50 µl de cuentas de estreptavidina). Los datos obtenidos de tres experimentos independientes se graficaron (*derecha*). Puntos, media; barras, s.d.

Figura 15. YK5 unida a soporte sólido, cuentas de YK55, aislados en una Hsp70 de una manera específica del tumor en complejo con onco-proteínas. (a, *izquierda* y b) complejos de Hsp70 precipitados de extractos celulares indicados (500 µg) con cuentas de YK55 D-biotina (YK55 100 µM o D-biotina adicionada a 50 µl de cuentas de estreptavidina, respectivamente) se analizaron por WB. (a, *derecha*) Se sondeó la unión de complejos de proteína a cuentas de YK55 en extractos celulares en los cuales se redujeron los niveles de Hsp/c70 por inmunoprecipitación con BB70 Ab o IgG, respectivamente. (c) Se incubaron extractos celulares durante 3 horas a 4°C con las concentraciones indicadas de YK5, seguido por precipitación de complejos de Hsp70 en cuentas de YK55 (YK55 100 µM adicionadas 50 µl de cuentas de estreptavidina). (d) YK5 reduce los niveles en estado estable de onco-proteínas reguladas por Hsp70. Las células de cáncer se trataron durante 24 horas con las concentraciones indicadas de YK5 y las células se lisaron para análisis por WB. Se usó β-actina como control de carga.

Figura 16. Ensayo competitivo de polarización fluorescente de Hsp70. Se adicionaron concentraciones crecientes de los inhibidores indicados en triplicado a la placa de ensayo y se realizó el ensayo de Polarización de Fluorescencia (FP) como se indica en métodos. El efecto competitivo se expresó como porcentaje de control y se calculó al dividir el valor de milipolarización (mP; substrayendo cy3B-YK5 libre) de concavidades de inhibidor por el mP promedio (substrayendo cy3B-YK5 libre) de controles (cy3B-YK5 y lisado celular con vehículo de DMSO) en cada placa. Se graficó la unión de ligando contra la concentración del inhibidor \log_{10} , y se calcularon los valores de EC_{50} usando un programa de ajuste a la curva de mínimos cuadrados no lineal en Prism 4.0. Puntos, media; barras, s.d.

Figura 17. YK5 identifica STAT1 y STAT3 como nuevos productos oncogénicos que interactúan con Hsp70 de células de cáncer de mama. (a) Cuentas con YK55 pero no con biotina reconocen Hsp70 en el complejo con STAT1 y STAT3 en extractos de MDA-MB-468 (*izquierda*). Para investigar el efecto de YK5 en los niveles en estado estable y la actividad de los STAT, se trataron células durante 24 horas con vehículo (DMSO) o YK5 (10 µM) (*derecha*). (b) Composiciones de ejemplo de materia inhiben potentemente STAT3 en células triple-negativas MDA-MB-468. STAT3 activado es parte de una importante ruta oncogénica en cánceres de mama triple-negativos.

Figura 18. YK5 descubre un nuevo mecanismo de inhibición del efecto pro-apoptótico del supresor tumoral STAT1. (a) cuentas de YK55 reconocen Hsp70 en complejo con p-STAT1 y STAT1 en extractos de MDA-MB-468 (500 µg). (b) Unión de complejos de proteína a cuentas de YK55 se sondeó en extractos de células MDA-MB-468 con niveles de Hsp/c70 reducidos por inmunoprecipitación con BB70 Ab o IgG. (c) se trataron células MDA-MB-468 7 horas con vehículo, IFN γ (100 ng/ml), YK5 (10 µM), pre-tratadas con YK5 durante 2 horas antes de la estimulación con IFN γ o co-tratadas y células se lisaron para análisis por Western Blot. (d) Se estimularon células con IFN γ (100 ng/ml), y complejos de Hsp70/STAT1 en extractos (500 µg) analizados por precipitación química e inmunitaria con D-biotina, cuentas de YK55 y un Ab de Hsp70, respectivamente. (e, f) Se estimularon células con IFN γ , en la presencia o ausencia de YK5 (10 µM) para los tiempos mostrados, y con o sin estaurosporina u ortovanadato adicionados como se describe en métodos. Se analizaron los niveles de p-STAT1 por Western Blot y se cuantificaron por dosimetría. Los datos de dos experimentos de repetición se graficaron contra el tiempo de tratamiento.

Figura 19. YK5 mejora el contenido nuclear de STAT1 activado con IFN γ y potencia su unión a un ADN. Se trataron células MDAMB-468 con IFN γ (100 ng/ml) o se co-trataron con IFN γ (100 ng/ml) y YK5 (10 µM). (a) STAT1 activado (pTyr701), se determinó por microscopía inmunofluorescente con un anticuerpo secundario conjugado con FITC. La tinción nuclear se realizó con DAPI. (b) La unión de STAT1 activado a sitio de unión de consenso de STAT (5'-TTCCCGGAA-3') se determinó por un ensayo basado en ELISA. STAT1 activado, contenido en lisados de células no tratadas (barra blanca), tratadas con YK5 (barra gris claro), IFN γ (barras gris oscuro) o la combinación de IFN γ y YK5 (barras negras), y unido al oligonucleótido, se detectó a través del uso de un anticuerpo anti-STAT1. Se realizaron ensayos en la ausencia o presencia de 20 pmol de oligonucleótido competidor que contiene ya sea un sitio de unión de consenso a STAT tipo silvestre o mutado usando células tratadas con IFN γ (barras gris oscuro). Los experimentos se llevaron a cabo en cuatro replicas. Los resultados se expresan como valores medios de absorbancia (OD450nm) con SEM.

Figura 20. **Tratamiento de células AML primarias con YK5. YK5 aniquila tanto células madre de cáncer como**

blastos. Se trataron células con concentraciones crecientes de YK5 durante 24 horas. (a-b) se muestra el % de viabilidad con relación a control no tratado. Barras abiertas: "Otro" representa células normales en el mismo paciente (sin blastos), Barras grises: Blastos (CD45 dim), barras rojas: células madre de leucemia (LSC) (CD34+CD38-CD123+). (c) Disminución de CFU (Unidades formadoras de colonias) después del tratamiento de células AML primarias con YK5. **p<0.001.

Figura 21: Alineación de secuencia de proteína de hHsp70 de longitud completa (SEQ ID NO:1) (Número de Acceso: P08107), proteína hHsp70 N-terminal (SEQ ID NO:2) (PDB ID: 1S3X), estructura de Hsp70 de *E. coli* (DNAK) (SEQ ID NO :3) (PDB ID: 2KHO) y *C. elegans* (PDB ID: 2P32) (SEQ ID NO:4). Las anotaciones de residuos están subrayadas y los residuos conservados se presentan en un color similar. Las secuencias que definen el sitio 1 de cavidad alostérica se muestran en cuadros. Los aminoácidos importantes en estas secuencias interactúan con los ligandos designados en la presente.

Descripción Detallada

Definiciones

Como se usa en la presente, los términos "administrar", "que administra", y "administración", se refieren a cualquier método que, en práctica médica acertada, administra la composición a un sujeto de una manera para proporcionar un efecto terapéutico.

La frase "derivada" como se usa en la presente se refiere a cualquier hidrato, solvato, sal, racemato, isómero, enantiómero, profármaco, metabolito, éster, u otro análogo o derivado de una molécula o compuesto químico particular. El término "derivado" también puede significar una modificación a los compuestos divulgados que incluyen, pero no se limitan a, productos de hidrólisis, reducción u oxidación de los compuestos divulgados. En la técnica se conocen las reacciones de hidrólisis, reducción y oxidación.

El término "modulación" se refiere al proceso de producir un efecto en la actividad biológica, función, salud o condición de un organismo en el cual se mantiene, mejora, disminuye o trata esta actividad biológica, función, salud o condición de una manera que es consistente con la salud general y bienestar del organismo. El término "mejora" de la actividad biológica, función, salud o condición de un organismo se refiere al proceso de aumentar, fortalecer, reforzar o mejorar.

Como se usa en la presente, las frases una "cantidad efectiva" o una "cantidad terapéuticamente efectiva" de un ingrediente o agente activo, o ingrediente o agente farmacéuticamente activo, que son sinónimas en la presente, se refieren a una cantidad del agente farmacéuticamente activo suficiente para tener un efecto terapéutico en la administración. Una cantidad terapéuticamente efectiva del agente farmacéuticamente activo puede, será, o se espera que provoque un alivio de los síntomas. Las cantidades efectivas del agente farmacéuticamente activo variarán con la condición o condiciones particulares que se traten, con la severidad de la condición, con la duración del tratamiento, con los componentes específicos de la composición que se use, y factores similares.

La frase "cualquier sustituyente", como se usa en la presente al definir la fórmula (I) y (I'), significa cualquier sustituyente que se puede reemplazar por hidrógeno. En algunas modalidades, el término "cualquier sustituyente", como se usa en la presente al definir la fórmula (I) y (I'), es un grupo alquilo, alquenilo, o alquinilo recto o ramificado opcionalmente sustituido; un grupo carbocíclico, heterocíclico, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido; halo; un grupo C₂₋₂₂acilo opcionalmente sustituido; hidroxilo; nitro; ciano; ariloxi; alcoxi; alcoxi halogenado; alqueniloxi; hidroxialquilo; amino; alquilamino; dialquilamino; cicloalquilamino; arilamino; diarilamino; acilamino; carbamilo; amido sustituido o insustituido; alquilamido; alquilsulfonamido; sulfonamido; -NH₂SO₂alquenilo; NHCOalquenilo; -NHCOalquinilo; -COalquenilo; -COalquinilo; trihalocarbono; tioalquilo; SO₂-alquilo; -COO-alquilo; -COalquilo; y alquil-CN; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos o un hidrato de los mismos. En otras modalidades, la frase "cualquier sustituyente" se refiere a un sustituyente que comprende un grupo marcador o de marbete útil para identificar, seguir y/o aislar el compuesto. Los ejemplos del grupo de marbete y grupos marcadores útiles en la presente incluyen, por ejemplo, grupos fluorescentes, grupos de biotina, grupos de avidina, y grupos ligadores enzimáticos.

Al nombrar opciones de sustituyentes, tal como para Z y W₁-W₄ posteriormente, el nombre se refiere al tipo de grupo que se une directamente a la estructura central y no imposibilita la funcionalidad adicional unida al sustituyente base.

De esta manera, el término "alquilo" se refiere a un grupo de hidrocarburo lineal, cíclico o ramificado, saturado, opcionalmente sustituido, en el cual el átomo unido al resto de la estructura es un átomo de carbono. El grupo alquilo puede tener de 1 a 24 átomos de carbono, tal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, t-butilo, octilo, decilo, tetradecilo, hexadecilo, eicosilo, tetracosilo y similares. Los grupos "alquilo" preferidos contienen en la presente de 1 a 12 átomos de carbono. "Alquilo inferior" se refiere a un grupo alquilo de 1 a 6, de manera preferente de uno a cuatro, átomos de carbono. El grupo alquilo puede tener sustituyentes, por ejemplo, halógeno, hidroxilo, alcoxi, amino, amido sustituido e insustituido, sulfonamino, sulfonamido, sulfoxi, arilo, ciano, carboxi, carboxamido, acilo, nitro, tio.

El término “alqueno” se refiere a un grupo de hidrocarburo insaturado lineal, cíclico o ramificado, opcionalmente sustituido que tiene un doble enlace carbono-carbono en uno o más lugares, en el cual el átomo unido al resto de la estructura es un átomo de carbono. El grupo alqueno puede tener 2-20 carbonos, de manera preferente 2-8 carbonos. El grupo alqueno lineal incluye, por ejemplo: un grupo 1-alqueno tal como un grupo eteno, un grupo 1-propeno, y un grupo 1-buteno; y un grupo 2-alqueno tal como un grupo 2-buteno, y grupo 2-penteno. El grupo alqueno puede tener sustituyentes que son los mismos como para un grupo alquilo.

El término “alquino” se refiere a un grupo de hidrocarburo insaturado ramificado o no ramificado opcionalmente sustituido que tiene un triple enlace carbono-carbono en uno o más lugares, en los cuales el átomo unido al resto de la estructura es un átomo de carbono. El grupo alquino puede tener 2-20 carbonos, de manera preferente 2-8 carbonos. Los ejemplos incluyen: un grupo 1-alquino tal como grupo etino, grupo 1-propino, y grupo 3,3-dimetil-1-butino; y un grupo 2-alquino tal como un grupo 2-propino, grupo 2-butino, y grupo 3-fenil-2-propino. El grupo alquino puede tener sustituyentes que son los mismos como para un grupo alquilo.

Los términos “halo” o “halógeno” se refieren a fluro, cloro, bromo o yodo, usualmente con respecto a la sustitución halo para un átomo de hidrógeno en un compuesto orgánico. De los halos, en general se prefieren cloro y fluro con cloro que en general es el más preferido.

El término “amino” abarca moléculas en las cuales un N de amina se une directamente a la estructura central, incluyendo grupos NH₂, alquilamino y alquencilamino.

El término “alquilo” se refiere a hidrógeno, alquilo, cicloalquilo parcialmente saturado o completamente saturado, heterociclo parcialmente saturado o completamente saturado, y grupos carbonilo sustituidos con arilo.

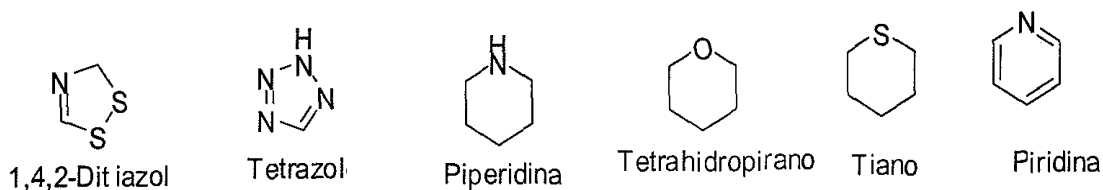
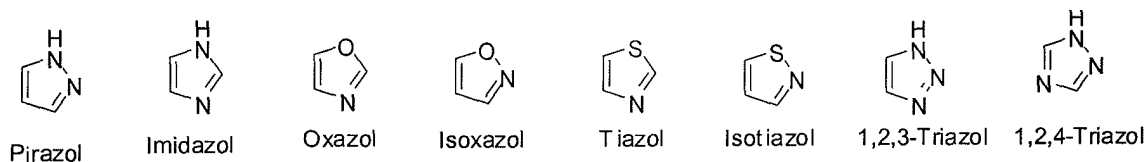
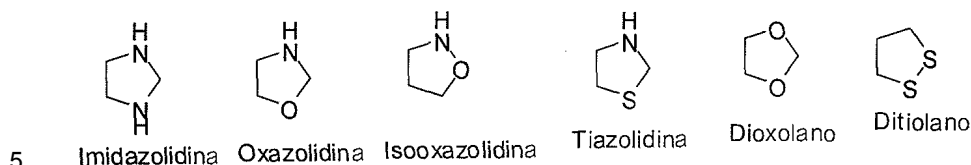
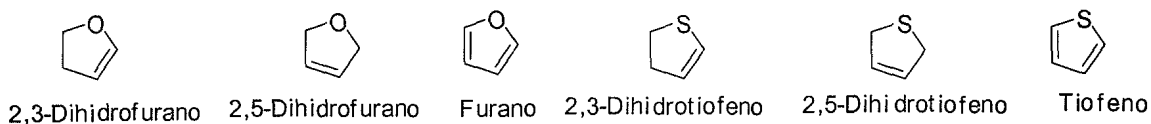
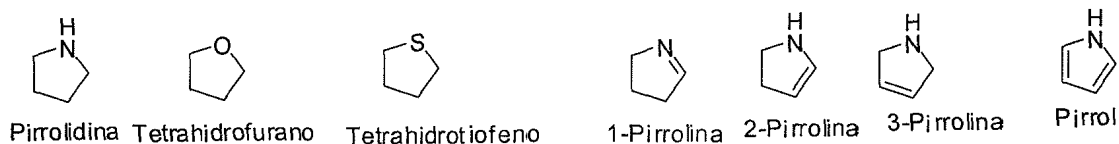
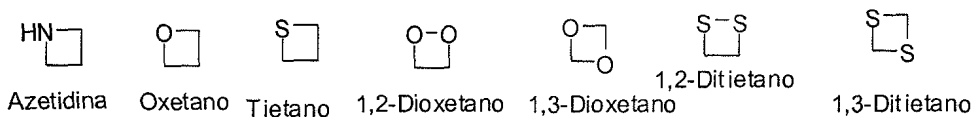
El término “arilo” se refiere a un grupo de anillo de hidrocarburo aromático sustituido o insustituido que tiene de 5 a aproximadamente 30 átomos de carbono con de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 átomos de carbono que son los preferidos. El grupo “arilo” puede tener un anillo individual o múltiples anillos condensados. Cuando se identifica un sustituyente como un sustituyente de arilo, un átomo del anillo de arilo se une directamente a un átomo del resto de la estructura. Un sustituyente de arilo es un grupo arilo conectado al resto de la estructura por un puente -O-. El grupo arilo puede tener sustituyentes que son los mismos como para un grupo alquilo, más sustituyentes alquilo, alqueno o alquino. El término “arilo” incluye, pero no se limita a, fenilo, α -naftilo, β -naftilo, bifenilo, antrilo, tetrahidronaftilo, fluorenilo, indanilo, bifenilenilo, y acenaftenilo. Específicamente se incluyen dentro de la definición de “arilo” aquellos grupos aromáticos que están opcionalmente sustituidos. Por ejemplo, en modalidades representativas de la presente materia, los grupos “arilo” están opcionalmente sustituidos con 1 a 5 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste de alquilo, hidroxilo, alquilo, alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 6 átomos de carbono, alqueno de 2 a 6 átomos de carbono, alquino de 2 a 6 átomos de carbono, amino, amino sustituido por uno o dos grupos alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, aminoalquilo, alquilamino, azido, ciano, halo, nitro, tioalcoxi, trihalometilo, y arilo. El término “aralquilo” abarca porciones alquilo sustituidas con arilo. Los grupos aralquilo preferibles son grupos “aralquilo inferior” que tienen grupos arilo unidos a grupos alquilo que tienen de uno a seis átomos de carbono. Los ejemplos de estos grupos incluyen bencilo, difenilmetilo, trifenilmetilo, feniletilo, y difeniletilo.

El término “carbocíclico” se refiere a un grupo opcionalmente sustituido que contiene una o más estructuras de anillo covalentemente cerradas, y que los átomos que forman la estructura del anillo son todos átomos de carbono. El término distingue de esta manera anillos carbocíclicos de los heterocíclicos en los cuales la estructura de anillo contiene al menos un átomo no de carbono. Los términos “cicloalcano” o “alcano cíclico” o “cicloalquilo” se refieren a un grupo carbocíclico en el cual el anillo es un hidrocarburo alifático, cíclico, opcionalmente sustituido, por ejemplo, un grupo alquilo cíclico con preferentemente 3 a 12 carbonos de anillo. “Cicloalquilo” incluye, a manera de ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, o ciclooctilo, y similares.

El término “heterocíclico o heterociclo” significa un grupo de hidrocarburo, cíclico, aromático o no aromático, saturado o insaturado, opcionalmente sustituido con 4 a aproximadamente 20 átomos de carbono, de manera preferente de aproximadamente 5 a aproximadamente 6, en donde se reemplazan de 1 a aproximadamente 4 átomos de carbono por nitrógeno, oxígeno o azufre. Los heterociclos preferidos se seleccionan del grupo que consiste de bencimidazol, dihidrotiofeno, dioxina, dioxano, dioxolano, ditiano, ditiazina, ditiazol, ditiolano, furano, imidazol, morfolina, oxazol, oxadiazol, oxatiazol, oxatiazolidina, oxazina, oxadiazina, piperazina, piperidina, pirano, pirazina, pirazol, piridina, pirimidina, pirrol, pirrolidina, tetrahidrofurano, tetrazina, tiadiazina, tiadiazol, tiatriazol, tiazina, tiazol, tiomorfolina, tiofeno, tiopirano, triazina, y triazol.

Las estructuras de algunos heterocíclicos son como sigue:

Heterociclos



10 Como se usa en la presente, el término "heteroarilo" se identifica como un sistema de anillo, heterocíclico, aromático sustituido o insustituido (monocíclico o bicíclico). Los grupos heteroarilo pueden tener, por ejemplo, de aproximadamente 4 a aproximadamente 20 átomos de carbono (a menos que se especifique explícitamente de otro modo) con de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 que es lo preferido. En algunas modalidades, los grupos heteroarilo son sistemas de anillos heterocíclicos aromáticos que tienen de aproximadamente 4 a aproximadamente 14 átomos de anillo y que contiene átomos de carbono y 1, 2, 3, o 4 heteroátomos seleccionados de oxígeno, nitrógeno o azufre. Los grupos heteroarilo representativos son furano, tiofeno, indol, azaindol, oxazol, tiazol, isoxazol, isotiazol, imidazol, N-metilimidazol, piridina, pirimidina, pirazina, pirrol, N-metilpirrol, pirazol, N-metilpirazol, 1,3,4-oxadiazol, 1,2,4-triazol, 1-metil-1,2,4-triazol, 1H-tetrazol, 1-metiltetrazol, benzoxazol, benzotiazol, benzofurano, bencisoxazol, bencimidazol, N-metilbencimidazol, azabencimidazol, indazol, quinazolina, quinolina, e isoquinolina.

20 El término "anillo en puente" se refiere a un grupo de 6 a 12 átomos que forma un carbociclo, heterociclo, arilo, o heteroarilo opcionalmente sustituido que comprende uno o más anillos en donde se conectan dos o más átomos de anillo no adyacentes. Los ejemplos no limitantes de una estructura de anillo en puente pueden incluir un tricicloalcano, tal como por ejemplo adamantanilo.

"Opcional" u "opcionalmente" significa que el evento o circunstancia subsiguientemente descrito puede presentarse o no, y que la descripción incluye casos donde el evento o circunstancia se presente y casos donde no se presenta. "Opcionalmente" es incluyente de modalidades en las cuales las condiciones descritas están presentes y modalidades

en las cuales no está presente la condición descrita. Por ejemplo, “fenilo opcionalmente sustituido” significa que el fenilo puede estar o no sustituido, y que la descripción incluye tanto fenilo insustituido como fenilo en donde hay sustitución. “Opcionalmente” es incluyente en modalidades en las cuales las condiciones descritas están presentes y modalidades en las cuales no está presente la condición descrita.

5 Los compuestos de la presente materia pueden existir en formas tautomérica, geométrica o estereoisomérica. La presente materia contempla todos estos compuestos, incluyendo isómeros cis- y trans-geométricos, isómeros E- y Z-geométricos, R- y S-enantiómeros, diatereómeros, d-isómeros, 1-isómeros, las mezclas racémicas de los mismos y otras mezclas de los mismos, como caiga dentro del alcance de la presente materia.

10 La frase “portador farmacéuticamente aceptable” como se usa a este respecto se refiere a cualquier ingrediente inactivo presente en una de las composiciones descritas en la presente en una cantidad efectiva para mejorar la estabilidad, efectividad, o de otro modo de la composición. Los ejemplos no limitantes de portadores farmacéuticamente aceptables incluyen diluyentes, excipientes, agentes de suspensión, agentes lubricantes, adyuvantes, vehículos, sistemas de distribución, emulsionadores, desintergrantes, absorbentes, adsorbentes, conservadores, agentes tensioactivos, colorantes, saborizantes, emolientes, amortiguadores, modificadores de pH, espesadores, agentes de ablandamiento de agua, humectantes, fragancias, estabilizadores, agentes acondicionadores, agentes quelantes, edulcorantes, propulsores, agentes anti-endurecimiento, agentes incrementadores de viscosidad, solubilizadores, plastificantes, agentes mejoradores de penetración, deslizantes, agentes formadores de película, agentes de relleno, agentes de revestimiento, aglutinantes, antioxidantes, agentes rigidizadores, agentes humectantes o cualquier mezcla de estos componentes.

20 Como se usa en la presente, la frase “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a sales de ciertos ingredientes que poseen la misma actividad como los compuestos no modificados y que ni son biológicamente ni de otro modo indeseables. Se puede formar una sal con, por ejemplo, ácidos orgánicos o inorgánicos. Los ejemplos no limitantes de ácidos adecuados incluyen ácido acético, ácido acetilsalicílico, ácido adípico, ácido algínico, ácido ascórbico, ácido aspártico, ácido benzoico, ácido bencenosulfónico, ácido bisulfúrico, ácido bórico, ácido butírico, ácido canfórico, ácido canforsulfónico, ácido carbónico, ácido cítrico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido diglucónico, ácido dodecilsulfúrico, ácido etanosulfónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido glicérico, ácido glicerofosfórico, glicina, ácido glucoheptanoico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido glutárico, ácido glicólico, ácido hemisulfúrico, ácido heptanoico, ácido hexanoico, ácido hipúrico, ácido bromhídrico, ácido clorhídrico, ácido yodhídrico, ácido hidroxietanosulfónico, ácido láctico, ácido maleico, ácido málico, ácido malónico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido múxico, ácido naftilenosulfónico, ácido naftílico, ácido nicotínico, ácido nitroso, ácido oxálico, ácido pelargónico, ácido fosfórico, ácido propiónico, sacarina, ácido salicílico, ácido sórbico, ácido succínico, ácido sulfúrico, ácido tartárico, ácido tiocianico, ácido tioglicólico, ácido tiosulfúrico, ácido tosílico, ácido undecilénico, y aminoácidos derivados de forma natural y de manera sintética.

35 Como se usa en la presente, “sujeto” o “individuo” o “animal” o “paciente” o “mamífero,” se refiere a cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, de quien se desea la diagnosis, prognosis o terapia, por ejemplo, un humano.

40 Como se usa en la presente, un “tratamiento” o “tratar” de una enfermedad, trastorno o condición abarca alivio de al menos un síntoma de la misma, una reducción en la severidad de la misma, o el retraso, prevención, o inhibición del progreso de la misma. El tratamiento no necesita significar que se cure totalmente la enfermedad, trastorno o condición. Una composición útil en la presente sólo necesita reducir la severidad de una enfermedad, trastorno o condición, reducir la severidad de los síntomas asociados con esta, proporcionar mejora a un paciente o calidad de vida del sujeto o retrasar, prevenir o inhibir el comienzo de una enfermedad, trastorno o condición.

45 Como se usa en la presente, el término “modular” significa que un compuesto de la presente materia puede ser un activador o inhibidor de Hsp70 o Hsc70. Un activador promoverá las vías de HSP. Los activadores serán útiles para enfermedades donde la proliferación incrementada puede tener un efecto terapéutico benéfico. Un inhibidor inhibirá Hsp70 o Hsc70 y de este modo inhibe la ruta de HSP e inhibe el crecimiento de varios cánceres y trastornos proliferativos. En consecuencia, en condiciones donde se requiere actividad incrementada de la ruta de HSP, entonces se prefiere un activador. En condiciones donde se requiere la inhibición de la ruta de HSP, entonces se prefiere un inhibidor.

50 En ciertas modalidades, los compuestos de la presente materia son útiles en el tratamiento de trastornos proliferativos. El término “trastorno proliferativo” como se usa en la presente se refiere a cáncer, incluyendo cánceres de mama, próstata, pulmón, colon, estómago, pancreático, ovárico, cerebro y hematopoyético, carcinoma esofágico, carcinoma de células renales, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, leucemias y sarcomas tal como colangiosarcoma y sarcoma esofágico. En particular, esto incluye cánceres de mama y ovárico, cáncer de próstata, cáncer pancreático, carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón de células no pequeñas y de células pequeñas (NSCL y SCLC), cáncer colorectal, leucemia y linfoma. Se incluyen cánceres metastáticos, tal como por ejemplo, cáncer metastático de mama.

Como se usa en la presente, una “oncoprotéina” significa una proteína que puede inducir o facilitar potencialmente la transformación neoplásica de una célula. En un ejemplo, la proteína se puede codificar por un oncogen. Un oncogen

5 como se usa en la presente es un gen que produce un producto génico que puede inducir o facilitar potencialmente la transformación neoplástica de una célula. Un oncogen puede tener un origen viral o celular. Los ejemplos no limitantes de oncoproteínas incluyen receptores de factores de crecimiento, proteína-cinasas, transductores de señales, fosfoproteínas nucleares, metil-transferasas y factores de transcripción. Cuando estas proteínas se expresan, activan o
 10 translocan de forma anormal dentro de la célula después de cambios estructurales y/o regulatorios, puede resultar la proliferación celular descontrolada y el déficit en la muerte celular. Los ejemplos no limitantes de una oncoproteína de la presente materia incluyen ErbB2 (Her2/Neu), EGFR/ErbB1, ErbB3, ErbB4, ErbB5 y cualquier otro miembro de la familia de erbB, PDGFR, PML-RAR AKT, BCR-abl, src, miembros de la familia de Raf (por ejemplo, C-Raf, B-Raf), p53 negativo dominante, HIF-1 α , Telomerasa, MTG8 (proteína de leucemia mieloide), Factor de Choque Térmico, transcriptasa inversa de virus de Hepatitis B, c-src, v-src, p53 mutada o ausente, receptor de estrógeno, proteínas K-ras mutantes, óxido nítrico-sintasa y proteína quimérica p210_{BCR-ABL} individualmente y/o en cualquier combinación. La presente invención incluye además cualquier otra oncoproteína no conocida o identificada posteriormente como que esté asociada con Hsp70 o el complejo Hsp70-Hsp90. En algunas modalidades, las oncoproteínas presentes en un
 15 paciente se miden antes, durante y después de terapia. En otras modalidades, la administración de los compuestos de la presente materia a un paciente en necesidad de estas da por resultado la desestabilización y degradación de una o más oncoproteínas en el paciente.

Cualquier intervalo de concentración, intervalo de porcentaje o intervalo de relación, citado en la presente se va a entender que incluye concentraciones, porcentajes o relaciones de cualquier número entero dentro de ese intervalo y fracciones de los mismos, tal como un décimo y un céntimo de un entero, a menos que se indique de otro modo.

20 Se debe entender que los términos “un” y “una” como se usan anteriormente y en otra parte de la presente se refieren a “uno o más” de los componentes enumerados. Será claro a un experto en la técnica que el uso de lo singular incluye lo plural a menos que se señale específicamente lo contrario. Por lo tanto, los términos “un”, “una” y “al menos uno” se usan de manera indistinta en esta solicitud. Por ejemplo, “un” polímero se refiere tanto a un polímero como a una mezcla que comprende dos o más polímeros.

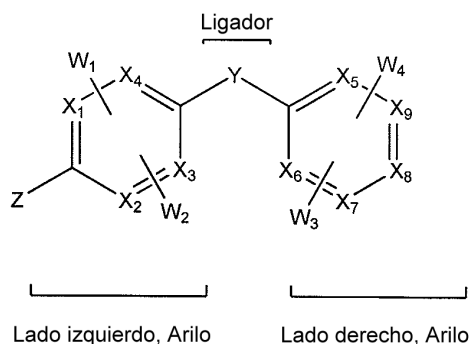
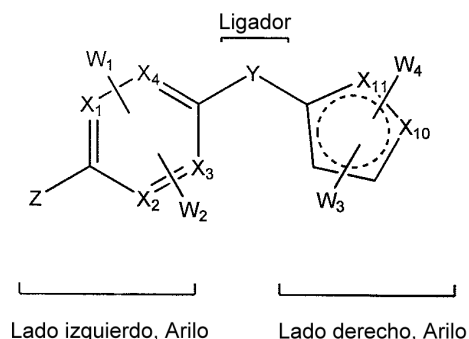
25 A lo largo de la solicitud, las descripciones de varias modalidades usan el texto “que comprende”; sin embargo, se entenderá por un experto en la técnica, que en algunos casos específicos, una modalidad se puede describir de manera alternativa usando el texto “que consiste esencialmente de” o “que consiste de”.

30 Para propósitos de entender mejor las presentes enseñanzas y de ningún modo limitar el alcance de las enseñanzas, a menos que se indique de otro modo, todos los números que expresan cantidades, porcentajes o proporciones, y otros valores numéricos usados en la especificación y en las reivindicaciones, se van a entender como que están modificados en todos los casos por el término “aproximadamente”. Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la siguiente especificación y reivindicaciones anexas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busca obtener. En el último momento, cada parámetro numérico se debe construir al menos en vista del número de dígitos significativos reportados y al aplicar técnicas ordinarias de redondeo.
 35

Otros términos como se usa en la presente se proponen para que se definan por sus significados bien conocidos en la técnica.

Compuestos de la Presente Materia

Se describen en la presente:

Fórmula I**Fórmula 1a****Fórmula 1b****Fórmula I'****Fórmula 1a'****Fórmula 1b'**

sus estereoisómeros, tautómeros, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde,

$X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6, X_7, X_8,$ y X_9 se seleccionan independientemente de CH, C sustituido, y N sustituido;

X_{10} y X_{11} se seleccionan independientemente de CH, CH_2 , NH, NR, O, y S tal que se mantiene la aromaticidad; R es una cadena de alquilo o alquilo sustituido;

Y es S, SO, SO_2 , CH_2 , CHR, CRR, CO, O, NH, o NR, en donde R es una cadena de alquilo o alcoxilo inferior;

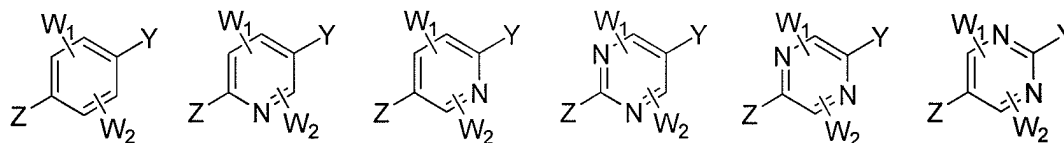
Z se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alquenilo, hidroalquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, - $NHSO_2$ alqueno, - $NHCO$ alqueno, - $NHCO$ alquino, - CO alqueno, - CO alquino, trihalocarbono, tioalquilo, SO_2 -alquilo, - COO -alquilo, - CO alquilo, y alquil-CN;

W_1 y W_2 independientemente en cada ocurrencia se pueden seleccionar del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alquenilo, hidroalquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, - $NHSO_2$ alqueno, - $NHCO$ alqueno, - $NHCO$ alquino, - CO alqueno, - CO alquino, trihalocarbono, tioalquilo, SO_2 -alquilo, - COO -alquilo, - CO alquilo, y alquil-CN; o W_1 y W_2 se pueden unir conjuntamente mediante un ligador, para formar un anillo fusionado de 5 o 6 miembros; y

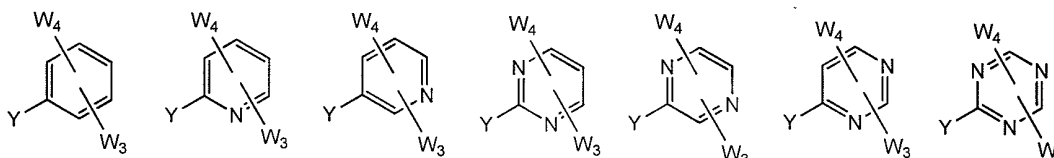
W_3 y W_4 independientemente en cada ocurrencia se pueden seleccionar del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alquenilo, hidroalquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, - $NHSO_2$ alqueno, - $NHCO$ alqueno, - $NHCO$ alquino, - CO alqueno, - CO alquino, trihalocarbono, tioalquilo, SO_2 -alquilo, - COO -alquilo, - CO alquilo, y alquil-CN; o W_3 y W_4 se pueden unir conjuntamente mediante un ligador, para formar un anillo fusionado de 5 o 6 miembros.

Adicionalmente, W_2 se puede unir al anillo arilo del lado derecho directamente para formar un anillo de 5 miembros o mediante un ligador para formar un anillo de 6 o 7 miembros.

En modalidades preferidas de la fórmula (1a) y fórmula (1b), X_1 - X_4 se seleccionan independientemente pero no se limitan a:



En modalidades preferidas de la fórmula (1a), X₅-X₉ se seleccionan independientemente de pero no se limitan a:



5 En modalidades preferidas de la fórmula (1b'), X₁₀ es CH₂, NH, NR', O, y S; en donde R' es una cadena de alquilo inferior;

En modalidades preferidas de la fórmula (I) y fórmula (I') Y es S, SO, SO₂, O o CH₂.

10 En modalidades preferidas de la fórmula (1a) y fórmula (1a') Z es alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

15 En modalidades preferidas de la fórmula (1a) y fórmula (1a') W₁ y W₂ en cada ocurrencia se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido; W₁ y W₂ se pueden unir conjuntamente mediante un ligador, para formar un anillo fusionado de 5 o 6 miembros.

20 En modalidades preferidas de la fórmula (1b) y fórmula (1b') W₃ y W₄ en cada ocurrencia se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido; W₃ y W₄ se pueden unir conjuntamente mediante un ligador, para formar un anillo fusionado de 5 o 6 miembros.

25 En una modalidad, el compuesto de la fórmula (I) o (I') es como se define anteriormente, con la condición que: (1) Y se selecciona del grupo que consiste de S, SO, y SO₂; (2) Z se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, y diarilamino; (3) el arilo del lado izquierdo de la fórmula 1a o 1a' contiene al menos un nitrógeno de anillo; (4) al menos uno de W₁ y W₂ se selecciona del grupo que consiste de alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, y diarilamino; y (5) al menos uno de W₃ y W₄ se selecciona del grupo que consiste de amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, -NHCOalquenilo, -NHCOalquinilo, -NHCOalquino, -COalquenilo, -COalquinilo, alquilamido, alquilsulfonamido, y sulfonamido.

35 En otra modalidad, el compuesto de la fórmula (I) o (I') es como se define anteriormente, con la condición que: (1) Z se selecciona del grupo que consiste de arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, y diarilamino; (2) al menos uno de W₁ y W₂ se selecciona del grupo que consiste de alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, y diarilamino; y (3) al menos uno de W₃ y (4) W₄ se selecciona del grupo que consiste de amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido o insustituido, -NHCOalquenilo, -NHCOalquinilo, -NHCOalquino, -COalquenilo, -COalquinilo, alquilamido, alquilsulfonamido, y sulfonamido.

40 En una modalidad adicional, el compuesto de la fórmula (I) o (I') es como se define anteriormente, con la condición que: (1) Y se selecciona del grupo que consiste de S, SO, y SO₂; (2) Z se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno,

hidroxilo, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, y diarilamino; (3) al menos uno de W_1 y W_2 se selecciona del grupo que consiste de alquilo, alqueno, alquino, arilo, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, y diarilamino; y (4) al menos uno de W_3 y W_4 se selecciona del grupo que consiste de amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido o insustituido, -NHSO₂alqueno, -NHCOalqueno, -NHCOalquino, -COalqueno, -COalquino, alquilamido, alquilsulfonamido, y sulfonamido.

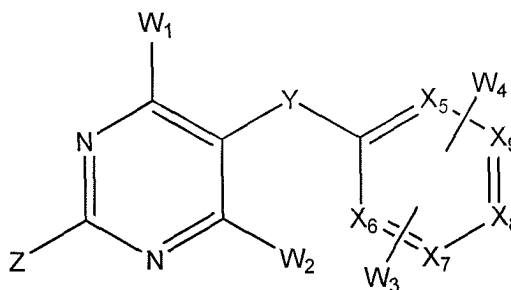
En una modalidad adicional, el compuesto de la fórmula (I) o (I') es como se define anteriormente, con la condición que: (1) Z se selecciona del grupo que consiste de arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, y diarilamino; (2) tanto W_1 y W_2 se seleccionan del grupo que consiste de alquilo, alqueno, alquino, arilo, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, y diarilamino; y (3) al menos uno de W_3 y W_4 se selecciona del grupo que consiste de amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido o insustituido, -NHSO₂alqueno, -NHCOalqueno, -NHCOalquino, -COalqueno, -COalquino, alquilamido, alquilsulfonamido, y sulfonamido.

En una modalidad adicional, el compuesto de la fórmula (I) o (I') es como se define anteriormente, con la condición que: (1) tanto W_1 y W_2 se seleccionan del grupo que consiste de arilo, heterociclo, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, y diarilamino; y (4) al menos uno de W_3 y W_4 se selecciona del grupo que consiste de amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido o insustituido, -NHSO₂alqueno, -NHCOalqueno, -NHCOalquino, -COalqueno, -COalquino, alquilamido, alquilsulfonamido, y sulfonamido.

En una modalidad, el compuesto de la fórmula (I) o (I') es como se define anteriormente, con la condición que: (1) Y se selecciona del grupo que consiste de S, SO, y SO₂; (2) Z se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, y diarilamino; (3) ya sea el arilo del lado izquierdo o el arilo del lado derecho de la fórmula 1a o 1a' contiene al menos dos nitrógenos de anillo; (4) al menos uno de W_1 y W_2 se selecciona del grupo que consiste de alquilo, alqueno, alquino, arilo, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, y diarilamino; y (5) al menos uno de W_3 y W_4 se selecciona del grupo que consiste de amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido o insustituido, -NHSO₂alqueno, -NHCOalqueno, -NHCOalquino, -COalqueno, -COalquino, alquilamido, alquilsulfonamido, y sulfonamido.

En una modalidad, el compuesto de la fórmula (I) o (I') es como se define anteriormente, con la condición que: (1) Y se selecciona del grupo que consiste de S, SO, y SO₂; (2) Z se selecciona del grupo que consiste de arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, y diarilamino; (3) ya sea el arilo del lado izquierdo o el arilo del lado derecho o ambos arilos de la fórmula 1a o 1a' contienen al menos dos nitrógenos de anillo; (4) al menos uno de W_1 y W_2 se selecciona del grupo que consiste de amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, y diarilamino; y (5) al menos uno de W_3 y W_4 se selecciona del grupo que consiste de alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido o insustituido, -NHSO₂alqueno, -NHCOalqueno, -NHCOalquino, -COalqueno, -COalquino, alquilamido, alquilsulfonamido, y sulfonamido.

Otra modalidad se refiere a compuestos que tienen la fórmula:



Fórmula 2a

sus estereoisómeros, tautómeros, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde,

X_5 - X_9 se seleccionan independientemente de CH, C sustituido, y N sustituido;

Y es S, SO, SO₂, CH₂, CHR, CRR, CO, O, NH, o NR, donde R es una cadena de alcoxilo o alquilo inferior;

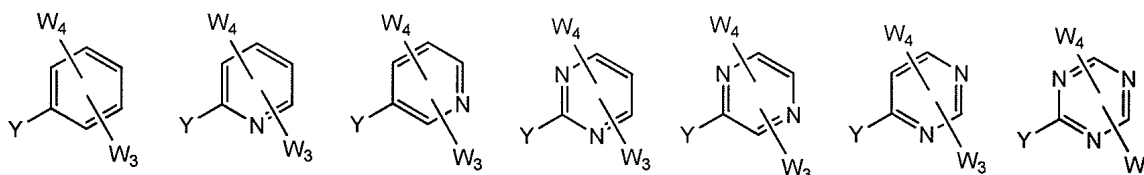
Z se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alquenoiloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alqueno, -NHCOalqueno, -NHCOalquino, -COalqueno, -COalquino, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN;

W₁ y W₂ independientemente en cada ocurrencia se pueden seleccionar del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alquenoiloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alqueno, -NHCOalqueno, -NHCOalquino, -COalqueno, -COalquino, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN; y;

W₃ y W₄ independientemente en cada ocurrencia se pueden seleccionar del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alquenoiloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alqueno, -NHCOalqueno, -NHCOalquino, -COalqueno, -COalquino, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN; o W₃ y W₄ se pueden unir conjuntamente mediante un ligador, para formar un anillo fusionado de 5 o 6 miembros.

Adicionalmente, W₂ se puede unir al anillo de arilo del lado derecho directamente para formar un anillo de 5 miembros o mediante un ligador para formar un anillo de 6 o 7 miembros.

En modalidades preferidas de la fórmula (2a), X₅-X₉ se seleccionan independientemente de pero no se limitan a:



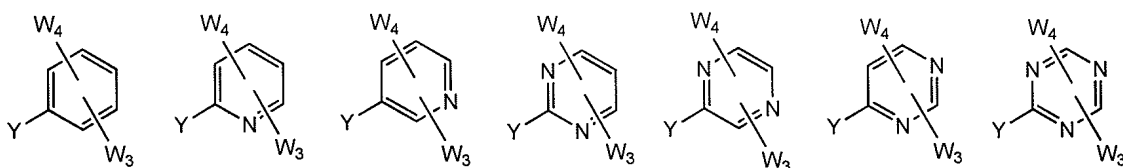
En modalidades preferidas de la fórmula (2a), Y es S, SO, SO₂, O o CH₂.

En modalidades preferidas de la fórmula (2a), Z es alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alquenoiloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

En modalidades preferidas de la fórmula (2a), W₁ y W₂ en cada ocurrencia se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alquenoiloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

En modalidades preferidas de la fórmula (2a), W₃ y W₄ en cada ocurrencia se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alquenoiloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

En modalidades preferidas particulares de la fórmula (2a), X₅-X₉ son



En

modalidades preferidas particulares de la fórmula (2a), Y es S, SO, o SO₂.

5 En modalidades preferidas particulares de la fórmula (2a), Z es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino o diarilamino.

En modalidades preferidas particulares de la fórmula (2a), W₁ y W₂ son independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, o diarilamino.

10 En modalidades preferidas particulares de la fórmula (2a), W₃ y W₄ son independientemente hidrógeno, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alquenilo, -NHCOalquenilo, -NHCOalquinilo, -COalquenilo, -COalquinilo, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN.

15 La tabla 1 muestra ejemplos de compuestos específicos que ejemplifican esta modalidad. Los valores de IC₅₀ listados para algunos de estos compuestos ilustran los efectos antiproliferativos de los presentes compuestos y se obtuvieron usando ensayos de Inhibición de Crecimiento descritos en la presente.

Tabla 1

ID#	Nombre de Compuesto	IC ₅₀ (μM) Kasumi	IC ₅₀ (μM) SKBr ₃
YK1	N,N'-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4,6-diil)-diacetamida	15	
YK2	2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metil-piperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4,6-diamina	57.2	
YK3	N,N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metil-piperazin-1-il)pirimidin-5-ilsulfinil)pirimidin-4,6-diil)diacetamida		
YK4	N-(6-amino-2-(2-amino-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)-pirimidin-4-il)-3-(dietilamino)-propanamida		
YK5	N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida	0.4-0.6	0.455
YK6	N-(6-amino-2-(2-amino-4,6-dime-toxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-3-(4-metilpiperazin-1-il)-propanamida	23	
YK7	N,N'-(2-(2-(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4,6-diil)-diacetamida		
YK8	N,N'-(2-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)-pirimidin-4,6-diil)diacetamida	>100	
YK9	N,N'-(2-(4,6-dimetoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4,6-diil)diacetamida	>100	

ID#	Nombre de Compuesto	IC ₅₀ (μ M) Kasumi	IC ₅₀ (μ M) SKBr ₃
YK10	2-(4-(5-(4,6-diaminopirimidin-2-iltio)-4,6-dimetoxipirimidin-2-il)piperazin-1-il)etanol		
YK11	2-(4,6-dimetoxi-2-morfolino-pirimidin-5-iltio)pirimidin-4,6-diamina	>100	
YK12	2-(4,6-dimetoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4,6-diamina	>100	
YK13	N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propionamida	>100 (>100)	
YK14	N-(6-amino-2-(2-(4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)-pirimidin-4-il)propionamida	>100	
YK15	N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2- morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propionamida	>100	
YK16	N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propionamida	>100	
YK17	N-(6-amino-2-(2-(4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)-pirimidin-4-il)acrilamida		
YK18	N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2- morfolinopirimidin-5-iltio)-pirimidin-4-il)acrilamida	3	
YK19	N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida	2.5	
YK20	N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4- metilpiperazin-1-il)pirimidin-5- iltio)pirimidin-4-il)octanamida	6.3	
YK21	N-(6-amino-2-(2-(4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)-pirimidin-4-il)octanamida	7.2	
YK22	N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)-pirimidin-4-il)octanamida	12.3	
YK23	N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)octanamida	13.2	
YK24	N,N'-(2-(2-(4-butilpiperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4,6-diil)diacetamida	16.8	
YK25	2-(2-(4-butilpiperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)-pirimidin-4,6-diamina	>100	
YK26	N-(6-amino-2-(2-(4-butilpiperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida		
YK27	N-(6-amino-2-(2-(4-butilpiperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)octanamida		

ES 2 608 670 T3

ID#	Nombre de Compuesto	IC ₅₀ (μM) Kasumi	IC ₅₀ (μM) SKBr ₃
YK28	2-(4,6-dietoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4,6-diamina		
YK29	N,N'-(2-(4,6-dietoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4,6-diil)-diacetamida	76.7	
YK30	N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida	0.48	
YK31	N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propionamida	34.1	
YK32	N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-3-cloropropanamida		
YK33	N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)ciclopropanocarboxamida	88.7 (14.2)	
YK34	(E)-N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)but-2-enamida	55	
YK35	2-(4,6-dietoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4,6-diamina		
YK36	N,N'-(2-(4,6-dietoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4,6-diil)-diacetamida		
YK37	N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida	2.5	
YK38	N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propionamida	50	
YK39	N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-2-bromoacetamida		
YK40	N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)ciclopropanocarboxamida	38.3	
YK41	N,N'-(2-(4,6-dietoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4,6-diil)diclopropano-carboxamida	>100	
YK42	(E)-N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)but-2-enamida		
YK43	N,N'-(2-(4,6-dietoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4,6-diil)diacetamida		
YK44	N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida	1.2	
YK45	N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propionamida		

ES 2 608 670 T3

ID#	Nombre de Compuesto	IC ₅₀ (μ M) Kasumi	IC ₅₀ (μ M) SKBr ₃
YK46	N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2- morfolinopirimidin-5-iltio)-pirimidin-4-il)-2-bromoacetamida		
YK47	N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2- morfolinopirimidin-5-iltio)-pirimidin-4-il)ciclopropanocarboxamida		
YK48	(E)-N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2- morfolinopirimidin-5-iltio)-pirimidin-4-il)but-2-enamida		
YK49	N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2- morfolinopirimidin-5-iltio)-pirimidin-4-il)furan-2-carboxamida	>100	
YK50	N-(6-amino-2-(2-amino-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)-pirimidin-4-il)acrilamida	1.5	
YK51	N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4- metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-3-(dimetilamino)propanamida	8	
YK52	6-(5-(4,6-diaminopirimidin-2-iltio)-4,6-dimetoxipirimidin-2-ilamino)hexan-1-ol	779	
YK53	N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4- metilpiperazin-1-il)pirimidin-5- iltio)pirimidin-4-il)acetamida	16	
YK54	N-(6-amino-2-(2-(4-(2-(2-(2-(2-hidroxietoxi)etoxi)etoxi)etil)-piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida	4.8	
YK55	5-(2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoato de 2-(2-(2-(2-(4-(5-(4-acrilamido-6-aminopirimidin-2-iltio)-4,6-dimetoxipirimidin-2-il)piperazin-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)etilo	13.1	
YK56	5-((3aR,4R,6aS)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)-pentanoato de 2-(2-(2-(2-(5-(4-acrilamido-6-aminopirimidin-2- iltio)-6-metoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-4-iloxi)etoxi)etoxi)etoxi)etilo		
YK57	N-(6-amino-2-(4-(2-(2-(2-(2- hidroxietoxi)etoxi)etoxi)etoxi)-6-metoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida		
YK58	N-(6-amino-2-(2-amino-4-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida		
YK59	5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoato de 2-(2-(2-(2-(4-(5-(4-amino-6-propionamidopirimidin-2-iltio)-4,6-dietoxipirimidin-2-il)piperazin-1-il)-etoxi)etoxi)etoxi)etilo		
YK60	5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoato de 2-(2-(2-(2-(4-(5-(4-amino-6-(3-(dimetilamino)-propanamido)pirimidin-2-iltio)- 4,6-dimetoxipirimidin-2-il)-piperazin-1-il)etoxi)etoxi)-etoxi)etilo		

ES 2 608 670 T3

ID#	Nombre de Compuesto	IC ₅₀ (μ M) Kasumi	IC ₅₀ (μ M) SKBr ₃
YK61	N-(2-(2-amino-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acetamida	94.4	
YK62	N-(2-(2-fluoro-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acetamida	>100	
YK63	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acetamida	11.2	
YK64	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acetamida	4	
YK65	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acetamida	15.7	
YK66	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(pirrolidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acetamida	48.3	
YK67	2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)-pirimidin-4-amina	93.5	
YK68	2-(4,6-dimetoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-amina	14.7	
YK69	2-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-amina	54.2	
YK70	2-(4,6-dimetoxi-2-(pirrolidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-amina	25.2	
YK71	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida	0.8	1.2
YK72	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida	2	
YK73	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida	1.9	11.6
YK74	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(pirrolidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida	42.2	4.3
YK75	4-(5-(4-acetamidopirimidin-2-iltio)-4,6-dimetoxipirimidin-2-il)-1-metilpiperazin-1-óxido		>100
YK76	N-(2-(2,4,6-trimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida	22.5	2.4
YK77	N-(2-(2,4,6-trimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propionamida	62.3	79.2
YK78	N-(2-(2,4,6-trimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)ciclopropanocarboxamida		
YK79	4-(5-(4-aminopirimidin-2-iltio)-4,6-dimetoxipirimidin-2-il)-1-metilpiperazin-1-óxido		

ES 2 608 670 T3

ID#	Nombre de Compuesto	IC ₅₀ (μ M) Kasumi	IC ₅₀ (μ M) SKBr ₃
YK80	4-(5-(4-acrilamidopirimidin-2-iltio)-4,6-dimetoxipirimidin-2-il)-1-metilpiperazin-1-óxido	>100	31.1
YK81	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propionamida		
YK82	4-(4,6-dimetoxi-5-(4-propionamidopirimidin-2-ilsulfonil)pirimidin-2-il)-1-metilpiperazin-1-óxido		
YK83	4-(5-(4-aminopirimidin-2-ilsulfonil)-4,6-dimetoxipirimidin-2-il)-1-metilpiperazin-1-óxido		
YK84	2-(4,6-dimetil-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-amina		
YK85	N-(2-(4,6-dimetil-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida	4.8	1.8
YK86	N-(2-(4,6-dimetil-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propionamida	26.2	44.4
YK87	(E)-N-(2-(4,6-dimetil-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)but-2-enamida	16.0	
YK88	N-(2-(4,6-dimetil-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)metacrilamida	13.1	16.7
YK89	N-(2-(4,6-dimetil-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)furan-2-carboxamida	12.0, 7.5	6.8
YK90	N-(2-(4,6-dimetil-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)ciclopropanocarboxamida	20.1, 27.1	25.8
YK91	2-(2-(4-(4-aminobutil)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4,6-diamina		
YK92	N-(6-amino-2-(2-(4-(4-aminobutil)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida		
YK93	2-(2-(4-(4-aminobutil)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-amina		
YK94	N-(2-(2-(4-(4-aminobutil)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida		
YK95	N-(2-(2-(4-(4-aminobutil)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)furan-2-carboxamida		
YK96	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propionamida		
YK97	(E)-N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)but-2-enamida		

ES 2 608 670 T3

ID#	Nombre de Compuesto	IC ₅₀ (μ M) Kasumi	IC ₅₀ (μ M) SKBr ₃
YK98	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)metacrilamida		
YK99	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)-pirimidin-4-il)furan-2- carboxamida		
YK100	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)-pirimidin-4-il)furan-2-carboxamida		
YK101	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propionamida		
YK102	(E)-N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)but-2- enamida		
YK103	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)metacrilamida		
YK104	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)furan-2-carboxamida		
YK105	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)ciclopropanocarboxamida		
YK106	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(pirrolidin- 1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propionamida	>100	99.5
YK107	(E)-N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(pirrolidin-1-il)pirimidin-5-iltio)-pirimidin-4-il)but-2-enamida		
YK108	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(pirrolidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)metacrilamida	9.5	
YK109	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(pirrolidin- 1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)furan-2-carboxamida		
YK110	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(pirrolidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)ciclopropanocarboxamida	>100, >100	>100
YK111	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propionamida		
YK112	(E)-N-(2-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)but-2-enamida		
YK113	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)metacrilamida		
YK114	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-furan-2-carboxamida		
YK115	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)ciclopropanocarboxamida		

ES 2 608 670 T3

ID#	Nombre de Compuesto	IC ₅₀ (μ M) Kasumi	IC ₅₀ (μ M) SKBr ₃
PDP2	3-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)anilina	79.7	>100
PDP3	N-(3-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)fenil)-acrilamida	11.4	16.5
PDP4	N-(3-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)fenil)-propionamida	>100	>100
PDP5	N-(3-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)fenil)metacrilamida		18.1
PDP6	N-(3-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)fenil)ciclopropanocarboxamida	?	9.9(?)
PDP7	2-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)-6-(trifluorometil)pirimidin-4-ol		
PDP8	acrilato de 2-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)-6-(trifluorometil)pirimidin-4-ilo		
PDP9	Ciclopropanocarboxilato de 2-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)-6-(trifluorometil)pirimidin-4-ilo		
PDP10	metacrilato de 2-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)-6-(trifluorometil)pirimidin-4-ilo		
YK116	2-(4,6-dimetil-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-amina		
YK117	N-(2-(4,6-dimetil-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida	6.2	14.4
YK118	N-(2-(4,6-dimetil-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propionamida	>100	>100
YK119	(E)-N-(2-(4,6-dimetil-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-but-2-enamida		
YK120	N-(2-(4,6-dimetil-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)metacrilamida		
YK121	N-(2-(4,6-dimetil-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-furan-2-carboxamida		
YK122	N-(2-(4,6-dimetil-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)ciclopropanocarboxamida		
YK123	N-(2-(4,6-dimetil-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-2-metoxiacetamida	58.1	>100
YK124	2-(4,6-dimetil-2-(piperazin-1-il)-pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-amina		
YK125	N-(2-(4,6-dimetil-2-(piperazin-1-il)-pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida		

ES 2 608 670 T3

ID#	Nombre de Compuesto	IC ₅₀ (μ M) Kasumi	IC ₅₀ (μ M) SKBr ₃
YK126	N-(2-(4,6-dimetil-2-(piperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propionamida		
YK127	(E)-N-(2-(4,6-dimetil-2-(piperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)but-2-enamida		
YK128	N-(2-(4,6-dimetil-2-(piperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)metacrilamida		
YK129	N-(3-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acrilamida	7.7, 9.9	6.8
YK130	N-(3-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)propionamida	10.4, 21.2	18.3
YK131	(E)-N-(3-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)but-2-enamida	15.0	20.7
YK132	N-(3-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)metacrilamida-N-(3-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)metacrilamida	7.7	17.8
YK133	3-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)anilina	30.5, 25.4	37.3
YK134	N-(3-(4,6-dimetil-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)propionamida		
YK135	N-(3-(4,6-dimetil-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)propionamida		
YK136	(E)-N-(3-(4,6-dimetil-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)but-2-enamida		
YK137	N-(3-(4,6-dimetil-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)metacrilamida		
YK138	3-(4,6-dimetil-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)anilina		
YK139	N-(3-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)ciclopropanocarboxamida	8.9, 7.9	7.7
YK140	N-(3-(2-amino-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)fenil)propionamida	35.2	99.5
YK141	N-(3-(2-(4-(2-(2-(2-hidroxi)etoxi)etoxi)etil)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)fenil)propionamida		38.9
YK142	5-(2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoato de 2-(2-(2-(2-(4,6-dimetoxi-5-(3-propionamidofeniltio)pirimidin-2-il)piperazin-1-il)etoxi)etoxi)-etoxi)etilo		47.9

ES 2 608 670 T3

ID#	Nombre de Compuesto	IC ₅₀ (μM) Kasumi	IC ₅₀ (μM) SKBr ₃
YK144	N-(2-(2-(4-(2-(2-(2-hidroxietoxi)etoxi)etoxi)etil)piperazin-1-il)-4,6-dimetilpirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)furan-2-carboxamida		
YK145	5-(2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoato de 2-(2-(2-(2-(4-(5-(4-(furan-2-carboxamido)pirimidin-2-iltio)-4,6-dimetilpirimidin-2-il)-piperazin-1-il)etoxi)etoxi)-etoxi)etilo		
YK146	N-(3-(4,6-dimetil-2-(piperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)propionamida	8.8, 9.0	
YK147	N-(3-(4,6-dimetil-2-(piperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)but-3-enamida		
YK148	N-(3-(4,6-dimetil-2-(piperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)metacrilamida		
YK149	2-amino-N-(3-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida	13.9 21.0	
YK177	2-(5-(3-acetamidofeniltio)-2-amino-6-metilpirimidin-4-ilo)propanoato de metilo		
TT-2	N-(3-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)ciclobutanocarboxamida		
TT-3	N-(3-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)ciclohexanocarboxamida		
TT-4	N-(3-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)benzamida		
TT-5	2-amino-N-(3-(2-(4-metilpiperazin-1-il)-4-fenilpirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		
TT-6	N-(2-(2-(2-(2-(4-(5-(4-acrilamido-6-aminopirimidin-2-iltio)-4,6-dimetoxipirimidin-2-il)-piperazin-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)etil)-5-(2-oxohexahidro-1H-tieno-[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamida		
TT-7	N-(3-(4-(benciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		
TT-8	N-(3-(4-(benciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)benzamida		
TT-9	2-amino-N-(3-(4-(benciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		
TT-10	2-amino-N-(3-(4-(4-metoxibenciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		

ES 2 608 670 T3

ID#	Nombre de Compuesto	IC ₅₀ (μ M) Kasumi	IC ₅₀ (μ M) SKBr ₃
TT-11	N-(3-(4-(4-metoxibenciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		
TT-12	2-amino-N-(3-(4-(ciclopentilmetoxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		
TT-13	2-amino-N-(3-(2-(4-metilpiperazin-1-il)-4-fenoxipirimidin-5-iltio)-fenil)acetamida		
TT-14	2-amino-N-(3-(4-(ciclopentiloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)-pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		
TT-15	2-amino-N-(3-(4-(ciclohexiloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)-pirimidin-5-iltio)fenil)-acetamida		
TT-16	2-amino-N-(3-(2-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(piridin-3-ilmetoxi)-pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		
TT-17	2-amino-N-(3-(2-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(piridin-4-ilmetoxi)-pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		
TT-18	2-amino-N-(3-(4-(benciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)propanamida		
TT-19	2-amino-N-(3-(4-(benciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)-3-metilbutanamida		
TT-20	N-(3-(4-(benciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)pirrolidin-2-carboxamida		
TT-21	2-amino-N-(3-(4-bencil-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		
TT-22	2-amino-N-(3-(4-(4-clorobenciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)-pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		
TT-23	2-amino-N-(3-(4-metoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		
TT-24	2-amino-N-(3-(4-(3-aminobenciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		
TT-25	2-amino-N-(3-(4-(2-aminobenciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)-pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		
TT-26	2-amino-N-(3-(4-(difluoro(fenil)-metoxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		
TT-27	2-amino-N-(3-(4-(3,5-difluorobenciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)-acetamida		
TT-28	N-(3-(4-(benciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acrilamida		

ES 2 608 670 T3

ID#	Nombre de Compuesto	IC ₅₀ (μ M) Kasumi	IC ₅₀ (μ M) SKBr ₃
TT-29	N-(2-(4-(benciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida		
TT-30	N-(6-amino-2-(4-(benciloxi)-2-(4- etilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida		
1-01	2-amino-N-(3-(4-(3-(dimetilamino)fenil)-2-(4-metilpiperazin-1-il)-pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		
1-02	2-amino-N-(3-(4-(4-(dimetilamino)fenil)-2-(4-metilpiperazin-1-il)-pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		
1-03	2-amino-N-(3-(4-(3-cianofenil)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		
1-04	2-amino-N-(3-(2-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(3-nitrofenil)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		
1-05	2-amino-N-(3-(2-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(3-sulfamoilfenil)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		
1-06	2-amino-N-(3-(4-(furan-2-il)-2-(4- metilpiperazin-1-il)pirimidin-5- iltio)fenil)acetamida		
1-07	N-(3-(4-(furan-3-il)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)benzamida		
1-08	3-(4-(benciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)-N-ciclopropilbenzamida		
1-09	3-(3-(4-(benciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenoxi)-2-metilpropanamida		
1-10	2-amino-N-(3-amino-5-(2-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(1H-pirrol-2- il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		
1-11	2-amino-N-(3-(2-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(1H-pirrol-3-il)pirimidin-5-iltio)fenil)-propanamida		
1-12	2-amino-N-(3-cloro-5-(2-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(1H-pirazol-3-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		
1-13	N-(3-(4-(ciclohexiloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)benzamida		
1-14	2-amino-N-(3-amino-5-(4-(2- (dimetilamino)etoxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		
1-15	2-amino-N-(3-(4-(2-metoxietil)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)propanamida		
1-16	N-(3-(4-acetil-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)-5-clorofenil)-2-aminoacetamida		

ID#	Nombre de Compuesto	IC ₅₀ (μ M) Kasumi	IC ₅₀ (μ M) SKBr ₃
1-17	N-(4-metil-2-(4-metilpiperazin-1-il)-10H-tiocromeno[3,2-d]-pirimidin-7-il)propionamida		
1-18	2-amino-N-(3-(2-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(pirrolidin-2-ilmetoxi)-pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		
1-19	2-amino-N-(3-(2-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(piperidin-4-iloxi)-pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		
1-20	2-amino-N-(3-(4-(benciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)-6-(trifluorometil)pirimidin-5-iltio)-5-metoxifenil)acetamida		
1-21	2-amino-N-(3-(4-(benciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)-3-(1H-imidazol-4-il)propanamida		
1-22	5-(4-(benciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)quinolin-2(1H)-ona		
1-23	2-amino-N-(3-(4-(benciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)-3-metilbutanamida		
1-24	N-(4-(4-(3-(dimetilamino)-fenoxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)piridin-2-il)propionamida		
1-25	N-(3-(2-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(piperidin-3-iloxi)pirimidin-5-iltio)fenil)metanosulfonamida		
1-26	4-(benciloxi)-6-(2-metoxietoxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)-5-(3-(1-feniletiletil)feniltio)pirimidina		
1-27	7-(2-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(quinolin-8-ilmetoxi)pirimidin-5-iltio)quinolin-2(1H)-ona		
1-28	N-(3-(4-(benciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)pirrolidin-2-carboxamida		
1-29	2-amino-N-(3-(4-(benciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)propanamida compuesto con N-(3-(4-(benciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)pirrolidin-2-carboxamida (1:1)		
1-30	2-amino-N-(5-(4-(3-aminofenoxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)piridin-3-il)acetamida		
1-31	2-amino-N-(4-(4-(4-aminociclohexiloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)-6-metilpirimidin-2-il)acetamida		
1-32	2-amino-3-metil-N-(3-(2-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(piridin-3-ilmetoxi)pirimidin-5-ilsulfonil)fenil)pentanamida		
1-33	2-amino-N-(6-(4-(benciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)benzo[d][1,3]dioxo1-4-il)acetamida		

ID#	Nombre de Compuesto	IC ₅₀ (μ M) Kasumi	IC ₅₀ (μ M) SKBr ₃
1-34	(3-(4-(3-aminociclohexiloxi)-2-(4- metilpiperazin-1-il)pirimidin-5- iltio)fenil)metanol		
1-35	2-amino-N-(4-(4-(benciloxi)-6-(2-metoxietoxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		
1-36	2-amino-N-(3-(furan-3-ilamino)-5-(2-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(pirimidin-2-ilmetoxi)pirimidin-5-ilsulfinil)fenil)-4-metilpentanamida		
1-37	2-amino-N-(3-(4-(3-bromo-2-metoxibenciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)-5- metoxifenil)acetamida		
1-38	2-amino-N-(6-(4-(3-aminociclopentiloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirazin-2-il)acetamida		
1-39	2-amino-N-(4-(4-(benciloxi)-6-metoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)-1,3,5-triazin-2-il)propanamisa		
1-40	2-amino-N-(6-(2-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(piridin-3-iloxi)-pirimidin-5-iltio)piridin-2-il)-propanamida		
1-41	2-amino-N-(3-(4-(benciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)-5-(dimetilamino)fenil)acetamida		
1-42	5-(4-(benciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)-3,4-dihidroquinolin-2(1H)ona		
1-43	2-amino-N-(2-(4-(3-carbamimidoilfenoxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acetamida		
1-44	N-(3-(4-(2-(dimetilamino)etoxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acrilamida		
1-45	2-amino-N-(2-(2-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(piridin-2-iloxi)pirimidin-5-ilsulfonil)-piridin-4-il)propanamida		
1-46	2-amino-N-(3-amino-5-(4-(benciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		
1-47	7-(4-(benciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)-3,4-dihidroquinolin-2(1H)ona		
1-48	N-(3-(2-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(piridin-4-iloxi)pirimidin-5-ilsulfinil)fenil)benzamida		
1-49	N-(2-amino-6-(4,6-dimetoxi-2-(4- metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)piridin-4-il)acrilamida		
1-50	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)piridin-4-il)acrilamida		
1-51	N-(3-amino-5-(4,6-dimetoxi-2-(4- metilpiperazin-1-il)pirimidin-5- iltio)fenil)acrilamida		

ES 2 608 670 T3

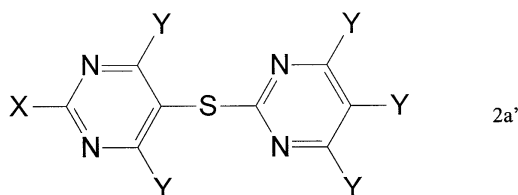
ID#	Nombre de Compuesto	IC ₅₀ (μ M) Kasumi	IC ₅₀ (μ M) SKBr ₃
1-52	N-(3-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acrilamida		
1-53	N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)metacrilamida		
1-54	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)metacrilamida		
1-55	(Z)-N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)but-2-enamida		
1-56	(Z)-N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)but-2-enamida		
1-57	(E)-N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)but-2-enamida		
1-58	(E)-N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)but-2-enamida		
1-59	N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-N-metilacrilamida		
1-60	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-N-metilacrilamida		
1-61	N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propiolamida		
1-62	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propiolamida		
1-63	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)-6-metoxipirimidin-4-il)acrilamida		
1-64	N4-ali1-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4,6-diamina		
1-65	N-alil-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-amina		
1-66	2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)-N4-(prop-2-inil)pirimidin-4,6-diamina		
1-67	2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)-N-(prop-2-inil)pirimidin-4-amina		
1-68	N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-(2-(2-metoxietoxi)etil)piperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida		
1-69	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-(2-(2-metoxietoxi)etil)piperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida		

ES 2 608 670 T3

ID#	Nombre de Compuesto	IC ₅₀ (μ M) Kasumi	IC ₅₀ (μ M) SKBr ₃
1-70	N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-(2-(2-morfolinoetoxi)etil)piperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida		
1-71	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-(2-(2-morfolinoetoxi)etil)piperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida		
1-72	N-(6-amino-2-(2-(4-(2-(2-(dimetilamino)etoxi)etil)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida		
1-73	N-(2-(2-(4-(2-(2-(dimetilamino)etoxi)etil)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida		
1-74	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)-6-(3-morfolinopropilamino)pirimidin-4-il)acrilamida		
1-75	N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)-6-(3-(dimetilamino)propilamino)pirimidin-4-il)acrilamida		
1-76	(E)-N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-4-(dimetilamino)but-2-enamida		
1-77	(E)-N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-4-(dimetilamino)but-2-enamida		
1-78	(E)-N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-3-(furan-2-il)acrilamida		
1-79	(E)-N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-3-(furan-2-il)acrilamida		
1-80	(E)-N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-3-(tiofen-2-il)acrilamida		
1-81	(E)-N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-3-(tiofen-2-il)acrilamida		
1-82	(E)-N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-3-(piridin-3-il)acrilamida		
1-83	(E)-N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-3-(piridin-3-il)acrilamida		
1-84	5-(3-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)-1H-pirrol-2(5H)-ona		
1-85	N-(1-(4-metoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)isoquinolin-3-il)acrilamida		
1-86	N-(4-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acrilamida		

ID#	Nombre de Compuesto	IC ₅₀ (μM) Kasumi	IC ₅₀ (μM) SKBr ₃
1-87	5-(4-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)pent-1-en-3-ona		
1-88	N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)etenosulfonamida		
1-89	N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propiolamida		
1-90	1-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)but-3-en-2-ona		
1-91	2-amino-N-(3-(4-(4-clorobenciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		
1-92	2-amino-N-(3-(4-(furan-2-ilmetoxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		
1-93	2-amino-N-(3-(4-(furan-3-ilmetoxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		
1-94	2-amino-N-(3-(2-(4-metilpiperazin-1-il)-4-fenoxipirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		
1-95	2-amino-N-(3-(4-(2-ciclopentiletoxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		
1-96	2-amino-N-(3-(4-metoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida		

En un aspecto de la invención, el compuesto de la fórmula 2a' es un compuesto de la fórmula 2a'



5 o un estereoisómero, tautómero, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde: cada uno de X e Y se seleccionan independientemente del grupo que consiste de alquilo, alquenilo o alquinilo recto o ramificado opcionalmente sustituido; un grupo carbocíclico, heterocíclico, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido; halo; un grupo C₂₋₂₂ acilo opcionalmente sustituido; un grupo -NR₄R₅; un grupo -C(O)R₆; un grupo -(etoxi)_n-R₆, en donde n es 1-12; un grupo alcóxicarbonilo opcionalmente sustituido; un grupo alquilo opcionalmente sustituido; un grupo amino opcionalmente sustituido; un grupo nitro; y un grupo carboxilo; R₄ y R₅ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de H; alquilo, alquenilo, o alquinilo recto o ramificado opcionalmente sustituido; y -C(O)R₆; y cada R₆ se selecciona independientemente del grupo que consiste de un alquilo, alquenilo o alquinilo recto o ramificado opcionalmente sustituido; un grupo carbocíclico, heterocíclico, arilo, o heteroarilo opcionalmente sustituido; un grupo alquilo opcionalmente sustituido; y un grupo alquilacrilato (tal como acrilato de etilo).

10

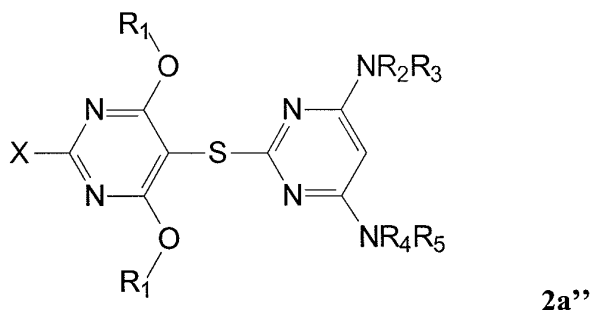
En otra modalidad, el compuesto de la fórmula 2a' es como se describe anteriormente, con la condición que X no comprenda una estructura de anillo en puente.

15

En otra modalidad, el compuesto de la fórmula 2a' es como se describe anteriormente, con la condición que al menos

uno de los sustituyentes X o Y comprenda al menos un grupo de marbete o marcador útil para identificar, seguir, y/o aislar el compuesto. Los ejemplos no limitantes de grupos marcadores y grupos de marbete útiles en la presente incluyen, por ejemplo, grupos fluorescentes, grupos de biotina, grupos de avidina, y grupos ligadores enzimáticos.

En otro aspecto la invención se refiere a un compuesto de la fórmula 2a'



5

o un estereoisómero, tautómero, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde: cada R₁ se selecciona independientemente del grupo que consiste de H; alquilo, alquenilo o alquinilo recto o ramificado opcionalmente sustituido; un grupo carbocíclico, heterocíclico, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido; halo; un grupo C₂₋₂₂acilo opcionalmente sustituido; un grupo -C(O)R₆; y un grupo -(etoxi)_n-R₆, en donde n es 1-12; R₂, R₃, R₄ y R₅ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de H; alquilo, alquenilo, o alquinilo recto o ramificado opcionalmente sustituido; un grupo carbocíclico, heterocíclico, arilo, o heteroarilo opcionalmente sustituido; un grupo C₂₋₂₂acilo opcionalmente sustituido; un grupo -C(O)R₆; y un grupo alcóxicarbonilo opcionalmente sustituido; y X se selecciona del grupo que consiste de alquilo, alquenilo o alquinilo recto o ramificado opcionalmente sustituido; un grupo carbocíclico, heterocíclico (por ejemplo 4-alquilpiperazina), arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido; halo; un grupo C₂₋₂₂acilo opcionalmente sustituido; un grupo -NR₄R₅; un grupo -C(O)R₆; un grupo -(etoxi)_n-R₆, en donde n es 1-12; un grupo alcóxicarbonilo opcionalmente sustituido; un grupo alquiloxi opcionalmente sustituido; un grupo amino opcionalmente sustituido; un grupo nitro; y un grupo carboxilo; y cada R₆ se selecciona independientemente del grupo que consiste de un alquilo, alquenilo, o alquinilo recto o ramificado opcionalmente sustituido; un grupo carbocíclico, heterocíclico, arilo, o heteroarilo opcionalmente sustituido; un grupo alquiloxi opcionalmente sustituido; y un grupo alquilacrilato (tal como acrilato de etilo); con la condición que X no comprenda una estructura de anillo en puente.

10

15

20

En otra modalidad, el compuesto de la fórmula 2a' es como se describe anteriormente, con la condición que el compuesto no es N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metil-piperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)octanamida (YK20).

25

30

En aun otra modalidad, el compuesto de la fórmula 2a' es como se describe anteriormente, y en donde: cada R₁ se selecciona independientemente del grupo que consiste de H; y alquilo, alquenilo o alquinilo recto o ramificado opcionalmente sustituido; R₂, R₃, R₄, y R₅ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de H; C₁-C₆alquilo recto o ramificado opcionalmente sustituido; y -C(O)R₆ en donde R₆ es un C₁-C₆alquilo, alquenilo, o alquinilo recto o ramificado opcionalmente sustituido; y X se selecciona del grupo que consiste de un grupo alquilo, alquenilo, o alquinilo recto o ramificado opcionalmente sustituido; un grupo carbocíclico, heterocíclico, arilo, o heteroarilo opcionalmente sustituido; y halo. En una modalidad adicional, X es un anillo de piperazina enlazado a un átomo de nitrógeno, en donde la piperazina está opcionalmente sustituida con al menos un grupo seleccionado del grupo que consiste de halo, haloalquilo, alquilo recto o ramificado, alquilo recto o ramificado sustituido, y HO-(etoxi)_n-C₁-C₆alquilo- donde n = 1-8 (tal como, por ejemplo, HO-(etoxi)₃-C₂H₄-).

35

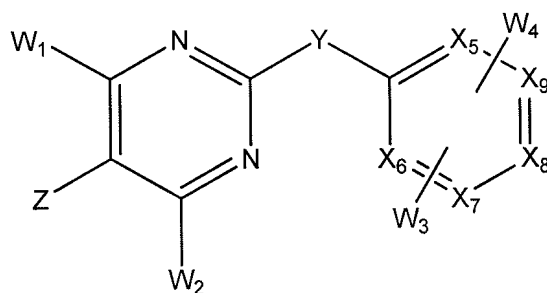
En otra modalidad, el compuesto de la fórmula 2a' es como se describe anteriormente, en donde: cada R₁ se selecciona independientemente del grupo que consiste de C₁-C₆alquilo recto o ramificado y C₁-C₆alquilo recto o ramificado sustituido. Por ejemplo, R₁ se puede seleccionar del grupo que consiste de metilo, etilo, etenilo, propilo, y butilo.

En otra modalidad, el compuesto de la fórmula 2a' es como se describe anteriormente, en donde: cada R₁ se selecciona independientemente entre metilo y etilo; NR₂R₃ es NH₂; NR₄R₅ es NHC(O)-C₁-C₆alquilo o NHC(O)-C₂-C₆alquenilo; y X es anillo de piperazina enlazado en un átomo de nitrógeno, y el anillo de piperazina está opcionalmente sustituido con halo, haloalquilo, o C₁-C₆alquilo recto o ramificado.

40

En otra modalidad, el compuesto de la fórmula 2a' es como se describe anteriormente, en donde: cada R₁ es el mismo o diferente y es metilo o etilo; R₂, R₃, y R₄ son cada uno H; R₅ es -C(O)-metilo, -C(O)-etilo, o -C(O)-etenilo; X es piperazina, 4-metilpiperazin-1-ilo o 4-(2-(2-(2-(2-hidroxietoxi)etoxi)etoxi)etil)piperazin-1-ilo.

Otra modalidad se refiere a compuestos que tienen la fórmula:



Fórmula 3a

sus estereoisómeros, tautómeros, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde,

X₅-X₉ se seleccionan independientemente de CH, C sustituido, y N sustituido;

5 Y es S, SO, SO₂, CH₂, CHR, CRR, CO, O, NH, o NR, en donde R es una cadena de alcoxilo o alquilo inferior;

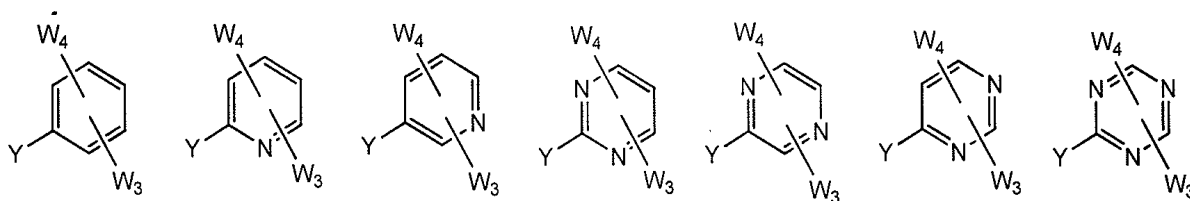
Z se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido o insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alquenilo, -NHCOalquenilo, -NHCOalquinilo, -COalquenilo, -COalquinilo, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN;

15 W₁ y W₂ independientemente cada ocurrencia se puede seleccionar del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido o insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alquenilo, -NHCOalquenilo, -NHCOalquinilo, -COalquenilo, -COalquinilo, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN; y

20 W₃ y W₄ independientemente en cada ocurrencia se puede seleccionar del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido o insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alquenilo, -NHCOalquenilo, -NHCOalquinilo, -COalquenilo, -COalquinilo, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN; o W₃ y W₄ se pueden unir conjuntamente mediante un ligador, para formar un anillo fusionado de 5 o 6 miembros.

25 Adicionalmente, W₂ se puede unir al anillo de arilo del lado derecho directamente para formar un anillo de 5 miembros o mediante un ligador para formar un anillo de 6 o 7 miembros.

En modalidades preferidas de la fórmula (3a), X₅-X₉ se seleccionan independientemente, pero no se limitan a:



En modalidades preferidas de la fórmula (3a) Y es S, SO, SO₂, O o CH₂.

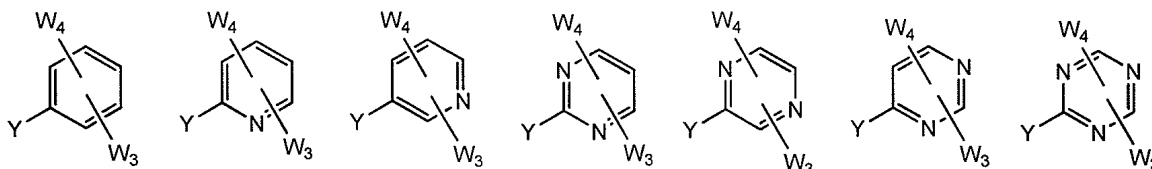
30 En modalidades preferidas de la fórmula (3a) Z es alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido o insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

35 En modalidades preferidas de la fórmula (3a) W₁ y W₂ en cada ocurrencia se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno,

ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

- 5 En modalidades preferidas de la fórmula (3a) W_3 y W_4 en cada ocurrencia se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (3a), X_5 - X_9 son



En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (3a), Y es S, SO, o SO₂.

- 10 En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (3a), Z es hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, o diarilamino.

En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (3a), W_1 y W_2 son independientemente hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, o diarilamino.

- 15 En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (3a), W_3 y W_4 son independientemente hidrógeno, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alqueno, -NHCOalqueno, -NHCOalquino, -COalqueno, -COalquino, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN.

- 20 La Tabla 2 muestra ejemplos de compuestos específicos que ejemplifican esta modalidad.

Tabla 2

ID #	Nombre de Compuesto
2-01	N-(3-(4,6-dimetoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-2-iltio)fenil)acrilamida
2-02	4,6-dimetoxi-2-(3-fenoxifeniltio)pirimidina
2-03	N-(3-(4-(ciclopropilamino)-5-(5,6-dihidropiridin-1(2H)-il)-6-metoxipirimidin-2-iltio)fenil)acrilamida
2-04	3-(5-hidroxi-4,6-dimetoxipirimidin-2-iltio)bencenosulfonamida
2-05	7-(4-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-2-iltio)-3,4-dihidroquinolin-2(1H)-ona
2-06	7-(4-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-2-iltio)quinolin-2(1H)-ona
2-07	2-(4,6-dicloropiridin-2-iltio)-4-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidina
2-08	N-(2-(4-amino-5-etil-6-metoxipirimidin-2-ilsulfinil)-6-metoxipiridin-4-il)acetamida
2-09	2-(6-cloro-4-(ciclopentilamino)piridin-2-iltio)-N5,N5-dietil-N4-fenilpirimidina-4,5-diamina

ES 2 608 670 T3

ID #	Nombre de Compuesto
2-10	(2-cloro-6-(5-etoxi-4-metoxipirimidin-2-iltio)piridin-4-il)metanosulfonamida
2-11	2-(2-(4-metxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-2-iltio)piridin-4-il)acetoneitrilo
2-12	2-amino-N-(2-(4-(furan-2-il)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-2-iltio)piridin-4-il)acetamida
2-13	N(5-(4,6-dimetil-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-2-iltio)piridin-3-il)ciclopropanocarboxamida
2-14	N-metil-2-(5-(trifluorometoxi)piridin-3-ilsulfonil)-5-vinilpirimidin-4-amina
2-15	Etil-5-(4-difenilamino)-5-(pirrolidin-1-il)pirimidin-2-iltio)piridin-3-ilcarbamato
2-16	N-isopropil-4,6-dimetil-2-(5-trifluorometil)piridin-3-iltio)pirimidin-5-amina
2-17	N-(5-(4,6-dimetil-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-2-iltio)piridin-3-il)picolinamida
2-18	N-(5-(4-metil-6-(5-metilfuran-2-il)-5-piperazin-1-il)pirimidin-2-iltio)piridin-3-il)ciclopropanocarboxamida
2-19	N-(6-hidroxi-2-(4-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)-6-vinilpirimidin-2-iltio)pirimidin-4-il)acetamida
2-20	N-(2-(4-dimetilamino)5-(pro-1-inil)pirimidin-2-iltio)-6-(viniloxi)pirimidin-4-il)acetamida
2-21	1-(6-hidroxi-2-(4-metoxi-5-(1H-pirrol-1-il)-6-vinilpirimidin-2-iltio)pirimidin-4-il)etanona
2-22	2-(5-(dietilamino)-4-metoxi-6-vinilpirimidin-2-iltio)-6-(metiltio)pirimidin-4-ol
2-23	N-(6-hidroxi-2-(4-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)-6-vinilpirimidin-2-iltio)pirimidin-4-il)nicotinamida
2-24	N-(6-hidroxi-2-(4-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)-6-(1H-pirrol-2-il)pirimidin-2-iltio)pirimidin-4-il)acetamida
2-25	4-(4-metoxi-2-(6-nitropirazin-2-iltio)-6-fenilpirimidin-5-il)morfolina
2-26	2-(6-(4-(ciclopentilamino)-6-metoxi-5-(piridin-4-il)pirimidin-2-ilsulfonil)pirazin-2-il)etanol
2-27	2-(5-(4-metoxi-6-fenil-5-(piperidin-1-il)pirimidin-2-iltio)pirazin-2-il)acetamida
2-28	N-ciclopentil-4-metoxi-2-(6-(metilsulfonil)pirazin-2-iltio)-6-fenilpirimidin-5-amina
2-29	4-(6-metoxi-5-morfolino-2-(6-nitropirazin-2-iltio)pirimidin-4-il)-N,N-dimetilanilina
2-30	4-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)-2-(6-nitropirazin-2-iltio)-6-(1H-pirazol-3-il)pirimidina
2-31	6-(4-etinil-6-metoxi-5-(piperidin-1-il)pirimidin-2-iltio)pirimidina-4-carbonitrilo
2-32	2-(6-aminopirimidin-4-ilsulfonil)-5-ciclohexil-N-fenilpirimidin-4-amina

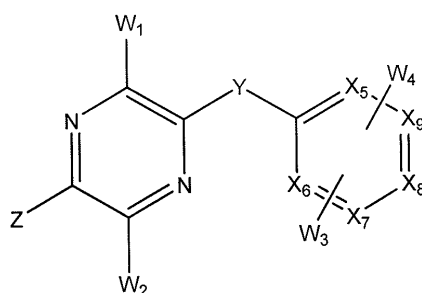
ES 2 608 670 T3

ID #	Nombre de Compuesto
2-33	N-(6-(4-etinil-5-fluoro-6-metoxipirimidin-2-iltio)pirimidin-4-il)acetamida
2-34	isopropil-6-(4-etinil-6-metoxi-5-(fenilamino) pirimidin-2-iltio)pirimidina-4-carboxilato
2-35	6-(4-(3-(dimetilamino)fenil)-5-(piperidin-1-il)pirimidin-2-iltio)pirimidina-4-carbonitrilo
2-36	6-(4-metoxi-5-(piperidin-1-il)-6-(tiofen-2-il)pirimidin-2-iltio)pirimidina-4-carbonitrilo
2-37	N-(4-amino-6-(5-(4-hidroxipiperidin-1-il)-4-fenoxipirimidin-2-iltio)-1,3,5-triazin-2-il)benzamida
2-38	6-(5-ciclohexenilpirimidin-2-iltio)-N2-etil-N4,N4-dimeti-1,3,5-triazina-2,4-diamina
2-39	N-acetil-N-(4-amino-6-(5-bromo-4-fenoxipirimidin-2-iltio)-1,3,5-triazin-2-il)acetamida
2-40	(4-amino-6-(4-fenoxi-5-(pirimidin-5-ilamino)pirimidin-2-iltio)-1,3,5-triazin-2-il)(ciclopentil)metanona
2-41	N-(4-amino-6-(4-(3-(dimetilamino)fenoxi)-5-(4-hidroxipiperidin-1-il)pirimidin-2-iltio)-1,3,5-triazin-2-il)benzamida
2-42	N-(4-(4-alil-5-(4-hidroxipiperidin-1-il)pirimidin-2-iltio)-6-amino-1,3,5-triazin-2-il)-2-aminopropanamida
2-43	6-(5-(4-hidroxiciclohexilamino)-4-metoxi-6-(tiofen-2-il)pirimidin-2-iltio)pirimidina-4-carbonitrilo
2-44	N-(4-amino-6-(5-(4-hidroxiciclohexilamino)-4-fenoxipirimidin-2-iltio)-1,3,5-triazin-2-il)benzamida
2-45	2-amino-N-(3-(5-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(pirolidin-2-ilmetoxi)pirimidin-2-iltio)fenil)acetamida
2-46	2-amino-N-(3-(5-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(piperidin-4-iloxi)pirimidin-2-iltio)fenil)acetamida
2-47	2-amino-N-(3-(4-(benciloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)-6-(trifluorometil)pirimidin-2-iltio)-5-metoxifenil)acetamida
2-48	2-amino-N-(3-(4-(benciloxi)-5-(4-metilpiperazin-il)pirimidin-2-iltio)fenil)-3-(1H-imidazol-4-il)propanamida
2-49	5-(4-(benciloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-2-iltio)quinolin-2(1H)-ona
2-50	2-amino-N-(3-(4-(benciloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-2-iltio)fenil)-3-metilbutanamida
2-51	N-(4-(4-(3-(dimetilamino)fenoxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-2-iltio)piridin-2-il)propionamida
2-52	N-(3-(5-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(piperidin-3-iloxi)pirimidin-2-iltio)fenil)metanosulfonamida
2-53	4-(2-metoxietoxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)-6-fenoxi-2-(3-(1-feniletil)feniltio)pirimidina
2-54	7-(5-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(quinolin-8-iloxi)pirimidin-2-iltio)quinolin-2(1H)-ona

ES 2 608 670 T3

ID #	Nombre de Compuesto
2-55	N-(3-(4-(benciloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-2-iltio)fenil)pirrolidina-2-carboxamida
2-56	2-amino-N-(3-(4-(benciloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-2-iltio)fenil)propanamida
2-57	2-amino-N-(5-(4-(3-aminofenoxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-2-iltio)piridin-3-il)acetamida
2-58	2-amino-N-(4-(4-(4-aminociclohexiloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-2-iltio)-6-metilpirimidin-2-il)acetamida
2-59	2-amino-3-metil-N-(3-(5-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(piridin-3-ilmetoxi)pirimidin-2-ilsulfonil)fenil)-pentanamida
2-60	2-amino-N-(6-(4-(benciloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-2-iltio)benzo[d][1,3]dioxo1-4-il)acetamida
2-61	(3-(4-(3-(dimetilamino)ciclohexiloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-2-iltio)fenil)metanol
2-62	2-amino-N-(4-(4-(benciloxi)-6-(2-metoxietoxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-2-iltio)fenil)acetamida
2-63	2-amino-N-(3-(furan-3-ilamino)-5-(5-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(pirimidin-2-ilmetoxi)-pirimidin-2-ilsulfonil)fenil)-4-metilpentanamida
2-64	2-amino-N-(6-(4-(3-aminociclopentiloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-2-iltio)pirazin-2-il)acetamida
2-65	2-amino-N-(4-(4-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)-6-fenilpirimidin-2-iltio)-1,3,5-triazin-2-il)propanamida
2-66	2-amino-N-(6-(5-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(piridin-3-iloxi)pirimidin-2-iltio)piridin-2-il)propanamida
2-67	2-amino-N-(2-(4-(3-carbamimidoilfenoxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-2-iltio)pirimidin-4-il)acetamida
2-68	N-(3-(4-(2-(dimetilamino)etoxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-2-iltio)fenil)acrilamida
2-69	2-amino-N-(2-(5-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(piridin-2-iloxi)pirimidin-2-ilsulfonil)piridin-4-il)propanamida
2-70	N-(3-(5-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(piridin-4-iloxi)pirimidin-2-ilsulfonil)fenil)benzamida
2-71	2-amino-N-(3-(dimetilamino)-5-(5-(4-metilpiperazin-1-il)-4-fenoxipirimidin-2-iltio)fenil)acetamida
2-72	5-(4-(benciloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-2-iltio)-3,4-dihidroquinolin-2(1H)-ona
2-73	2-amino-N-(3-amino-5-(4-(ciclopentiloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-2-iltio)fenil)acetamida
2-74	7-(4-(ciclopropilmetoxi)-6-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-2-iltio)-3,4-dihidroquinolin-2(1H)-ona

Otra modalidad se refiere a compuestos que tienen la fórmula:



Fórmula 4a

sus estereoisómeros, tautómeros, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde

X₅-X₉ se seleccionan independientemente de CH, C sustituido, y N sustituido;

5 Y es S, SO, SO₂, CH₂, CHR, CRR, CO, O, NH, o NR, donde R es una cadena de alcoxilo o alquilo inferior;

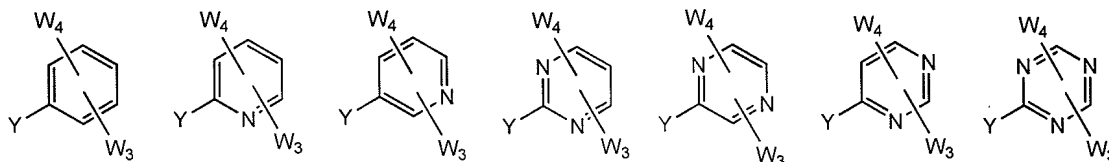
Z se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHCOalquenilo, -NHCOalquinilo, -NHCOalquino, -COalquenilo, -COalquinilo, trihalocarbono, tialquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN;

W₁ y W₂ independientemente en cada ocurrencia se puede seleccionar del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHCOalquenilo, -NHCOalquinilo, -NHCOalquino, -COalquenilo, -COalquinilo, trihalocarbono, tialquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN; y

W₃ y W₄ independientemente en cada ocurrencia se puede seleccionar del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHCOalquenilo, -NHCOalquinilo, -NHCOalquino, -COalquenilo, -COalquinilo, trihalocarbono, tialquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN; o W₃ y W₄ se pueden unir conjuntamente mediante un ligador, para formar un anillo fusionado de 5 o 6 miembros.

Adicionalmente, W₂ se puede unir al anillo de arilo del lado derecho directamente para formar un anillo de 5 miembros o mediante un ligador para formar un anillo de 6 o 7 miembros.

En modalidades preferidas de la fórmula (4a), X₅-X₉ se seleccionan independientemente de, pero no se limitan a:



En modalidades preferidas de la fórmula (4a) Y es S, SO, SO₂, O o CH₂.

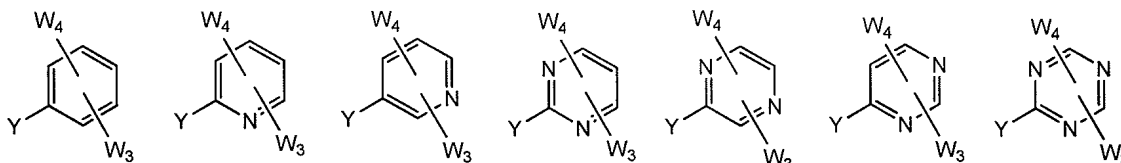
En modalidades preferidas de la fórmula (4a) Z es alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

En modalidades preferidas de la fórmula (4a) W₁ y W₂ en cada ocurrencia se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno,

ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

- 5 En modalidades preferidas de la fórmula (4a) W_3 y W_4 en cada ocurrencia se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (4a), X_5 - X_9 son



En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (4a), Y es S, SO, o SO₂.

- 10 En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (4a), Z es hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, o diarilamino.

En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (4a), W_1 y W_2 son independientemente hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, o diarilamino.

- 15 En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (4a), W_3 y W_4 son independientemente hidrógeno, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alqueno, -NHCOalqueno, -NHCOalquino, -COalqueno, -COalquino, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN.

- 20 La Tabla 3 muestra ejemplos de compuestos específicos que ejemplifican esta modalidad.

Tabla 3

ID #	Nombre de Compuesto
3-01	N-(3-(3,6-dimetoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)fenil)acrilamida
3-02	2,5-dimetoxi-3-(3-fenoxifeniltio)pirazina
3-03	N-(3-(6-(ciclopropilamino)-5-(5,6-dihidropiridin-1(2H)-il)-3-metoxipirazin-2-iltio)fenil)acrilamida
3-04	3-(5-hidroxi-3,6-dimetoxipirazin-2-iltio)benzenosulfonamida
3-05	7-(6-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)-3,4-dihidroquinolin-2(1H)-ona
3-06	7-(6-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)quinolin-2(1H)-ona
3-07	5-(4,6-dicloropiridin-2-iltio)-3-metoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirazina
3-08	N-(2-(3-amino-5-etil-6-metoxipirazin-2-ilsulfonil)-6-metoxipiridin-4-il)acetamida
3-09	5-(6-cloro-4-(ciclopentilamino)piridin-2-iltio)-N ₂ ,N ₂ -dietil-N ₃ -fenilpirazino-2,3-diamina
3-10	(2-cloro-6-(5-etoxi-6-metoxipirazin-2-iltio)piridin-4-il)metanosulfonamida
3-11	2-(2-(6-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)piridin-4-il)acetonitrilo

ES 2 608 670 T3

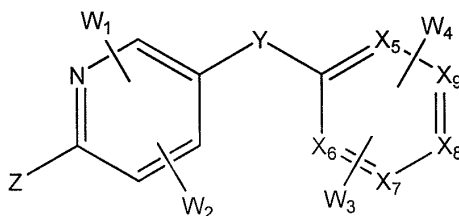
ID #	Nombre de Compuesto
3-12	2-amino-N-(2-(6-(furan-2-il)-5-(4-metilpiperazin-1-il))pirazin-2-iltio)piridin-4-il)acetamida
3-13	N-(5-(6-metil-5-(4-metilpiperazin-1-il))pirazin-2-iltio)piridin-3-il)ciclopropanocarboxamida
3-14	N-metil-3-(5-(trifluorometoxi)piridin-3-ilsulfonil)-6-vinilpirazin-2-amina
3-15	etil-5-(6-(difenilamino)-5-(pirrolidin-1-il))pirazin-2-iltio)piridin-3-ilcarbamato
3-16	N-isopropil-3,6-dimetil-5-(5-(trifluorometil)piridin-3-iltio)pirazin-2-amina
3-17	N-(5-(3,6-dimetil-5-(4-metilpiperazin-1-il))pirazin-2-iltio)piridin-3-il)picolinamida
3-18	N-(5-(3-metil-6-(5-metilfuran-2-il)-5-(piperazin-1-il))pirazin-2-iltio)piridin-3-il)ciclopropanocarboxamida
3-19	N-(6-hidroxi-2-(3-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)-6-vinilpirazin-2-iltio)pirimidin-4-il)acetamida
3-20	N-(2-(3-(dimetilamino)-5-(prop-1-inil))pirazin-2-iltio)-6-(viniloxi)pirimidin-4-il)acetamida
3-21	1-(6-hidroxi-2-(3-metoxi-5-(1H-pirrol-1-il)-6-vinilpirazin-2-iltio)pirimidin-4-il)etanona
3-22	2-(5-(dietilamino)-3-metoxi-6-vinilpirazin-2-iltio)-6-(metiltio)pirimidin-4-ol
3-23	N-(6-hidroxi-2-(3-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)-6-vinilpirazin-2-iltio)pirimidin-4-il)nicotinamida
3-24	N-(6-hidroxi-2-(3-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)-6-(1H-pirrol-2-il))pirazin-2-iltio)pirimidin-4-il)acetamida
3-25	4-(3-metoxi-5-(6-nitropirazin-2-iltio)pirazin-2-il)morfolina
3-26	2-(6-(3-(ciclopentilamino)-6-metoxi-5-(piridin-4-il))pirazin-2-ilsulfonil)pirazin-2-il)etanol
3-27	2-(5-(6-metoxi-3-fenil-5-(piperidin-1-il))pirazin-2-iltio)pirazin-2-il)acetamida
3-28	N-ciclopentil-3-metoxi-5-(6-(metilsulfonil)pirazin-2-iltio)-6-fenilpirazin-2-amina
3-29	4-(5-metoxi-6-morfolino-3-(6-nitropirazin-2-iltio)pirazin-2-il)-N,N-dimetilanilina
3-30	2-metoxi-3-(4-metilpiperazin-1-il)-6-(6-nitropirazin-2-iltio)-5-(1H-pirazol-3-il)pirazina
3-31	6-(3-etinil-6-metoxi-5-(piperidin-1-il))pirazin-2-iltio)pirimidina-4-carbonitrilo
3-32	6-(5-ciclohexil-3-(fenilamino)pirazin-2-ilsulfonil)pirimidin-4-amina
3-33	N-(6-(3-etinil-5-fluoro-6-metoxipirazin-2-iltio)pirimidin-4-il)acetamida
3-34	Isopropil-6-(3-etinil-6-metoxi-5-(fenilamino)pirazin-2-iltio)pirimidina-4-carboxilato
3-35	6-(3-(3-(dimetilamino)fenil)-5-(piperidin-1-il))pirazin-2-iltio)pirimidina-4-carbonitrilo
3-36	6-(6-metoxi-5-(piperidin-1-il)-3-(tiofen-2-il))pirazin-2-iltio)pirimidina-4-carbonitrilo
3-37	N-(4-amino-6-(5-(4-hidroxipiperidin-1-il)-3-fenoxipirazin-2-iltio)-1,3,5-triazin-2-il)benzamida
3-38	6-(5-ciclohexenilpirazin-2-iltio)-N2-etil-N4,N4-dimetil-1,3,5-triazina-2,4-diamina
3-39	N-acetil-N-(4-amino-6-(5-bromo-3-fenoxipirazin-2-iltio)-1,3,5-triazin-2-il)acetamida

ES 2 608 670 T3

ID #	Nombre de Compuesto
3-40	(4-amino-6-(3-fenoxi-5-(pirimidin-5-ilamino)pirazin-2-iltio)-1,3,5-triazin-2-il)(ciclopentil)metanona
3-41	N-(4-amino-6-(3-(3-(dimetilamino)fenoxi)-5-(4-hidroxipiperidin-1-il)pirazin-2-iltio)-1,3,5-triazin-2-il)benzamida
3-42	N-(4-(3-alil-5-(4-hidroxipiperidin-1-il)pirazin-2-iltio)-6-amino-1,3,5-triazin-2-il)-2-aminopropanamida
3-43	N-(3-(5-(4-hidroxiciclohexilamino)-3,6-dimetoxipirazin-2-iltio)fenil)acrilamida
3-44	2-amino-N-(3-(5-(4-metilpiperazin-1-il)-6-(pirrolidin-2-ilmetoxi)pirazin-2-iltio)fenil)acetamida
3-45	2-amino-N-(3-(5-(4-metilpiperazin-1-il)-6-piperidin-4-iloxi)pirazin-2-iltio)fenil)acetamida
3-46	2-amino-N-(3-(6-(benciloxi)-3-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)-5-metoxifenil)acetamida
3-47	2-amino-N-(3-(6-(benciloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)fenil)-3-(1H-imidazol-4-il)propanamida
3-48	5-(6-(benciloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)quinolin-2(1H)-ona
3-49	2-amino-N-(3-(6-(benciloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)fenil)-3-metilbutanamida
3-50	N-(4-(6-(3-(dimetilamino)fenoxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)piridin-2-il)propionamida
3-51	N-(3-(5-(4-metilpiperazin-1-il)-6-(piperidin-3-iloxi)pirazin-2-iltio)fenil)metanosulfonamida
3-52	N,N-dimetil-2-(6-(4-metilpiperazin-1-il)-5-fenoxi-3-(3-(1-feniletil)fenililtio)pirazin-2-iloxi)etanamina
3-53	7-(5-(4-metilpiperazin-1-il)-6-(quinolin-8-iloxi)pirazin-2-iltio)quinolin-2(1H)-ona
3-54	N-(3-(6-(benciloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)fenil)pirrolidina-2-carboxamida
3-55	2-amino-N-(3-(6-(benciloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)fenil)propanamida
3-56	2-amino-N-(5-(6-(3-aminofenoxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)piridin-3-il)acetamida
3-57	2-amino-N-(4-(6-(4-aminociclohexiloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)-6-metilpirimidin-2-il)acetamida
3-58	2-amino-3-metil-N-(3-(5-(4-metilpiperazin-1-il)-6-(piridin-3-ilmetoxi)pirazin-2-ilsulfonil)fenil)pentanamida
3-59	2-amino-N-(6-(6-(benciloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)benzo[d][1,3]dioxol-4-il)acetamida
3-60	3-(6-(3-(dimetilamino)ciclohexiloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)fenil)metanol
3-61	2-amino-N-(4-(6-(benciloxi)-3-(2-metoxietoxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)fenil)acetamida
3-62	2-amino-N-(3-(furan-3-ilamino)-5-(5-(4-metilpiperazin-1-il)-6-(pirimidin-2-ilmetoxi)pirazin-2-ilsulfonil)fenil)-4-metilpentanamida
3-63	2-amino-N-(3-(6-(2,3-dimetoxibenciloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)-5-metoxifenil)acetamida
3-64	2-amino-N-(6-(6-(3-aminociclopentiloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)pirazin-2-il)acetamida

ID #	Nombre de Compuesto
3-65	2-amino-N-(4-(3-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)-6-fenilpirazin-2-iltio)-1,3,5-triazin-2-il)propanamida
3-66	2-amino-N-(6-(5-(4-metilpiperazin-1-il)-6-(piridin-3-ilo)pirazin-2-iltio)piridin-2-il)propanamida
3-67	2-amino-N-(3-(3-amino-5-(4-metilpiperazin-1-il)-6-fenoxipirazin-2-iltio)fenil)acetamida
3-68	5-(6-(benciloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)-3,4-dihidroquinolin-2(1H)-ona
3-69	2-amino-N-(2-(6-(3-carbamimidoilfenoxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)pirimidin-4-il)acetamida
3-70	N-(3-(6-(2-(dimetilamino)etoxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)fenil)acrilamida
3-71	2-amino-N-(2-(5-(4-metilpiperazin-1-il)-6-(piridin-2-ilo)pirazin-2-ilsulfonil)piridin-4-il)propanamida
3-72	2-amino-N-(3-amino-5-(6-(ciclopentiloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)fenil)acetamida
3-73	7-(6-(ciclopropilmetoxi)-3-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)-3,4-dihidroquinolin-2(1H)-ona
3-74	N-(3-(5-(4-metilpiperazin-1-il)-6-(piridin-4-ilo)pirazin-2-ilsulfonil)fenil)benzamida

Otra modalidad se refiere a compuestos que tienen la fórmula:



Fórmula 5a

5 sus estereoisómeros, tautómeros, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde,

X₅-X₉ se seleccionan independientemente de CH, C sustituido y N sustituido;

Y es S, SO, SO₂, CH₂, CHR, CRR, CO, O, NH, o NR, en donde R es una cadena de alquilo o alcoxilo inferior;

10 Z se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alquenilo, -NHCOalquenilo, -NHCOalquinilo, -COalquenilo, -COalquinilo, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN;

15 W₁ y W₂ independientemente en cada ocurrencia se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alquenilo, -NHCOalquenilo, -NHCOalquinilo, -COalquenilo, -COalquinilo, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN; o W₁ y W₂ se pueden unir conjuntamente
20 mediante un ligador, para formar un anillo fusionado de 5 o 6 miembros; y

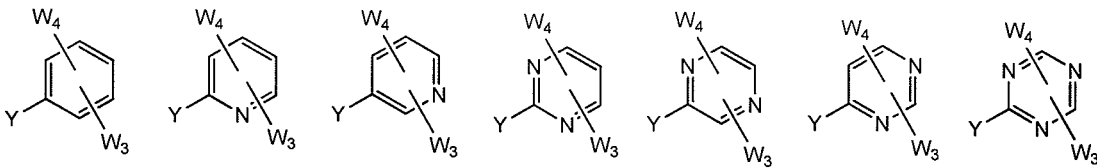
W₃ y W₄ independientemente en cada ocurrencia se pueden seleccionar del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo,

alqueno, alquino, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alquenoiloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alqueno, -NHCOalqueno, -NHCOalquino, -COalqueno, -COalquino, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN; o W₃ y W₄ se pueden unir conjuntamente mediante un ligador, para formar un anillo fusionado de 5 o 6 miembros.

5

Adicionalmente, W₂ se puede unir al anillo de arilo del lado derecho directamente para formar un anillo de 5 miembros o mediante un ligador para formar un anillo de 6 o 7 miembros.

En modalidades preferidas de la fórmula (5a), X₅-X₉ se seleccionan independientemente pero no se limitan a:



10

En modalidades preferidas de la fórmula (5a), Y es S, SO, SO₂, O o CH₂.

En modalidades preferidas de la fórmula (5a), Z es alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alquenoiloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

15

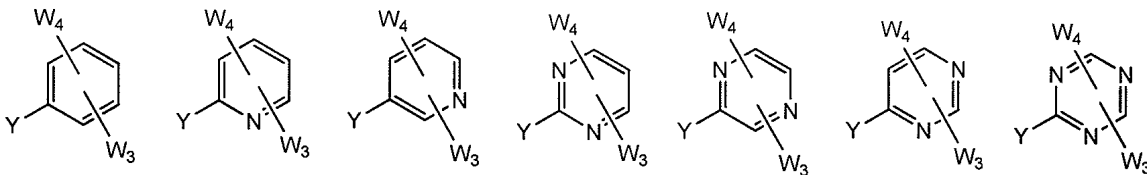
En modalidades preferidas de la fórmula (5a), W₁ y W₂ en cada ocurrencia se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alquenoiloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

20

En modalidades preferidas de la fórmula (5a) W₃ y W₄ en cada ocurrencia se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alquenoiloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

25

En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (5a), X₅-X₉ son



En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (5a), Y es S, SO o SO₂.

En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (5a), Z es hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, o diarilamino.

30

En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (5a), W₁ y W₂ son independientemente hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, o diarilamino.

En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (5a), W₃ y W₄ son independientemente hidrógeno, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alquenoiloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alqueno, -NHCOalqueno, -NHCOalquino, -COalqueno, -COalquino, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN.

35

ES 2 608 670 T3

La Tabla 4 muestra ejemplos de compuestos específicos que ejemplifican esta modalidad.

Tabla 4

ID #	Nombre de Compuesto	
YK171	N-(2-(2-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)pirimidin-4-il)propionamida	
YK172	N-(2-(2-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)pirimidin-4-il)ciclopropanocarboxamida	
YK173	N-(3-(2-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)fenil)propionamida	
YK174	N-(3-(2-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio) fenil)ciclopropanocarboxamida	
YK175	2-amino-N-(3-(2-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)fenil)acetamida	
YK176	1-(5-(3,5-diclorofeniltio)-6-metoxipiridin-2-il)-4-metilpiperazina	
YK178	N-(3-(2-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)fenil)benzamida	
YK179	2-amino-N-(3-(2-hidroxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)fenil)acetamida	
YK180	2-amino-N-(3-(2-(benciloxi)-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)fenil)acetamida	
YK181	2-amino-N-(3-(2-(4-metoxibenciloxi)-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)fenil)acetamida	
4-01	2-(2-(5-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)piridin-4-il)acetonitrilo	
4-02	2-amino-N-(2-(5-(furan-2-il)-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)piridin-4-il)acetamida	
4-03	N-(5-(5-metil-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)piridin-3-il)ciclopropanocarboxamida	
4-04	N-metil-3-(5-(trifluorometoxi)piridin-3-ilsulfonil)-6-vinilpiridin-2-amina	
4-05	5-(5-(difenilamino)-6-(pirrolidin-1-il) piridin-3-iltio)piridin-3-ilcarbamato de etilo	
4-06	N-isopropil-3,6-dimetil-5-(5-(trifluorometil)piridin-3-iltio)piridin-2-amina	
4-07	N-(5-(2,5-dimetil-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)piridin-3-il)picolinamida	
4-08	N-(5-(2-metil-5-(5-metilfuran-2-il)-6-(piperazin-1-il)piridin-3-iltio)piridin-3-il)ciclopropanocarboxamida	
4-09	N-(6-hidroxi-2-(2-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)-5-vinilpiridin-3-iltio)pirimidin-4-il)acetamida	
4-10	N-(2-(2-(dimetilamino)-6-(prop-1-inil)piridin-3-iltio)-6-(viniloxi)pirimidin-4-il)acetamida	
4-11	1-(6-hidroxi-2-(2-metoxi-6-(1H-pirrol-1-il)-5-vinilpiridin-3-iltio)pirimidin-4-il)etanona	
4-12	2-(6-(dietilamino)-2-metoxi-5-vinilpiridin-3-iltio)-6-(metiltio)pirimidin-4-ol	
4-13	N-(6-hidroxi-2-(2-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)-5-vinilpiridin-3-iltio)pirimidin-4-il)nicotinamida	
4-14	N-(6-hidroxi-2-(2-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)-5-(1H-pirrol-2-il)piridin-3-iltio)pirimidin-4-il)acetamida	

ES 2 608 670 T3

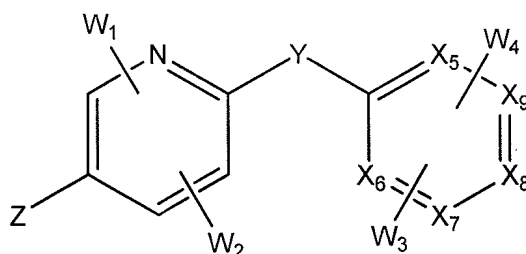
ID #	Nombre de Compuesto	
4-15	4-(3-metoxi-5-(6-nitropirazin-2-iltio)piridin-2-il)morfolina	
4-16	2-(6-(6-(ciclopentilamino)-3-metoxi-2,4'-bipiridin-5-ilsulfonil)pirazin-2-il)etanol	
4-17	2-(5-(5-metoxi-2-fenil-6-(piperidin-1-il)piridin-3-iltio)pirazin-2-il)acetamida	
4-18	N-ciclopentil-3-metoxi-5-(6-(metilsulfonil)pirazin-2-iltio)-6-fenilpiridin-2-amina	
4-19	4-(5-metoxi-6-morfolino-3-(6-nitropirazin-2-iltio)piridin-2-il)-N,N-dimetilanilina	
4-20	2-(5-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)-2-(1H-pirazol-3-il)piridin-3-iltio)-6-nitropirazina	
4-21	6-(2-etinil-5-metoxi-6-(piperidin-1-il)piridin-3-iltio)pirimidina-4-carbonitrilo	
4-22	6-(6-ciclohexil-2-(fenilamino)piridin-3-ilsulfonil)pirimidina-4-amina	
4-23	N-(6-(2-etinil-6-fluoro-5-metoxipiridin-3-iltio)pirimidin-4-il)acetamida	
4-24	6-(2-etinil-5-metoxi-6-(fenilamino)piridin-3-iltio)pirimidina-4-carboxilato de isopropilo	
4-25	6-(2-(3-(dimetilamino)fenil)-6-(piperidin-1-il)piridin-3-iltio)pirimidina-4-carbonitrilo	
4-26	6-(5-metoxi-6-(piperidin-1-il)-2-(tiofen-2-il)piridin-3-iltio)pirimidina-4-carbonitrilo	
4-27	N-(4-amino-6-(6-(4-hidroxipiperidin-1-il)-2-fenoxipiridin-3-iltio)-1,3,5-triazin-2-il)benzamida	
4-28	6-(6-ciclohexenilpiridin-3-iltio)-N2-etil-N4,N4-dimetil-1,3,5-triazina-2,4-diamina	
4-29	N-acetil-N-(4-amino-6-(6-bromo-2-fenoxipiridin-3-iltio)-1,3,5-triazin-2-il)acetamida	
4-30	(4-amino-6-(2-fenoxi-6-(piridin-3-ilamino)piridin-3-iltio)-1,3,5-triazin-2-il)(ciclopentil)metanona	
4-31	N-(4-amino-6-(2-(3-(dimetilamino)fenoxi)-6-(4-hidroxipiperidin-1-il)piridin-3-iltio)-1,3,5-triazin-2-il)benzamida	
4-32	N-(4-(2-alil-6-(4-hidroxipiperidin-1-il)piridin-3-iltio)-6-amino-1,3,5-triazin-2-il)-2-aminopropanamida	
4-33	N-(3-(6-(4-hidroxiciclohexilamino)-2,5-dimetoxipiridin-3-iltio)fenil)acrilamida	
4-34	N-(3-(2-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)fenil)acetamida	
4-35	2-amino-N-(2-(2-(furan-2-il)-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)piridin-4-il)acetamida	
4-36	N-(5-(4-metoxi-6-(piperazin-1-il)piridin-3-iltio)piridin-3-il)ciclopropanocarboxamida	
4-37	2-amino-N-(3-(6-(4-metilpiperazin-1-il)-5-(pirrolidin-2-ilmetoxi)piridin-3-iltio)fenil)acetamida	
4-38	2-amino-N-(3-(6-(4-metilpiperazin-1-il)-5-(piperidin-4-iloxi)piridin-3-iltio)fenil)acetamida	
4-39	2-amino-N-(3-metoxi-5-(2-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)fenil)acetamida	
4-40	2-amino-N-(3-(2-(benciloxi)-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)fenil)-3-(1H-imidazol-4-il)propanamida	

ES 2 608 670 T3

ID #	Nombre de Compuesto	
4-41	5-(5-(benciloxi)-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)quinolin-2(1H)-ona	
4-42	2-amino-N-(3-(2-(benciloxi)-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)fenil)-3-metilbutanamida	
4-43	N-(4-(2-(3-(dimetilamino)fenoxi)-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)piridin-2-il)propanamida	
4-44	N-(3-(6-(4-metilpiperazin-1-il)-5-(piperidin-3-iloxi)piridin-3-iltio)fenil)metanosulfonamida	
4-45	N,N-dimetil-2-(6-(4-metilpiperazin-1-il)-5-fenoxi-3-(3-(1-feniletil)fenil)piridin-2-iloxi)etanamina	
4-46	7-(6-(4-metilpiperazin-1-il)-5-(quinolin-8-iloxi)piridin-3-iltio)quinolin-2(1H)-ona	
4-47	N-(3-(2-(benciloxi)-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)fenil)pirrolidina-2-carboxamida	
4-48	2-amino-N-(3-(5-(benciloxi)-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)fenil)propanamida	
4-49	2-amino-N-(5-(5-(3-aminofenoxi)-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)piridin-3-il)acetamida	
4-50	2-amino-N-(4-(5-(4-aminociclohexiloxi)-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)-6-metilpirimidin-2-il)acetamida	
4-51	2-amino-3-metil-N-(3-(6-(4-metilpiperazin-1-il)-5-(piridin-3-ilmetoxi)piridin-3-ilsulfonil)fenil)pentanamida	
4-52	2-amino-N-(6-(6-(4-metilpiperazin-1-il)-2-fenoxipiridin-3-iltio)benzo[d][1,3]dioxol-4-il)acetamida	
4-53	(3-(5-(3-(dimetilamino)ciclohexiloxi)-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)fenil)metanol	
4-54	2-amino-N-(4-(2-(2-metoxietoxi)-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)fenil)acetamida	
4-55	2-amino-N-(3-(furan-3-ilamino)-5-(6-(4-metilpiperazin-1-il)-5-(pirimidin-2-ilmetoxi)piridin-3-ilsulfinil)fenil)-4-metilpentanamida	
4-56	2-amino-N-(3-(5-(2,3-dimetoxibenciloxi)-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)-5-metoxifenil)acetamida	
4-57	2-amino-N-(6-(5-(3-aminociclopentiloxi)-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)pirazin-2-il)acetamida	
4-58	2-amino-N-(4-(2-(furan-2-iloxi)-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)-1,3,5-triazin-2-il)propanamida	
4-59	2-amino-N-(6-(6-(4-metilpiperazin-1-il)-5-(piridin-3-iloxi)piridin-3-iltio)piridin-2-il)propanamida	
4-60	2-amino-N-(3-(2-amino-6-(4-metilpiperazin-1-il)-5-fenoxipiridin-3-iltio)fenil)acetamida	
4-61	5-(5-(benciloxi)-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)-3,4-dihidroquinolin-2(1H)-ona	
4-62	2-amino-N-(2-(5-(3-carbamimidoilfenoxi)-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)pirimidin-4-il)acetamida	
4-63	N-(3-(2-(furan-3-ilmetil)-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)fenil)acrilamida	

ID #	Nombre de Compuesto	
4-64	2-amino-N-(2-(6-(4-metilpiperazin-1-il)-5-(piridin-2-iloxi)piridin-3-ilsulfonil)piridin-4-il)propanamida	
4-65	2-amino-N-(3-amino-5-(5-(ciclopentiloxi)-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)fenil)acetamida	
4-66	7-(5-(ciclopropilmetoxi)-2-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)-3,4-dihidroquinolin-2(1H)-ona	
4-67	N-(3-(6-(4-metilpiperazin-1-il)-5-(piridin-4-iloxi)piridin-3-ilsulfonil)fenil)benzamida	
4-68	N-(6-amino-2-(7-amino-3-metoxi-1-(4-metilpiperazin-1-il)isoquinolin-4-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida	

Otra modalidad se refiere a compuestos que tienen la fórmula:



Fórmula 6a

5 sus estereoisómeros, tautómeros, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde,

X_5 - X_9 se seleccionan independientemente de CH, C sustituido y N sustituido;

Y es S, SO, SO₂, CH₂, CHR, CRR, CO, O, NH, o NR, en donde R es una cadena de alquilo o alcoxilo inferior;

10 Z se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniilo, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alqueniilo, -NHCOalqueniilo, -NHCOalquinilo, -COalqueniilo, -COalquinilo, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN;

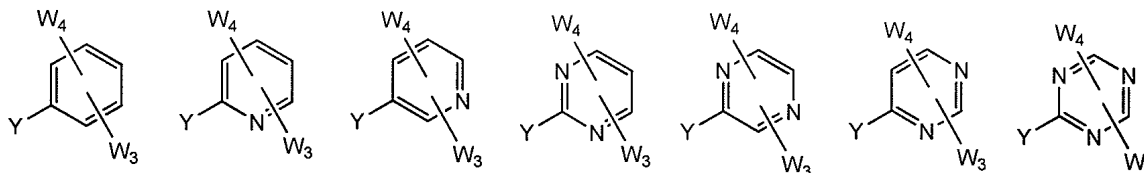
15 W_1 y W_2 independientemente en cada ocurrencia se pueden seleccionar del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniilo, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alqueniilo, -NHCOalqueniilo, -NHCOalquinilo, -COalqueniilo, -COalquinilo, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN; o W_1 y W_2 se pueden unir conjuntamente mediante un ligador, para formar un anillo fusionado de 5 o 6 miembros; y

25 W_3 y W_4 independientemente en cada ocurrencia se pueden seleccionar del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniilo, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alqueniilo, -NHCOalqueniilo, -NHCOalquinilo, -COalqueniilo, -COalquinilo, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN; o W_3 y W_4 se pueden unir conjuntamente mediante un ligador, para formar un anillo fusionado de 5 o 6 miembros.

Adicionalmente, W_2 se puede unir al anillo de arilo del lado derecho directamente para formar un anillo de 5 miembros o

mediante un ligador para formar un anillo de 6 o 7 miembros.

En modalidades preferidas de la fórmula (6a), X₅-X₉ se seleccionan independientemente de pero no se limitan a:



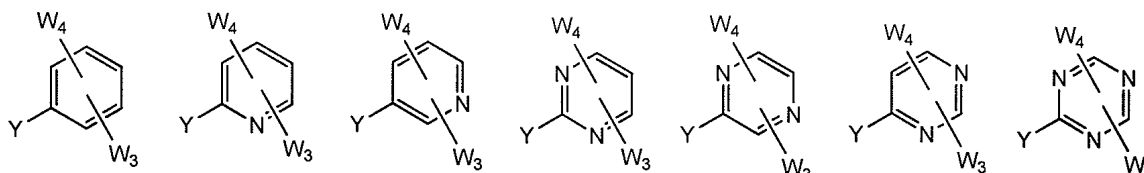
En modalidades preferidas de la fórmula (6a), Y es S, SO, SO₂, O o CH₂.

- 5 En modalidades preferidas de la fórmula (6a), Z es alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

- 10 En modalidades preferidas de la fórmula (6a), W₁ y W₂ en cada ocurrencia se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

- 15 En modalidades preferidas de la fórmula (6a) W₃ y W₄ en cada ocurrencia se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (6a), X₅-X₉ son



- 20 En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (6a), Y es S, SO o SO₂.

En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (6a), Z es hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, o diarilamino.

- 25 En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (6a), W₁ y W₂ son independientemente hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, o diarilamino.

- 30 En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (6a), W₃ y W₄ son independientemente hidrógeno, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alqueno, -NHCOalqueno, -NHCOalquino, -COalqueno, -COalquino, trihalocarbono, toialquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN.

La Tabla 5 muestra ejemplos de compuestos específicos que ejemplifican esta modalidad.

Tabla 5

ID #	Nombre de Compuesto
5-01	N-(3-(4,6-dimetoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)fenil)acrilamida

ES 2 608 670 T3

ID #	Nombre de Compuesto	
5-02	2,4-dimetoxi-6-(3-fenoxifeniltio)piridina	
5-03	N-(3-(4-(ciclopropilamino)-5-(5,6-dihidropiridin-1(2H)-il)-6-metoxipiridin-2-iltio)fenil)acrilamida	
5-04	3-(5-hidroxi-4,6-dimetoxipiridin-2-iltio)bencenosulfonamida	
5-05	7-(4-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)-3,4-dihidroquinolin-2(1H)-ona	
5-06	7-(4-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)quinolin-2(1H)-ona	
5-07	1-(6-(4,6-dicloropiridin-2-iltio)-4-metoxipiridin-3-il)-4-metilpiperazina	
5-08	N-(2-(6-amino-5-etil-4-metoxipiridin-2-ilsulfonil)-6-metoxipiridin-4-il)acetamida	
5-09	6-(6-cloro-4-(ciclopentilamino)piridin-2-iltio)-N3,N3-dietil-N4-fenilpiridina-3,4-diamina	
5-10	(2-cloro-6-(5-etoxi-4-metoxipiridin-2-iltio)piridin-4-il)metanosulfonamida	
5-11	2-(2-(4-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)piridin-4-il)acetronitrilo	
5-12	2-amino-N-(2-(4-(furan-2-il)-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)piridin-4-il)acetamida	
5-13	N-(5-(4,6-dimetil-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)piridin-3-il)ciclopropanocarboxamida	
5-14	N-metil-6-(5-(trifluorometoxi)piridin-3-ilsulfonil)-3-vinilpiridin-2-amina	
5-15	5-(4-(difenilamino)-5-(pirrolidin-1-il)piridin-2-iltio)piridin-3-ilcarbamato de etilo	
5-16	N-isopropil-2,4-dimetil-6-(5-(trifluorometil)piridin-3-iltio)piridin-3-amina	
5-17	N-(5-(4,6-dimetil-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)piridin-3-il)picolinamida	
5-18	N-(5-(6-metil-4-(5-metilfuran-2-il)-5-(piperazin-1-il)piridin-2-iltio)piridin-3-il)ciclopropanocarboxamida	
5-19	N-(6-hidroxi-2-(6-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)-4-vinilpiridin-2-iltio)pirimidin-4-il)acetamida	
5-20	N-(2-(6-(dimetilamino)-5-(prop-1-inil)piridin-2-iltio)-6-(viniloxi)pirimidin-4-il)acetamida	
5-21	1-(6-hidroxi-2-(6-metoxi-5-(1H-pirrol-1-il)-4-vinilpiridin-2-iltio)pirimidin-4-il)etanona	
5-22	2-(5-(dietilamino)-6-metoxi-4-vinilpiridin-2-iltio)-6-(metiltio)pirimidin-4-ol	
5-23	N-(6-hidroxi-2-(6-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)-4-vinilpiridin-2-iltio)pirimidin-4-il)nicotinamida	
5-24	N-(6-hidroxi-2-(6-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(1H-pirrol-2-il)piridin-2-iltio)pirimidin-4-il)acetamida	
5-25	4-(4-metoxi-6-(6-nitropirazin-2-iltio)-2-fenilpiridin-3-il)morfolina	
5-26	2-(6-(2-(ciclopentilamino)-4-metoxi-3,4'-bipiridin-6-ilsulfonil)pirazin-2-il)etanol	
5-27	2-(5-(4-metoxi-6-fenil-5-(piperidin-1-il)piridin-2-iltio)pirazin-2-il)acetamida	

ES 2 608 670 T3

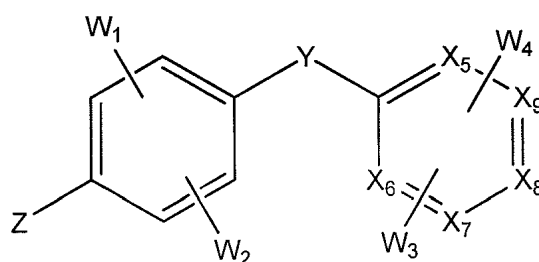
ID #	Nombre de Compuesto	
5-28	N-ciclopentil-4-metoxi-6-(6-(metilsulfonil)pirazin-2-iltio)-2-fenilpiridin-3-amina	
5-29	4-(4-metoxi-3-morfolino-6-(6-nitropirazin-2-iltio)piridin-2-il)-N,N-dimetilanilina	
5-30	2-(4-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)-6-(1H-pirazol-3-il)piridin-2-iltio)-6-nitropirazina	
5-31	6-(6-etinil-4-metoxi-5-(piperidin-1-il)piridin-2-iltio)pirimidina-4-carbonitrilo	
5-32	6-(5-ciclohexil-6-(fenilamino)piridin-2-ilsulfonil)pirimidin-4-amina	
5-33	N-(6-(6-etinil-5-fluoro-4-metoxipiridin-2-iltio)pirimidin-4-il)acetamida	
5-34	6-(6-etinil-4-metoxi-5-(fenilamino)piridin-2-iltio)pirimidina-4-carboxilato de isopropilo	
5-35	6-(6-(3-(dimetilamino)fenil)-5-(piperidin-1-il)piridin-2-iltio)pirimidina-4-carbonitrilo	
5-36	6-(4-metoxi-5-(piperidin-1-il)-6-(tiofen-2-il)piridin-2-iltio)pirimidina-4-carbonitrilo	
5-37	N-(4-amino-6-(5-(4-hidroxipiperidin-1-il)-6-fenoxipiridin-2-iltio)-1,3,5-triazin-2-il)benzamida	
5-38	6-(5-ciclohexenilpiridin-2-iltio)-N2-etil-N4,N4-dimetil-1,3,5-triazina-2,4-diamina	
5-39	N-acetil-N-(4-amino-6-(5-bromo-6-fenoxipiridin-2-iltio)-1,3,5-triazin-2-il)acetamida	
5-40	(4-amino-6-(6-fenoxi-5-(pirimidin-5-ilamino)piridin-2-iltio)-1,3,5-triazin-2-il)(ciclopentil)metanona	
5-41	N-(4-amino-6-(6-(3-(dimetilamino)fenoxi)-5-(4-hidroxipiperidin-1-il)piridin-2-iltio)-1,3,5-triazin-2-il)benzamida	
5-42	N-(4-(6-alil-5-(4-hidroxipiperidin-1-il)piridin-2-iltio)-6-amino-1,3,5-triazin-2-il)-2-aminopropanamida	
5-43	N-(3-(5-(4-hidroxiciclohexilamino)-4,6-dimetoxipiridin-2-iltio)fenil)acrilamida	
5-44	N-(2-metoxi-5-(6-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)fenil)acrilamida	
5-45	1-(6-(4,6-dicloropiridin-2-iltio)-5-metoxipiridin-3-il)-4-metilpiperazina	
5-46	N-(5-(3,6-dimetil-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)piridin-3-il)ciclopropanocarboxamida	
5-47	N-(2-(3-ciclopropoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)-6-hidroxipirimidin-4-il)acetamida	
5-48	4-(5-metoxi-6-(6-nitropirazin-2-iltio)-2-fenilpiridin-3-il)morfolina	
5-49	2-amino-N-(3-(5-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(pirrolidin-2-ilmetoxi)piridin-2-iltio)fenil)acetamida	
5-50	2-amino-N-(3-(5-(4-metilpiperazin-1-il)-3-(piperidin-4-iloxi)piridin-2-iltio)fenil)acetamida	
5-51	2-amino-N-(3-(3-(benciloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)-5-metoxifenil)acetamida	
5-52	2-amino-N-(3-(4-(benciloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)fenil)-3-(1H-imidazol-4-il)propanamida	
5-53	5-(4-(benciloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)quinolin-2(1H)-ona	
5-54	2-amino-N-(3-(4-(benciloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)fenil)-3-metilbutanamida	

ES 2 608 670 T3

ID #	Nombre de Compuesto	
5-55	N-(4-(3-(3-(dimetilamino)fenoxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)piridin-2-il)propionamida	
5-56	N-(3-(5-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(piperidin-3-ilo)piridin-2-iltio)fenil)metanosulfonamida	
5-57	1-(2-(2-metoxietoxi)-4-fenoxi-6-(3-(1-feniletil)feniltio)piridin-3-il)-4-metilpiperazina	
5-58	7-(5-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(quinolin-8-ilo)piridin-2-iltio)quinolin-2(1H)-ona	
5-59	N-(3-(4-(benciloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)fenil)pirrolidina-2-carboxamida	
5-60	2-amino-N-(3-(4-(benciloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)fenil)propanamida	
5-61	2-amino-N-(5-(4-(3-aminofenoxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)piridin-3-il)acetamida	
5-62	2-amino-N-(4-(4-(4-aminociclohexiloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)-6-metilpirimidin-2-il)acetamida	
5-63	2-amino-3-metil-N-(3-(5-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(piridin-3-ilmetoxi)piridin-2-ilsulfonil)fenil)pentanamida	
5-64	2-amino-N-(6-(3-(benciloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)benzo[d][1,3]dioxol-4-il)acetamida	
5-65	(3-(4-(3-(dimetilamino)ciclohexiloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)fenil)metanol	
5-66	2-amino-N-(4-(4-(benciloxi)-6-(2-metoxietoxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)fenil)acetamida	
5-67	2-amino-N-(3-(furan-3-ilamino)-5-(5-(4-metilpiperazin-1-il)-3-(pirimidin-2-ilmetoxi)piridin-2-ilsulfonil)fenil)-4-metilpentanamida	
5-68	2-amino-N-(3-(4-(2,3-dimetoxibenciloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)-5-metoxifenil)acetamida	
5-69	2-amino-N-(6-(4-(3-aminociclopentiloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)pirazin-2-il)acetamida	
5-70	(E)-2-amino-N-(4-(6-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)-4-estirilpiridin-2-iltio)-1,3,5-triazin-2-il)propanamida	
5-71	2-amino-N-(6-(5-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(piridin-3-ilo)piridin-2-iltio)piridin-2-il)propanamida	
5-72	2-amino-N-(3-(dimetilamino)-5-(5-(4-metilpiperazin-1-il)-4-fenoxipiridin-2-iltio)fenil)acetamida	
5-73	5-(5-(4-metilpiperazin-1-il)-3-(piridin-3-ilmetoxi)piridin-2-iltio)-3,4-dihidroquinolin-2(1H)-ona	
5-74	2-amino-N-(2-(4-(3-carbamidoilfenoxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)pirimidin-4-il)acetamida	
5-75	N-(3-(4-(2-(dimetilamino)etoxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)fenil)acrilamida	
5-76	2-amino-N-(2-(5-(4-metilpiperazin-1-il)-3-(piridin-2-ilo)piridin-2-ilsulfonil)piridin-4-il)propanamida	

ID #	Nombre de Compuesto	
5-77	2-amino-N-(3-amino-5-(4-(ciclopentiloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)fenil)acetamida	
5-78	7-(4-(ciclopropilmetoxi)-6-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)-3,4-dihidroquinolin-2(1H)-ona	
5-79	N-(3-(5-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(piridin-4-iloxi)piridin-2-ilsulfinil)fenil)benzamida	
5-80	N-(6-amino-2-(6-amino-4-(4-metilpiperazin-1-il)isoquinolin-1-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida	

Otra modalidad se refiere a compuestos que tienen la fórmula:



Fórmula 7a

5 sus estereoisómeros, tautómeros, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde,

X_5 - X_9 se seleccionan independientemente de CH, C sustituido y N sustituido;

Y es S, SO, SO₂, CH₂, CHR, CRR, CO, O, NH, o NR, en donde R es una cadena de alquilo o alcoxilo inferior;

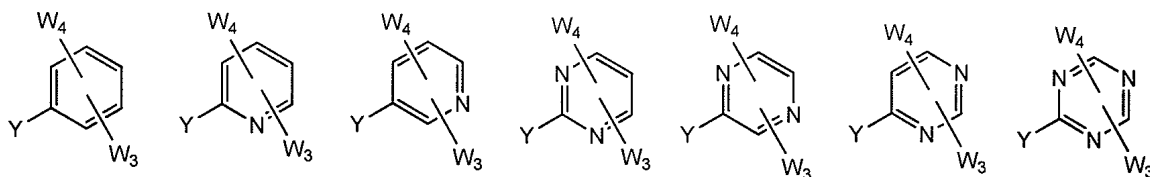
Z se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alquenilo, -NHCOalquenilo, -NHCOalquinilo, -COalquenilo, -COalquinilo, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN;

15 W_1 y W_2 independientemente en cada ocurrencia se pueden seleccionar del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alquenilo, -NHCOalquenilo, -NHCOalquinilo, -COalquenilo, -COalquinilo, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN; o W_1 y W_2 se pueden unir conjuntamente mediante un ligador, para formar un anillo fusionado de 5 o 6 miembros; y

20 W_3 y W_4 independientemente en cada ocurrencia se pueden seleccionar del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alquenilo, -NHCOalquenilo, -NHCOalquinilo, -COalquenilo, -COalquinilo, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN; o W_3 y W_4 se pueden unir conjuntamente mediante un ligador, para formar un anillo fusionado de 5 o 6 miembros.

Adicionalmente, W_2 se puede unir al anillo de arilo del lado derecho directamente para formar un anillo de 5 miembros o mediante un ligador para formar un anillo de 6 o 7 miembros.

En modalidades preferidas de la fórmula (7a), X_5 - X_9 se seleccionan independientemente de pero no se limitan a:



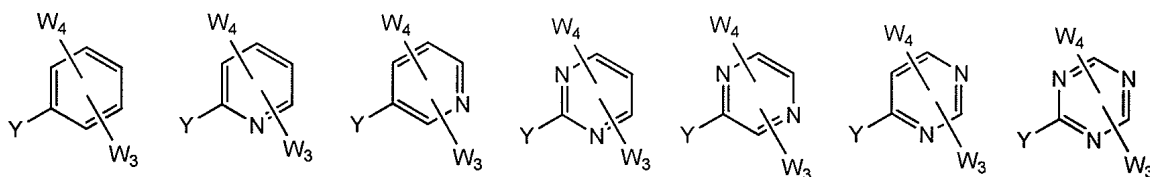
En modalidades preferidas de la fórmula (7a), Y es S, SO, SO₂, O o CH₂.

5 En modalidades preferidas de la fórmula (7a), Z es alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

10 En modalidades preferidas de la fórmula (7a), W₁ y W₂ en cada ocurrencia se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

En modalidades preferidas de la fórmula (7a) W₃ y W₄ en cada ocurrencia se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

15 En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (7a), X₅-X₉ son



En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (7a), Y es S, SO o SO₂.

20 En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (7a), Z es hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, o diarilamino.

En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (7a), W₁ y W₂ son independientemente hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, o diarilamino.

25 En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (7a), W₃ y W₄ son independientemente hidrógeno, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alqueno, -NHCOalqueno, -NHCOalquino, -COalqueno, -COalquino, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN.

La Tabla 6 muestra ejemplos de compuestos específicos que ejemplifican esta modalidad.

Tabla 6

ID #	Nombre de Compuesto	
6-01	N-(3-(2,6-dimetoxi-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)fenil)acrilamida	
6-02	(2,5-dimetoxifenil)(3-fenoxifenil)sulfano	
6-03	N-(3-(3-(ciclopropilamino)-4-(5,6-dihidropiridin-1(2H)-il)-5-metoxifeniltio)fenil)acrilamida	

ES 2 608 670 T3

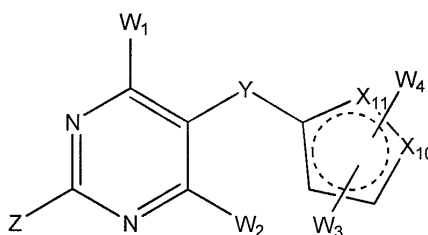
ID #	Nombre de Compuesto	
6-04	3-(4-hidroxi-2,6-dimetoxifeniltio)benzenosulfonamida	
6-05	7-(3-metoxi-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)-3,4-dihidroquinolin-2(1H)-ona	
6-06	7-(3-metoxi-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)quinolin-2(1H)-ona	
6-07	1-(4-(4,6-dicloropiridin-2-iltio)-2-metoxifenil)-4-metilpiperazina	
6-08	N-(2-(5-amino-2-etoxi-4-etilfenilsulfonil)-6-metoxipiridin-4-il)acetamida	
6-09	4-(6-cloro-4-(ciclopentilamino)piridin-2-iltio)-N1,N1-dietil-N2-fenilbenceno-1,2-diamina	
6-10	(2-cloro-6-(2-(ciclopentiloxi)-4-etoxifeniltio)piridin-4-il)metanosulfonamida	
6-11	2-(2-(3-metoxi-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)piridin-4-il)acetonitrilo	
6-12	2-amino-N-(2-(3-(furan-2-il)-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)piridin-4-il)acetamida	
6-13	N-(5-(2,6-dietil-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)piridin-3-il)ciclopropanocarboxamida	
6-14	N-metil-5-(5-(trifluorometoxi)piridin-3-ilsulfonil)-2-vinilanilina	
6-15	5-(3-(difenilamino)-4-(pirrolidin-1-il)feniltio)piridin-3-ilcarbamato de etilo	
6-16	N-isopropil-2,6-dimetil-4-(5-(trifluorometil)piridin-3-iltio)anilina	
6-17	N-(5-(2-(ciclopentilamino)-6-metoxi-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)piridin-3-il)picolinamida	
6-18	N-(5-(3-metil-5-(5-metilfuran-2-il)-4-(piperazin-1-il)feniltio)piridin-3-il)ciclopropanocarboxamida	
6-19	N-(6-hidroxi-2-(3-metoxi-4-(4-metilpiperazin-1-il)-5-vinilfeniltio)pirimidin-4-il)acetamida	
6-20	N-(2-(2-(dimetilamino)-4-(prop-1-inil)feniltio)-6-(viniloxi)pirimidin-4-il)acetamida	
6-21	1-(6-hidroxi-2-(5-metoxi-4-(1H-pirrol-1-il)-2-vinilfeniltio)pirimidin-4-il)etanona	
6-22	2-(4-(dietilamino)-3-metoxi-5-vinilfeniltio)-6-(metiltio)pirimidin-4-ol	
6-23	N-(2-(2,5-dimetoxi-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)-6-hidroxipirimidin-4-il)nicotinamida	
6-24	N-(2-(2-(furan-2-il)-4-(4-metilpiperazin-1-il)-5-(1H-pirrol-2-il)feniltio)-6-hidroxipirimidin-4-il)acetamida	
6-25	4-(3-metoxi-5-(6-nitropirazin-2-iltio)bifenil-2-il)morfolina	
6-26	2-(6-(3-(ciclopentilamino)-5-metoxi-4-(piridin-4-il)fenilsulfonil)pirazin-2-il)etanol	
6-27	2-(5-(5-metoxi-6-(piperidin-1-il)bifenil-3-iltio)pirazin-2-il)acetamida	
6-28	N-ciclopentil-3-metoxi-5-(6-(metilsulfonil)pirazin-2-iltio)bifenil-2-amina	
6-29	3'-metoxi-N,N-dimetil-2'-morfolino-5'-(6-nitropirazin-2-iltio)bifenil-4-amina	
6-30	2-(3-metoxi-4-(4-metilpiperazin-1-il)-5-(1H-pirazol-3-il)feniltio)-6-nitropirazina	

ES 2 608 670 T3

ID #	Nombre de Compuesto	
6-31	6-(3-etinil-5-metoxi-4-(piperidin-1-il)feniltio)pirimidina-4-carbonitrilo	
6-32	6-(4-ciclohexil-3-(fenilamino)fenilsulfonil)pirimidin-4-amina	
6-33	N-(6-(6-etinil-5-fluoro-4-metoxipiridin-2-iltio)pirimidin-4-il)acetamida	
6-34	6-(3-etinil-5-metoxi-4-(fenilamino)feniltio) pirimidina-4-carboxilato de isopropilo	
6-35	6-(3'-(dimetilamino)-6-(piperidin-1-il)bifenil-3-iltio)pirimidina-4-carbonitrilo	
6-36	6-(3-metoxi-4-(piperidin-1-il)-5-(tiofen-2-il)feniltio)pirimidina-4-carbonitrilo	
6-37	N-(4-amino-6-(4-(4-hidroxi-piperidin-1-il)-3-fenoxifeniltio)-1,3,5-triazin-2-il)benzamida	
6-38	6-(4-ciclohexenilfeniltio)-N2-etil-N4,N4-dimetil-1,3,5-triazina-2,4-diamina	
6-39	N-acetil-N-(4-amino-6-(4-bromo-3-fenoxifeniltio)-1,3,5-triazin-2-il)acetamida	
6-40	(4-amino-6-(3-fenoxi-4-(pirimidin-5-ilamino)feniltio)-1,3,5-triazin-2-il)(ciclopentil)metanona	
6-41	N-(4-amino-6-(3-(3-(dimetilamino)fenoxi)-4-(4-hidroxi-piperidin-1-il)feniltio)-1,3,5-triazin-2-il)benzamida	
6-42	N-(4-(3-alil-4-(4-hidroxi-piperidin-1-il)feniltio)-6-amino-1,3,5-triazin-2-il)-2-aminopropanamida	
6-43	N-(3-(4-(4-hidroxiciclohexilamino)-2,6-dimetoxifeniltio)fenil)acrilamida	
6-44	2-amino-N-(3-(4-(4-metilpiperazin-1-il)-3-(pirrolidin-2-ilmetoxi)feniltio)fenil)acetamida	
6-45	2-amino-N-(3-(4-(4-metilpiperazin-1-il)-2-(piperidin-4-iloxi)feniltio)fenil)acetamida	
6-46	2-amino-N-(3-(2-(benciloxi)-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)-5-metoxifenil)acetamida	
6-47	2-amino-N-(3-(3-(benciloxi)-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)fenil)-3-(1H-imidazol-4-il)propanamida	
6-48	5-(3-(benciloxi)-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)quinolin-2(1H)-ona	
6-49	2-amino-N-(3-(3-(benciloxi)-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)fenil)-3-metilbutanamida	
6-50	N-(4-(2-(3-(dimetilamino)fenoxi)-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)piridin-2-il)propionamida	
6-51	N-(3-(4-(4-metilpiperazin-1-il)-3-(piperidin-3-iloxi)feniltio)fenil)metanosulfonamida	
6-52	1-(2-(2-metoxietoxi)-6-fenoxi-4-(3-(1-feniletil)feniltio)fenil)-4-metilpiperazina	
6-53	7-(4-(4-metilpiperazin-1-il)-3-(quinolin-8-iloxi)feniltio)quinolin-2(1H)-ona	
6-54	N-(3-(3-(benciloxi)-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)fenil)pirrolidina-2-carboxamida	
6-55	2-amino-N-(3-(3-(benciloxi)-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)fenil)propanamida	
6-56	2-amino-N-(5-(3-(3-aminofenoxi)-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)piridin-3-il)acetamida	
6-57	2-amino-N-(4-(3-(4-aminociclohexiloxi)-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)-6-metilpirimidin-2-il)acetamida	

ID #	Nombre de Compuesto	
6-58	2-amino-3-metil-N-(3-(4-(4-metilpiperazin-1-il)-3-(piridin-3-ilmetoxi)fenilsulfonil)fenil)pentanamida	
6-59	2-amino-N-(6-(2-(benciloxi)-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio) benzo[d][1,3]dioxol-4-il)acetamida	
6-60	(3-(3-(3-(dimetilamino)ciclohexiloxi)-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)fenil)metanol	
6-61	2-amino-N-(4-(3-(benciloxi)-5-(2-metoxietoxi)-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)fenil)acetamida	
6-62	2-amino-N-(3-(furan-3-ilamino)-5-(4-(4-metilpiperazin-1-il)-2-(pirimidin-2-ilmetoxi)fenilsulfonil)fenil)-4-metilpentanamida	
6-63	2-amino-N-(3-(3-(2,3-dimetoxibenciloxi)-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)-5-metoxifenil)acetamida	
6-64	2-amino-N-(9-metoxi-8-(4-metilpiperazin-1-il)dibenzo[b,d]tiofen-3-il)acetamida	
6-65	2-amino-N-(6-(3-(3-aminociclopentiloxi)-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)pirazin-2-il)acetamida	
6-66	(E)-2-amino-N-(4-(3-metoxi-4-(4-metilpiperazin-1-il)-5-estirilfeniltio)-1,3,5-triazin-2-il)propanamida	
6-67	2-amino-N-(6-(4-(4-metilpiperazin-1-il)-3-(piridin-3-iloxi)feniltio)piridin-2-il)propanamida	
6-68	2-amino-N-(3-(dimetilamino)-5-(4-(4-metilpiperazin-1-il)-3-fenoxifeniltio)fenil)acetamida	
6-69	5-(4-(4-metilpiperazin-1-il)-2-(piridin-3-ilmetoxi)feniltio)-3,4-dihidroquinolin-2(1H)-ona	
6-70	2-amino-N-(2-(3-(3-carbamimidoidifenoxi)-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)pirimidin-4-il)acetamida	
6-71	N-(3-(3-(2-(dimetilamino)etoxi)-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)fenil)acrilamida	
6-72	2-amino-N-(2-(4-(4-metilpiperazin-1-il)-2-(piridin-2-iloxi)fenilsulfonil)piridin-4-il)propanamida	
6-73	2-amino-N-(3-amino-5-(3-(ciclopentiloxi)-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)fenil)acetamida	
6-74	7-(3-(ciclopropilmetoxi)-5-metoxi-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)-3,4-dihidroquinolin-2(1H)-ona	
6-75	N-(3-(4-(4-metilpiperazin-1-il)-3-(piridin-4-iloxi)fenilsulfonil)fenil)benzamida	
6-76	2-amino-N-(2-(6-amino-4-(4-metilpiperazin-1-il)naftalen-1-iltio)pirimidin-4-il)acetamida	

Otra modalidad se refiere a compuestos que tienen la fórmula:



Fórmula 2b

sus estereoisómeros, tautómeros, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde,

X_{10} y X_{11} se seleccionan independientemente de CH, CH_2 , NH, NR' , O, y S tal que se mantiene la aromaticidad, en donde R' es una cadena de alquilo o alquilo sustituido;

5 Y es S, SO, SO_2 , CH_2 , CHR, CRR, CO, O, NH, o NR, en donde R es una cadena de alquilo o alcoxilo inferior;

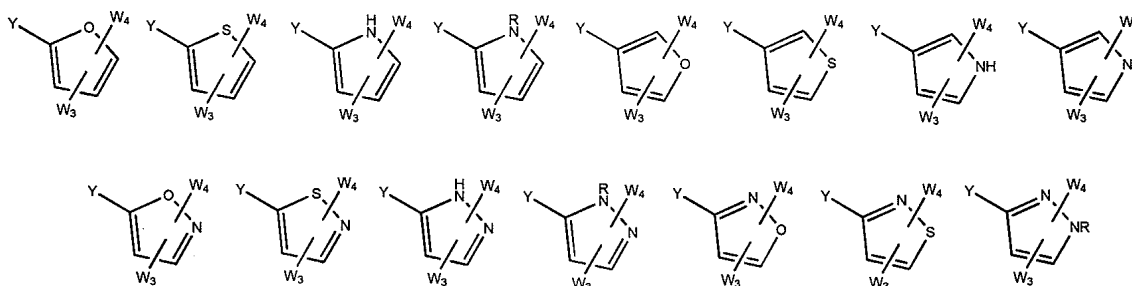
Z se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, - $NHSO_2$ alquenilo, -
10 $NHCO$ alquenilo, - $NHCO$ alquinilo, - CO alquenilo, - CO alquinilo, trihalocarbono, tioalquilo, SO_2 -alquilo, - COO -alquilo, - CO alquilo, y alquil-CN;

W_1 y W_2 independientemente en cada ocurrencia se pueden seleccionar del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -
15 $NHSO_2$ alquenilo, - $NHCO$ alquenilo, - $NHCO$ alquinilo, - CO alquenilo, - CO alquinilo, trihalocarbono, tioalquilo, SO_2 -alquilo, - COO -alquilo, - CO alquilo, y alquil-CN; y

W_3 y W_4 independientemente en cada ocurrencia se pueden seleccionar del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -
20 $NHSO_2$ alquenilo, - $NHCO$ alquenilo, - $NHCO$ alquinilo, - CO alquenilo, - CO alquinilo, trihalocarbono, tioalquilo, SO_2 -alquilo, - COO -alquilo, - CO alquilo, y alquil-CN; o W_3 y W_4 se pueden unir conjuntamente mediante un ligador, para formar un anillo fusionado de 5 o 6 miembros.

25 Adicionalmente, W_2 se puede unir al anillo de arilo del lado derecho directamente para formar un anillo de 5 miembros o mediante un ligador para formar un anillo de 6 o 7 miembros.

En modalidades preferidas de la fórmula (2b), X_{10} y X_{11} se seleccionan independientemente de, pero no se limitan a:



30 en donde R es una cadena de alquilo o alquilo sustituido.

En modalidades preferidas de la fórmula (2b), Y es S, SO, SO_2 , O o CH_2 .

En modalidades preferidas de la fórmula (2b), Z es alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.
35

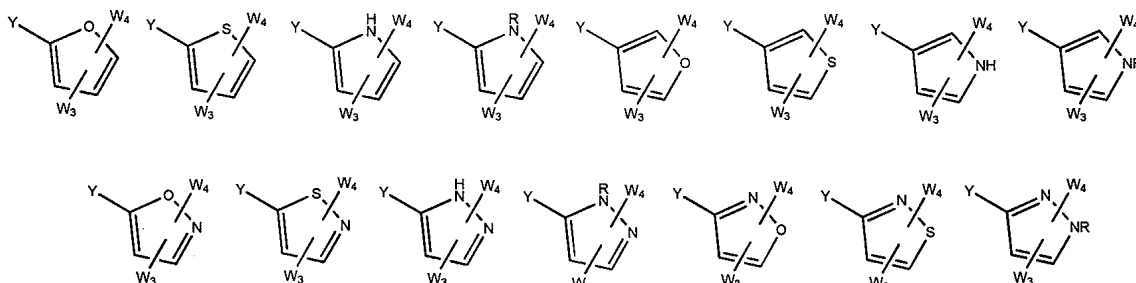
En modalidades preferidas de la fórmula (2b), W_1 y W_2 en cada ocurrencia se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.
40

En modalidades preferidas de la fórmula (2b) W_3 y W_4 en cada ocurrencia se seleccionan independientemente del grupo

que consiste de hidrógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (2b), X₁₀ y X₁₁ se seleccionan independientemente de;

5



en donde R es una cadena de alquilo o alquilo sustituido.

En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (2b), Y es S, SO o SO₂.

10

En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (2b), Z es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, o diarilamino.

En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (2b), W₁ y W₂ son independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, o diarilamino.

15

En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (2b), W₃ y W₄ son independientemente hidrógeno, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alquenilo, -NHCOalquenilo, -NHCOalquinilo, -COalquenilo, -COalquinilo, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN.

La Tabla 7 muestra ejemplos de compuestos específicos que ejemplifican esta modalidad.

20

Tabla 7

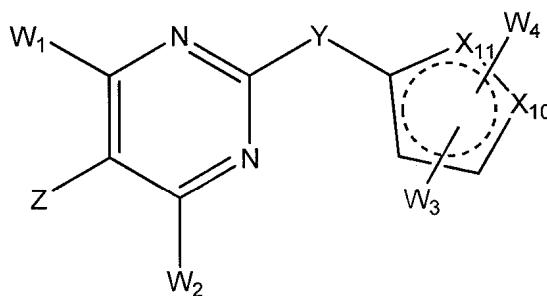
ID #	Nombre de Compuesto	
7-01	4-(4-(3-(dimetilamino)fenil)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)-1H-pirrol-3-ol	
7-02	4-(4-(3-(dimetilamino)fenil)-5-(2-fenil-1H-pirrol-3-ilsulfonil)pirimidin-2-ilamino)ciclohexanol	
7-03	(E)-4-(2-(etilamino)-4-(prop-1-enil)pirimidin-5-iltio)-1H-pirrol-3-ol	
7-04	4-(2-metoxipirimidin-5-iltio)-1H-pirrol-3-ol	
7-05	2-metoxi-5-(5-metoxi-4-metil-1H-pirrol-3-iltio)-6-metilpirimidin-4-amina	
7-06	4-(4-metoxi-5-(2-(metiltio)-1H-pirrol-3-ilsulfonil)pirimidin-2-ilamino)ciclohexanol	
7-07	5-(1-metil-1H-pirrol-3-iltio)-4-fenil-2-(piperidin-1-il)pirimidina	
7-08	1-metil-4-(4-fenil-2-(piridin-4-il)pirimidin-5-iltio)-1H-pirrol-3-amina	
7-09	4-(4-etinil-2-vinilpirimidin-5-iltio)-N,N,1-trimetil-1H-pirrol-3-amina	
7-10	5-(1-metil-4-nitro-1H-pirrol-3-iltio)-2-fenoxi-4-fenilpirimidina	

ES 2 608 670 T3

ID #	Nombre de Compuesto	
7-11	N-(4-(2-etoxi-4-(3-sulfamoilfenil)pirimidin-5-iltio)-1-etil-1H-pirrol-3-il)acetamida	
7-12	4-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-5-(1-metil-4-(metilsulfonil)-1H-pirrol-3-iltio)-2-(piridin-4-il)pirimidina	
7-13	1-(2-(dietilamino)-5-(5-metilfuran-3-iltio)pirimidin-4-il)etanona	
7-14	1-(5-(4-(etilamino)furan-3-iltio)-2-(piridin-3-il)pirimidin-4-il)etanona	
7-15	2-etinil-5-(5-(pirrolidin-1-il)furan-3-iltio)pirimidin-4-amina	
7-16	1-(5-(5-metilfuran-3-iltio)-2-(fenilamino)pirimidin-4-il)etanona	
7-17	4-(4-acetil-2-(1H-pirrol-1-il)pirimidin-5-iltio)furan-2-ilcarbamato de isopropilo	
7-18	4-(4-(1H-pirazol-3-il)-2-(piridin-3-il)pirimidin-5-iltio)furan-2-carboxilato de metilo	
7-19	1-(3-(5-(5-clorotiofen-3-iltio)-2-(5,6-dihidropiridin-1(2H)-il)pirimidin-4-il)fenil)etanona	
7-20	N-(4-(4-(3-acetilfenil)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-ilsulfinil)tiofen-3-il)acetamida	
7-21	1-(3-(5-(5-bromotiofen-3-iltio)-2-(5,6-dihidropiridin-1(2H)-il)pirimidin-4-il)fenil)etanona	
7-22	1-(3-(2-(5,6-dihidropiridin-1(2H)-il)-5-(5-etoxitiofen-3-iltio)pirimidin-4-il)fenil)etanona	
7-23	4-(4-(3-acetilfenil)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)tiofeno-3-sulfonamida	
7-24	N-(4-(4-(ciclopentilamino)-6-metil-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-ilsulfinil)tiofen-3-il)acetamida	
7-25	5-(4-metoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)-N-metil-1H-pirrol-3-carboxamida	
7-26	4-(benciloxi)-5-(3-metoxi-1H-pirrol-2-iltio)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidina	
7-27	1-etil-5-(4-metoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)-N-metil-1H-pirrol-3-carboxamida	
7-28	1-(5-(5-(hidroximetil)-1H-pirrol-2-iltio)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-4-il)urea	
7-29	5-(4-metoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)-N-metilfuran-3-carboxamida	
7-30	2-amino-N-(2-(4-metoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)furan-3-il)acetamida	
7-31	1-(5-(4-(ciclopropilamino)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)furan-2-il)etanona	
7-32	2-amino-N-(2-(4-metoxi-6-metil-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)tiofen-3-il)propanamida	
7-33	5-(4-metoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)-N-metil-4-(trifluorometoxi)tiofeno-3-carboxamida	
7-34	5-metil-3-(2-(piridin-3-il)pirimidin-5-ilsulfinil)isoxazol	
7-35	1-(3-(4-amino-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)isoxazol-4-il)etanona	

ID #	Nombre de Compuesto	
7-36	3-(4,6-dimetil-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)isotiazol	
7-37	4-(4-(benciloxi)-5-(5-(furan-2-il)isotiazol-3-iltio)pirimidin-2-il)morfolina	
7-38	5-(4-metoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)-N-metil-1H-pirazol-3-carboxamida	
7-39	4-(benciloxi)-5-(4-metoxi-1H-pirazol-5-iltio)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidina	
7-40	1-etil-5-(4-metoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)-N-metil-1H-pirazol-3-carboxamida	
7-41	2-(3-(4-etil-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)-1-metil-1H-pirazol-4-iloxi)etanamina	
7-42	5-(4-metoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)-N-metilisoxazol-3-carboxamida	
7-43	2-amino-N-(5-(4-metoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)isoxazol-4-il)acetamida	
7-44	N-ciclopropil-5-(isoxazol-5-iltio)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-4-amina	
7-45	2-amino-N-(5-(4-metoxi-6-metil-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)isotiazol-4-il)propanamida	
7-46	5-(4-metoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)-N-metil-4-(trifluorometoxi)isotiazol-3-carboxamida	

Otra modalidad se refiere a compuestos que tienen la fórmula:



Fórmula 3b

5 sus estereoisómeros, tautómeros, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde,

X_{10} y X_{11} se seleccionan independientemente de CH, CH_2 , NH, NR' , O, y S tal que se mantiene la aromaticidad, en donde R' es una cadena de alquilo o alquilo sustituido;

Y es S, SO, SO_2 , CH_2 , CHR, CRR, CO, O, NH, o NR, en donde R es una cadena de alquilo o alcoxilo inferior;

10 Z se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, $-NHSO_2$ alqueno, $-NHCO$ alqueno, $-NHCO$ alquino, $-CO$ alqueno, $-CO$ alquino, trihalocarbono, tionalquilo, SO_2 -alquilo, $-COO$ -alquilo, $-CO$ alquilo, y alquil-CN;

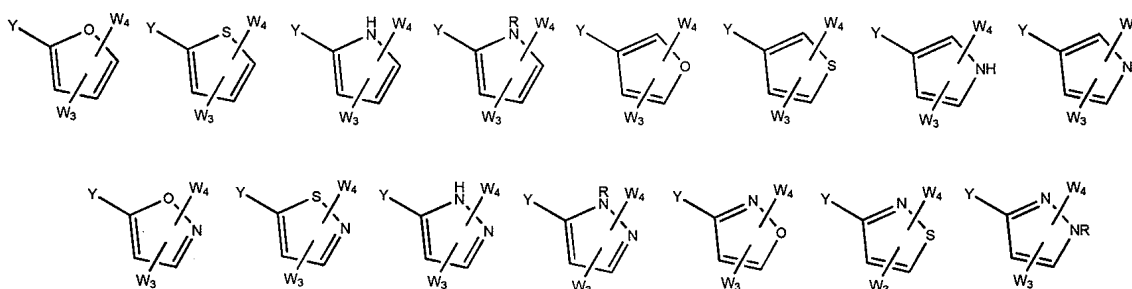
15 W_1 y W_2 independientemente en cada ocurrencia se pueden seleccionar del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino,

arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alquenilo, -NHCOalquenilo, -NHCOalquinilo, -COalquenilo, -COalquinilo, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN; y

5 W₃ y W₄ independientemente en cada ocurrencia se pueden seleccionar del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alquenilo, -NHCOalquenilo, -NHCOalquinilo, -COalquenilo, -COalquinilo, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN; o W₃ y W₄ se pueden unir conjuntamente mediante un ligador, para formar un anillo fusionado de 5 o 6 miembros.

Adicionalmente, W₂ se puede unir al anillo de arilo del lado derecho directamente para formar un anillo de 5 miembros o mediante un ligador para formar un anillo de 6 o 7 miembros.

En modalidades preferidas de la fórmula (3b), X₁₀ y X₁₁ se seleccionan independientemente de, pero no se limitan a:



en donde R es una cadena de alquilo o alquilo sustituido.

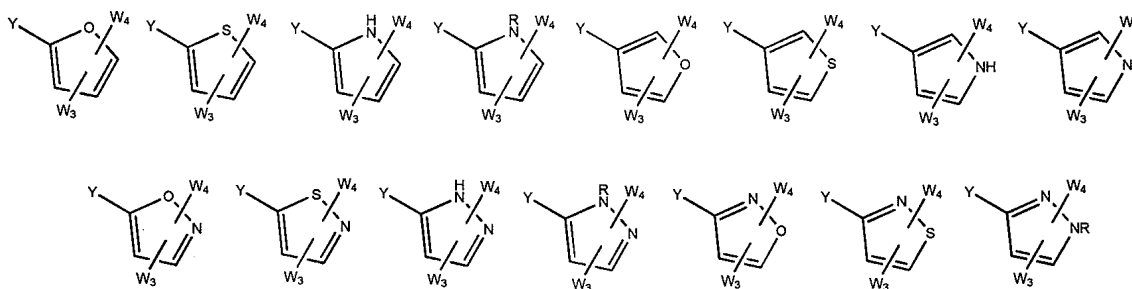
En modalidades preferidas de la fórmula (3b), Y es S, SO, SO₂, O o CH₂.

20 En modalidades preferidas de la fórmula (3b), Z es alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

25 En modalidades preferidas de la fórmula (3b), W₁ y W₂ en cada ocurrencia se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

30 En modalidades preferidas de la fórmula (3b) W₃ y W₄ en cada ocurrencia se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (3b), X₁₀ y X₁₁ se seleccionan independientemente de;



en donde R es una cadena de alquilo o alquilo sustituido.

En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (3b), Y es S, SO o SO₂.

En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (3b), Z es hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, o diarilamino.

- 5 En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (3b), W₁ y W₂ son independientemente hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, o diarilamino.

- 10 En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (3b), W₃ y W₄ son independientemente hidrógeno, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, arilo, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueno, alquino, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alqueno, -NHCOalqueno, -NHCOalquino, -COalqueno, -COalquino, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN.

La Tabla 8 muestra ejemplos de compuestos específicos que ejemplifican esta modalidad.

Tabla 8

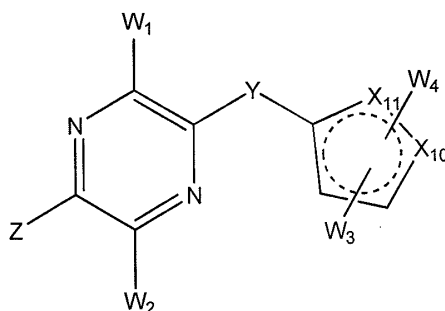
ID #	Nombre de Compuesto	
8-01	4-(4-(4-(dimetilamino)fenil)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-2-iltio)-1H-pirrol-3-ol	
8-02	3-(5-(4-hidroxiciclohexilamino)-2-(2-fenil-1H-pirrol-3-ilsulfonil)pirimidin-4-il)bencimidamida	
8-03	(E)-4-(5-(etilamino)-4-(prop-1-enil)pirimidin-2-iltio)-1H-pirrol-3-ol	
8-04	4-(5-metoxipirimidin-2-iltio)-1H-pirrol-3-ol	
8-05	5-metoxi-2-(5-metoxi-4-metil-1H-pirrol-3-iltio)-6-metilpirimidin-4-amina	
8-06	4-(4-metoxi-2-(2-(metiltio)-1H-pirrol-3-ilsulfonil)pirimidin-5-ilamino)ciclohexanol	
8-07	2-(1-metil-1H-pirrol-3-iltio)-4-fenil-5-(piperidin-1-il)pirimidina	
8-08	1-metil-4-(4-fenil-5-(piridin-4-il)pirimidin-2-iltio)-1H-pirrol-3-amina	
8-09	4-(4-etinil-5-vinilpirimidin-2-iltio)-N,N,1-trimetil-1H-pirrol-3-amina	
8-10	2-(1-metil-4-nitro-1H-pirrol-3-iltio)-5-fenoxi-4-fenilpirimidina	
8-11	N-(4-(5-etoxi-4-(3-sulfamoilfenil)pirimidin-2-iltio)-1-etil-1H-pirrol-3-il)acetamida	
8-12	4-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-2-(1-metil-4-(metilsulfonil)-1H-pirrol-3-iltio)-5-(piridin-4-il)pirimidina	
8-13	1-(5-(dietilamino)-2-(5-metilfuran-3-iltio)pirimidin-4-il)etanona	
8-14	4-(4,5-di(piridin-3-il)-6-(pirrolidin-1-il)pirimidin-2-iltio)-N-etilfuran-3-amina	
8-15	5-etinil-2-(5-(pirrolidin-1-il)furan-3-iltio)pirimidin-4-amina	
8-16	2-(5-metilfuran-3-iltio)-N-fenil-4-(tiofen-3-il)pirimidin-5-amina	
8-17	4-(4-acetil-5-(1H-pirrol-1-il)pirimidin-2-iltio)furan-2-ilcarbamato de isopropilo	
8-18	4-(4-(1H-pirazol-3-il)-5-(piridin-3-il)pirimidin-2-iltio)furan-2-carboxilato de metilo	

ES 2 608 670 T3

ID #	Nombre de Compuesto	
8-19	1-(3-(2-(5-clorotiofen-3-iltio)-5-(5,6-dihidropiridin-1(2H)-il)pirimidin-4-il)fenil)etanona	
8-20	N-(4-(4-(2-(dimetilamino)etoxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-2-ilsulfinil)tiofen-3-il)acetamida	
8-21	1-(3-(2-(5-bromotiofen-3-iltio)-5-(5,6-dihidropiridin-1(2H)-il)pirimidin-4-il)fenil)etanona	
8-22	5-(5,6-dihidropiridin-1(2H)-il)-2-(5-etoxitiofen-3-iltio)-4-(furan-2-il)pirimidina	
8-23	4-(4-(ciclopentiloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-2-iltio)tiofeno-3-sulfonamida	
8-24	N-(4-(4-(ciclopentilamino)-6-metil-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-2-ilsulfinil)tiofen-3-il)acetamida	
8-25	5-(6-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)-N-metil-1H-pirrol-3-carboxamida	
8-26	3-(benciloxi)-5-(3-metoxi-1H-pirrol-2-iltio)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirazina	
8-27	1-etil-5-(6-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)-N-metil-1H-pirrol-3-carboxamida	
8-28	1-(6-(5-(hidroximetil)-1H-pirrol-2-iltio)-3-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-il)urea	
8-29	5-(6-metoxi-3-metil-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)-N-metilfuran-3-carboxamida	
8-30	2-amino-N-(2-(6-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)furan-3-il)acetamida	
8-31	1-(5-(6-(ciclopropilamino)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)furan-2-il)etanona	
8-32	2-amino-N-(2-(6-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)tiofen-3-il)propanamida	
8-33	5-(6-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)-N-metil-4-(trifluorometoxi)tiofeno-3-carboxamida	
8-34	3-(6-metoxi-5-(piridin-3-il)pirazin-2-ilsulfinil)-5-metilisoxazol	
8-35	1-(3-(6-amino-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)isoxazol-4-il)etanona	
8-36	3-(6-metil-5-(piperidin-1-il)pirazin-2-iltio)isotiazol	
8-37	4-(3-(benciloxi)-5-(5-(furan-2-il)isotiazol-3-iltio)pirazin-2-il)morfolina	
8-38	5-(6-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)-N-metil-1H-pirazol-3-carboxamida	
8-39	3-(benciloxi)-5-(4-metoxi-1H-pirazol-5-iltio)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirazina	
8-40	1-etil-5-(6-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)-N-metil-1H-pirazol-3-carboxamida	
8-41	2-(3-(6-etil-3-metil-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)-1-metil-1H-pirazol-4-ilo)etanamina	
8-42	5-(6-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)-N-metilisoxazol-3-carboxamida	
8-43	2-amino-N-(5-(6-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)isoxazol-4-il)acetamida	
8-44	N-ciclopropil-6-(isoxazol-5-iltio)-3-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-amina	

ID #	Nombre de Compuesto	
8-45	2-amino-N-(5-(6-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)isotiazol-4-il)propanamida	
8-46	5-(6-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)-N-metil-4-(trifluorometoxi)isotiazol-3-carboxamida	

Otra modalidad se refiere a compuestos que tienen la fórmula:



Fórmula 4b

5 sus estereoisómeros, tautómeros, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde,

X_{10} y X_{11} se seleccionan independientemente de CH, CH_2 , NH, NR' , O, y S tal que se mantiene la aromaticidad, en donde R' es una cadena de alquilo o alquilo sustituido;

Y es S, SO, SO_2 , CH_2 , CHR, CRR, CO, O, NH, o NR, en donde R es una cadena de alquilo o alcoxilo inferior;

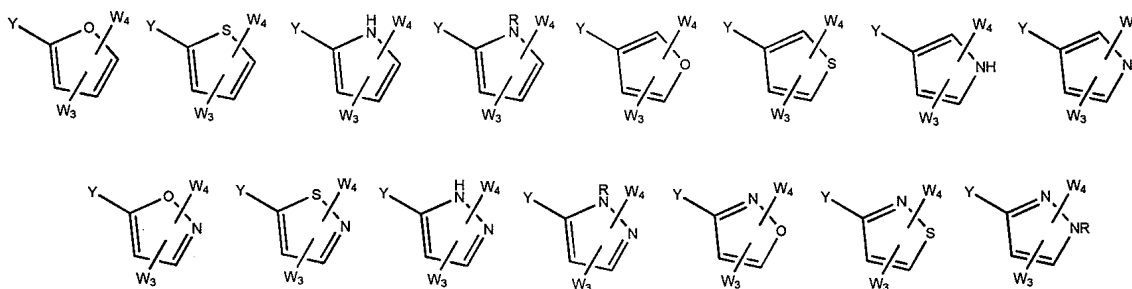
10 Z se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, $-NHCO_2$ alquenilo, $-NHCO_2$ alquinilo, $-CO_2$ alquenilo, $-CO_2$ alquinilo, trihalocarbono, tioalquilo, SO_2 -alquilo, $-COO-$ alquilo, $-CO_2$ alquilo, y alquil-CN;

15 W_1 y W_2 independientemente en cada ocurrencia se pueden seleccionar del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, $-NHCO_2$ alquenilo, $-NHCO_2$ alquinilo, $-CO_2$ alquenilo, $-CO_2$ alquinilo, trihalocarbono, tioalquilo, SO_2 -alquilo, $-COO-$ alquilo, $-CO_2$ alquilo, y alquil-CN; y

25 W_3 y W_4 independientemente en cada ocurrencia se pueden seleccionar del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, $-NHCO_2$ alquenilo, $-NHCO_2$ alquinilo, $-CO_2$ alquenilo, $-CO_2$ alquinilo, trihalocarbono, tioalquilo, SO_2 -alquilo, $-COO-$ alquilo, $-CO_2$ alquilo, y alquil-CN; o W_3 y W_4 se pueden unir conjuntamente mediante un ligador, para formar un anillo fusionado de 5 o 6 miembros.

Adicionalmente, W_2 se puede unir al anillo de arilo del lado derecho directamente para formar un anillo de 5 miembros o mediante un ligador para formar un anillo de 6 o 7 miembros.

30 En modalidades preferidas de la fórmula (4b), X_{10} y X_{11} se seleccionan independientemente de, pero no se limitan a:



en donde R es una cadena de alquilo o alquilo sustituido.

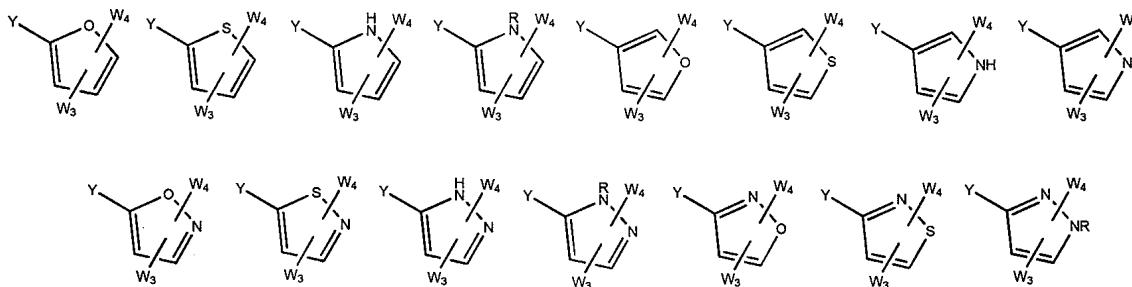
En modalidades preferidas de la fórmula (4b), Y es S, SO, SO₂, O o CH₂.

5 En modalidades preferidas de la fórmula (4b), Z es alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

10 En modalidades preferidas de la fórmula (4b), W₁ y W₂ en cada ocurrencia se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

15 En modalidades preferidas de la fórmula (4b) W₃ y W₄ en cada ocurrencia se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (4b), X₁₀ y X₁₁ se seleccionan independientemente de;



20

en donde R es una cadena de alquilo o alquilo sustituido.

En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (4b), Y es S, SO o SO₂.

25 En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (4b), Z es hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, o diarilamino.

En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (4b), W₁ y W₂ son independientemente hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, o diarilamino.

30 En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (4b), W₃ y W₄ son independientemente hidrógeno, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alqueno, -NHCOalqueno, -NHCOalquino, -COalqueno, -COalquino, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN.

La Tabla 9 muestra ejemplos de compuestos específicos que ejemplifican esta modalidad.

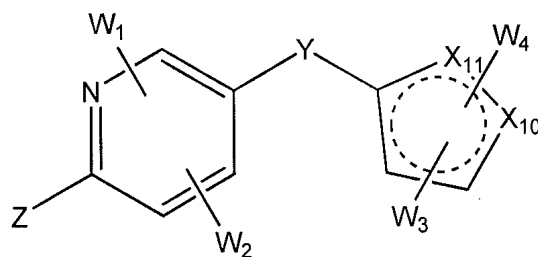
Tabla 9

ID #	Nombre de Compuesto	
9-01	4-(6-(4-(dimetilamino)fenil)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)-1H-pirrol-3-ol	
9-02	3-(3-(4-hidroxiciclohexilamino)-6-(2-fenil-1H-pirrol-3-ilsulfonil)pirazin-2-il)bencimidamida	
9-03	(E)-4-(5-(etilamino)-6-(prop-1-enil)pirazin-2-iltio)-1H-pirrol-3-ol	
9-04	4-(5-metoxipirazin-2-iltio)-1H-pirrol-3-ol	
9-05	3-metoxi-6-(5-metoxi-4-metil-1H-pirrol-3-iltio)-5-metilpirazin-2-amina	
9-06	4-(3-metoxi-5-(2-(metiltio)-1H-pirrol-3-ilsulfonil)pirazin-2-ilamino)ciclohexanol	
9-07	4-(3-metoxi-5-(2-(metiltio)-1H-pirrol-3-ilsulfonil)pirazin-2-ilamino)ciclohexanol	
9-08	1-metil-4-(6-fenil-5-(piridin-4-il)pirazin-2-iltio)-1H-pirrol-3-amina	
9-09	4-(6-etinil-5-vinilpirazin-2-iltio)-N,N,1-trimetil-1H-pirrol-3-amina	
9-10	3-metil-2-(1-metil-4-nitro-1H-pirrol-3-iltio)-5-fenoxipirazina	
9-11	N-(4-(5-etoxi-6-(3-sulfamoilfenil)pirazin-2-iltio)-1-etil-1H-pirrol-3-il)acetamida	
9-12	3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-5-(1-metil-4-(metilsulfonil)-1H-pirrol-3-iltio)-2-(piridin-4-il)pirazina	
9-13	1-(3-(dietilamino)-6-(5-metilfuran-3-iltio)pirazin-2-il)etanona	
9-14	3-(4-(etilamino)furan-3-iltio)-5,6-di(piridin-3-il)pirazin-2-amina	
9-15	3-etinil-6-(5-(pirrolidin-1-il)furan-3-iltio)pirazin-2-amina	
9-16	5-(5-metilfuran-3-iltio)-N-fenil-3-(tiofen-3-il)pirazin-2-amina	
9-17	4-(6-acetil-5-(1H-pirrol-1-il)pirazin-2-iltio)furan-2-ilcarbamato de isopropilo	
9-18	4-(6-(1H-pirazol-3-il)-5-(piridin-3-il)pirazin-2-iltio)furan-2-carboxilato de metilo	
9-19	1-(3-(6-(5-clorotiofen-3-iltio)-3-(5,6-dihidropiridin-1(2H)-il)pirazin-2-il)fenil)etanona	
9-20	N-(4-(6-(2-(dimetilamino)etoxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-ilsulfinil)tiofen-3-il)acetamida	
9-21	1-(3-(6-(5-bromotiofen-3-iltio)-3-(5,6-dihidropiridin-1(2H)-il)pirazin-2-il)fenil)etanona	
9-22	2-(5,6-dihidropiridin-1(2H)-il)-5-(5-etoxitiofen-3-iltio)-3-(furan-2-il)pirazina	
9-23	4-(6-(ciclopentiloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)tiofeno-3-sulfonamida	
9-24	N-(4-(6-(ciclopentilamino)-3-metil-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-ilsulfinil)tiofen-3-il)acetamida	
9-25	5-(6-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)-N-metil-1H-pirrol-3-carboxamida	

ES 2 608 670 T3

ID #	Nombre de Compuesto	
9-26	3-(benciloxi)-5-(3-metoxi-1H-pirrol-2-iltio)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirazina	
9-27	1-etil-5-(6-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)-N-metil-1H-pirrol-3-carboxamida	
9-28	1-(6-(5-(hidroximetil)-1H-pirrol-2-iltio)-3-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-il)urea	
9-29	5-(6-metoxi-3-metil-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)-N-metilfuran-3-carboxamida	
9-30	2-amino-N-(2-(6-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)furan-3-il)acetamida	
9-31	1-(5-(6-(ciclopropilamino)-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)furan-2-il)etanona	
9-32	2-amino-N-(2-(6-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)tiofen-3-il)propanamida	
9-33	5-(6-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)-N-metil-4-(trifluorometoxi)tiofeno-3-carboxamida	
9-34	3-(6-metoxi-5-(piridin-3-il)pirazin-2-ilsulfinil)-5-metilisoxazol	
9-35	1-(3-(6-amino-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)isoxazol-4-il)etanona	
9-36	3-(6-metil-5-(piperidin-1-il)pirazin-2-iltio)isotiazol	
9-37	4-(3-(benciloxi)-5-(5-(furan-2-il)isotiazol-3-iltio)pirazin-2-il)morfolina	
9-38	5-(6-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)-N-metil-1H-pirazol-3-carboxamida	
9-39	3-(benciloxi)-5-(4-metoxi-1H-pirazol-5-iltio)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirazina	
9-40	1-etil-5-(6-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)-N-metil-1H-pirazol-3-carboxamida	
9-41	2-(3-(6-etil-3-metil-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)-1-metil-1H-pirazol-4-ilo)etanamina	
9-42	5-(6-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)-N-metilisoxazol-3-carboxamida	
9-43	2-amino-N-(5-(6-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)isoxazol-4-il)acetamida	
9-44	N-ciclopropil-6-(isoxazol-5-iltio)-3-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-amina	
9-45	2-amino-N-(5-(6-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)isotiazol-4-il)propanamida	
9-46	5-(6-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)pirazin-2-iltio)-N-metil-4-(trifluorometoxi)isotiazol-3-carboxamida	

Otra modalidad se refiere a compuestos que tienen la fórmula:



Fórmula 5b

sus estereoisómeros, tautómeros, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde,

5 X_{10} y X_{11} se seleccionan independientemente de CH, CH_2 , NH, NR' , O, y S tal que se mantiene la aromaticidad, en donde R' es una cadena de alquilo o alquilo sustituido;

Y es S, SO, SO_2 , CH_2 , CHR, CRR, CO, O, NH, o NR, en donde R es una cadena de alquilo o alcoxilo inferior;

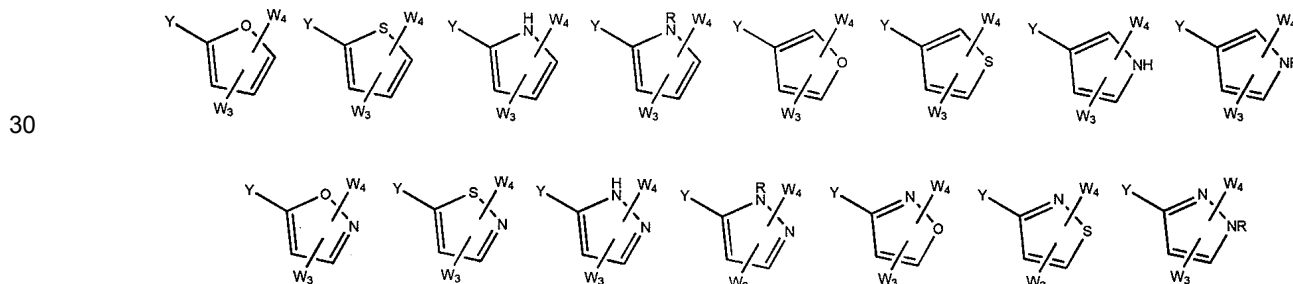
10 Z se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, - $NHSO_2$ alquenilo, - $NHCO$ alquenilo, - $NHCO$ alquinilo, - CO alquenilo, - CO alquinilo, trihalocarbono, tioalquilo, SO_2 -alquilo, - COO -alquilo, - CO alquilo, y alquil-CN;

15 W_1 y W_2 independientemente en cada ocurrencia se pueden seleccionar del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, - $NHSO_2$ alquenilo, - $NHCO$ alquenilo, - $NHCO$ alquinilo, - CO alquenilo, - CO alquinilo, trihalocarbono, tioalquilo, SO_2 -alquilo, - COO -alquilo, - CO alquilo, y alquil-CN; o W_1 y W_2 se pueden unir conjuntamente mediante un ligador, para formar un anillo fusionado de 5 o 6 miembros; y

20 W_3 y W_4 independientemente en cada ocurrencia se pueden seleccionar del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, - $NHSO_2$ alquenilo, - $NHCO$ alquenilo, - $NHCO$ alquinilo, - CO alquenilo, - CO alquinilo, trihalocarbono, tioalquilo, SO_2 -alquilo, - COO -alquilo, - CO alquilo, y alquil-CN; o W_3 y W_4 se pueden unir conjuntamente mediante un ligador, para formar un anillo fusionado de 5 o 6 miembros.

Adicionalmente, W_2 se puede unir al anillo de arilo del lado derecho directamente para formar un anillo de 5 miembros o mediante un ligador para formar un anillo de 6 o 7 miembros.

En modalidades preferidas de la fórmula (5b), X_{10} y X_{11} se seleccionan independientemente de, pero no se limitan a:



en donde R es una cadena de alquilo o alquilo sustituido.

En modalidades preferidas de la fórmula (5b), Y es S, SO, SO_2 , O o CH_2 .

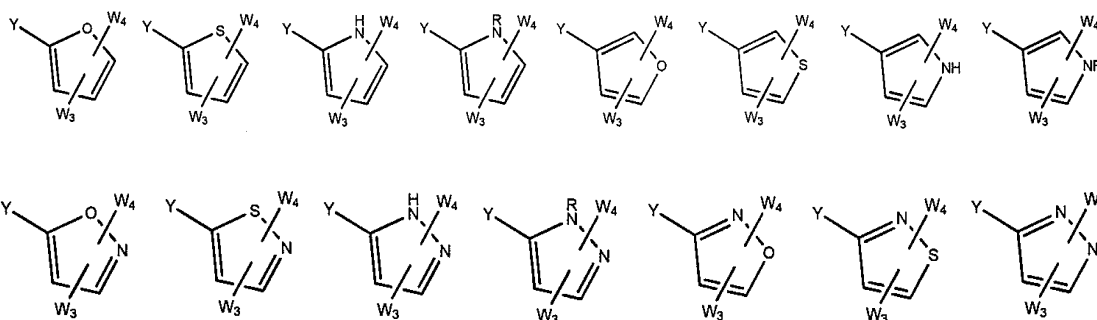
En modalidades preferidas de la fórmula (5b), Z es alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado

o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alquenioloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

5 En modalidades preferidas de la fórmula (5b), W_1 y W_2 en cada ocurrencia se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alquenioloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

10 En modalidades preferidas de la fórmula (5b) W_3 y W_4 en cada ocurrencia se selecciona independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alquenioloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (5b), X_{10} y X_{11} se seleccionan independientemente de;



15 en donde R es una cadena de alquilo o alquilo sustituido.

En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (5b), Y es S, SO, o SO₂.

En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (5b), Z es hidrógeno, alquilo, alqueniolo, alquiniolo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, o diarilamino.

20 En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (5b), W_1 y W_2 son independientemente hidrógeno, alquilo, alqueniolo, alquiniolo, arilo, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, o diarilamino.

25 En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (5b), W_3 y W_4 son independientemente hidrógeno, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alquenioloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alqueniolo, -NHCOalqueniolo, -NHCOalquiniolo, -COalqueniolo, -COalquiniolo, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN.

La Tabla 10 muestra ejemplos de compuestos específicos que ejemplifican esta modalidad.

Tabla 10

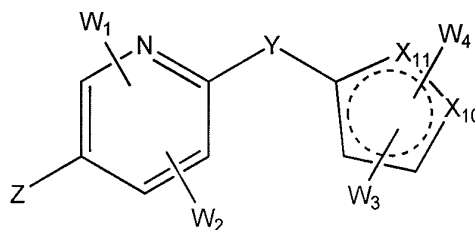
ID #	Nombre de Compuesto
10-01	4-(5-(4-(dimetilamino)fenil)-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)-1H-pirrol-3-ol
10-02	3-(2-(4-hidroxiciclohexilamino)-5-(2-fenil-1H-pirrol-3-ilsulfonil)piridin-3-il)bencimidamida
10-03	(E)-4-(6-(etilamino)-5-(prop-1-enil)piridin-3-iltio)-1H-pirrol-3-ol
10-04	4-(6-metoxipiridin-3-iltio)-1H-pirrol-3-ol

ES 2 608 670 T3

ID #	Nombre de Compuesto
10-05	2-metoxi-5-(5-metoxi-4-metil-1H-pirrol-3-iltio)-6-metilpiridin-3-amina
10-06	4-(3-metoxi-5-(2-(metiltio)-1H-pirrol-3-ilsulfonil)piridin-2-ilamino)ciclohexanol
10-07	5-(1-metil-1H-pirrol-3-iltio)-3-fenil-2-(piperidin-1-il)piridina
10-08	1-metil-4-(3-fenil-2,4'-bipiridin-5-iltio)-1H-pirrol-3-amina
10-09	4-(5-etinil-6-vinilpiridin-3-iltio)-N,N,1-trimetil-1H-pirrol-3-amina
10-10	2-metil-3-(1-metil-4-nitro-1H-pirrol-3-iltio)-6-fenoxipiridina
10-11	N-(4-(6-etoxi-5-(3-sulfamoilfenil)piridin-3-iltio)-1-etil-1H-pirrol-3-il)acetamida
10-12	3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-5-(1-metil-4-(metilsulfonil)-1H-pirrol-3-iltio)-2,4'-bipiridina
10-13	1-(2-(dietilamino)-5-(5-metilfuran-3-iltio)piridin-3-il)etanona
10-14	Podría no generarse un nombre para esta estructura
10-15	2-etinil-5-(5-(pirrolidin-1-il)furan-3-iltio)piridin-3-amina
10-16	5-(5-metilfuran-3-iltio)-N-fenil-3-(tiofen-3-il)piridin-2-amina
10-17	isopropil 4-(5-acetil-6-(1H-pirrol-1-il)piridin-3-iltio)furan-2-ilcarbamato
10-18	metil 4-(3-(1H-pirazol-3-il)-2,3'-bipiridin-5-iltio)furan-2-carboxilato
10-19	1-(3-(5-(5-clorotiofen-3-iltio)-2-(5,6-dihidropiridin-1(2H)-il)piridin-3-il)fenil)etanona
10-20	N-(4-(5-(2-(dimetilamino)etoxi)-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-ilsulfonil)tiofen-3-il)acetamida
10-21	1-(3-(5-(5-bromotiofen-3-iltio)-2-(5,6-dihidropiridin-1(2H)-il)piridin-3-il)fenil)etanona
10-22	2-(5,6-dihidropiridin-1(2H)-il)-5-(5-etoxitiofen-3-iltio)-3-(furan-2-il)piridina
10-23	4-(5-(ciclopentiloxi)-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)tiofen-3-sulfonamida
10-24	N-(4(5-(ciclopentilamino)-2-metil-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-ilsulfonil)tiofen-3-il)acetamida
10-25	5-(5-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)-N-metil-1H-pirrol-3-carboxamida
10-26	1-(3-(benciloxi)-5-(3-metoxi-1H-pirrol-2-iltio)piridin-2-il)-4-metilpiperazina
10-27	1-etil-5-(5-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)-N-metil-1H-pirrol-3-carboxamida
10-28	1-(5-(5-(hidroximetil)-1H-pirrol-2-iltio)-2-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-il)urea
10-29	5-(5-metoxi-2-metil-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)-N-metilfuran-3-carboxamida
10-30	2-amino-N-(2-(5-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)furan-3-il)acetamida
10-31	1-(5-(5-(ciclopropilamino)-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)furan-2-il)etanona

ID #	Nombre de Compuesto
10-32	2-amino-N-(2-(5-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)tiofen-3-il)propanamida
10-33	5-(5-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)-N-metil-4-(trifluorometoxi)tiofen-3-carboxamida
10-34	4-(3-(benciloxi)-5-(5-(furan-2-il)isotiazol-3-iltio)piridin-2-il)morfolina
10-35	5-(5-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)-N-metil-1H-pirazol-3-carboxamida
10-36	1-(3-(benciloxi)-5-(4-metoxi-1H-pirazol-5-iltio)piridin-2-il)-4-metilpiperazina
10-37	1-etil-5-(5-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)-N-metil-1H-pirazol-3-carboxamida
10-38	2-(3-(5-etil-2-metil-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)-1-metil-1H-pirazol-4-iloxi)etanamina
10-39	5-(5-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)-N-metilisoxazol-3-carboxamida
10-40	2-amino-N-(5-(5-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)isoxazol-4-il)acetamida
10-41	N-ciclopropil-5-(isoxazol-5-iltio)-2-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-amina
10-42	2-amino-N-(5-(5-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)isotiazol-4-il)propanamida
10-43	2-amino-N-(5-(5-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)isoxazol-4-il)acetamida
10-44	N-ciclopropil-5-(isoxazol-5-iltio)-2-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-amina
10-45	2-amino-N-(5-(5-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)isotiazol-4-il)propanamida
10-46	5-(5-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-iltio)-N-metil-4-(trifluorometoxi)isotiazol-3-carboxamida

Otra modalidad se refiere a compuestos que tienen la fórmula:



Fórmula 6b

5 sus estereoisómeros, tautómeros, y sales farmacéuticamente aceptable de los mismos, en donde,

X_{10} y X_{11} se seleccionan independientemente de CH, CH₂, NH, NR', O, y S tal que se mantiene la aromaticidad, en donde R' es una cadena de alquilo o alquilo sustituido;

Y es S, SO, SO₂, CH₂, CHR, CRR, CO, O, NH, o NR, en donde R es una cadena de alcoxi o alquilo inferior;

10 Z se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alquenilo, -

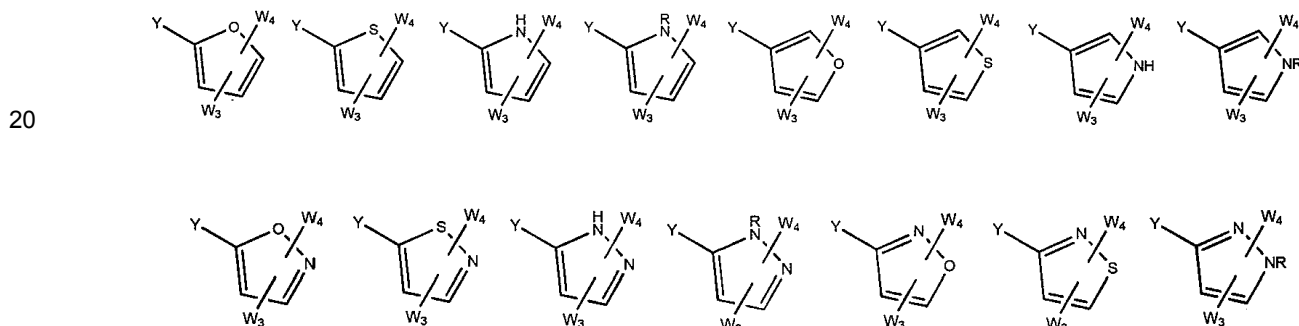
NHCOalquenilo, -NHCOalquinilo, -COalquenilo, -COalquinilo, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN;

5 W₁ y W₂ independientemente en cada ocurrencia se pueden seleccionar del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alquenilo, -NHCOalquenilo, -NHCOalquinilo, -COalquenilo, -COalquinilo, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN; o W₁ y W₂ se pueden unir conjuntamente mediante un ligador, para formar un anillo fusionado de 5 o 6 miembros; y

10 W₃ y W₄ independientemente en cada ocurrencia se pueden seleccionar del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alquenilo, -NHCOalquenilo, -NHCOalquinilo, -COalquenilo, -COalquinilo, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN; o W₃ y W₄ se pueden unir conjuntamente mediante un ligador, para formar un anillo fusionado de 5 o 6 miembros.

Adicionalmente, W₂ se puede unir al anillo de arilo del lado derecho directamente para formar un anillo de 5 miembros o mediante un ligador para formar un anillo de 6 o 7 miembros.

En modalidades preferidas de la fórmula (6b), X₁₀ y X₁₁ se seleccionan independientemente de, pero no se limitan a:



en donde R es una cadena de alquilo o alquilo sustituido.

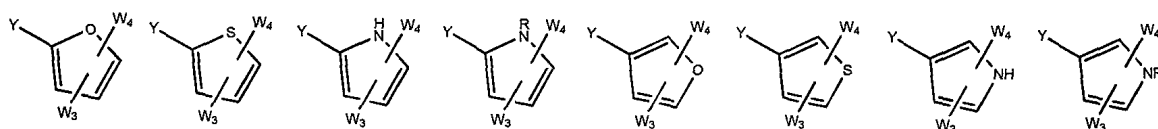
En modalidades preferidas de la fórmula (6b) Y es S, SO, SO₂, O o CH₂.

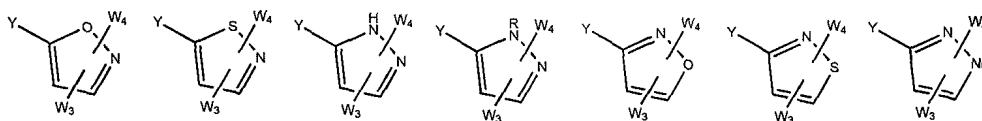
25 En modalidades preferidas de la fórmula (6b) Z es alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

30 En modalidades preferidas de la fórmula (6b) W₁ y W₂ en cada ocurrencia se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

35 En modalidades preferidas de la fórmula (6b) W₃ y W₄ en cada ocurrencia se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (6b), X₁₀ y X₁₁ se seleccionan independientemente de;





en donde R es una cadena de alquilo o alquilo sustituido.

En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (6b), Y es S, SO, o SO₂.

- 5 En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (6b), Z es hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, o diarilamino.

En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (6b), W₁ y W₂ son independientemente hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, o diarilamino.

- 10 En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (6b), W₃ y W₄ son independientemente hidrógeno, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, arilo, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueno, alquino, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alqueno, -NHCOalqueno, -NHCOalquino, -COalqueno, -COalquino, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN.

La Tabla 11 muestra ejemplos de compuestos específicos que ejemplifican esta modalidad.

- 15 Tabla 11

ID #	Nombre de Compuesto
11-01	4-(4-(4-(dimetilamino)fenil)-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)-1H-pirrol-3-ol
11-02	3-(5-(4-hidroxiciclohexilamino)-2-(2-fenil-1H-pirrol-3-ilsulfonil)piridin-4-il)bencimidamida
11-03	(E)-4-(5-(etilamino)-4-(prop-1-enil)piridin-2-iltio)-1H-pirrol-3-ol
11-04	4-(5-metoxipiridin-2-iltio)-1H-pirrol-3-ol
11-05	3-metoxi-6-(5-metoxi-4-metil-1H-pirrol-3-iltio)-2-metilpiridin-4-amina
11-06	4-(4-metoxi-6-(2-(metiltio)-1H-pirrol-3-ilsulfonil)piridin-3-ilamino)ciclohexanol
11-07	2-(1-metil-1H-pirrol-3-iltio)-4-fenil-5-(piperidin-1-il)piridina
11-08	1-metil-4-(4-fenil-3,4'-piperidin-6-iltio)-1H-pirrol-3-amina
11-09	4-(4-etinil-5-vinilpiridin-2-iltio)-N,N,1-trimetil-1H-pirrol-3-amina
11-10	6-(1-metil-4-nitro-1H-pirrol-3-iltio)-3-fenoxi-2-fenilpiridina
11-11	N-(4-(5-etoxi-6-(3-sulfamoilfenil)piridin-2-iltio)-1-etil-1H-pirrol-3-il)acetamida
11-12	4-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-6-(1-metil-4-(metilsulfonil)-1H-pirrol-3-iltio)-3,4'-piperidina
11-13	1-(5-(dietilamino)-2-(5-metilfuran-3-iltio)piridin-4-il)etanona

ES 2 608 670 T3

ID #	Nombre de Compuesto
11-14	4-(3,3'-bipiridin-6-iltio)-N-etilfuran-3-amina
11-15	5-etinil-2-(5-(pirrolidin-1-il)furan-3-iltio) piridin-4-amina
11-16	6-(5-metilfuran-3-iltio)-N-fenil-4-(tiofen-3-il) piridin-3-amina
11-17	isopropil 4-(4-acetil-5-(1H-pirrol-1-il)piridin-2-iltio)furan-2-ilcarbamato
11-18	metil 4-(4-(1H-pirazol-3-il)-3,3'-bipiridin-6-iltio)furan-2-carboxilato
11-19	1-(3-(2-(5-clorotiofen-3-iltio)-5-(5,6-dihidropiridin-1(2H)-il)piridin-4-il)fenil)etanona
11-20	N-(4-(4-(2-(dimetilamino)etoxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-ilsulfinil)tiofen-3-il)acetamida
11-21	1-(3-(2-(5-bromotiofen-3-iltio)-5-(5,6-dihidropiridin-1(2H)-il)piridin-4-il)fenil)etanona
11-22	5-(5,6-dihidropiridin-1(2H)-il)-2-(5-etoxitiofen-3-iltio)-4-(furan-2-il)piridina
11-23	4-(4-(ciclopentiloxi)-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)tiofen-3-sulfonamida
11-24	N-(4-(4-(ciclopentilamino)-6-metil-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-ilsulfinil)tiofen-3-il)acetamida
11-25	5-(4-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)-N-metil-1H-pirrol-3-carboxamida
11-26	1-(4-(benciloxi)-6-(3-metoxi-1H-pirrol-2-iltio)piridin-3-il)-4-metilpiperazina
11-27	1-etil-5-(4-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)-N-metil-1H-pirrol-3-carboxamida
11-28	1-(2-(5-(hidroximetil)-1H-pirrol-2-iltio)-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-4-il)urea
11-29	5-(4-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)-N-metilfuran-3-carboxamida
11-30	2-amino-N-(2-(4-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)furan-3-il)acetamida
11-31	1-(5-(4-(ciclopropilamino)-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)furan-2-il)etanona
11-32	2-amino-N-(2-(4-metoxi-6-metil-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)tiofen-3-il)propanamida
11-33	5-(4-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)-N-metil-4-(trifluorometoxi)tiofen-3-carboxamida
11-34	3-(4-metoxi-3,3'-bipiridin-6-ilsulfinil)-5-metilisoxazol
11-35	1-(3-(4-amino-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)isoxazol-4-il)etanona
11-36	3-(4,6-dimetil-5-(piperidin-1-il)piridin-2-iltio)isotiazol
11-37	4-(4-(benciloxi)-6-(5-(furan-2-il)isotiazol-3-iltio)piridin-3-il)morfolina
11-38	5-(4-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)-N-metil-1H-pirazol-3-carboxamida

ID #	Nombre de Compuesto
11-39	1-(4-(benciloxi)-6-(4-metoxi-1H-pirazol-5-iltio)piridin-3-il)-4-metilpiperazina
11-40	1-etil-5-(4-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)-N-metil-1H-pirazol-3-carboxamida
11-41	2-(3-(4-etil-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)-1-metil-1H-pirazol-4-iloxi)etanamina
11-42	5-(4-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)-N-metilisoxazol-3-carboxamida
11-43	2-amino-N-(5-(4-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)isoxazol-4-il)acetamida
11-44	N-ciclopropil-2-(isoxazol-5-iltio)-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-4-amina
11-45	2-amino-N-(5-(4-metoxi-6-metil-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)isotiazol-4-il)propanamida
11-46	5-(4-metoxi-5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-iltio)-N-metil-4-(trifluorometoxi)isotiazol-3-carboxamida

Otra modalidad se refiere a compuestos que tienen la fórmula:

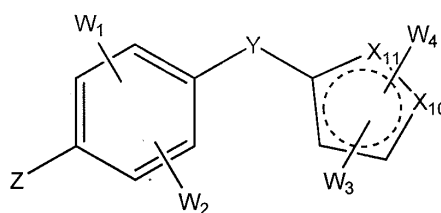


Figura 7b

5 sus estereoisómeros, tautómeros, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde,

X₁₀ y X₁₁ se seleccionan independientemente de CH, CH₂, NH, NR', O, y S tal que se mantiene la aromaticidad, en donde R' es una cadena de alquilo o alquilo sustituido;

Y es S, SO, SO₂, CH₂, CHR, CRR, CO, O, NH, o NR, en donde R es una cadena de alcoxilo o alquilo inferior;

10 Z se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alquenilo, -NHCOalquenilo, -NHCOalquinilo, -COalquenilo, -COalquinilo, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN;

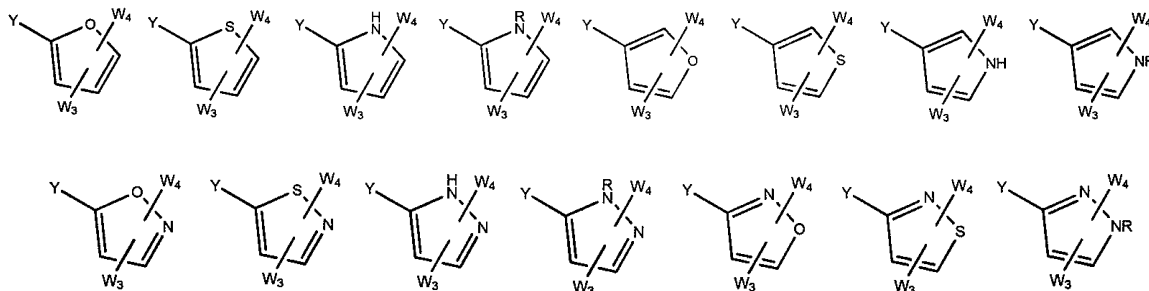
15 W₁ y W₂ independientemente en cada ocurrencia se pueden seleccionar del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alquenilo, -NHCOalquenilo, -NHCOalquinilo, -COalquenilo, -COalquinilo, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN; o W₁ y W₂ se pueden unir conjuntamente mediante un ligador, para formar un anillo fusionado de 5 o 6 miembros; y

25 W₃ y W₄ independientemente en cada ocurrencia se pueden seleccionar del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, alquilsulfonamido, sulfonamido, -NHSO₂alquenilo, -NHCOalquenilo, -NHCOalquinilo, -COalquenilo, -COalquinilo, trihalocarbono, tioalquilo, SO₂-alquilo, -

COO-alquilo, -COalquilo, y alquil-CN; o W_3 y W_4 se pueden unir conjuntamente mediante un ligador, para formar un anillo fusionado de 5 o 6 miembros.

Adicionalmente, W_2 se puede unir al anillo de arilo del lado derecho directamente para formar un anillo de 5 miembros o mediante un ligador para formar un anillo de 6 o 7 miembros.

5 En modalidades preferidas de la fórmula (7b), X_{10} y X_{11} se seleccionan independientemente de pero no se limitan a:



en donde R es una cadena de alquilo o alquilo sustituido.

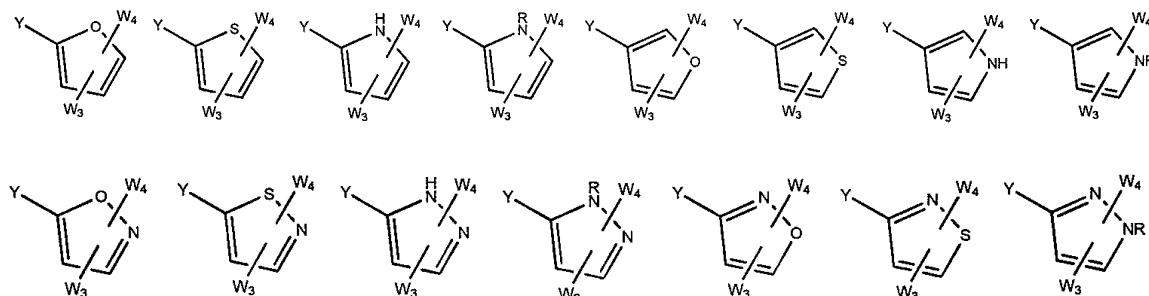
En modalidades preferidas de la fórmula (7b) Y es S, SO, SO_2 , O o CH_2 .

10 En modalidades preferidas de la fórmula (7b) Z es alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

15 En modalidades preferidas de la fórmula (7b) W_1 y W_2 en cada ocurrencia se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

20 En modalidades preferidas de la fórmula (7b) W_3 y W_4 en cada ocurrencia se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, ariloxi, alcoxi, alcoxi halogenado, alqueniloxi, hidroxialquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, diarilamino, acilamino, carbamilo, amido sustituido e insustituido, alquilamido, y dialquilamido.

En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (7b), X_{10} y X_{11} se seleccionan independientemente de;



25 en donde R es una cadena de alquilo o alquilo sustituido.

En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (7b), Y es S, SO, o SO_2 .

En modalidades preferidas, particulares de la fórmula (7b), Z es hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, cicloalquilo saturado o insaturado, heterociclo saturado o insaturado, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, o diarilamino.

30 inhibición de la progresión del ciclo celular anormal, degradación e inhibición de varias onco-proteínas, inducción de apoptosis, reducción en el potencial invasivo de células cancerosas a dosis que no son tóxicas para células normales, o

combinaciones de los mismos.

5 El bolsillo, referido en el presente documento como un sitio alostérico 1, está a continuación del bolsillo de unión de ATP/ADP, y comprende un sub-bolsillo hidrófilo revestido por, pero no se limita a los aminoácidos polares Thr13, Thr14, Tyr15, Lys56, Lys271, Arg269, Glu268, Arg264 y Thr265. Hay un resto de cisteína (Cys267) incorporado en este sub-bolsillo que podría unirse covalentemente a un ligando que contiene la funcionalidad reactiva en Cys apropiada, tal como, pero no se limita a acrilamida, vinilsulfonamida, propiolamida o α -halocarbonilo. Adyacente al sub-bolsillo hidrófilo hay un gran sub-bolsillo que comprende tanto restos de aminoácidos no polares como polares, tales como, pero no se limitan a Leu237, Val238, Val260, Arg261, Val59, Pro63, Thr66, Asn235, Asp234, Glu231, Asp69, Phe68 Arg 72 y Tyr41, que proporcionan interacciones hidrófobas y electrostáticas (π - π) con el ligando. Proporcionando interacciones con el ligando están aminoácidos tales como, pero no se limitan a, Lys88, His89, Trp90, Pro91 y Phe92.

Debido a que no estaba disponible estructura cristalina de longitud completa de Hsp70 humana, se creó un modelo de homología de Hsp70 humana de longitud completa. Mientras que en las estructuras cristalinas disponibles Cys267 no está expuesta, en el modelo de homología de Hsp70 de longitud completa el bolsillo que contiene Cys267 llega a estar expuesto. La interacción identificada de YK5 es con el modelo de homología de longitud completa de Hsp70 humana.

15 En una realización, los compuestos de la presente invención son para su uso en el tratamiento o prevención de un tumor o trastorno proliferativo en un animal, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos de la presente invención a un animal en necesidad de los mismos; poner en contacto los compuestos de la presente invención con un dominio de unión alostérico localizado fuera del sitio de unión de nucleótidos de Hsp70 y Hsc70; inhibir simultáneamente tanto Hsp70 como Hsc70; inducir la apoptosis en células tumorales o células con un trastorno proliferativo; y no inducir elevada apoptosis en células normales, estroma o vasos sanguíneos.

25 En otra realización más, el dominio de unión alostérico se localiza en SEQ ID NO:1 y dicho dominio se define por uno o más restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Thr13, Thr14, Tyr15, Lys56, Lys271, Arg269, Glu268, Arg264, Thr265, Cys267, Leu237, Val238, Val260, Arg261, Val59, Pro63, Thr66, Asn235, Asp234, Glu231, Asp69, Phe68, Tyr41, Lys88, His89, Trp90, Pro91, Phe92, y combinaciones de los mismos. En otra realización, el dominio de unión alostérico es 1 definido por tres o más restos de aminoácidos citados anteriormente. En otra realización, el dominio de unión alostérico es 1 definido por cuatro o más

ES 2 608 670 T3

ID #	Nombre de Compuesto
12-15	2-etinil-5-(5-(pirrolidin-1-il)furan-3-iltio)anilina
12-16	4-(5-metilfuran-3-iltio)-N-fenil-2-(tiofen-3-il)anilina
12-17	isopropil 4-(3-acetil-4-(1H-pirrol-1-il)feniltio)furan-2-ilcarbamato
12-18	metil 4-(3-(1H-pirazol-3-il)-4-(piridin-3-il)feniltio)furan-2-carboxilato
12-19	1-(5-(5-clorotiofen-3-iltio)-2'-(5,6-dihidropiridin-1(2H)-il)bifenil-3-il)etanona
12-20	N-(4-(3-(2-(dimetilamino)etoxi)-4-(4-metilpiperazin-1-il)fenilsulfinil)tiofen-3-il)acetamida
12-21	1-(5-(5-bromotiofen-3-iltio)-2'-(5,6-dihidropiridin-1(2H)-il)bifenil-3-il)etanona
12-22	1-(4-(5-etoxitiofen-3-iltio)-2-(furan-2-il)fenil)-1,2,3,6-tetrahidropiridina
12-23	4-(3-(ciclopentiloxi)-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)tiofen-3-sulfonamida
12-24	N-(4-(3-(ciclopentilamino)-5-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)fenilsulfinil)tiofen-3-il)acetamida
12-25	5-(3-metoxi-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)-N-metil-1H-pirrol-3-carboxamida
12-26	1-(2-(benciloxi)-4-(3-metoxi-1H-pirrol-2-iltio)fenil)-4-metilpiperazina
12-27	1-etil-5-(3-metoxi-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)-N-metil-1H-pirrol-3-carboxamida
12-28	1-(5-(5-(hidroximetil)-1H-pirrol-2-iltio)-2-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)urea
12-29	5-(5-metoxi-2-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)-N-metilfuran-3-carboxamida
12-30	2-amino-N-(2-(3-metoxi-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)furan-3-il)acetamida
12-31	1-(5-(3-(ciclopropilamino)-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)furan-2-il)etanona
12-32	2-amino-N-(2-(3-metoxi-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)tiofen-3-il)propanamida
12-33	5-(3-metoxi-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)-N-metil-4-(trifluorometoxi)tiofen-3-carboxamida
12-34	3-(3-metoxi-4-(piridin-3-il)fenilsulfinil)-5-metilisoxazol
12-35	1-(3-(3-amino-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)isoxazol-4-il)etanona
12-36	3-(3-metil-4-(piperidin-1-il)feniltio)isotiazol
12-37	4-(2-(benciloxi)-4-(5-(furan-2-il)isotiazol-3-iltio)fenil)morfolina
12-38	5-(3-metoxi-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)-N-metil-1H-pirazol-3-carboxamida
12-39	1-(2-(benciloxi)-4-(4-metoxi-1H-pirazol-5-iltio)fenil)-4-metilpiperazina
12-40	1-etil-5-(3-metoxi-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)-N-metil-1H-pirazol-3-carboxamida
12-41	2-(3-(5-etil-2-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)feniltio)-1-metil-1H-pirazol-4-iloxi)etanamina

ID #	Nombre de Compuesto
12-42	5-(3-metoxi-4-(4-metilpiperazin-1-il)fenilitio)-N-metilisoxazol-3-carboxamida
12-43	2-amino-N-(5-(3-metoxi-4-(4-metilpiperazin-1-il)fenilitio)isoxazol-4-il)acetamida
12-44	N-ciclopropil-5-(isoxazol-5-iltio)-2-(4-metilpiperazin-1-il)anilina
12-45	2-amino-N-(5-(3-metoxi-4-(4-metilpiperazin-1-il)fenilitio)isotiazol-4-il)propanamida
12-46	5-(3-metoxi-4-(4-metilpiperazin-1-il)fenilitio)-N-metil-4-(trifluorometoxi)isotiazol-3-carboxamida

En una modalidad, el compuesto de la presente materia es un compuesto seleccionado del grupo que consiste de los compuestos de la Tabla 1, compuestos de la Tabla 2, compuestos de la Tabla 3, compuestos de la Tabla 4, compuestos de la Tabla 5, compuestos de la Tabla 6, compuestos de la Tabla 7, compuestos de la Tabla 8, compuestos de la Tabla 9, compuestos de la Tabla 10, compuestos de la Tabla 11, y compuestos de la Tabla 12.

Se describe en la presente un método para producir un compuesto, un intermedio del mismo, que comprende realizar al menos uno de los pasos de síntesis descritos en los ejemplos de la presente.

Descripción de un sitio alostérico no explorado (Sitio 1) de Hsp70 cuya ocupación confiere actividad anticáncer.

De acuerdo con otra modalidad, una cavidad en la proteína Hsp70 que no tiene ligando conocido que se presente de forma natural o que se cree de manera sintética, cuando se ocupa por los compuestos de la presente materia como se describe en la presente, da por resultado la inhibición del crecimiento celular maligno, la inhibición del progreso del ciclo celular anormal, la degradación e inhibición de una o más onco-proteínas, inducción de apoptosis, reducción en el potencial invasivo de células de cáncer a dosis que no son tóxicas a células normales o combinaciones de esto. De acuerdo con otra modalidad, la ocupación de esta cavidad previamente no explorada por otros ligandos de molécula pequeña conducirá a todos o un subconjunto de los siguientes efectos, pero no limitados a: inhibición de crecimiento de células malignas, inhibición del progreso del ciclo celular anormal, degradación e inhibición de varias onco-proteínas, inducción de apoptosis, reducción en el potencial invasivo de células de cáncer a dosis que no son tóxicas a células normales, o combinaciones de esto.

La cavidad, referida en la presente como Sitio alostérico 1, está próxima a la cavidad de unión de ATP/ADP, y está comprendida de una sub-cavidad hidrófila revestida por pero no limitada a aminoácidos polares Thr13, Thr14, Tyr15, Lys56, Lys271, Arg269, Glu268, Arg264 y Thr265. Hay un residuo de cisteína (Cys267) incrustado en esta sub-cavidad que puede enlazarse covalentemente a un ligando que contiene la funcionalidad reactiva Cys apropiada, tal como pero no se limitan a acrilamida, vinil-sulfonamida, propiolamida o α -halocarbonilo. Adyacente a la sub-cavidad hidrófila hay una sub-cavidad grande comprendida de residuos de aminoácidos tanto polares como no polares, tal como, pero no se limitan a Leu237, Val238, Val260, Arg261, Val59, Pro63, Thr66, Asn235, Asp234, Glu231, Asp69, Phe68 Arg72 y Tyr41, que proporcionan interacciones hidrófobas y electrostáticas (π - π) con el ligando. Proporcionando interacciones con el ligando están los aminoácidos tal como, pero no limitados a Lys88, His89, Trp90, Pro91 y Phe92.

Debido a que no está disponible la estructura cristalina de longitud completa de Hsp70 humana, se creó un modelo de homología de Hsp70 humana de longitud completa. En tanto que en las estructuras cristalinas disponibles no se expone Cys267, en el modelo de homología de la Hsp70 de longitud completa se llevó a exponer la cavidad que contiene Cys267. La interacción identificada de YK5 es con el modelo de homología de longitud completa de Hsp70 humana.

En una modalidad, los compuestos de la presente invención se usan para tratar o prevenir un trastorno proliferativo o tumoral en un animal, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de Hsp70 a un animal en necesidad de esto; poner en contacto el inhibidor de Hsp70 con un dominio alostérico de unión localizado fuera del sitio de unión a nucleótidos de Hsp70 y Hsc70; inhibir simultáneamente tanto Hsp70 como Hsc70; inducir apoptosis en células tumorales o células con un trastorno proliferativo; y no inducir la apoptosis incrementada en células, estroma o vasos sanguíneos normales. En una modalidad adicional, el inhibidor de Hsp70 es un compuesto seleccionado de la fórmula (I) o (I').

En aún una modalidad adicional, el dominio alostérico de unión se localiza en SEQ ID NO:1 y este dominio se define por uno o más residuos de aminoácido seleccionados del grupo que consiste de Thr13, Thr14, Tyr15, Lys56, Lys271, Arg269, Glu268, Arg264, Thr265, Cys267, Leu237, Val238, Val260, Arg261, Val59, Pro63, Thr66, Asn235, Asp234,

5 Glu231, Asp69, Phe68, Tyr41, Lys88, His89, Trp90, Pro91, Phe92, y combinaciones de estos. En otra modalidad, el dominio alostérico de unión es uno definido por tres o más residuos de aminoácido citados anteriormente. En otra modalidad, el dominio alostérico de unión es uno definido por cuatro o más residuos de aminoácido citados anteriormente. En otra modalidad, el dominio alostérico de unión es uno definido por cinco o más residuos de aminoácido citados anteriormente. En otra modalidad, el dominio alostérico de unión es uno definido por 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más residuos de aminoácidos citados anteriormente. En algunas modalidades, un compuesto de la presente materia se une a este dominio alostérico de unión y provoca la inhibición de Hsp70, Hsc70, o ambas, simultáneamente.

10 En otra modalidad, el dominio alostérico de unión se localiza en SEQ ID NO:1 y este dominio se define por uno o más residuos de aminoácido seleccionados del grupo que consiste de Cys267, Leu237, Arg264, Asp234, Arg261, Tyr41, Phe68, Trp90, His89, y combinaciones de estos. En aún otra modalidad, el dominio alostérico de unión se localiza en SEQ ID NO:1 y este dominio se define por uno o más residuos de aminoácido seleccionados del grupo que consiste de Cys267, Arg264, Arg261, Phe68, His89, y combinaciones de estos.

15 Otra modalidad se refiere a un método para activar Hsp70, en donde la Hsp70 comprende una cavidad de unión en SEQ ID NO:1 que tiene un Sitio 1 localizado en una región hendida fuera del dominio de unión de ATP/ADP, y flanqueada por las subregiones Ib y IIb, y que comprende poner en contacto el Sitio 1 de la cavidad de unión con un ligando que se une a la cavidad de unión para activar la actividad de Hsp70. Modalidades adicionales comprenden un método para activar Hsp70 de acuerdo a la reivindicación 27, en donde el Sitio 1 tiene una primera cavidad hidrófila grande que comprende los aminoácidos polares Tyr15, Lys56, Lys271, Arg269, Glu268, Arg264 y Thr265; un residuo de cisteína (Cys267) incrustado en esta cavidad; y adyacente a esta cavidad hay una segunda cavidad más grande en Hsp70 que comprende residuos de aminoácido tanto no polares como polares tal como Leu237, Val238, Val260, Arg261, Val59, Pro63, Thr66, Asn235, Asp234, Glu231, Asp69, Phe68 y Tyr41, que pueden formar interacciones hidrófobas y electrostáticas (π - π).

25 En una modalidad adicional, se proporciona una estructura tridimensional del sitio 1 de unión de Hsp70 o una variante del mismo para examinar un modulador que modula la actividad de Hsp-70 o Hsc-70, en donde el sitio de unión comprende un dominio de unión a ligando en SEQ ID NO:1 definido por un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Thr13, Thr14, Tyr15, Lys56, Lys271, Arg269, Glu268, Arg264, Thr265, Cys267, Leu237, Val238, Val260, Arg261, Val59, Pro63, Thr66, Asn235, Asp234, Glu231, Asp69, Phe68, Tyr41, Lys88, His89, Trp90, Pro91, Phe92, y combinaciones de estos.

30 Una modalidad se refiere a un sistema asistido por computadora para producir una estructura tridimensional del sitio 1 de unión de Hsp70 o una variante del mismo de la reivindicación 1, en donde el sistema comprende: (a) un medio de almacenamiento de datos legibles por computadora que comprende un material de almacenamiento de datos codificado con datos legibles por computadora, en donde los datos comprenden al menos una porción de la secuencia peptídica SEQ ID NO: 1 y las secuencias mostradas en cuadros en la Figura 21 (b) una memoria de trabajo que tiene instrucciones almacenadas para procesar los datos legibles por computadora; (c) una unidad de procesamiento central acoplada al medio de almacenamiento de datos legibles por computadora y la memoria de trabajo para procesar los datos legibles por computadora en la estructura tridimensional; y (d) una pantalla acoplada a la unidad de procesamiento central para visualizar la estructura tridimensional. En una modalidad adicional, el sitio 1 de unión de Hsp70 o una variante del mismo en SEQ ID NO:1 se define por un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Thr13, Thr14, Tyr15, Lys56, Lys271, Arg269, Glu268, Arg264, Thr265, Cys267, Leu237, Val238, Val260, Arg261, Val59, Pro63, Thr66, Asn235, Asp234, Glu231, Asp69, Phe68, Tyr41, Lys88, His89, Trp90, Pro91, Phe92, y combinaciones de estos.

Composición Farmacéutica que Contiene un Compuesto de la Presente Materia

45 En una modalidad, la presente materia se refiere a composiciones que comprenden un compuesto como se describe en la presente. En otra modalidad, la presente materia se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto como se describe en la presente, y un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores útiles en la presente pueden incluir además uno o más agentes de relleno sólidos o líquidos compatibles, diluyentes, o materiales encapsulados que son adecuados para administración humana o animal.

50 Los portadores bio-compatibles, como se usa en la presente, son componentes que no provocan ninguna interacción que reduce sustancialmente la eficiencia de la composición farmacéutica en un ambiente ordinario de usuarios. Los posibles portadores farmacéuticos deben ser suficientemente de baja toxicidad para hacerlos adecuados para la administración al sujeto que se trata.

55 Se puede usar cualquier portador no tóxico, inerte y efectivo para formular las composiciones contempladas en la presente. Los portadores, excipientes y diluyentes farmacéuticamente aceptables, adecuados a este respecto son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica, tal como aquellos descritos en The Merck Index, Treceava Edición, Budavari et al., Eds., Merck & Co., Inc., Rahway, NJ. (2001); y the "Inactive Ingredient Guide", U.S. Food and Drug

Administration (FDA) Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Office of Management. Los ejemplos de portadores, excipientes y diluyentes farmacéuticamente aceptables, preferidos, útiles en las presentes composiciones incluyen agua destilada, solución salina fisiológica, solución de Ringer, solución de dextrosa, solución de Hank y DMSO.

- 5 Estos componentes inactivos adicionales así como formulaciones efectivas y procedimientos de administración, son bien conocidos en la técnica y se describen en libros de texto normales, tal como Goodman and Gillman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8.^a Ed., Gilman et al. Eds. Pergamon Press (1990) and Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1990). El portador puede comprender, en total, de aproximadamente 0.1 % a aproximadamente 99.99999 % en peso de las composiciones presentadas en la presente.

Aplicaciones Terapéuticas

- 10 En algunas modalidades, los compuestos de la fórmula (I) y fórmula (I') se han encontrado que poseen actividad anti-proliferativa y por lo tanto se cree que son de uso en el tratamiento de trastornos proliferativos tal como cánceres y otros trastornos asociados con proliferación celular descontrolada. Como se define en la presente, un efecto anti-proliferativo dentro del alcance de la presente materia se puede demostrar, por ejemplo, por la capacidad para inhibir cinasas específicas de la proliferación celular, *in vitro* o *in vivo*, o para inhibir la proliferación celular en un ensayo de células enteras *in vitro*, en un modelo animal *in vivo* o en administración clínica humana.

Administración

Las composiciones farmacéuticas de la presente materia se pueden adaptar para vías de administración oral, rectal, vaginal, parenteral, intramuscular, intraperitoneal, intraarterial, intratecal, intrabronquial, subcutánea, intradérmica, intravenosa, nasal, bucal o sublingual.

- 20 Para administración oral, se hace uso particular de tabletas comprimidas, píldoras, tabletas, cápsulas, gotas y cápsulas. De manera preferente, estas composiciones contienen de 1 a 250 mg y de manera más preferente de 10-100 mg, de principio activo por dosis.

- 25 Otras formas de administración comprenden soluciones o emulsiones que se pueden inyectar de manera intravenosa, intraarterialmente, de manera intratecal, subcutáneamente, de manera intradérmica, intraperitonealmente o de forma intramuscular, y que se preparan de soluciones estériles o esterilizables. Las composiciones farmacéuticas de la presente materia también pueden estar en la forma de supositorios, pesarios, suspensiones, emulsiones, lociones, ungüentos, cremas, geles, aspersiones, soluciones o polvos de espolvorear.

- 30 Un medio alternativo de administración transdérmica es por el uso de un parche cutáneo. Por ejemplo, el principio activo se puede incorporar en una crema que consiste de una emulsión acuosa de polietilenglicoles o parafina líquida. El principio activo también se puede incorporar, en una concentración de entre 1 y 10 % en peso, en un ungüento que consiste de una cera blanca o base de parafina blanda blanca conjuntamente con estabilizadores y conservadores como se pueda requerir.

Las formas inyectables pueden contener entre 10-1000 mg, de manera preferente entre 10-250 mg, de principio activo por dosis.

- 35 Las composiciones se pueden formular en formas de dosis unitarias, es decir, en la forma de porciones discretas que contienen una dosis unitaria, o múltiples o sub-unidades de una dosis unitaria.

Dosis

- 40 Los niveles apropiados de dosis en el orden de aproximadamente 0.001 mg a aproximadamente 5,000 mg por kilogramo de peso corporal del agente activo de compuesto pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades, trastornos, y condiciones contempladas en la presente. Típicamente, esta cantidad efectiva del agente activo comprenderá en general de aproximadamente 0.001 mg a aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal del paciente por día. Además, se entenderá que esta dosis de agente activo se puede administrar en unidades de dosis individuales o múltiples para proporcionar el efecto terapéutico deseado.

- 45 En una modalidad, la dosis preferida terapéuticamente efectiva será la cantidad de un compuesto de la presente materia requerida para obtener una concentración en suero, pero de manera más preferente en tumor, concentración equivalente a la concentración para lograr efectos fenotípicos en cualquiera de los muchos ensayos descritos en la presente tal como pero no limitado a inhibición de crecimiento de células AML Kasumi-1, inducción de apoptosis como se indica por activación de caspasa 3,7 en células MOLM-13 AML, degradación de cinasas HER-2 y Raf-1 en células de cáncer de mama SKBr3, inactivación de p-STAT3 en células de cáncer de mama MDA-MB-468 seleccionada del grupo
50 que consiste de 1 nM a 200 uM; 1 nM a 100 uM; 1 nM a 50 uM; 100 nM a 100 uM; 100 nM a 50 uM; 100 nM a 20 uM; 1 nM a 1 uM; y 1 nM a 100 nM. En una modalidad, el efecto fenotípico es el valor de IC₅₀ para el ensayo. En una

- modalidad adicional, la dosis terapéuticamente efectiva preferida será la cantidad requerida para obtener una concentración en suero, pero de manera más preferente en tumor, concentración equivalente a la concentración para lograr efectos fenotípicos en cualquiera de los muchos ensayos descritos en la presente, tal como la inhibición de crecimiento de células AML Kasumi-1, inducción de apoptosis como se indica por activación de caspasa 3,7 en células MOLM-13 AML, degradación de cinasas HER-2 y Raf-1 en células de cáncer de mama SKBr3, inactivación de p-STAT3 en células de cáncer de mama MDA-MB-468 seleccionada del grupo que consiste de menos de 200 uM; menos de 100 uM; menos de 50 uM; menos de 25 uM; menos de 15 uM; menos de 10 uM; menos de 5 uM; menos de 2 uM; menos de 1 uM; menos de 500 nM; menos de 200 nM; o menos de 100 nM. En una modalidad adicional, el efecto fenotípico es el valor de IC₅₀ para el ensayo.
- 5 Si se desea, se pueden emplear otros agentes terapéuticos en unión con aquellos proporcionados en las composiciones descritas anteriormente. La cantidad de principios farmacéuticamente activos que se pueden combinar con los materiales portadores para producir una forma de dosis individual variará dependiendo del hospedador tratado, la naturaleza de la enfermedad, trastorno, o condición, y la naturaleza de los principios activos.
- 10 Las composiciones farmacéuticas preferidas se pueden dar en una dosis diaria individual o múltiple, diariamente. En una modalidad, las composiciones farmacéuticas se dan de una a tres veces diariamente. Iniciando con una baja dosis dos veces al día y trabajando lentamente hasta mayores dosis si es necesario es una estrategia. La cantidad de principios farmacéuticamente activos que se pueden combinar con los materiales portadores para producir una forma de dosis individual variará dependiendo del hospedador tratado, de la naturaleza de la enfermedad, trastorno, o condición, y de la naturaleza de los principios activos. Sin embargo, se entiende que un nivel específico de dosis para cualquier paciente particular variará dependiendo de una variedad de factores, incluyendo la actividad del agente farmacéuticamente activo específico; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración; la velocidad de excreción; posibles combinaciones con fármacos; la severidad de la condición particular que se trate; y la forma de administración. Un experto en la técnica apreciará la variabilidad de estos factores y será capaz de establecer niveles específicos de dosis usando no más que experimentación de rutina.
- 15 20 Los parámetros farmacocinéticos, tal como biodisponibilidad, constante de velocidad de absorción, volumen aparente de distribución, fracción no unida, depuración total, fracción excretada sin cambio, metabolismo de primera pasada, constante de velocidad de eliminación, vida media y tiempo medio de residencia son todos bien conocidos en la técnica.
- 25 Las formulaciones farmacéuticas óptimas se determinarán por un experto en la técnica dependiendo de consideraciones tal como la combinación particular de agentes farmacéuticamente activos y la dosis deseada. Ver, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18.^a ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042), p. 1435-1712. Estas formulaciones pueden tener influencia en el estado físico, estabilidad, velocidad de liberación in vivo, y velocidad de depuración *in vivo* de los lípidos esenciales.
- 30 En una modalidad, la presente composición farmacéutica de acuerdo con la materia descrita en la presente puede estar en una forma intravenosa o una forma de dosis oral, por ejemplo, una cápsula, una tableta, líquido y/o un polvo envasado en, por ejemplo, un envase de uso individual o de múltiples usos, incluyendo por ejemplo, un recipiente o botella, o un envase de blíster.
- 35 Se pueden preparar equipos y envases de dosis individuales que contienen una cantidad de una vez por día o una vez por tratamiento de la composición farmacéutica. Dentro del alcance de la presente materia se contemplan recipientes desechables de dosis individual, dosis unitaria y una vez por día de las presentes composiciones farmacéuticas.
- 40 Terapia de Combinación
- En otra modalidad, las presentes composiciones farmacéuticas se pueden usar en combinación con una forma de dosis farmacéutica adicional para mejorar su efectividad en el tratamiento de un cáncer, malignidad, o trastorno proliferativo. A este respecto, las presentes composiciones preferidas se pueden administrar como parte de un régimen que incluye adicionalmente cualquier otra forma de dosis farmacéutica y/o farmacéutica conocida en la técnica como efectiva para el tratamiento de un cáncer, malignidad, o trastorno proliferativo. De manera similar, un principio farmacéuticamente activo diferente de aquellos especificados en la presente se puede adicionar a las presentes composiciones preferidas para mejorar su efectividad al tratar un cáncer, malignidad o trastorno proliferativo. Por consiguiente, este ingrediente adicional farmacéuticamente activo o forma de dosis farmacéuticamente adicional se puede administrar a un paciente ya sea de forma directa o indirecta, y de manera concomitante o secuencial, con las composiciones preferidas descritas en la presente.
- 45 50 En este respecto, como útiles para la terapia de combinación analizada en la presente se contemplan adicionalmente agentes anti-cáncer, anti-malignidad o anti-trastorno proliferativo diferente de los compuestos analizados anteriormente. En la presente se contemplan combinaciones de cualquiera de los agentes anteriores o sus sales o derivados farmacéuticamente aceptables.

En una modalidad de este respecto, las presentes composiciones y la forma de dosis farmacéuticamente adicional se pueden administrar a un paciente a la vez. En una modalidad alternativa, se puede administrar una de las presentes composiciones preferidas y la forma de dosis farmacéuticamente adicional en la mañana y la otra se puede administrar en la tarde.

- 5 En otra modalidad, los compuestos actualmente descritos se pueden administrar a un paciente en necesidad del mismo en múltiples formas de dosis farmacéuticas. Esta terapia de combinación puede aumentar al máximo la efectividad de la presente composición al tratar un cáncer, malignidad o trastorno proliferativo.

Ejemplos

- 10 Los siguientes ejemplos son ilustrativos de las presentes composiciones farmacéuticas y no se proponen que sean limitaciones de la misma. Los compuestos se nombraron al usar la función "Convertir Estructura a Nombres" en ChemBioDraw Ultra V.11.0.1 (Cambridge Soft; Cambridge, MA).

Ejemplo 1: Síntesis Química y Purificación

- 15 Aspectos Generales.- Se registraron los espectros de RMN en un espectrómetro de RMN Bruker AV-III-500 MHz. Los cambios químicos se reportan en valores δ en ppm campo abajo desde TMS como la norma interna. Se reportan datos de ^1H como sigue: cambio químico, multiplicidad (s = singlete, d = doblete, t = triplete, q = cuarteto, br = amplio, m = multiplete), constante de acoplamiento (Hz), integración. Los cambios químicos de ^{13}C se reportan en valores δ en ppm campo abajo desde TMS como la norma interna. Se registraron espectros de masa de alta resolución en un sistema Waters LCT Premier. Se obtuvieron los espectros de masa de baja resolución en un detector de LC de Alto Desempeño con ionización de electro-rosado SQ Waters Acquity. Se realizó la HPLC analítica en un sistema Waters Autopurification con un detector PDA, MicroMass ZQ y ELSD. Se realizó la cromatografía analítica en capa delgada en placas de gel de sílice F254 de 250 μM . Se realizó la cromatografía preparativa de capa delgada en placas de gel de sílice malla 230-400. Los solventes fueron grado HPLC. Todos los reactivos se compraron de Aldrich o Acros Organics y se usaron sin purificación. Todas las reacciones se realizaron bajo protección de argón.

25 (2) - PU24FC1

Se sintetizó **2** de acuerdo al procedimiento anteriormente publicado. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 6.46 (s, 1H), 6.17 (br s, 2H), 4.31 (s, 2H), 4.12 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 2.19 (dd, J = 6.6, 2.5 Hz, 2H), 1.97 (t, J = 2.5 Hz, 1H), 1.94-1.87 (m, 2H); RMN ^{13}C (166 MHz, CDCl_3) δ 159.8, 157.7, 156.2, 152.8, 152.4, 150.5, 150.2, 142.6, 128.7, 119.7, 116.8, 108.5, 82.2, 69.8, 61.1, 56.2, 42.1, 31.5, 28.1, 15.7; MS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 434.1.

30 (3) - PU-H71

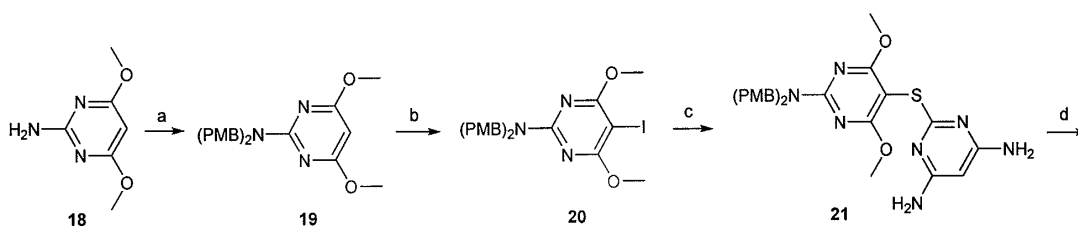
Se sintetizó **3** de acuerdo al procedimiento anteriormente publicado. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 8.33 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 5.99 (s, 2H), 5.58 (br s, 2H), 4.30 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.74-2.69 (m, 1H), 2.58 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.01-1.96 (m, 2H), 1.03 (d, J = 6.2 Hz, 6H); RMN ^{13}C (166 MHz, CDCl_3) δ 154.6, 152.9, 151.6, 149.2, 148.9, 146.2, 127.9, 120.1, 119.2, 112.2, 102.2, 91.1, 48.7, 43.9, 41.7, 30.3, 22.9; MS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 513.0.

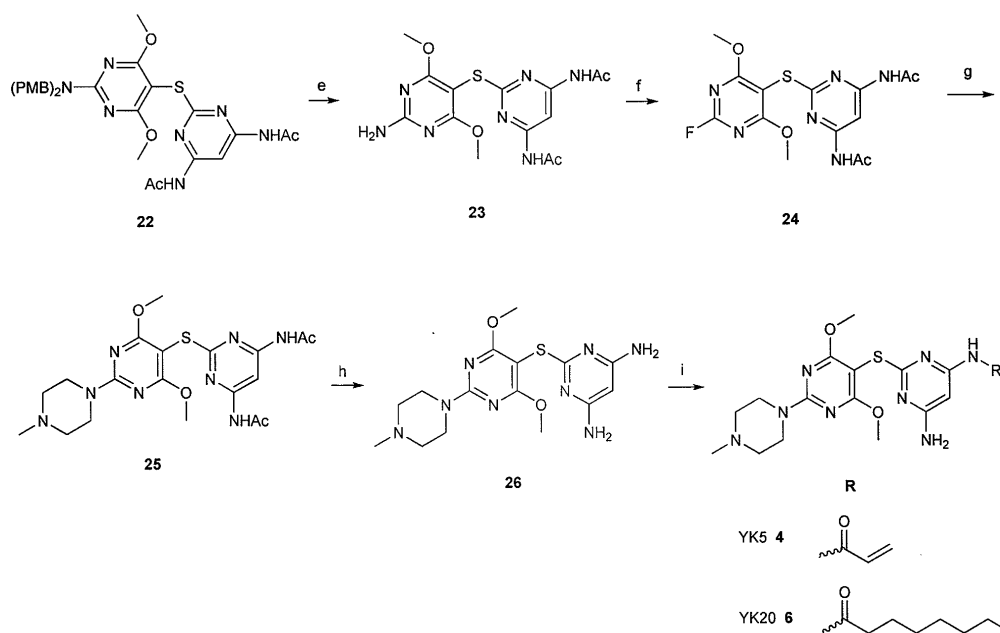
35 (5) - GM-Cy3B

Se sintetizó **5** de acuerdo al procedimiento anteriormente publicado. MS (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1181.3.

Esquema de Síntesis 1

El Esquema 1 de Síntesis proporciona ejemplos para sintetizar los compuestos 18-26, YK5 (4), y YK20 (6).





5 **Reactivos y condiciones:** (a) PMBCl, NaH, DMF, 0°C a temperatura ambiente, 12 h, 95 %; (b) NIS, MeCN, temperatura ambiente, 1 h, 98 %; (c) 4,6-diamino-2-mercaptopyrimidina, neocuproina, CuI, K₂CO₃, DMSO, 120°C, 16 h, 65 %; (d) Ac₂O, DMAP, 110°C, 2 h, 91 %; (e) TFA, CHCl₃, 62°C, 24 h, 95 %; (f) HF/piridina, NaNO₂, 0°C, 1 h, 54 %; (g) 1-metilpiperizina, DMF, 90°C, 1 h, 90 %; (h) NaOH, H₂O, MeOH, 60°C, 1 h, 95 %; (i) cloruro de acrilóilo, Et₃N, dioxano, temperatura ambiente, 24 h, 50 % o cloruro de octanoilo, Et₃N, dioxano, temperatura ambiente, 12 h, 71 %.

(19)-4,6-dimetoxi-N,N-bis(4-metoxibencil)pirimidin-2-amina

10 A una solución de 2-amino-4,6-dimetoxipirimidina (2.0 g, 12.9 mmol) en 20 mL de DMF a 0°C, se adicionó NaH (1.24 g, 51.5 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. Se adicionó cloruro de 4-metoxibencilo (4.03 g, 25.7 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se extinguió con metanol y se removió el
 15 solvente bajo presión reducida. El residuo se disolvió en EtOAc, se lavó con salmuera y se secó sobre MgSO₄. El solvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano:EtOAc, 4:1) para dar 4.8 g (95 %) de 19. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7.26 (d, J = 8.4 Hz, 4H), 6.89 (d, J = 8.4 Hz, 4H), 5.47 (s, 1H), 4.78 (s, 4H), 3.85 (s, 6H), 3.80 (s, 6H); RMN ¹³C (166 MHz, CDCl₃): δ 171.9, 161.5, 158.7, 130.9, 129.1, 113.8, 78.7, 55.2, 53.4, 48.3; MS (m/z): [M+H]⁺ 396.3.

(20)-5-yodo-4,6-dimetoxi-N,N-bis(4-metoxibencil)pirimidin-2-amina

20 A una solución de 19 (4.8 g, 12.3 mmol) en 50 mL de acetonitrilo, se adicionó N-yodosuccinimida (4.13 g, 18.4 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El solvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano:EtOAc, 4:1) para dar 6.3 g (98 %) de 20. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7.18 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 6.83 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 4.71 (s, 4H), 3.89 (s, 6H), 3.79 (s, 6H); RMN ¹³C (166 MHz, CDCl₃): δ 169.1, 160.9, 158.8, 130.5, 129.0, 113.9, 55.3, 54.7, 48.6, 43.9; MS (m/z): [M+H]⁺ 522.4.

(21) 2-(2-(bis(4-metoxibencil)amino)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidina-4,6-diamina

25 Una mezcla de 20 (6.2 g, 11.9 mmol), 4,6-diamino-2-mercaptopyrimidina (1.7 g, 11.9 mmol), neocuproina (0.538 g, 2.38 mmol), yoduro de cobre (0.452 g, 2.38 mmol), y carbonato de potasio (3.3 g, 33.8 mmole) en 100 mL de DMSO se agitó a 120°C durante 16 h. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 20:1) para dar 4.2 g (65 %) de 21. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆): δ 7.18 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 6.80 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 5.09 (s, 1H), 4.68 (s, 4H), 4.40 (s, 4H), 3.79 (s, 6H), 3.74 (s, 6H); MS (m/z): [M+H]⁺ 536.5.

30 (22) N,N'-(2-(2-(bis(4-metoxibencil)amino)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidina-4,6-diil)diacetamida

Una solución de 21 (3.2 g, 6.0 mmol) y DMAP (0.037 g, 0.3 mmol) en 20 mL de anhídrido acético se agitó a 110°C durante 2 h. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano:EtOAc, 1:1) para dar 3.4 g (91 %) de 22. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃/DMSO-Jd): δ 8.25 (br s, 1H), 7.70 (br s, 2H), 7.18 (d, J = 10.0 Hz, 4H), 6.81 (d, J = 10.0 Hz, 4H), 4.70 (s, 4H), 3.78 (s, 6H), 3.74 (s, 6H), 2.10 (s, 6H); MS (m/z):

[M+H]⁺ 620.4.

(23) N,N'-(2-(2-amino-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio) pirimidina-4,6-diil)diacetamida

Una solución de 22 (0.950 g, 1.5 mmol) en 20 mL de TFA:CHCl₃ (1:1) se calentó a 62°C durante 24 h. Se removieron TFA en exceso y el solvente bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH, 20:1) para dar 0.550 g (95 %) de 23. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆): δ 10.51 (br s, 2H), 8.37 (br s, 1H), 6.98 (s, 2H), 3.78 (s, 6H), 2.06 (s, 6H); RMN ¹³C (166 MHz, DMSO-d₆): δ 170.9, 170.1, 169.2, 162.5, 158.9, 92.8, 78.5, 53.9, 24.1; MS (m/z): [M+H]⁺ 380.2.

(24) N,N'-(2-(2-fluoro-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio) pirimidina-4,6-diil)diacetamida

Se adicionó 23 (2.0 g, 5.3 mmol) a un tubo de plástico equipado con una barra de agitación y se enfrió a 0°C. Entonces se adicionó una solución de HF/piridina (3.6 mL, 144 mmol). Se adicionó NaNO₂ (0.545 g, 7.9 mmol) en porciones durante un periodo de 20 minutos con agitación. Se agitó vigorosamente durante 50 minutos adicionales a 0°C y 2 h a temperatura ambiente. Se adicionó CaCO₃ (14.4 g, 144 mmol) para destruir el HF en exceso. La mezcla se extrajo con CH₂Cl₂ y se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 20:1) para dar 1.1 g (54 %) de 24. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.45 (s, 1H), 7.61 (s, 2H), 4.00 (s, 6H), 2.18 (s, 6H); MS (m/z): [M+H]⁺ 383.2.

(25) N,N'-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il) pirimidin-5-iltio) pirimidina-4,6-diil)diacetamida

A una solución de 24 (30 mg, 0.078 mmol) en 2 mL de DMF se adicionó 1-metilpiperazina (31 mg, 0.31 mmol) y se calentó a 90°C durante 1 h. Se removieron el solvente y el reactivo en exceso bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CHCl₃:MeOH-NH₃ (7N), 10:1) para producir 32 mg (90 %) de 25. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.36 (br s, 1H), 8.13 (br s, 2H), 3.88 (s, 6H), 3.87 (m, 4H), 2.46 (m, 4H), 2.35 (s, 3H), 1.99 (s, 6H); RMN ¹³C (166 MHz, CDCl₃): δ 172.2, 169.4, 168.9, 160.4, 158.9, 96.1, 95.9, 54.7, 54.3, 46.1, 43.8, 24.7; MS (m/z): [M+H]⁺ 463.2.

(26) 2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidina-4,6-diamina

Una mezcla de 25 (50 mg, 0.108 mmol), NaOH 1 N (acuoso) (2 mL) en 4 mL de metanol se agitó a 60°C durante 1 h. Se removieron los solventes bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria para dar 39 mg (95 %) de 26. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 5.19 (s, 1H), 4.48 (s, 4H), 3.88 (s, 6H), 3.87 (m, 4H), 2.48 (m, 4H), 2.35 (s, 3H); MS (m/z): [M+H]⁺ 378.9.

YK5 (4)-N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida

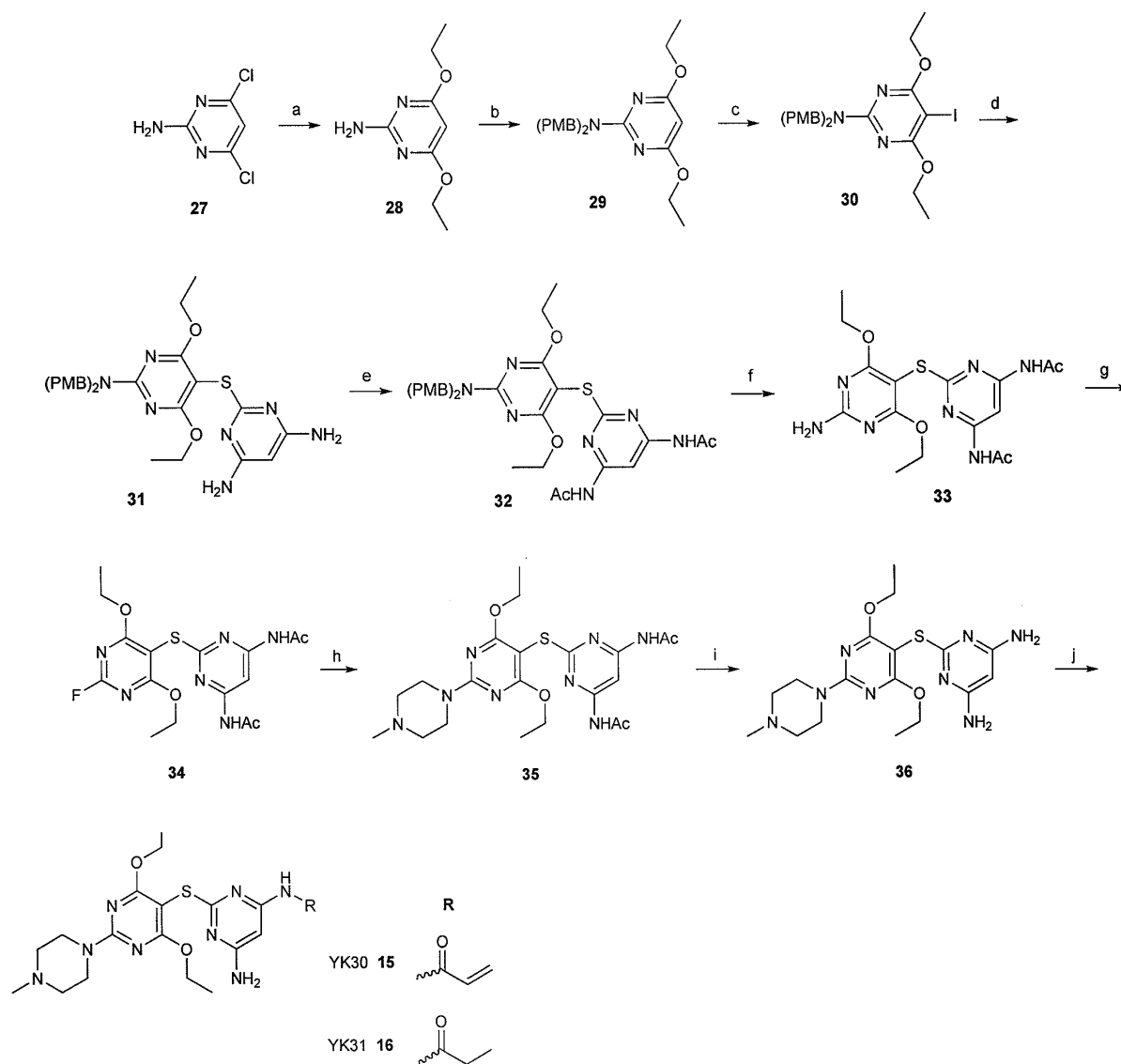
A una solución de 26 (0.370 g, 0.977 mmol) y Et₃N (0.988 g, 9.77 mmol) en 10 mL de dioxano anhidro se adicionó cloruro de acrililoilo (0.855 g, 9.77 mmol) gota a gota bajo baño de agua. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria (CHCl₃:MeOH-NH₃ (7N), 10:1) para dar 0.211 g (50 %) de 4. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7.96 (br s, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.41 (d, J = 16.8 Hz, 1H), 6.17 (dd, J = 16.8, 10.3 Hz, 1H), 5.78 (d, J = 10.3 Hz, 1H), 4.83 (br s, 2H), 3.88 (s, 6H), 3.87 (m, 4H), 2.47 (m, 4H), 2.35 (s, 3H); RMN ¹³C (166 MHz, CDCl₃): δ 169.3, 168.8, 162.6, 162.5, 158.3, 154.9, 128.9, 127.1, 86.7, 78.2, 53.1, 52.4, 44.5, 41.9; HRMS (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₁₈H₂₅N₈O₃S, 433.1770; encontrado 433.1750; HPLC: (a) H₂O + 0.1 % TFA (b) ACN + 0.1 % TFA (5 a 95 % ACN en 10 min.) Rt = 6.28 min.

YK20 (6) - N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio) pirimidin-4-il)octanamida

A una solución de 26 (20 mg, 0.049 mmol) y Et₃N (49 mg, 0.49 mmol) en 1 mL de dioxano anhidro se adicionó cloruro de octanoilo (80 mg, 0.49 mmol) gota a gota. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria (CHCl₃:MeOH-NH₃ (7N), 10:1) para dar 17 mg (71 %) de 6. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.01 (br s, 1H), 6.97 (s, 1H), 4.86 (br s, 2H), 3.89 (s, 6H), 3.86 (m, 4H), 2.46 (m, 4H), 2.35 (s, 3H), 2.30 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.62 (m, 2H), 1.20-1.30 (m, 8H), 0.87 (t, J = 6.9 Hz, 3H); RMN ¹³C (166 MHz, CDCl₃): δ 172.7, 171.1, 170.4, 164.3, 160.0, 156.7, 87.9, 80.1, 54.9, 54.2, 46.3, 43.7, 37.7, 31.6, 29.1, 29.0, 25.2, 22.6, 14.1; HRMS (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₃H₃₇N₈O₃S, 505.2709; encontrado 505.2701; HPLC: (a) H₂O + 0.1 % TFA (b) ACN + 0.1 % TFA (5 a 95 % ACN en 10 min.) Rt = 7.98 min.

Esquema de Síntesis 2

El Esquema 2 de Síntesis proporciona ejemplos para sintetizar los compuestos 28-36, YK30 (15), y YK31 (16).



5

Reactivos y condiciones: (a) NaH, EtOH, reflujo, 12 h, 89 %; (b) PMBCl, NaH, DMF, 0°C a temperatura ambiente, 12 h, 97 %; (c) NIS, MeCN, temperatura ambiente, 1 h, 96 %; (d) 4,6-diamino-2-mercaptopyrimidina, neocuproina, CuI, K₂CO₃, DMSO, 120°C, 16 h, 80 %; (e) Ac₂O, DMAP, 110°C, 2 h, 89 %; (f) TFA, CHCl₃, 62°C, 24 h, 92 %; (g) HF/piridina, NaNO₂, 0°C, 1 h, 46 %; (h) 1-metilpiperizina, DMF, 90°C, 1 h, 91 %; (i) NaOH, H₂O, MeOH, 60°C, 1 h, 93 %; (j) cloruro de acrililo, Et₃N, dioxano, temperatura ambiente, 12 h, 40 % o cloruro de propionilo, Et₃N, dioxano, temperatura ambiente, 12 h, 66 %.

10

(28)-2-amino-4,6-dietoxipirimidina

15

A una solución de 2-amino-4,6-dicloropirimidina (1.0 g, 6.09 mmol) en 20 mL de etanol absoluto se adicionó NaH (0.585 g, 24.39 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó bajo reflujo durante 12 h. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se disolvió en diclorometano y se lavó con salmuera. El solvente se evaporó y el sólido resultante se purificó por cromatografía en columna (hexano:EtOAc, 4:1) para dar 1.0 g (89 %) de 28. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 5.42 (s, 1H), 4.78 (br s, 2H), 4.24 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 1.34 (t, J = 7.1 Hz, 6H); MS (m/z): [M+H]⁺ 183.9.

(29)-4,6-dietoxi-N,N-bis(4-metoxibencil)pirimidin-2-amina

20

A una solución de 28 (1.00 g, 5.46 mmol) en 20 mL de DMF a 0°C, NaH (0.524 g, 21.83 mmol) se adicionó y se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. Se adicionó cloruro de 4-metoxibencilo (1.88 g, 12.0 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se extinguió con etanol y el solvente se removió bajo presión

reducida. El residuo se disolvió en EtOAc, se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄ y se concentró para dar un residuo que se purificó por cromatografía en columna (hexano:EtOAc, 4:1) para dar 2.25 g (97 %) de 29. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7.18 (d, J = 8.1, 4H), 6.84 (d, J = 8.1, 4H), 5.38 (s, 1H), 4.70 (s, 4H), 4.27 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 3.79 (s, 6H), 1.29 (t, J = 7.1 Hz, 6H); RMN ¹³C (166 MHz, CDCl₃): δ 171.5, 161.4, 158.6, 130.9, 129.0, 113.7, 78.6, 61.8, 55.2, 48.1, 14.6; MS (m/z): [M+H]⁺ 424.2.

(30)-5-yodo-4,6-dietoxi-N,N-bis(4-metoxibencil)pirimidin-2-amina

A una solución de **29** (2.2 g, 5.2 mmol) en 50 mL de acetonitrilo, se adicionó N-yodosuccinimida (1.7 g, 8 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano: EtOAc, 4:1) para dar 2.75 g (96 %) de 30. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7.17 (m, 4H), 6.84 (m, 4H), 4.68 (s, 4H), 4.34 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 3.80 (s, 6H), 1.32 (t, J = 7.1 Hz, 6H); RMN ¹³C (166 MHz, CDCl₃/DMSO-J6): δ 168.3, 160.4, 158.2, 130.1, 128.4, 113.2, 62.6, 54.8, 48.1, 44.2, 14.1; MS (m/z): [M+H]⁺ 550.1.

(31) 2-(2-(bis(4-metoxibencil)amino)-4,6-dietoxipirimidin-5-iltio)pirimidina-4,6-diamina

Una mezcla de 30 (2.75 g, 5.0 mmol), 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina (0.71 g, 5.0 mmol), neocuproina (0.226 g, 1.0 mmol), yoduro de cobre (0.190 g, 1.0 mmol), y carbonato de potasio (1.38 g, 10.0 mmol) en 60 mL de DMSO se agitó a 120°C durante 16 h. Se removió el solvente bajo presión reducida y el residuo se purificó parcialmente por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 20:1) para dar 2.2 g (80 %) de 31 impuro [MS (m/z): [M+H]⁺ 564.2], que se usó sin purificación adicional en el siguiente paso.

(32) N,N'-(2-(2-(bis(4-metoxibencil)amino)-4,6-dietoxipirimidin-5-iltio)pirimidina-4,6-diil)diacetamida

Una solución de 31 (1.2 g, 2.19 mmol) y DMAP (0.013 g, 0.11 mmol) en 20 mL de anhídrido acético se agitó a 110°C durante 2 h. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano:EtOAc, 1:1) para dar 1.2 g (89 %) de 32. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.22 (s, 2H), 7.21 (d, J = 8.5 Hz, 4H), 6.86 (d, J = 8.5 Hz, 4H), 4.70 (s, 4H) 4.32 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 3.80 (s, 6H), 2.16 (s, 6H), 1.20 (t, J = 7.1 Hz, 6H); MS (m/z): [M+H]⁺ 648.1.

(33) N,N'-(2-(2-amino-4,6-dietoxipirimidin-5-iltio)pirimidina-4,6-diil)diacetamida

Una solución de 32 (2.00 g, 3.09 mmol) en 20 mL de TFA:CHCl₃ (1:1) se calentó a 62°C durante 24 h. Se removieron el TFA en exceso y el solvente bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH, 20:1) para dar 1.15 g, (92 %) de 33 [MS (m/z): [M+H]⁺ 407.8].

(34) N,N'-(2-(2-fluoro-4,6-dietoxipirimidin-5-iltio)pirimidina-4,6-diil)diacetamida

Se adicionó **33** (1.5 g, 3.68 mmol) a un tubo de plástico equipado con una barra de agitación y enfriado a 0°C. Entonces se adicionó una solución de HF/piridina (3.0 mL, 120 mmol). Después de varios minutos, se adicionó NaNO₂ (0.380 g, 5.52 mmol) en porciones durante un periodo de 20 minutos con agitación. Se agitó vigorosamente durante 50 minutos adicionales a 0°C. Se adicionó CaCO₃ (12.0 g, 120 mmol) para destruir el exceso de HF. La mezcla se extrajo con CH₂Cl₂ y se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 20:1) para dar 0.76 g (46 %) de 34. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.47 (br s, 1H), 7.85 (br s, 2H), 4.44 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 2.17 (s, 6H), 1.31 (t, J = 7.1 Hz, 6H); MS (w/z): [M+H]⁺ 411.3.

(35) N,N'-(2-(4,6-dietoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidina-4,6-diil)diacetamida

A una solución de 34 (0.165 g, 0.402 mmol) en 3 mL DMF se adicionó 1-metilpiperazina (400 mg, 4.4 mmol) y se calentó a 90°C durante 1 h. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 10:1) para producir 0.180 g (91 %) de 35. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.35 (br s, 1H), 8.06 (br s, 2H), 4.35 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 3.82 (m, 4H), 2.43 (m, 4H), 2.36 (s, 3H), 2.15 (s, 6H), 1.26 (t, J = 7.1 Hz, 6H); MS (m/z): [M+H]⁺ 491.2.

(36)-2-(4,6-dietoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidina-4,6-diamina

Una mezcla de **35** (0.130 g, 0.265 mmol), NaOH 1 N (acuoso) (2 mL) en 7 mL de metanol se agitó a 60°C durante 1 h. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH, 10:1) para dar 0.100 g (93 %) de 36. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 5.17 (br s, 1H), 4.48 (s, 4H), 4.34 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 3.83 (m, 4H), 2.47 (m, 4H), 2.35 (s, 3H), 1.27 (t, J = 7.1 Hz, 6H); MS (m/z): [M+H]⁺ 407.1.

YK30 (15)-N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida

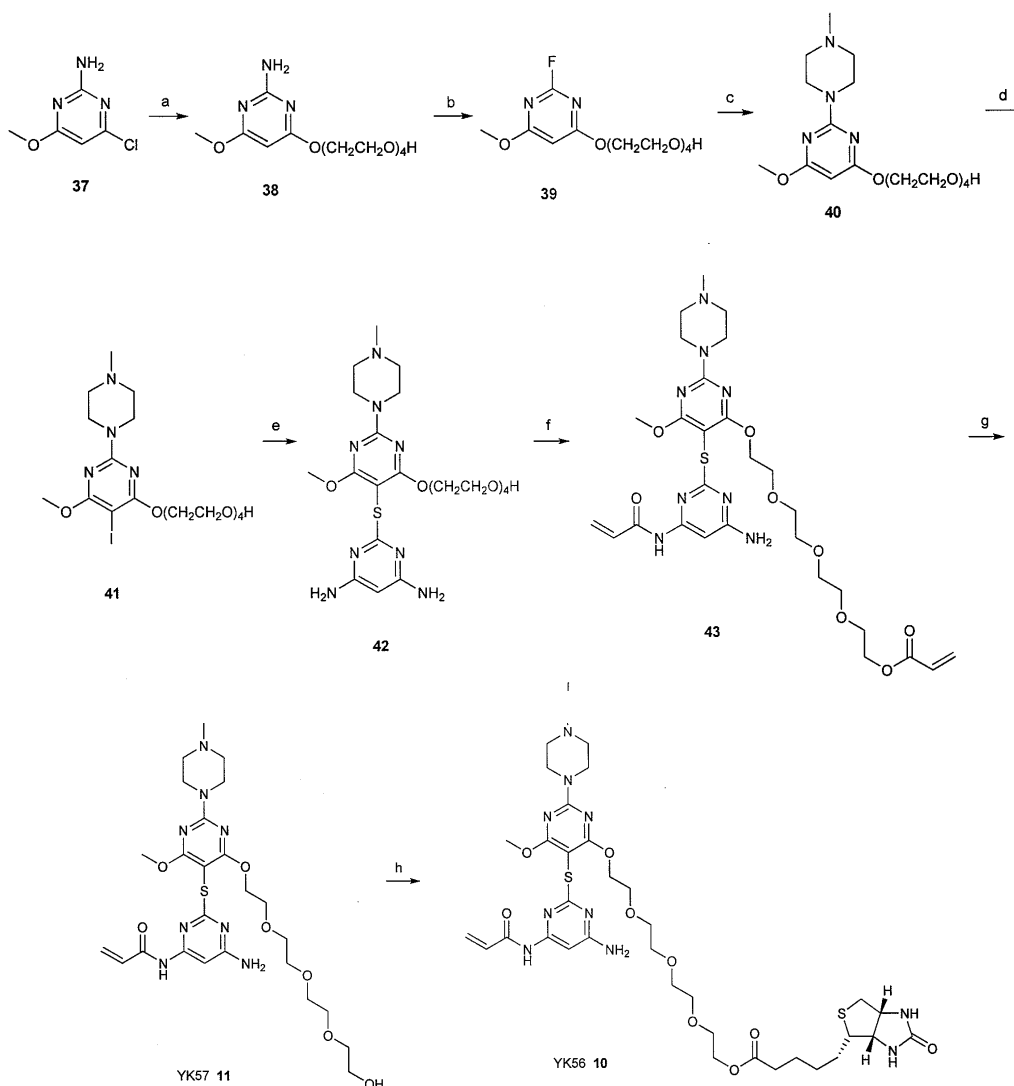
A una solución de **36** (20 mg, 0.049 mmol) y Et₃N (49 mg, 0.49 mmol) en 1 mL de dioxano anhidro se adicionó cloruro de acrililo (44 mg, 0.49 mmol) gota a gota. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria (CHCl₃:MeOH-NH₃ (7N), 10:1) para dar 9 mg (40 %) de **15**. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.14 (br s, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.40 (d, J = 16.9 Hz, 1H), 6.19 (dd, J = 16.9, 10.4 Hz, 1H), 5.77 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 4.83 (br s, 2H), 4.35 (q, J = 7.0 Hz, 4H), 3.83 (m, 4H), 2.46 (m, 4H), 2.35 (s, 3H), 1.28 (t, J = 7.0 Hz, 6H); RMN ¹³C (166 MHz, DMSO-d₆): δ 170.1, 169.2, 164.8, 164.2, 159.4, 156.4, 131.3, 128.1, 87.5, 79.9, 62.0, 54.3, 46.6, 43.2, 14.4; HRMS (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₀H₂₉N₈O₃S, 461.2083; encontrado 461.2096; HPLC: (a) H₂O + 0.1 % TFA (b) ACN + 0.1 % TFA (5 a 95 % ACN en 10 min.) Rt = 5.57 min.

YK31 (16)-N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propionamida

A una solución de **36** (20 mg, 0.049 mmol) y Et₃N (49 mg, 0.49 mmol) en 1 mL de dioxano anhidro se adicionó cloruro de propionilo (45 mg, 0.49 mmol) gota a gota. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria (CHCl₃:MeOH-NH₃ (7N), 10:1) para dar 15 mg (66 %) de **16**. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.17 (br s, 1H), 6.95 (s, 1H), 4.84 (br s, 2H), 4.35 (q, J = 7.5, 4H), 3.82 (m, 4H), 2.44 (m, 4H), 2.34 (s, 3H), 2.34 (q, J = 7.5 Hz, 2H), 1.28 (t, J = 7.5 Hz, 6H), 1.15 (t, J = 7.5 Hz, 3H); RMN ¹³C (166 MHz, CDCl₃): δ 173.3, 170.6, 170.5, 164.2, 160.0, 156.7, 87.7, 80.3, 62.4, 54.9, 46.3, 43.7, 30.6, 14.5, 9.1; HRMS (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₀H₃₁N₈O₃S, 463.2240; encontrado 463.2253; HPLC: (a) H₂O + 0.1 % TFA (b) ACN + 0.1 % TFA (5 a 95 % ACN en 10 min.) Rt = 6.22 min.

Esquema de Síntesis 3

El Esquema 3 de Síntesis proporciona ejemplos para sintetizar los compuestos **38-43**, YK57 (**11**), y YK56 (**10**).



Reactivos y condiciones: (a) H(OCH₂CH₂)₄OH, DMF 80°C 3 h, 83 %; (b) HF/piridina, NaNO₂, 0°C, 42 %; (c) 1-metilpiperazina, DMF, 90°C, 1 h, 91 %; (d) NIS, CH₃CN, temperatura ambiente, 1.5 h, 85 %; (e) 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina, neocuproina, CuI, K₃PO₄, DMSO, 150°C, 2.5 h, 73 %; (f) cloruro de acrililo, Et₃N, CH₂Cl₂, 0°C a temperatura ambiente, 8 h, 38 %; (g) NaOH, H₂O, THF, temperatura ambiente, 6 h, 52 %; (h) D-biotina, DCC, DMAP, CH₂Cl₂, sonicato, 8 h, 72 %.

(38)-2-(2-(2-(2-(2-amino-6-metoxipirimidin-4-iloxi)etoxi)etoxi)etoxi)etanol

A 7.28 g (37.5 mmol) de tetraetilenglicol disuelto en 20 mL de DMF se adicionaron 0.900 g (37.5 mmol) de NaH y la suspensión resultante se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se adicionaron 2.0 g (12.5 mmol) de 2-amino-4-cloro-6-metoxipirimidina y la mezcla de reacción se calentó a 80°C durante 3 h. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo aceitoso se purificó por cromatografía en columna (EtOAc:MeOH, 100:0 a 95:5) para dar 3.30 g (83 %) de un aceite 38. TLC (EtOAc:MeOH, 95:5 v/v): R_f = 0.24; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 5.48 (s, 1H), 5.08 (br s, 2H), 4.39 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.79 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.60-3.73 (m, 12H), 3.21 (br s, 1H); RMN ¹³C (166 MHz, CDCl₃): δ 172.6, 172.0, 162.4, 80.2, 72.8, 70.86, 70.80, 70.77, 70.57, 69.7, 65.6, 61.8, 53.9; MS (m/z): [M+H]⁺ 318.1.

(39)-2-(2-(2-(2-(2-fluoro-6-metoxipirimidin-4-iloxi)etoxi)etoxi)etoxi)etanol

Se adicionaron 1.55 g (4.88 mmol) de 38 a un tubo de plástico equipado con una barra de agitación y enfriado a 0°C. Entonces se adicionó una solución de HF/piridina (1.22 ml, 48.8 mmol). Después de varios minutos, se adicionaron 0.505 g (7.32 mmol) de NaNO₂ en porciones durante un periodo de 20 minutos con agitación. Se agitó vigorosamente durante 70 minutos adicionales a 0°C y a temperatura ambiente durante 3 horas. Luego, se adicionaron 15 ml de CH₂Cl₂ y 4.88 g de CaCO₃ (48.8 mmol) y la mezcla se agitó durante 5 horas a temperatura ambiente. Entonces se filtró sobre un embudo de disco sinterizado y el sólido se lavó con EtOAc (4 x 25 ml). El filtrado combinado se filtró sobre celita, se concentró bajo presión reducida y el residuo aceitoso se purificó por cromatografía en columna (EtOAc:MeOH, 100:0 a 95:5) para dar 0.65 g (42 %) de un aceite 39. TLC (EtOAc): R_f = 0.19; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 5.99 (s, 1H), 4.48-4.50 (m, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.80-3.84 (m, 2H), 3.58-3.75 (m, 12H), 2.56 (br s, 1H); RMN ¹³C (166 MHz, CDCl₃): δ 173.7 (d, J = 15.7 Hz), 173.0 (d, J = 15.7 Hz), 161.6 (d, J = 215.9 Hz), 88.0 (d, J = 6.8 Hz), 72.5, 70.70, 70.68, 70.57, 70.37, 69.2, 66.6, 61.8, 54.7; MS (m/z): [M+H]⁺ 321.2.

(40) 2-(2-(2-(2-(6-metoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il) pirimidin-4-iloxi)etoxi)etoxi)etoxi)etanol

Se disolvieron 0.55 g (1.72 mmol) de 39 en 40 ml de DMF y se adicionaron 1.72 g (17.2 mmol) de 1-metilpiperazina y se calentaron a 90°C durante 1 h. Se removieron el solvente y el reactivo en exceso bajo presión reducida y el residuo aceitoso se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 20:1) para dar 0.63 g (91 %) de un aceite 40. TLC (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 20:1 v/v): R_f = 0.24; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 5.40 (s, 1H), 4.42 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.80 (t, J = 5.1 Hz, 4H), 3.65-3.73 (m, 12H), 3.60 (t, J = 4.5 Hz, 2H), 2.44 (t, J = 5.1 Hz, 4H), 2.33 (s, 3H); RMN ¹³C (166 MHz, CDCl₃): δ 172.0, 171.3, 160.7, 78.5, 72.6, 71.8, 70.64, 70.55, 70.33, 69.5, 65.1, 61.7, 54.9, 53.5, 46.2, 43.7; MS (m/z): [M+H]⁺ 401.3.

(41) 2-(2-(2-(2-(5-yodo-6-metoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-4-iloxi)etoxi)etoxi)etoxi)etanol

A 0.600 g (1.50 mmol) de 40 disuelto en 20 ml CH₃CN se adicionó 0.581 g (2.58 mmol) de N-yodosuccinimida y la solución se agitó durante 1.5 h a temperatura ambiente. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo aceitoso se purificó por cromatografía en columna (CHCl₃:MeOH:Et₃N, 90:10:2) para dar 0.670 g (85 %) de un aceite 41. TLC (CHCl₃:MeOH:Et₃N, 90:10:2 v/v/v): R_f = 0.29; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 4.46 (t, J = 4.7 Hz, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.86 (m, 4H), 3.57-3.83 (m, 14H), 2.46 (m, 4H), 2.33 (s, 3H); MS (m/z): [M+H]⁺ 527.2.

(42)-2-(2-(2-(2-(5-(4,6-diaminopirimidin-2-iltio)-6-metoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-4-iloxi)etoxi)etoxi)etoxi)etanol

Se calentaron a 150°C durante 2.5 horas 0.620 g (1.18 mmol) de 41, 0.501 g (2.36 mmol) K₃PO₄, 0.053 g (0.236 mmol) neocuproina, 0.045 g (0.236 mmol) yoduro de cobre, y 0.184 g (1.30 mmol) 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina en 14 ml DMSO. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CHCl₃:MeOH:Et₃N, 99:1:2 a 95:5:2) para dar 0.465 g (73 %) de 42. TLC (CHCl₃:MeOH:Et₃N, 85:15:2 v/v/v): R_f = 0.35; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 5.18 (s, 1H), 4.94 (br s, 4H), 4.45 (t, J = 4.2 Hz, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.80-3.86 (br s, 4H), 3.74 (t, J = 4.2 Hz, 2H), 3.69 (t, J = 4.7 Hz, 2H), 3.51-3.63 (m, 10H), 2.46 (t, J = 4.6 Hz, 4H), 2.35 (s, 3H); MS (m/z): [M+H]⁺ 541.4.

(43) - Acrilato de 2-(2-(2-(2-(5-(4-acrilamido-6-aminopirimidin-2-iltio)-6-metoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-4-iloxi)etoxi)etoxi)etoxi)etilo

A 0.100 g (0.185 mmol) de 42 en 2 ml de CH₂Cl₂ a 0°C se adicionaron 0.037 g (51 µl, 0.370 mmol) de Et₃N. Entonces a 0°C se adicionaron 0.117 g (105 µl, 1.30 mmol) de cloruro de acrililo. Después de 5 minutos se removió el baño de hielo y se continuó la agitación a temperatura ambiente. Después de 2 horas adicionales, se adicionaron 0.037 g (51 µl,

0.370 mmol) de Et₃N y 0.050 g (45 μl, 0.555 mmol) de cloruro de acrililo y la agitación se continuó durante 6 horas adicionales. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 12:1) para producir 0.049 g (38 %) de 43. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.16 (br s, 1H), 7.06 (s, 1H), 6.39-6.42 (m, 2H), 6.10-6.27 (m, 2H), 5.76-5.83 (m, 2H), 4.92 (s, 2H), 4.49 (br s, 2H), 4.29 (br s, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.86 (s, 4H), 3.51-3.74 (m, 12H), 2.48 (s, 4H), 2.37 (s, 3H); MS (m/z): [M+H]⁺ 649.4.

YK57 (11) - N-(6-amino-2-(4-(2-(2-(2-(2-hidroxietoxi)etoxi) etoxi)etoxi)-6-metoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida

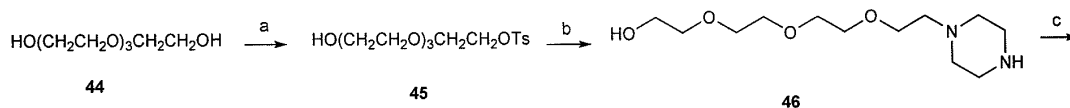
A 0.042 g (0.0647 mmol) de 43 disueltos en 0.8 ml de THF se adicionaron 0.2 mL de 0.5 N NaOH a temperatura ambiente y se agitó durante 6 horas. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria (CHCl₃:MeOH-NH₃ (7N), 10:1) para producir 0.020 g (52 %) de 11. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.38 (s, 1H), 7.07 (s, 1H), 6.42 (d, J = 16.7 Hz, 1H), 6.24 (dd, J = 16.7, 10.3 Hz, 1H), 5.77 (d, J = 10.3 Hz, 1H), 4.95 (br s, 2H), 4.49 (br s, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.86 (br s, 4H), 3.51-3.74 (m, 14H), 2.47 (br s, 4H), 2.36 (s, 3H); HRMS (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₅H₃₉N₈O₇S, 595.2662; encontrado, 595.2658; HPLC: (a) H₂O + 0.1 % TFA (b) ACN + 0.1 % TFA (5 a 95 % ACN en 10 min.) Rt = 5.05 min.

YK56 (10) - 5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoato de 2-(2-(2-(2-(5-(4-acrilamido-6-aminopirimidin-2-iltio)-6-metoxi-2-(4-metil-piperazin-1-il)pirimidin-4-iloxi)etoxi)etoxi)etoxi)etilol

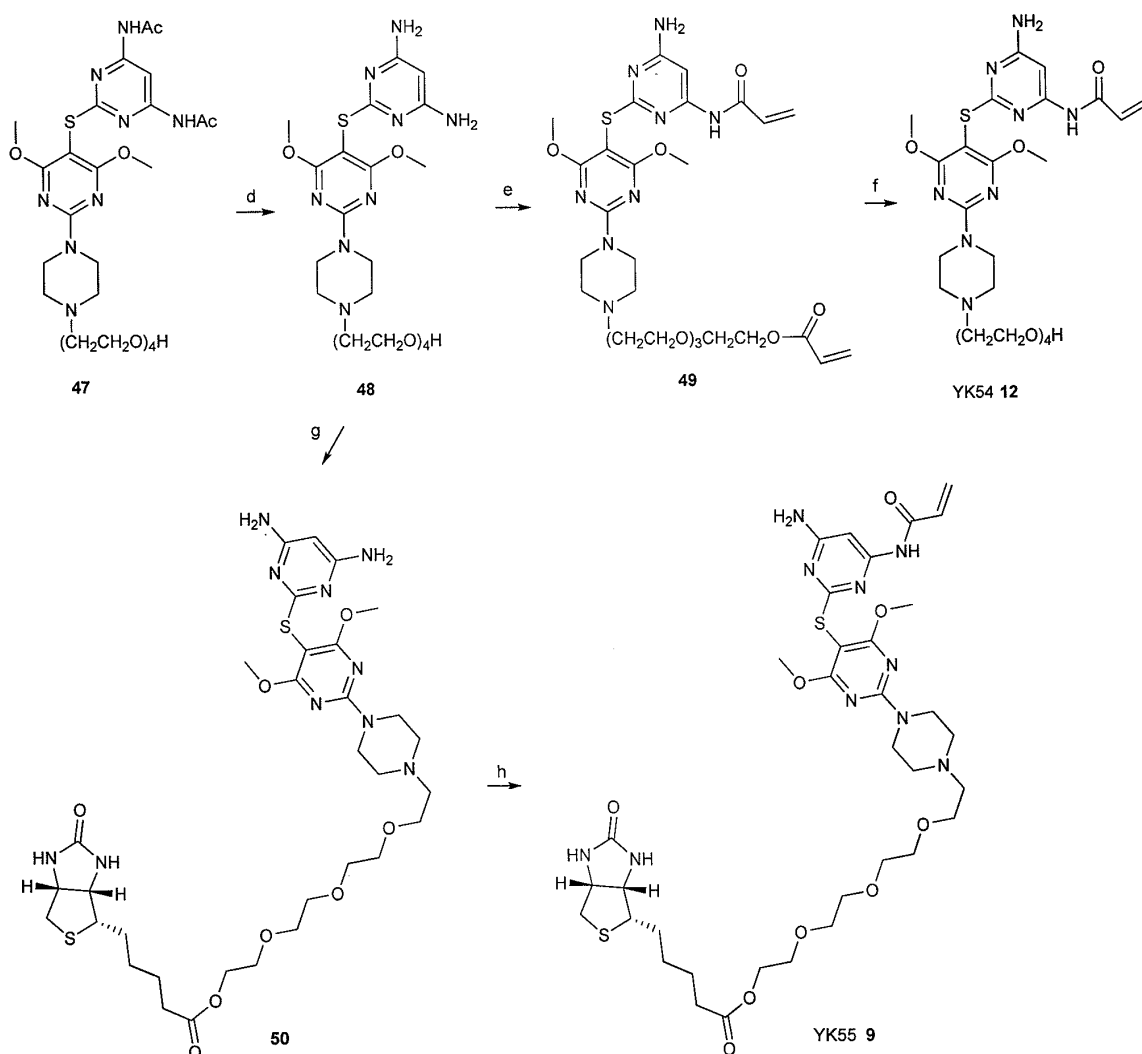
Se trataron con ultrasonido durante 8 horas en un tubo sellado 5.0 mg (0.0084 mmol) de 11, 7.0 mg (0.0287 mmol) D-(+)-biotina, 1.0 mg (0.0084 mmol) DMAP, 14.0 mg (0.0679 mmol) DCC en 2 ml de CH₂Cl₂. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria (CHCl₃:MeOH-NH₃ (7N), 10:1) para producir 5.0 mg (72 %) de 10. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 9.58 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 6.41-6.43 (m, 2H), 6.19 (br s, 1H), 5.77 (br s, 1H), 5.73 (dd, J = 7.3, 4.3 Hz, 1H), 5.31 (br s, 2H), 4.5-4.6 (m, 2H), 4.41-4.47 (m, 1H), 4.35-4.4 (m, 1H), 4.15-4.25 (m, 2H), 3.85-3.93 (br s, 7H), 3.5-3.75 (m, 12H), 3.14-3.19 (m, 1H), 2.93 (dd, J = 12.9, 4.9 Hz, 1H), 2.84 (d, J = 12.7 Hz, 1H), 2.56 (br s, 4H), 2.41 (s, 2H), 2.28 (t, J = 7.5 Hz, 3H), 1.37-1.78 (m, 6H); RMN ¹³C (166 MHz, CDCl₃): δ = 173.2, 170.7, 170.2, 169.4, 164.6, 164.3, 163.7, 159.5, 156.6, 130.6, 128.3, 88.3, 77.2, 70.5, 70.2, 70.1, 69.3, 68.8, 65.8, 63.1, 61.8, 59.9, 55.2, 54.2, 53.8, 45.4, 42.9, 40.1, 33.4, 29.3, 27.9, 27.8, 24.4; HRMS (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₃₅H₅₃N₁₀O₉S₂, 821.3438; encontrado, 821.3439; HPLC: (a) H₂O + 0.1 % TFA (b) ACN + 0.1 % TFA (5 a 95 % ACN en 10 min.) Rt = 7.10 min.

Esquema de Síntesis 4

El Esquema 4 de Síntesis proporciona ejemplos para sintetizar los compuestos 45-50, YK54 (12), y YK55 (9).



30



- 5 **Reactivos y condiciones:** (a) TsCl, NaOH, THF, H₂O, 0°C, 2 h, 78 %; (b) piperazina, CH₃CN, 75°C 12 h, 66 %; (c) 24, DMF, 90°C, 2 h, 79 %; (d) NaOH, MeOH, H₂O, 60°C, 2 h, 98 %; (e) cloruro de acrililo, Et₃N, CH₂Cl₂, 0°C, 7 h, 36 %; (f) NaOH, THF, H₂O, 3 h, 75 %; (g) D-biotina, DCC, DMAP, CH₂Cl₂, sonicación, 13 h, 85 %; (h) cloruro de acrililo, Et₃N, CH₂Cl₂, 0°C, 6 h, 41 %

(45) - 4-metilbencenosulfonato de 2-(2-(2-(2-hidroxietoxi)etoxi)etoxi)etilo

- 10 A 0°C se enfriaron 2.0 g (10.3 mmol) de tetraetilenglicol en 10 ml de THF. Se adicionaron 0.200 g (5 mmol) de NaOH en 2 ml de agua destilada y se agitó durante 30 minutos. Entonces, se adicionó lentamente 0.491 g (2.58 mmol) de cloruro de p-toluenosulfonilo lentamente y se continuó agitando a 0°C durante 2 horas. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano:EtOAc, 50:50 a 10:90) para dar 0.705 g (78 %) de un aceite 45. TLC (hexano:EtOAc, 10:90 v/v): R_f = 0.26; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7.80 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.34 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 4.16 (t, J = 4.9 Hz, 2H), 3.59-3.74 (m, 14H), 2.45 (s, 3H); MS (m/z): [M+Na]⁺ 371.3.

(46) - 2-(2-(2-(2-(piperazin-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)etanol

- 15 Durante 12 horas a 75°C se calentaron 0.705 g (2.02 mmol) de 45 y 0.697 g (8.09 mmol) de piperazina en 45 ml de CH₃CN. Se removieron el solvente y el reactivo en exceso bajo presión reducida y el residuo aceitoso se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH:MeOH-NH₃ (7N), 90:5:5 a 90:0:10) para dar 0.350 g (66 %) de un aceite 46. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 3.72 (m, 2H), 3.58-3.70 (m, 12H), 2.91 (m, 4H), 2.59 (br m, 2H), 2.49 (m, 4H); MS (m/z): [M+H]⁺ 263.3.

- 20 (47) - N,N'-(2-(2-(4-(2-(2-(2-(2-hidroxietoxi)etoxi)etoxi) etil)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio) pirimidina-4,6-

diil)diacetamida

5 A 0.430 g (1.12 mmol) de 24 en 27 ml de DMF se adicionaron 0.310 g (1.18 mmol) de 46 y se calentó a 90°C durante 2 horas. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH, 10:1) para dar 0.552 g (79 %) de 47. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.38 (br s, 2H), 8.13 (s, 1H), 3.88 (br s, 10H), 3.57-3.74 (m, 14H), 2.66 (br s, 2H), 2.58 (br s, 4H), 2.15 (s, 6H); MS (m/z): [M+H]⁺ 625.5.

(48) - 2-(2-(2-(2-(4-(5-(4,6-diaminopirimidin-2-iltio)-4,6-dimetoxipirimidin-2-il)piperazin-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)etanol

10 A 0.520 g (0.832 mmol) de 47 se adicionaron 25 ml de MeOH y 7 ml de 10 % NaOH (acuoso) y la suspensión se agitó a 60°C durante 2 horas. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH, 15:1) para dar 0.440 g (98 %) de 48. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 5.17 (s, 1H), 4.60 (br s, 4H), 3.88 (br s, 10H), 3.57-3.77 (m, 14H), 2.67 (br s, 2H), 2.59 (br s, 4H); MS (m/z): [M+H]⁺ 541.4.

(49) Acrilato de 2-(2-(2-(2-(4-(5-(4-acrilamido-6-aminopirimidin-2-iltio)-4,6-dimetoxi-pirimidin-2-il)piperazin-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)etilo

15 A 22.6 mg (0.042 mmol) de 48 en 3 ml de CH₂Cl₂ a 0°C se adicionaron 83.6 mg (116 µl, 0.836 mmol) de Et₃N. A 0°C se adicionaron 11.4 mg (10.2 µl, 0.126 mmol) de cloruro de acrililo. Después de 1 hora se adicionaron 11.4 mg adicionales (10.2 µl, 0.126 mmol) de cloruro de acrililo. Esto se repitió cinco veces más durante un tiempo total de reacción de 7 horas (cloruro de acrililo total, 79.8 mg, 71.7 µl, 0.882 mmol). La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH, 10:1) para producir 9.8 mg (36 %) de 49. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.10 (br s, 1H), 7.05 (s, 1H), 6.35-6.45 (m, 2H), 6.10-6.20 (m, 2H), 5.73-5.85 (m, 2H), 4.90 (br s, 2H), 4.32 (br s, 2H), 3.89 (br s, 10H), 3.60-3.70 (m, 12H), 2.69 (br s, 2H), 2.61 (br s, 4H); MS (m/z): [M+H]⁺ 649.5.

YK54 (12) N-(6-amino-2-(2-(4-(2-(2-(2-(2-hidroxietoxi)etoxi)etoxi)etil)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio) pirimidin-4-il)acrilamida

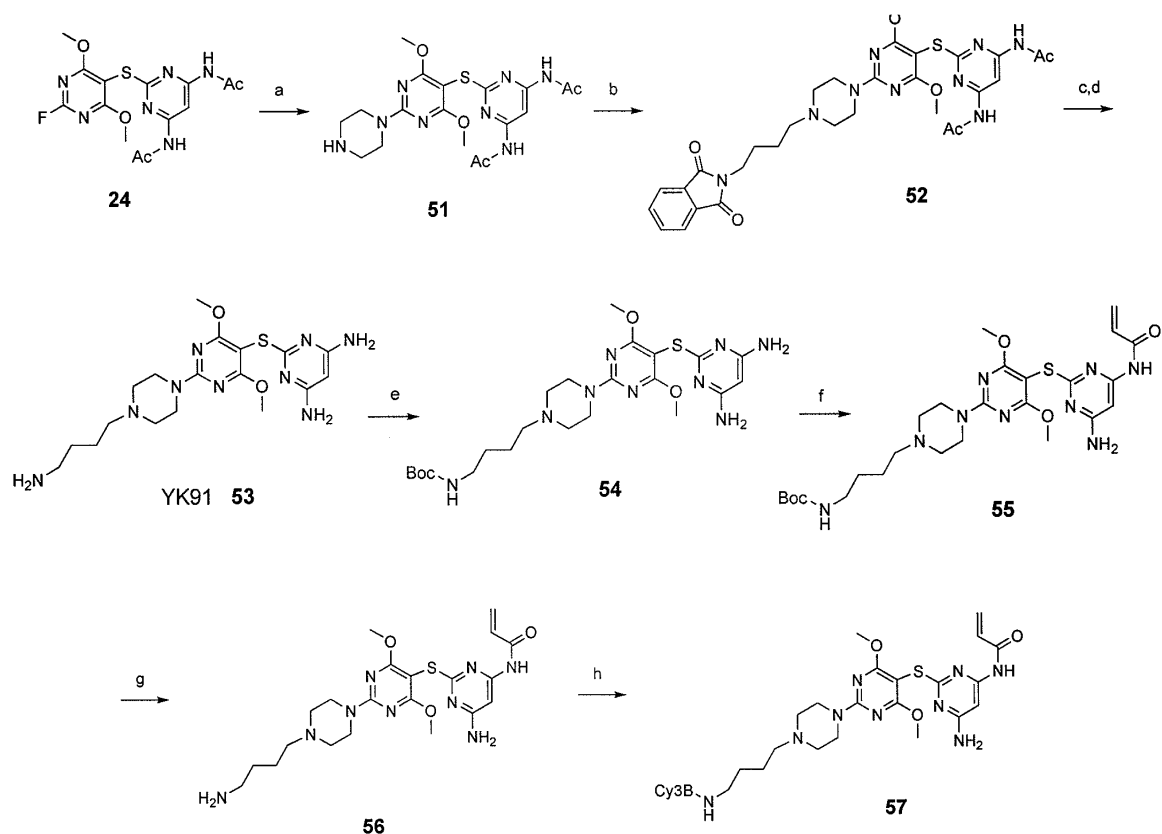
25 A 8.0 mg (0.012 mmol) de 49 disueltos en 1.6 ml de THF se adicionaron 0.4 mL de NaOH 0.5 N a temperatura ambiente y se agitó durante 3 horas. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH, 10:1) para producir 5.5 mg (75 %) de 12. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.65 (s, 1H), 7.03 (s, 1H), 6.36 (d, J = 16.2 Hz, 1H), 6.11 (m, 1H), 5.70 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 5.14 (br s, 2H), 3.88 (br s, 4H), 3.85 (s, 6H), 3.57-3.75 (m, 15H), 2.70 (br s, 2H), 2.62 (br s, 4H); HRMS (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₅H₃₉N₈O₇S, 595.2662; encontrado, 595.2684. HPLC: (a) H₂O + 0.1 % TFA (b) ACN + 0.1 % TFA (5 a 95 % ACN en 10 min.) Rt = 6.05 min.

(50) - 5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoato de 2-(2-(2-(2-(4-(5-(4,6-diaminopirimidin-2-iltio)-4,6-dimetoxipirimidin-2-il) piperazin-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)etilo

30 Durante 13 horas en un tubo sellado se trataron con ultrasonido 50.0 mg (0.0925 mmol) de 48, 90.0 mg (0.37 mmol) D-(+)-biotina, 11.3 mg (0.0925 mmol) DMAP, 153.0 mg (0.74 mmol) DCC en 15 ml de CH₂Cl₂. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad y el residuo se cromatografió en columna (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 20:1 a 10:1) para dar 50 impuro que se purificó por TLC preparatoria (CHCl₃:MeOH-NH₃ (7N), 10:1) para producir 60.0 mg (85 %) de 50. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 5.27 (br s, 1H), 5.18 (s, 1H), 4.82 (br s, 1H), 4.59 (br s, 4H), 4.49 (m, 1H), 4.32 (m, 1H), 4.22 (m, 2H), 3.88 (br s, 10H), 3.60-3.75 (m, 12H), 3.15 (m, 1H), 2.92 (m, 1H), 2.90 (m, 1H), 2.69 (m, 2H), 2.60 (m, 4H), 2.34 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 1.37-1.78 (m, 6H); HRMS (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₃₂H₅₁N₁₀O₈S₂, 767.3333; encontrado 767.3361.

YK55 (9) - 5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno [3,4-d] imidazol-4-il)pentanoato de 2-(2-(2-(2-(4-(5-(4-acrilamido-6-aminopirimidin-2-iltio)-4,6-dimetoxipirimidin-2-il)piperazin-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)etilo

40 A 50.0 mg (0.065 mmol) de 50 en 10 ml de CH₂Cl₂ a 0°C se adicionaron 195.4 mg (271 µl, 1.953 mmol) de Et₃N. Entonces se adicionaron 17.7 mg (15.9 µl, 0.196 mmol) de cloruro de acrililo a 0°C. Después de 1 hora se adicionaron 17.7 mg adicionales (15.9 µl, 0.196 mmol) de cloruro de acrililo. Esto se repitió cuatro veces más durante un tiempo total de reacción de 6 horas (cloruro de acrililo total, 106.2 mg, 95.4 µl, 1.17 mmol). La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria (CHCl₃:MeOH-NH₃ (7N), 10:1) para producir 22.0 mg (41 %) de 9. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.99 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.40 (d, J = 16.8 Hz, 1H), 6.31 (dd, J = 16.7, 9.9 Hz, 1H), 5.79 (br s, 1H), 5.74 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 5.09 (s, 2H), 5.08 (s, 1H), 4.50 (m, 1H), 4.36 (m, 1H), 4.21 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.87 (s, 10H), 3.6-3.75 (m, 12H), 3.16 (m, 1H), 2.91 (dd, J = 12.8, 5.0 Hz, 1H), 2.74 (d, J = 12.8 Hz, 1H), 2.70 (t, J = 5.4 Hz, 2H), 2.61 (t, J = 4.8 Hz, 4H), 2.31 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.37-1.8 (m, 6H); RMN ¹³C (166 MHz, CDCl₃): δ 172.9, 170.4, 169.5, 164.1, 164.0, 163.2, 159.3, 156.3, 130.3, 127.9, 88.1, 78.9, 69.9, 69.8, 69.7, 68.5, 68.0, 62.8, 61.4, 59.6, 57.7, 57.1, 54.9, 53.5, 52.5, 42.9, 39.9, 33.1, 27.8, 27.6, 24.0; HRMS (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₃₅H₅₃N₁₀O₉S₂, 821.3438; encontrado 821.3455; HPLC: (a) H₂O + 0.1 % TFA (b) ACN + 0.1 % TFA (5 a 95 % ACN en 10 min.) Rt = 6.98 min.



Esquema 5. Preparación de Cy3B-YK5 (57)

- 5 **Reactivos y condiciones:** a. piperazina, DMF, 90°C, 1 h, b. N-(4-bromobutil)ftalamida, DMF, 80°C, 1 h, c. hidrazina, THF, temperatura ambiente, 16h, d. NaOH, metanol, 60°C, 1 h, e. di-t-butildicarbonato, Et₃N, CH₂Cl₂, temperatura ambiente, 2h, f. cloruro de acrililo, Et₃N, CH₂Cl₂, g. TFA CH₂Cl₂ (1:4), temperatura ambiente, 1 h, h. Cy3B-OSu, DMF, temperatura ambiente, 12 h

(51) N,N'-(2-((4,6-dimethoxy-2-(piperazin-1-yl)pirimidin-5-il)tio)pirimidina-4,6-diil)diacetamida

- 10 Una solución de 24 (100 mg, 0.26 mmol) y piperazina (45 mg, 0.52 mmol) en 5 mL de DMF se calentó a 90°C durante 1 hora. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 10:1) para dar 84 mg (72 %) de 51. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 8.20 (s, 1H), 8.03 (s, 2H), 3.87 (s, 6H), 3.80 (m, 4H), 3.45 (m, 4H), 2.08 (s, 6H); MS (m/z): [M+H]⁺ 449.1.

(52) N,N'-(2-((2-(4-(4-(1,3-dioxisoindolin-2-il)butil)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-il)tio)pirimidina-4,6-diil)diacetamida

- 15 Una solución de 51 (50 mg, 0.111 mmol) y N-(4-bromobutil)ftalamida (125 mg, 0.446 mmol) en 5 mL de DMF se calentó a 80°C durante 1 hora. El solvente se removió bajo presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 10:1) para dar 61 mg (86 %) de 52. MS (m/z): [M+H]⁺ 650.1.

(53) 2-((2-(4-(4-aminobutil)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-il)tio)pirimidina-4,6-diamina [YK91]

- 20 A una solución de 52 (61 mg, 0.095 mmol) en 3 mL de THF se adicionó hidrazina (100 µL). La mezcla resultante se agitó durante 16 h a temperatura ambiente, luego el solvente se evaporó bajo presión reducida. Al residuo se adicionó metanol (10 ml), hidróxido de sodio (500 mg) y la mezcla se calentó a 60°C durante 1 hora. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 10:1) para dar 25 mg (60 %) de 53. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 5.16 (s, 1H), 4.58 (s, 4H), 3.87 (s, 6H), 3.71 (m, 4H), 2.75 (m, 2H), 2.50 (m, 4H), 2.36 (m, 2H), 1.68 (m, 2H), 1.60 (m, 2H); MS (m/z): [M+H]⁺ 436.1.

(54) 4-(4-(5-(4,6-diaminopirimidin-2-iltio)-4,6-dimetoxipirimidin-2-il)piperazin-1-il)butilcarbamato de ter-butilo

A una solución de 53 (80 mg, 0.18 mmol) y Et₃N (100 µL) en 3 mL de CH₂Cl₂ se adicionó dicarbonato de di-*t*-butilo (39 mg, 0.18 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2h. El solvente se evaporó bajo presión reducida, el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂: MeOH-NH₃ (7N), 10:1) para dar 95 mg (95 %) de 54 que se llevó a la siguiente reacción.

5 (55) 4-(4-(5-((4,6-diaminopirimidin-2-il)tio)-4,6-dimetoxipirimidin-2-il)piperazin-1-il)butil)carbamato de *ter*-butilo

A una solución de 54 (95 mg, 0.18 mmol) y Et₃N (94 µl) en 5 mL de CH₂Cl₂ se adicionó cloruro de acrililo en porciones. La reacción se monitorizó por TLC, cuando desapareció el SM, la reacción se extinguió al adicionar metanol bajo condiciones de enfriamiento. El producto se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 10:1) para dar 48 mg (46 %) de 55. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 8.21 (s, 1H), 7.05 (s, 1H), 6.42 (m, 1H), 6.32 (m, 1H), 5.79 (m, 1H), 3.88 (s, 6H), 3.87 (m, 4H), 3.15 (m, 2H), 2.49 (m, 4H), 2.39 (m, 4H), 1.59 (m, 4H), 1.44 (s, 9H); MS (m/z): [M+H]⁺ 590.4.

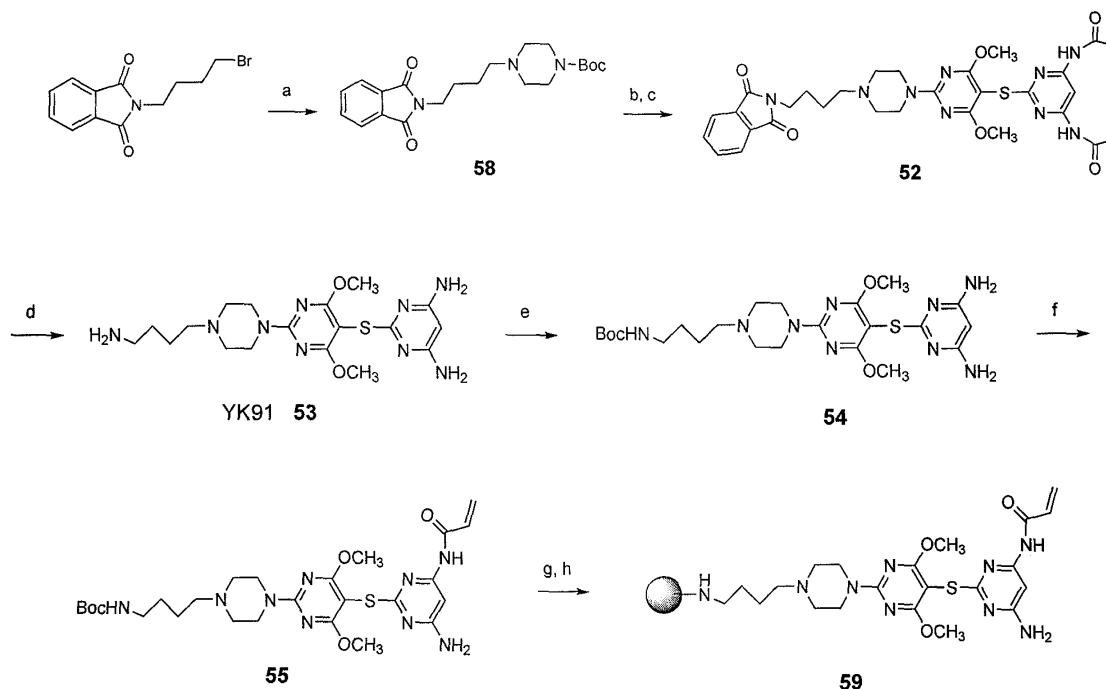
10 (56) N-(6-amino-2-((2-(4-(4-aminobutil)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-il)tio)pirimidin-4-il)acrilamida

La solución de 55 (48 mg, 17 mmol) en 20 % TFA-CH₂Cl₂ se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se secó bajo alto vacío para dar 31 mg (80 %) de 56 que se usó sin purificación adicional. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.01 (s, 1H), 6.40 (m, 1H), 6.29 (m, 1H), 5.80 (m, 1H), 3.88 (s, 6H), 3.86 (m, 4H), 2.75 (t, J = 7.5, 2H), 2.54 (m, 4H), 2.45 (m, 2H), 1.59 (m, 4H); MS (m/z): [M+H]⁺ 490.2.

15 (57) Cy3B-YK5

Una solución de Cy3B-OSu (1 mg, 0.00178 mmol) y 56 (1.74 mg, 0.0035 mmol) en 100 µL de DMF se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. El producto se purificó por HPLC para dar 57 (0.54 mg, rendimiento de 30 %). MS (m/z): [M+H]⁺ 1312.4.

20



Esquema 6. Preparación de cuentas de YK5 (59).

25 Reactivos y condiciones: a. 1-Boc-piperazina, NaI, K₂CO₃, acetona, reflujo, 22 h; b. CH₂Cl₂:TFA (4:1), temperatura ambiente, 1 h; c. 24, K₂CO₃, 90°C, 1.5 h; d. hidrato de hidrazina, MeOH, temperatura ambiente, 2 h, luego 1 M NaOH, 55°C, 2 h; e. di-*t*-butildicarbonato, Et₃N, CH₂Cl₂, temperatura ambiente, 20 h; f. cloruro de acrililo, Et₃N, CH₂Cl₂, 0°C, 2 h; g. CH₂Cl₂:TFA (4:1), temperatura ambiente, 45 min.; h. Affi-Gel^{MR} 10 cuentas, DIEA, DMAP, DMF, 3 h.

30 (58) 4-(4-(1,3-dioxoisindolin-2-il)butil)piperazina-1-carboxilato de *ter*-butilo

Se adicionaron N-(4-Bromobutil)ftalimida (1.95 g, 6.89 mmol) y yoduro de sodio (81 mg, 0.537 mmol) a una suspensión de K₂CO₃ (1.64 g, 11.88 mmol) y 1-Boc-piperazina (1.00 g, 5.37 mmol) en acetona (25 mL) y se sometió a reflujo

durante 22 horas. La mezcla de reacción se filtró y el sólido se lavó con acetona (3 x 50 mL). El filtrado se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano:EtOAc, 7:3 a 0:1) para dar 2.08 g (100 %) de 58. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7.84 (dd, J = 3.0, 5.4 Hz, 2H), 7.71 (dd, J = 3.0, 5.4 Hz, 2H), 3.71 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 3.38-3.43 (m, 4H), 2.32-2.40 (m, 6H), 1.70 (m, 2H), 1.53 (m, 2H), 1.45 (s, 9H); MS (m/z): [M+H]⁺ 388.4.

5 (52) N,N'-(2-(2-(4-(4-(1,3-dioxoisindolin-2-il)butil) piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidina-4,6-diil)diacetamida

10 A 58 (429.7 mg, 1.11 mmol) en CH₂Cl₂ (12 mL) se adicionó TFA (3 mL) gota a gota y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el TFA se removió al co-evaporar con MeOH varias veces y al secar bajo alto vacío durante la noche. A esto se adicionó K₂CO₃ (384 mg, 2.78 mmol) y DMF (21 mL) y la suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. Entonces se adicionó 24 (424 mg, 1.11 mmol) y la suspensión se calentó a 90°C durante 90 minutos. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH, 100:1 a 40:1) para dar 0.355 g (49 %) de 52. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.35 (br s, 1H), 7.82-7.88 (m, 4H), 7.72 (dd, J = 3.1, 5.5 Hz, 2H), 3.88 (s, 6H), 3.84 (m, 4H), 3.74 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.48 (m, 4H), 2.43 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.16 (s, 6H), 1.74 (m, 2H), 1.59 (m, 2H); MS (m/z): [M+H]⁺ 650.5.

15 YK91 (53) 2-(2-(4-(4-aminobutil)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidina-4,6-diamina

20 Se adicionó 52 (0.355 g, 0.546 mmol) en MeOH (10 mL) a hidrato de hidrazina (797 µL, 0.820 g, 16.4 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Luego, se adicionaron 5 mL de NaOH 1 M y la mezcla de reacción se calentó a 55°C durante 2 horas. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 20:1 a 5:1) para dar 0.228 g (96 %) de 53. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃/MeOH-d₄): δ 5.22 (s, 1H), 3.88 (s, 10H), 2.72 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.53 (m, 4H), 2.42 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.46-1.62 (m, 4H); MS (m/z): [M+H]⁺ 436.4.

(54) 4-(4-(5-(4,6-diaminopirimidin-2-iltio)-4,6-dimetoxipirimidin-2-il)piperazin-1-il)butilcarbamato de ter-butilo

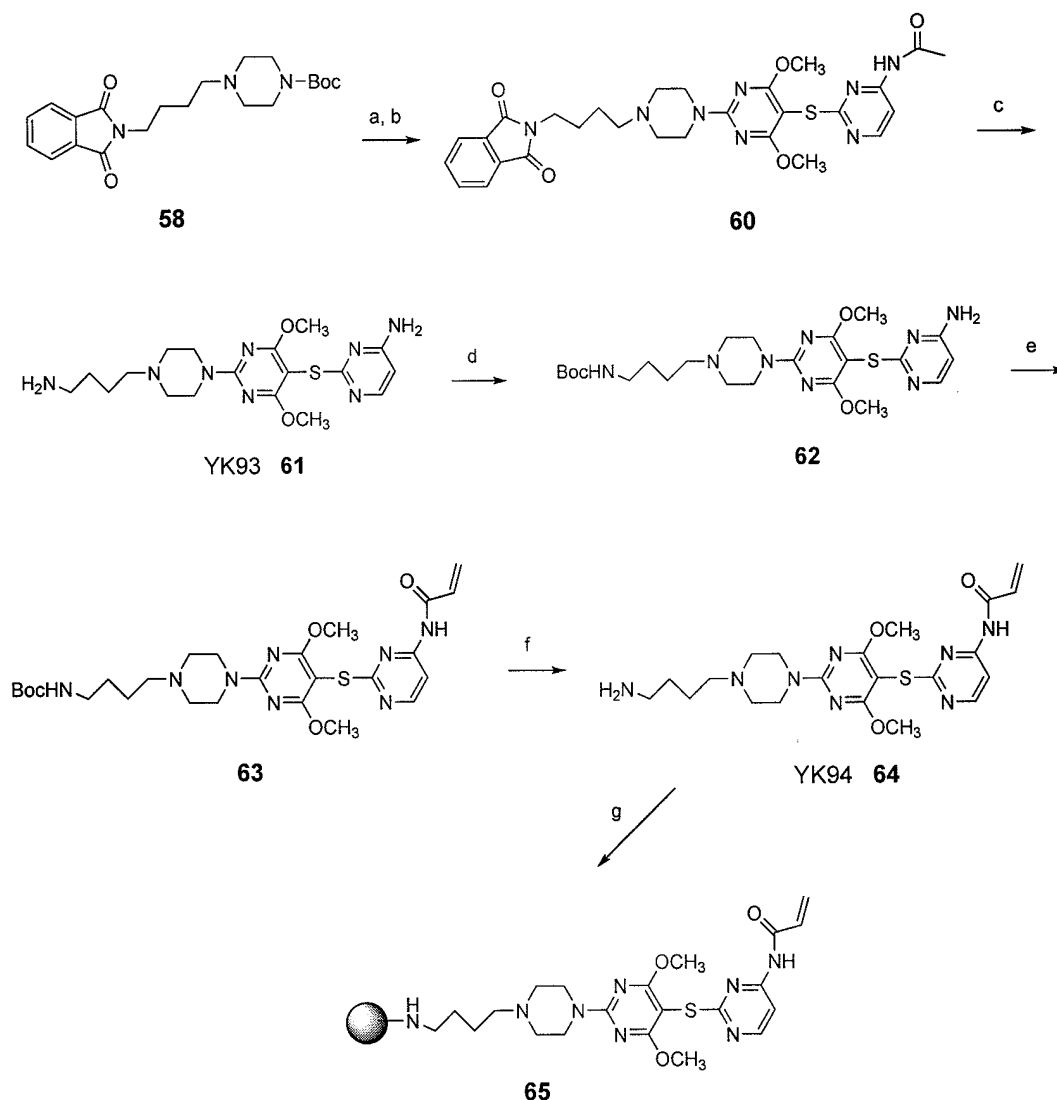
25 Se adicionó 53 (0.221 g, 0.507 mmol) en CH₂Cl₂ (6 mL) Et₃N (107 µL, 77 mg, 0.761 mmol) y dicarbonato de di-t-butilo (0.133 g, 0.611 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 100:1 a 30:1) para dar 0.254 g (93 %) de 54. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 5.19 (s, 1H), 4.41 (s, 4H), 3.89 (m, 10H), 3.14 (m, 2H), 2.50 (m, 4H), 2.40 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.54-1.63 (m, 4H), 1.44 (s, 9H); MS (m/z): [M+H]⁺ 536.5.

(55) 4-(4-(5-(4-acrilamido-6-aminopirimidin-2-iltio)-4,6-dimetoxipirimidin-2-il)piperazin-1-il)butilcarbamato de ter-butilo

30 A 80 mg (0.149 mmol) de 54 en 8 ml de CH₂Cl₂ a 0°C se adicionaron 414 µl (298 mg, 2.98 mmol) de Et₃N. Entonces, se adicionaron 14.5 µl (16.2 mg, 0.179 mmol) de cloruro de acrililo. Después de 30 minutos, se adicionaron 14.5 µl adicionales de cloruro de acrililo a 0°C. Esto se repitió dos veces más para un tiempo total de reacción de 2 horas (cloruro de acrililo total, 58 µl, 64.8 mg, 0.716 mmol). La reacción se extinguió por la adición de MeOH 1 mL y luego se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 15:1) para producir 42.5 mg (48 %) de 55. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7.78 (s, 1H), 7.05 (s, 1H), 6.42 (d, J = 16.9 Hz, 1H), 6.18 (dd, J = 10.4, 16.9 Hz, 1H), 5.80 (d, J = 10.2, 1H), 5.15 (br s, 1H), 4.80 (br s, 2H), 3.89 (s, 10H), 3.14 (m, 2H), 2.54 (m, 6H), 1.58 (m, 4H), 1.44 (s, 9H); MS (m/z): [M+H]⁺ 590.5.

(59) Cuentas de YK5

40 Una solución de 55 (45 mg, 0.076 mmol) en 3 ml de CH₂Cl₂ se adicionó a 0.75 mL de TFA gota a gota a temperatura ambiente. Después de la agitación durante 45 minutos, la mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida. Se removió el TFA al co-evaporar con MeOH varias veces y al secar bajo alto vacío durante la noche para producir un residuo que se disolvió en DMF (2 mL) y se adicionó a 4.2 mL (0.0636 mmol) de cuentas Affi-Gel^{MR} 10 (pre-lavadas, 3 x 6 mL de DMF) en un recipiente de síntesis de péptido en fase sólida. Se adicionaron 100 µL de N,N-diisopropiletilamina y varios cristales de DMAP y esto se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Entonces, el solvente se removió y las cuentas se lavaron durante 10 minutos cada vez con CH₂Cl₂ (4 x 10 mL), DMF (4 x 10 mL), y i-PrOH (3 x 10 mL).
45 Las cuentas de YK5 (59) se almacenaron en i-PrOH a -80°C.



Esquema 7. Preparación de Cuentas de YK71 (65).

- 5 **Reactivos y condiciones:** a. CH₂Cl₂:TFA (4:1), temperatura ambiente, 1 h; b. N-(2-(2-fluoro-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acetamida, K₂CO₃, 90°C, 1.5 h; c. hidrato de hidrazina, MeOH, temperatura ambiente, 20 h, luego 50°C, 3 h; d. dicarbonato de di-t-butilo, Et₃N, CH₂Cl₂, temperatura ambiente, 20 h; e. cloruro de acrililoilo, Et₃N, CH₂Cl₂, 0°C, 1.5 h; f. CH₂Cl₂:TFA (4:1), temperatura ambiente, 45 min.; g. cuentas Affi-Gel^{MR} 10, DIEA, DMAP, DMF, 3 h.

(60) N-(2-(2-(4-(4-(1,3-dioxoisindolin-2-il)butil) piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acetamida

- 10 A **58** (402.4 mg, 1.04 mmol) en CH₂Cl₂ (12 mL) se adicionó TFA (3 mL) gota a gota y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el TFA se removió al co-evaporar con MeOH varias veces y al secar bajo alto vacío durante la noche. A esto se adicionó K₂CO₃ (359 mg, 2.6 mmol) y DMF (20 mL) y la suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. Entonces se adicionó N-(2-(2-fluoro-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acetamida (338 mg, 1.04 mmol) y la suspensión se calentó a 90°C durante 90 minutos. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH, 100:1 a 40:1) para dar 0.60 g (97 %) de **60**. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.34 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 7.85 (dd, J = 3.0, 5.4 Hz, 2H), 7.81 (br s, 1H), 7.59-7.71 (m, 3H), 3.88 (s, 6H), 3.85 (m, 4H), 3.74 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.49 (m, 4H), 2.43 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.18 (s, 3H), 1.75 (m, 2H), 1.60 (m, 2H); MS (m/z): [M+H]⁺ 593.4.

YK93 (61) 2-(2-(4-(4-aminobutil)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-amina

- 20 A **60** (0.600 g, 1.01 mmol) en MeOH (28 mL) se adicionó hidrato de hidrazina (813 µL, 0.836 g, 16.7 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. Entonces se adicionó hidrato de hidrazina adicional (813 µL, 0.836 g, 16.7

mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 50°C durante 3 horas. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 80:1 a 10:1) para dar 0.370 g (87 %) de 61. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃/MeOH-d₄): δ 7.85 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 6.11 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 3.88 (s, 10H), 2.71 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.53 (m, 4H), 2.42 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.47-1.63 (m, 4H); MS (m/z): [M+H]⁺ 421.3.

5 (62) 4-(4-(5-(4-aminopirimidin-2-iltio)-4,6-dimetoxipirimidin-2-il)piperazin-1-il)butilcarbamato de ter-butilo

A 61 (0.370 g, 0.880 mmol) en CH₂Cl₂ (10 mL) se adicionó Et₃N (186 µL, 134 mg, 1.32 mmol) y dicarbonato de di-t-butilo (0.230 g, 1.06 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH:MeOH-NH₃ (7N), 100:1:0 a 50:0:1) para dar 0.44 g (96 %) de 62. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7.97 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 6.05 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 5.21 (br s, 1H), 4.76 (br s, 2H), 3.89 (s, 6H), 3.87 (m, 4H), 3.15 (m, 2H), 2.49 (m, 4H), 2.40 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.54-1.63 (m, 4H), 1.44 (s, 9H); MS (m/z): [M+H]⁺ 521.3.

10 (63) 4-(4-(5-(4-acrilamidopirimidin-2-iltio)-4,6-dimetoxipirimidin-2-il)piperazin-1-il)butilcarbamato de ter-butilo

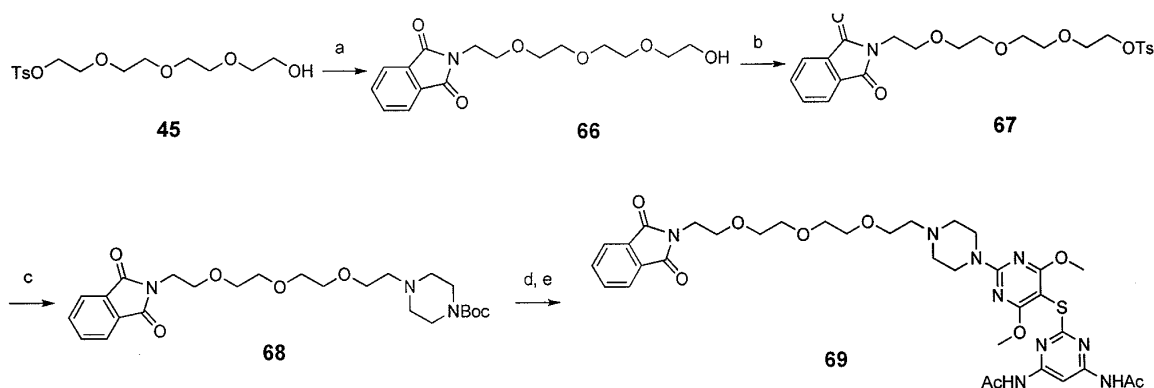
A 100 mg (0.192 mmol) de 62 en 10 ml de CH₂Cl₂ a 0°C se adicionaron 533 µl (384 mg, 3.84 mmol) de Et₃N. Entonces se adicionaron 19 µl (21 mg, 0.23 mmol) de cloruro de acrililoilo. Después de 30 minutos, a 0°C se adicionaron 19 µl adicionales de cloruro de acrililoilo. Esto se repitió una vez más para un tiempo total de reacción de 1.5 horas (cloruro de acrililoilo total, 57 µl, 63 mg, 0.69 mmol). La reacción se extinguió por la adición de 2 mL de MeOH y luego se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 20:1) para producir 72 mg (65 %) de 63. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.83 (br s, 1H), 8.36 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 6.46 (d, J = 16.9 Hz, 1H), 6.28 (dd, J = 10.2, 16.9 Hz, 1H), 5.81 (d, J = 10.2 Hz, 1H), 5.23 (br s, 1H), 3.87 (s, 6H), 3.85 (m, 4H), 3.16 (m, 2H), 2.48 (m, 4H), 2.40 (m, 2H), 1.57 (m, 4H), 1.44 (s, 9H); RMN ¹³C (166 MHz, CDCl₃): δ 171.4, 171.0, 164.4, 160.1, 158.9, 157.4, 156.1, 130.4, 129.7, 106.0, 79.1, 78.9, 58.2, 53.4, 52.9, 43.6, 40.5, 28.5, 28.0, 24.3; MS (m/z): [M+H]⁺ 575.3.

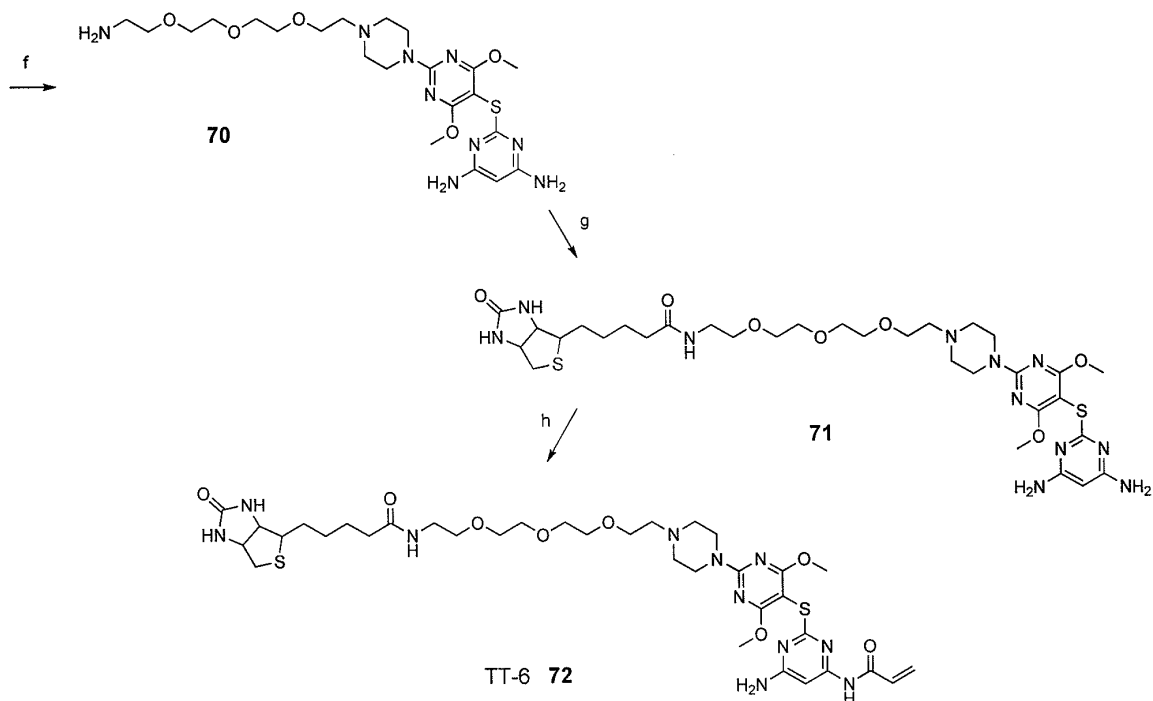
15 YK94 (64) N-(2-(2-(4-(4-aminobutil)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida

A 70 mg (0.122 mmol) de 63 en 4 ml de CH₂Cl₂ se adicionó 1 mL de TFA gota a gota a temperatura ambiente. Después de la agitación durante 45 minutos, la mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida. Se removió el TFA al co-evaporar con MeOH varias veces y al secar bajo alto vacío durante la noche para producir 64 como sal de TFA y se usó sin purificación adicional. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃/MeOH-d₄): δ 8.33 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 8.19 (br s, 1H), 8.03 (d, J = 6.1 Hz, 1H), 6.51 (d, J = 16.9 Hz, 1H), 6.40 (dd, J = 10.6, 16.9 Hz, 1H), 5.88 (d, J = 10.6 Hz, 1H), 3.90 (s, 6H), 3.55-3.72 (m, 2H), 3.38-3.54 (m, 2H), 3.19 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 2.94-3.13 (m, 4H), 1.86-1.95 (m, 2H), 1.73-1.82 (m, 2H); RMN ¹³C (166 MHz, CDCl₃/MeOH-d₄): δ 171.4, 170.2, 165.4, 159.9, 158.9, 155.7, 130.5, 129.9, 106.2, 79.2, 56.2, 54.4, 51.5, 40.7, 38.6, 24.1, 20.6; MS (m/z): [M+H]⁺ 475.4.

20 (65) Cuentas de YK71

Una solución de 64 (~ 0.122 mmol) en DMF (4 mL) se adicionó a 6.8 mL de (0.102 mmol) de cuentas Affi-Gel^{MR} 10 (pre-lavadas, 3 x 10 mL de DMF) en un recipiente de síntesis de péptidos en fase sólida. Se adicionaron 100 µL de N,N-diisopropiletilamina y varios cristales de DMAP y esto se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Entonces el solvente se removió y las cuentas se lavaron durante 10 minutos cada vez con CH₂Cl₂ (4 x 10 mL), DMF (4 x 10 mL), e i-PrOH (3 x 10 mL). Las cuentas de YK71 (65) se almacenaron en i-PrOH a -80°C.





Esquema 8. Síntesis de TT-6 (72).

Reactivos y condiciones: a. ftalimida potásica, DMF, 110°C, 18 h; b. cloruro de p-tosilo, Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂, 5°C a temperatura ambiente, 24 h; c. 1-Boc-piperazina, K₂CO₃, dioxano, 80°C, 22 h; d. CH₂Cl₂:TFA (4:1), temperatura ambiente, 1 h; e. 24, K₂CO₃, DMF, 90°C, 1.5 h; f. NH₂NH₂, MeOH, temperatura ambiente, 2 h entonces 1M NaOH (aq.), 50°C, 1.5 h; g. D-biotina, EDCI, DMAP, CH₂Cl₂, tratar con ultrasonido, 2 h; h. cloruro de acrilóilo, Et₃N, CH₂Cl₂, 0°C.

(66) 2-(2-(2-(2-(2-hidroxi)etoxi)etoxi)etoxi)etil) isoindolina-1,3-diona

45 (1.22 g, 3.5 mmol) y ftalimida potásica (0.713 g, 3.85 mmol) se suspendieron en DMF anhidra (10 mL) y se calentaron a 110°C durante 18 h. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se disolvió en CH₂Cl₂ (50 mL) y se lavó con HCl 1M (2 x 20 mL), salmuera (2 x 20 mL), y se secó sobre MgSO₄, y se filtró. El solvente se removió bajo presión reducida para dar un aceite que se purificó por cromatografía en columna (EtOAc) para dar 0.95 g (84 %) de 66. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7.85 (dd, J = 3.1, 5.4 Hz, 2H), 7.72 (dd, J = 3.0, 5.5 Hz, 2H), 3.91 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 3.75 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 3.55-3.73 (m, 12H); MS (m/z): [M+Na]⁺ 346.1.

(67) 4-metilbencenosulfonato de 2-(2-(2-(2-(1,3-dioxoisoindolin-2-il)etoxi)etoxi)etoxi)etilo

Una solución de 66 (0.95 g, 2.7 mmol), Et₃N (395 µL, 0.287 g, 2.8 mmol) y DMAP (33 mg, 0.27 mmol) en CH₂Cl₂ (30 mL) se enfrió a 5°C con baño de hielo. Se adicionó cloruro de tosilo (0.515 g, 2.7 mmol) en porciones a 5°C y después de 30 minutos se movió el baño de hielo y se continuó una agitación a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se adicionó a un embudo de separación y se lavó con HCl 1N (2 x 25 mL), agua (25 mL), y salmuera (2 x 25 mL). La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y concentró para dar un aceite que se purificó por cromatografía en columna (hexano:EtOAc, 6:4 a 4:6) para dar 1.12 g (87 %) de 67. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7.84 (dd, J = 3.1, 5.4 Hz, 2H), 7.79 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.72 (dd, J = 3.0, 5.5 Hz, 2H), 7.34 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 4.14 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.89 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 3.73 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 3.48-3.68 (m, 10H), 2.44 (s, 3H); MS (m/z): [M+Na]⁺ 500.0.

(68) 4-(2-(2-(2-(2-(1,3-dioxoisoindolin-2-il)etoxi)etoxi)etoxi)etil)piperazina-1-carboxilato de ter-butilo

67 (1.10 g, 0.0023 mol) en dioxano (25 mL) se adicionó a 1-Boc-piperazina (1.07 g, 0.0058 mol) y K₂CO₃ (1.37 g, 0.0099 mol) y se calentó a 80°C durante 22 horas. Se removió el solvente bajo presión reducida y el residuo se tomó en CH₂Cl₂ (100 mL) y se lavó con agua (2 x 50 mL) y salmuera (2 x 50 mL). La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y concentró a un aceite que se purificó en cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 1:0 a 30:1) para dar 0.819 g (72 %) de 68. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7.84 (dd, J = 3.1, 5.4 Hz, 2H), 7.71 (dd, J = 3.0, 5.5 Hz, 2H), 3.90 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 3.74 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 3.52-3.67 (m, 10H), 3.43 (m, 4H), 2.57 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.43 (m, 4H), 1.45 (m, 9H); MS (m/z): [M+H]⁺ 492.1.

(69) N,N'-(2-(2-(4-(2-(2-(2-(2-(1,3-dioxoisindolin-2-il) etoxi)etoxi)etoxi)etil)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidina-4,6-diil)diacetamida

5 A 68 (542 mg, 1.10 mmol) en CH₂Cl₂ (28 mL) se adicionó TFA (7 mL) gota a gota y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y se removió el TFA por co-evaporación con MeOH varias veces y se secó bajo alto vacío durante la noche. A esto se adicionaron K₂CO₃ (381 mg, 2.76 mmol) y DMF (20 mL) y la suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Entonces se adicionó 24 (421 mg, 1.1 mmol) y la suspensión se calentó a 90°C durante 90 minutos. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH, 100:1 a 25:1) para dar 0.537 g (65 %) de 69. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.35 (s, 1H), 7.84 (dd, J = 3.1, 5.5 Hz, 2H), 7.81 (bs, 2H), 7.71 (dd, J = 3.1, 5.5 Hz, 2H), 3.83-3.92 (m, 12H), 3.74 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 3.55-3.67 (m, 10H), 2.64 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 2.56 (m, 4H), 2.15 (s, 6H); MS (m/z): [M+H]⁺ 754.2.

(70) 2-(2-(4-(2-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etoxi)etil)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidina-4,6-diamina

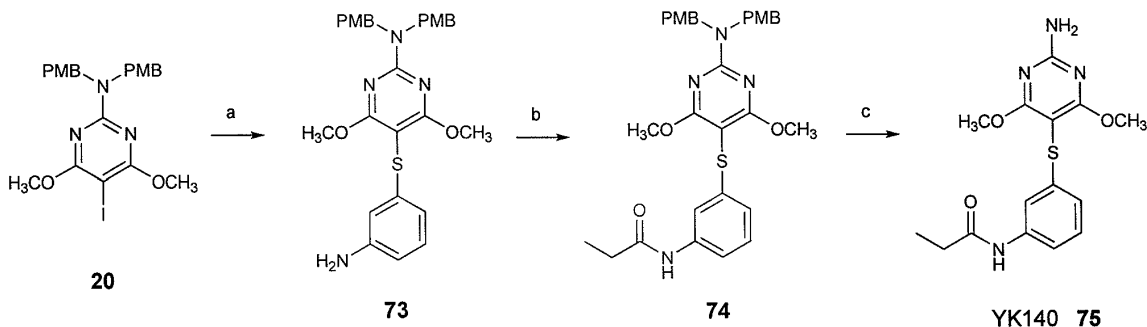
15 69 (300 mg, 0.398 mmol) en MeOH (9 mL) se adicionó a hidrato de hidracina (580 µL, 598 mg, 11.9 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Entonces se adicionó NaOH 1M (4.5 mL) y la mezcla de reacción se calentó a 50°C durante 1.5 horas. La mezcla de reacción se concentró a sequedad y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH, 60:1 a 10:1) para dar 0.214 g (93 %) de 70. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 5.16 (s, 1H), 4.56 (s, 4H), 3.84-3.91 (m, 10H), 3.61-3.69 (m, 10H), 3.51 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 2.86 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 2.66 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 2.57 (m, 4H); MS (m/z): [M+H]⁺ 540.1.

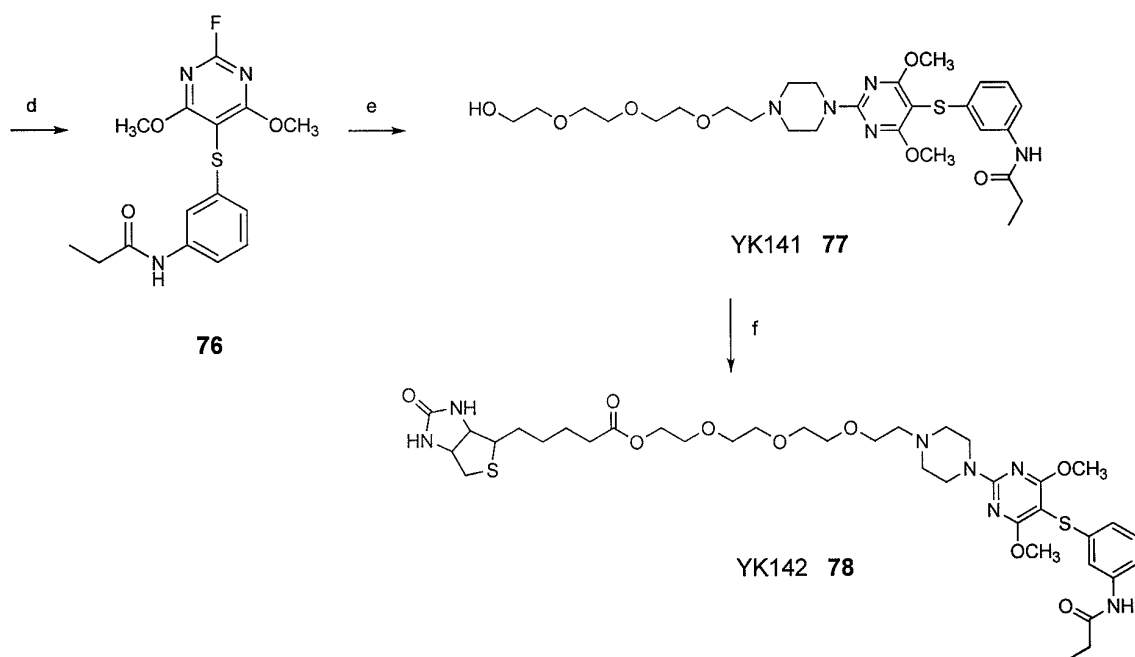
(71) N-(2-(2-(2-(2-(4-(5-(4,6-diaminopirimidin-2-iltio)-4,6-dimetoxipirimidin-2-il)piperazin-1-il)etoxi)etoxi)-etoxi)etil)-5-(2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamida

20 20.0 mg (0.0371 mmol) de 70, 18.1 mg (0.0741 mmol) de D-(+)-biotina, DMAP (cat.), 14.2 mg (0.0741 mmol) de EDCl en 1 ml de CH₂Cl₂ se trataron con ultrasonido durante 2 horas en un tubo sellado. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad y el residuo se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 10:1) para dar 15.6 mg (55 %) de 71. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃/MeOH-d₄): δ 5.23 (s, 1H), 4.49 (m, 1H), 4.30 (m, 1H), 3.86-3.91 (m, 10H), 3.60-3.72 (m, 12H), 3.40 (m, 2H), 3.12-3.18 (m, 1H), 2.91 (dd, J = 5.0, 12.9 Hz, 1H), 2.72 (d, J = 12.9 Hz, 1H), 2.68 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 2.60 (m, 4H), 2.19 (dd, J = 2.1, 7.7 Hz, 2H), 1.38-1.76 (m, 6H); MS (m/z): [M+H]⁺ 766.25.

TT-6 (72) N-(2-(2-(2-(2-(4-(5-(4-acrilamido-6-aminopirimidin-2-iltio)-4,6-dimetoxipirimidin-2-il)piperazin-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)etil)-5-(2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamida

30 A 15 mg (0.020 mmol) de 71 en 2 ml de CH₂Cl₂ a 0°C se adicionaron 83 µl (60 mg, 0.6 mmol) de Et₃N. Entonces se adicionaron 3.3 µl (3.6 mg, 0.04 mmol) de cloruro de acrililo en CH₂Cl₂ (0.5 mL) gota a gota a 0°C. Después de 1 hora, se adicionaron gota a gota 3.3 µl adicionales de cloruro de acrililo en CH₂Cl₂ (0.5 mL). Esto se repitió cuatro veces más a 30 minutos. Intervalos para un tiempo total de reacción de 3.5 horas (cloruro de acrililo total, 19.8 µl, 21.6 mg, 0.24 mmol). La reacción se extinguió por la adición de 1 mL de MeOH y luego se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 10:1) para producir 6.0 mg (37 %) de 72. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 9.57 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 6.94 (br s, 1H), 6.53 (br s, 1H), 6.32-6.45 (m, 2H), 5.72 (dd, J = 2.4, 9.0 Hz, 1H), 5.58 (br s, 2H), 5.19 (br s, 1H), 4.48 (m, 1H), 4.34 (m, 1H), 3.82-3.93 (m, 10H), 3.55-3.77 (m, 12H), 3.39 (m, 2H), 3.08-3.15 (m, 1H), 2.89 (dd, J = 5.1, 12.9 Hz, 1H), 2.81 (m, 2H), 2.72 (d, J = 12.9 Hz, 1H), 2.70 (m, 4H), 2.19 (m, 2H), 1.38-1.76 (m, 6H); RMN-¹³C (166 MHz, CDCl₃): δ 173.6, 171.0, 170.3, 165.1, 164.8, 163.8, 159.8, 157.1, 130.9, 128.8, 88.7, 79.5, 71.0, 70.4, 70.3, 70.2, 69.5, 62.3, 59.9, 57.3, 56.0, 54.2, 53.4, 52.5, 43.6, 40.7, 39.2, 35.4, 28.5, 28.0, 25.7; MS (m/z): [M+H]⁺ 820.3.





Esquema 9. Síntesis de YK140 (75), YK141 (77), YK142 (78)

Reactivos y condiciones: a. 3-aminobenzenotiol, neocuproina, CuI, K₂CO₃, DMF, 125°C, 20 h, b. cloruro de propionilo, Et₃N, CH₂Cl₂, 0°C hasta temperatura ambiente, c. CHCl₃:TFA (11), 62°C, 22 h, d. HF/piridina, NaNO₂, 0°C hasta temperatura ambiente, e. 46, DMF, 90°C, 75 mm, f. D-biotina, DCC, DMAP, CH₂Cl₂, tratar con ultrasonido, 6 h

(73) 5-(3-aminofeniltio)-4,6-dimetoxi-N,N-bis(4-metoxibencil)pirimidin-2-amina

Una mezcla de 20 (0.521 g, 1.0 mmol), 3-aminobenzenotiol (106 µL, 0.125 g, 1.0 mmol), neocuproina (42 mg, 0.2 mmol), yoduro de cobre (38 mg, 0.2 mmol), y carbonato de potasio (0.415 g, 3.0 mmol) en DMF (10 mL) se agitó a 125°C durante 20 horas. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano:EtOAc, 75:25) para dar 0.183 g (35 %) de 73. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7.23 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 7.00 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.87 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 6.54 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.44 (s, 1H), 6.41 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 4.76 (s, 4H), 3.89 (s, 6H), 3.81 (s, 6H), 3.59 (br s, 2H); MS (m/z): [M+H]⁺ 519.0.

(74) N-(3-(2-(bis(4-metoxibencil)amino)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)fenil)propionamida

A 183 mg (0.353 mmol) de 73 en 10 mL CH₂Cl₂ se adicionó Et₃N (492 µL, 357 mg, 3.53 mmol) y se enfrió a 0°C con baño de hielo. Se adicionó gota a gota una solución de cloruro de propionilo (168 µL, 179 mg, 1.765 mmol) en CH₂Cl₂ (5 mL) y se agitó a la mezcla de reacción. Después de 20 minutos. El baño de hielo se removió y la agitación se continuó durante 40 minutos adicionales. Se adicionaron 2 mL de MeOH para extinguir la reacción y el solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano:EtOAc, 70:30 a 60:40) para dar 0.188 g (93 %) de 74. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7.47 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.24 (d, J = 8.5 Hz, 4H), 7.17 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.08 (s, 1H), 7.01 (s, 1H), 6.87 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 6.83 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.77 (s, 4H), 3.89 (s, 6H), 3.81 (s, 6H), 2.36 (q, J = 7.5 Hz, 2H), 1.26 (t, J = 7.5 Hz, 3H); MS (m/z): [M+Na]⁺ 597.1.

YK140 (75) N-(3-(2-amino-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio) fenil)propionamida

Se calentaron 188 mg (0.327 mmol) de 74 en 5 mL de CHCl₃:TFA (1:1) a 62°C durante 22 horas. Se removió el solvente bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano:EtOAc, 1:1 a 4:6) para dar 90 mg (83 %) de 75. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7.43 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.15 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 6.95-7.06 (m, 3H), 6.74-6.85 (m, 2H), 3.90 (s, 6H), 2.36 (q, J = 7.6 Hz, 2H), 1.26 (t, J = 7.6 Hz, 3H); HRMS (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₁₅H₁₉N₄O₃S, 335.1178; encontrado, 335.1183.

(76) N-(3-(2-fluoro-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)fenil)-propionamida

Se adicionaron 60 mg (0.178 mmol) de 75 y piridina (250 µL) a un tubo de plástico equipado con una barra de agitación enfriado a 0°C. Entonces se adicionó una solución de HF/piridina (300 µL, 12 mmol). Después de varios minutos, se adicionaron 20 mg (0.290 mmol) de NaNO₂ y se agitó vigorosamente durante 90 minutos adicionales a 0°C y a temperatura ambiente durante 3 horas. Entonces se adicionaron 5 mL de CH₂Cl₂ y 100 mg

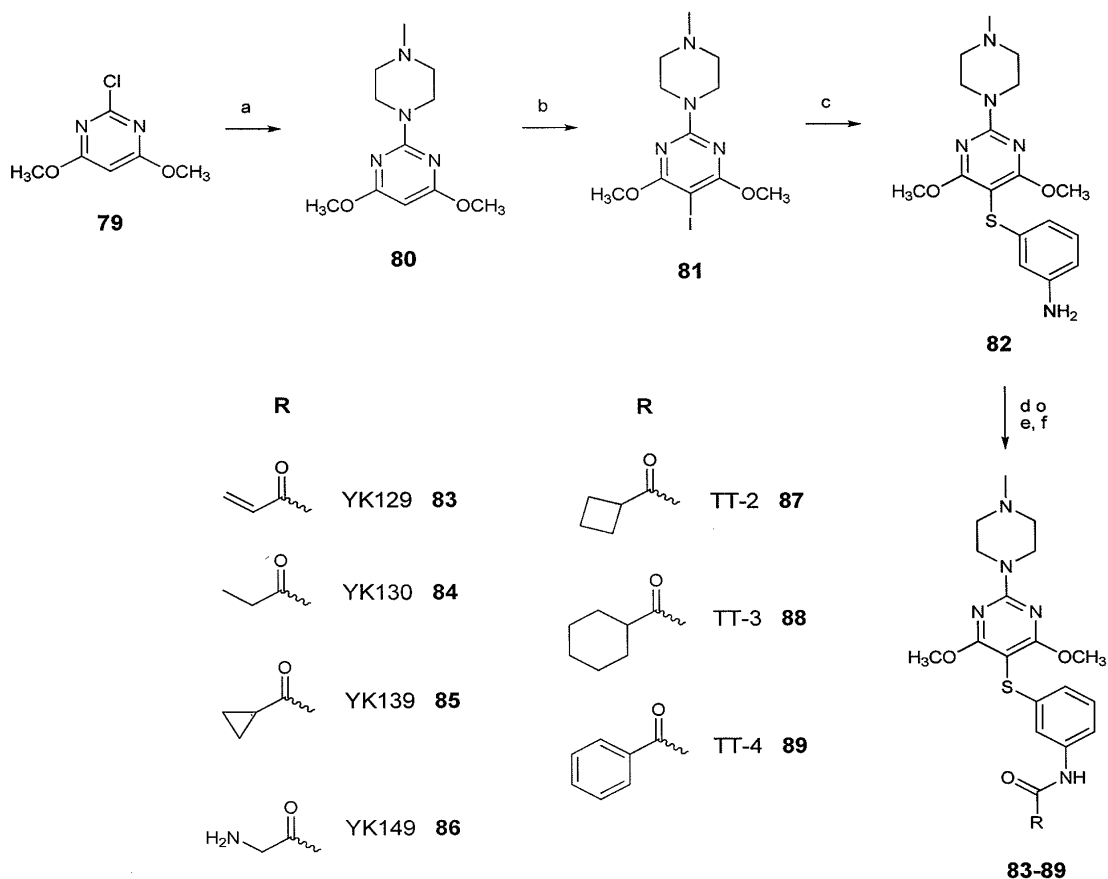
de CaCO₃ y la mezcla se agitó durante 5 horas a temperatura ambiente. Entonces se filtró sobre un embudo de discos sinterizado y el sólido se lavó con EtOAc. El filtrado se filtró sobre celita, se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria (hexano:EtOAc, 60:40) para dar 35 mg (58 %) de 76. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7.35 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.17 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 6.96-7.05 (m, 1H), 6.75-6.90 (m, 2H), 4.01 (s, 6H), 2.36 (q, J = 7.5 Hz, 2H), 1.23 (t, J = 7.5 Hz, 3H); MS (m/z): [M+H]⁺ 338.2.

YK141 (77) N-(3-(2-(4-(2-(2-(2-(2-hidroxietoxi)etoxi)etoxi)etil)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)fenil)propionamida

A 35 mg (0.104 mmol) de 76 en 2 ml de DMF se adicionaron 30 mg (0.114 mmol) de 46 y se calentó a 90°C durante 75 min. Se removió el solvente bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 15:1) para dar 44.2 mg (74 %) de 77. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7.51 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.14 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.80 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 3.94 (s, 4H), 3.89 (s, 6H), 3.60-3.80 (m, 15H), 2.60-2.82 (m, 6H), 2.35 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 1.21 (t, J = 7.4 Hz, 3H); HRMS (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₇H₄₂N₅O₇S, 580.2805; encontrado, 580.2806.

YK142 (78) 5-(2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il) pentanoato de 2-(2-(2-(2-(4-(4,6-dimetoxi-5-(3-propionamidofeniltio)pirimidin-2-il)piperazin-1-il)etoxi)etoxi) etoxi)etil

Durante 6 horas en un tubo sellado se trataron con ultrasonido 29 mg (0.050 mmol) de 77, 36 mg (0.147 mmol) D-(+)-biotina, DMAP (4.5 mg, 0.037 mmol), 61 mg (0.296 mmol) DCC en 5 ml de CH₂Cl₂. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad y el residuo se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 15:1) para dar 36 mg (90 %) de 78. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7.45-7.53 (m, 2H), 7.13 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 7.05 (s, 1H), 6.77 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 5.90 (s, 1H), 5.35 (s, 1H), 4.46-4.53 (m, 1H), 4.27-4.33 (m, 1H), 4.18-4.26 (m, 2H), 3.85-4.00 (m, 10H), 3.63-3.74 (m, 12H), 3.10-3.18 (m, 1H), 2.90 (dd, J = 4.5, 10.7 Hz, 1H), 2.74 (d, J = 10.7 Hz, 1H), 2.61 (m, 4H), 2.42 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.36 (m, 4H), 1.10-1.82 (m, 9H); HRMS (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₃₇H₅₆N₇O₉S₂, 806.3581; encontrado, 806.3566.



Esquema 10. Síntesis de YK129 (83), YK130 (84), YK139 (85), YK149 (86), TT-2 (87), TT-3 (88), TT-4 (89).

Reactivos y condiciones: a. N-metilpiperazina, DMF, 90°C, 2.5 horas; b. NIS, TFA, CH₃CN, temperatura ambiente, 1.5 horas; c. 3-aminobencenotiol, neocuproina, CuI, K₃PO₄, DMF, 125°C, 17 horas; d. RCOCl, Et₃N; e. RCOOH, DCC, THF, temperatura ambiente; f. CH₂Cl₂:TFA (4:1), temperatura ambiente.

(80) 4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidina

5 Durante 2.5 horas a 90°C se calentaron 5 g (0.0286 mol) de 2-cloro-4,6-dimetoxipirimidina (79) y 7.93 mL (7.16 g, 0.0715 mol) de N-metilpiperazina en 22 mL de DMF. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se tomó en 200 mL de CH₂Cl₂. Esto se lavó con salmuera (3 x 50 mL), se secó sobre MgSO₄, se filtró y concentró para dar 6.51 g (95 %) de 80. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 5.37 (s, 1H), 3.85 (s, 6H), 3.82 (m, 4H), 2.44 (m, 4H), 2.33 (s, 3H); RMN-¹³C (166 MHz, CDCl₃): δ 172.0, 160.8, 77.8, 55.0, 53.4, 46.3, 43.7; MS (m/z): [M+H]⁺ 239.2.

10 (81) 5-yodo-4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidina

A 1.59 g (6.67 mmol) de 80 en 40 mL de acetonitrilo se adicionaron 1.80 g (8.01 mmol) de N-yodosuccinimida, 0.771 mL (1.14 g, 10.0 mmol) de TFA y se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 horas. La mezcla de reacción se concentró a sequedad y el residuo se tomó en 100 mL de CH₂Cl₂ y se lavó con NaHCO₃ al 5 % (3 x 50 mL), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró para dar un residuo que se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 1:0 a 20:1) para producir 2.06 g (86 %) de 81. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 3.93 (s, 6H), 3.82 (m, 4H), 2.47 (m, 4H), 2.36 (s, 3H); MS (m/z): [M+H]⁺ 365.1.

YK133 (82) 3-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il) pirimidin-5-iltio)anilina

20 Una mezcla de 81 (0.500 g, 1.37 mmol), 3-aminobencenotiol (146 µL, 0.172 g, 1.37 mmol), neocuproina (86 mg, 0.411 mmol), yoduro de cobre (78 mg, 0.411 mmol), y fosfato de potasio (0.582 g, 2.74 mmol) en DMF (15 mL) se agitó a 125°C durante 17 horas. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 100:1 a 30:1) para dar 0.253 g (51 %) de 82. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 6.97 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 6.46-6.51 (m, 1H), 6.36-6.40 (m, 2H), 3.88-4.03 (m, 10H), 2.52 (m, 4H), 2.38 (s, 3H); RMN-¹³C (166 MHz, CDCl₃): δ 171.8, 160.1, 146.9, 139.5, 129.6, 116.2, 112.2, 112.1, 81.1, 55.0, 54.6, 46.3, 43.8; HRMS (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₁₇H₂₄N₅O₂S, 362.1651; encontrado, 362.1649.

YK129 (83) N-(3-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il) pirimidin-5-iltio)fenil)acrilamida

25 A una solución de 82 (10 mg, 0.027 mmol) y Et₃N (50 µL, 36 mg, 0.36 mmol) en 1 mL de CH₂Cl₂ se adicionó cloruro de acrililo (22 µL, 24.4 mg, 0.27 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas, luego se extinguió al adicionar MeOH frío. El solvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 20:1) para dar 6.0 mg (54 %) de 83. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7.49 (m, 1H), 7.36 (m, 1H), 7.14 (m, 2H), 6.84 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 6.36 (m, 1H), 6.22 (m, 1H), 5.73 (m, 1H), 4.02 (m, 4H), 3.90 (s, 6H), 2.70 (m, 4H), 2.50 (s, 3H); MS (m/z): [M+H]⁺ 416.4.

YK130 (84) N-(3-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)propionamida

35 A una solución de 82 (10 mg, 0.027 mmol) y Et₃N (50 µL, 36 mg, 0.36 mmol) en 1 mL de CH₂Cl₂ se adicionó cloruro de propionilo (22 µL, 24.4 mg, 0.27 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas luego se extinguió al adicionar MeOH frío. Se evaporó el solvente bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 20:1) para dar 7.3 mg (65 %) de 84. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7.44 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.13 (m, 2H), 7.04 (s, 1H), 6.78 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 3.93 (m, 4H), 3.90 (s, 6H), 2.55 (m, 4H), 2.36 (s, 3H), 2.33 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 1.21 (t, J = 7.2 Hz, 3H); HRMS (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₀H₂₈N₅O₃S, 418.1913; encontrado, 418.1910.

YK139 (85) N-(3-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il) pirimidin-5-iltio)fenil)ciclopropanocarboxamida

40 A una solución de 82 (10.9 mg, 0.0302 mmol) y Et₃N (21 µL, 15.3 mg, 0.151 mmol) en CH₂Cl₂ (1 mL) se adicionó cloruro de ciclopropanocarbonilo (14 µL, 15.8 mg, 0.1508 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se removió el solvente bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 20:1) para dar 7.9 mg (61 %) de 85. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7.49 (m, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.13 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.78 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 3.88-3.95 (m, 10H), 2.48 (m, 4H), 2.36 (s, 3H), 1.05-1.13 (m, 1H), 0.74-0.96 (m, 4H); HRMS (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₁H₂₈N₅O₃S, 430.1913; encontrado, 430.1897.

YK149 (86) 2-amino-N-(3-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida

A una solución de 82 (20 mg, 0.0552 mmol) en THF (1 mL) se adicionó Boc-glicina (9.7 mg, 0.0552 mmol) y DCC (12 mg, 0.058 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria (EtOAc:MeOH-NH₃ (7N), 20:1) para dar un sólido que se disolvió

en 2 mL de CH₂Cl₂:TFA (4:1) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 15:1) para dar 13.9 mg (60 %) de 86. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃/MeOH-d₄): δ 7.38 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.15 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 6.79 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 3.86-3.97 (m, 10H), 3.52 (s, 2H), 2.58 (m, 4H), 2.41 (s, 3H); MS (m/z): [M+H]⁺ 419.1.

5 TT-2 (87) N-(3-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il) pirimidin-5-iltio)fenil)ciclobutanocarboxamida

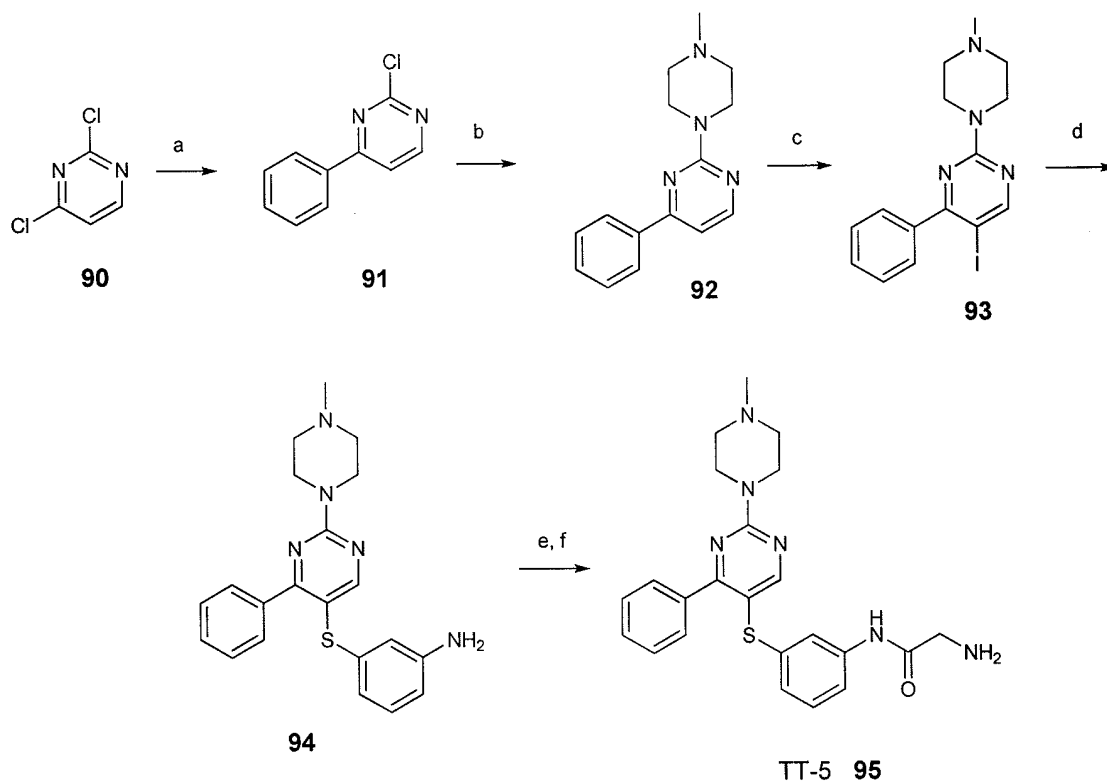
Durante 2 horas a temperatura ambiente se agitaron 82 (10 mg, 0.028 mmol), Et₃N (19.5 µl, 14.2 mg, 0.14 mmol) y cloruro de ciclobutanocarboxilo (9.6 µl, 10.0 mg, 0.084 mmol) en CH₂Cl₂ (1 mL). El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria (EtOAc:MeOH-NH₃ (7N), 20:1) para dar 4.1 mg (33 %) de 87. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7.50 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.14 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.94 (br s, 1H), 6.77 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 3.90 (br s, 10H), 3.07 (m, 1H), 2.50 (m, 14H), 2.14-2.42 (m, 7H), 1.82-2.02 (m, 2H); MS (m/z): [M+H]⁺ 444.1.

15 TT-3 (88) N-(3-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il) pirimidin-5-iltio)fenil)ciclohexanocarboxamida

Durante 3 horas a temperatura ambiente se agitaron 82 (10 mg, 0.028 mmol), Et₃N (19.5 µl, 14.2 mg, 0.14 mmol) y cloruro de ciclohexanocarboxilo (11.4 µl, 12.3 mg, 0.084 mmol) en CH₂Cl₂ (1 mL). El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria (EtOAc:MeOH-NH₃ (7N), 20:1) para dar 12 mg (91 %) de 88. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7.50 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.18 (s, 1H), 7.13 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.76 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 3.90 (br s, 10H), 2.51 (m, 4H), 2.38 (s, 3H), 2.11-2.22 (m, 1H), 1.19-1.96 (m, 10H); MS (m/z): [M+H]⁺ 472.0.

20 TT-4 (89) N-(3-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il) pirimidin-5-iltio)fenil)benzamida

Durante 3 horas a temperatura ambiente se agitaron 82 (10 mg, 0.028 mmol), Et₃N (19.5 µl, 14.2 mg, 0.14 mmol) y cloruro de benzoilo (9.8 µl, 11.8 mg, 0.084 mmol) en CH₂Cl₂ (1 mL). El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria (EtOAc:MeOH-NH₃ (7N), 20:1) para dar 8.6 mg (66 %) de 89. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7.83 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.74 (br s, 1H), 7.59 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.54 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 7.47 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 7.20 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 7.13 (s, 1H), 6.86 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 3.87-3.93 (m, 10H), 2.50 (m, 4H), 2.37 (s, 3H); MS (m/z): [M+H]⁺ 466.1.



25

Esquema 11. Síntesis de TT-5 (95).

Reactivos y condiciones: a. PhB(OH)₂, Na₂CO₃, Pd(OAc)₂, PPh₃, DME, 95°C, 15-20 h; b. N-metilpiperazina, DMF, 90°C, 1.5 horas; c. NIS, TFA, CH₃CN; d. 3-aminobencenotiol, neocuproina, CuI, K₃PO₄, DMF, 120°C, 12 horas; e. Boc-glicina,

DCC, THF, temperatura ambiente, 12 horas; f. CH₂Cl₂:TFA (4:1), temperatura ambiente.

(91) 2-cloro-4-fenilpirimidina

5 A una mezcla de 2,4-dicloropirimidina (90) (50 mg, 0.336 mmol), ácido fenilborónico (41 mg, 0.336 mmol), carbonato de sodio (110 mg en 0.5 mL de agua) y DME (2.5 mL) se adicionó acetato de paladio (3.8 mg, 0.0168 mmol) y trifenilfosfina (8.8 mg, 0.0336 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 95°C durante 20 horas. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se tomó en diclorometano (20 mL), se lavó con agua (3 x 5 mL), se secó sobre MgSO₄, y se concentró para dar un residuo que se purificó por TLC preparatoria (hexano:EtOAc, 8:2) para producir 41 mg (64 %) de 91. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.63 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 8.06-8.11 (m, 2H), 7.64 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 7.47-7.57 (m, 3H); RMN-¹³C (166 MHz, CDCl₃): δ 167.2, 161.9, 159.8, 135.1, 131.9, 129.1, 127.4, 115.2.

10 (92) 2-(4-metilpiperazin-1-il)-4-fenilpirimidina

A una solución de 91 (38 mg, 0.201 mmol) en 0.5 mL de DMF se adicionó 1-metilpiperazina (56 µl, 50 mg, 0.31 mmol) y se calentó a 90°C durante 1.5 horas. Se removió el solvente bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 20:1) para producir 49

15 mg (95 %) de 92. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.36 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 8.01-8.09 (m, 2H), 7.43-7.50 (m, 3H), 6.92 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 3.96 (m, 4H), 2.50 (m, 4H), 2.34 (s, 3H); RMN-¹³C (166 MHz, CDCl₃): δ 164.4, 162.1, 158.4, 137.8, 130.6, 128.8, 127.1, 105.8, 55.2, 46.4, 43.9; MS (m/z): [M+H]⁺ 255.1.

(93) 5-yodo-2-(4-metilpiperazin-1-il)-4-fenilpirimidina

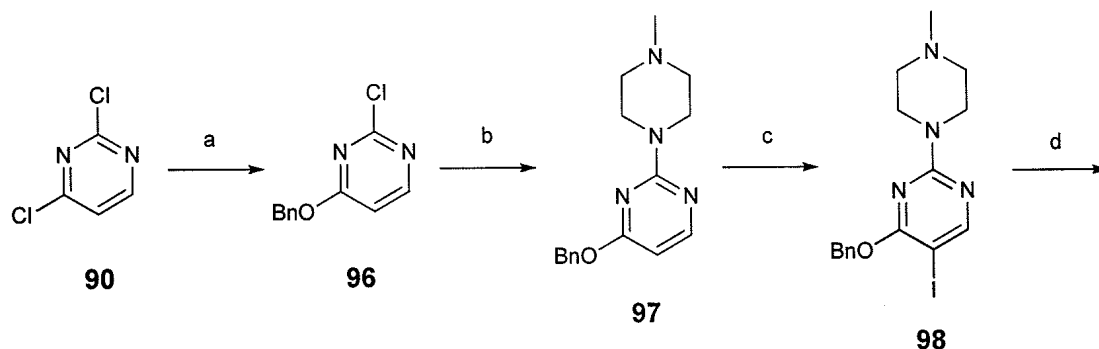
20 A 92 (49 mg, 0.193 mmol) en acetonitrilo (1.4 mL) se adicionó TFA (59 µl, 88 mg, 0.772 mmol), N-yodosuccinimida (43 mg, 0.193 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se evaporó el solvente y el residuo se tomó en diclorometano (15 mL), se lavó con Na₂CO₃ al 10 % (2 x 5 mL), agua (5 mL), se secó sobre MgSO₄, y se concentró para dar un residuo que se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH, 10:1) para producir 67 mg (92 %) de 93. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.60 (s, 1H), 7.65-7.73 (m, 2H), 7.42-7.49 (m, 3H), 3.86 (m, 4H), 2.45 (m, 4H), 2.33 (s, 3H); RMN-¹³C (166 MHz, CDCl₃): δ 167.5, 165.8, 160.9, 140.3, 129.7, 129.3, 128.1, 76.2, 55.0, 46.4, 43.9; MS (m/z): [M+H]⁺ 380.9.

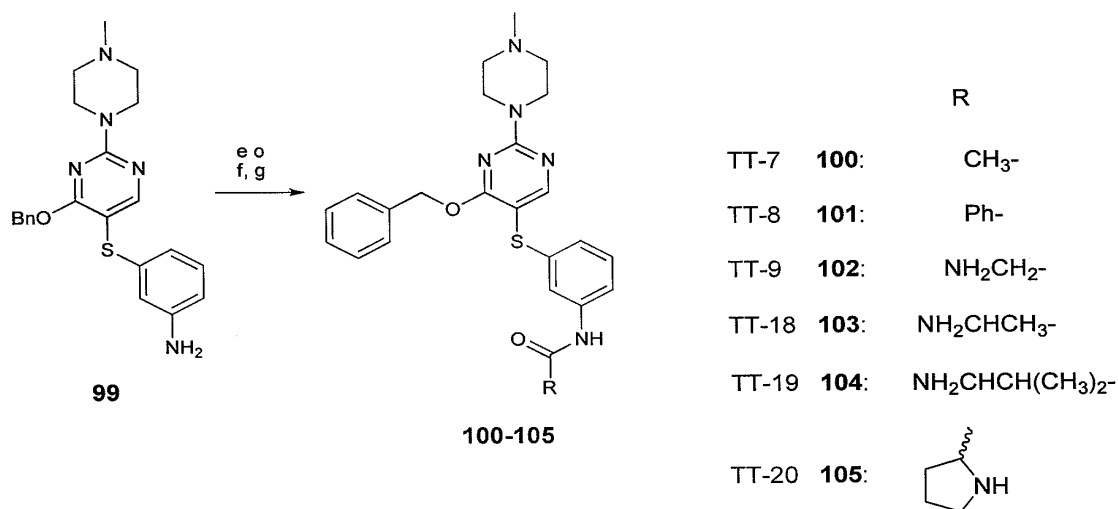
(94) 3-(2-(4-metilpiperazin-1-il)-4-fenilpirimidin-5-iltio)anilina

25 Una mezcla de 93 (37.6 mg, 0.099 mmol), 3-aminobencenotiol (12 µl, 13.6 mg, 0.109 mmol), neocuproina (6.2 mg, 0.0297 mmol), yoduro de cobre (5.7 mg, 0.0297 mmol), y carbonato de potasio (42 mg, 0.198 mmol) en DMF (1.4 mL) se agitó a 110°C durante 12 horas. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 10:1) para dar 10 mg (27 %) de 94. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.45 (s, 1H), 7.71 (d, J = 6.6 Hz, 2H), 7.32-7.42 (m, 3H), 6.99 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 6.47 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 6.43 (dd, J = 2.0, 6.4 Hz, 1H), 6.36 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 3.97 (m, 4H), 3.60 (br s, 2H), 2.52 (m, 4H), 2.37 (s, 3H); MS (m/z): [M+H]⁺ 378.1.

TT-5 (95) 2-amino-N-(3-(2-(4-metilpiperazin-1-il)-4-fenilpirimidin-5-iltio)fenil)acetamida

35 A una solución de 94 (5 mg, 0.0133 mmol) en THF (0.5 mL) se adicionó Boc-glicina (2.3 mg, 0.0133 mmol) y DCC (3 mg, 0.0146 mmol). Después de la agitación durante 2 horas a temperatura ambiente, se evaporó el THF y se adicionaron 0.5 mL de CH₂Cl₂:TFA (4:1). La solución se agitó durante 45 minutos, luego se concentró a sequedad bajo presión reducida para dar un residuo que se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 10:1) para dar 2 mg (35 %) de 95. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃/MeOH-d₄): δ 8.45 (s, 1H), 7.69 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.35-7.45 (m, 4H), 7.31 (m, 1H), 7.17 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 6.76 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 3.96 (m, 4H), 3.36 (s, 2H), 2.86 (m, 4H), 2.38 (s, 3H); MS (m/z): [M+H]⁺ 435.0.





Esquema 12. Síntesis de TT-7 (100), TT-8 (101), TT-9 (102), TT-18 (103), TT-19 (104), TT-20 (105).

5 **Reactivos y condiciones:** a. alcohol bencílico, KOH, 18-corona-6, tolueno, temperatura ambiente, 1 hora; b. N-metilpiperazina, DMF, 80°C, 1.75 horas; c. NIS, TFA, CH₃CN, temperatura ambiente, 1 hora; d. 3-aminobencenotiol, neocuproina, CuI, K₂CO₃, DMF, 120°C, 18 horas; e. Ac₂O, CH₂Cl₂ o PhCOCl, Et₃N, CH₂Cl₂; f. RCOOH, DCC, THF, temperatura ambiente, 12 horas; g. CH₂Cl₂:TFA (4:1), temperatura ambiente.

(96) 4-(benciloxi)-2-cloropirimidina

10 A una solución de 2,4-dicloropirimidina (90) (2.0 g, 0.0134 mmol) en tolueno (20 mL) se adicionó alcohol bencílico (1.53 ml, 1.59 g, 0.0147 mol), KOH (0.82 g, 0.0147 mol) y 18-corona-6 (0.177 g, 0.00067 mol) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (400 mL) y se lavó con agua (3 x 50 mL), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró para dar un sólido blanco que se cromatografió (hexano:CH₂Cl₂, 1:1 a 3:7) para dar 2.09 g (71 %) de una mezcla de 96 con 2-(benciloxi)-4-cloropirimidina regioisomérica (relación relativa 75:25 por RMN-¹H, respectivamente); MS (m/z): [M+Na]⁺ 243.1.

(97) 4-(benciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidina

15 A una solución de 96 (2.09, 0.00947 mol; contiene regioisómeros) en DMF (34 mL) se adicionó 1-metilpiperazina (3.15 mL, 2.85 g, 0.0284 mol) y se calentó a 80°C durante 1.75 horas. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se tomó en EtOAc (350 mL) y se lavó con salmuera (3 x 50 mL). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 50 mL) y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄, se filtró y se concentró para dar un aceite que se purificó por cromatografía en columna (EtOAc:MeOH-NH₃ (7N), 1:0 a 25:1) para dar 1.88 g (70 %) de 97. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.06 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 7.35 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 6.03 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 5.35 (s, 2H), 3.83 (m, 4H), 2.45 (m, 4H), 2.33 (s, 3H); MS (m/z): [M+H]⁺ 284.9.

(98) 4-(benciloxi)-5-yodo-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidina

25 A 97 (0.937 g, 0.0033 mol) en acetonitrilo (16 mL) se adicionó TFA (1.02 mL, 1.51 g, 0.0132 mol) y N-yodosuccinimida (0.965 g, 0.0043 mol) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Entonces se adicionaron 7 mL de Na₂CO₃ al 10 % (0.70 g, 0.066 mol) y se agitó durante 2 minutos. La mezcla de reacción se concentró a sequedad y el residuo se tomó en CH₂Cl₂ (200 ml) y se lavó con Na₂CO₃ al 10 % (2 x 50 mL), tiosulfato de sodio al 10 % (50 mL) y salmuera (50 mL). La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró para dar un aceite que se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 50:1) para producir 1.31 g (97 %) de 98. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.27 (s, 1H), 7.44 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 7.37 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 5.40 (s, 2H), 3.79 (m, 4H), 2.42 (m, 4H), 2.32 (s, 3H); MS (m/z): [M+H]⁺ 411.0.

(99) 3-(4-(benciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)anilina

35 Una mezcla de 98 (0.985 g, 2.40 mmol), 3-aminobencenotiol (255 µl, 300.5 mg, 2.40 mmol), neocuproina (150 mg, 0.72 mmol), yoduro de cobre (137 mg, 0.72 mmol), y carbonato de potasio (0.663 g, 4.80 mmol) en DMF (25 mL) se agitó a 120°C durante 18 horas. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 50:1 a 20:1) para dar 0.75 g (77 %) de 99. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.24 (s, 1H), 7.16-7.30 (m, 5H), 6.99 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 6.56 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.38-6.46 (m, 2H), 5.38 (s, 2H), 3.84 (m, 4H), 3.56

(br s, 2H), 2.45 (br s, 4H), 2.33 (s, 3H); RMN-¹³C (166 MHz, CDCl₃): δ 169.3, 164.5, 161.4, 158.1, 146.9, 138.5, 136.8, 129.6, 128.3, 127.7, 127.4, 117.6, 113.6, 112.6, 67.6, 54.8, 46.2, 43.9; MS (m/z): [M+H]⁺ 408.1.

TT-7 (100) N-(3-(4-(benciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida

5 A 99 (5.2 mg, 0.013 mmol) en CH₂Cl₂ (0.2 mL) se adicionó anhídrido acético (1.5 µL, 1.6 mg, 0.0156 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Entonces se concentró a sequedad bajo presión reducida para dar un residuo que se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 20:1) para dar 4.5 mg (79 %) de 100. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃/MeOH-d₄): δ 8.24 (s, 1H), 7.54 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.22-7.27 (m, 3H), 7.13-7.20 (m, 3H), 7.09 (s, 1H), 6.87 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 5.36 (s, 2H), 3.85 (m, 4H), 2.49 (m, 4H), 2.35 (s, 3H), 2.10 (s, 3H); MS (m/z): [M+H]⁺ 450.1.

TT-8 (101) N-(3-(4-(benciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)benzamida

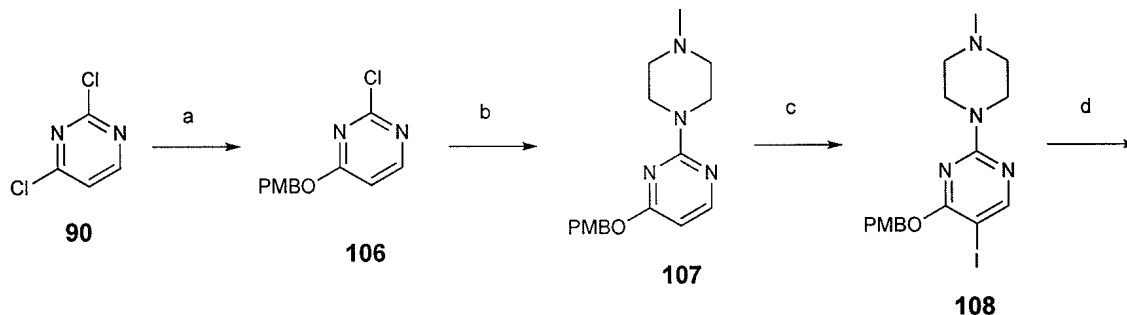
10 Durante 2 horas a temperatura ambiente se agitaron 99 (14 mg, 0.034 mmol), Et₃N (24 µl, 17.2 mg, 0.17 mmol) y cloruro de benzoilo (12 µl, 14.3 mg, 0.102 mmol) en CH₂Cl₂ (1 mL). El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 25:1) para dar 13.6 mg (78 %) de 101. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃/MeOH-d₄): δ 8.26 (s, 1H), 7.84 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 7.69 (dd, J = 1.4, 8.2 Hz, 1H), 7.54 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 7.47 (t, J = 7.9 Hz, 2H), 7.14-7.27 (m, 7H), 6.93 (dd, J = 0.9, 7.9 Hz, 1H), 5.37 (s, 2H), 3.85 (m, 4H), 2.48 (m, 4H), 2.35 (s, 3H);
15 RMN-¹³C (166 MHz, CDCl₃/MeOH-d₄): δ 168.6, 166.3, 164.2, 161.3, 138.6, 138.3, 136.4, 134.8, 131.8, 129.3, 128.6, 128.3, 127.7, 127.5, 127.2, 123.4, 118.8, 117.9, 100.1, 67.8, 54.6, 45.9, 43.6; MS (m/z): [M+H]⁺ 512.1.

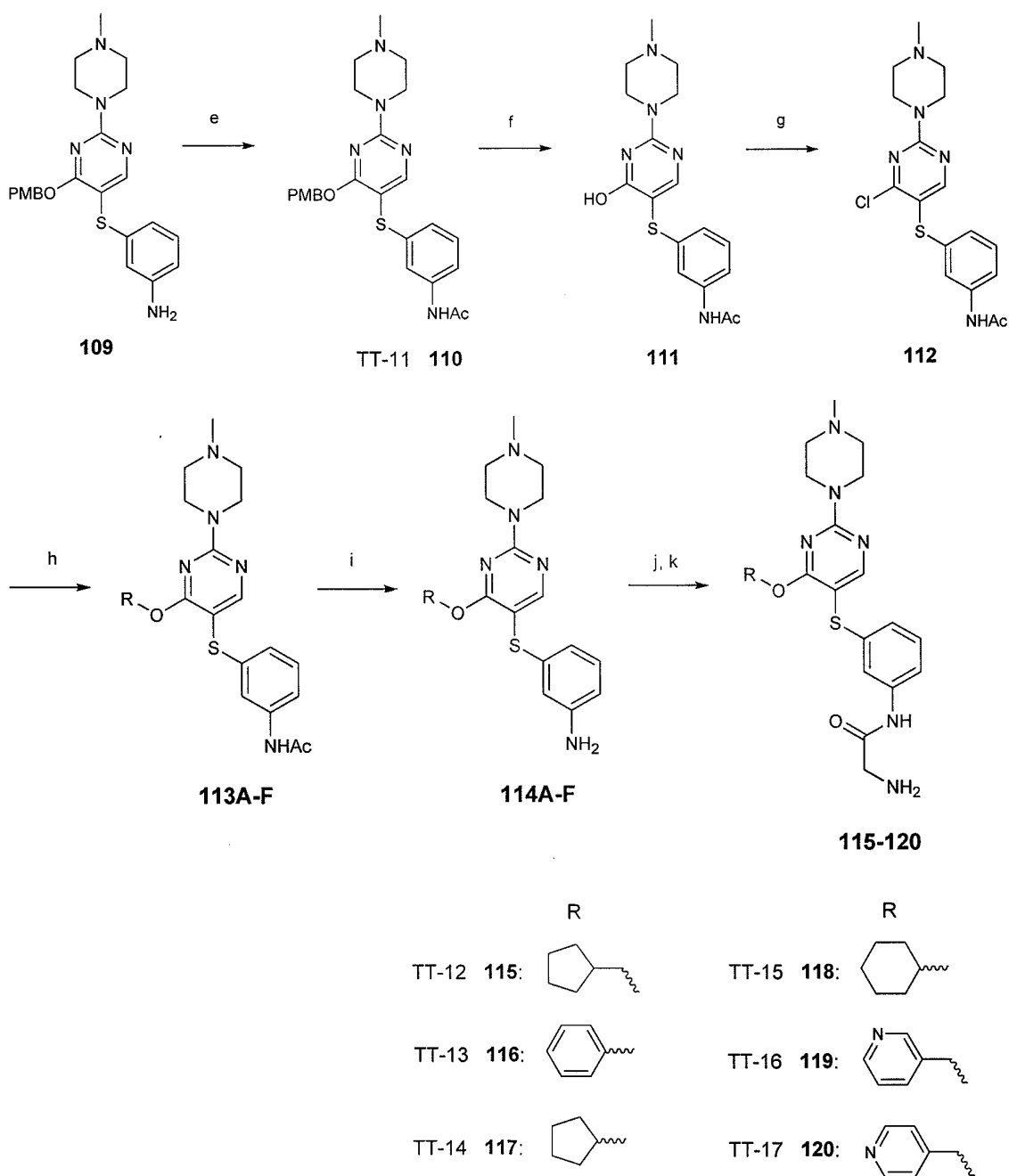
TT-9 (102) 2-amino-N-(3-(4-(benciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida

20 99 (30 mg, 0.0736 mmol) en THF (3 mL) se adicionaron a Boc-glicina (14.2 mg, 0.081 mmol), DCC (16.7 mg, 0.081 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 25:1) para dar un aceite que se disolvió en 2.5 mL de CH₂Cl₂:TFA (4:1) y se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 15:1) para dar 24.6 mg (72 %) de 102. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃/MeOH-d₄): δ 8.24 (s, 1H), 7.50 (dd, J = 1.2, 8.1 Hz, 1H), 7.31 (m, 1H), 7.22-7.27 (m, 3H), 7.13-7.20 (m, 3H), 6.86 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 5.37 (s, 2H), 3.85 (m, 4H), 3.39 (s, 2H), 2.49 (m, 4H), 2.35 (s, 3H);
25 RMN-¹³C (166 MHz, CDCl₃/MeOH-d₄): δ 171.4, 168.5, 164.1, 161.2, 138.2, 138.1, 136.4, 129.2, 128.2, 127.6, 127.2, 123.0, 118.2, 117.0, 67.7, 54.5, 45.8, 44.6, 43.5; MS (m/z): [M+H]⁺ 465.3.

TT-20 (105) N-(3-(4-(benciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)pirrolidina-2-carboxamida

30 99 (8.6 mg, 0.0211 mmol) en THF (0.5 mL) se adicionaron Boc-L-prolina (5 mg, 0.0232 mmol), DCC (5 mg, 0.0232 mmol) y se agitaron a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se disolvió en 0.35 mL de CH₂Cl₂:TFA (4:1) y se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 15:1) para dar 6.0 mg (57 %) de 105. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 9.63 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.58 (dd, J = 1.2, 8.1 Hz, 1H), 7.31 (t, J = 1.9 Hz, 1H), 7.12-7.17 (m, 3H), 7.22-7.26 (m, 3H), 6.83 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 5.36 (s, 2H), 3.80-3.91 (m, 5H), 3.04-3.11 (m, 1H), 2.94-3.00 (m, 1H), 2.47 (m, 4H), 2.35 (s, 3H), 2.15-2.25 (m, 1H), 1.98-2.06 (m, 1H), 1.70-1.81 (m, 1H); MS (m/z): [M+H]⁺ 505.2.





Esquema 13. Síntesis de TT-12 (115), TT-13 (116), TT-14 (117), TT-15 (118), TT-16 (119), TT-17 (120)

- 5 **Reactivos y condiciones:** a. alcohol p-metoxibencílico, KOH, 18-corona-6, tolueno, temperatura ambiente, 1 hora, b. N-metilpiperazina, DMF, 80°C, 1.5 horas, c. NIS, TFA, CH₃CN, temperatura ambiente, 1 hora, d. 3-aminobencenotiol, (1)tiofeno-2-carboxilato de cobre, K₂CO₃, DMF, 120°C, 25 horas, e. Ac₂O, CH₂Cl₂, temperatura ambiente, 3 horas, f. CH₂Cl₂:TFA (1:1), temperatura ambiente, 4 horas, g. POCl₃, 60°C, 2 horas, h. ROH, NaH, DMF, 80°C, 1.5 horas, i. BF₃-MeOH, reflujo, 5 horas, j. RCOOH, DCC, THF, temperatura ambiente, 12 horas, k. CH₂Cl₂:TFA (4:1), temperatura ambiente o CH₂Cl₂:piperidina (9:1), temperatura ambiente
- 10

(106) 2-cloro-4-(4-metoxibenciloxi)pirimidina

- 2,4-dicloropirimidina (90) (2.0 g, 0.0134 mmol) en tolueno (20 mL) se adicionó a alcohol p-metoxibencílico (1.84 ml, 2.04 g, 0.0147 mol), KOH (0.825 g, 0.0147 mol) y 18-corona-6 (0.177 g, 0.00067 mol) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (350 mL), se lavó con agua (2 x 50 mL), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró para dar un aceite que se purificó por cromatografía en columna (hexano:CH₂Cl₂, 1:1 a 3:7) para dar 2.39 g (71 %) de una mezcla de 106 con 4-cloro-2-(4-metoxibenciloxi)pirimidina regioisomérica (relación
- 15

relativa 78:22 por RMN-¹H, respectivamente).

(107) 4-(4-metoxibenciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidina

5 A una solución de 106 (2.39, 0.0095 mol; contiene regioisómeros) en DMF (34 mL) se adicionó 1-metilpiperazina (3.16 mL, 2.85 g, 0.0285 mol) y se calentó a 80°C durante 1.5 horas. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se tomó en EtOAc (350 mL) y se lavó con salmuera (3 x 50 mL). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 50 mL) y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron para dar un aceite que se purificó por cromatografía en columna (EtOAc:i-PrOH: Et₃N, 40:1:1 % a 20:1:1 %) para dar 2.10 g (70 %) de 107. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.05 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.90 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.00 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 5.27 (s, 2H), 3.84 (m, 4H), 3.81 (s, 3H), 2.46 (m, 4H), 2.34 (s, 3H); MS (m/z): [M+H]⁺ 315.2.

10 (108) 5-yodo-4-(4-metoxibenciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidina

15 A 107 (1.16 g, 3.69 mmol) en acetonitrilo (18 mL) se adicionó N-yodosuccinimida (1.08 g, 4.80 mmol), TFA (1.14 mL, 1.68 g, 14.76 mmol), y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Entonces se adicionaron 15.6 mL de Na₂CO₃ al 10 % (1.56 g, 14.76 mmol) y se agitó durante 2 minutos. La mezcla de reacción se concentró a sequedad y el residuo se tomó en CH₂Cl₂ (200 mL) y se lavó con Na₂CO₃ al 10 % (2 x 50 mL), tiosulfato de sodio al 10 % (50 mL) y salmuera (50 mL). La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró para dar un aceite que se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 50:1) para producir 1.44 g (85 %) de 108. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.26 (s, 1H), 7.37 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.90 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 5.33 (s, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.80 (m, 4H), 2.44 (m, 4H), 2.33 (s, 3H); MS (m/z): [M+H]⁺ 441.0.

(109) 3-(4-(4-metoxibenciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)anilina

20 Una mezcla de 108 (1.14 g, 2.59 mmol) y carbonato de potasio (0.716 g, 5.18 mmol) en DMF (37 mL) se evacuó y retrolenó con argón tres veces. Se adicionó tiofeno-2-carboxilato de cobre(I) (0.198 g, 1.04 mmol) y se evacuó y retrolenó con argón dos veces. Se adicionó 3-aminotiofenol (330 µl, 0.389 g, 3.11 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 120°C durante 25 h. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 200:1 a 40:1) para dar 0.933 g (82 %) de 109. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.23 (s, 1H), 7.14 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.98 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.80 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.54 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 6.44 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 6.40 (t, J = 1.9 Hz, 1H), 5.30 (s, 2H), 3.86 (m, 4H), 3.79 (s, 3H), 3.55 (br s, 2H), 2.47 (m, 4H), 2.35 (s, 3H); RMN ¹³C (166 MHz, CDCl₃): δ 168.6, 164.4, 161.4, 159.2, 146.8, 138.6, 129.5, 129.3, 128.8, 117.6, 113.7, 113.6, 112.5, 100.1, 67.4, 55.3, 54.8, 46.2, 43.9; MS (m/z): [M+H]⁺ 438.3.

TT-11 (110) N-(3-(4-(4-metoxibenciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida

30 A una solución de 109 (0.933 g, 2.13 mmol) en CH₂Cl₂ (6 mL) se adicionó anhídrido acético (242 µL, 261 mg, 2.56 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (90 mL) y se lavó con Na₂CO₃ al 10 % (2 x 25 mL), se secó sobre MgSO₄, se filtró y concentró bajo presión reducida para dar un residuo que se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 200:1 a 50:1) para dar 0.895 g (88 %) de 110. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.24 (s, 1H), 7.55 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.16 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.11 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.85-6.93 (m, 3H), 6.78 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 5.31 (s, 2H), 3.88 (m, 4H), 3.78 (s, 3H), 2.48 (m, 4H), 2.35 (s, 3H), 2.12 (s, 3H); MS (m/z): [M+H]⁺ 480.1.

(111) N-(3-(4-hidroxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida

40 A una solución de 110 (0.872 g, 1.82 mmol) en CH₂Cl₂ (4 mL) se adicionó TFA (4 mL) gota a gota durante 5 minutos y se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y se secó bajo alto vacío durante la noche para dar 111 que se usó sin purificación adicional. MS (m/z): [M+H]⁺ 360.2.

(112) N-(3-(4-cloro-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida

45 Durante 2 horas a 65°C se calentaron 111 (~1.82 mmol) y POCl₃ (5 mL). Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se adicionó a un vaso de laboratorio que contiene trozos de hielo. Después de la extinción completa de POCl₃, se adicionó cuidadosamente Na₂CO₃ sólido hasta pH ~ 9. Esto se transfirió a un embudo de separación y se extrajo con CH₂Cl₂ (4 x 60 mL), se secó sobre MgSO₄, se filtró y concentró a un sólido que se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 200:1 a 50:1) para dar 0.215 g (31 %) de 112. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.37 (s, 1H), 7.40 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.16-7.25 (m, 2H), 6.89 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 3.88 (m, 4H), 2.47 (m, 4H), 2.34 (s, 3H), 2.14 (s, 3H); MS (m/z): [M+H]⁺ 378.2.

(113A) N-(3-(4-(ciclopentilmetoxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida

5 A ciclopentanometanol (21.3 μ L, 19.9 mg, 0.198 mmol) disuelto en DMF (250 μ L) se adicionó NaH (4.3 mg, 0.179 mmol) y la suspensión resultante se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Entonces se adicionó 112 (15 mg, 0.0397 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 80°C durante 1.5 horas. Se adicionó MeOH (1 mL) y se agitó durante 5 minutos luego la mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida para dar un residuo que se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 20:1) para dar 13.9 mg (79 %) de 113A. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.23 (s, 1H), 7.42 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.10-7.22 (m, 3H), 6.86 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 4.16 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.86 (m, 4H), 2.48 (m, 4H), 2.35 (s, 3H), 2.19 (m, 1H), 2.09 (s, 3H), 1.56-1.67 (m, 2H), 1.40-1.55 (m, 4H), 1.10-1.20 (m, 2H); MS (*m/z*): [M+H]⁺ 442.1.

(114A) 3-(4-(ciclopentilmetoxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)anilina

10 113A (13.9 mg, 0.0315 mmol) en metanol (1 mL) se adicionó a BF₃-MeOH (47 μ L, 53.6 mg, 0.378 mmol) y se sometió a reflujo durante 5 horas. Entonces se adicionó Et₃N, la mezcla de reacción se concentró para dar un residuo que se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 20:1) para dar 11 mg (87 %) de 114A. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.22 (s, 1H), 6.98 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.55 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.45 (s, 1H), 6.43 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.17 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.86 (m, 4H), 3.58 (br s, 2H), 2.48 (m, 4H), 2.35 (s, 3H), 2.23 (m, 1H), 1.59-1.68 (m, 2H), 1.43-1.58 (m, 4H), 1.13-1.23 (m, 2H); MS (*m/z*): [M+H]⁺ 400.3.

TT-12 (115) 2-amino-N-(3-(4-(ciclopentilmetoxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida

20 114A (11 mg, 0.0275 mmol) en THF (1 mL) se adicionó a Boc-glicina (5.3 mg, 0.030 mmol), DCC (6.2 mg, 0.030 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 20:1) para dar un residuo que se disolvió en 1.25 mL de CH₂Cl₂:TFA (4:1) y se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 10:1) para dar 10.3 mg (82 %) de 115. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃/MeOH-d₄): δ 8.21 (s, 1H), 7.44 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.17 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 4.17 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.84 (m, 4H), 3.41 (s, 2H), 2.51 (m, 4H), 2.36 (s, 3H), 2.21 (m, 1H), 1.57-1.67 (m, 2H), 1.42-1.57 (m, 4H), 1.10-1.22 (m, 2H); MS (*m/z*): [M+H]⁺ 457.4.

25 (113B) N-(3-(2-(4-metilpiperazin-1-il)-4-fenoxipirimidin-5-iltio)fenil)acetamida

30 A fenol (19 mg, 0.198 mmol) disuelto en DMF (250 μ L) se adicionó NaH (4.3 mg, 0.179 mmol) y la solución resultante se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Entonces se adicionó 112 (15 mg, 0.0397 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 80°C durante 1.5 horas. Se adicionó MeOH (1 mL) y se agitó durante 5 minutos, y entonces la mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida para dar un residuo que se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 20:1) para dar 16.2 mg (94 %) de 113B. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.35 (s, 1H), 7.40 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.30-7.36 (m, 3H), 7.28 (br s, 1H), 7.15-7.23 (m, 2H), 7.02 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.96 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 3.65 (m, 4H), 2.36 (m, 4H), 2.28 (s, 3H), 2.13 (s, 3H); MS (*m/z*): [M+H]⁺ 436.2.

(114B) 3-(2-(4-metilpiperazin-1-il)-4-fenoxipirimidin-5-iltio)anilina

35 113B (16.2 mg, 0.037 mmol) en metanol (1 mL) se adicionó BF₃-MeOH (55 μ L, 63.3 mg, 0.446 mmol) y se sometió a reflujo durante 5 horas. Entonces se adicionó Et₃N, la mezcla de reacción se concentró para dar un residuo que se purificó por TLC preparatoria (hexano:CH₂Cl₂:EtOAc:MeOH-NH₃ (7N), 2:2:1:0.5) para dar 6.5 mg (45 %) de 114B. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.34 (s, 1H), 7.33 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.18 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.01-7.07 (m, 3H), 6.63 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.56 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.47 (dd, *J* = 2.2, 8.0 Hz, 1H), 3.63 (m, 6H), 2.37 (m, 4H), 2.30 (s, 3H); MS (*m/z*): [M+H]⁺ 394.3.

40 TT-13 (116) 2-amino-N-(3-(2-(4-metilpiperazin-1-il)-4-fenoxipirimidin-5-iltio)fenil)acetamida

45 114B (6.5 mg, 0.0165 mmol) en THF (0.65 mL) se adicionó a Fmoc-glicina (5.4 mg, 0.018 mmol), DCC (3.8 mg, 0.018 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria (hexano:CH₂Cl₂:EtOAc:MeOH-NH₃ (7N), 2:2:1:0.5) para dar un residuo que se disolvió en CH₂Cl₂ (0.9 mL) y piperidina (0.1 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 15:1) para dar 3.5 mg (47 %) de 116. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 9.34 (br s, 1H), 8.36 (s, 1H), 7.50 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.33 (t, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.22 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.18 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 6.96 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 3.68 (m, 4H), 3.46 (s, 2H), 2.40 (m, 4H), 2.31 (s, 3H); MS (*m/z*): [M+H]⁺ 451.1.

(113C) N-(3-(4-(ciclopentiloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida

50 A ciclopentanol (11.8 μ L, 11.2 mg, 0.13 mmol) disuelto en DMF (200 μ L) se adicionó NaH (2.8 mg, 0.117 mmol) y la suspensión resultante se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Entonces se adicionó 112 (10 mg, 0.026 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 80°C durante 2 horas. Se adicionó MeOH (1 mL) y se agitó durante 5

minutos luego la mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida para dar un residuo que se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 15:1) para dar 8.5 mg (77 %) de 113C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.21 (s, 1H), 7.41 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.10-7.19 (m, 3H), 6.86 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.39 (m, 1H), 3.86 (m, 4H), 2.48 (m, 4H), 2.35 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 1.63-1.86 (m, 4H), 1.45-1.56 (m, 4H); MS (*m/z*): [M+H]⁺ 428.2.

5 (114C) 3-(4-(ciclopentiloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)anilina

113C (8.5 mg, 0.020 mmol) en metanol (0.75 mL) se adicionó BF₃-MeOH (30 μL, 34.1 mg, 0.24 mmol) y se sometió a reflujo durante 5 horas. Entonces se adicionó Et₃N, la mezcla de reacción se concentró para dar un residuo que se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 15:1) para dar 7.2 mg (94 %) de 114C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.20 (s, 1H), 6.98 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.55 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 6.46 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.43 (dd, *J* = 2.0, 7.9 Hz, 1H), 5.40 (m, 1H), 3.86 (m, 4H), 3.58 (br s, 2H), 2.48 (m, 4H), 2.35 (s, 3H), 1.67-1.87 (m, 4H), 1.51-1.62 (m, 4H); MS (*m/z*): [M+H]⁺ 386.2.

10 TT-14 (117) 2-amino-N-(3-(4-(ciclopentiloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida

15 A una solución de 114C (7.2 mg, 0.0187 mmol) en THF (0.5 mL) se adicionó Boc-glicina (3.6 mg, 0.0206 mmol) y DCC (4.3 mg, 0.0206 mmol). Después de agitar durante la noche a temperatura ambiente, el THF se evaporó y se adicionaron 0.5 mL de CH₂Cl₂:TFA (4:1). La solución se agitó durante 45 minutos, luego se concentró a sequedad bajo presión reducida para dar un residuo que se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 15:1) para dar 7.4 mg (89 %) de 117. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 9.29 (br s, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.52 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.16 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.40 (m, 1H), 3.86 (m, 4H), 3.45 (s, 2H), 2.48 (m, 4H), 2.35 (s, 3H), 1.61-1.86 (m, 4H), 1.44-1.57 (m, 4H); MS (*m/z*): [M+H]⁺ 443.2.

20 (113D) N-(3-(4-(ciclohexiloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida

25 A ciclohexanol (14 μL, 13.0 mg, 0.13 mmol) disuelto en DMF (200 μL) se adicionó NaH (2.8 mg, 0.117 mmol) y la suspensión resultante se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Entonces se adicionó 112 (10 mg, 0.026 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 80°C durante 2 horas. Se adicionó MeOH (1 mL) y se agitó durante 5 minutos, luego la mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida para dar un residuo que se purificó por TLC preparatoria (hexano:CH₂Cl₂:EtOAc:MeOH-NH₃ (7N), 2:2:1:0.5) para dar 2.9 mg (25 %) de 113D. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.23 (s, 1H), 7.43 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.12-7.19 (m, 2H), 7.06 (br s, 1H), 6.88 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.05 (m, 1H), 3.85 (m, 4H), 2.50 (m, 4H), 2.36 (m, 3H), 2.14 (s, 3H), 1.22-1.80 (m, 10H); MS (*m/z*): [M+H]⁺ 442.2.

30 (114D) 3-(4-(ciclohexiloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)anilina

Se adicionó 113D (2.9 mg, 0.0066 mmol) en metanol (0.5 mL) a BF₃-MeOH (10 μL, 11.2 mg, 0.079 mmol) y se sometió a reflujo durante 5 horas. Entonces se adicionó Et₃N, la mezcla de reacción se concentró para dar un residuo que se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 15:1) para dar 2.4 mg (92 %) de 114D. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.22 (s, 1H), 6.98 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.57 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.48 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.43 (dd, *J* = 2.0, 8.0 Hz, 1H), 5.05 (m, 1H), 3.86 (m, 4H), 3.58 (br s, 2H), 2.51 (m, 4H), 2.37 (s, 3H), 1.22-1.80 (m, 10H); MS (*m/z*): [M+H]⁺ 400.2.

35 TT-15 (118) 2-amino-N-(3-(4-(ciclohexiloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida

A una solución de 114D (2.4 mg, 0.006 mmol) en THF (0.25 mL) se adicionó Boc-glicina (1.2 mg, 0.0066 mmol) y DCC (1.4 mg, 0.0066 mmol). Después de la agitación durante la noche a temperatura ambiente, se evaporó THF y se adicionaron 0.25 mL de CH₂Cl₂:TFA (4:1). La solución se agitó durante 45 minutos, luego se concentró a sequedad bajo presión reducida para dar un residuo que se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 15:1) para dar 2.5 mg (93 %) de 118. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 9.28 (br s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.54 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.17 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.06 (m, 1H), 3.84 (m, 4H), 3.45 (s, 2H), 2.48 (m, 4H), 2.35 (s, 3H), 1.22-1.80 (m, 10H); MS (*m/z*): [M+H]⁺ 457.1.

40 (113E) N-(3-(2-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(piridin-3-ilmetoxi)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida

45 A 3-piridilcarbinol (15.5 μL, 17.4 mg, 0.159 mmol) disuelto en DMF (200 μL) se adicionó NaH (3.4 mg, 0.143 mmol) y la suspensión resultante se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Entonces se adicionó 112 (12 mg, 0.0318 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 80°C durante 1.5 horas. Se adicionó MeOH (1 mL) y se agitó durante 5 minutos, luego la mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida para dar un residuo que se purificó por TLC preparatoria (hexano:CH₂Cl₂:EtOAc:MeOH-NH₃ (7N), 2:2:1:0.5) para dar 11.8 mg (83 %) de 113E. MS (*m/z*): [M+H]⁺ 451.3.

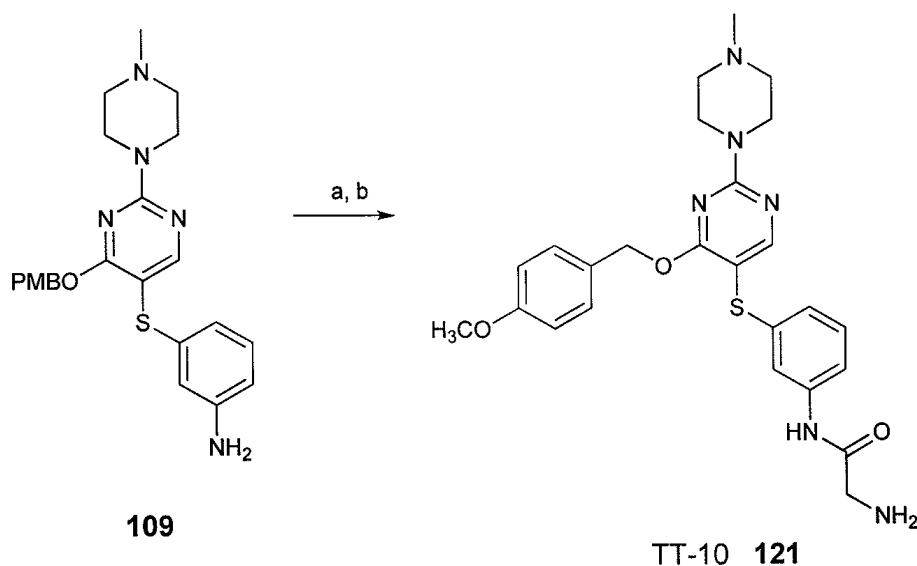
50 (114E) 3-(2-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(piridin-3-ilmetoxi)pirimidin-5-iltio)anilina

113E (11.8 mg, 0.026 mmol) en metanol (1 mL) se adicionó a BF₃-MeOH (39 μL, 44.3 mg, 0.312 mmol) y se sometió a

reflujo durante 5 horas. Se adicionó Et₃N, luego la mezcla de reacción se concentró para dar un residuo que se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 15:1) para dar 7 mg (66 %) de 114E. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃/MeOH-d₄): δ 8.45 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.50 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.27 (dd, *J* = 5.0, 7.8 Hz, 1H), 7.01 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.47-6.55 (m, 3H), 5.39 (s, 2H), 3.88 (m, 4H), 2.52 (m, 4H), 2.37 (s, 3H); MS (*m/z*): [M+H]⁺ 409.3.

5 TT-16 (119) 2-amino-N-(3-(2-(4-metilpiperazin-1-il)-4-(piridin-3-ilmetoxi)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida

A una solución de 114E (6 mg, 0.015 mmol) en THF (0.5 mL) se adicionó Boc-glicina (3 mg, 0.016 mmol) y DCC (3.3 mg, 0.016 mmol). Después de agitar durante la noche a temperatura ambiente, el THF se evaporó y se adicionaron 0.35 mL de CH₂Cl₂:TFA (4:1). La solución se agitó durante 45 minutos, luego se concentró a sequedad bajo presión reducida para dar un residuo que se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 15:1) para dar 6.1 mg (88 %) de 119. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃/MeOH-d₄): δ 9.31 (br s, 1H), 8.50 (m, 2H), 8.28 (s, 1H), 7.50 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.42 (m, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.11-7.25 (m, 2H), 6.86 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.40 (s, 2H), 3.87 (m, 4H), 3.46 (s, 2H), 2.48 (m, 4H), 2.36 (s, 3H); MS (*m/z*): [M+H]⁺ 466.2.

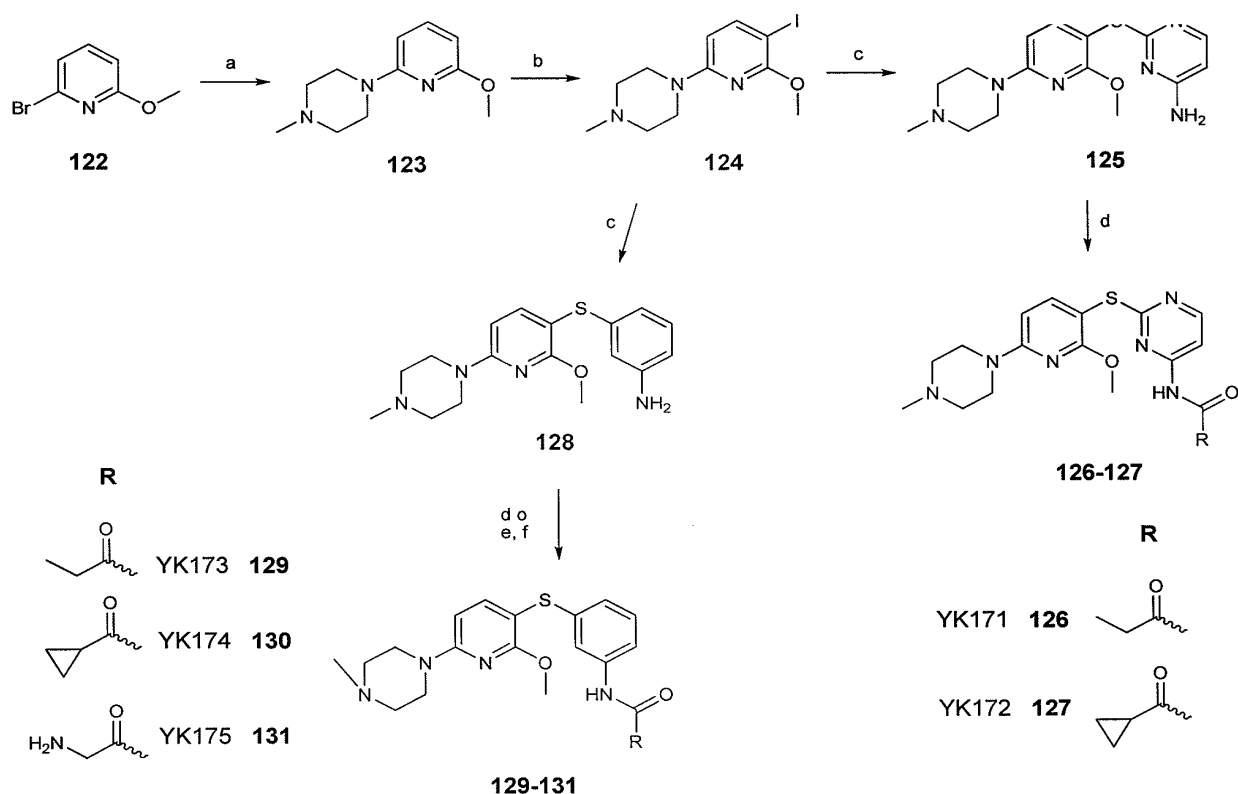


Esquema 14. Síntesis de TT-10 (121).

15 Reactivos y condiciones: a. Fmoc-glicina, DCC, THF, temperatura ambiente, 12 horas; b. CH₂Cl₂:piperidina (9:1), temperatura ambiente, 2h.

TT-10 (121) 2-amino-N-(3-(4-(4-metoxibenciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)fenil)acetamida

109 (10 mg, 0.0228 mmol) en THF (1 mL) se adicionó a Fmoc-glicina (7.5 mg, 0.0251 mmol), DCC (5.2 mg, 0.0251 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se disolvió en CH₂Cl₂ (0.9 mL) y piperidina (0.1 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparatoria (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 15:1) para dar 8.2 mg (73 %) de 121. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 9.20 (br s, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.60 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.17-7.20 (m, 2H), 7.09 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.85 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 6.77 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 5.30 (s, 2H), 3.88 (m, 4H), 3.78 (s, 3H), 3.44 (s, 2H), 2.48 (m, 4H), 2.35 (s, 3H); MS (*m/z*): [M+H]⁺ 495.2.



Esquema 15. Síntesis de YK171 (126), YK172 (127), YK173 (129), YK174 (130), YK175 (131).

Reactivos y condiciones: a. N-metilpiperazina, K_2CO_3 , DMF, $130^\circ C$, 16 h; b. NIS, CH_3CN , temperatura ambiente, 2h; c. 3-aminobencenotiol, neocuproina, CuI , K_2CO_3 , DMF, $130^\circ C$, 16 h; d. $RCOCl$, Et_3N ; e. $RCOOH$, $EDCl$, THF, temperatura ambiente; f. CH_2Cl_2 :TFA (4:1), temperatura ambiente.

(123) 1-(6-metoxipiridin-2-il)-4-metilpiperazina

A una solución de 2-bromo-6-metoxipiridina (122) (150 mg, 0.8 mmol) y 1-metilpiperazina (240 mg, 2.4 mmol) en 2 ml de DMF se adiciónó de K_2CO_3 (220 mg, 1.6 mmol) y la mezcla resultante se calentó a $130^\circ C$ durante 16 horas. El solvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna con (5-10 % MeOH en CH_2Cl_2) para dar 145 mg (88 %) de 123. RMN^1H (500MHz, $CDCl_3$): δ 7.41 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.16 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.08 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.54 (m, 4H), 2.51 (m, 4H), 2.54 (s, 3H); $RMN^{13}C$ (125 MHz, $CDCl_3$): δ 163.1, 158.3, 140.1, 98.2, 98.1, 54.8, 52.9, 46.2, 45.1; MS (m/z): $[M+H]^+$ 208.4.

(124) 1-(5-yodo-6-metoxipiridin-2-il)-4-metilpiperazina

A una solución de 123 (124 mg, 0.6 mmol) en 5 mL de acetonitrilo se adiciónó N-yodosuccinimida (203 mg, 0.9 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El solvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna con (CH_2Cl_2 :MeOH- NH_3 (7N), 1:0 a 85:15) para dar 190 mg (95 %) de 124. RMN^1H (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.70 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.02 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.60 (m, 4H), 2.62 (m, 4H), 2.39 (s, 3H); $RMN^{13}C$ (125MHz, $CDCl_3$): δ 177.7, 160.5, 157.8, 148.6, 100.7, 61.7, 54.2, 45.5, 44.5; MS (m/z): $[M+H]^+$ 334.1.

(125) 2-((2-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-il)tio)pirimidin-4-amina

La mezcla de 124 (100 mg, 0.3 mmol), 4-aminopirimidina-2-tiol (39 mg, 0.3 mmol), K_2CO_3 (83 mg, 0.6 mmol), neocuproina (11 mg, 0.05 mmol), y CuI (10 mg, 0.05mmol) en DMF (3 ml) se calentó a $130^\circ C$ durante 16 horas. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH_2Cl_2 :MeOH- NH_3 (7N), 1:0 a 85:15) para dar 60 mg (60 %) de 125. RMN^1H (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.95 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.20 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.05 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 5.01 (s, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.62 (m, 4H), 2.54 (m, 4H), 2.36 (s, 3H); $RMN^{13}C$ (125 MHz, $CDCl_3$): δ 171.9, 162.9, 162.5, 158.6, 156.2, 147.8, 101.1, 98.6, 97.6, 54.6, 53.6, 46.0, 44.6; MS (m/z): $[M+H]^+$ 333.5.

YK171 (126) N-(2-((2-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-il)tio)pirimidin-4-il)propionamida

5 A una solución de 125 (20 mg, 0.06 mmol) en 1.5 mL CH₂Cl₂ y Et₃N (100 µL) se adicionó cloruro de propionilo en CH₂Cl₂ gota a gota. Al término (por TLC), la reacción se extinguió al adicionar MeOH frío. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna con (MeOH-NH₃ (7N) 2-10 % en CH₂Cl₂) para dar 18 mg (80 %) de 126. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.53 (bs, 1H), 8.34 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.21 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.63 (m, 4H), 2.52 (m, 4H), 2.41 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.36 (s, 3H), 1.08 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); RMN ¹³C (125MHz, CDCl₃): δ 173.4, 172.2, 171.7, 162.9, 158.8, 157.3, 147.6, 105.6, 98.7, 96.7, 54.6, 53.7, 46.0, 44.6, 30.6, 8.96; MS (*m/z*): [M+H]⁺ 389.3.

YK172 (127) N-(2-((2-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-il)tio)pirimidin-4-il)ciclopropanocarboxamida

10 A una solución de 125 (20 mg, 0.06 mmol) en 1.5 mL CH₂Cl₂ y Et₃N (100 µL) se adicionó cloruro de ciclopropanocarbonilo en CH₂Cl₂ gota a gota. Al término (por TLC), la reacción se extinguió al adicionar MeOH frío. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna con (MeOH-NH₃ (7N) 2-10 % en CH₂Cl₂) para dar 21 mg (90 %) de 127. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.87 (br s, 1H), 8.31 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.75 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.57 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.20 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.62 (m, 4H), 2.52 (m, 4H), 2.36 (s, 3H), 1.61 (m, 1H), 1.08 (m, 2H), 0.88 (m, 2H); RMN ¹³C (125MHz, CDCl₃): δ 176.4, 173.5, 171.7, 162.9, 158.8, 157.2, 147.6, 105.7, 98.6, 96.7, 54.7, 53.6, 46.1, 44.6, 14.0, 7.7; MS (*m/z*): [M+H]⁺ 401.3.

(128) 3-((2-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-il) tio)anilina

20 Una mezcla de 124 (100 mg, 0.3 mmol), 3-aminobencenotiol (37 mg, 0.3 mmol), K₂CO₃ (83 mg, 0.6 mmol), neocuproina (11 mg, 0.05 mmol) y CuI (10 mg, 0.05 mmol) en DMF (3 ml) se calentó a 130°C durante 16 horas. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 1:0 a 85:15) para dar 60 mg (60 %) de 128. RMN ¹H (500MHz, CDCl₃): δ 7.54 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.96 (m, 1H), 6.51 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.41 (m, 2H), 6.19 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.62 (m, 4H), 2.54 (m, 4H), 2.36 (s, 3H); RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 162.7, 158.4, 147.5, 146.8, 139.5, 129.5, 117.1, 113.0, 112.2, 99.8, 98.9, 54.6, 53.7, 46.1, 44.8; MS (*m/z*): [M+H]⁺ 331.2.

YK173 (129) N-(3-((2-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il) piridin-3-il)tio)fenil)propionamida

25 A una solución de 128 (20 mg, 0.06 mmol) y Et₃N (100 µL) en 1.5 mL CH₂Cl₂ se adicionó cloruro de propionilo en CH₂Cl₂ gota a gota. Al término (por TLC), la reacción se extinguió al adicionar MeOH frío. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna con (MeOH-NH₃ (7N) 2-10 % en CH₂Cl₂) para dar 15 mg (70 %) de 129. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7.55 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.22 (br s, 1H), 7.14 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.08 (s, 1H), 6.81 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.20 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.47 (m, 4H), 2.57 (m, 4H), 2.36 (s, 3H), 2.33 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.19 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); MS (*m/z*): [M+H]⁺ 387.2.

YK174 N-(3-((2-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-il)tio)fenil)ciclopropanocarboxamida

35 A una solución de 128 (20 mg, 0.06 mmol) y Et₃N (100 µL) en 1.5 mL CH₂Cl₂ se adicionó cloruro de ciclopropanocarbonilo en CH₂Cl₂ gota a gota. Al término (por TLC), la reacción se extinguió al adicionar MeOH frío. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna con (MeOH-NH₃ (7N) 2-10 % en CH₂Cl₂) para dar 16 mg (70 %) de 130. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.61 (s, 1H), 7.31 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.20 (br s, 1H), 6.88 (m, 2H), 6.55 (m, 1H), 5.95 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 3.63 (s, 3H), 3.37 (m, 4H), 2.29 (m, 4H), 2.09 (s, 3H), 1.25 (m, 1H), 0.78 (m, 2H), 0.57 (m, 2H); RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 176.4, 172.1, 162.7, 158.4, 147.5, 139.3, 138.7, 129.2, 122.2, 117.5, 116.8, 99.0, 54.6, 53.6, 46.1, 44.7, 13.9, 7.9; MS (*m/z*): [M+H]⁺ 398.3.

YK175 (131) 2-amino-N-(3-((2-metoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-il)tio)fenil)acetamida

40 A una solución de 128 (20 mg, 0.06 mmol) en CH₂Cl₂ (1 ml) se adicionó Boc-glicina (10.6 mg, 0.06 mmol), DMAP (1.0 mg), Et₃N (10 µL) y EDCI (11 mg, 0.06 mmol). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El solvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 1:0 a 85:15) para dar 26 mg (90 %) de residuo. A esto se adicionaron 5 ml de 10 % de TFA-CH₂Cl₂ y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El solvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N), 1:0 a 85:15) para dar 16 mg (85 %) de 131. RMN ¹H (500MHz, CDCl₃): δ 9.26 (br s, 1H), 7.55 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.47 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.28 (s,1H), 7.15 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 8.0, 1H), 6.21 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.62 (m, 4H), 3.42 (s, 2H), 2.54 (m, 4H), 2.36 (s, 3H); RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 170.6, 162.7, 158.4, 147.5, 139.4, 138.0, 129.3, 122.5, 117.5, 116.5, 99.4, 98.9, 54.6, 53.6, 46.0, 45.1, 44.7; MS (*m/z*): [M+H]⁺ 388.3.

Ejemplo 2: Construcción de Modelo de Homología de Hsp70 Humana (hHsp70) y Diseño de YK5

Para diseñar inhibidores/moduladores de Hsp70, se emplearon diferentes planteamientos computacionales tal como modelado de homología, SiteMap y acoplamiento para determinar el modelo 3D de la Hsp70 humana (hHsp70), para identificar probables sitios de unión y para evaluar las interacciones proteína/ligando, respectivamente. No está disponible información de la estructura cristalina de longitud completa de la proteína hHsp70, y se planeó para construcción un modelo 3D teórico (modelo de homología) de hHsp70. Como se describe por Wallner et al., el factor más importante en la construcción del modelo de homología es la exactitud de alineación y la elección de las mejores estructuras de plantilla. Se seleccionaron tres estructuras cristalinas de plantilla que comparten alta identidad de secuencia (más de 50 %) con el receptor de interés para construir el modelo de homología de la proteína hHsp70. La estructura cristalina N-terminal de la proteína hHsp70 (PDB ID: 1S3X) fue la mejor plantilla disponible para los aminoácidos de N-término (Met1-Gly382, hHsp70). No hay estructura cristalina para el SBD de hHsp70, de modo que la estructura de Hsp70 de *E. coli* (DNAK) (PDB ID: 2KHO), que comparte una similitud de 62 % con hHsp70, se seleccionó como la plantilla para modelar un segmento del SBD (Asp385-Gln538, *E. coli.*; Asp383-Ala541, hHsp70). Finalmente, la estructura cristalina de Hsp70 de *C. elegans* (PDB ID: 2P32) se usó como una plantilla para los aminoácidos de C-término (Leu543-Ser614, *C. elegans*; Leu542-Gly613, hHsp70). Los aminoácidos C-terminales (614-641) de hHsp70 no tenían una estructura de plantilla, por lo tanto no se modelaron. Como se sugiere por Chothia y Lesk, después de la selección de la plantilla, la alineación de la plantilla y la capacidad para detectar las similitudes estructurales en base a la secuencia de aminoácidos determina la calidad total del modelo. Se alinearon los residuos de hHsp70. Se ha reportado por Wallner et al., que para secuencias de proteína cercanamente relacionadas con alta similitud, la alineación es más frecuentemente óptima. En el presente estudio, 606 de los 613 residuos fueron idénticos a las tres plantillas implementadas (PDB ID: 1S3X, PDB ID: 2KHO, PDB ID: 2P32), indicando alineación óptima. Después de la alineación de las cadenas laterales de residuos, se insertaron exitosamente los aminoácidos ausentes en la estructura de plantilla (PDB ID: 2KHO), tal como Lys384, Ser385, Glu386, Asn387 y Arg509 (hHsp70), usando un procedimiento automatizado o semiautomatizado en Prime. El modelo de homología obtenido de esta manera con tubo asas intracelulares y extracelulares basadas en la estructura de plantilla (excluyendo los términos). Todas las regiones de asa (33 asas) se optimizaron usando la herramienta de refinación de asa en Prime para generar conformaciones firmes para las asas. Finalmente, el modelo de proteína obtenido se sometió a una utilidad de asistente de preparación de proteína, seguida por rigurosa minimización de energía para relajar los contactos desfavorables.

Anteriormente se ha mostrado por Wallner et al., que la desviación rms entre la plantilla y la proteína modelada es un buen método de validación. La sobreposición de los átomos de estructura en el NBD del modelo de homología y la estructura de plantilla (PDB ID: 1S3X) da una desviación rms de 1.01 Å y una buena puntuación de alineación de 0.05, validando el presente modelo.

El modelo de homología creado de esta manera contiene 613 residuos de aminoácido y tiene dos dominios principales, un NBD y un SBD, conjuntamente unidos por un ligador flexible (Figura 2a). El dominio de ATPasa N-terminal exhibe un pliegue de hexocinasa tipo actina y tiene dos lóbulos globulares, I (subdominios IA y IB) y II (subdominios IIA y IIB). Doce hélices α y dieciséis hojas β compilan el NBD, que corrobora con las estructuras cristalinas del NBD. El SBD C-terminal se puede dividir adicionalmente en dos subdominios funcionalmente pertinentes; una intercalación de dos β -hojas de cuatro hebras que contiene el subdominio de unión a péptido (SBD- β) y un subdominio de cuatro α -hélices (SBD- α), también llamado el dominio de tapa. En la ausencia de una estructura cristalina de longitud completa de este chaperón terapéuticamente importante, este modelo de homología es útil para determinar sitios de unión para el diseño de inhibidores de Hsp70, por métodos tales como pero no limitados al diseño basado en estructura y examen virtual.

Predicción de sitios: para una estrategia de diseño basado en estructura, se identificaron por SiteMap los sitios de unión potencial en hHsp70 tratables para selección de inhibidores de molécula pequeña. SiteMap considera varios descriptores físicos tales como tamaño, grado de encierro/exposición, hermeticidad, fuerzas de van der Waals, carácter hidrófobo/hidrófilo, y las posibilidades de unión a hidrógeno, para determinar un sitio potencial. Haciéndolo así al enlazar conjuntamente puntos de sitio que más probablemente van a contribuir a la interacción proteína/ligando o proteína/proteína.

SiteMap examina la estructura completa y clasifica los sitios. El tamaño del sitio (medido por el número de puntos de sitio encontrados), la abertura relativa del sitio (medida por las propiedades de exposición y encierro) y la hermeticidad del sitio (medida por el término de contacto, y el carácter hidrófobo e hidrófilo del sitio) contribuyen significativamente hacia la clasificación. Para explorar extensivamente los sitios de unión disponibles en Hsp70, SiteMap se configuró para retornar hasta 10 sitios. Se percibieron qué sitios pobremente clasificados, tal como los sitios 6-10, estuvieron en las superficies (no mostradas en la Figura 2). Estos son artefactos del modelo computacional, que encuentra sitios que corresponden a superficies exteriores y que tienen menor puntuación S. Por lo tanto, se configuró SiteMap para regresar hasta cinco sitios de unión, probables, clasificados en la proteína hHsp70 modelada por homología. Estos cinco sitios tienen una puntuación S de 0.80 o mayor, que se recomienda por T. A Halgreen para definir un sitio verosímil de unión.

Otro criterio importante para la determinación del sitio de unión es la capacidad de farmacabilidad del sitio, como se describe por la puntuación D en SiteMap. Esto incluye términos que promueven la unión a ligando, tal como tamaño adecuado y asilamiento de solventes, pero se contrarresta con un término que penaliza la hidrofiliidad incrementada. De acuerdo a T. A. Halgreen, los sitios se clasifican en no convertible en fármaco, difícil a fármaco y convertible en fármaco. Los sitios no convertibles en fármaco son fuertemente hidrófilos, de tamaño relativamente pequeño, con poco

o ningún carácter hidrófobo, y se caracterizan por un valor de puntuación D menor de 0.83. Los sitios difíciles son suficientemente hidrófilos para requerir administración como un profármaco, pero son menos hidrófobos que un sitio típico de unión, y se definen por un valor de puntuación D entre 0.83 y 0.98. Los sitios convertibles en fármaco son de tamaño razonable, encierro razonable e hidrofobicidad razonable, de hidrofiliidad no excepcional y tienen un valor de puntuación D mayor de 0.98.

Entre los cinco sitios (Sitios 1-5) previstos por SiteMap (Figura 2), los Sitios 3, 4 y 5 tienen muy pocos puntos de sitio, la cavidad es pequeña y el sitio es poco profundo. Como resultado, es difícil generar suficiente afinidad de unión para estos sitios. El sitio 2, que incluye la ranura ocupada por los ligandos endógenos ATP y ADP, tiene un tamaño razonable (puntos de sitio: 178), y una puntuación S razonablemente alta. En la inspección visual, el Sitio 2 tiene una ranura relativamente más pequeña, y consiste principalmente de aminoácidos hidrófilos. En la ausencia de regiones adecuadas para interacciones hidrófobas, es potencialmente más difícil seleccionar como objetivo, como se representa por una puntuación D relativamente menor (0.91). El Sitio 1, localizado en una región hendida fuera del dominio de unión de ATP/ADP, y flanqueado por las sub-regiones Ib y IIb, es de tamaño más grande (puntos de sitio: 385), tiene una ranura más grande y consiste de aminoácidos hidrófilos e hidrófobos, haciéndolo un sitio más convertible en fármaco (puntuación D: 1.00). Tomando conjuntamente las puntuaciones S y D, su tamaño, su carácter hidrófobo e hidrófilo equilibrado, las propiedades de exposición y encierro, se predice que el Sitio 1 es la cavidad más convertible en fármaco, y de esta manera se colocó enfoque en este nuevo Sitio 1 alostérico para diseño adicional de inhibidores de Hsp70.

Para reconocer las propiedades del sitio completo, en los Sitios 1 y 2 se generaron mapas hidrófobos/hidrófilos. Estos mapas toman en cuenta el sitio como una totalidad, en contraste al modelo superficial donde sólo se consideran los átomos receptores más cercanos. Estos mapas muestran explícitamente la forma del sitio, y sugieren la extensión de las regiones hidrófobas e hidrófilas. El Sitio 2 es principalmente de un carácter hidrófilo, con poco carácter hidrófobo. En contraste, el Sitio 1 tiene un carácter equilibrado, tanto con regiones hidrófobas como hidrófilas presentes. Estos resultados soportan adicionalmente la mayor farmacabilidad del Sitio 1.

25 Interacciones Proteína/Ligando y Diseño de Inhibidores:

A la fecha, se conocen pocas moléculas para modular la actividad de Hsp70. Se han identificado varias moléculas que tienen como objetivo el SBD, que incluyen 15-desoxiespergualina y acil-benzamidas de ácidos grasos. Un péptido de pequeño peso molecular diseñado para unirse al SBD de la Hsp70 bacteriana, estimuló su actividad de ATPasa. Entre los agentes que tienen como objetivo el NBD están las dihidropirimidinas y los miméticos de nucleótidos. Las dihidropirimidinas se descubrieron en un examen que mide la actividad de ATPasa de Hsp70 de levadura. La identificación de inhibidores competitivos de ATP ha probado ser difícil. Williamson et al., describieron análogos basados en adenosine diseñados para unirse con la cavidad de ATPasa. La Hsp70 corresponde a la familia tipo actina de las ATPasa, y una alta homología estructural, especialmente dentro de su dominio de ATPasa, existe entre estas proteínas. Como resultado, tomados conjuntamente con el más pobre carácter tipo fármaco de este sitio como se determina anteriormente, no es claro si el desarrollo de competidores directos de ATP es el planteamiento más favorable para Hsp70. Por lo tanto elegimos el Sitio 1 para selección de objetivo.

Figura 21: La alineación de secuencia de proteína de hHsp70 de longitud completa (Número de acceso: P08107), proteína hHsp70 N-terminal (PDB ID: 1S3X), estructura de Hsp70 de *E. coli* (DNAK) (PDB ID: 2KHO) y *C. elegans* (PDB ID: 2P32). Las anotaciones de residuos están subrayadas y los residuos conservados se exhiben en un color similar. Las secuencias que definen el Sitio 1 de cavidad alostérica se muestran en cuadros. Los aminoácidos importantes en estas secuencias interactúan con los ligandos designados en la presente.

Para identificar los inhibidores de Hsp70 que seleccionan como objetivo de forma específica el Sitio 1, se diseñaron y sintetizaron varias bibliotecas químicas de espacio químico no explorado adecuadas para interactuar con sus ranuras estructurales. El Sitio 1 también contiene una cisteína potencialmente reactiva, Cys267, y para aprovechar una interacción covalente potencial, se incorporó una funcionalidad de acrilamida (NH-C(=O)-CH=CH_2) dentro de la biblioteca química diseñada. El diseño y prueba con retroalimentación útil, como se ejemplifica en la Figura 3, dio por resultado la identificación de YK5 (Figura 2). A fin de confirmar la unión de YK5 al Sitio 1 y para estudiar las potenciales interacciones de ligando/proteína, el compuesto YK5 se acopló en cada uno de los cinco sitios previstos por SiteMap. La investigación de las interacciones de unión, de la orientación del compuesto y de los valores Glidescore concluyó que YK5 se une más favorablemente al Sitio 1. El mejor modo de unión derivado por acoplamiento de YK5 en el Sitio 1 se muestra en la Figura 2c.

Tabla 13: SiteMap predijo sitios de unión para inhibidores/moduladores en proteína hHsp70

Sitio de Unión	Posición	Puntuación S	Puntuación D	Tamaño
Sitio 1	IB y IIB	1.05	1.00	365

Sitio de Unión	Posición	Puntuación S	Puntuación D	Tamaño
Sitio 2	IA y IIA	1.12	0.91	178
Sitio 3	SBD- β	1.06	0.98	95
Sitio 4	SBD- β y SBD- α	0.94	0.97	83
Sitio 5	Dominio de ligador	0.78	0.71	51

A fin de validar adicionalmente las interacciones de unión propuestas, YK20, que se prevé que es de menor afinidad para Hsp70, se acopló en el Sitio 1 de unión, alostérico. Diferente de YK5, todas las actitudes acopladas de YK20 se orientaron fuera de la cavidad de unión y tienen una pobre puntuación G. A fin de determinar la razón potencial para esta orientación, se revistió YK20 con YK5 unido a hHsp70 modelada por homología, para mostrar que YK20 tiene potencial choque estérico que da cuenta de su pobre actividad inhibitoria.

Ejemplo 3: Caracterización de Nuevos Moduladores

Para identificar inhibidores de Hsp70, se sintetizaron varias bibliotecas químicas de químico no explorado diseñadas para interactuar con las ranuras estructurales de la región N-terminal (Figura 2, sección a). Este dominio acomoda dos regiones potencialmente convertibles en fármaco. Una es el sitio de unión a nucleótido (representado como Sitio 2 en la Figura 2, sección a), que tiene un carácter principalmente hidrófilo, y por lo tanto es potencialmente más difícil de seleccionar como objetivo. La segunda es una ranura de unión más grande y potencialmente más tipo fármaco, localizada en una región hendida fuera del dominio de unión a nucleótido, y flanqueada por las sub-regiones Ib y IIb (representada como Sitio 1 en la Figura 2, sección a). Las Hsp70 también contienen varias cisteínas potencialmente reactivas, dos de las cuales están localizadas en la vecindad de los dos sitios convertibles en fármaco potenciales (Figura 2, sección a). Para aprovechar estos residuos, se incorporó una funcionalidad de acrilamida en algunos de los derivados diseñados, sondeando la posible formación de enlaces covalentes entre el inhibidor y los residuos de cisteína en la unión a proteína (Figura 2, sección a). Hay precedente para el uso de una "ojiva" de acrilamida en el desarrollo de inhibidores irreversibles de EGFR y HER2, tal como CI-1033 (Canertinib) (Fig. 2, sección b) y EKB-569 (Pelitinib), compuestos en ensayos clínicos para cáncer. EGFR y HER2, igual que las Hsp70s, contienen una cisteína reactiva en su sitio regulador.

De acuerdo con una hipótesis de trabajo que en las células de cáncer, los inhibidores de Hsp70 tendrán el resultado fenotípico de los inhibidores de Hsp90 en tanto que carecen de una inducción de Hsp70 de retroalimentación, se examinaron estos agentes en ensayos fenotípicos anteriormente desarrollados por Chiosis lab para Hsp90 tumoral. Estos ensayos se diseñaron para leer las huellas celulares de la inhibición de Hsp90, tal como la degradación de un onco-cliente de Hsp90 en el antecedente genético pertinente y la inhibición asociada del crecimiento de células tumorales. La inducción de Hsp70 se analizó para excluir aquellos que activaron HSF-1. Para asegurarse que a las concentraciones farmacológicamente pertinentes, los compuestos van a actuar probablemente de forma selectiva a través de un mecanismo mediado por Hsp70, se seleccionaron sólo aquellos activos a concentraciones similares en todos los ensayos. Se sondeó adicionalmente la unión a Hsp90 para excluir inhibidores directos de Hsp90.

Varias entidades de un nuevo núcleo molecular, las 2,5'-tiodipirimidinas que son parte de un género más grande que se llama en la presente como YK, fueron activas por estos criterios (Figura 2, sección a). La metodología de síntesis para montar el núcleo molecular de YK se presenta en los Esquemas del Ejemplo 1.

Un derivado identificado de la presente estrategia de diseño y examen fue YK5 (Figura 2, sección b) de cuya síntesis se describe en la presente.

Como se evidencia en las células de cáncer de mama SKBr3, YK5, pero no el derivado de control YK20 (20 μ M), que inhibe al objetivo con menor afinidad, indujo la degradación de las cinasas HER2, Raf-1 y Akt, las tres de las cuales son proteínas onco-clientes de Hsp90, conocidas en este contexto celular (Figura 3, sección a). Adicionalmente, la tirosina-proteína-cinasa no oncogénica CSK, una c-Src relacionada a tirosina-cinasa, permaneció sin afectar por los agentes de YK y el inhibidor directo de Hsp90 PU-H71 (Figura 3, sección a). YK5 también indujo apoptosis en estas células como se evidencia por la escisión de PARP (Fig. 3, sección a). De acuerdo con los informes anteriores de inhibidores directos de Hsp90, y como se observa aquí con PU-H71 (Figura 3, sección a), las proteínas β -actina y el co-chaperón p23 de Hsp90 cuyos niveles son insensibles a la inhibición de Hsp90, permanecieron sin cambio en la adición celular de los YK (Figura 3, sección a).

La inducción de retro-alimentación de Hsp70 no se detectó con YK5 a concentraciones donde se degradan los onco-clientes de la maquinaria de Hsp90 (Figuras 3, sección a y b). Entre tanto, en estas células, los inhibidores directos de Hsp90 activaron potentemente una respuesta de choque térmico, como se evidencia por la inducción de Hsp70 (Fig. 3, PU-H71 en la sección a, y PU24FCI en la sección b). Diferente de los inhibidores directos de Hsp90 PU-H71 y PU24FCI,

los derivados de YK fallaron en competir con un derivado de geldanamicina fluorescentemente marcado, GM-Cy3B, para la unión a Hsp90 (Fig. 3, sección c).

En las células de cáncer de mama SKBr3, la degradación de las proteínas onco-clientes de Hsp90 por YK5 se presentó a bajas concentraciones crecientes macromolares (Figura 3, sección a) que también condujo a la inhibición de la proliferación celular (Figura 3, sección d), sugiriendo que en este intervalo de concentración, la actividad biológica de YK5 se canaliza probablemente a través de la inhibición de una maquinaria funcional de Hsp90, potencialmente por un mecanismo de unión a Hsp70.

YK5 es un compuesto que se une selectivamente a Hsp70 en células de cáncer. Para confirmar que Hsp70 es responsable de la actividad de YK5, se diseñó un derivado biotinilado de YK5, el YK55 (Figura 4, sección a). La síntesis de YK55 se describe en la presente. En otras modalidades, otros compuestos de la presente materia se pueden biotinilar y usar de acuerdo a los métodos descritos en la presente.

La adición de KY55, pero no de D-biotina, a células seguido por aislamiento en cuentas de estreptavidina, identificó una banda principal alrededor de 70 kDa (Figura 4, sección b), que compitió de una manera dependiente de la dosis por YK5 soluble (Figura 4, sección c). El análisis por cromatografía líquida-espectro de masa en tándem (LC/MS/MS) de digestiones peptídicas obtenidas de esta banda confirmó la presencia de dos isoformas inducibles de Hsp70 (Hsp70-1 y Hsp70-6), y de Hsc70, el miembro constitutivo de Hsp70. Su identidad se investigó adicionalmente por Western Blot, para demostrar las Hsp70 pero no la Hsp90 en las reducciones de YK55 (Figura 4, sección d).

Para investigar la etapa de ciclo de Hsp70 más sensible a YK5, se analizaron complejos de co-chaperones aislados por cuentas de YK55 y se compararon a aquellos identificados por un anticuerpo anti-Hsp70s (Figura 4, sección e, izquierda). Las cuentas de YK55 atraparon preferencialmente Hsp70 en el complejo con sus co-chaperones activadores, Hsp40 y Hsp110, en tanto que los aislados de Ab carecieron del factor de intercambio de nucleótidos, Hsp110. Debido a que el Ab anti-Hsp70s BB70 puede agotar los niveles celulares de Hsp70 y Hsc70, pero es débil en atrapar Hsp70s en una conformación unida a co-chaperón (es decir, Hsp110), fue posible sondear adicionalmente la especificidad de las cuentas de YK55 para Hsp70s (Figura 4, sección e, derecha). Específicamente, cuando se incubaba con BB70 pero no los extractos irrelevantes agotados de Hsp70s de IgG, las cuentas de YK55 fallaron en interactuar significativamente con Hsp110, confirmando que la interacción de YK55 con Hsp110 se presentó a través de un complejo mediado por Hsp70s. YK5 soluble agotó de una manera dependiente de la dosis a las cuentas de YK55 para la unión a los complejos de Hsp70 (Figura 4, sección f).

En la incubación de células con YK55, se formó una fuerte y selectiva interacción, no interrumpida por lavados de alta concentración de sal (NaCl 1M) ente el agente y Hsp70s (Figura 4, sección b). YK5 contiene una funcionalidad de acrilamida que puede crear un enlace covalente en la unión a proteína. Para compuestos donde la unión irreversible juega un papel, el valor de unión inhibitoria media (IC50) para la unión consiste de dos componentes, uno que refleja la unión reversible y otro que refleja la unión covalente subsiguiente, y depende del grado al cual se ha presentado la interacción covalente. En realidad, la incubación de células durante una a cuatro horas con YK55, conduce a un incremento progresivo en la cantidad de la banda 70 kDa inmovilizada (Figura 5, sección a), que por inmunotransferencias anti-biotina y Hsp70, se sugirió que es una especie que contiene YK55-Hsp70 (Figura 5, sección b). Se detectó una débil interacción o ninguna interacción de YK55 con Grp 75 y Grp78, los miembros de la familia de Hsp70 mitocondriales y del retículo endoplásmico, respectivamente, bajo estas condiciones (Figura 5, sección b).

La elución de complejos de proteína de cuentas de YK55-estreptavidina en condiciones suficientemente rudas para interrumpir la más hermética unión no covalente conocida, el complejo de estreptavidina-biotina, confirmó que en realidad se formó una especie de YK55-Hsp70 covalentemente unida cuando las células se incubaron con YK55 (Figura 5, sección c). La digestión con tripsina de las especies de Hsp70s unidas a YK55, pero no de reducciones de BB70, un anticuerpo anti-Hsp70s, identificó dos picos m/z en 1867.915 y 1372.649 unidades de masa atómica (Figura 5, sección b). Estos picos corresponden a YK55 (820.34 Da) unido a LRTAC²⁶⁷ERAK y YK55 que carecen de la biotina (YK55-Biotina) (594.26 Da) unida a TAC²⁶⁷ERAK, respectivamente. No se observó marcación de estos péptidos cuando los aislados de YK55-Hsp70s se redujeron y alquilaron usando beta-mercaptoetanol y acrilamida, respectivamente. Se realizó la secuenciación espectrométrica de masa de LRTAC²⁶⁷(YK55)ERAK para confirmar adicionalmente la identidad de secuencia (no mostrada).

La secuencia TACERAK se conserva en Hsp70s citosólica humana, pero es divergente en Grp75 y Grp78, consistente con su carencia de interacción con YK55 bajo condiciones similares (Fig. 5, sección b). Colectivamente, estos datos sugieren la derivatización específica de Hsp70s citosólica por YK55.

YK5 inhibe las principales funciones bioquímicas de Hsp70s. Entonces, se investigó la unión de YK5 a Hsp70s para ver si interfiere con sus actividades bioquímicas principales, específicamente el plegado de una proteína cliente desnaturalizada y su actividad de ATPasa. Las actividades de Hsp70 se estimulan por proteínas de Hsp40 y factores de intercambio de nucleótidos, tal como Hsp110. Los humanos tienen varias Hsp40s citosólicas, entre las cuales Hdj1, DJA1, DJA2 y DJA4, y se reportó recientemente que DJA1 proporciona la estimulación más fuerte de Hsc70. La actividad de ATPasa, en tanto que DJA2 no es más eficiente al promover el plegado de un sustrato de polipéptido de

Hsc70, luciferasa de luciérnaga. La YK5 inhibió de forma dependiente a la dosis el plegado de luciferasa por Hsc70 purificada y DJA2 (Figura 6, sección a) e inhibió parcialmente la velocidad estimulada de ATPasa de Hsc70 (Figura 6, sección b). Debido a que la unión de YK5 al dominio N-terminal de Hsp70 no obstruye el sitio de ATPasa, su efecto más probable resulta de la interrupción de la coordinación esencial de los dominios N- y C-terminales. Las funciones bioquímicas núcleo de Hsp70 se inhibieron por YK5 en condiciones de ensayo que no favorecen la formación de enlaces covalentes, sugiriendo además de reactividad covalente, un ajuste apropiado para YK5 en el sitio activo del objetivo o diana.

YK5 inhibe la formación de complejos activos de Hsp70/Hsp90/oncoproteína. Se sugiere que Hsp70 facilita la función del complejo multi-chaperón de Hsp90 y actúa en el paso inicial de la formación de complejo al cargar proteínas cliente sobre el complejo de Hsp90 a través de la proteína intermedia HOP. Los clientes de Hsp90 son varias proteínas cliente activadoras y de soporte de malignidad con papeles importantes en el desarrollo y progreso de la transformación celular patógena. Además de las oncoproteínas, la Hsp90 regula el factor de transcripción, factor-1 de choque térmico (HSF-1), el regulador principal de una respuesta de choque térmico en respuesta a agravios celulares. La Hsp90 se une a HSF-1 y mantiene el factor de transcripción en un estado monomérico. En la exposición de células a un inhibidor de Hsp90 o a elementos que inducen estrés celular, el chaperón se disocia de HSF-1, y permite trimerizarse, entra el núcleo y se une a los elementos de respuesta de choque térmico encontrados en los promotores de proteínas de choque térmico, incluyendo Hsp70 y su activador, Hsp40.

YK5 interfirió de una forma dependiente de la dosis con la formación de los complejos de Hsp90 (Figura 6, sección c, izquierda y parte intermedia) sin afectar la expresión celular de los chaperones de componentes complejos (Figura 6, sección c, derecha). La inhibición de la formación del complejo de Hsp90 por YK5 conduce a liberación y desestabilización de onco-proteínas (Figura 6, sección d), pero no tiene efecto en la activación de HSF-1 (Figura 6, sección e). De acuerdo con la carencia de desestabilización del complejo de Hsp90/HSF-1 por YK5, sólo los inhibidores de Hsp90 de choque térmico y directos, pero no YK5, conducen en la formación de trímeros de HSF-1 (Figura 6, sección e). Estos resultados dan evidencia de soporte a la hipótesis que la competencia de transcripción de HSF-1 se reprime por la asociación con una Hsp90 y ningún complejo que contiene Hsp70s. También muestran que la acción reguladora de onco-proteínas de la maquinaria de Hsp90 se puede diferenciar de sus efectos en HSF-1, por inhibición de Hsp70s en etapa posterior. A este respecto, YK5 llega a ser una herramienta química para estudiar el efecto biológico de la inhibición de la maquinaria de Hsp90 en un ambiente de supresión de HSF-1 químico. Las ventajas de esta intervención son evidentes con respecto a las manipulaciones genéticas de HSF-1, permitiendo el análisis temporal y espacial del ambiente celular. La alteración de complejo de Hsp90 por YK5 toma lugar a bajas concentraciones micromolares crecientes (Figura 6c, parte intermedia) a las cuales también se presenta la degradación de las proteínas onco-clientes de Hsp90 (Figura 3a). Colectivamente, YK5 inhibió el crecimiento de células SKBr3 y degradó la oncoproteína cliente HER2 de Hsp70/Hsp90 a concentraciones que interrumpieron la formación de complejos de Hsp70/Hsp90, sugiriendo que, en este intervalo de concentración, la actividad biológica de YK5 se canalizó parcialmente a través de la interrupción de una maquinaria funcional de Hsp90. La interrupción del complejo de maquinaria/onco-proteína de Hsp90 por YK5, se asoció con desestabilización de onco-proteínas y su aceleración de depuración celular, como se demuestra por vida media reducida de proteína (Figura 7b), y reducción consecuente en los niveles celulares de estado estable de la oncoproteína (Figura 7a). La confirmación adicional de un efecto mediado por la maquinaria de Hsp90, y consistente con la degradación de proteínas cliente de la maquinaria de Hsp90 mediante la ruta de proteosoma en la inhibición del chaperón, los inhibidores de proteosoma pero no los inhibidores de otras enzimas proteolíticas, rescatando de forma eficiente la degradación de las onco-proteínas por YK5 (Figura 7c).

Colectivamente, estas modalidades demuestran que la actividad biológica de YK5 y otros compuestos relacionados de la presente materia con respecto a la regulación de proteínas onco-clientes, es, al menos parcialmente, una consecuencia de su capacidad para interferir con la formación del complejo intermedio activo de la maquinaria de Hsp90, que conduce a procesamiento celular inapropiado de proteínas onco-clientes de Hsp90 y da por resultado su degradación subsiguiente, principalmente por el proteosoma.

Ejemplo 4: Relación Estructural-Actividad en la Serie YK.

Para confirmar adicionalmente que una dependencia absoluta del valor de IC50 con reactividad del inhibidor de YK5 no puede ser dependiente del componente de la IC50 que refleja unión reversible (no covalente), se llevaron a cabo estudios pertinentes de relaciones de estructura-actividad. En realidad, la reducción de la acrilamida, como en YK30, a etilamida, como en YK31 (Figura 8a), retuvo mecanismo de acción activado por Hsp70, y disminuyó la actividad biológica por sólo 30 veces (Figura 8a y no mostrado). Además, el mantenimiento de la acrilamida pero no el cambio de la cadena de etilenglicol desde la posición R1, como en YK54 y su versión biotinilada YK55, a R2 como en YK57 y su versión biotinilada YK56, disminuyó la actividad biológica por aproximadamente 20-25 veces (Figuras 8b y 8c). En algunas modalidades, los compuestos de la presente materia con actividad biológica disminuida, en comparación a otros compuestos de la presente materia, aún pueden tener suficiente actividad para lograr la inhibición o la unión de enzimas o proteínas seleccionadas a concentraciones útiles de IC50 o constantes útiles de unión.

Colectivamente, estos datos indican que la interacción de YK5, y otros compuestos relacionados de la presente materia,

con Hsp70s consiste de dos elementos, uno que refleja la unión reversible y otro subsecuente la modificación covalente de cisteína.

En tanto que hay un interés que una entidad de acrilamida puede reaccionar indiscriminadamente con proteínas no relacionadas al objetivo que da por resultado efectos pleiotrópicos, la incubación de células con YK5 dio por resultado selectivamente la formación de aductos de YK55-Hsp70 (Figuras 4 y 5). Además, los agentes que dan por resultado la oxidación no específica de cisteínas se conoce que incrementan el mal plegado de proteínas celulares y conducen a activación protectora a consecuencia de una respuesta de choque térmico, fenómeno no observado con YK5. A la concentración fisiológicamente pertinente de 10 μ M, YK5 también fue inerte cuando se probó contra 359 cinasas (Figura 6f). Estos hallazgos confirman que a las concentraciones probadas, YK5 es un modulador específico de Hsp70s, y de esta manera, una herramienta apropiada para analizar el significado de la inhibición farmacológica de Hsp70s en sistemas biológicos *in vitro*.

Los esfuerzos de descubrimiento de fármacos tienden a evitar moléculas que exhiben cinética no competitiva, una precaución entendible considerando los potenciales eventos de toxicología asociados con la inhibición irreversible. No obstante, al menos 25 agentes en uso clínico como agentes anti-cáncer y anti-microbianos son modificadores covalentes de proteínas. Se puede razonar que para aglutinantes irreversibles, hay una menor necesidad de mantener altas concentraciones de fármaco en la circulación sistémica, y de esta manera una vez que se logra la inhibición objetivo, los efectos permanecen hasta que se sintetiza una nueva proteína objetivo. Además, para proteínas con una afinidad relativamente alta para ATP, tal como las Hsp70s, se puede argumentar que en la presencia de altos niveles celulares de ATP, la inhibición objetivo irreversible ofrece una ventaja terapéutica. Colectivamente, estas observaciones sugieren que si se logra un equilibrio entre el metabolismo de primera pasada y la inhibición y distribución objetivo suficiente a costo de toxicidad limitada, los inhibidores reversibles pueden tener un papel significativo en terapias anti-cáncer.

Para YK5, los presentes datos demuestran que los inhibidores reversibles retienen un mecanismo mediado por Hsp70, sugiriendo que se puede eliminar por completo el grupo acrilamida y se pueden identificar potentes inhibidores reversibles al mejorar la entalpia de la unión. En realidad, otras modalidades de la presente muestran compuestos de la presente materia con un modo de interacción reversible de Hsp70 (Figura 9, Figura 10 y Figura 11). La adición de estos compuestos de la presente materia a varias células de cáncer dio por resultado la degradación de proteínas oncogénicas pertinentes e indujo apoptosis de una manera similar a YK5. Por lo tanto, estas modalidades demuestran que se puede lograr una importante actividad como se describe en la presente por los compuestos de la presente materia que interactúan con Hsp70 ya sea por un modo de unión irreversible o reversible. En una modalidad particular, estos compuestos interactúan con el Sitio 1 descrito anteriormente.

También se han reportado esfuerzos para investigar la pertinencia biológica de la inhibición de Hsp70 por moléculas pequeñas. Esto sugiere que las Hsp70 no son tan fácilmente dirigibles al objetivo como la Hsp90. Recientemente, se han descrito varios moduladores de Hsp70, sin embargo estos compuestos son de baja potencia y no están completamente claros sus efectos pleiotrópicos potenciales en la fisiología celular. También se conoce poco de su modo de interacción con las isoformas de Hsp70. Además, estos compuestos se basan en núcleos moleculares de características limitadas tipo fármaco. Adicionalmente, de manera sorprendente, se observó una respuesta apoptótica baja o ninguna en células de cáncer con varios de estos inhibidores de Hsp70, una paradoja aparente considerando las potentes funciones anti-apoptóticas reportadas de la Hsp70.

Además, la manipulación genética de Hsp70 conduce a hallazgos en conflicto. Havik et al reportó que la reducción individual o mezclada en la expresión de Hsp70 y Hsc70 en dos células de cáncer de mama SKBr3 y MCF-7, en tanto que reduce la viabilidad celular, no exhibió capacidad para reducir la actividad del complejo de chaperón de Hsp90/Hsp70. Por otra parte, la transfección simultánea que tiene como objetivo tanto Hsc70 como Hsp70 inhibió las funciones de Hsp90 en células de cáncer de colon HCT116. Nylansted et al., encontraron que el agotamiento de Hsp70 también conduce a erradicación de glioblastoma, y de xenoinjertos de carcinoma de colon y mama, en tanto que en células de cáncer de próstata, otros reportaron sólo sensibilización a agentes anti-cáncer.

En contraste a las estrategias mencionadas anteriormente, el presente trabajo identifica YK5, un modulador dual y selectivo de Hsp70 y Hsc70, diseñado en núcleo molecular potencialmente convertible en fármaco, tratable con la química medicinal extensiva. También en contraste a las estrategias anteriores, YK5 y los compuestos relacionados de la presente materia han mostrado tener potentes propiedades antiproliferativas, por las muchas medidas descritas en la presente, sin ser tóxicos a células normales.

Ejemplo 5: Modulación Farmacológica de Hsp70 Interfiere con Huellas Principales de Malignidad

La transformación de células normales en células malignas es un proceso de múltiples pasos, que requiere la acumulación de varias alteraciones genéticas que tienen influencia en los procesos reguladores clave en la célula. Hanahan y Weinberg describieron seis rasgos fenotípicos esenciales que se requieren para el desarrollo del fenotipo maligno completo, referido como las "seis características" del cáncer. Para cada rasgo característico, se ha identificado

al menos una proteína cliente de la maquinaria de Hsp90 que tiene la capacidad de regular este proceso, y los inhibidores directos de Hsp90 tienen la capacidad de tener influencia en las seis de estas características. Habiendo desarrollado un regulador farmacológico de Hsp70, entonces se investigó el papel de Hsp70 en la maquinaria de Hsp90 con respecto a las características del cáncer.

5 Las células de cáncer se caracterizan por proliferación anormal. Ciertos clientes de la maquinaria de Hsp90, tal como Akt y Raf-1, son jugadores principales en las vías necesarias para el crecimiento de supervivencia de tumores, y se regulan por Hsp90 en la mayoría de tumores. Consistente con la participación de las Hsp70s en estas funciones de Hsp90, se observa una degradación dependiente de la dosis y una inactivación de estas moléculas ubicuas activadoras de tumor en la adición de YK5 y compuestos relacionados de la presente materia a una variedad de células de cáncer, incluyendo células de cáncer de mama SKBr3 y MDA-MB-468, el carcinoma pulmonar de células pequeñas NCI-H526 y la leucemia mieloide aguda MOLM-13 (Figura 3, 7-10 y Tabla 1). Otros onco-clientes de Hsp90, específicos a un fenotipo maligno particular, también fueron sensibles a YK5. En el caso de la línea de células de cáncer de mama SKBr3, se activa la transformación por la sobre-expresión de la tirosina-cinasa HER2, que activa las vías de señalización promoviendo el crecimiento celular y la supervivencia celular. La estabilidad de HER2 en esta célula se regula por Hsp90, y la inhibición de chaperón por inhibidores directos de Hsp90 da por resultado la degradación de HER2 (Figura 3). El receptor de andrógeno (AR) mutante expresado en células de cáncer de próstata LNCaP y la cinasa mutante FLT-3 característica de leucemia mieloide aguda y expresada en células MOLM-13, ambos clientes en la maquinaria de Hsp90, también fueron sensibles a YK5 y compuestos relacionados de la presente materia descrita en la presente (Figuras 10a y 15d). STAT3 y PDK1, activados en células de cáncer triple-negativas y STAT5, activado en leucemias, también fueron sensibles a YK5 y compuestos relacionados de la presente materia descrita en la presente (Figuras 9-11, 15d).

Concordante con un mecanismo común de acción a través de la inhibición del complejo patógeno Hsp70/Hsp90, los inhibidores directos de Hsp90 PU-H71 y PU24FCI, así como YK5 inhibieron el crecimiento de todas las células de cáncer probadas, a pesar de su origen y antecedente genético (Figura 12a y Tabla 1). Se probaron células de cáncer de mama triple-negativas MDA-MB-468, células de cáncer de mama SKBr3 HER2+, células de cáncer de próstata LNCaP mAR+, células de leucemia mieloide aguda MOLM-13 y Kasumi-1, células de linfoma de células B grandes difusas OCI-Ly7 y células de carcinoma hepatocelular HuH7. YK5 también inhibió el crecimiento de tumores xenoinjertados MDA-MB-468 (Figura 12b). En células de cáncer, las concentraciones medias inhibitorias de crecimiento (GI_{50} s) registradas para YK5 estuvieron en alta concordancia con su potencia para degradar onco-clientes de Hsp90. De forma colectiva, estos resultados sugieren que adicionalmente, a la dosis farmacológicamente pertinente, la actividad biológica de YK5 es un reflejo de su objetivo, la inhibición de Hsp70.

La proliferación anormal en células de cáncer se asocia con la desregulación del ciclo celular, y varios componentes moleculares de la transición a través del ciclo celular se controlan por la maquinaria de Hsp90. Los inhibidores directos de Hsp90 conducen a la detección del ciclo dependiente de la célula, y ciertas células, tal como SKBr3, se bloquean en una etapa G_0/G_1 , en tanto que otras tal como MDA-MB-468, en G_2/M . De acuerdo con este mecanismo de selección de objetivo de la maquinaria de Hsp90, YK5 tiene un efecto similar en el ciclo celular en estas células (Figura 12c, izquierda). Sus efectos se asociaron con el agotamiento de proteínas del ciclo celular dependiente de la maquinaria de Hsp90, tal como la proteína reguladora de G_2/M , CDK1 en MDA-MB-468, y la proteína reguladora de G_1 , Ciclina D1 en SKBr3 (Figura 12c, derecha). Además, se encontraron estas proteínas en el complejo con Hsp70 aislado de YK5 (Figura 12d).

La invasión en tejidos adyacentes y la metástasis a sitios distantes son características importantes de células de cáncer malignas y son la causa de 90 % de las muertes por cáncer en humanos. La invasión y metástasis son procesos complejos y requieren acciones coordinadas de una gran variedad de genes, incluyendo muchas cinasas. Varias proteínas comprendidas en el incremento del potencial metastático de células de cáncer se regulan por Hsp90, incluyendo la ruta de PI3K/Akt, una ruta de señalización clave que activa la invasión de células tumorales. En las células de cáncer de mama MDA-MB-231 altamente metastáticas, la inhibición de esta ruta es suficiente para reducir su potencial invasivo. De forma concordante, YK5, que disminuyó los niveles celulares de Akt activado, como se evidencia por reducción en Akt fosforilado en Ser473 (Figura 12e, superior), inhibió la capacidad de las células MDA-MB-231 para invadir a través de Matrigel (Figura 12e, inferior). Colectivamente, estos hallazgos demuestran que la modulación farmacológica de Hsp70 a través de un mecanismo mediado por YK5, imita parcialmente los efectos de los inhibidores directos de Hsp90 con respecto a la degradación de onco-proteínas, a la inhibición de la proliferación y ciclo de células anormales, y a la reducción de potencial invasivo. De manera similar, también se puede esperar que otros compuestos de la presente materia tengan también estas mismas actividades.

La evasión de apoptosis es otra característica importante del cáncer. Las células de cáncer sufren muerte celular significativa cuando se estimulan con YK5, y para ciertas líneas de células de cáncer este efecto fue consistentemente mayor que en la inhibición directa de Hsp90 (Figuras 3a y 13). En tanto que en ciertas células, tal como MDA-MB-468, OCI-Ly7 y MOLM-13, se observa aniquilación considerable e igual en la inhibición de Hsp90 por PU24FCI y la inhibición de Hsp70 por YK5, otras, tal como LNCaP, SKBr3 y HuH7, parecen ser más sensibles hacia la inhibición de Hsp70 (Figura 12a). El efecto de aniquilación celular reducida en estas células se reportó para otros inhibidores de Hsp90 de distintos quimiotipos, sugiriendo una consecuencia específica relacionada al objetivo, y no un evento no específico, tal

como el metabolismo potencial de inhibidor de Hsp90.

Para determinar si la muerte celular por YK5 fue atribuible al apoptosis, se trataron células con YK5 y se analizaron (Figura 13) los efectos en la morfología, así como en varios efectores y mediadores de la apoptosis. Para cuantificar el número de células que sufren apoptosis, las células se tiñeron con naranja de acridina/bromuro de etidio (AO/EB) y se analizaron bajo un microscopio de fluorescencia para el porcentaje de células viables, apoptóticas (tempranas y tardías) y necróticas. Los cultivos celulares tratados con YK5 demostraron un incremento significativo y preferencial dependiente de la dosis en células que muestran las características morfológicas de la apoptosis, tal como encogimiento y fragmentación nuclear (Figura 13a, *izquierda* y Figura 13b). La cuantificación de estos experimentos después de 24 horas de tratamiento, mostró que aproximadamente 5 % de las células estaban sufriendo apoptosis en células Kasumi-1 de leucemia mieloide aguda (AML) tratadas con vehículo, y su número incrementó a 70 % cuando se estimuló con YK5 10 μ M (Figura 13a, *derecha*). Se observó sólo 9 % de muerte celular apoptótica en condiciones idénticas con PU24FCI (Figura 13a, *derecha*). El efecto apoptótico incrementado de YK5 en comparación a inhibidores directos de Hsp90 se observó en otras células de cáncer, tal como en células de cáncer de mama y próstata (no mostrado). Más sensibles a YK5 fueron las células de cáncer pancreático. Cuando se probó en un panel que consiste de células Mia-PaCa2, AsPC-1, BxPC3 y PL45, YK5 (10 μ M) indujo apoptosis significativa después de sólo 24-48 horas de tratamiento (Figura 13b y no mostrado), un hallazgo notable considerando el alto umbral anti-apoptótico del cáncer pancreático, y su resistencia a las terapias.

A nivel molecular, se demostró la apoptosis por YK5 y compuestos relacionados de la presente materia en células de cáncer por un incremento en activación y escisión de caspasa-3 (Figuras 9, 10, 14) y PARP (Figura 13c). Estos efectos en los marcadores apoptóticos se presentaron a concentraciones de YK5 en concordancia con su actividad anti-proliferativa y su capacidad para degradar onco-proteínas dependientes de la maquinaria de Hsp90, sugeriendo de un mecanismo de acción común mediado por Hsp70 de YK5 en las características de cáncer.

Ejemplo 6. YK5 Induce Apoptosis a Través de Vías Mediadas por Hsp70 y Hsp90.

Se ha documentado que tanto Hsp70 como Hsp90 inhiben la apoptosis. La Hsp70 protege a las células de una amplia variedad de estímulos apoptóticos y necróticos, y se cree que niveles elevados de Hsp70 aumentan la supervivencia de células tumorales. En concreto, se ha reportado que Hsp70 inhibe la pérdida del potencial de membrana mitocondrial que precede a la liberación tanto del citocromo-C como de AIF de la mitocondria. También se ha señalado un efecto directo de Hsp70 en el citocromo c, Apaf-1 y AIF. También se documentó la implicación de Hsp70 en un paso temprano en la transducción de señales apoptóticas mediante la supresión de la cinasa JNK activada por estrés. Además, se encontró que Hsp70 media la protección de la citotoxicidad de TNF, para unirse y modular la actividad y localización de factores anti-apoptóticos tal como Bcl2, y para promover la degradación e inactivación de factores pro-apoptóticos tal como p53 y c-myc. De esta manera, Hsp70 inhibe la apoptosis al regular varios elementos clave de las vías apoptóticas intrínsecas y extrínsecas. En contraste, la regulación de la apoptosis por Hsp90 es más limitada, y las moléculas principales anti-apoptóticas reguladas por Hsp90 son Akt y Bcl-xL. En tanto que se regulan varias moléculas anti-apoptóticas, los dos chaperones, Hsp90 y Hsp70 no son inhibidores ubicuos de la apoptosis en cáncer. Su efecto se manifiesta de una manera específica de la transformación que es dependiente de la funcionalidad y entramado celular de las vías apoptóticas.

A lo largo de estas líneas, se reportó recientemente que en células SKBr3, la inactivación de Hsp90 detiene su crecimiento y conduce a la degradación de Akt pero falla en inducir apoptosis apreciable. En contraste estos agentes inducen apoptosis masiva en células de carcinoma pulmonar de células pequeñas NCI-H526. Todo lo contrario, el tratamiento de células con MAL3-101, un agente que interfiere con la activación de Hsp70 por J-proteínas, o con cuercetina y KNK437, ambos inhibidores inducibles de la expresión de Hsp70, da por resultado muerte celular sustancial por apoptosis en SKBr3 pero no en NCI-H526. La reducción de la expresión de Hsp70 por secuencias antisentido también indujo muerte celular considerable en células SKBr3. Colectivamente, estos estudios propusieron Hsp70 un regulador importante de vías apoptóticas en SKBr3 pero no en NCI-H526, y por el contrario, indicaron Hsp90 como un regulador principal de la apoptosis en NCI-H526 pero no en SKBr3. Actuando de forma simultánea en las vías de Hsp90 y Hsp70, YK5 y los compuestos relacionados de la presente materia inducen apoptosis significativa tanto en células SKBr3 (Figura 13c) como en células NCI-H526 (Figura 14 y no mostrado).

Además de inhibir la supervivencia celular autónoma, la inducción de la expresión de Hsp70 se reporta que vuelve a las células altamente resistentes a muerte celular inducida por factor de necrosis tumoral (TNF), estrés oxidativo, radiación UV, sobre-expresión de caspasa-3, y varios fármacos quimioterapéuticos. De acuerdo con este efecto en Hsp70, YK5 incrementó el efecto apoptótico de TNF α en células de cáncer de mama, triple-negativas, MDA-MB-468 (Figura 13e).

Colectivamente, estos hallazgos sugieren que la inhibición dual de Hsp70 y Hsc70 induce apoptosis en un espectro de tumores mayor que la inhibición sola de Hsp90 o Hsp70, indicando una potencia terapéutica potencial incrementada de estos inhibidores en cánceres. También muestran que los compuestos de la presente materia descrita en la presente pueden potenciar el efecto terapéutico de otras intervenciones.

La apoptosis incrementada observada con YK5 en comparación a inhibidores directos de Hsp90 también se puede explicar parcialmente por su incapacidad para inducir una respuesta de choque térmico de retroalimentación. En tanto que se ha mostrado que ciertos tumores son susceptibles a apoptosis después de inhibición directa de Hsp90, una inducción de retroalimentación de Hsp70 en la inhibición directa de Hsp90 limita la citotoxicidad de estos agentes en muchos tipos de tumores. A nivel de proteína, la inducción de la síntesis de proteína de Hsp70 se ha demostrado para todos los inhibidores conocidos de Hsp90, y se ha observado tanto de forma pre-clínica como de manera clínica. De manera preferencial los inhibidores directos de Hsp90 son citotóxicos a células que se suprimieron de HSF-1, y aún una regulación descendente a corto plazo de Hsp70 en ciertas células de cáncer por ARNs i y planteamiento antisentido las hace más sensibles a inhibidores de Hsp90. A lo largo de estas líneas, moléculas pequeñas que imparten activación de HSF-1 también sensibilizan células a la inhibición de Hsp90. Adicionalmente, ciertas células tumorales que fallan en favorecer la expresión de niveles de Hsp70 parecen ser particularmente sensibles a la inhibición de Hsp90. La inducción de Hsp70 por otras intervenciones se documenta que da por resultado citoprotección, y la evidencia experimental sugiere que el nivel celular de Hsp70 es un parámetro crítico para susceptibilidad a apoptosis. Considerando estas capacidades principales anti-apoptóticas, la incapacidad de YK5 para inducir Hsp70 y activar HSF-1 (Figura 3), al menos en parte, da cuenta de su mayor citotoxicidad (Figura 12a) y respuesta apoptótica (Figura 13) en comparación a inhibidores directos de Hsp90. De acuerdo adicionalmente con esta observación, los inhibidores de Hsp90 fueron más tóxicos a células de cáncer pre-tratadas con YK5, o cuando se adicionaron conjuntamente agentes inhibitorios de Hsp90 y Hsp70.

Colectivamente, estos hallazgos sugieren que la inhibición farmacológica dual de Hsp70 y Hsc70 tienen la capacidad de tener influencia en una multitud de características oncogénicas, conduciendo un ataque comprensivo del fenotipo maligno y dando por resultado letalidad de células de cáncer.

Además, los presentes datos demuestran que la inhibición de Hsp70 tiene un efecto más profundo en la apoptosis en comparación a la inactivación de Hsp90, sugiriendo una potencia terapéutica potencial incrementada de estos inhibidores en cánceres.

25 Ejemplo 7: Inhibición Farmacológica de Hsp70 es Selectivamente Tóxica a Células de Cáncer.

Debido a que Hsp70 ayuda en las funciones de mantenimiento de células normales, tal como el plegado de polipéptidos recién sintetizados, el replegado de proteínas malplegadas, y la translocación de proteínas a través de membranas biológicas, permanece no claro si las interacciones farmacológicas que tienen como objetivo ambas isoformas de Hsp70 y Hsc70, tal como YK5, son no tóxicas a estas células. Para afrontar esta materia, se evaluó el efecto citotóxico de YK5 en un panel de células normales, específicamente leucocitos de sangre periférica (PLB) obtenidos de donadores sanguíneos saludables y fibroblastos normales cultivados, tal como las células de colon CCD18Co y las células de pulmón MRC-5 (Figuras 14a-c). La muerte celular fue mínima en células normales después de la inactivación farmacológica de Hsp70 por YK5 por medida de la actividad metabólica (Figura 14a, *superior*), activación de apoptosis (Figura 14b, 14c) e inspección visual de morfología celular (Figura 14c, *inferior*). Entre tanto, en condiciones similares, las células de cáncer experimentaron muerte significativa cuando se estimularon con YK5 (Figuras 14a-14c). En los especímenes primarios de AML, YK5 indujo potente muerte celular en poblaciones de blastocitos, en tanto que las células no tumorales encontradas dentro de la misma muestra de paciente fueron significativamente menos afectadas por el tratamiento. Además, cuando tejido fresco obtenido en cirugías de un paciente con un carcinoma ductal infiltrante pobremente diferenciado de estado ER, PR, HER2 se trató *ex vivo* con YK5 (5 μ M), no se observó ningún cambio relacionado al tratamiento en vasos sanguíneos normales y estroma, sino apoptosis masiva en células tumorales (60 % de células tumorales se murió o agonizó en 24 horas después de la adición de YK5) (no mostrado). Colectivamente, estos hallazgos indican que YK5 y los compuestos relacionados de la presente materia son selectivamente tóxicos a células de cáncer.

Conjuntamente con los hallazgos de manipulaciones genéticas de Hsp70, donde la lentificación de las isoformas de Hsp70 fue menos tóxica en líneas de células no tumorígenas que en células de cáncer, la mayor sensibilidad de células de cáncer hacia la expresión de Hsp70 e inactivación de función se puede justificar por un modelo semejante al modelo de "adicción de oncogen" propuesto por Weinstein. En este modelo, la degradación de un cliente específico de Hsp70 en el contexto genético apropiado (por ejemplo HER2 en células con sobre-expresión de la tirosina-cinasas) por YK5 dio por resultado apoptosis y/o diferenciación, en tanto que su degradación en células normales tiene poco o ningún efecto. Se ha usado este modelo para justificar el desarrollo clínico de inhibidores directos de Hsp90 en una amplia variedad de tipos de tumor.

Sin embargo, no se puede excluir un uso más sofisticado de las Hsp70 en células de cáncer, que se pueden seleccionar selectivamente como objetivo por la molécula pequeña de YK5, de una manera ciertos inhibidores de Hsp90 seleccionan especies tumorales de Hsp90. Para investigar esta posibilidad, se midió la interacción de cuentas de YK55 con extractos de células normales y de cáncer. En un primer experimento, se llevaron a cabo experimentos de precipitación química de una célula normal, MRC-5 y una célula de cáncer, SKBr3 con concentraciones crecientes de cuentas de YK55 (Figura 14c, *sección superior*). Las cuentas de TK55 interactuaron fuertemente con una especie de Hsc/p70 unida a Hsp40 en las SKBr3. En las MRC-5, la interacción fue más débil, y la especie de Hsp40 indetectable en la reducción de YK55. Para aumentar los niveles de Hsp en las células MRC-5, estas células se expusieron a

tratamiento de choque térmico antes del paso de precipitación química. El choque térmico elevó la expresión de las Hsp70s y las Hsp40s, pero no alteró la selectividad y afinidad de YK55 (Figura 14d, *sección del medio*). Se determinaron hallazgos similares en extractos cerebrales. Aunque este tejido tiene alta expresión de Hsc70, comparable a células de cáncer, la especie Hsp70 en extractos cerebrales interactúa débilmente con YK55 (Figura 14d, *sección inferior*).

En un segundo experimento, se probó la capacidad de YK5 soluble para competir por la unión por YK55 a la especie de Hsp70 de células normales y de cáncer (Figura 14e). De forma interesante, la unión de cuentas de YK55 a la especie Hsp70 de extractos de células de cáncer SKBr3 se compitió por concentraciones micromolares bajas de YK5, en tanto que una concentración de YK5 que excedió 200 μ M fue necesaria para observar el desplazamiento de las Hsp70s expresadas en las células MRC-5 (Figura 14e). La interacción de YK5 fue aún más débil con Hsp70 humana recombinante (Figura 14e).

Hsp70 en células de cáncer existe en complejos heterogéneos, con especies de Hsp70 unidas a co-chaperón y proteína onco-cliente probablemente para coexistir en cualquier momento con Hsp70 libre y Hsp70 unida a co-chaperón. El análisis en este contexto y hallazgos de la Figura 15, indican que las especies de Hsp70 que están unidas a onco-proteínas son más sensibles a la competición con YK5 soluble, sugiriendo una mayor afinidad de YK5 para estas especies de Hsp70.

Colectivamente, estos resultados sugieren que los compuestos de la presente materia, tal como YK5, pueden tener una mayor afinidad para las especies de Hsp70s expresadas en células malignas, y además pueden preferir estas especies de Hsp70 que están unidas a co-chaperones y onco-proteínas, proporcionando una explicación potencial de la sensibilidad selectiva observada de células de cáncer a los compuestos de la presente materia, tal como YK5, y de la sensibilidad incrementada de las onco-proteínas a inhibición inducida por los compuestos de la presente materia.

Ejemplo 8. Ensayo de Polarización de Fluorescencia de Competición de Cy3B-K5 de Hsp70

Debido a que YK5 y los compuestos relacionados de la presente materia se unen con mayor afinidad a complejos de Hsp/c70 encontrados en células de cáncer que a proteína recombinante (Figura 14d, e), se diseñó un ensayo de polarización de fluorescencia (FP) que midió la unión competitiva de YK5 marcado con cy3B o compuestos relacionados de la presente materia a complejos de Hsp/c70 de lisado de cáncer. En principio, los lisados celulares se pre-incubaron con un compuesto de la presente materia descrito en la presente, y en la adición y equilibrio de YK5-cy3B, la señal se lee en un lector de placa Analyst GT. El ensayo se desarrolló para un formato de 96 concavidades y permite una evaluación rápida de los compuestos (Figura 16).

Preparación de Lisado de Células de Cáncer Humanas: La línea de células de cáncer de mama de humano MDA-MB-468 se obtuvo de la American Type Culture Collection (Manassas, VA) y se cultivó como se indica por el vendedor. Las células se recolectaron y congelaron para ruptura de las membranas y luego se disolvieron en amortiguador de unión con inhibidores adicionados de proteasa y fosfatasa para formar el lisado. Los lisados se almacenaron a -80°C antes del uso. Se determinó el contenido total de proteína usando el equipo de ensayo de ácido bicinonínico (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Ensayo de FP de competición de Cy3B-K5 de Hsp70: Se realizaron mediciones de FP usando placas de microtítulo de 96 concavidades, negras (Corning # 3650), donde tanto la excitación como la emisión ocurrió de la parte superior de la concavidad. El amortiguador de unión de FP de Hsp70 contuvo lo siguiente: HEPES-K 25 mM, pH=7.2, NaCl 20 mM, CaCl₂ 200 μ M, KOAc 110 mM, Mg(OAc)₂ 2 mM, NP40 al 0.01 %. Cada concavidad de ensayo contuvo 20 μ g de lisado celular y el inhibidor de YK en 75 μ l de amortiguador. La mezcla se mantuvo en un agitador durante 10 minutos, luego se incubó a 37°C durante 2 horas. El trazador se adicionó a cada concavidad dando por resultado una concentración final de Cy3B-YK5 3nM y un volumen final de 100 μ L. Entonces se realizó la medición en un lector de placa Analyst GT (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Se usó un tiempo de integración de 100 ms, y la altura Z se ajustó a 3 mm (media). La polarización de excitación se ajustó a estática, y la polarización de emisión se ajustó a dinámica. Para cy3B-YK5, se usaron un filtro de excitación a 530 nm y un filtro de emisión a 580 nm con un espejo dicróico de 561 nm. Todos los valores de FP se expresaron en unidades de milipolarización (mP). Los valores de mP se calcularon usando la ecuación $mP = 1000 \times [(I_S - I_{SB}) - (I_P - I_{PB})] / [(I_S - I_{SB}) + (I_P - I_{PB})]$, donde I_S es la medición de intensidad de emisión paralela, I_P es la medición de muestra de intensidad de emisión perpendicular, e I_{SB} e I_{SP} son las correspondientes mediciones para el fondo (amortiguador). La fluorescencia total se determinó como $2 \times I_P + I_S$.

Como se puede ver en la Figura 16, se adicionaron concentraciones crecientes de los inhibidores indicados en triplicado a la placa de ensayo y se realizó el ensayo de FP como se indica anteriormente. El efecto competitivo se expresó como porcentaje de control y se calculó al dividir el valor de milipolarización (mP; sustrayendo cy3B-YK5 libre) de las concavidades de inhibidor por el mP promedio (sustrayendo cy3B-YK5 libre) de controles (cy3B-YK5 y lisado celular con vehículo DMSO) en cada placa. Se graficó la unión de

ligando contra la concentración de inhibidor \log_{10} , y los valores de EC_{50} se calcularon usando un parámetro de ajuste a la curva de mínimos cuadrados no lineal en Prism 4.0. Puntos, media; barras, s.d. La Figura 16 indica que la adición de los compuestos indicados de la presente materia, agotaron de forma dependiente de la dosis la unión de YK5-cy3B a Hsp70 en el lisado celular.

5 Ejemplo 9. YK5 Atrapa Hsp70 en Una Conformación Unida a Proteína Cliente. Uso de YK5 Inmovilizado en Soporte Sólido para Identificar Onco-Proteínas Específicas de Cáncer: STAT1 en Cáncer de Mama

10 Las cuentas de YK55 aíslan preferentemente Hsp70 en complejo con varias onco-proteínas específicas de tumor (Figuras 15a-d). La pre-incubación de lisados celulares con YK5, disminuyó de una manera dependiente de la dosis, la capacidad de las cuentas de YK55 para interactuar con las Hsp70s, y dio por resultado el desplazamiento de onco-proteínas unidas (Figura 15c). Debido a que el Ab anti-Hsp70s BB70 puede agotar los niveles celulares de Hsp70 y Hsc70, pero es débil en atrapar las Hsp70s en un co-chaperón (es decir, Hsp110) y la conformación unida a onco-proteína cliente, se sondeó la especificidad de las cuentas de YK55 para las Hsp70s. Específicamente, cuando se incubaba con BB70 pero no extractos irrelevantes agotados de Hsp70s de IgG, las cuentas de YK55 fallaron en interactuar significativamente con Hsp110 y Raf-1, confirmando que la interacción de YK55 con Hsp110 y Raf-1 se presentó a través de un complejo mediado por Hsp70s (Figura 15a, *derecha*).

20 Colectivamente, estos hallazgos indican que YK5 aísla Hsp70 en una conformación de onco-cliente, sugiriendo el uso de cuentas de YK55 o compuestos relacionados de la presente materia en el descubrimiento de clientes de Hsp70 dependientes del tipo de tumor, que confiere la posibilidad sin precedentes de investigar la interactoma de las Hsp70s de cáncer en un ambiente celular endógeno. Estos esfuerzos son críticos para el descubrimiento de mecanismos asociados con sensibilidad de tumores a inhibición de Hsp70, para diseñar terapias combinatorias racionales que incluyen los compuestos de la presente materia descritos en la presente e inhibidores de cuentas de YK55 aíslaron onco-proteínas activadas y vías, y para una traducción racional de los compuestos de la presente materia descrita en la presente y de otros inhibidores de Hsp70 al tratamiento de cáncer.

25 Para validar la utilidad de las cuentas de YK55, la mezcla de Hsp70s aislada por YK55, pero no por biotina, se mostró primero que contiene un cliente establecido de Hsp70s tal como la serina-treonina-cinasa Raf-1 (Figura 15a, *izquierda*). Las cuentas de YK55 fallaron en interactuar de forma significativa con la cinasa oncogénica Raf-1 en células agotadas de Hsp70, confirmando que la interacción de YK55 con el producto oncogénico se presentó a través del complejo mediado por las Hsp70s (Figura 15, *derecha*).

30 Entonces, se probó si las Hsp70s, como la Hsp90, tienen la capacidad de interactuar con onco-proteínas específicas a un antecedente genético. Se encontraron varias oncoproteínas, comprendidas ya sea en la señalización incrementada a través de una ruta patogénica o en el ciclo celular anormal, en complejo con las Hsp70s. Estas, también conocidas como interactores de Hsp90, incluyen Ciclina D1 y la cinasa HER2 en las células de cáncer de mama SKBr3 que sobreexpresan HER2, cinasa 1 dependiente de ciclina (CDK1) y cinasa-1 dependiente de fosfoinositida (PDK1) en las células de cáncer de mama MDA-MB-468 y receptor de andrógeno (AR) mutante en las células de cáncer de próstata LNCaP (Figuras 15b, c). La pre-incubación de lisados celulares con YK5, disminuyó de una manera dependiente de la dosis la capacidad de las cuentas de YK55 para interactuar con las Hsp70s, y dio por resultado el desplazamiento de onco-proteínas unidas (Figura 15c).

40 Colectivamente, estos datos demuestran que las cuentas de YK5 aíslan varios productos de oncogenes regulados por Hsp70 que se proporcionan al efectuar la señalización anormal específica de la célula. La inhibición de estos productos de oncogén en el contexto genético correcto conduce a inhibición tumoral y apoptosis, y de esta manera su degradación se puede usar como un ensayo funcional (es decir, biomarcadores de respuesta) para evaluar la respuesta clínica a los compuestos descritos en la presente de la presente materia. Los inhibidores de estos productos de oncogén también se pueden usar en combinación con los compuestos de la presente materia descritos en la presente para diseñar terapias personalizadas con resultado mejorado. Para identificar los productos pertinentes de oncogén sensibles a la inhibición de Hsp70 por las composiciones de materia, relacionadas, descritas en la presente, se describe aquí el uso de cuentas de YK55.

Investigación de la Interactoma de las Hsp70s en Tumores de Mama

50 Las HSP son proteínas ubicuamente expresadas con funciones muy amplias en el plegado y translocación celular de una variedad de proteínas. En tanto que estas funciones de mantenimiento son bien conocidas y han sido el sujeto de investigación intensa, ahora está llegando a ser claro que los chaperones se acogen en células patógenas para llevar a cabo distintos y especializados papeles específicos de la enfermedad.

55 Para el chaperón de Hsp90, estas funciones en la malignidad se han descifrado principalmente a través del descubrimiento de un inhibidor de molécula pequeña, la geldanamicina. En contraste, la carencia de moléculas pequeñas que modulen selectivamente a las Hsp70s en este contexto y los hallazgos algo contradictorios por medio de manipulaciones genéticas de Hsp70 y Hsc70, ha reprimido nuestra capacidad para entender completamente la

implicación de Hsp70 y Hsc70 en formación maligna. Debido a que YK5 y los compuestos relacionados de la presente materia son moduladores de Hsp70s con un nuevo mecanismo de acción, que fija las Hsp70s en complejo con proteínas onco-clientes y moléculas reguladoras de apoptosis, esto permite la oportunidad única para investigar de forma neutral la interactoma de las Hsp70s en la célula de cáncer.

Secuencia	SEQ ID NO	Cuentas de control de MDA-MD-468	Cuentas de YK55 de MDA-MB-468	Cuentas de control de SKBr3	Cuentas de YK55 de SKBr3
		intensidad	intensidad	intensidad	intensidad
(R)FHDLLSQLDDQY SR(F)	SEQ ID NO:5		9.51E+07		5.32E+07
(R)FNQAQSGNIQST VMLDK(Q)	SEQ ID NO:6				5.44E+07
(R)FNQAQSGNIQST VmLDK(Q)	SEQ ID NO:7				5.50E+07
(R)GLNVDQLNMLG EK(L)	SEQ ID NO:8			2.58E+08	1.60E+08
(K)LLGPNASPDGLI PWTR(F)	SEQ ID NO:9		1.34E+08		
(K)SLEDLQDEYDFK (C)	SEQ ID NO:10				8.30E+07
(K)TELISVSEVHPSR (L)	SEQ ID NO:11				3.97E+08
(K)VMAAENIPENPL K(Y)	SEQ ID NO:12				6.39E+07

Tabla 14. Un YK5 inmovilizado en soporte sólido identifica STAT1 como un interactor de Hsp70 en las células de cáncer de mama. Complejos de proteínas aislados por cuentas de control, que tienen unida D-biotina, y por cuentas de YK55 en lisados de cáncer de mama MDA-MB-468 humano y SKBr3 humano, se separaron en SDA-PAGE, se escindió una banda de 90kDa, y las proteínas extraídas se digirieron y se analizaron por LC/MS/MS, como se describe en métodos. Los aminoácidos en los paréntesis se escindieron del resto de la secuencia durante la extracción. El análisis de secuencia identificó la banda que es STAT1.

5 Para llevar a cabo un análisis imparcial de la interactoma de las Hsp70s de cáncer, se realizó un análisis proteómico en reducciones de cuentas de control y de YK55 a partir de células de cáncer de mama SKBr3 y MDA-MB-468. Entre las proteínas identificadas (Tabla 14) y validadas (Figura 17, Figura 18) de cargo estuvieron en el transductor de señal y el activador de transcripción 1 y 3 (STAT1 y STAT3). YK55 falló en interactuar con los STAT en las células inmunoagotadas de Hsp70s (Figura 18b), indicando que la unión de YK55 a los STAT se midió por Hsp70 y fue específica de Hsp70. De forma integrante, contrario a Raf-1 y otras oncoproteínas, la adición de YK5 a células falló en reducir los niveles de estado estable de STAT1 (Figura 17a, *derecha*). Por otra parte, una reducción en STAT3 activo pero no en STAT1, como se evidencia por niveles bastantes disminuidos de p-STAT3, se observó en el tratamiento con YK5 (Figura 17a, *derecha*).

15 Los STAT son una familia de factores de transcripción con papeles críticos en la integración de una variedad de estímulos extracelulares. En tanto que la mayoría de los miembros de la familia de STAT, tal como STAT3 y el STAT5 se ha mostrado que promueve la oncogénesis, el STAT1 suprime la oncogénesis, sugiriendo que para sobrevivir, las células de cáncer necesitan desarrollar mecanismos opuestos para mantener de forma concomitante una expresión incrementada de p-STAT3 y p-STAT5, en tanto que suprime los niveles de p-STAT1. En realidad, en células de cáncer de mama se encontró abundante p-STAT3 (Figuras 8-11, Figura 17), pero niveles escasamente detectables de STAT1 activado (Figuras 17, 18, ver niveles de p-STAT1 en células estimuladas con IFN γ versus endógeno). Por lo tanto, se preguntó si en las células de cáncer, el ajuste fino en los niveles de las especies de p-STAT1 y p-STAT3 se puede regular por las Hsp70s. Dado que la activación de STAT1 puede promover la muerte celular, y debido a que las células

de cáncer de mama expresan STAT1, se tuvo como hipótesis que la unión de las Hsp70s a STAT1 en estas células puede jugar un papel al inhibir su función pro-apoptótica, sugiriendo un posible mecanismo por el cual las células de cáncer protegen contra IFN γ y el sistema inmunitario.

De acuerdo con esto, se encontró que IFN γ tanto incrementa los niveles celulares de p-STAT1 (Figuras 18c, d) como induce apoptosis en células MDA-MB-468 (Figura 18c). Los efectos de IFN γ en p-STAT1 se aumentaron por YK5 (Figura 18c). La comparación de los niveles de STAT1 y p-STAT1 en estas células, a aquellas secuestradas por cuentas de YK55, indicó que la mayoría del STAT1 activado estuvo en complejo con YK5/Hsp70, sugiriendo que la captura de p-STAT1 por las Hsp70s está implicada en la inhibición de la ruta de IFN γ -STAT1.

El STAT1 es un efector principal de la señalización de interferón (IFN γ). IFN γ es una citocina producida por células T y células aniquiladoras naturales con una función inmunoestimuladora esencial que proporciona defensa contra patógenos y el desarrollo de tumores. IFN γ puede ejercer efectos antiproliferativos en una amplia variedad de células tumorales, incluyendo aquellas de la mama, y estos efectos se canalizan a través de STAT1. IFN γ tiene efectos de vigilancia intrínseca tumoral en ratones inmunocompetentes, y estos efectos requieren una ruta intacta de señalización de JAK (cinasa Janus)-STAT. Específicamente, IFN γ da por resultado la fosforilación de STAT1 el residuo 701 de tirosina y el residuo 727 de serina que conduce a homodimerización, unión de ADN y activación transcripcional de sus genes objetivos, varios con papeles apoptóticos. La apoptosis y activación de caspasa en respuesta a IFN γ se abolió en células que carecen de STAT1 funcional. De manera similar, células negativas a STAT1 muestran expresión reducida de caspasa y apoptosis inducida por factor α de necrosis tumoral (TNF α) en comparación a células cercanamente correspondidas que expresan STAT1 funcional. Estos hallazgos indican que la activación de STAT1 juega un papel clave en la inducción de la apoptosis en respuesta a citocinas reguladoras, tal como IFN γ o TNF α . Adicionalmente, un estudio reciente mostró que ratones deficientes de tanto STAT1 como RAG2, una proteína crítica para recombinación de V(D)J, estuvieron predispuestos a carcinomas espontáneos de glándula mamaria. También se ha proporcionado evidencia que STAT1 es un regulador negativo de la angiogénesis, crecimiento y metástasis de tumores.

Estos resultados indican que el uso de terapias de combinación que incorporen los compuestos de la presente materia como se describen en la presente tiene el potencial de estimular el efecto de interferón y permitir respuestas inmunitarias a tumores mucho más potentemente extendidos al bloquear un mecanismo amortiguador relacionado al tumor. Este es un hallazgo excitante para ensayos de terapia de vacuna, sugiriendo que la co-administración de interferón biológicamente activo con compuestos de la presente materia descritos en la presente puede mejorar la eficiencia de vacuna y permitir el uso de una menor dosis de vacunación. Debido a que otras transformaciones patógenas dependen de la señalización de citocina/STAT1, tal como infecciones microbianas y virales y complicaciones tardías de diabetes tipo II, el presente trabajo sugiere que terapias que incorporan inhibidores Hsp70s, además de cánceres, también pueden tener un efecto potenciador en el tratamiento de estas enfermedades.

La Unión de las Hsp70s es un Nuevo Mecanismo de Inhibición de la Actividad Supresora Tumoral.

Para detallar el mecanismo de inhibición de STAT1 por las Hsp70s, analizaron células MDA-MB-468 tratadas con IFN γ en diferentes puntos de tiempo en la presencia y ausencia de YK5, y de inhibidores de fosforilación y desfosforilación de proteína, con el objetivo de medir fosforilación de tirosina dependiente del tiempo del STAT1 en el residuo de Tyr701 (Figura 18e, f). En tanto que la presencia de YK5, la fosforilación de STAT1 alcanzó rápidamente niveles máximos, en la ausencia del inhibidor de Hsp70s, su activación se retrasó y falló en alcanzar una magnitud similar.

Puesto que el nivel total de p-STAT1 se determina por el equilibrio de los eventos de fosforilación y desfosforilación, la fosforilación prolongada de tirosina de células inhibidas de STAT1 con Hsp70 puede resultar ya sea de un incremento en la actividad de la cinasa JAK o una disminución en la actividad de proteína-tirosina-fosfatasa (PTPasa) hacia STAT1.

Para monitorizar la velocidad de desfosforilación de STAT1, se empleó una estrategia de pulso y persecución en la cual se adicionó estaurosporina, un inhibidor de proteína-cinasa, a las células pretratadas con IFN γ durante 30 minutos, bloqueando abruptamente la fosforilación continua de STAT1 por las JAK (Figura 18f, *superior*). El nivel residual de STAT1 fosforilizado con tirosina entonces se determinó en varios puntos de tiempo posteriores. En la ausencia de YK5, la fosforilación con tirosina de STAT1 declinó inmediatamente, en tanto que en su presencia, se prolongaron los niveles celulares de p-STAT1. Estos resultados indican que Hsp70s puede atenuar la inducción de IFN γ de la fosforilación de STAT1 en células de cáncer de mama, y los inhibidores de Hsp70s facilitan la acumulación de p-STAT1 debido a un retraso potencial en la desfosforilación. Por consiguiente, en la presencia de ortovanadato (Na₃VO₄), un inhibidor no específico de PTPasa, se presentó la fosforilación de STAT1 casi tan eficientemente en células tratadas y no tratadas con YK5 (Figura 18f, *inferior*). El bloqueo de la desfosforilación de STAT1 por ortovanadato condujo a acumulación nuclear del STAT1 fosforilizado con tirosina y su persistencia subsiguiente. De forma concordante, el pretratamiento de células MDA-MB-468 con YK5 antes de la estimulación con IFN γ mejoró la translocación nuclear de STAT1 activado

(Figura 19a) e incrementó su eficiencia de unión a ADN (Figura 19). Estos resultados son consistentes con un mecanismo por el que las Hsp70s retienen a p-STAT1 en una conformación que altera la velocidad de desfosforilación de las PTPasas.

Ejemplo 10: Uso de YK5 Inmovilizado en Soporte Sólido para Identificar Oncoproteínas Específicas de Cáncer: STAT3 en Cáncer de Mama

Como se indica en el Ejemplo 9, también se identificó STAT3 en los aislados de cuentas de YK55 (Figura 17c). Contrario a STAT1, el STAT3 se encontró frecuentemente que es constitutivamente activo en cáncer de mama y los tumores pueden llegar a ser adictos a STAT3. La fosforilación con tirosina de STAT3 y la unión a ADN se ha encontrado que se eleva en un gran número de tumores de cáncer de mama y líneas celulares. La evidencia sugiere que STAT3 puede activar la transcripción de varios genes asociados al progreso del ciclo celular, supervivencia y transformación celular. Por el contrario, la inhibición farmacológica y negativa dominante de la actividad de STAT3 bloqueó la proliferación y supervivencia de células de cáncer de mama, sugiriendo colectivamente que la actividad de STAT3 se requiere para el fenotipo transformado en cáncer de mama.

Usando la estrategia experimental diseñada para STAT1, las Hsp70s juegan en STAT3 un efecto opuesto a aquel en STAT1. Los presentes resultados indican que las Hsp70s facilitan la acumulación de p-STAT3 celular al facilitar la fosforilación por cinasas y/o retrasar la desfosforilación de STAT3 por las PTPasas. La activación de STAT3 es contingente en la fosforilación de un residuo de tirosina conservado (Y705) por cinasas de tapa posterior, tal como cinasa Janus 2 (JAK2). Colectivamente, se concluyó que la unión a las Hsp70s retiene el p-STAT3 en una conformación poco accesible a las PTPasas pero favorable a la fosforilación de JAK, y es un mecanismo principal para mantener un depósito elevado de niveles de p-STAT3 en la célula. Junto con un mecanismo de regulación de actividad de STAT3 por la Hsp70, los compuestos de la presente materia descrita en la presente inactivan potentemente el STAT3 como se indica por la reducción de la fosforilación del residuo de tirosina (Y705) en la presencia de los compuestos descritos (Figuras 9b, 10a, 11b). De esta manera, los efectos promotores por p-STAT3 de las Hsp70s se invierten por YK5 y los compuestos relacionados de la presente materia. La activación persistente de la ruta de señalización de STAT3 se ha documentado en una amplia variedad de cánceres sanguíneos y sólidos humanos y se asocia comúnmente con una prognosis peor. Entre las actividades promotoras de cáncer atribuidas a la persistencia de señalización de STAT3 están aquellas comprendidas en la proliferación celular, metástasis, angiogénesis, evasión inmunitaria de hospedador, y resistencia a apoptosis. Se mostró aquí que la interferencia con la ruta de señalización de STAT por los compuestos de la presente materia descrita en la presente es una nueva estrategia para inhibir la señalización de STAT anormalmente activada en células cancerosas.

En conclusión, las modalidades incluidas en la presente muestran el uso de YK5 y su derivado biotinilado, YK55, para investigar la interactoma de las Hsp70s citosólicas. Varios productos de oncogén activados en una amplia variedad de tipos de cáncer se identificaron por estas cuentas. Estos incluyen, pero no se limitan a HER2, ciclina D1, Raf-1, STAT1, y STAT3 en cáncer de mama que sobreexpresa HER2, PDK1, STAT1, STAT3 y CDK1 en cáncer de mama triple-negativo y AR mutante en cáncer de próstata. Estos proporcionan evidencia que los compuestos de la presente materia descrita en la presente actúan de manera combinada en varias vías oncogénicas activadas y tendrán actividad en un espectro grande de cánceres. La unión de estas proteínas por Hsp70 se requiere para mantener su estabilidad funcional, y la inhibición de Hsp70 por YK5 y compuestos relacionados de la presente materia conduce a la desestabilización de oncoproteínas y a la eliminación subsiguiente por una ruta proteasómica, de manera alternativa a su inactivación.

Existe la necesidad de entender mejor las anomalías moleculares que dan resultado al fenotipo transformado. Este entendimiento puede conducir al desarrollo de tratamientos anti-cáncer menos tóxicos, en base a inhibidores de moléculas promotoras de tumor. Debido a que la mayoría de los cánceres se caracterizan por varias alteraciones moleculares, es difícil en escenarios clínicos determinar la combinación exacta de agentes molecularmente dirigidos a objetivo que darán por resultado un mejor resultado. Uno puede imaginar usar cuentas de YK para "pesca" un subconjunto de proteínas que lleguen a ser anormales en cada tipo de célula de cáncer/cada tejido tumoral de paciente. La información ganada de estos experimentos "pesca" se puede compilar al crear un mapa molecular de vías de transformación y específicas de cáncer y de células. La generación de un mapa de "anomalías moleculares específicas de tumor" permitirá finalmente al facultativo diseñar una terapia personalizada para pacientes. Este mapa proteómico tiene ventajas obvias con respecto a los mapas de signatura genética más comunes, debido a que la mayoría de los agentes anti cáncer son moléculas pequeñas que seleccionan como objetivo proteínas no genes, y muchas moléculas pequeñas que tienen como objetivo alteraciones moleculares específicas actualmente están en desarrollo. Estos esfuerzos pueden establecer la base para el diseño de terapias de combinación con mejor eficacia y menos toxicidad en el tratamiento de pacientes con cánceres y, además, definir las alteraciones moleculares específicas en un tumor particular, facilitando el desarrollo de nuevas terapias molecularmente dirigidas a objetivo.

Una modalidad de la presente materia proporciona un método para monitorizar el estado de tratamiento de un paciente que se está tratado para un tumor o trastorno proliferativo, que comprende enlazar covalentemente un compuesto de las reivindicaciones 1 a 20 a un sustrato sólido para formar un complejo sustrato-compuesto; obtener una primera muestra biológica del paciente en un momento antes o durante el período de tratamiento; poner en contacto la muestra con el

complejo de sustrato-compuesto para permitir que el complejo de sustrato-compuesto se ponga en contacto con el complejo de HSP70; medir y registrar el tipo y cantidad de oncoproteína desplazada del complejo de HSP70; obtener una segunda muestra biológica del paciente en un momento posterior durante el período de tratamiento y repetir el paso de medir t y registrar el tipo y cantidad de oncoproteína desplazada del complejo de HSP70; comparar los resultados con la medición previa e identificar si se han inhibido o cambiado vías metabólicas de oncoproteínas a otras vías de oncoproteínas, e identificar si la terapia del paciente ha tenido un efecto benéfico.

Estas modalidades muestran también que el uso de YK5 y compuestos relacionados de la presente materia identifican un nuevo mecanismo de regulación de fosforilación de proteínas en la célula. Específicamente, se muestra que las Hsp70s actúan como un amortiguador celular para la actividad de STAT1 y STAT3 en células de cáncer de mama. Los presentes datos son indicativos de un mecanismo por el cual las Hsp70s se unen a STAT1 y STAT3, y retienen las proteínas en una conformación que facilita y acelera (para STAT1) o que se desacelera (para STAT3) su defosforilación por fosfatasas. Por este mecanismo las Hsp70s disminuyen la p-STAT1 endógena y disminuyen sus capacidades pro-apoptóticas y por el contrario, incrementan el p-STAT3 endógeno y aumentan sus capacidades de inducción de proliferación.

No por último, los presentes hallazgos sugieren que la inhibición farmacológica de las Hsp70s a través de un mecanismo de YK5 tiene un efecto multi-modal en una amplia variedad de células de cáncer y da por resultado un ataque comprensivo en las características principales del cáncer. Este efecto se conecta altamente a la capacidad de los compuestos de la presente materia descrita en la presente para deteriorar la estabilidad y función de múltiples oncoproteínas, y para restaurar la actividad de supresión de tumor. Juntamente con su carencia de respuesta de choque térmico de retroalimentación, el poco efecto citotóxico en células normales y potente actividad en una amplia variedad de células de cáncer de distinto antecedente genético, los presentes resultados colocan a la inhibición farmacológica dual de Hsp70 y Hsc70 como una nueva intervención potencial anti-cáncer.

Ejemplo 11. Uso de Compuestos de la Presente Materia para Realizar la Ablación de Células Madre

YK5 aniquila potentemente células madre de cáncer. La evidencia creciente sugiere que la leucemia mielógena aguda (AML) se genera y mantiene por una subpoblación relativamente rara, resistente a quimioterapia de células conocidas como células madre de leucemia (LSC), que puede auto-renovarse, proliferar, y diferenciarse en blastos leucémicos. Los pacientes quienes presentan una mayor proporción de LSC fenotípicamente definidas demuestran una supervivencia significativamente más pobre libre de recaída que los pacientes con bajas proporciones de LSC. También, una mayor proporción de LSC en la diagnosis es altamente predictiva de enfermedad residual mínima (MRD), sugiriendo que las LSC son contribuyentes significativos a la MRD. Finalmente, se ha demostrado que, en tanto que muchos fármacos pueden aniquilar blastos de leucemia, muy pocos realizan la ablación de las LSC.

En especímenes primarios de AML, YK5 indujo muerte celular potente en blastos, células madre y poblaciones progenitoras (Figura 20). Sorprendentemente, se observó una alta sensibilidad de células madre de leucemia fenotípicamente descritas y de blastos leucémicos totales (Figura 20b; barras rojas versus grises). Finalmente, las células no tumorales encontradas dentro de la misma muestra de paciente fueron significativamente menos afectadas por el tratamiento por YK5 (Figura 20, *barras blancas*). De esta manera, un compuesto con toxicidad de células madre de cáncer, tal como los YK, es de valor significativo para mejorar terapia de cáncer.

Ejemplo 12: Métodos de Análisis

Reactivos. Se sintetizaron PU24FC1 y PU-H71 y se caracterizaron como se describe anteriormente. La sonda fluorescente GM-cy3B basada en el inhibidor de Hsp90 de ansamicina, se sintetizó como se reporta. La síntesis y caracterización de los compuestos de la presente materia descrita en la presente. Se obtuvieron leupeptina, MG 132, MG 101, PMSF, propidio-yodo y factor- α de necrosis tumoral de Sigma-Aldrich; AEBSF de A.G.; Scientific; Z-VAD-FMK, BOC-D-FMK, inhibidor de cathepsina 1, calpeptina e IFN γ - de Calbiochem. La proteína Hsp70 recombinante humana se compró de Stressgen.

Líneas Celulares. Células de cáncer humano MDA-MB-468, MDA-MB-231, LNCaP y fibroblastos de pulmón humano normales MRC5 y células de colon humanas normales CCD18Co se compraron de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). Las células SKBR-3 fueron un obsequio del Dr. Neal Rosen, MSKCC, las células HuH7 fueron un obsequio del Dr. Massague, MSKCC, OCI-Ly7, MOLM-13 y Kasumi-1 del Dr. S. Nimer, MSKCC y Mia-PaCa2, AsPC-1, BxPC3 y PL45 fueron un obsequio del Dr. Bar-Sagi, NYU. Las células se cultivaron por rutinaria en DME/F12 (MDA-MB-468, MDA-MB-231 y SKBr3) o en RPMI (LNCaP, MOLM-13, BxPC3, y AsPC-1 y Kasumi-1) o en MEM (MRC5 y CCD18Co) o en IMDM (OCI-Ly7) o en DMEM (HuH7, Mia-Paca2, y PL45) complementado con 10 % de suero bovino fetal, 1 % de L-glutamina, 1 % de penicilina y estreptomina. Se aislaron los PBL (leucocitos de sangre periférica humana) de la sangre de paciente comprada del New York Blood Center. Treinta y cinco ml de la suspensión celular se estratificó sobre 15 ml de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare). Las muestras se centrifugaron a 2,000 rpm durante 40 min a 4°C, y se recolectó la entrecara de leucocitos. Las células se colocaron en placa en medio RPMI con 10 % de FBS y se trataron al siguiente día con concentraciones apropiadas de YK5 durante los tiempos indicados.

- Cultivo y Aislamiento de Células Primarias. Las células de AML, humanas primarias se obtuvieron con consentimiento informado. Toda la manipulación y análisis de especímenes se aprobó por el Weill Cornell Medical College Institutional Review Board. Las células mononucleares se aislaron usando separación por gradiente de densidad de Ficoll-Placa (Pharmacia Biotech, Piscataway, Nueva York). En algunos casos, las células se crioconservaron en medio de congelación que consiste del medio Dulbecco modificado de Iscove (IMDM), 40 % de suero bovino fetal (FBS), y 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO) o en CryoStor^{MR} CS-10 (Biolife).
- Amortiguadores: Para lavar los complejos de proteína aislados en las cuentas de YK55 o BB70-Ab se usó como se indica ya sea amortiguador de alta concentración de sal (Tris 20 mM pH 7.4, NaCl 1M, NP-40 al 0.1 %) o amortiguador de baja concentración de sal (Tris 20 mM, pH 7.4, NaCl 25 mM, amortiguador NP-40 al 0.1 %). Para eluir los complejos de proteína de las cuentas de YK55, como se indica, se usó ya sea amortiguador A de elución (Tris HCl 62.5 mM, pH 6.8, SDS al 2 %, glicerol al 10 %, 15.5 mg/ml de DTT, Azul de Bromofenol 0.02 mg/ml) y se hirvió la muestra a 100°C durante 3 minutos o amortiguador B de elución (SDS al 2 %, fosfato 50 mM, NaCl 100 mM, urea 6M y tiourea 2 mM) y se incubó la muestra durante 15 min a temperatura ambiente, seguido por 15 min a 100°C.
- Métodos de Cómputo: La secuencia de proteína y estructuras cristales se descargaron de la base de datos de NCBI y RCSB, respectivamente. El modelo de homología se construyó por Prime v2.0 y el modelo de homología cruda se refinó adicionalmente por minimización usando Macromodel v9.6. Se realizó el análisis de SiteMap v2.2 en el modelo de homología resultante, seguido por diseño y acoplamiento de YK5 en el sitio alostérico previsto. Todos los cálculos se llevaron a cabo en la estación de trabajo HP xw8200 con el sistema operativo Ubuntu 8.10 que usa Maestro v8.5.
- Esquema de Numeración de Residuo: La posición de cada residuo de aminoácido en la proteína Hsp70 fue de acuerdo a la numeración de secuencia de hHsp70 (Número de Acceso: P08107), propuesta por Milner et al., a menos que se especifique de otro modo.
- Construcción de Modelo de Homología: El modelo de homología se generó usando Prime v2.0. Las estructuras de proteína del dominio de N-terminal de hHsp70 en el complejo con ATP (PDB ID: 1S3X), la Hsp70 de *E. coli* (DnaK) vuelta compleja tanto con ADP como con el sustrato (péptido-NRLLLTG) (PDB ID: 2KHO), el dominio C-terminal de la Hsp70 de *C. elegans* (PDB ID: 2P32) y la secuencia de aminoácidos de la proteína hHsp70 de longitud completa (Número de Acceso: P08107) se usaron para construcción del modelo. Para crear el modelo, la secuencia de proteína de hHsp70 (Número de Acceso: P08107) se introdujo como una secuencia de entrada en el asistente de preparación de estructura Prime. Se llevó a cabo una búsqueda de homología de secuencia para identificar plantillas que exhiban más de 50 % de homología de secuencia. Esta búsqueda condujo a la identificación de tres estructuras cristalinas de plantilla (PDB ID: 1S3X, 2KHO y 2P32). La secuencia de hHsp70 de longitud completa y las plantillas se alinearon usando parámetros por defecto de Prime. En la opción de estructura de construcción de Prime, los aminoácidos Met1-Gly382 (hHsp70) se seleccionaron de PDB ID:1S3X, los aminoácidos Asp385-Gln538 (*E. coli*) es decir, Asp383-Ala541 (hHsp70) de PDB ID: 2KHO y, finalmente, los aminoácidos Leu543-Ser614 (*C. elegans*), es decir, Leu542-Gly613 (hHsp70) de PDB ID: 2P32. Los residuos de aminoácido (614-641, hHsp70) no se modelaron debido a que hay estructura de plantilla para estos aminoácidos C-terminales. La estructura entonces se construyó usando posiciones de átomos de las porciones alineadas de las plantillas, tomando en cuenta las contribuciones del solvente, del ligando (ADP), del campo de fuerza, y otras mediante una serie de algoritmos implementados en Prime. Se optimizaron las discontinuidades estructurales al insertar separaciones de plantilla para más de veinte residuos. Se refinaron todas las asas con los ajustes de parámetros por defecto de Prime.
- Preparación de Estructura: La estructura de proteína hHsp70 modelada por homología se refinó para SiteMap y cálculos de acoplamiento usando el asistente de preparación de proteína disponible en Maestro 8.5. Las cargas atómicas parciales se asignaron de acuerdo al campo de fuerza de OLPS-AA. Para obtener una estructura 3D más confiable de hHsp70, el modelo de homología se sometió adicionalmente a una serie de pasos de minimización de energía que consistieron de 5,000 iteraciones de gradiente descendente más empinado (SD) y conjugado (CG), hasta que la energía del gradiente de raíz de mínimos cuadrados (rms) fue menor de $0.001 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$.
- Predicción de Sitio de Unión: El modelo de homología refinado de hHsp70 se sometió a investigación computacional con la finalidad de determinar los probables sitios convertibles en fármaco usando parámetros por defecto implementados en SiteMap v2.2 de Maestro v8.5. Un cálculo de SiteMap se divide en tres etapas como se describe por T. Halgren. En la primera etapa, se seleccionan puntos pertinentes de sitio en base a las propiedades geométricas y energéticas, y los puntos se agrupan en conjuntos para definir los sitios. Entonces, se computan propiedades hidrófobas, hidrófilas, y otras, clave, a puntos de rejilla y se preparan los mapas de contorno. Finalmente, las propiedades del sitio, tal como la puntuación del sitio (puntuaciones S), la puntuación de convertibilidad a fármaco (puntuación D), tamaño, encierro, hidrófilo e hidrófobo se computan. Los sitios potenciales de unión a receptor se clasifican en base a puntuaciones S y puntuaciones D.
- A fin de determinar un sitio apropiado de unión a fármaco, SiteMap reconoce un sitio que puede unirse fuertemente a ligandos (mayor puntuación S), pero no lo clasifica como farmacohable, si los ligandos activos de más alta actividad contienen estructuras cargadas, tal como aquellas del sustrato natural de fosfato, y de esta manera son de carácter bastante diferente a fármaco (menor puntuación D).

Preparación de Estructura de Ligando: Se construyeron el modulador de hHsp70 (YK5) y los moduladores recién diseñados usando el diccionario de fragmento de Maestro v8.5. La geometría de los moduladores se optimizó por el programa Macromodel v9.6 usando el campo de fuerza de OLPS-AA.

5 Acoplamiento a Ligando. Se corrieron los cálculos de acoplamiento en el modo de precisión normal (SP) de Glide v4.0. Se prepararon rejillas usando la herramienta de generación de rejillas de receptor en Glide al seleccionar sitios de entrada individual obtenidos por SiteMap (Sitios 1-5) como ligando de entrada. El sitio de unión, para el cual se calcularon y almacenaron las varias rejillas energéticas se define en términos de dos cubos concéntricos; el cuadro delimitador, que debe contener el centro de cualquier actitud de ligando aceptable, y el cuadro de encierro, que debe contener todos los átomos de ligando de una actitud aceptable. Los cuadros de delimitación y de encierro se definen por cubos con una longitud de borde de 12Å y 30Å, respectivamente, que se centran en el punto medio de la distancia más larga de átomo-átomo de ligando. Las actitudes con desviación de rms de menos de 0.5Å y un desplazamiento atómico máximo de menos de 1.3Å se eliminaron para excluir la redundancia. El factor de escala para los radios de van der Waals se aplicó a aquellos átomos con cargas parciales absolutas menores o iguales a 0.15 (factor de escala a 0.8) y 0.25 (factor de escala a 1.0) electrones por ligando y proteína, respectivamente. La variable *maxkeep* que ajusta el número máximo de actitudes generadas durante la fase inicial del cálculo de acoplamiento se ajustó a 5000, y la variable *keep best* que ajusta el número de actitudes por ligando que introduce la minimización de energía se ajustó a 1000. El protocolo de minimización de energía incluye una constante dieléctrica de 4.0 y 1000 pasos de gradiente de conjugado. Al término de cada cálculo de acoplamiento, se permite generar a lo mucho 100 actitudes por ligando. La mejor conformación acoplada se eligió considerando la orientación y la puntuación Glide (puntuación G).

20 Western Blot. Se cultivaron células a 60-70 % de confluencia y se trataron con inhibidor o vehículo DMSO durante los tiempos indicados. Se prepararon lisados de proteína en Tris 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM y amortiguador de lisis de NP-40 al 1 %. Se midieron las concentraciones de proteína usando el equipo BCA (Pierce) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los lisados de proteína (10-50 µg) se resolvieron por SDS-PAGE, se transfirieron sobre membrana de nitrocelulosa y se incubaron con los anticuerpos primarios indicados: anti-erbB2 de conejo (1:250, 28-0004, Zymed), anti-Hsp90 de ratón (1:500, SPA-830, Stressgen), anti-Hsp40 de conejo (1:1000, SPA-400, Stressgen), anti-HOP de ratón (1:1000, SRA-1500 Stressgen), anti-Hsc70 de conejo (1:500, SPA-816, Stressgen), anti-receptor de andrógenos de ratón (1:500, 554225, Biosciences), anti-Flt-3 de conejo (1:500, sc-480, Santa Cruz), antibiotina de ratón (1:250, B7653, Sigma-Aldrich), anti-Hsp90 de ratón (1:1000, SMC-107, Stressmarq), anti-HSF1 de conejo (1:500, SPA-901, Stressgen), anti-CDK1 de ratón (1:1000, 905-777-100, Assay Designs), anti-ciclina D1 de ratón (1:125, 2926, Cell Signaling), anti-caspasa 3 de conejo (1:500, 9665, Cell Signaling), antifosfo-STAT1 (Tyr 701) de conejo (1:250, 9171, Cell Signaling), anti-STAT1 de ratón (1:1000, 610186, BD Biosciences), anti-Hsp70 de ratón (1:500, SPA-810, Stressgen), anti-Akt de conejo (1:500, 9272, Cell Signaling), anti-fosfo-Akt (Ser 473) de conejo (1:500, 9271, Cell Signaling), anti-Raf-1 de conejo (1:500, sc-133, Santa Cruz), anti-PARP (fragmento p85) de conejo (1:500, G7341, Promega), anti-CSK de conejo (1:1000, sc-13074, Santa Cruz), anti-β-actina de ratón (1:2500, A1978, Sigma-Aldrich) y anti-PI3K (p85) de conejo (1:4000, 06-195, Upstate). Las membranas entonces se incubaron con un anticuerpo secundario correspondiente conjugado a peroxidasa (dilución 1:3.000). El anti-p23 (JJ3) fue un obsequio del Dr. D. Toft. Los anticuerpos anti-HIP, anti-Hsp90 (H9010) y anti-Hsp/c70 (BB70) se produjeron como se describe anteriormente.

40 Ensayo de Unión de Hsp90. Se realizaron mediciones en placas de microtítulo de 96 concavidades negras (Corning #3650) como se describe anteriormente⁷. En resumen, cada placa de 96 concavidades contuvo Cy3B-GM 3 nM, Hsp90 10 nM (Stressgen #SPP-770) e inhibidor probado (solución concentrada inicial en DMSO) en un volumen final de 100µl. La placa se dejó en un agitador a 4°C durante 24 h, y se registraron los valores de polarización de fluorescencia (FP) en mP. Se determinaron los valores de EC₅₀ como las concentraciones de competidor a las cuales 50 % del Cy3B-GM se desplazó. Las mediciones de FP se midieron en un instrumento Analyst GT (Molecular Devices).

45 Actividad de ATPasa de Hsc70 y el Repliegado de Luciferasa. Se purificaron las Hsc70, DJA1/DNAJA1, DJA2/DNAJA2 y Hsp110/Hsp105/HSPH1 de humano y se analizaron. Para medir la actividad de ATPasa de Hsc70, se preincubó Hsc70 4 µM en amortiguador de ensayo (KOAc 100 mM, Hepes-KOH 20 mM, pH 7.5, MgOAc₂ 5 mM) a 37°C durante 2 horas con diferentes concentraciones de YK5 o DMSO al 1 % como control con vehículo. Se adicionaron DJA1 o DJA2 4 µM, Hsp110 1 µM, ATP 2 mM y 5 µCi/ml µ³²P]-ATP (Perkin Elmer) y las reacciones se incubaron a 30°C. Se terminaron las muestras en los puntos de tiempo con EDTA 37.5 mM y se analizaron por cromatografía de capa delgada en polietilenoimina-celulosa (Mallinckrodt Baker) desarrollada en LiCl 0.5 M y ácido fórmico 0.5 M. El ADP producido se determinó por cuantificación de fósforo en imagen y se calcularon las velocidades enzimáticas lineales (*V_{max}*) por análisis de regresión. Para analizar el repliegado de luciferasa, se desnaturalizó luciferasa de luciérnaga (Sigma) en guanidinio-HCl 6 M y ditiotretitol 1 mM durante 10 min. Se preincubó Hsc70 4 µM con fármaco o control de vehículo como antes. Se adicionaron DJA2 4 µM y ATP 2 mM, y se diluyó rápidamente la luciferasa 1:100 a 5.4 nM en las reacciones, que se incubaron a 30°C. A los 60 minutos sobre el punto de tiempo indicado, las muestras se diluyeron 2:25 en reactivo de ensayo de luciferasa (Promega) y se midió la actividad en un luminómetro Berthold Lumat LB9507.

60 Ensayo de Competición de Hsp70 Usando Cuentas de YK55. Se prepararon lisados de proteína usando Tris 20 mM pH 7.4, NaCl 25 mM, amortiguador de lisis NP-40 al 0.1 %. Los extractos celulares se incubaron durante 3 horas a 4°C con las concentraciones indicadas de competidor soluble en Tris 20 mM pH 7.4, NaCl 25 mM, amortiguador de NP-40 al 0.1 %. Entre tanto, se prepararon cuentas de YK55 al incubar cuentas de estreptavidina-agarosa (50 µl) (Thermo Scientific)

con YK55 (50 o 100 μM , como se indica) a 4°C durante 1 hora. En lavado de cuentas de tres veces con amortiguador, los lisados que contienen competidor soluble, anteriores, se incubaron con las cuentas de YK55. Las muestras se incubaron a 4°C durante la noche, se lavaron cinco veces con el amortiguador de lisis y se aplicaron a SDS-PAGE.

5 Ensayo de Polarización de Fluorescencia de Competición de Cy3B-K5 de Hsp70: Se realizaron mediciones de FP usando placas de microtítulo de 96 concavidades, negras (Corning # 3650), donde se presenta tanto la emisión como la excitación desde la parte superior de la concavidad. El amortiguador de unión de FP de Hsp70 contuvo lo siguiente: HEPES-K 25 mM, pH=7.2, NaCl 20 mM, CaCl_2 200 μM , KOAc 110 mM, $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 2 mM, NP40 al 0.01 %. Cada concavidad de ensayo contuvo 20 μg de lisado celular y el inhibidor de YK en 75 μl de amortiguador. La mezcla se mantuvo en un agitador durante 10 minutos, luego se incubó a 37°C durante 2 horas. El trazador se adicionó a cada concavidad dando por resultado una concentración final de Cy3B-YK5 3nM y un volumen final de 100 μL . Entonces se realizó la medición en un lector de placa Analyst GT (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Se usó un tiempo de integración de 100 ms, y la altura Z se ajustó a 3 mm (parte media). La polarización de excitación se ajustó a estática, y la polarización de emisión se ajustó a dinámica. Para cy3B-GA, se usaron un filtro de excitación a 530 nm y un filtro de emisión a 580 nm con un espejo dicroico de 561 nm. Todos los valores de FP se expresaron en unidades de milipolarización (mP). Los valores de mP se calcularon usando la ecuación $mP = 1000 \times [(IS - ISB) - (IP - IPB)] / [(IS - ISB) + (IP - IPB)]$, donde IS es la medición de intensidad de emisión paralela, IP es la medición de muestra de intensidad de emisión perpendicular, e ISB e ISP son las correspondientes mediciones para el fondo (amortiguador). La fluorescencia total se determinó como $2 \times IP + IS$.

20 Electroforesis en Gel Nativo. Las células se sometieron a choque térmico durante 45 minutos a 42°C o se trataron con el inhibidor o vehículo indicado durante 3 horas, y consecuentemente se lisaron en HEPES 20 mM, pH 7.9, NaCl 0.42 M, MgCl_2 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, amortiguador de glicerol al 25 %. Se cargaron muestras de setenta y cinco μg de proteína sobre un gel de poliacrilamida de gradiente no desnaturizante, de pre-corrida (gel de apilamiento al 4 %, gel de separación al 5 a 20 %) y se separaron en amortiguador de electroforesis de Tris 50 mM pH 8.0, glicina 0.38 M a 4°C durante la noche. El gel se pre-equilibró en amortiguador de corrida de SDS-PAGE durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las proteínas entonces se transfirieron de manera electroforética en amortiguador de Tris 50 mM, glicina 380 mM, SDS al 0.1 %, metanol al 20 % a 4°C en membrana de nitrocelulosa y se transfirieron por HSF-1.

30 Inmunoprecipitación. Las células se recolectaron y lisaron en amortiguador de Tris 20 mM, pH 7.4, NaCl 25 mM, NP-40 al 0.1 %. Cada muestra contuvo 500 μg de una proteína total. Se adicionó un anticuerpo apropiado (BB70 para Hsp70 y H9010 para Hsp90) (5 μl) o IgG normal (5 μl) (como un control negativo) a cada muestra conjuntamente con cuentas de proteína G-agarosa (30 μl) (Upstate) y se incubó a 4°C durante la noche. Las muestras se lavaron cinco veces con amortiguador de lisis, y se aplicaron en SDS-PAGE seguido por un procedimiento normal de Western Blot.

35 Precipitación Química. Se prepararon lisados de proteína usando amortiguador de lisis de Tris 20 mM, pH 7.4, NaCl 25 mM, NP-40 al 0.1 %. Se lavaron tres veces cuentas de estreptavidina-agarosa (50 μl) (Thermo Scientific) con amortiguador de lisis, se adicionó YK55 a las concentraciones indicadas y los complejos se incubaron a 4°C durante 1 hora. En un lavado de tres veces con amortiguador, las cuentas se adicionaron a la proteína celular total indicada en amortiguador. Las muestras se incubaron a 4°C durante la noche, se lavaron cinco veces con amortiguador de lisis y se aplicaron a SDS-PAGE.

40 Agotamiento de Hsp70. Se adicionaron cuatro μl de anticuerpo BB70 anti-Hsp70 o IgG normal de ratón y 30 μl de suspensión de proteína G-agarosa a 200 μg de lisado celular proteico MDA-MB-468 en amortiguador de Tris 20 mM, pH 7.4, NaCl 25 mM, NP-40 al 0.1 %. Después de la incubación a 4°C durante 3 horas, las muestras se centrifugaron, el sobrenadante se recolectó y el sedimento de las cuentas se descartó. El procedimiento se repitió dos veces. Se prepararon como se describe anteriormente cuentas de YK55 (100 μM de YK55 adicionado a 50 μl de cuentas de estreptavidina), se adicionaron a los sobrenadantes y se incubaron a 4°C durante la noche. Las cuentas se lavaron 5 veces con amortiguador de Tris 20 mM pH 7.4, NaCl 25 mM, NP-40 al 0.1 % y se aplicaron a SDS-PAGE.

45 Unión Covalente. Se trataron células K562 con la cantidad indicada de YK55 durante el tiempo indicado. Las células se recolectaron y lisaron en amortiguador de Tris 20 mM, pH 7.4, NaCl 25 mM, NP-40 al 0.1 %. El extracto celular (500 μg) en 100 μl del amortiguador de lisis se incubó con cuentas de estreptavidina-agarosa durante 1 hora a 4°C. Las muestras se lavaron cinco veces con el amortiguador de lisis o amortiguador de alto contenido de sal (Tris 20 mM pH 7.4, NaCl 1M, NP-40 al 0.1 %) y se sometieron a SDS-PAGE. Los geles se tiñeron con plata de acuerdo al procedimiento del fabricante (Invitrogen) o las proteínas se transfirieron sobre membrana de nitrocelulosa seguidas por inmunotransferencia.

55 Protocolo de Prueba de Irreversibilidad. Se cultivaron células MDA-MB-468 en placas de 6 concavidades a aproximadamente 80 % de confluencia. Los conjuntos de células se trataron con YK5 (10 μM) o vehículo (DMSO) durante 2 horas. Un conjunto de células tratadas con YK5 entonces se estimuló con 100 ng/mL de $\text{IFN}\gamma$ durante 30 minutos y los extractos se hicieron para Western Blot. El otro conjunto de células se lavó libre del compuesto con medio calentado, se incubó durante 2 horas, se lavó nuevamente, se incubó otras 2 horas, se lavó nuevamente, y luego se incubó 4 horas adicionales. Este conjunto de células entonces se estimuló con $\text{IFN}\gamma$ y se hicieron extractos similares al

primer conjunto de células.

Tratamientos con Cicloheximida. Las células se trataron con cicloheximida (a una concentración final de 100 µg/mL) con vehículo adicionado o un compuesto de la presente materia durante los tiempos indicados. Las células se lisaron como se indica anteriormente y las muestras resultantes se analizaron por Western Blot.

5 Las células se lisaron en amortiguador de lisis de Tris 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM y NP-40 al 0.1 %. Las fracciones insolubles de NP-40 se lisaron en Tris 50 mM pH 7.4 y SDS al 2 % y se hirvieron durante 15 minutos. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE seguido por un procedimiento normal de Western Blot. Las transferencias se visualizaron por autoradiografía usando sistema mejorado de detección de quimioluminiscencia (GE Healthcare).

10 Densitometría. Los geles se exploraron en Adobe Photoshop 7.0.1 y se realizó el análisis densitométrico cuantitativo usando el software Un-Scan-It 5.1 (Silk Scientific), Orem, UT.

Examen de Cinasa. Para la mayoría de los ensayos, se cultivaron cepas de fago T7 marcadas con cinasa en paralelo en bloques de 24 concavidades en un hospedador de *E. coli* derivado de la cepa BL21. Se cultivó *E. coli* a fase logarítmica y se infectó con fago T7 de una solución concentrada congelada (multiplicidad de infección = 0.4) y se incubó con agitación a 32°C hasta lisis (90-150 min). Los lisados se centrifugaron (6000 x g) y se filtraron (0.2µm) para remover los desechos celulares. Las cinasas restantes se produjeron en células HEK-293 y se marcaron subsecuentemente con ADN para detección por qPCR. Las cuentas magnéticas revestidas con estreptavidina se trataron con ligandos biotinilados de molécula pequeña durante 30 minutos a temperatura ambiente para generar resinas de afinidad para ensayos de cinasa. Las cuentas con ligandos se bloquearon con exceso de biotina y se lavaron con amortiguador de bloqueo (SeaBlock (Pierce), BSA al 1 %, Tween 20 al 0.05 %, DTT 1 mM) para remover el ligando no unido y para reducir la unión no específica a fagos. Se montaron reacciones de unión al combinar cinasas, las cuentas de afinidad con ligando y los compuestos de prueba en amortiguador de unión 1x (SeaBlock al 20 %, 0.17x PBS, Tween 20 al 0.05 %, DTT 6 mM). Los compuestos de prueba se prepararon como soluciones concentradas 40x en DMSO al 100 % y se diluyeron directamente en el ensayo. Todas las reacciones se realizaron en placas de polipropileno de 384 concavidades a un volumen final de 0.04 ml. Las placas de ensayo se incubaron a temperatura ambiente con agitación durante 1 hora y las cuentas de afinidad se lavaron con amortiguador de lavado (1x PBS, Tween 20 al 0.05 %). Las cuentas entonces se re-suspendieron en amortiguador de elución (1x PBS, Tween 20 al 0.05 %, ligando de afinidad no biotinilado 0.5 µM) y se incubaron a temperatura ambiente con agitación durante 30 minutos. La concentración de cinasa en los productos eluidos se midió por qPCR. La puntuación de selectividad de KINOMEScan (S) es una medida cuantitativa de la selectividad del compuesto. Se calcula al dividir el número de cinasas que se unen al compuesto por el número total de distintas cinasas probadas, excluyendo variantes mutantes. TREEspot^{MR} es una herramienta de software de visualización de datos, patentada desarrollada por KINOMEScan. Las cinasas que se encuentran que se unen se marcan con círculos rojos, donde los círculos grandes indican una unión de mayor afinidad. El dendograma de las cinasas se adaptó y se reprodujo con permiso de Science and Cell Signaling Technology, Inc.

35 Ensayo de Inhibición de Crecimiento. Se evaluaron los efectos antiproliferativos de los inhibidores usando el tinte azul de Alamar. Este reactivo ofrece una rápida medición objetiva de la viabilidad celular en cultivo celular, y usa el tinte indicador resazurin para medir la capacidad metabólica de células, un indicador de la viabilidad celular. En forma breve, las células se colocaron en placas Costar de 96 concavidades. Para las células unidas (tal como SKBr3, MDA-MB-468, LNCaP, MRC5), se usaron 8000 células/concavidad. Para las células de suspensión (tal como MOLM-13, Kasumi-1, OCI-Ly7, PBL), se colocaron en placa 20,000 células/concavidad. Las células se dejaron incubar durante 24 horas a 37°C antes del tratamiento con el fármaco. Los fármacos se adicionaron en triplicado a las concentraciones indicadas, y la placa se incubó durante 72 horas. Se adicionó Azul de Alamar (440 µM) y la placa se leyó 6 horas después usando el Analyst GT (modo de intensidad de Fluorescencia, excitación 530 nm, emisión 580 nm, con espejo dicróico de 560 nm). Los resultados se analizaron usando el software Sofmax Pro. Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento celular al comparar lecturas de fluorescencia obtenidas de células tratadas versus de control, que da cuenta de la población celular inicial (tiempo cero). La IC50 se calculó como la concentración de fármaco que inhibe el crecimiento celular por 50 %.

Apóptosis.- Naranja de Acridina/Bromuro de Etidio. Se determinó la apoptosis usando tinción doble de naranja de acridina/bromuro de etidio (AO/EB). El naranja de acridina se toma tanto por células viables como no viables y emite fluorescencia verde si se intercala en el ácido nucleico (ADN) de doble hebra o fluorescencia roja si se une a ácido nucleico de hebra individual (ARN). El bromuro de etidio se toma sólo por células no viables y emite fluorescencia roja por intercalación en el ADN. (1) Células viables tiene núcleos verdes uniformes con estructura organizada. (2) Células apoptóticas tempranas (que aún tienen membranas intactas pero han empezado a sufrir escisión de ADN) tienen núcleos verdes, pero es visible la condensación de cromatina perinuclear como fragmentos o parches verdes brillosos. (3) las células apoptóticas tardías tienen núcleos naranja a rojo con cromatina condensada o fragmentada. (4) Las células necróticas tienen núcleos uniformemente naranja a rojo con estructura organizada. En resumen, las células se colocaron en placas Falcon de 20 mm y se incubaron durante 24 horas adicionales. Se adicionaron los fármacos a las concentraciones indicadas durante 24 o 48 horas, las células se lavaron con PBS y se trataron con tripsina. Después de la tinción con Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio, las células se visualizaron con un microscopio fluorescente (Zeiss Axiovert 40 CFL) y se contaron. Se determinó el porcentaje de células apoptóticas a partir de 200-300 células

contadas en cada grupo.

- Tinción Celular con Yoduro de Propidio y Análisis por Citometría de Flujo. También se puede determinar la presencia de células con ADN fragmentado (indicación de apoptosis) como células con un contenido de ADN menor de 2N (sub-G₁). Para el análisis de contenido de ADN, las células se lavaron en PBS enfriada con hielo y se fijaron en etanol a 70 % durante 1 hora a 4°C. Las células fijas se centrifugaron a 1,200 rpm durante 5 minutos y se tiñeron por incubación en PBS que contiene 50 µg/ml de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich) y 50 µg/mL de ribonucleasa A libre de DNasa (Sigma-Aldrich) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se analizó el contenido de ADN por citometría de flujo en FACScan (BD Biosciences). Los datos se recolectaron con el software Cell Quest Pro (Becton Dickinson) de no menos de 10,000 células, y se analizaron con FlowJo (Ashland, OR).
- 5
- 10 Pulso-Repercusión. Células MDA-MB-468 se pre-trataron con 100 ng/ml de IFN γ durante 30 minutos, luego se adicionó YK5 10 µM durante 30 minutos, seguido por estaurosporina 500 nM o tratamiento con Na₃VO₄ 1 mM. Las células se recolectaron a los tiempos indicados y se lisaron en amortiguador de lisis de Tris 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM y NP-40 al 1 % y se sometieron a procedimiento de Western Blot.
- 15 Ensayo de Unión de ADN de STAT1 Activado. Se valoró la capacidad de unión a ADN del STAT1 por un ensayo basado en ELISA (TransAM, Active Motif, Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. De forma breve, se trataron 5x10⁵ células MDA-MB-468 con IFN γ (100 ng/ml), YK5 (10 µM) o la combinación de IFN γ (100 ng/ml) más YK5 (1, 5 y 10 µM). Se adicionaron diez microgramos de lisados celulares a las concavidades que contienen oligonucleótidos de consenso de STAT pre—adsorbidos (5'-TTCCCGGAA-3'). Para las células tratadas con IFN γ , el ensayo se realizó en la ausencia o presencia de 20 pmol de los oligonucleótidos competidores que contienen ya sea un sitio de unión de consenso de STAT tipo silvestre o mutado. Se usaron células HeLa tratadas con interferón (5 µg por concavidad) como controles positivos para el ensayo. Después de la incubación y lavado, se adicionó anticuerpo anti-STAT1 α policlonal de conejo (1:1000, Motivo Activo) a cada concavidad, seguido por anticuerpo secundario anti-conejo de HRP (1:1000, Motivo Activo). Después de la adición del sustrato de HRP, se leyó la absorbancia a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 655 nm (Synergy4, Biotek, Winooski, VT). En este ensayo, la absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de factor de transcripción unido a ADN presente en la muestra. Los experimentos se llevaron a cabo en cuatro réplicas. Los resultados se expresaron como valores medios de absorbancia con SEM. Se obtuvieron valores P por prueba T bilateral.
- 20
- 25
- Microscopia Inmunofluorescente. Células MDA-MB-468 se trataron con 100 ng/ml de IFN γ durante 30 minutos, entonces se adicionó un compuesto de la presente materia durante otros 30 minutos. Las células se fijaron en paraformaldehído (4 %) a temperatura ambiente durante 15 minutos seguido por lavados con 1 x TBS (3-5 min). Las células entonces se extinguieron durante 5 minutos con borohidruro de sodio al 0.1 % en 1 x TBS, se enjuagaron como se describe anteriormente, seguido por incubación con solución de bloque que contiene 5.5 % de suero de becerro fetal normal y 0.1 % de Tritón X-100 a temperatura ambiente para reducir la unión no específica. Entonces las células se incubaron con anticuerpo primario (anti-fosfo-STAT1 (Y701); Señalización Celular) durante 1 hora a temperatura ambiente seguido por enjuague e incubación adicional con anticuerpo secundario anti-conejo de cabra marcado con FITC (Invitrogen, Camarillo, CA). Los portaobjetos se montaron en Vectashield con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para tinción nuclear (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). La fluorescencia se monitorizó con un microscopio invertido Zeiss Axiovert 200M, con DAPI y conjuntos de filtro de isotiocianato de fluoresceína (FITC), y un ajuste de objetivo de 40x.
- 30
- 35
- 40 Ensayo de Invasión Celular. La capacidad de invasión de células MDA-MB-231 se examinó usando un ensayo de invasión de Matrigel de cámara Boyden. Se pre-trataron células MDA-MB-231 colocadas en placa a 5x10⁵ células/concavidad en una placa de 6 concavidades (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), durante 24 horas con DMSO y YK5 (1 µM). La viabilidad celular se estimó por exclusión de azul de triptano. En resumen, las células se tiñeron con azul de triptano y se contaron manualmente con un hemacitómetro. Las células viables, que son células que excluyen el azul de triptano, se lavaron tres veces con DMEM libre de suero y se re-suspendieron en 0.3 ml de DMEM libre de suero. Se adicionaron números iguales de células viables (2x10⁵) al compartimiento superior de la cámara Boyden y el medio de tratamiento que contiene FBS al 10 % en DMEM se adicionó a la cámara inferior. Las cámaras Boyden contuvieron una membrana grabada con pistas de PET de 8 µm, revestida con transconcavidades Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA). Después de que las células se incubaron durante 20 horas a 37°C, las células que invaden el lado inferior de la membrana se fijaron con fijador en metanol al 100 % durante 2 minutos, se tiñeron en violeta cristal al 0.5 % durante dos minutos, se enjuagaron en agua, y se examinaron bajo microscopio de campo brillante. Las células en diez campos por membrana se contaron en un objetivo x 100.
- 45
- 50
- 55 Ensayo de Apoptosis de Activación de Caspasa 3/7. En una placa negra de 96 concavidades (Corning 3603), las células se colocaron en placas excepto la columna de fondo (sin células) con 50ul de medio, y se dejó en la incubadora (37°C, CO₂ al 5 %) para permitir que las células se unieran y llegaran al equilibrio. Se adicionaron compuestos en 50ul de medio al intervalo de concentración indicada durante los tiempos indicados. Se adicionaron 100ul del amortiguador de ensayo (HEPES 100mM (pH 7.5), EDTA 2 mM, CHAPS al 0.1 %, 0.1mg/ml de PMSF, Mezcla de Inhibidor de Proteasa Completa (Roche 1 697 498)) que contiene Z-DEVD-R110 (Molecular Probes R22120) a cada concavidad. Después de la incubación, se leyó la intensidad de fluorescencia con Analyst (Emisión 485 Excitación a 530).

Precipitación Química y Proteómica. Se prepararon lisados de proteína usando amortiguador de lisis de Tris 20 mM pH 7.4, NaCl 25 mM, NP-4 al 0.1 %. La estreptavidina-agarosa (Thermo Scientific) se lavó tres veces con amortiguador de lisis, se adicionó YK55 (100 μ M) y los complejos se incubaron a 4°C durante 1 hora. En un lavado de tres veces con amortiguador, las cuentas se adicionaron a 500 μ g de proteína celular en amortiguador. Las muestras se incubaron a 4°C durante la noche, se lavaron cinco veces con el amortiguador de lisis y se aplicaron a SDS-PAGE. Los geles se tiñeron por el equipo de Tinción con Plata SilverQuest (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las bandas de proteína se cortaron y después de lavar con agua los cortes de gel se cortaron en piezas de 1 mm³, se redujeron con DTT 10 mM en NH₄HCO₃ 100 mM a 56°C durante 30 minutos, se alquilaron con una solución de yodacetamida 55 mM en NH₄HCO₃ 100 mM a temperatura ambiente en la oscuridad durante 20 minutos, y luego se digirieron con tripsina (13 ng/ μ l) a 37°C durante la noche. Los péptidos se extrajeron con 100-200 μ l de acetonitrilo al 66.6 % /ácido fórmico al 5 %, y el volumen del extracto peptídico combinado se redujo a ~10 μ l en un SpeedVac antes del análisis por MS. El análisis de espectrometría en masa en tándem con cromatografía líquida (LC-MS/MS) en la instalación Proteomics de Weill Cornell Medical College (WCMC) se realizó usando un LC en serie 1100 acoplado a un espectrómetro de masa de trampa iónica XCT plus (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). El sistema se equipó con una interfaz Agilent Chip Cube y una oblea de silicio "chip-columna" que integra una columna de enriquecimiento C18, columna de resolución C18, y emisor de nanoaspersión. Las digestiones de proteína en gel se cargaron y desalinaron en la columna de enriquecimiento a una velocidad de flujo de 4 μ L/min y luego se resolvieron a una velocidad de flujo de 0.35 μ l/min en una columna 40 mm \times 75 μ M ZORBAX 300 C18 (Agilent). El gradiente de LC fue 3 a 45 % de Solvente B durante 25 minutos, seguido por 45 a 90 % de Solvente B durante 5 minutos. El solvente A de la fase móvil fue ácido fórmico al 0.1 % en ACN al 3 % y el Solvente B es ácido fórmico al 0.1 % en ACN al 90 %. Se adquirieron espectros de masa en modo de ión positivo con MS/MS automatizada dependiente de datos en los cuatro iones más intensos de exploraciones de MS de precursor. Se usó el software SPECTRUM MILL (Agilent) para procesar los datos naturales de LC-MS/MS y para buscar bases de datos de proteína para identificación de proteínas.

Precipitación Química y Análisis de MS: 1: Nano-LC-MS/MS. Se trataron células K562 durante 4 horas con YK55 100 μ M o D-biotina. Las células se recolectaron y lisaron en amortiguador de Tris 20 mM, pH 7.4, NaCl 25 mM, NP-40 al 0.1 %. El extracto celular tratado con YK55 (500 μ g) en 100 μ l del amortiguador de lisis se incubó con cuentas de estreptavidina-agarosa durante 1 hora a 4°C. El extracto celular tratado con D-biotina (500 μ l) se incubó durante 1 hora a 4°C con el anticuerpo BB70 (4 μ l) unido a cuentas de proteína G-agarosa (30 μ l) (Upstate). Las cuentas se lavaron con amortiguador de alta concentración de sal (NaCl 1 M), las proteínas se eluyeron por ebullición en SDS al 2 %, se separaron en un gel desnaturizante y se tiñeron con Coomassie de acuerdo al procedimiento del fabricante (Biorad). Las proteínas resueltas en gel de las reducciones de BB70 y tratadas con fármaco YK55 se digirieron con tripsina, los péptidos que contienen cisteína se redujeron y alquilaron usando beta-mercaptoetanol y acrilamida, como se describe en (10). Las digestiones tripticas en gel se sometieron a un procedimiento de micro-limpieza en un volumen de lecho de 2 μ l de cuentas de fase invertida Poros 50 R2 (Applied Biosystems – 'AB') se envasaron en una punta cargada de gel Eppendorf, y el eluyente se diluyó con ácido fórmico al 0.1 %. Se realizaron los análisis de las herramientas purificadas por lote usando un espectrómetro de masa OrbiTrap (Thermo Scientific LTQ XL Trampa Iónica Lineal), equipado con una fuente de iones de nanoaspersión. Se cargan mezclas de péptidos (en 20 μ l) en una columna de protección de trampa (cartucho 0.3x5-mm PepMap C18 100 de LC Packings) usando un sistema Eksigent nano MDLC (Eksigent Technologies, Inc) a una velocidad de flujo de 20 μ l/min. Después del lavado, el flujo se invirtió a través de la columna de protección y los péptidos se eluyeron con un gradiente de MeCN al 5-45 % (en FA al 0.1 %) durante 85 minutos a una velocidad de flujo de 200 nL/min, sobre y en una columna PepMap C18 capilar de sílice fusionada de 75 micrones por 15 cm (LC Packings); el eluyente se dirigió a una aguja de nano-electrorociado de sílice fusionada (New Objective) de 75 micrones (con orificio de 10 micrones). El voltaje de la aguja de ionización por electrorociado (ESI) se ajustó a aproximadamente 1800 V. El analizador de masa se operó en modo de adquisición de MS/MS dependiente de datos, automático; la energía de colisión se ajustó automáticamente de acuerdo con el valor *m/z* de los iones de precursor seleccionados para MS/MS. Las identificaciones iniciales de proteína de los datos de LC-MS/MS se hicieron usando la máquina de búsqueda Mascot (Matrix Science, version 2.2.04; www.matrixscience.com) y las bases de datos NCBI (National Library of Medicine, NIH) e IPI (International Protein Index, EBI, Hinxton, RU). Se permitieron dos sitios de escisión triptica ausentes, tolerancia de masa iónica de precursor = 10ppm, tolerancia de masa iónica de fragmento = 0.8 Da, se permitieron modificaciones de proteína para Met-óxido, Cys-acrilamida y acetilación N-terminal. Se aplicó típicamente la puntuación MudPit con "requiere remarcar rojo" activado, y usando puntuación de umbral de significancia *p*<0.01. Las cuentas peptídicas únicas (o "cuentas espectrales") y el por ciento de coberturas de secuencia para todas las proteínas identificadas se exportaron a Excel para análisis adicional.

MALDI-reTOF-MS/MS: Las mezclas peptídicas resultantes de las digestiones en gel se analizaron por MS de tiempo de vuelo de reflectón de ionización/desorción láser asistido con matriz (MALDI-reTOF) usando un instrumento BRUKER UltraFlex TOF/TOF (Bruker Daltonics; Bremen, Alemania). Las masas experimentales seleccionadas (*m/z*) se tomaron para buscar el segmento humano de una base de datos de proteínas, no redundante ("NR"; ~223,695 entradas; National Center for Biotechnology Information; Bethesda, MD), utilizando el programa Mascot Peptide Mass Fingerprint (PMF), versión 2.2.04 para Windows (www.matrixscience.com), con una restricción de exactitud de masa mejor de 35 ppm, y dos sitios de escisión ausentes máximos permitidos por péptido. Esto sirvió para confirmar la identidad de las proteínas y para localizar diferencias entre los mapas peptídicos tripticos de los péptidos modificados (cisteína-acrilamida-derivatizado). Los valores diferenciales de pico *m/z* se hicieron corresponder a las proteína identificadas, permitiendo la presencia de grupos derivatizadores de fármaco a 820.34 (más fármaco YK55) y 594.26 Daltons (más fármaco YK55 sin

- el grupo biotina). Para confirmar los péptidos observados con fragmentos mono-isotópicos calculados que corresponden a los valores experimentales, se realizó la secuenciación espectrométrica de masa de los péptidos seleccionados por análisis MALDI-TOF/TOF (MS/MS) en las mismas muestras preparadas, usando el instrumento UltraFlex en el modo "LIFT". Se tomaron los espectros iónicos de fragmento para buscar NR usando el programa de Búsqueda Iónica MASCOT MS/MS (Matrix Science) y el equipo de herramienta de proteomics en línea disponible en <http://db.systemsbiology.net:8080/proteomicsToolkit/FraglonServlet.html>. Los resultados se confirmaron manualmente. Cualquier resultado tentativo obtenido de esta manera se verificó al comparar la serie iónica de fragmento generada por computadora del péptido triptico predicho con los datos experimentales de MS/MS.
- 5
- 10 Xenoinjertos de Tumor. Ratones hembra atímicos *nu/nu* de cuatro a seis semanas de edad se obtuvieron de Taconic (Farms INC). Los experimentos se llevaron a cabo bajo un protocolo aprobado por Institutional Animal Care and Use Committee, y se siguieron las guías institucionales para el uso apropiado y humano de animales en investigación. Se implantaron subcutáneamente células MDA-MB-468 (1×10^7 células) en el flanco derecho de los ratones usando una aguja de calibre 20 y se dejaron crecer. Antes de la administración, se formuló una solución de YK5:HCl en agua estéril. Los ratones se inyectaron intratumoralmente (i.t.), 20 μ l de la solución de YK5 en un programa de días alternos. La concentración del YK5 inyectado se estimó por entendimiento mutuo al volumen tumoral, y se mantuvo a 10 μ M a todo lo largo del periodo experimental. Todos los ratones recibieron Augmentin (Amoxicilina/Clavulanato potásico; SmithKline Beecham) en su agua de beber en tanto que están en terapia. Los ratones se sacrificaron por eutanasia con CO₂. Los ratones (n=5) que tienen tumores MDA-MB-468 que alcanzan un volumen de 100-150 mm³ se trataron intratumoralmente (i.t.), en días alternos. El volumen tumoral se determinó por medición con calibradores Vernier, y el volumen tumoral se calculó como el producto de su longitud x ancho² x 0.4. El volumen tumoral se expresó en los días indicados como el volumen tumoral medio \pm s.d., indicado para grupos de ratones. Se midieron los valores de por ciento (%) de inhibición de crecimiento tumoral en el día final del estudio para los ratones tratados con fármaco en comparación con los tratados con vehículo y se calculó como $100 \times \{1 - [(Tratado_{Día\ final} - Tratado_{Día\ 1}) / (Control_{Día\ final} - Control_{Día\ 1})]\}$.
- 15
- 20
- 25 Estadísticas. Se analizaron los datos W por pruebas t bidimensionales no apareadas como se implementa en GraphPad Prism (version 4; GraphPad Software). Un valor P de menos de 0.05 se consideró significativo. A menos que se señale de otro modo, los datos se presentan como la media \pm SD de duplicados o triplicados. Las barras de error representan la SD de la media. Si está presente un panel individual, los datos son representativos de dos experimentos individuales.

Ejemplo 13: Tratamiento de un Paciente

- 30 Un paciente está sufriendo de cáncer de mama. Al paciente se administra una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva del compuesto YK5 o un compuesto relacionado de la presente materia. Se espera que el paciente se mejorara o recuperará del cáncer de mama, y/o se desacelerará y/o inhibirá la proliferación del cáncer de mama.

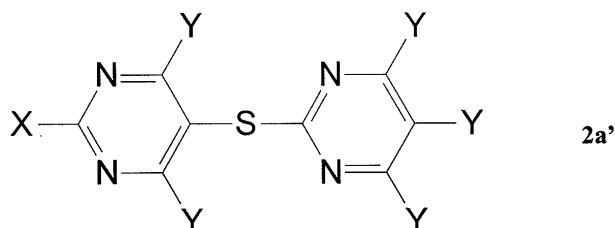
Ejemplo 14: Tratamiento de un Paciente

- 35 Un paciente está sufriendo de leucemia. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de un compuesto de la presente materia se administra al paciente. Se espera que el paciente se mejorará o recuperará de leucemia, y/o se desacelerará y/o inhibirá la proliferación del cáncer de la leucemia.

- 40 Se aprecia que ciertas características de la materia actualmente descrita, que se describe, por claridad, en el contexto de modalidades separadas, también se puede proporcionar en combinación en una modalidad individual. Por el contrario, varias características de la materia actualmente descrita, que se describen, por brevedad, en el contexto de una modalidad individual, también se pueden proporcionar de manera separada o en cualquier subcombinación adecuada.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula 2a'



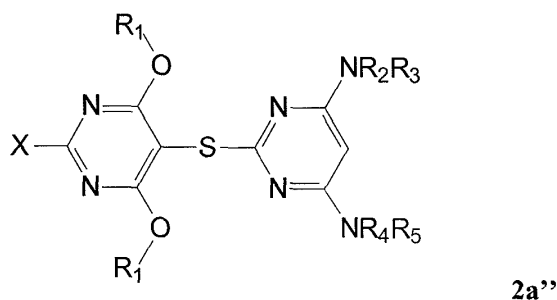
5 o un estereoisómero, tautómero, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

10 cada X e Y se selecciona independientemente del grupo que consiste de alquilo, alquenilo, o alquinilo recto o ramificado opcionalmente sustituido; un grupo carbocíclico, heterocíclico, arilo, o heteroarilo opcionalmente sustituido; halo; un grupo C₂₋₂₂acilo opcionalmente sustituido; un grupo -NR₄R₅; un grupo -C(O)R₆; un grupo -(etoxi)_n-R₆, en donde n es 1-12; un grupo alcóxicarbonilo opcionalmente sustituido; un grupo alquiloxi opcionalmente sustituido; un grupo amino opcionalmente sustituido; un grupo nitro; y un grupo carboxilo;

R₄ y R₅ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de H; alquilo, alquenilo, o alquinilo recto o ramificado opcionalmente sustituido; y -C(O)R₆; y

15 cada R₆ se selecciona independientemente del grupo que consiste de un alquilo, alquenilo, o alquinilo recto o ramificado opcionalmente sustituido; un grupo carbocíclico, heterocíclico, arilo, o heteroarilo opcionalmente sustituido; un grupo alquiloxi opcionalmente sustituido; y un grupo alquilacrilato (tal como acrilato de etilo).

2. Un compuesto de la fórmula 2a''



o un estereoisómero, tautómero, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

20 cada R₁ se selecciona independientemente del grupo que consiste de H; alquilo, alquenilo, o alquinilo recto o ramificado opcionalmente sustituido; un grupo carbocíclico, heterocíclico, arilo, o heteroarilo opcionalmente sustituido; halo; un grupo C₂₋₂₂acilo opcionalmente sustituido; un grupo -C(O)R₆; y un grupo -(etoxi)_n-R₆, en donde n es 1-12;

25 R₂, R₃, R₄, y R₅ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de H; alquilo, alquenilo, o alquinilo recto o ramificado opcionalmente sustituido; un grupo carbocíclico, heterocíclico, arilo, o heteroarilo opcionalmente sustituido; un grupo C₂₋₂₂acilo opcionalmente sustituido; un grupo -C(O)R₆; y un grupo alcóxicarbonilo opcionalmente sustituido; y

30 X se selecciona del grupo que consiste de alquilo, alquenilo, o alquinilo recto o ramificado opcionalmente sustituido; un grupo carbocíclico, heterocíclico (por ejemplo 4-alquilpiperazina), arilo, o heteroarilo opcionalmente sustituido; halo; un grupo C₂₋₂₂acilo opcionalmente sustituido; un grupo -NR₄R₅; un grupo -C(O)R₆; un grupo -(etoxi)_n-R₆, en donde n es 1-12; un grupo alcóxicarbonilo opcionalmente sustituido; un grupo alquiloxi opcionalmente sustituido; un grupo amino opcionalmente sustituido; un grupo nitro; y un grupo carboxilo; y

cada R₆ se selecciona independientemente del grupo que consiste de un alquilo, alquenilo, o alquinilo recto o ramificado opcionalmente sustituido; un carbocíclico, heterocíclico, arilo, o heteroarilo opcionalmente sustituido; un grupo alquiloxi

opcionalmente sustituido; y un grupo alquilacrilato (tal como acrilato de etilo);

con la condición que X no comprenda una estructura de anillo en puente.

3. El compuesto de conformidad con la reivindicación 2, en donde:

5 cada R₁ se selecciona independientemente del grupo que consiste de H; y alquilo, alquenilo, o alquinilo recto o ramificado opcionalmente sustituido;

R₂, R₃, R₄, y R₅ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de H; C1-C6alquilo recto o ramificado opcionalmente sustituido; y -C(O)R₆ en donde R₆ es un C1-C6alquilo, alquenilo, o alquinilo recto o ramificado opcionalmente sustituido; y

10 X se selecciona del grupo que consiste de un grupo alquilo, alquenilo, o alquinilo recto o ramificado opcionalmente sustituido; un grupo carbocíclico, heterocíclico, arilo, o heteroarilo opcionalmente sustituido; y halo, preferentemente:

en donde

cada R₁ se selecciona independientemente del grupo que consiste de C1-C6alquilo recto o ramificado y C1-C6alquilo recto o ramificado sustituido, o

en donde

15 cada R₁ se selecciona independientemente de metilo y etilo;

NR₂R₃ es NH₂;

NR₄R₅ es NHC(O)-C1-C6alquilo o NHC(O)-C2-C6alquenilo; y

X es un anillo de piperazina enlazado a un átomo de nitrógeno, y el anillo de piperazina está opcionalmente sustituido con halo, haloalquilo, o C1-C6alquilo recto o ramificado, o

20 en donde:

cada R₁ es el mismo o diferente y es metilo o etilo; y

R₂, R₃, y R₄ son cada uno H;

R₅ es -C(O)-metilo, -C(O)-etilo, o -C(O)-etenilo;

X es piperazina, 4-metilpiperazin-1-ilo, o 4-(2-(2-(2-(2-hidroxi)etoxi)etoxi)etil)piperazin-1-ilo.

25 4. El compuesto de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 3, seleccionado del grupo que consiste de:

N,N'-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4,6-diil)diacetamida,

2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4,6 diamina,

N-(6-amino-2-(2-amino-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-3-(dietilamino)propanamida,

N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida,

30 N-(6-amino-2-(2-amino-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-3-(4-metilpiperazin-1-il)propanamida,

N,N'-(2-(2-(4-(2-hidroxi)etil)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4,6-diil)diacetamida,

N,N'-(2-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4,6-diil)diacetamida,

N,N'-(2-(4,6-dimetoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4,6-diil)diacetamida,

2-(4-(5-(4,6-diaminopirimidin-2-iltio)-4,6-dimetoxipirimidin-2-il)piperazin-1-il)etanol,

- 2-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4,6-diamina,
 2-(4,6-dimetoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4,6-diamina,
 N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propionamida,
 N-(6-amino-2-(2-(4-(2-idroxietyl)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propionamida,
 5 N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propionamida,
 N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propionamida,
 N-(6-amino-2-(2-(4-(2-idroxietyl)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida,
 N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida,
 N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida,
 10 N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)octanamida,
 N-(6-amino-2-(2-(4-(2-idroxietyl)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)octanamida,
 N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)octanamida,
 N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)octanamida,
 N,N'-(2-(2-(4-butilpiperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4,6-diil)diacetamida,
 15 2-(2-(4-butilpiperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4,6-diamina,
 N-(6-amino-2-(2-(4-butilpiperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida,
 N-(6-amino-2-(2-(4-butilpiperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)octanamida,
 2-(4,6-dietoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4,6-diamina,
 N,N'-(2-(4,6-dietoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4,6-diil)diacetamida,
 20 N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida,
 N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propionamida,
 N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-3-cloropropanamida,
 N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)ciclopropanocarboxamida,
 (E)-N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)but-2-enamida,
 25 2-(4,6-dietoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4,6-diamina,
 N,N'-(2-(4,6-dietoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4,6-diil)diacetamida,
 N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida,
 N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propionamida,
 N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-2-bromoacetamida,
 30 N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)ciclopropanocarboxamida,
 N,N'-(2-(4,6-dietoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4,6-diil)diclopropanocarboxamida,

- (E)-N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)but-2-enamida,
 N,N'-(2-(4,6-dietoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4,6-diil)diacetamida,
 N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida,
 N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propionamida,
 5 N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-2-bromoacetamida,
 N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)ciclopropanocarboxamida,
 (E)-N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)but-2-enamida,
 N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)furan-2-carboxamida,
 N-(6-amino-2-(2-amino-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida,
 10 N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-3-(dimetilamino)propanamida,
 6-(5-(4,6-diaminopirimidin-2-iltio)-4,6-dimetoxipirimidin-2-ilamino)hexan-1-ol,
 N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acetamida,
 N-(6-amino-2-(2-(4-(2-(2-(2-(2-hidroxietoxi)etoxi)etoxi)etil)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida,
 15 5-(2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoato de 2-(2-(2-(2-(4-(5-(4-acrilamido-6-aminopirimidin-2-iltio)-4,6-dimetoxipirimidin-2-il)piperazin-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)etilo,
 5-((3aR,4R,6aS)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoato de 2-(2-(2-(2-(5-(4-acrilamido-6-aminopirimidin-2-iltio)-6-metoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-4-iloxi)etoxi)etoxi)etoxi)etilo,
 20 N-(6-amino-2-(4-(2-(2-(2-(2-hidroxietoxi)etoxi)etoxi)etoxi)-6-metoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida,
 5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoato de 2-(2-(2-(2-(4-(5-(4-amino-6-propionamidopirimidin-2-iltio)-4,6-dietoxipirimidin-2-il)piperazin-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)etilo,
 5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoato de 2-(2-(2-(2-(4-(5-(4-amino-6-(3-dimetilamino)propanamido)pirimidin-2-iltio)-4,6-dimetoxipirimidin-2-il)piperazin-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)etilo,
 25 N-(6-amino-2-(2-(4-(4-aminobutil)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida,
 N-(2-(2-(2-(2-(4-(5-(4-acrilamido-6-aminopirimidin-2-iltio)-4,6-dimetoxipirimidin-2-il)piperazin-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)etil)-5-(2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamida N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)metacrilamida,
 (E)-N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)but-2-enamida,
 30 N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-N-metilacrilamida,
 N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propiolamida,
 N4-alil-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4,6-diamina,
 2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)-N4-(prop-2-inil)pirimidin-4,6-diamina,
 N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-(2-(2-metoxietoxi)etil)piperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida,
 35 N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-(2-(2-morfolinoetoxi)etil)piperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida,

N-(6-amino-2-(2-(4-(2-(2-(dimetilamino)etoxi)etil)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida,
 N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)-6-(3-morfolinopropilamino)pirimidin-4-il)acrilamida,
 N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)-6-(3-(dimetilamino)propilamino)pirimidin-4-il)acrilamida,
 (E)-N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-4-(dimetilamino)but-2-enamida,
 5 (E)-N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-3-(furan-2-il)acrilamida,
 (E)-N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-3-(tiofen-2-il)acrilamida,
 (E)-N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-3-(piridin-3-il)acrilamida,
 N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propiolamida,
 o un estereoisómero, tautómero, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 5. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1 o 2, seleccionado del grupo que consiste de:

N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida,
 N-(6-amino-2-(4,6-dietoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida,
 N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida,

15 6. Un compuesto de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el compuesto contiene además un marcador seleccionado entre grupos fluorescentes, grupos de biotina y grupos de avidina, preferentemente en donde el marbete es un tinte fluorescente.

20 7. Una composición farmacéutica, que comprende un compuesto de acuerdo a una de las reivindicaciones 1 a 3, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

25 8. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de las reivindicaciones 1 a 3 para usar en el tratamiento del cáncer o en un trastorno proliferativo en un animal; con la condición que el compuesto tenga un valor IC_{50} menor de 100 μM en ya sea la prueba para la inhibición de crecimiento de células AML Kasumi-1, o en la prueba para inhibición de crecimiento en células de cáncer de mama SKBr3, o ambos.

30 9. Un compuesto de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 3 para usar en el tratamiento de un tumor o trastorno proliferativo en un animal, dicho tratamiento comprende

administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto a un animal en necesidad del mismo;

35 de modo que el compuesto se una a un dominio alostérico de unión localizado fuera del sitio de unión a nucleótido de Hsp70 y Hsc70; e

inhibe tanto Hsp70 como Hsc70; y de este modo

induce apoptosis en células tumorales o células asociadas con un trastorno proliferativo; sin inducir apoptosis en células, estroma, o vasos sanguíneos normales,

preferentemente:

40

en donde el dominio alostérico de unión se localiza en SEQ ID NO:1 y este dominio se define por uno o más residuos de aminoácido seleccionados del grupo que consiste de Thr13, Thr14, Tyr15, Lys56, Lys271, Arg269, Glu268, Arg264, Thr265, Cys267, Leu237, Val238, Val260, Arg261, Val59, Pro63, Thr66, Asn235, Asp234, Glu231, Asp69, Phe68, Tyr41, Lys88, His89, Trp90, Pro91, Phe92, y combinaciones de estos.

5 10. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de las reivindicaciones 1 a 3 para usar en el tratamiento de un tumor o en un trastorno proliferativo en un animal que comprende administrarla de modo que el compuesto se una a un dominio de unión a ligando localizado en SEQ ID NO:1 definido por uno o más residuos de aminoácido seleccionados del grupo que consiste de Thr13, Thr14, Tyr15, Lys56, Lys271, Arg269, Glu268, Arg264, Thr265, Cys267, Leu237, Val238, Val260, Arg261, Val59, Pro63, Thr66, Asn235, Asp234, Glu231, Asp69, Phe68, Tyr41, Lys88, His89, Trp90, Pro91, Phe92, y combinaciones de estos.

15 11. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de las reivindicaciones 1 a 3 para usar en la inhibición de la actividad de Hsp70, en donde la Hsp70 contiene un dominio de unión a ligando en la proteína de SEQ ID NO:1, o una variante de la misma, definido por uno o más residuos de aminoácido seleccionados del grupo que consiste de Thr13, Thr14, Tyr15, Lys56, Lys271, Arg269, Glu268, Arg264, Thr265, Cys267, Leu237, Val238, Val260, Arg261, Val59, Pro63, Thr66, Asn235, Asp234, Glu231, Asp69, Phe68, Tyr41, Lys88, His89, Trp90, Pro91, Phe92, y combinaciones de estos; que comprende

poner contacto el dominio de unión a ligando con un ligando para inhibir la actividad de Hsp70.

en donde dicho ligando es dicho compuesto de las reivindicaciones 1 a 3.

20 12. Un método para identificar la proteína asociada a Hsp70 en el tumor o las células asociadas con el trastorno proliferativo, que comprende:

enlazar un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 indirectamente o de forma directa a un soporte sólido

poner en contacto una muestra biológica con el compuesto enlazado al soporte sólido para permitir que el compuesto se una a cualquier complejo de Hsp70 presente en la muestra;

25 e identificar la proteína asociada a Hsp unida al compuesto;

para identificar la proteína asociada a Hsp en el tumor o las células asociadas con el trastorno proliferativo.

13. El compuesto seleccionado del grupo que consiste de:

N-(2-(2-amino-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acetamida,

N-(2-(2-fluoro-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acetamida,

30 N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acetamida,

N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acetamida,

N-(2-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acetamida,

N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(pirrolidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acetamida,

2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-amina,

35 2-(4,6-dimetoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-amina,

2-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-amina,

2-(4,6-dimetoxi-2-(pirrolidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-amina,

N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida,

N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida,

- N-(2-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida,
 N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(pirrolidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida,
 1-óxido de 4-(5-(4-acetamidopirimidin-2-iltio)-4,6-dimetoxipirimidin-2-il)-1-metilpiperazina,
 N-(2-(2,4,6-trimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida,
 5 N-(2-(2,4,6-trimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propionamida,
 N-(2-(2,4,6-trimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)ciclopropanocarboxamida,
 1-óxido de 4-(5-(4-aminopirimidin-2-iltio)-4,6-dimetoxipirimidin-2-il)-1-metilpiperazina,
 1-óxido de 4-(5-(4-acrilamidopirimidin-2-iltio)-4,6-dimetoxipirimidin-2-il)-1-metilpiperazina,
 N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propionamida,
 10 2-(4,6-dimetil-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-amina,
 2-(2-(4-(4-aminobutil)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-amina,
 N-(2-(2-(4-(4-aminobutil)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida,
 N-(2-(2-(4-(4-aminobutil)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)furan-2-carboxamida,
 N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propionamida,
 15 (E)-N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)but-2-enamida,
 N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)metacrilamida,
 N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)furan-2-carboxamida,
 N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propionamida,
 (E)-N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)but-2-enamida,
 20 N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)metacrilamida,
 N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)furan-2-carboxamida,
 N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(piperidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)ciclopropanocarboxamida,
 N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(pirrolidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propionamida,
 (E)-N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(pirrolidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)but-2-enamida,
 25 N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(pirrolidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)metacrilamida,
 N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(pirrolidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)furan-2-carboxamida,
 N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(pirrolidin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)ciclopropanocarboxamida,
 N-(2-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propionamida,
 (E)-N-(2-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)but-2-enamida,
 30 N-(2-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)metacrilamida,
 N-(2-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)furan-2-carboxamida,

- N-(2-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)ciclopropanocarboxamida,
 2-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)-6-(trifluorometil)pirimidin-4-ol,
 acrilato de 2-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)-6-(trifluorometil)pirimidin-4-ilo,
 ciclopropanocarboxilato de 2-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)-6-(trifluorometil)pirimidin-4-ilo,
 5 metacrilato de 2-(4,6-dimetoxi-2-morfolinopirimidin-5-iltio)-6-(trifluorometil)pirimidin-4-ilo,
 N-(2-(4-(benciloxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida,
 2-amino-N-(2-(4-(3-carbamimidoilfenoxi)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acetamida,
 N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)metacrilamida,
 (Z)-N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)but-2-enamida,
 10 (E)-N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)but-2-enamida,
 N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-N-metilacrilamida,
 N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)propiolamida,
 N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)-6-metoxipirimidin-4-il)acrilamida,
 N-alil-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-amina,
 15 2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)-N-(prop-2-inil)pirimidin-4-amina,
 N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-(2-(2-metoxietoxi)etil)piperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida,
 N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-(2-(2-morfolinoetoxi)etil)piperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida,
 N-(2-(2-(4-(2-(2-(dimetilamino)etoxi)etil)piperazin-1-il)-4,6-dimetoxipirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida,
 (E)-N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-4-(dimetilamino)but-2-enamida,
 20 (E)-N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-3-(furan-2-il)acrilamida,
 (E)-N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-3-(tiofen-2-il)acrilamida,
 (E)-N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)-3-(piridin-3-il)acrilamida,
 N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)etenosulfonamida,
 1-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)but-3-en-2-ona,
 25 o un estereoisómero, tautómero, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

14. El compuesto de la reivindicación 13, en donde el compuesto es N-(2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida.

15. El compuesto de la reivindicación 5, en donde el compuesto es N-(6-amino-2-(4,6-dimetoxi-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-5-iltio)pirimidin-4-il)acrilamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Figura 1a

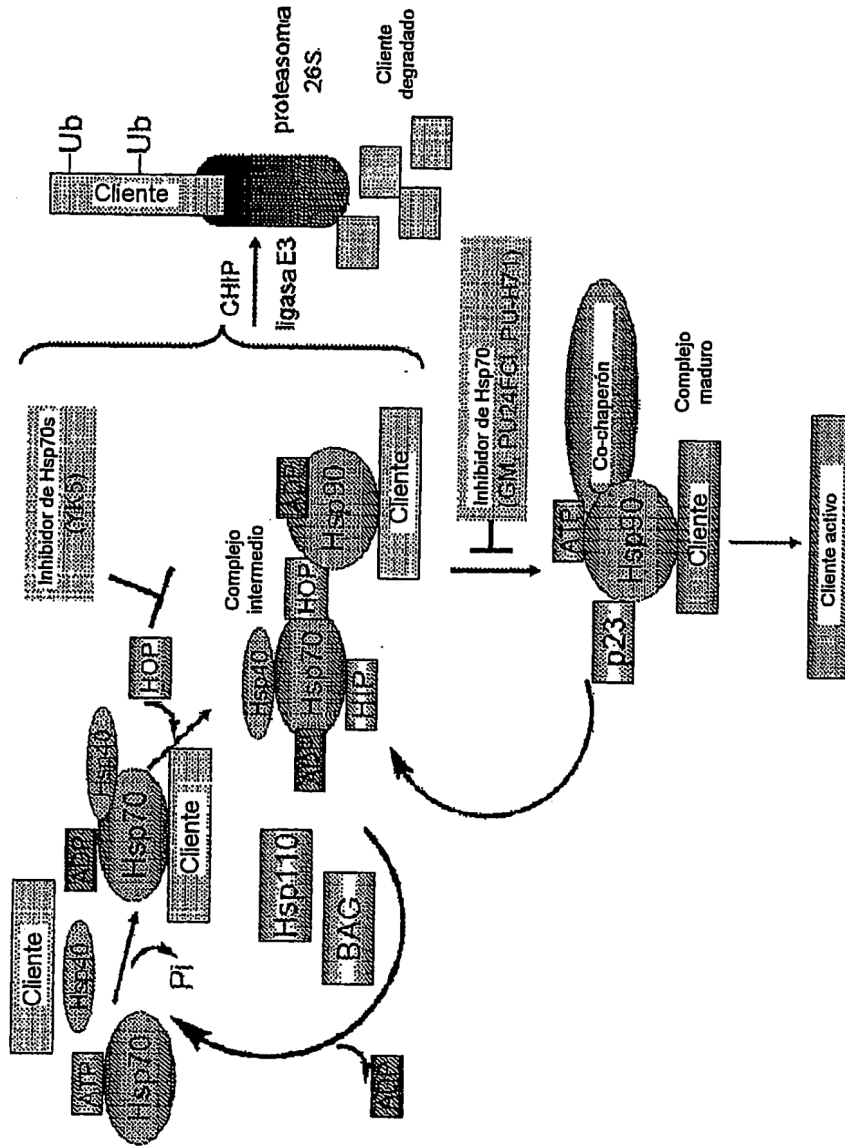
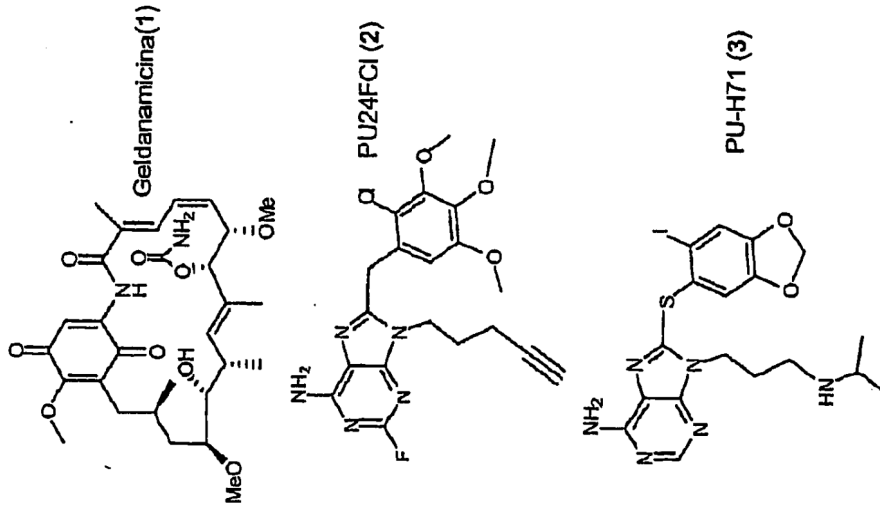


Figura 1b

Estructuras de inhibidores de Hsp90



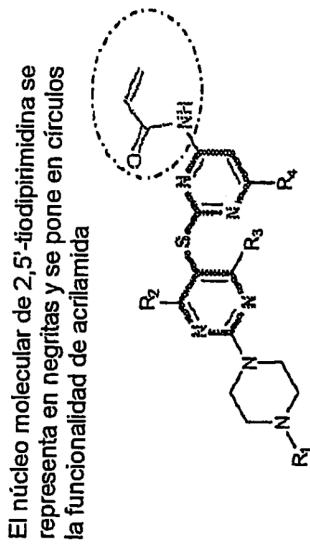


Figura 2b

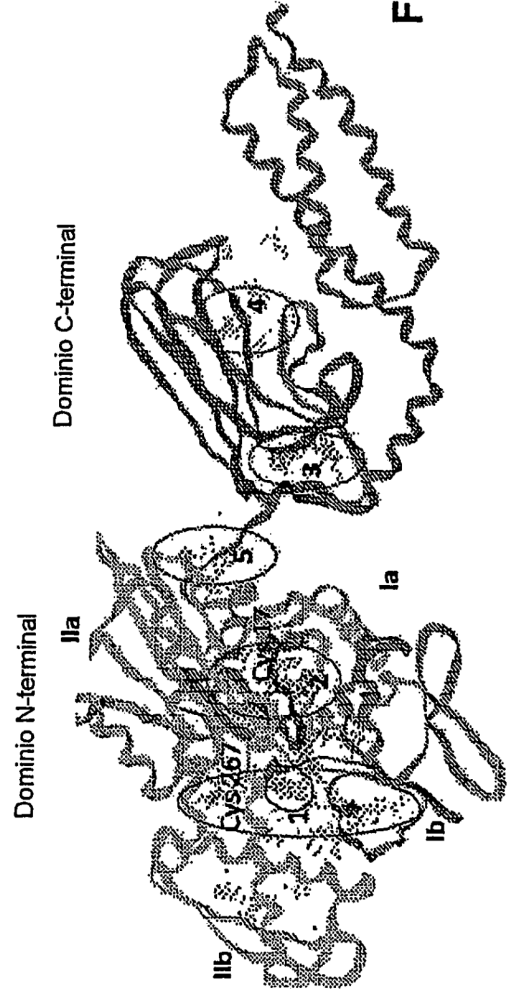
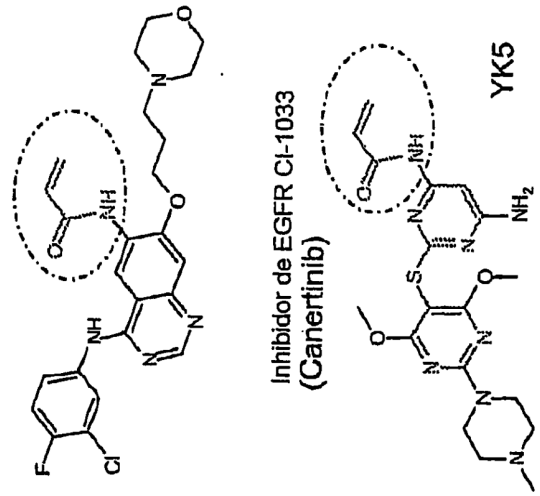


Figura 2a

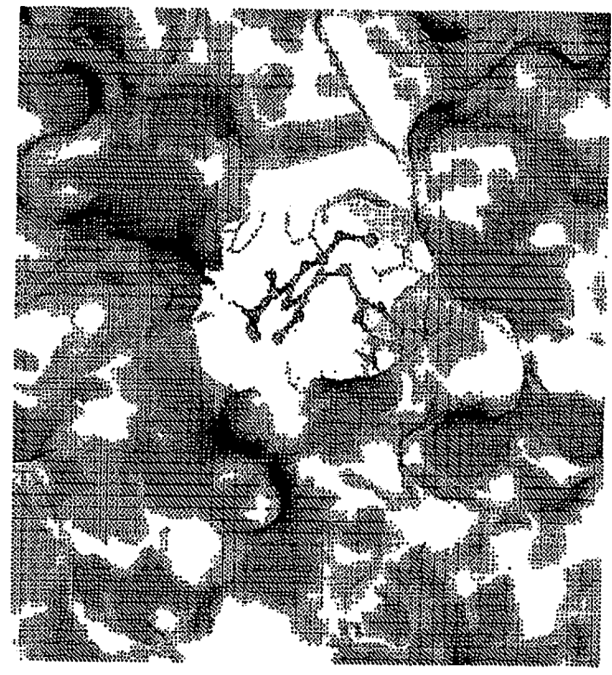
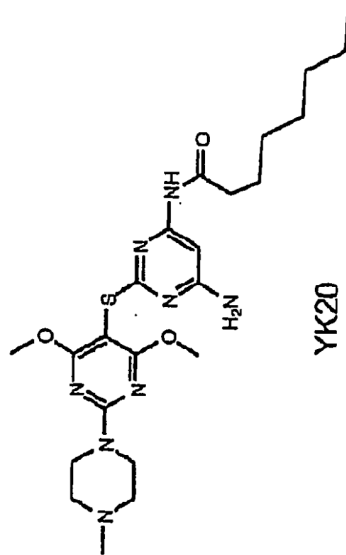
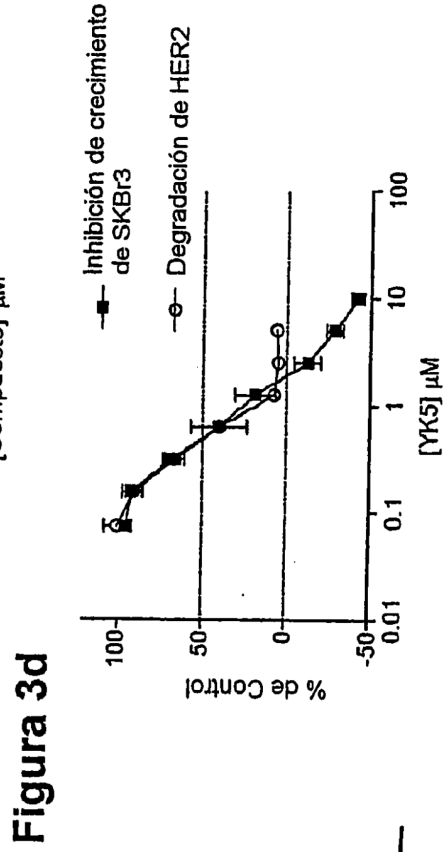
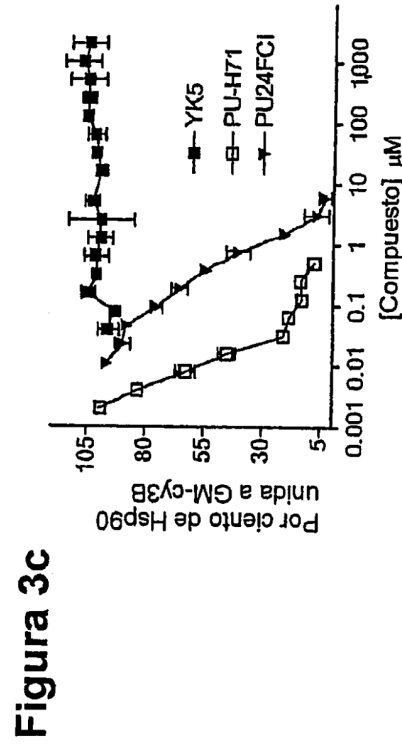
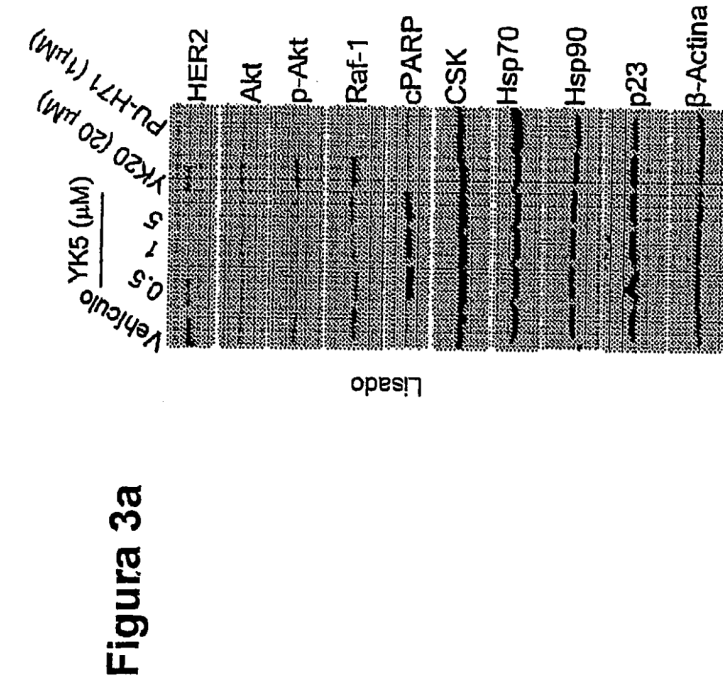
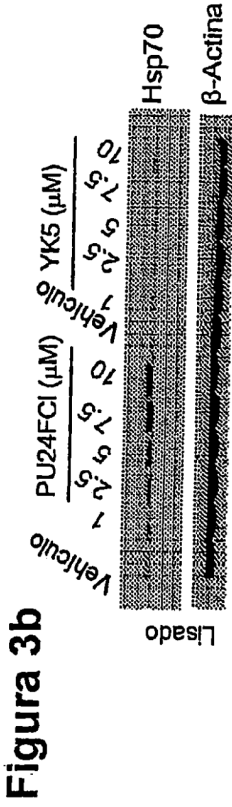
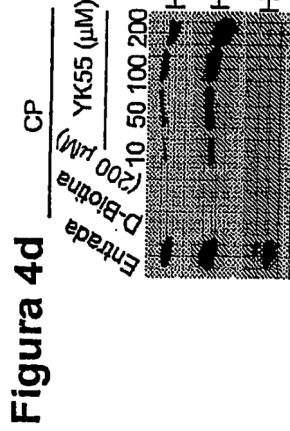
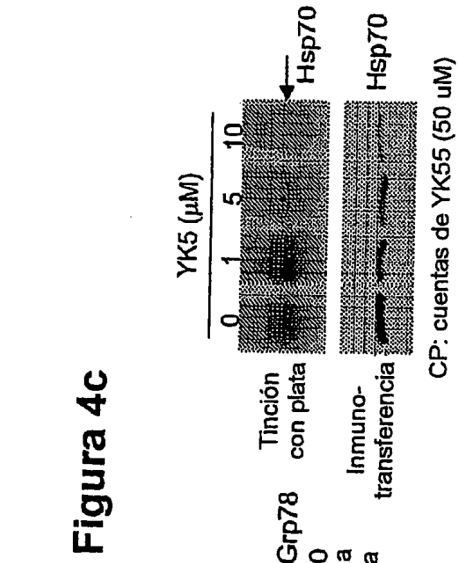
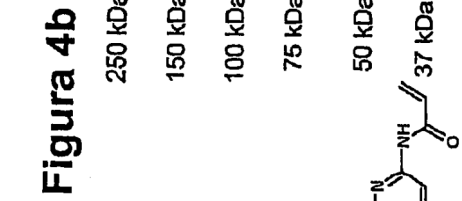
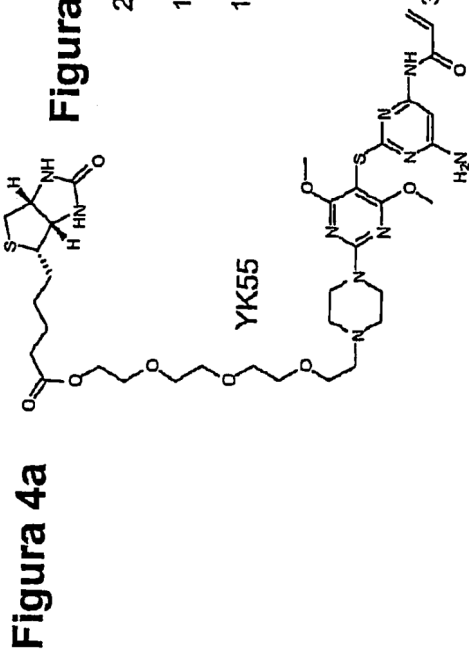


Figura 2c





IP: cuentas de estreptavidina
Lavado: amortiguador de alto contenido de sal

Figura 4e

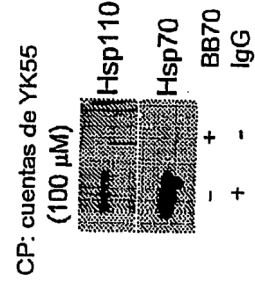
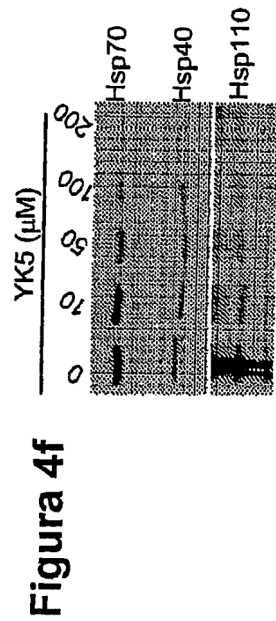
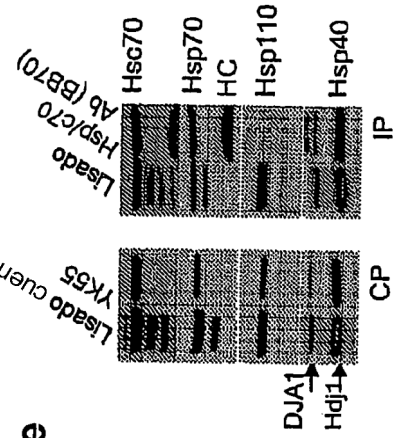


Figura 5b

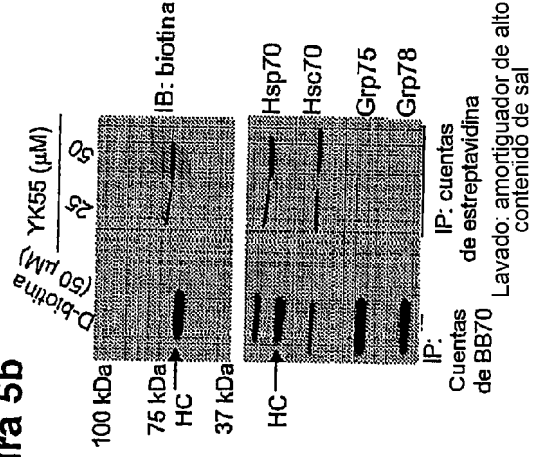


Figura 5a

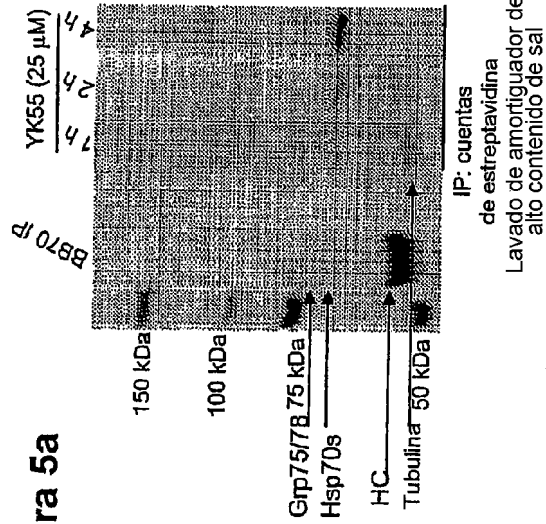


Figura 5c

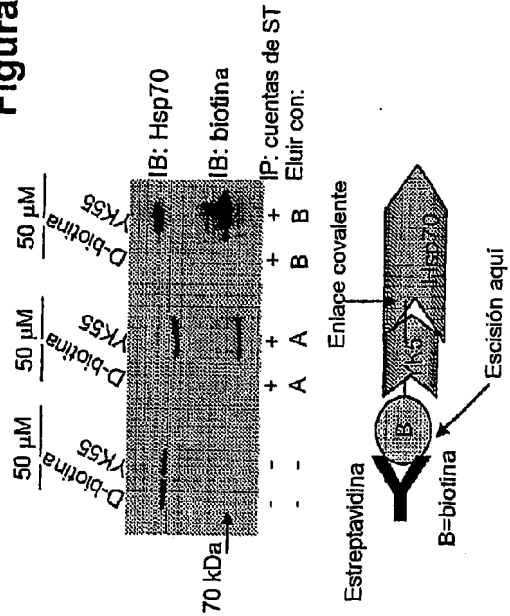
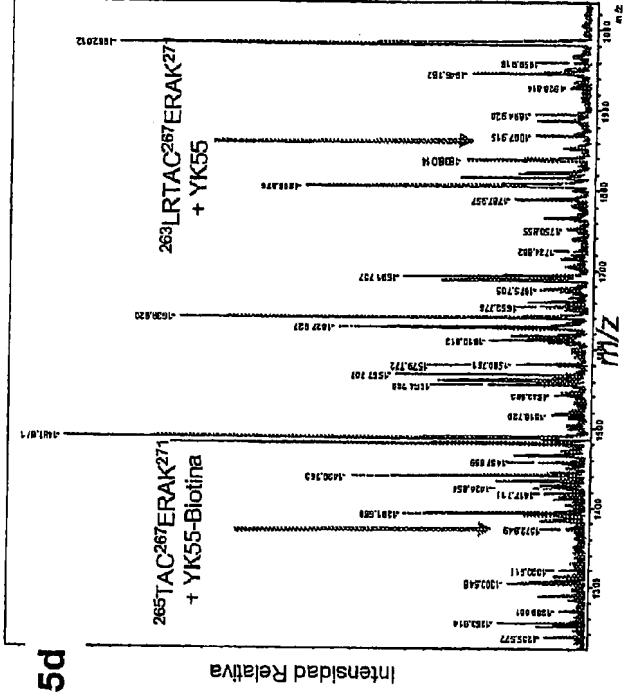


Figura 5d



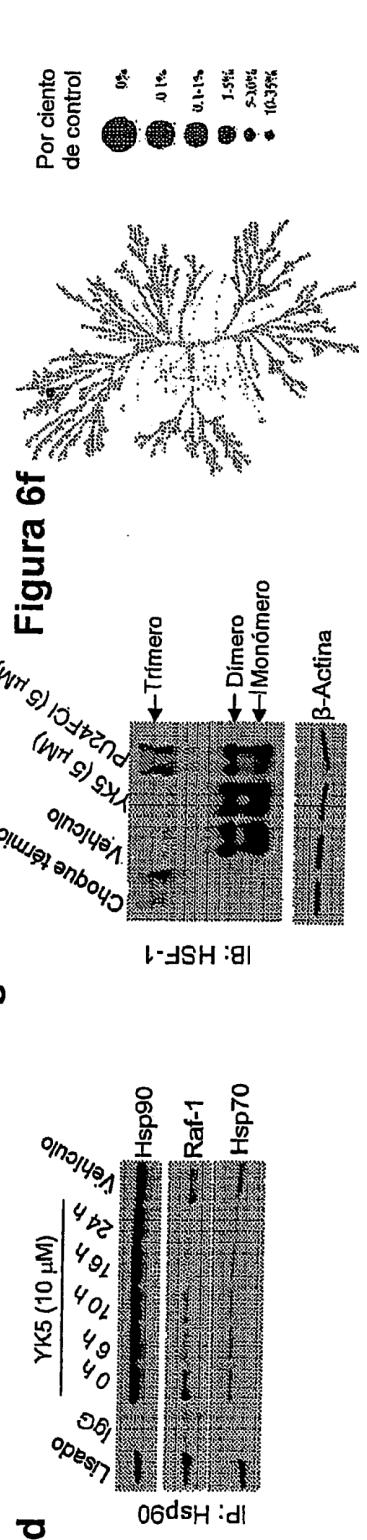
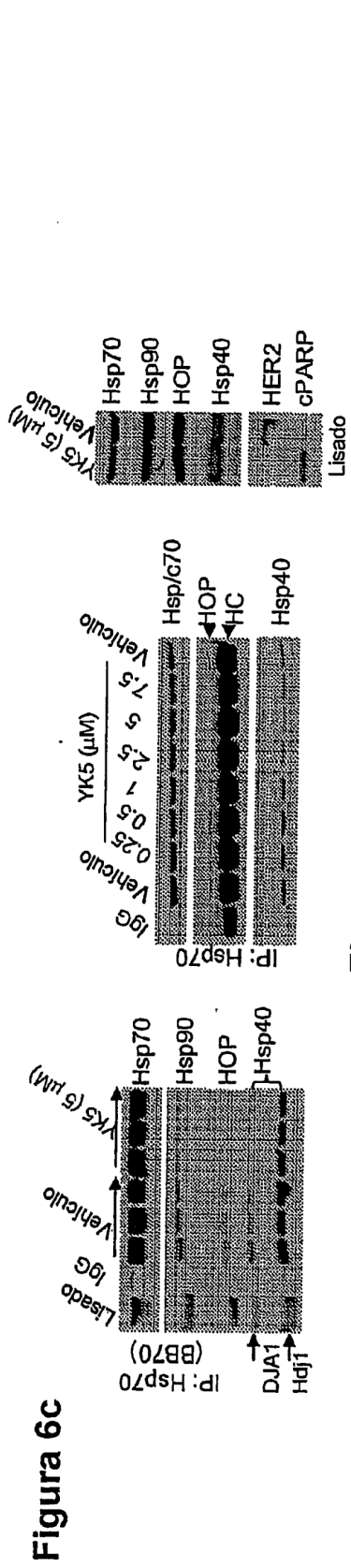
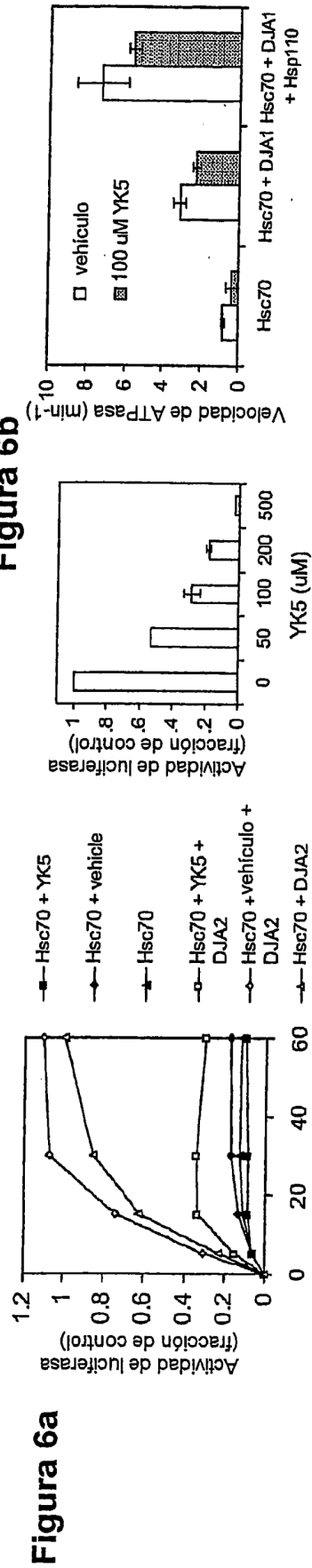


Figura 7a

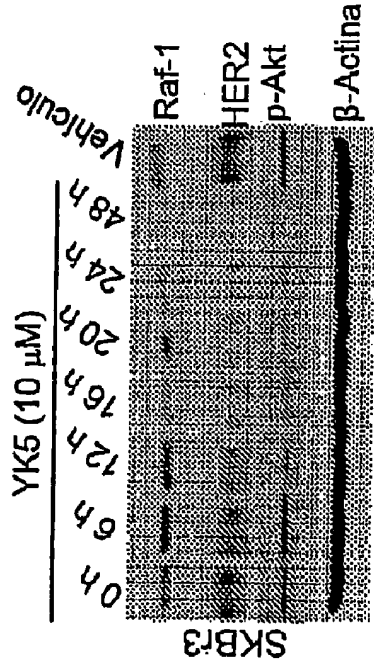


Figura 7b

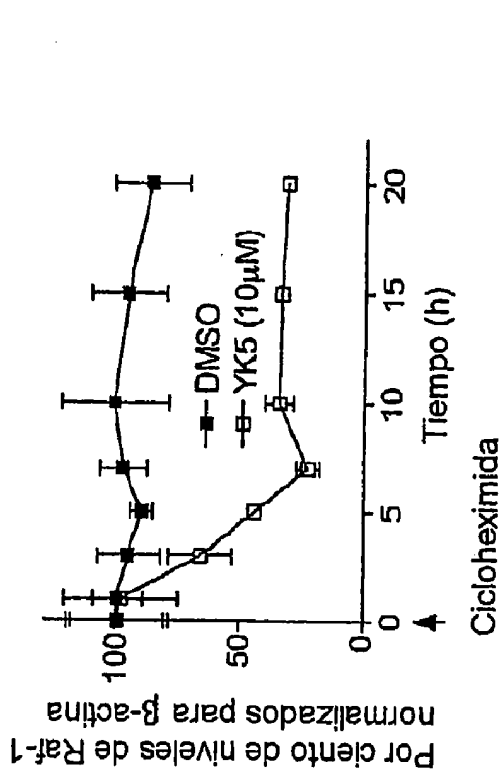


Figura 7c

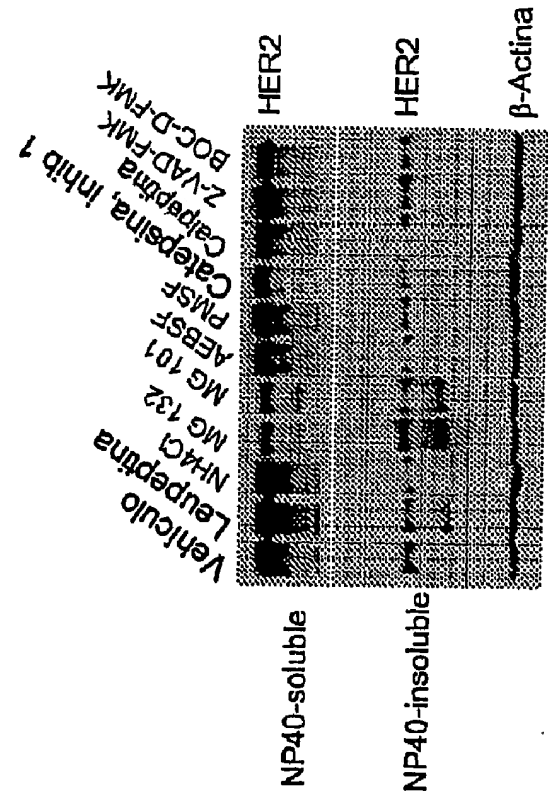
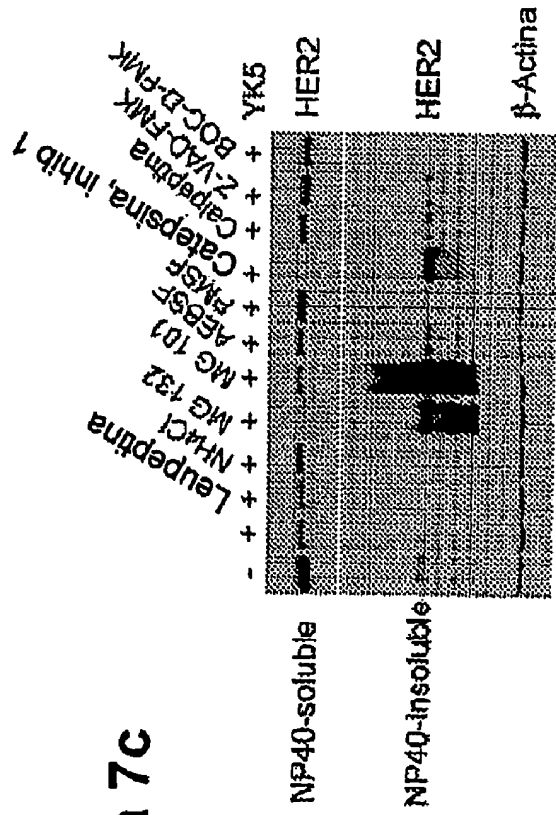


Figura 8c

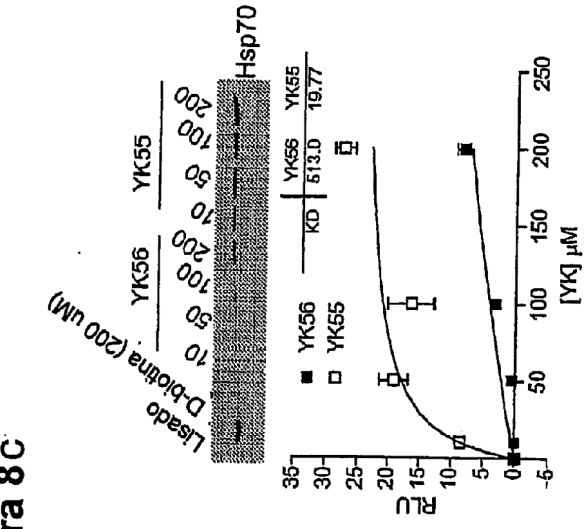


Figura 8a

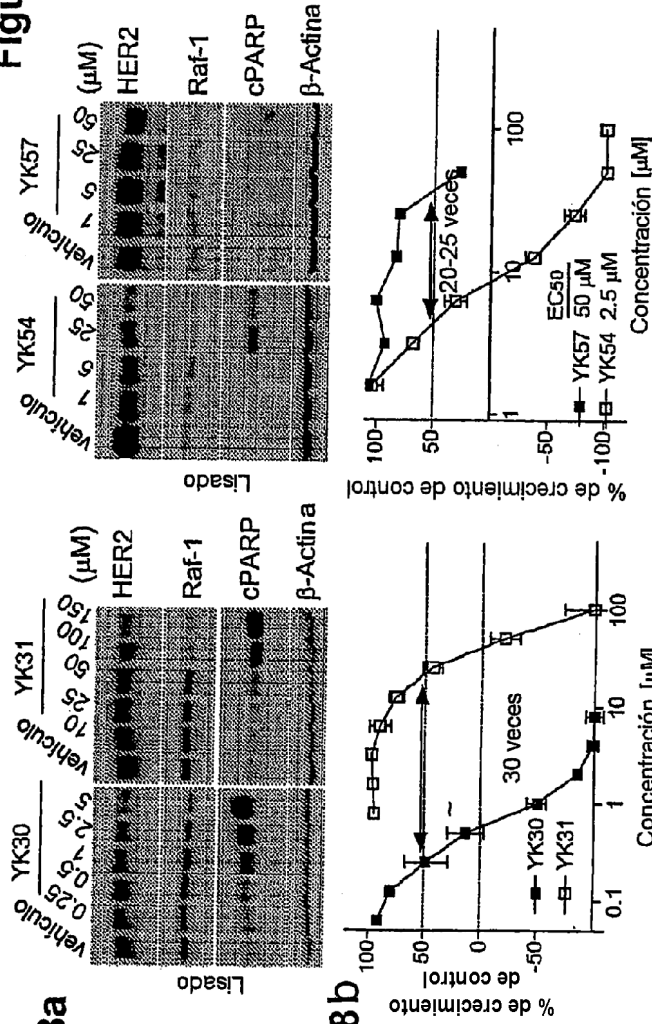


Figura 8b

Figura 8d

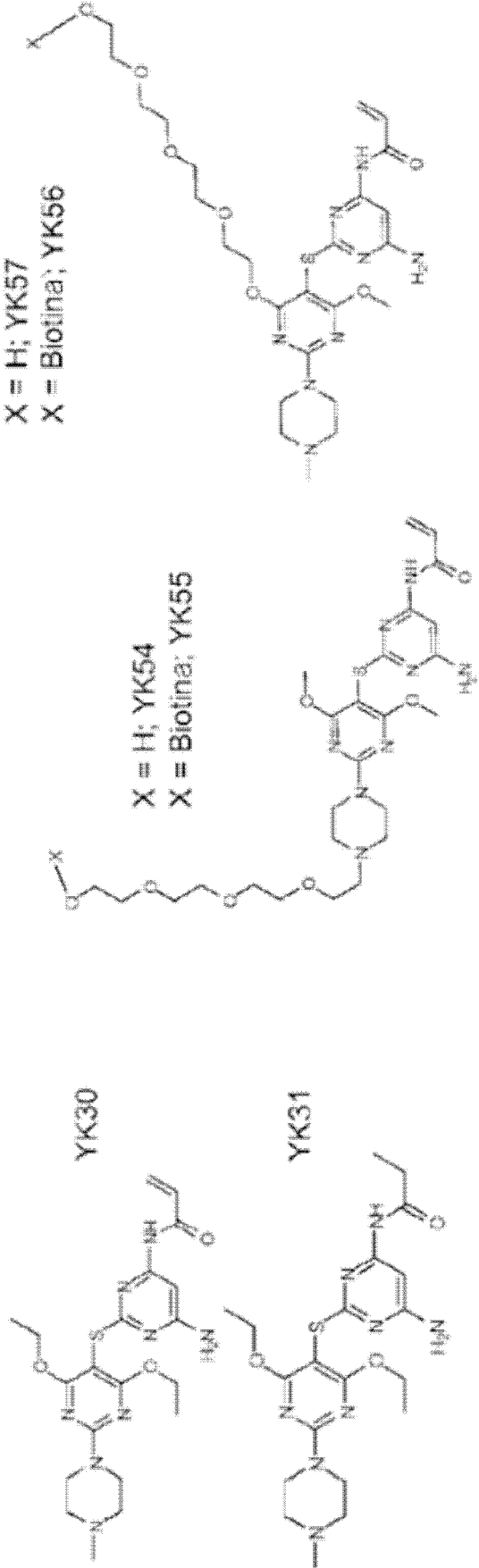


Figura 9a

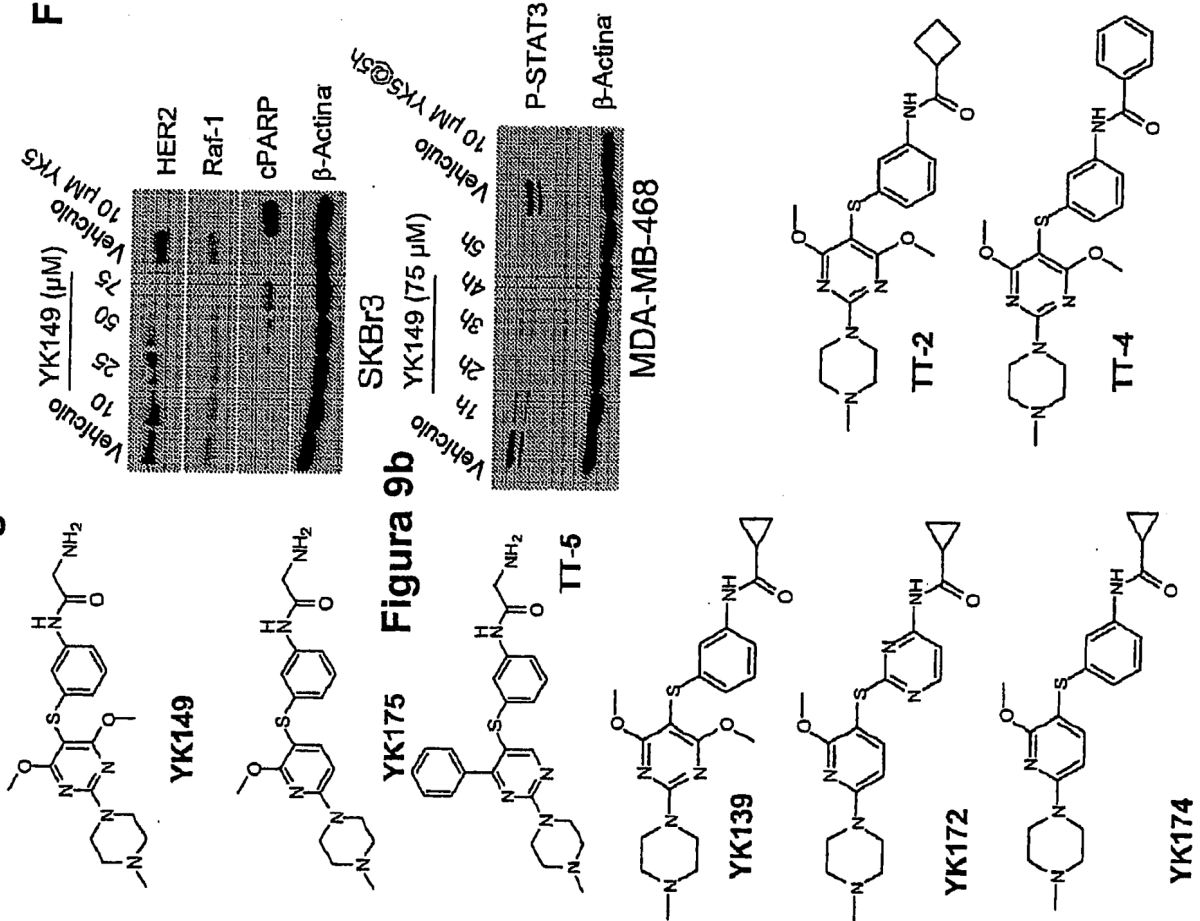
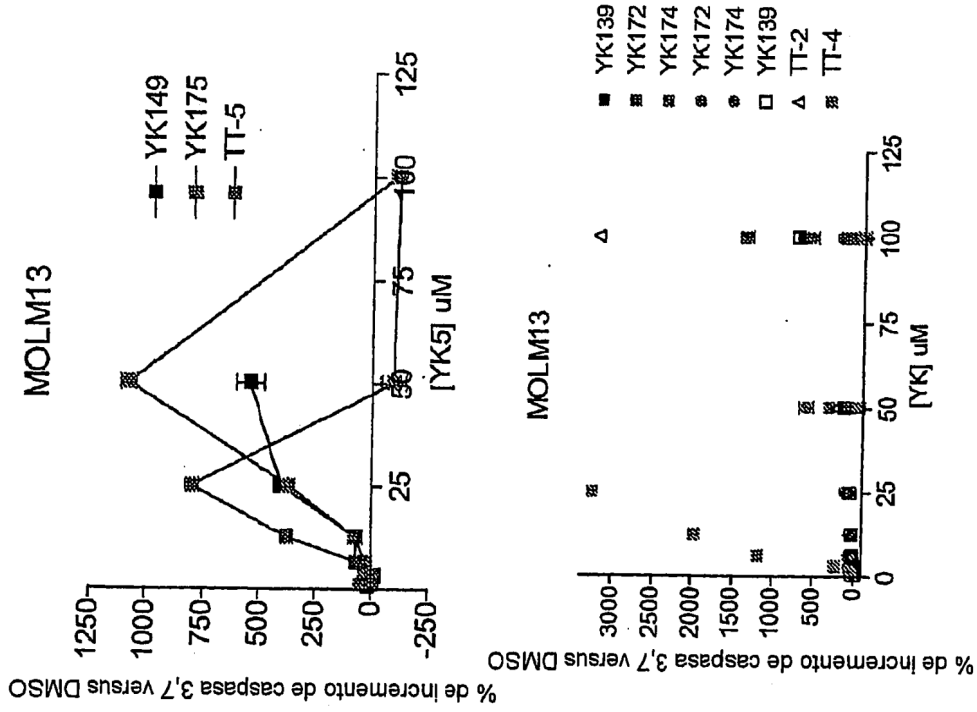


Figura 9c



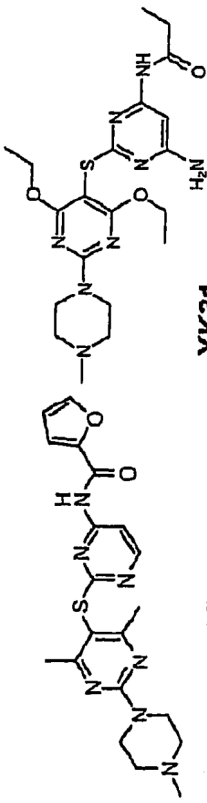


Figura 10a

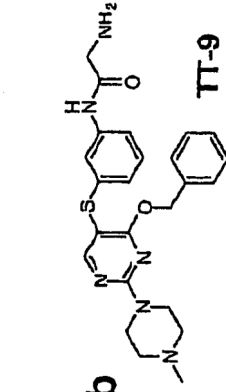
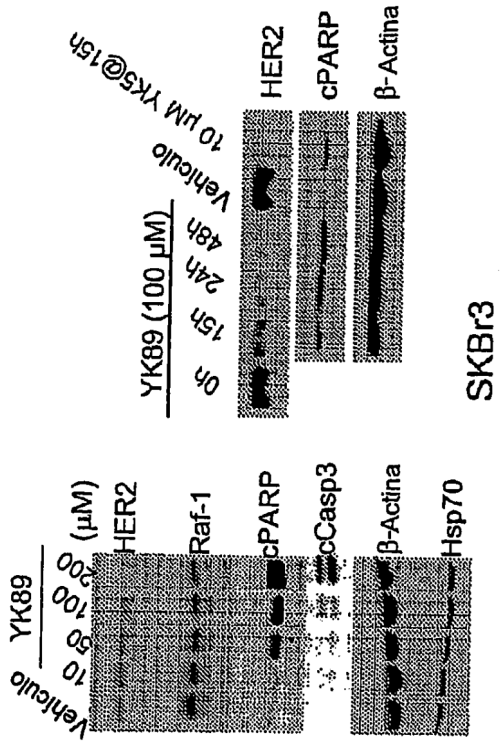
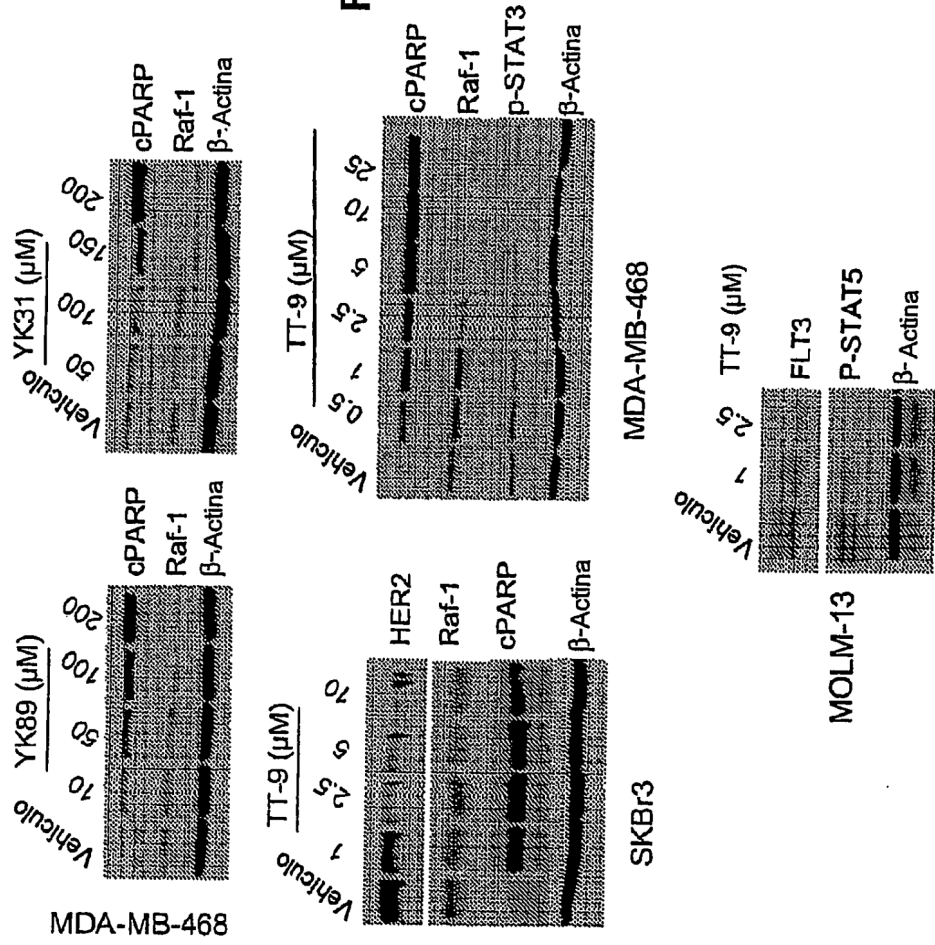
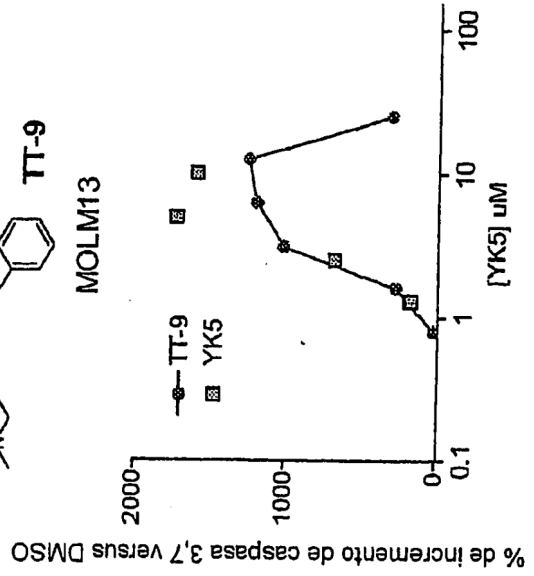
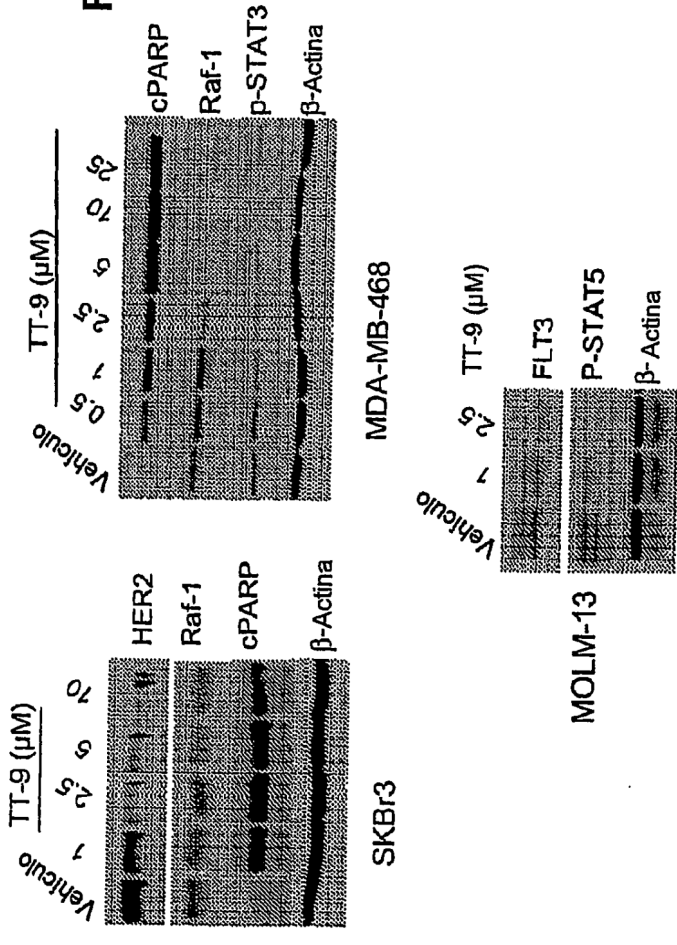


Figura 10b



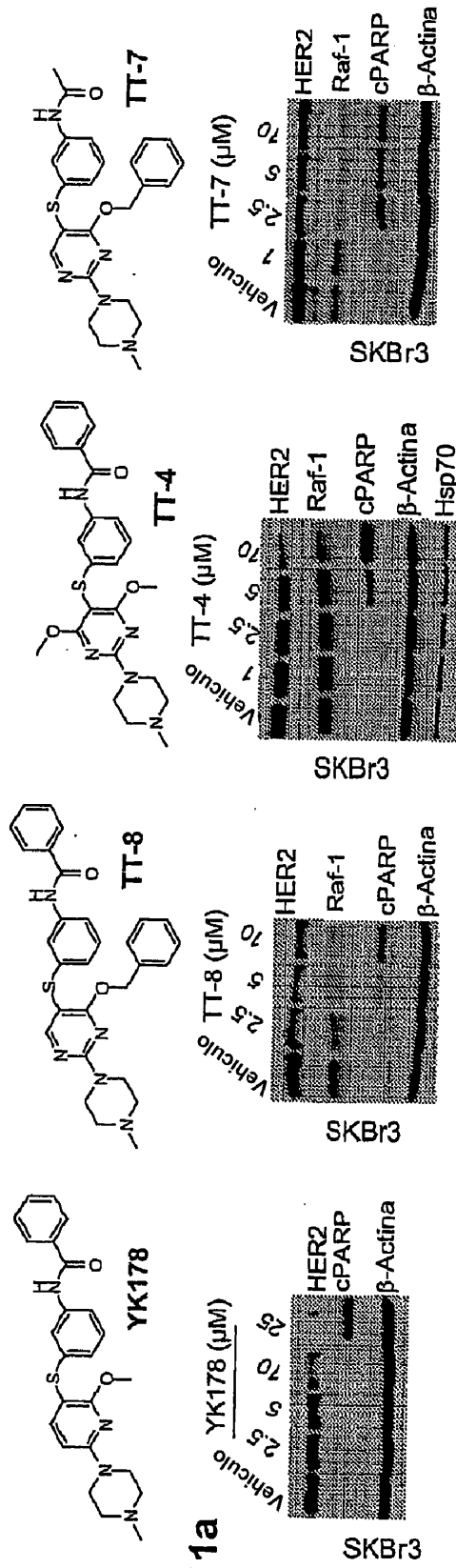


Figure 11a

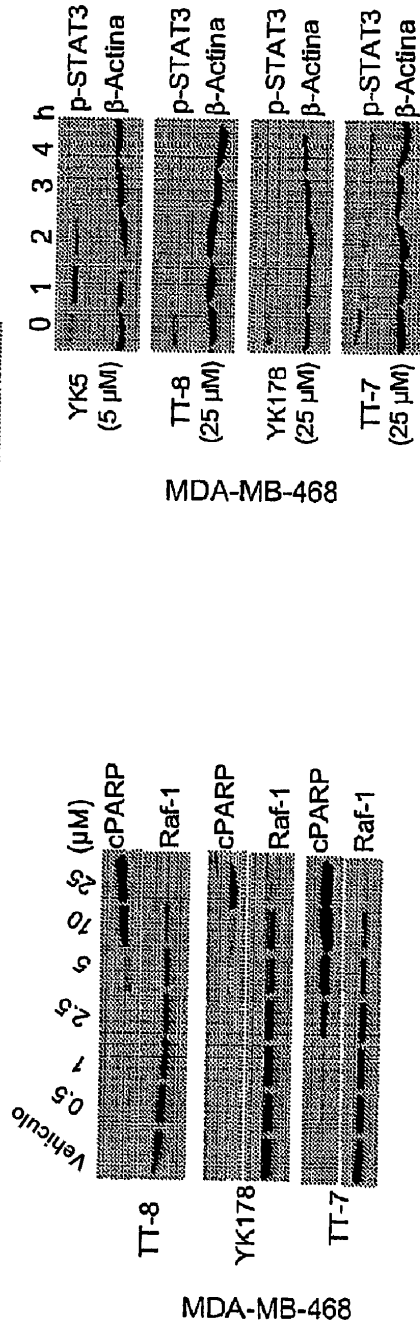


Figure 11b

Figura 12a

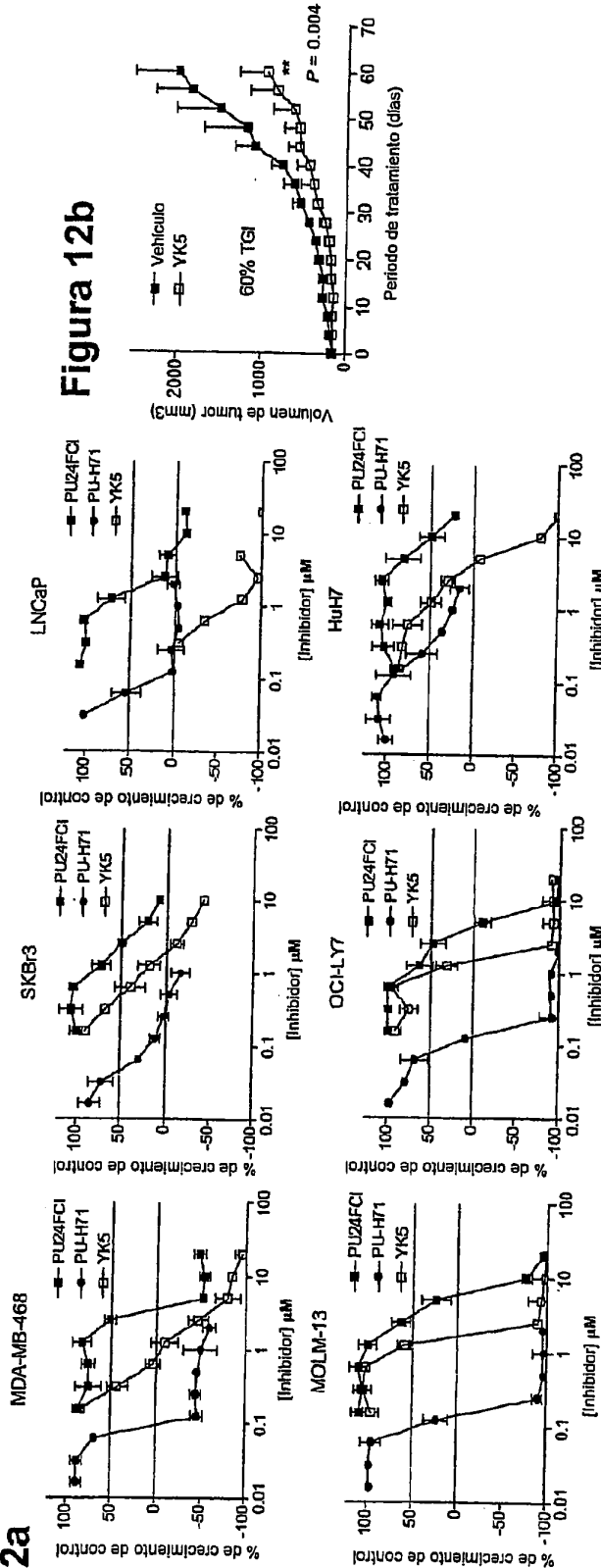


Figura 12b

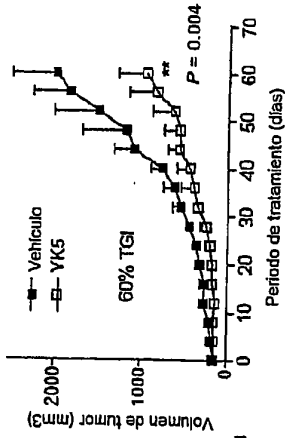


Figura 12c

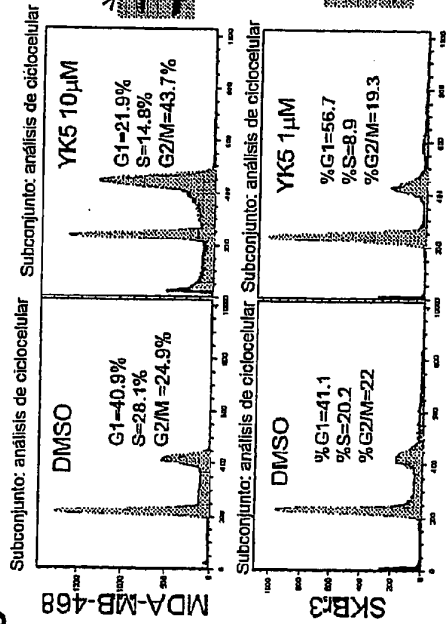


Figura 12d

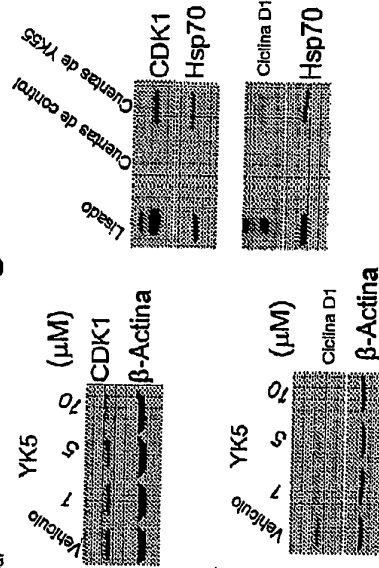


Figura 12e

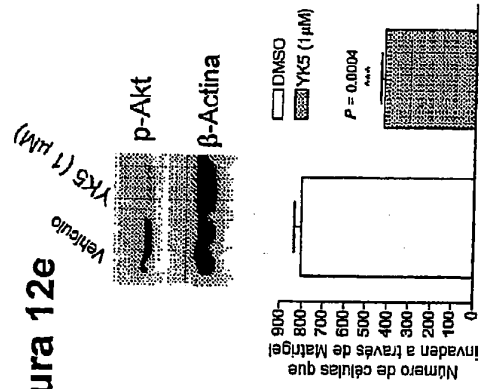


Figura 13a

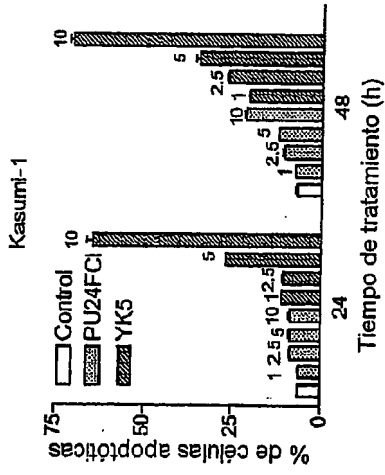
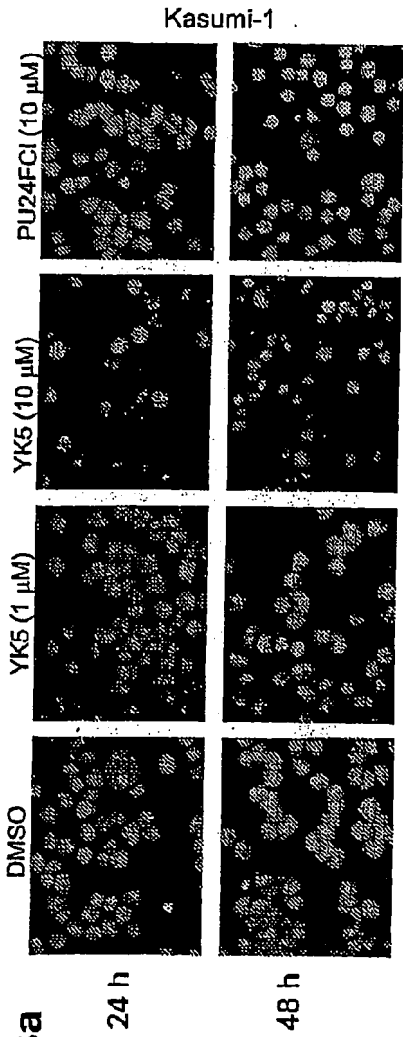


Figura 13b

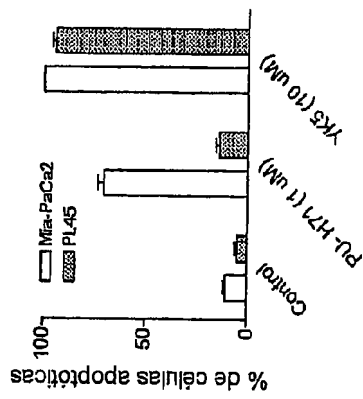


Figura 13c

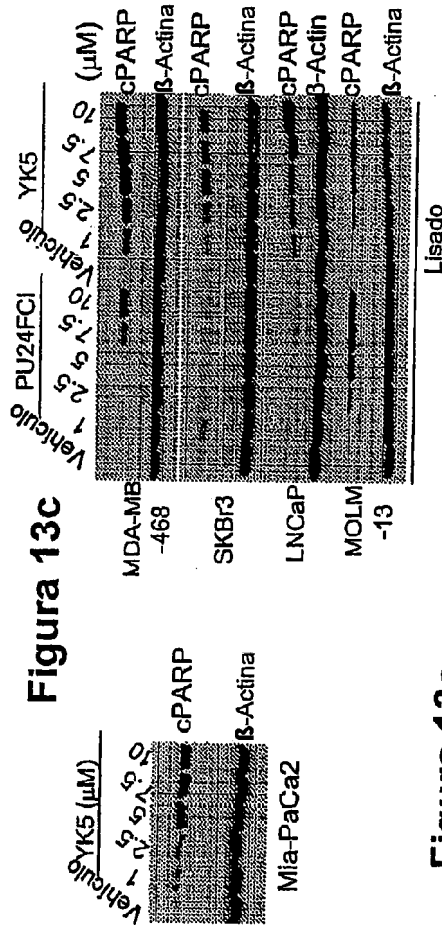


Figura 13d

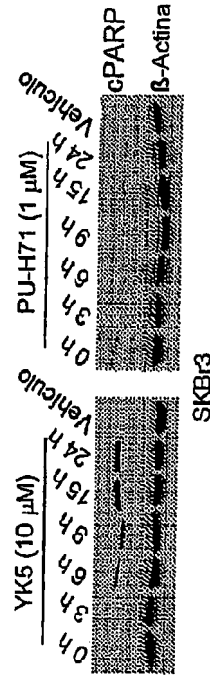


Figura 13e

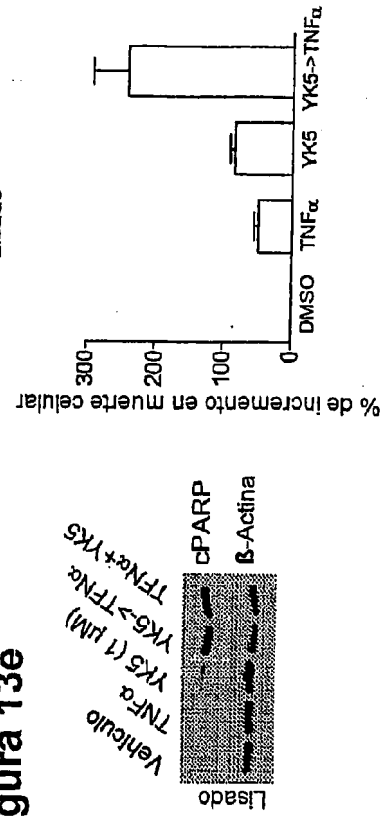


Figura 14a

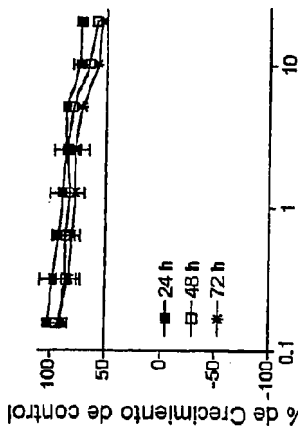


Figura 14c

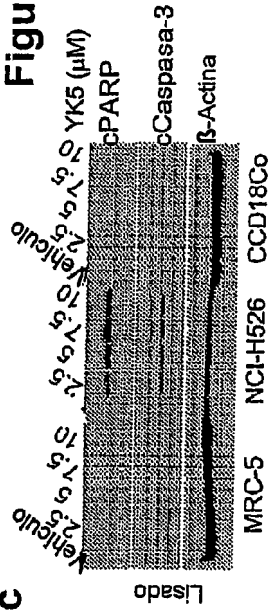


Figura 14b

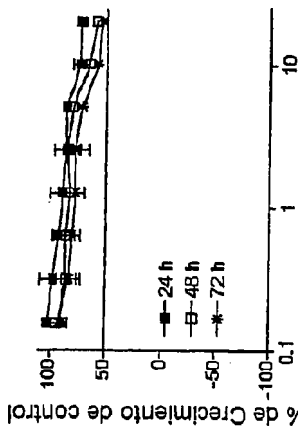


Figura 14b

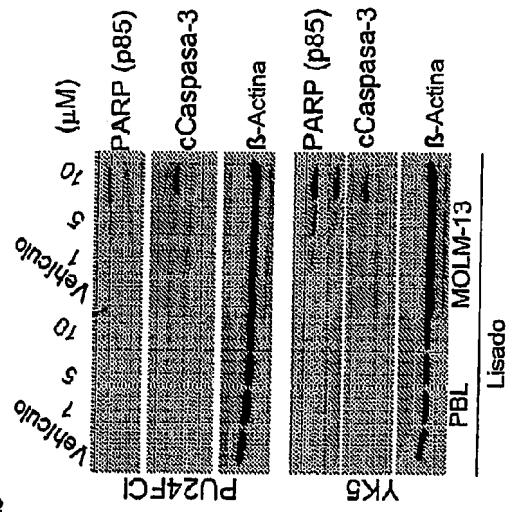


Figura 14e

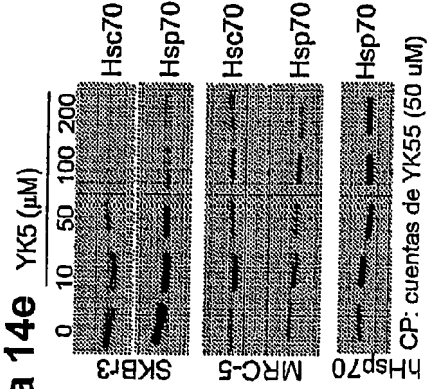
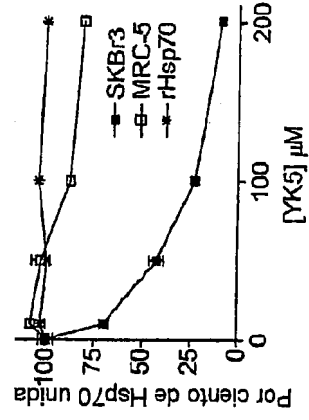
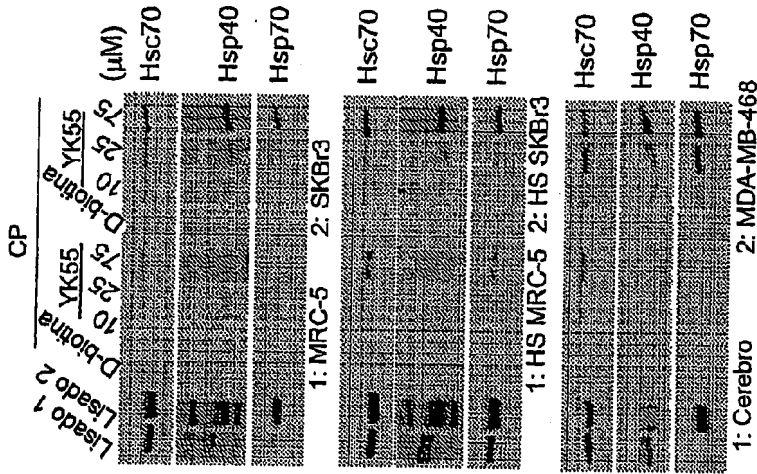


Figura 14d



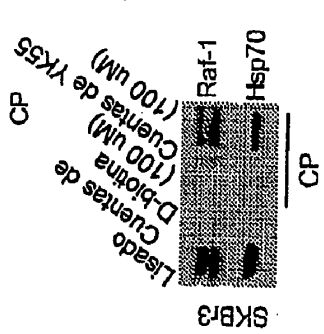


Figura 15a

Figura 15c

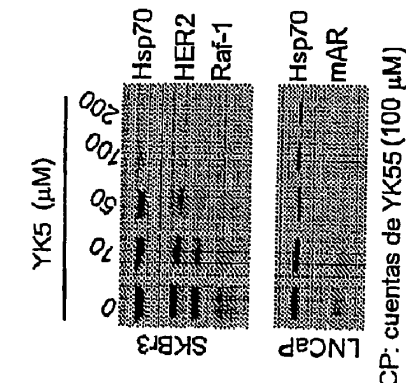


Figura 15b

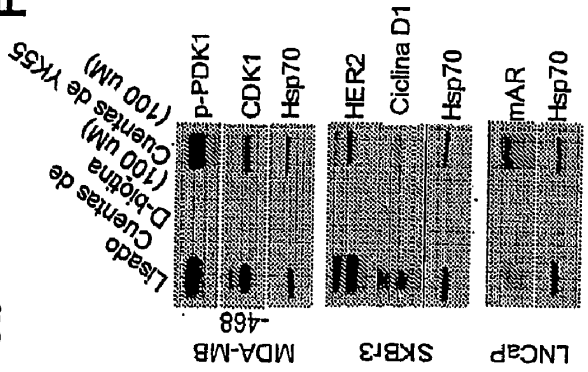


Figura 15d

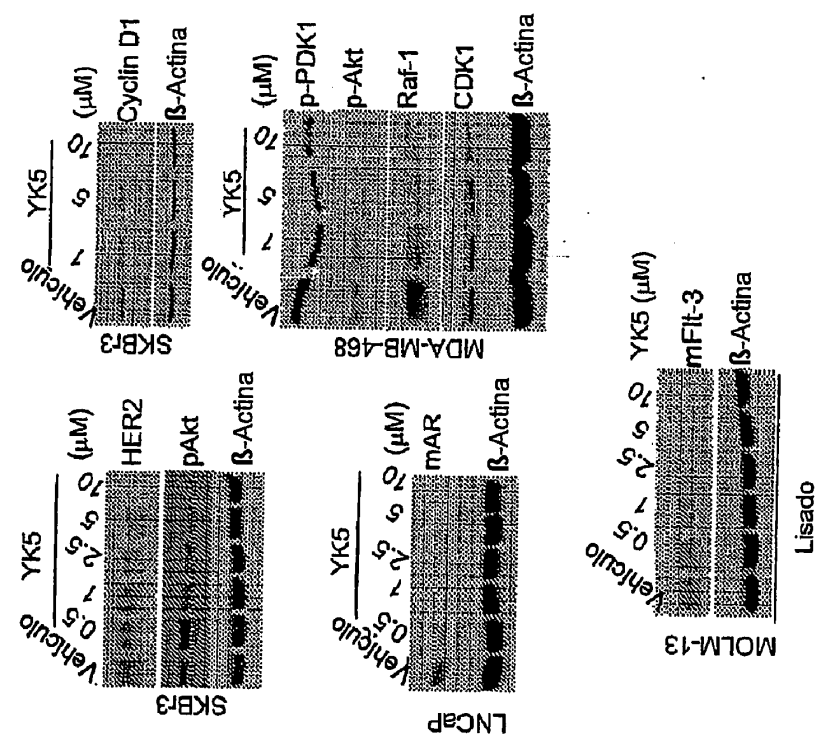


Figura 16

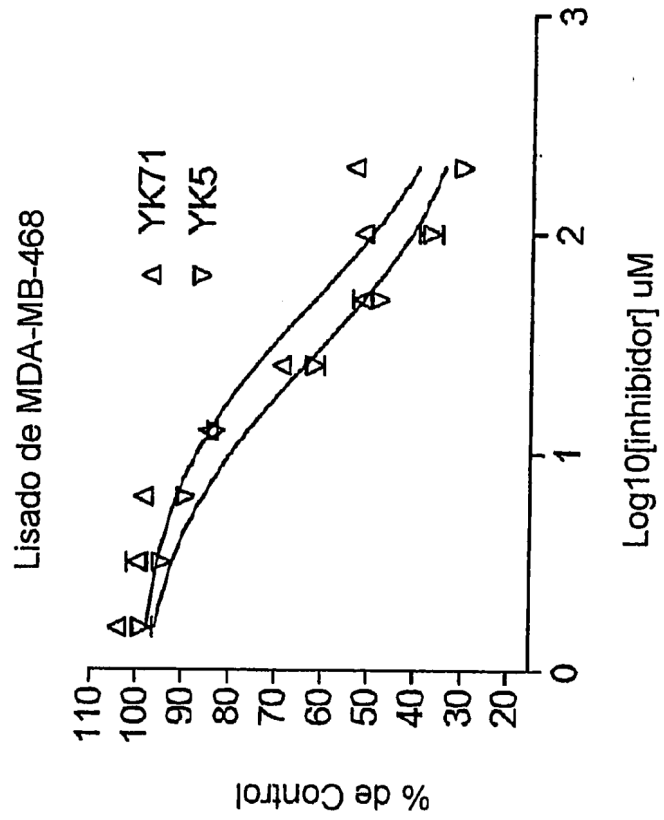
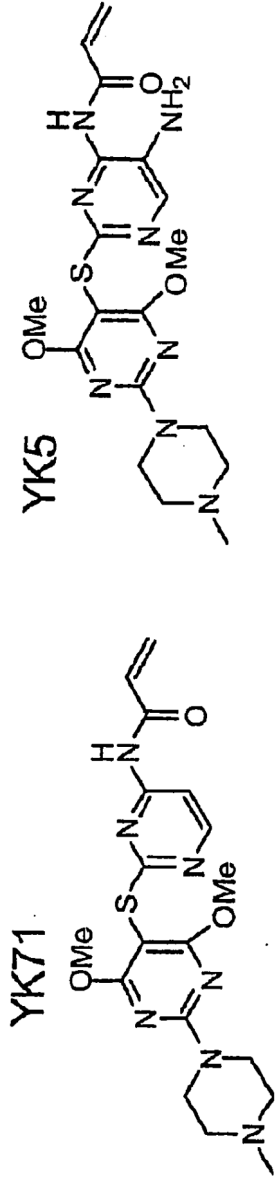


Figura 17a

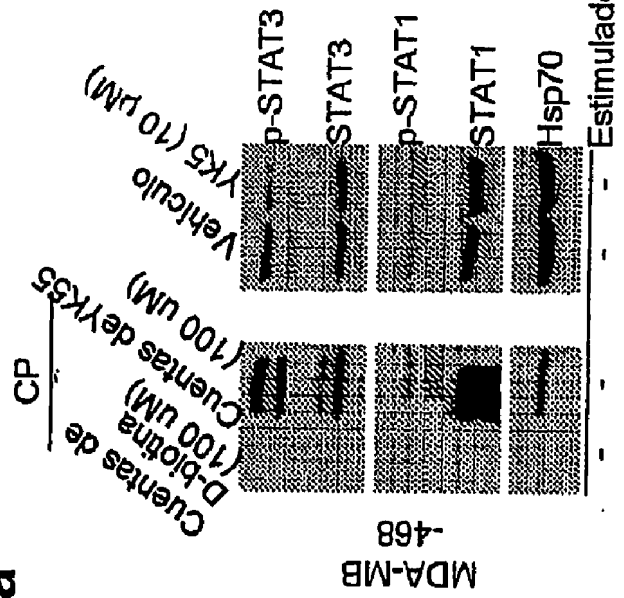


Figura 17b

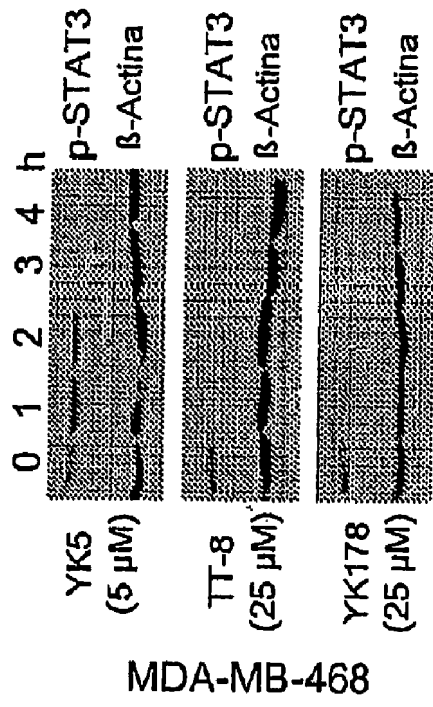


Figura 18a

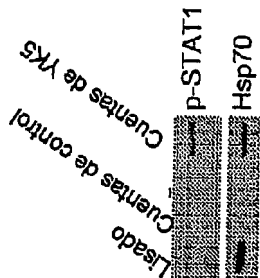


Figura 18b

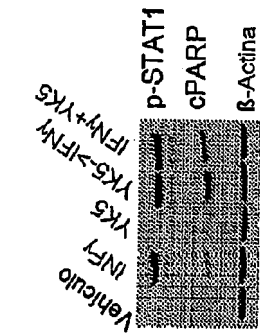


Figura 18c

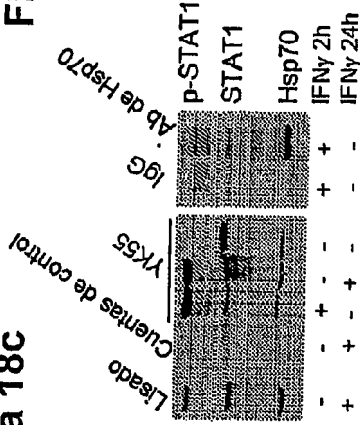


Figura 18d

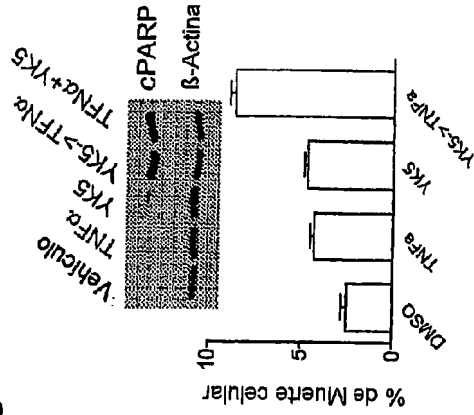


Figura 18e

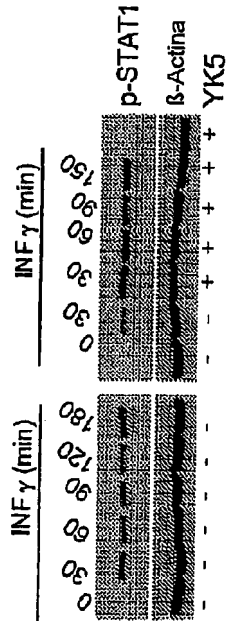


Figura 18f

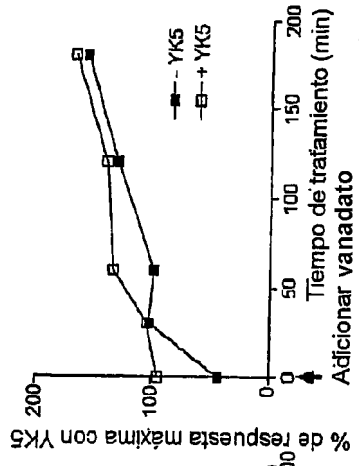
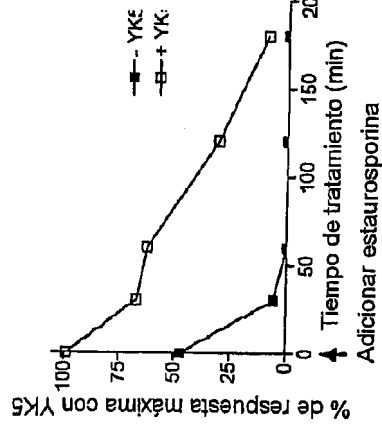
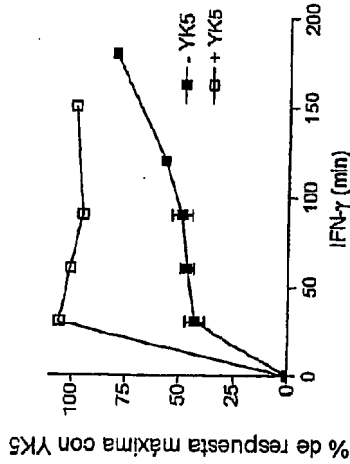
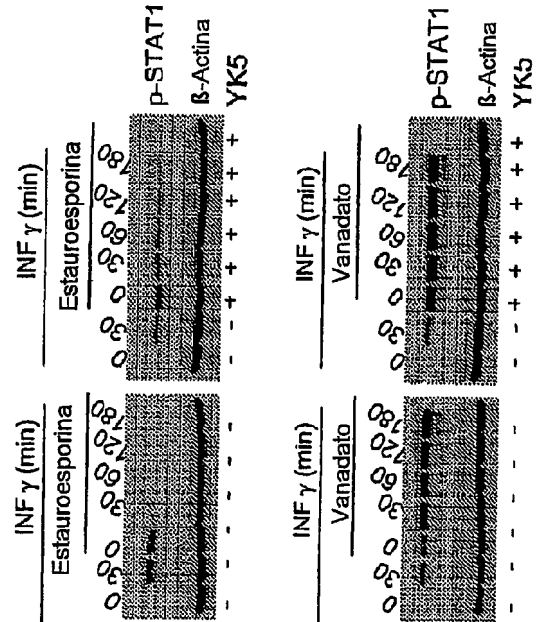


Figura 19a

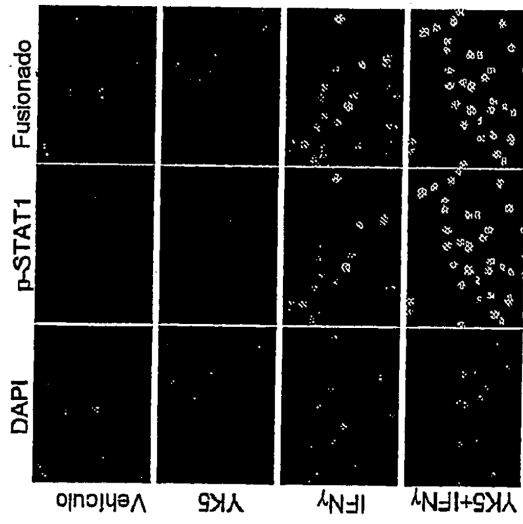


Figura 19b

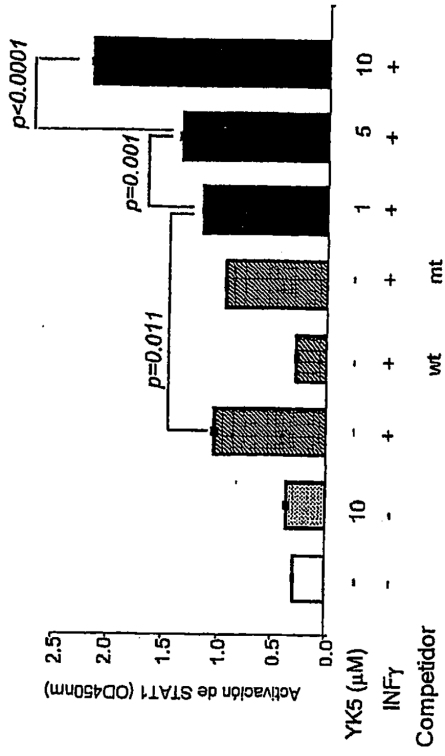


Figura 20a

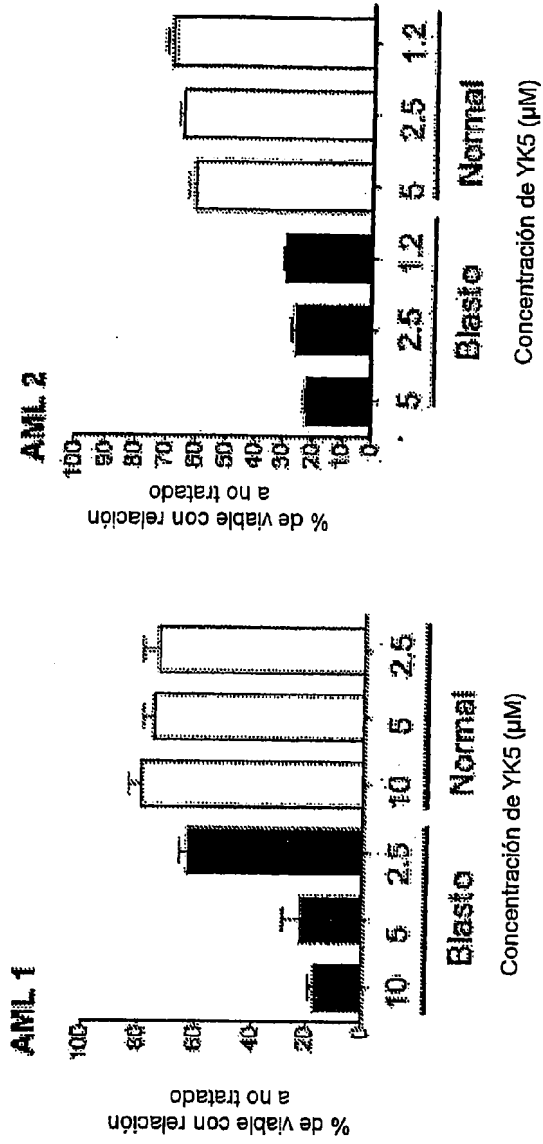


Figura 20b

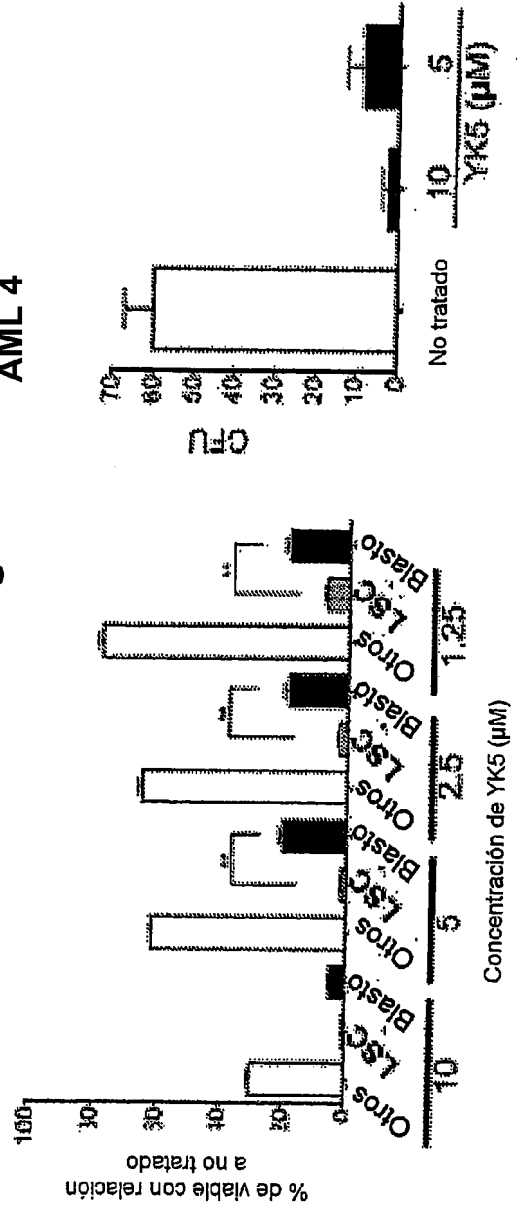


Figura 20c

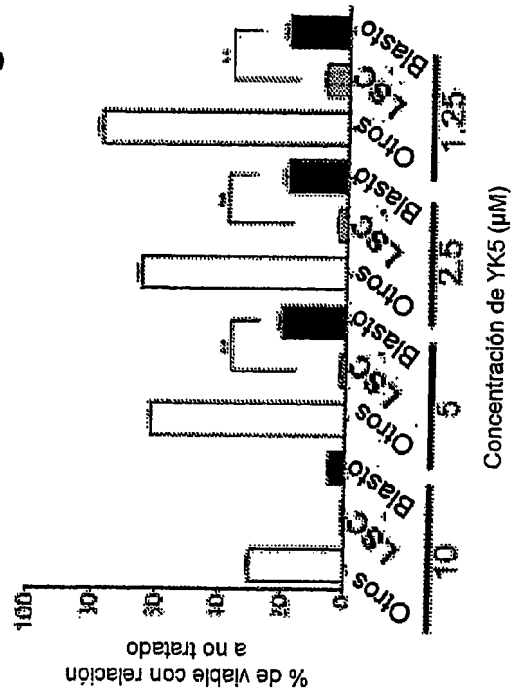


Figura 21

```

P08167 1 MAKAAA.....IGHDLGTTIYQVSYFQCHSNVLIANDQGNWZTSPFAFDZT.ERLLIGRAHAKVYVLI...YVFDAAK
1S3K_A 1 makaaa.....IGHDLGTTIYQVSYFQCHSERVEIISDQGNWZTSPFAFDZT.ERLLIGRAHAKVYVLI...YVFDAAK
2P32_A 1 mgseshhhhshs.
2KH0_A 1 mgk.....IGHDLGTRNSCTVAINGSETFVLEKRGKXWESI.EAYQDSRTVYQDPRARAVYTRFYMTEFAIKK
-----
P08167 73 LIGKFGDZVVSSEKUMPEVINDS.DKPKVVSIGETELFYDEIISSEVLEWAKIAPALYLSYVUNNAVIVVAALFV
1S3K_A 73 LIGKFGDZVVSSEKUMPEVINDS.DKPKVVSIGETELFYDEIISSEVLEWAKIAPALYLSYVUNNAVIVVAALFV
2P32_A 13 .....
2KH0_A 72 LIGKFGDZVVSNGIEMPTIIAARGDARVWK...GCKGASDQIIEKPVLSKXZAKELIGETFEAVLYVZAYFV
-----
P08167 152 DSKQKMTDAGVIMAGVAVLIINPTAAALANGKAKKCKEHWVATLGGGTFYYSILITING....IFVWVATAGDZV
1S3K_A 152 DSKQKMTDAGVIMAGVAVLIINPTAAALANGKAKKCKEHWVATLGGGTFYYSILITING....IFVWVATAGDZV
2P32_A 13 .....
2KH0_A 148 DQKQKMTDAGKTAGLEVRKLIEMPTAALASIKRSTG.NETIATVHLGGGTFYYSILITING....IFVWVATAGDZV
-----
P08167 228 LGGEDIRKMLIHEVETXRNKNDIISOMKREKRALETRCPKPAFTLSSSTASLEIIDSLES....IDFTSITWRRER
1S3K_A 228 LGGEDIRKMLIHEVETXRNKNDIISOMKREKRALETRCPKPAFTLSSSTASLEIIDSLES....IDFTSITWRRER
2P32_A 13 .....
2KH0_A 227 LGGEDIRKMLIHEVETXRNKNDIISOMKREKRALETRCPKPAFTLSSSTASLEIIDSLES....IDFTSITWRRER
-----
P88167 304 ELCSDLFSSTLEPVEKALDARLKACIEHLKVGSTALXV*LLQDPTKCDZAKSIWZBVAVAGAVV*ALIMGD
1S3K_A 304 ELCSDLFSSTLEPVEKALDARLKACIEHLKVGSTALXV*LLQDPTKCDZAKSIWZBVAVAGAVV*ALIMGD
2P32_A 13 .....
2KH0_A 387 SILVERIVRRSIEKZVALQDGLSVSHIR*LVGSGTWHENV*XYLEFGC.KEPKRDV#KRAVAGAVV*GCVLIGG
-----
P08167 384 KSEFYQPLAHLVZSESISSETRASGVYALIKRNNSEIFTKGQIFITFYDNRFSVLIQVYEGERMTKNNKLLSEFELSG
1S3K_A .....
2P32_A 13 .....
2KH0_A 386 ...YKUTLHLVTELELGEIFRMSGVYTLKAKETIPHEFSOVGTARMSAVLHVLQGERKAAINKSLGSENLDC
-----
P08167 464 IPPAERGTPQIVETFDIDANNILNVTATUKSECKANKIHITMKVZRLSFEIEMAKJELKIZARBEYQERVSELRNLIK
1S3K_A .....
2P32_A 13 .....
2KH0_A 462 INPAPRMPDIEVTEQIEMAGILHVAZDKSSGHEKTIKASSE.LKEDFCRATVADKAMPEDRDELYCTRNQGD
-----
P08167 544 SYRTNKSAYDEDEKKGKIGEDVAKKVLKDKDEVISWLDANTLAKADEE.KMKRQSLQVCPPIISLQYQAGSGPQGGF
1S3K_A .....
2P32_A .....
2KH0_A 541 HLLDSTRANVZE...RSDPLIEADPTALIZSALVLETRAK...GKDELLIHNKQHLQVTS.QKHEIIRKQI
-----
P08167 623 GACCFKSSSSSGTHLEVD
1S3K_A .....
2P32_A .....
2KH0_A 102 aapggaaaggaagpctiaevs

```