

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 242**

51 Int. Cl.:

**C07D 417/12** (2006.01)

**C07D 417/14** (2006.01)

**A61K 31/427** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.09.2012 PCT/US2012/057445**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.04.2013 WO2013049279**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2012 E 12836986 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2760860**

54 Título: **Derivados de mostaza de nitrógeno**

30 Prioridad:

**28.09.2011 US 201161540523 P**

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

**12.06.2017**

73 Titular/es:

**EURO-CELTIQUE S.A. (100.0%)  
1, rue Jean Piret  
2350 Luxembourg, LU**

72 Inventor/es:

**CHEN, YU y  
CHEN, YI**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 616 242 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).

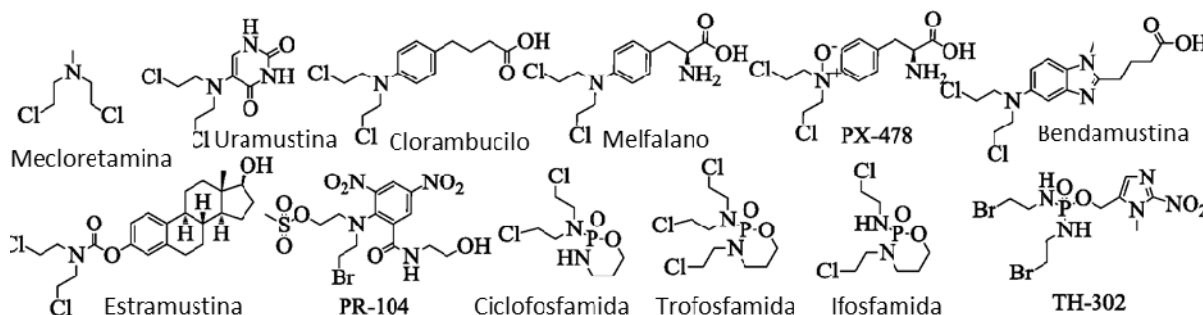
## DESCRIPCIÓN

Derivados de mostaza de nitrógeno

**Antecedentes**

5 El cáncer es una de las enfermedades que suponen mayor amenaza para la vida en el que las células de una parte del cuerpo experimentan un crecimiento fuera de control. De acuerdo con los últimos datos de la American Cancer Society, el cáncer es la segunda causa que conduce a muerte en los Estados Unidos (en segundo lugar, solamente tras las enfermedades cardíacas) y se cobró más de 550.000 vidas en 2009. De hecho, se estima que el 50 % de todos los hombres y el 33 % de todas las mujeres que viven en los Estados Unidos desarrollarán algún tipo de cáncer a lo largo de su vida. Por tanto, el cáncer constituye una carga principal para la salud pública y representa un coste significativo en los Estados Unidos. Durante décadas, la cirugía, la quimioterapia, y la radiación fueron los tratamientos establecidos para diversos cánceres. Los pacientes reciben usualmente una combinación de estos tratamientos dependiendo del tipo y la extensión de su enfermedad. Pero la quimioterapia es la opción más importante para el paciente de cáncer cuando el tratamiento quirúrgico es imposible.

15 Las mostazas de nitrógeno, un tipo clásico de agentes alquilantes del ADN fueron de los primeros agentes quimioterapéuticos aplicados racionalmente al tratamiento de cáncer. La mecloretamina, un análogo del gas mostaza y derivado de la investigación y desarrollo de armas químicas durante la Segunda Guerra Mundial, se ha utilizado en la quimioterapia contra el cáncer durante 60 años. Las mostazas de nitrógeno ejercen generalmente su actividad citotóxica formando aductos de ADN o retrocruzamientos entre las hebras de ADN en las condiciones presentes en las células, interfiriendo directamente con el ciclo reproductivo de la célula. Se indican a continuación las estructuras de algunas mostazas de nitrógeno bien conocidas.



25 Melfalano es una mostaza de nitrógeno alquilante del ADN bien conocida homologada para el tratamiento del mieloma múltiple (Musto P, et al, Expert Opin Investig Drugs. 2007, 16(9):1467-87). Melfalano, en combinación con prednisona (MP) se ha utilizado como tratamiento normalizado de primera línea durante décadas para pacientes de mieloma múltiple en la tercera edad no aptos para el trasplante de citoblastos autólogos. Actualmente, MP sigue siendo la columna vertebral de nuevos regímenes quimioterapéuticos de primera línea con MM tales como MP-talidomida (MPT), MP-lenalidomida (MPR) y MP-bortezomib (MPV). Asimismo, el uso de melfalano solo como régimen de acondicionamiento para el trasplante de citoblastos autólogos se considera una "asistencia sanitaria habitual" para el tratamiento de mieloma múltiple. En cuanto a hoy, melfalano participa en 196 ensayos clínicos activos para una variedad de indicaciones de cáncer, tal como el mieloma múltiple, leucemia, linfoma, MDS, cáncer de ovario, cáncer de mama, y tumor cerebral, etc.

35 Bendamustina, sintetizada en primer lugar en 1963, consiste en un resto de mostaza de nitrógeno alquilante y un resto de bencimidazol similar a purina con un efecto sugerido análogo a purina (Barman Balfour JA, et al, Drugs 2001; 61: 631-640). Bendamustina ha mostrado tener una actividad sustancial contra linfomas de grado bajo (Herold M, et al., Blood, 1999; 94, Supl 1: 262a), mielomas múltiples (Poensch W, et al., Blood 2000; 96, Supl 1: 759a), y algunos tumores sólidos (Kollmannsberger C, et al., Anticancer Drugs 2000; 11: 535-539). Se notificó también que bendamustina induce eficazmente la apoptosis en células de linfoma (Chow KU, et al., Haematologica, 2001; 86: 485-493). En marzo de 2008, la FDA concedió la autorización para comercializar bendamustina para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (LLC). En octubre de 2008, la FDA concedió la autorización adicional para comercializar bendamustina para el tratamiento de linfoma no de Hodgkin (NHL) de linfocitos B indolentes que ha progresado durante o en seis meses de tratamiento con rituximab o un régimen que contiene rituximab. Actualmente, bendamustina está en ensayos clínicos para una variedad de indicaciones de cáncer, tal como leucemia, linfoma, cáncer de pulmón microcítico, mieloma múltiple, MDS, cáncer de ovario, cáncer de mama, y tumor cerebral.

45 La mostaza de nitrógeno ciclofosfamida sigue siendo uno de los fármacos más satisfactorios y ampliamente utilizados en el tratamiento moderno del cáncer (Emadi A, et al, Nat Rev Clin Oncol. Nov 2009; 6(11):638-47). La ciclofosfamida es un profármaco inactivo que requiere activación enzimática y química y la mostaza de nitrógeno resultante produce retrocruzamientos del ADN intercatenarios e intracatenarios que representan sus propiedades citotóxicas. Los

regímenes de quimioterapia basados en ciclofosfamida tales como FCR, FCE, AC, y R-CHOP siguen siendo la piedra angular de la primera línea de tratamiento para el cáncer de mama, linfoma, LLC, cáncer de ovario, y sarcomas de tejidos blandos.

5 Aunque las mostazas de nitrógeno alquilantes del ADN convencionales han hecho una contribución significativa al tratamiento del cáncer, tienen importantes limitaciones. Como los inventores saben, las mostazas de nitrógeno alquilantes del ADN convencionales dañarán el ADN y a continuación se activará la ruta de respuesta al daño del ADN celular para detener la progresión del ciclo celular, inducir la apoptosis, y reparar el daño del ADN. No obstante, las células cancerosas tratadas con las mostazas de nitrógeno convencionales pueden escapar fácilmente de la detención del ciclo celular y la apoptosis, y pueden reparar eficazmente el daño del ADN, conduciendo a un rápido desarrollo de resistencia al fármaco y a un fracaso del tratamiento. Por lo tanto, es urgente investigar continuamente en este campo de la técnica para la nueva generación de mostazas de nitrógeno con actividades anticancerosas significativamente mejoradas.

15 En los últimos años, las quinasas dependientes de ciclina (CDK) han emergido recientemente como una diana importante de la enfermedad para el tratamiento del cáncer (Marcos Malumbres et al, Nat Rev Cancer. marzo de 2009;9(3):153-66; Silvia Lapenna, et al, Nat Rev Drug Discovery, julio de 2009; 8(7):547-66). Las CDK son una familia de las serina/treonina quinasas que regulan procesos celulares clave que incluyen la progresión del ciclo celular y la transcripción del ARN (Shapiro Gl. J Clin Oncol. 10 de abril de 2006; 24(11): 1770-83). Las CDK heterodimerizadas con unidades de ciclina reguladoras, pueden dividirse generalmente en dos grupos basándose en sus funciones. El primer grupo consiste en componentes fundamentales del ciclo celular y controlan la transición del ciclo celular y la división celular: quinasas 4/6 dependientes de la ciclina D y quinasas 2 dependiente de la ciclina E, que controlan la transición G1->S; quinasas 1/2 dependientes de la ciclina A un regulador crítico de la progresión de la fase S; CDK1 dependiente de ciclina B, requerida para la transición G2->M y ciclina H/CDK7, la quinasas activadora de CDK. El segundo grupo, denominado también CDK transcripcionales, incluye la ciclina H/CDK7 y la ciclina T/CDK9 que fosforila el dominio del extremo C (CTD) de la ARN polimerasa II y promueve el inicio y el alargamiento de la transcripción.

20 La desregulación de la actividad de CDK se detecta en virtualmente todas las formas de cáncer humano, debido más frecuentemente a la expresión en exceso de las ciclinas y a la pérdida de expresión de los inhibidores de CDK (de Caree G et al, Curr Med Chem. 2007; 14(9):969- 85). La inhibición de CDK4/6 ha mostrado inducir una potente detención de G1 in vitro y la regresión del tumor in vivo (Lukas J et al., Nature. 8 de junio de 1995; 375(6531):503-6. Schreiber M et al., Oncogene. 4 de marzo de 1999; 18(9):1663-76; Fry DW et al., Mol Cancer Ther. Noviembre de 2004;3(11); 1427-38). Se han notificado diversas soluciones destinadas a dirigirse a CDK2/1 para inducir S y G2 seguido por apoptosis (Chen YN et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 13 de abril de 1999; 96(8):4325-9); Chen W et al., Cancer Res. 1 de junio de 2004; 64(11):3949-57. Mendoza N et al., Cancer Res. 1 de marzo 2003; 63(5):1020-4). La inhibición de las CDK 7 y 9 transcripcionales puede influir sobre la acumulación de transcritos que codifican los miembros de la familia antiapoptosis, reguladores del ciclo celular, así como las dianas génicas sensibles a p53 y NF-KB (Lam LT et al., Genome Biol. 2001; 2(10):RESEARCH0041). Todos estos efectos contribuyen a la inducción de la apoptosis y también a la potenciación de la citotoxicidad mediada por la perturbación de una variedad de rutas en muchos tipos de células cancerosas (Chen R et al., Blood. 1 octubre de 2005;106(7):2513-9; Pepper C et al. Leuk Lymphoma. Feb de 2003; 44(2):337-42. Las CDK se reconocen por tanto como una diana atractiva para el diseño y desarrollo de compuestos que se pueden unir específicamente e inhibir la actividad quinasas dependiente de ciclina y su ruta de transducción de la señal en células cancerosas, y de esta manera pueden servir como agentes terapéuticos. En la actualidad existe una lista de inhibidores de CDK, (por ejemplo, AT-7519, AZD5438, flavopiridol, P1446A-05, P276-00, CYC202, SCH727965, BAY 1000394, LEE011, etc.) actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer.

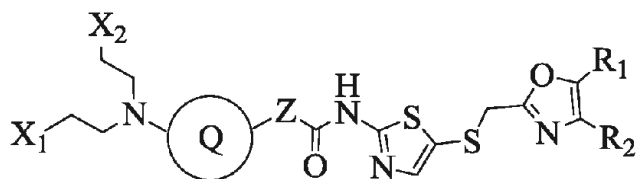
45 En el documento WO 95/30442 se describen compuestos heterobifuncionales adecuados para destruir células seleccionadas en una población celular heterogénea.

Se describen inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas en el documento US 6214852

### **Sumario**

50 La presente invención se refiere a una novedosa clase de derivados inhibidores de CDK de las mostazas de nitrógeno alquilantes del ADN convencionales. Más específicamente, la presente invención se refiere a una novedosa clase de mostazas de nitrógeno/inhibidores de CDK alquilantes del ADN de doble función diseñadas racionalmente en las que un farmacóforo funcionalmente capaz de inhibir CDK se une covalentemente al farmacóforo de la mostaza de nitrógeno. Atacando las células cancerosas desde dos direcciones distintas simultáneamente (inhibición de CDK y alquilación del ADN), la molécula individual con doble función puede mejorar la eficacia del fármaco de las mostazas de nitrógeno alquilantes del ADN convencionales y evitar la emergencia de resistencia al fármaco sin aumentar las toxicidades limitantes de la dosis. Así, los compuestos de la presente invención pueden ser útiles en el tratamiento de un paciente que tiene un tumor. Los compuestos de la invención pueden ser también útiles en la prevención y el tratamiento de una enfermedad inmunitaria.

En un aspecto, esta invención se refiere a los compuestos de Fórmula (1):

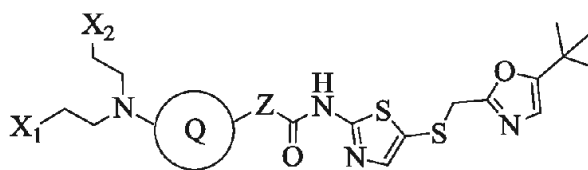


Fórmula (1).

En la Fórmula (1), cada uno de  $X_1$  y  $X_2$  independientemente, es halo u  $OSO_2R_a$ , en la que  $R_a$  es alquilo alquenilo o alquinilo;

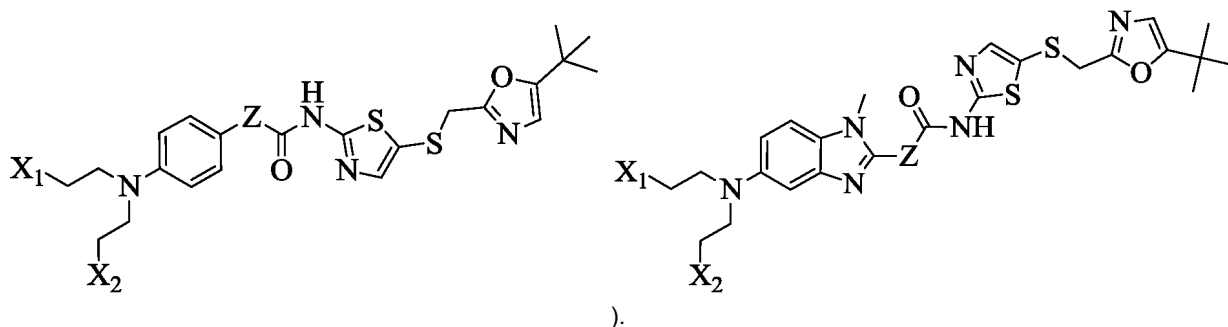
- 5 Q es cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquenilo, heterocicloalquenilo, arilo o heteroarilo, cada uno de los cuales independientemente, está opcionalmente sustituido con alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquenilo, heterocicloalquenilo, arilo, heteroarilo, halo, nitro, oxo,  $-CH=NH$ , ciano, alquil- $R_b$ ,  $CH=NOR_b$ ,  $OR_b$ ,  $OC(O)R_b$ ,  $OC(O)OR_b$ ,  $OC(O)SR_b$ ,  $SR_b$ ,  $C(O)R_b$ ,  $C(O)OR_b$ ,  $C(O)SR_b$ ,  $C(O)NR_cR_d$ ,  $SOR_b$ ,  $SO_2R_b$ ,  $NR_cR_d$ , alquil- $NR_cR_d$  o  $N(R_c)C(O)R_d$ , en los que cada uno de  $R_b$ ,  $R_c$  y  $R_d$ , independientemente, es H, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, halo, ciano, nitro, amino, hidroxilo, alquilamino, haloalquilo o alcoxi; Z se elimina o es  $(CH_2)_m$ , en el que m es un número entero de 1 a 10; y cada uno de  $R_1$  y  $R_2$  independientemente, es H, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquenilo, heterocicloalquenilo, arilo, heteroarilo, halo, nitro, oxo,  $-CH=NH$ , ciano, alquil- $R_b$ ,  $CH=NOR_b$ ,  $OR_b$ ,  $OC(O)R_b$ ,  $OC(O)OR_b$ ,  $OC(O)SR_b$ ,  $SR_b$ ,  $C(O)R_b$ ,  $C(O)OR_b$ ,  $C(O)SR_b$ ,  $C(O)NR_cR_d$ ,  $SOR_b$ ,  $SO_2R_b$ ,  $NR_cR_d$ , alquil- $NR_cR_d$  o  $N(R_c)C(O)R_d$ , en los que dichos grupos cicloalquilo, cicloalquenilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquenilo, arilo, heteroarilo, alquilo, alquenilo y alquinilo son como se definen en la reivindicación 1.

Un subconjunto de los compuestos con Fórmula (1) incluye aquellos en los que  $R_1$  es H, alquilo, alquenilo o alquinilo y  $R_2$  es H. Un subconjunto adicional de estos compuestos representados por la Fórmula (2):



(Fórmula 2)

- 20 Un subconjunto de los compuestos de Fórmula (2) incluye aquellos en los que Q es un arilo o heteroarilo. En estos compuestos, Q puede ser un arilo o heteroarilo de 5-6 miembros (por ejemplo,



- 25 Los compuestos de la invención pueden contener uno o más átomos de carbono asimétricos. Por consiguiente, los compuestos pueden existir en forma de diastereómeros, enantiómeros o mezclas de los mismos. Cada de los átomos de carbono asimétricos puede estar en la configuración R o S y ambas de estas configuraciones están dentro del alcance de la invención.

- 30 Los compuestos descritos anteriormente incluyen los compuestos en sí mismos, así como sus sales y sus solvatos, si fuera aplicable. Una sal, por ejemplo, puede formarse entre un anión y un grupo cargado positivamente (por ejemplo, amino) en un compuesto de la presente invención. Los aniones adecuados incluyen cloruro, bromuro yoduro, sulfato, bisulfato, sulfamato, nitrato, fosfato, citrato, metanosulfonato, trifluoroacetato, glutamato, glucuronato, glutarato, malato, maleato, succinato, fumarato, tartrato, tosilato, salicilato, lactato, naftalenosulfonato y acetato. De forma análoga, una sal también puede formarse entre un catión y un grupo cargado negativamente (por ejemplo, carboxilato) en un compuesto de la presente invención. Los cationes adecuados incluyen ion de sodio, ion de potasio, ion de

magnesio, ion de calcio un catión de amonio, tal como ion de tetrametilamonio. Los compuestos de esta invención también incluyen aquellas sales que contienen átomos de nitrógeno cuaternarios.

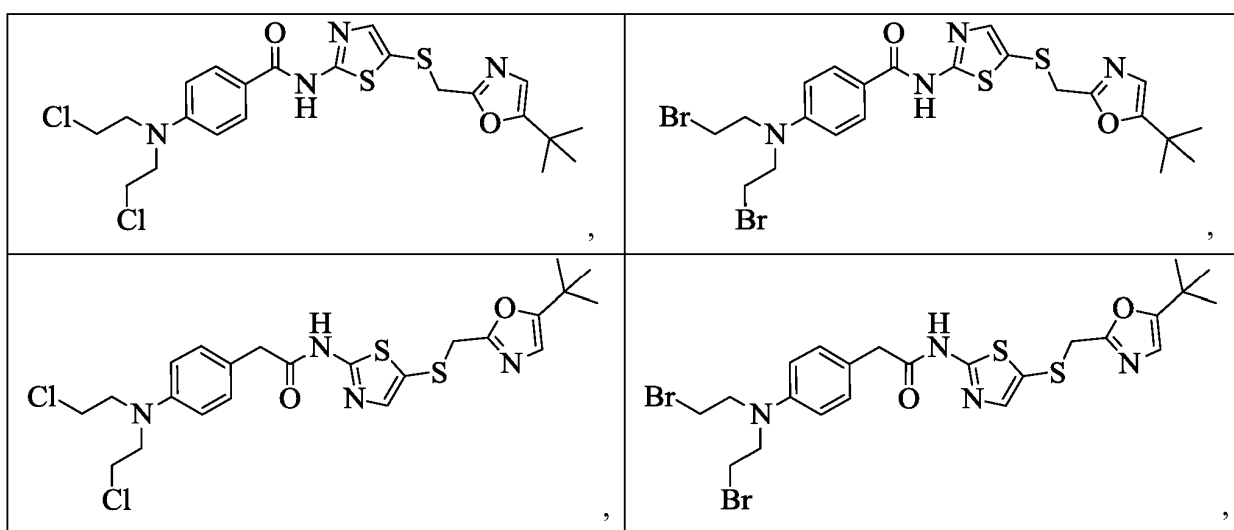
5 También dentro del alcance de esta invención está una composición farmacéutica que contiene uno o más de los compuestos descritos anteriormente para su uso en el tratamiento o prevención de un trastorno neoplásico o inmune, así como este uso terapéutico y uso de los compuestos para la preparación de un medicamento para tratar el trastorno.

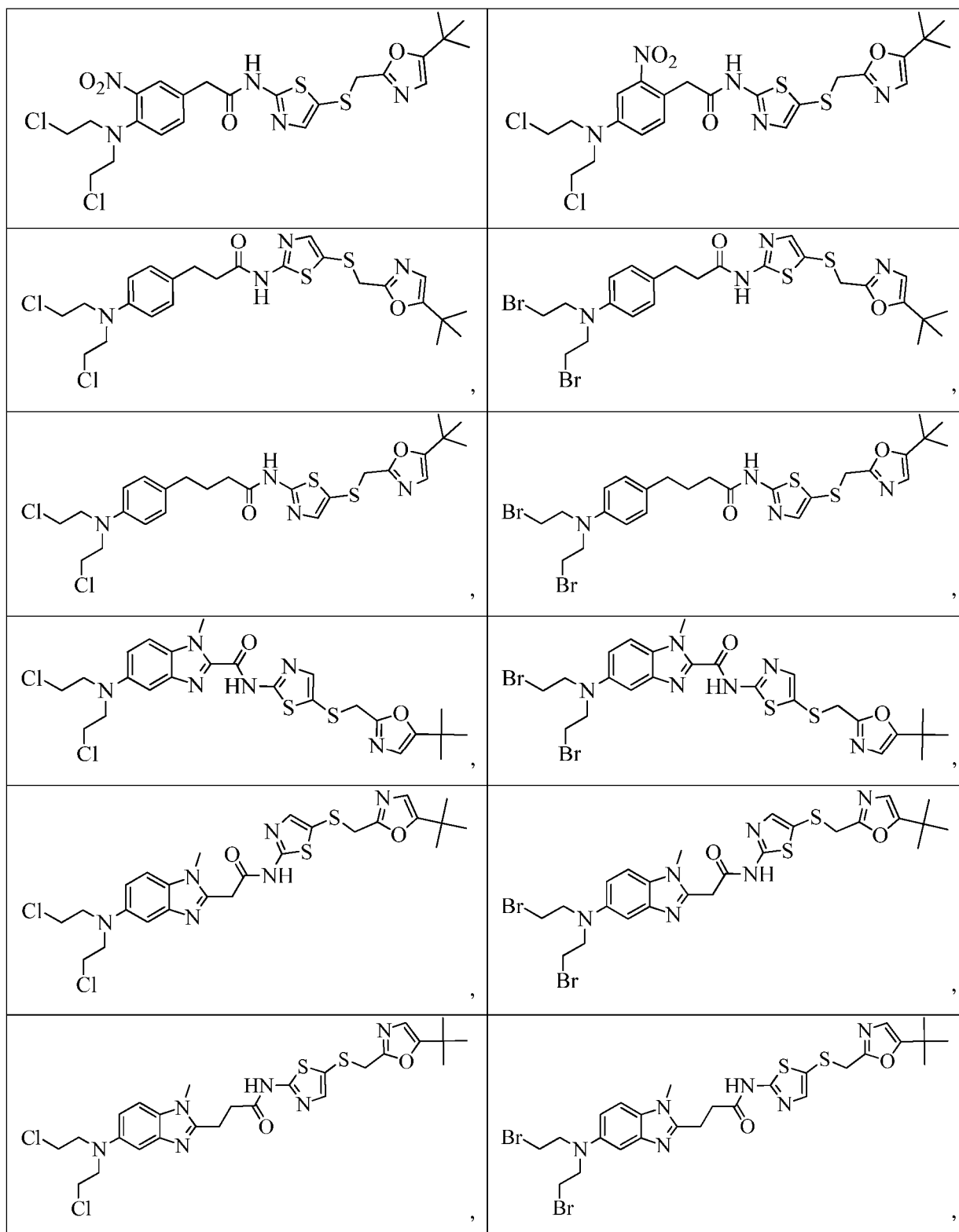
También se contempla un compuesto modificado de uno cualquiera de los compuestos descritos anteriormente, incluyendo una modificación que tiene una solubilidad, estabilidad y/o biodisponibilidad farmacéuticas mejoradas (por ejemplo, potenciada, superior) en comparación con el compuesto sin modificar.

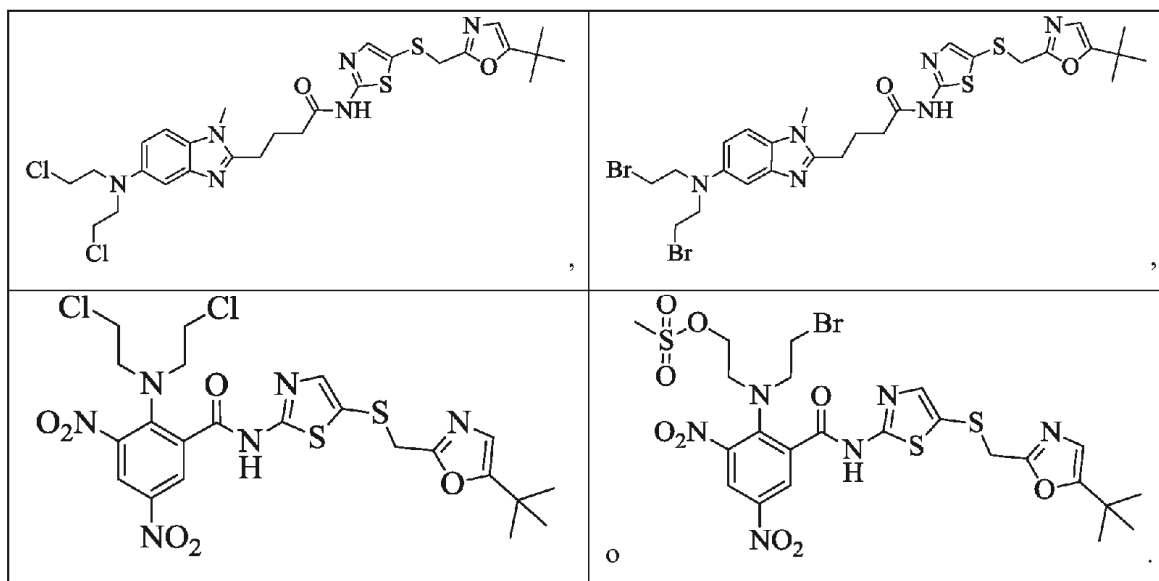
10 Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen más adelante en la descripción. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y de las reivindicaciones.

**Descripción detallada**

Los compuestos ejemplares descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, los siguientes:







Los compuestos de la invención pueden contener uno o más átomos de carbono asimétricos. Por consiguiente, los compuestos pueden existir en forma de diastereómeros, enantiómeros o mezclas de los mismos. Las síntesis de los compuestos pueden emplear racematos, diastereómeros o enantiómeros como materiales de partida o como intermediarios. Los compuestos diastereoméricos pueden separarse por procedimientos cromatográficos o de cristalización. De forma análoga, pueden separarse mezclas racémicas usando las mismas técnicas u otras conocidas en la técnica. Cada uno de los átomos de carbono asimétricos puede estar en la configuración R o S y ambas de estas configuraciones están dentro del alcance de la invención.

Debe reconocerse que los compuestos de la presente invención pueden estar presentes y opcionalmente administrarse en forma de sales, solvatos y profármacos que se convierten *in vivo* en los compuestos de la presente invención. Por ejemplo, está dentro del alcance de la presente invención convertir los compuestos de la presente invención y usarlos en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables obtenidas a partir de diversos ácidos y bases orgánicas e inorgánicas de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica.

La invención abarca además composiciones farmacéuticas que comprenden cualquier forma física sólida o líquida del compuesto de la invención. Por ejemplo, los compuestos pueden estar en una forma cristalina, en una forma amarga, y pueden tener cualquier tamaño de partícula. Las partículas pueden micronizarse, o pueden ser aglomerados, gránulos particulados, polvos, aceites, suspensiones oleosas o cualquier otra forma física sólida o líquida.

Cuando el compuesto de acuerdo con la presente invención presenta insolubilidad insuficiente, se pueden usar métodos para solubilizar los compuestos. Dichos métodos son conocidos por los expertos en la materia, e incluyen, pero no de forma limitativa, ajuste del pH y formación de sales, utilización de cosolventes, tales como etanol, propilenglicol, polietilenglicol (PEG) 300, PEG 400, DMA (10-30 %), DMSO (10-20 %), NMP (10-20 %), uso de tensoactivos, tales como polisorbato 80, polisorbato 20 (1-10 %), cremophor EL, Cremophor RH40, Cremophor RH60 (5-10 %), Pluronic F68/Poloxámero 188 (20-50 %), Solutol HS15 (20-50 %), Vitamina E TPGS, y succinato de d- $\alpha$ -tocoferilo PEG 1000 (20-50 %), usando complejación tal como HP $\beta$ CD y SBE $\beta$ CD (10-40 %), y usando soluciones avanzadas tales como micelas, adición de polímero, suspensiones de nanopartículas, y formación de liposomas.

Se pueden utilizar una amplia variedad de composiciones junto con los compuestos de la presente invención. Dichas composiciones pueden incluir, además de los compuestos de la presente invención, excipientes farmacéuticos, y otros agentes convencionales, farmacéuticamente inactivos. Además, las composiciones pueden incluir agentes activos además de los compuestos de la presente invención. Estos agentes activos adicionales pueden incluir compuestos adicionales de acuerdo con la invención, o uno o más de diferentes agentes farmacéuticamente activos.

Adicionalmente, las composiciones de la presente invención pueden estar en la forma de formulaciones de liberación controlada o liberación inmediata.

Se pueden usar una amplia variedad de métodos de administración junto con los compuestos de la presente invención. Las composiciones que comprenden los compuestos de la presente invención pueden administrarse o administrarse simultáneamente por vía oral, parenteral, intraperitoneal, vía intravenosa, intraarterial, transdérmica, sublingual, intramuscular, rectal, transbucal, intranasal, liposomal, mediante inhalación, vaginal, intraocular, mediante administración local (por ejemplo, mediante un catéter o endoprótesis), subcutánea, intraadiposa, intraarticular, o intratecal. Los compuestos y/o composiciones de acuerdo con la invención también pueden administrarse o administrarse simultáneamente en formas farmacéuticas de liberación lenta. Las composiciones pueden estar en forma gaseosa, líquida, semilíquida o sólida, formuladas de una manera adecuada para la ruta de administración que se va a usar. Para administración oral, las formulaciones orales sólidas adecuadas incluyen comprimidos, cápsulas,

píldoras, gránulos, aglomerados, sobrecillos y comprimidos efervescentes, polvos, y similares. las formulaciones orales líquidas adecuadas incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y similares. Para administración parenteral, se utiliza normalmente la reconstitución de un polvo liofilizado.

5 "Tratamiento combinado" incluye la administración de los compuestos sujeto en combinación adicional con otros ingredientes biológicamente activos (tales como, pero no de forma limitativa, un segundo y diferente agente antineoplásico) y tratamientos sin fármaco (tales como, pero no de forma limitativa, cirugía o radioterapia). Por ejemplo, se pueden utilizar los compuestos de la invención en combinación con otros compuestos farmacéuticamente activos, preferentemente compuestos que sean capaces de potenciar el efecto de los compuestos de la invención. Se pueden administrar simultáneamente los compuestos de la invención (como una preparación única o una preparación independiente) o de forma secuencial al otro tratamiento con fármacos. En general, un tratamiento combinado abarca la administración de dos o más fármacos durante un ciclo individual o pauta de tratamiento.

15 En determinadas realizaciones preferidas, los compuestos de la invención se administran en combinación con un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos abarcan una amplia gama de tratamientos terapéuticos en el campo de la oncología. Estos agentes se administran en diversos estadios de la enfermedad para reducir los tumores, destruyendo las células cancerosas restantes que han quedado después de la cirugía, induciendo la remisión, manteniendo la remisión y aliviando los síntomas relacionados con el cáncer o su tratamiento. Los ejemplos de dichos agentes incluyen, pero no de forma limitativa, agentes alquilantes tales como derivados de gas mostaza (mecloretamina, ciclofosfamida clorambucilo, melfalano, trofosfamida), etileniminas (tiotepa, hexametilmelanina), alquilsulfonatos (busulfano), hidrazinas y triazinas (altretamina, procarbazona, dacarbazina y temozolomida), nitrosureas (carmustina, lomustina y estreptozocina), ifosfamida y sales metálicas (carboplatino, cisplatino, y oxaliplatino); alcaloides vegetales tales como podofilotoxinas (etopósido y tenipósido), taxanos (paclitaxel y docetaxel), alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina y vinorelbina); antibióticos antitumorales tales cromomicinas (dactinomomicina y plicamicina), antraciclinas (doxorubicina, daunorrubicina, epirubicina, mitoxantrona, e idarrubicina), y mezcla de antibióticos tales como mitomicina y bleomicina; antimetabolitos tales como antagonistas del ácido fólico (metotrexato), antagonistas de la pirimidina (5-fluorouracilo, fexuridina, citarabina, capecitabina, y gemcitabina), antagonistas de purina (6-mercaptopurina y 6-tioguanina) fludarabina, nelarabina y pentostatina; inhibidores de la topoisomerasa tales como inhibidores de la topoisomerasa I (irinotecán, topotecán) e inhibidores de la topoisomerasa II (amsacrina, etopósido, fosfato de etopósido, tenipósido); anticuerpos monoclonales (alemtuzumab, ozogamicina de gemtuzumab, rituximab, trastuzumab, lbrutumomab Tioxetan); y mezclas de antineoplásicos tales como inhibidores de la ribonucleótido reductasa (hidroxiurea); inhibidores de los esteroides adrenocorticales (mitotano); enzimas (asparaginasa y pegaspargasa); y agentes antimicrotúbulos (estramustina); y retinoides (bexaroteno, isotretinoína, tretinoína (ATRA)).

35 En determinadas realizaciones preferidas, los compuestos de la invención se administran en combinación con un agente anticanceroso dirigido. Los agentes anticancerosos dirigidos abarcan una amplia gama de tratamientos terapéuticos en el campo de la oncología. Los ejemplos de dichos agentes incluyen, pero no de forma limitativa, los compuestos funcionalmente capaces de inhibir la actividad de la tirosina quinasa, serina/treonina quinasa, ADN metil transferasas (DNMT), proteosomas y las proteínas de choque térmico (HSP), receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK/MEK), quinasa dependientes de ciclinas (CDK), histona desacetilasas (HDAC), y la diana de mamífero fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato-AKT de la ruta de la rapamicina [P13K-AKT (RAF, mTOR)], metaloproteinasas de matriz, farnesil transferasas, y la apoptosis.

45 En determinadas realizaciones preferidas, los compuestos de la invención se administran en combinación con un agente quimio protector, agentes inmunoterapéuticos, vacunas, o anticuerpos. Los agentes quimio protectores actúan para proteger el cuerpo o minimizar los efectos secundarios de la quimioterapia. Los ejemplos de dichos agentes incluyen, pero no de forma limitativa, amfostina, mesna, y dexrazoxano.

50 En determinadas realizaciones preferidas, los compuestos sujeto se administran en combinación con radioterapia. La radiación se administra normalmente internamente (implante de material radioactivo próximo al sitio del cáncer) o externamente desde una máquina que emplea fotones (rayos x o rayos gamma) o radiación de partículas. Cuando el tratamiento combinado comprende además radioterapia, la radioterapia puede llevarse a cabo en cualquier momento adecuado siempre que se consiga un efecto beneficioso de la acción simultánea de la combinación de los agentes terapéuticos y de radioterapia. Por ejemplo, en los casos adecuados, el efecto beneficioso se consigue además cuando se elimina temporalmente la radioterapia de la administración de los agentes terapéuticos, quizá en días o incluso semanas.

55 La invención se refiere además a una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno neoplásico en un mamífero que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto representado por la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable, un hidrato, un solvato, un profármaco, un metabolito activo, un enantiómero correspondiente, un racemato correspondiente, o uno de sus diastereómeros correspondientes.

60 En una realización preferida, en la que dicha enfermedad neoplásica se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer del sistema nervioso central, cáncer de próstata, cáncer de testículo, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de estómago, carcinoma del tracto biliar,



cáncer de esófago, tumor estromal gastrointestinal, cáncer de mama, cáncer de cuello de útero, cáncer de ovario, cáncer de útero, leucemia, linfomas, mieloma múltiple, melanoma, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, cáncer de vejiga, cáncer renal, sarcoma, mesotelioma, timoma, síndrome mielodisplásico y enfermedad mieloproliferativa.

- 5 Se sabe bien que la inmunosupresión es uno de los efectos secundarios principales de los agentes quimioterapéuticos convencionales tales como la mostaza de nitrógeno. A dosis bajas, el agente quimioterapéutico se puede usar para tratar enfermedades inmunitarias tales como esclerosis múltiple, artritis reumatoide y la supresión de rechazos a trasplantes. Por ejemplo, la mostaza de nitrógeno ciclofosfamida es un agente inmunosupresor muy potente (Emadi A, et al, Nat Rev Clin Oncol. noviembre de 2009; 6(11):638-47; Perini P, et al. Neurol Sci. Septiembre de 2008; 29 Supl 2:S233-4) y se ha usado también ampliamente en los regímenes de "acondicionamiento" y "movilización" en el trasplante de médula ósea, y para el tratamiento de las dolencias autoinmunitarias graves resistentes al tratamiento, tales como lupus sistémico eritematoso (LSE), enfermedad de cambios mínimos, artritis reumatoide grave, granulomatosis de Wegener (con nombre comercial Cytoxan) escleroderma, y esclerosis múltiple (con nombre comercial Revimmune) Asimismo, los inhibidores de CDK están emergiendo como una nueva clase de agente inmunosupresor. Por ejemplo, se ha descubierto que la actividad de CDK puede ser una diana útil en el tratamiento del lupus sistémico eritematoso. (Zoja C, et al. Arthritis Rheum. mayo de 2007; 56(5):1629-37). Una acción inmunomoduladora directa del inhibidor de CDK selecciclib sobre linfocitos T y linfocitos B puede ser uno de los mecanismos sobre los que subyacen los efectos beneficiosos. En otro artículo (Sekine C et al, J Immunol. 1 de febrero de 2008; 180(3): 1954-61), se ha notificado el tratamiento satisfactorio de modelos animales de la artritis reumatoide con inhibidores de la quinasa dependientes de ciclina de molécula pequeña. Por tanto, no es difícil imaginar que una mostaza de nitrógeno/inhibidor de CDK de función doble representada por la Fórmula (I) pudiera utilizarse para el tratamiento de una enfermedad inmunitaria. La invención se refiere además a una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad inmunitaria en un mamífero que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable, un hidrato, un solvato, un profármaco, un metabolito activo, un enantiómero correspondiente, un racemato correspondiente, o uno de sus diastereómeros correspondientes.

En una realización preferida, la enfermedad inmunitaria se selecciona entre el grupo que consiste en el rechazo de órganos y tejidos trasplantados enfermedad de injerto frente a hospedador, una enfermedad inflamatoria no autoinmunitaria, y una enfermedad autoinmunitaria, en el que enfermedad autoinmunitaria se selecciona entre el grupo que consiste en encefalomiелitis diseminada aguda, enfermedad de Addison, espondilitis anquilosante, síndrome de anticuerpos dirigidos contra fosfolípidos, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad del oído interno autoinmunitaria, penfigoide buloso, enfermedad celiaca, enfermedad de Chagas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de Churg-Strauss, dermatomiositis, enfermedad de Crohn, diabetes mellitus de tipo 1, endometriosis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, hidradenitis supurativa, púrpura trombocitopénica idiopática, cistitis intersticial, lupus eritematoso, morfea, esclerosis múltiple, miastenia grave, narcolepsia, neuromiotonía, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, polimiositis, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, esquizofrenia, escleroderma, arteritis temporal, vasculitis, vitíligo, y granulomatosis de Wegener.

#### **Definiciones:**

40 "Acilo" significa un carbonilo que contiene un sustituyente representado por la fórmula  $-C(O)-R$  en la que R es H, alquilo, un carbociclo, un heterociclo, un alquilo sustituido con carbociclo o un alquilo sustituido con heterociclo, en los que el alquilo, alcoxi, carbociclo y heterociclo son como se definen en el presente documento. Los grupos acilo incluyen alcanoil (por ejemplo, acetilo), aroilo (por ejemplo, benzoilo) y heteroaróilo.

45 "Alifático" significa un resto caracterizado por una disposición de cadena lineal o ramificada de átomos de carbono constituyentes y puede estar saturada o parcialmente insaturada con uno o más dobles o triples enlaces.

El término "alquilo" se refiere a un hidrocarburo lineal o ramificado que contiene 1-20 átomos de carbono (por ejemplo,  $C_1-C_{10}$ ). Los ejemplos de alquilo incluyen, pero sin limitación, metilo, metileno, etilo, etileno, n-propilo, i-propilo, n-butilo, i-butilo y t-butilo. El término "alquenilo" se refiere a un hidrocarburo lineal o ramificado que contiene 2-20 átomos de carbono (por ejemplo,  $C_2-C_{10}$ ) y uno o más dobles enlaces. Los ejemplos de alquenilo incluyen, pero sin limitación, etenilo, propenilo y alilo. El término "alquinilo" se refiere a un hidrocarburo lineal o ramificado que contiene 2-20 átomos de carbono (por ejemplo,  $C_2-C_{10}$ ) y uno o más triples enlaces. Los ejemplos de alquinilo incluyen, pero sin limitación, etinilo, 1-propinilo, 1 y 2-butinilo y 1-metil-2-butinilo. El término "alquilamino" se refiere a un  $-N(R)$ -alquilo en el que R puede ser H, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquenilo, arilo o heteroarilo. "Alcoxi" significa un resto de oxígeno que tiene un sustituyente alquilo adicional. "Alcoxicarbonilo" significa un grupo alcoxi unido a un grupo carbonilo. "Oxoalquilo" significa un alquilo, sustituido adicionalmente con un grupo carbonilo. El grupo carbonilo puede ser un aldehído, cetona, amida de éster, ácido o cloruro de ácido. El término "cicloalquilo" se refiere a un sistema de anillo de hidrocarburo saturado que tiene de 3 a 30 átomos de carbono (por ejemplo,  $C_3-C_{12}$ ). Los ejemplos de cicloalquilo incluyen, pero sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo. El término "cicloalquenilo" se refiere a un sistema de anillo de hidrocarburo no aromático que tiene de 3 a 30 carbonos (por ejemplo,  $C_3-C_{12}$ ) y uno o más dobles enlaces. Los ejemplos incluyen ciclopentenilo, ciclohexenilo y cicloheptenilo. El término "heterocicloalquilo" se refiere a

- un sistema de anillo no aromático monocíclico de 5-8 miembros, bicíclico de 8-12 miembros o tricíclico de 11-14 miembros que tiene uno o más heteroátomos (tales como O, N, S, P o Se). Los ejemplos de grupos heterocicloalquilo incluyen, pero sin limitación, piperazinilo, pirrolidinilo, dioxanilo, morfolinilo y tetrahidrofuranilo. El término "heterocicloalqueno" se refiere a un sistema de anillo no aromático monocíclico de 5-8 miembros, bicíclico de 8-12 miembros o tricíclico de 11-14 miembros que tiene uno o más heteroátomos (tales como O, N, S, P o Se) y uno o más dobles enlaces.
- El término "arilo" se refiere a un sistema de anillo aromático monocíclico de 6 carbonos, bicíclico de 10 carbonos, tricíclico de 14 carbonos. Los ejemplos de grupos arilo incluyen, pero sin limitación, fenilo, naftilo y antraceno. El término "heteroarilo" se refiere a un sistema de anillo aromático monocíclico de 5-8 miembros, bicíclico de 8-12 miembros o tricíclico de 11-14 miembros que tiene cero o más heteroátomos (tales como O, N, S, P o Se). Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen piridilo, furilo, imidazolilo, benzoimidazolilo, pirimidinilo, tienilo, quinolinilo, indolilo y tiazolilo.
- Alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalqueno, heterocicloalqueno, alquilamino, arilo y heteroarilo mencionados anteriormente incluyen restos sustituidos y sin sustituir. Los sustituyentes posibles en alquilamino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalqueno, heterocicloalqueno, arilo y heteroarilo incluyen, pero sin limitación, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>20</sub>, cicloalqueno C<sub>3</sub>-C<sub>20</sub>, heterocicloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, heterocicloalqueno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, arilo, ariloxi, heteroarilo, heteroariloxi, amino, alquilamino C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, arilamino, hidroxilo, halo, oxo (O=), tioxi (S=), tio, sililo, alquiltio C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, ariltio, alquilsulfonilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, arilsulfonilo, acilamino, aminoácido, aminoácido, amidino, mercapto, amido, tioureido, tiocianato, sulfonamido, guanidina, ureido, ciano, nitro, acilo, tioácido, aciloxi, carbamido, carbamilo, carboxilo y éster carboxílico. Por otro lado, los sustituyentes posibles en alquilo, alqueno o alquino incluyen todos los sustituyentes recitados anteriormente, excepto alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>. El cicloalquilo, cicloalqueno, heterocicloalquilo, heterocicloalqueno, arilo y heteroarilo también pueden estar condensados los unos con los otros.
- "Amino" significa un resto de nitrógeno que tiene dos sustituyentes adicionales donde cada sustituyente tiene un átomo de hidrógeno o carbono alfa enlazado al nitrógeno. A menos que se indique lo contrario, los compuestos de la invención que contienen restos amino pueden incluir derivados protegidos de los mismos. Los grupos protectores adecuados para restos amino incluyen acetilo, *tert*-butoxicarbonilo, benciloxicarbonilo, y similares.
- "Aromático" significa un resto en el que los átomos constituyentes constituyen un sistema de anillo insaturado, todos los átomos en el sistema de anillo tienen hibridación sp<sup>2</sup> y el número total de electrones pi es igual a 4n+2. Un anillo aromático puede ser tal, que los átomos en el anillo sean únicamente átomos de carbono o puede incluir átomos de carbono y átomos distintos de carbono (véase Heteroarilo).
- "Carbamoilo" significa el radical -OC(O)NRaRb donde Ra y Rb son cada uno independientemente dos sustituyentes adicionales donde un átomo de hidrógeno o carbono es alfa con respecto al nitrógeno. Nótese que los restos carbamoilo pueden incluir derivados protegidos de los mismos. Los ejemplos de grupos protectores adecuados para restos carbamoilo incluyen acetilo, *tert*-butoxicarbonilo, benciloxicarbonilo y similares. Nótese que tanto los derivados sin proteger como los derivados protegidos entran dentro del alcance de la invención.
- "Carbonilo" significa el radical -C(O)-. Nótese que el radical carbonilo puede estar adicionalmente sustituido con una diversidad de sustituyentes para formar grupos carbonilo diferentes incluyendo ácidos, haluros de ácido, amidas, ésteres y cetonas.
- "Carboxi" significa el radical -C(O)O-. Nótese que los compuestos de la invención que contienen restos carboxi pueden incluir derivados protegidos de los mismos, es decir, donde el oxígeno está sustituido con un grupo protector. Los grupos protectores adecuados para restos carboxi incluyen bencilo, *tert*-butilo, y similares.
- "Ciano" significa el radical -CN.
- "Halo" significa flúor, cloro, bromo o yodo.
- "Alquilo sustituido con halo", como un grupo aislado o como parte de un grupo más largo, significa "alquilo sustituido con uno o más átomos de "halo", tales términos se definen en la presente solicitud. El alquilo sustituido con halo incluye haloalquilo, dihaloalquilo, trihaloalquilo, perhaloalquilo y similares.
- "Hidroxilo" significa el radical -OH.
- "Derivado de imina" significa un derivado que comprende el resto -C(NR)-, en el que R comprende un átomo de hidrógeno o carbono alfa con respecto al nitrógeno.
- "Isómeros" significan cualquier compuesto que tiene fórmulas moleculares idénticas pero se diferencian en la naturaleza o secuencia de enlace de sus átomos o en la disposición de sus átomos en el espacio. Los isómeros que se diferencian en la disposición de sus átomos en el espacio se denominan "estereoisómeros". Los estereoisómeros que no son imágenes especulares el uno del otro se denominan "diastereoisómeros" y los estereoisómeros que son imágenes especulares no superponibles se denominan "enantiómeros" o algunas veces isómeros ópticos. Un átomo de carbono

enlazado a cuatro sustituyentes no idénticos se denomina un "centro quiral". Un compuesto con un centro quiral tiene dos formas enantioméricas de quiralidad opuesta. Una mezcla de las dos formas enantioméricas se denomina una "mezcla racémica".

"Nitro" significa el radical  $-\text{NO}_2$ .

5 "Derivados protegidos" significa derivados de inhibidores en los que un sitio o sitios reactivos están bloqueados con grupos protectores. Los derivados protegidos son útiles en la preparación de inhibidores o ellos mismos pueden ser activos como inhibidores. Una lista comprensiva de grupos protectores adecuados puede encontrarse en T. W. Greene, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, 3ª edición, John Wiley & Sons, 1999.

10 "Sustituido o no sustituido" significa que un resto dado puede consistir en únicamente sustituyentes de hidrógeno a través de las valencias disponibles (no sustituido) o puede comprender adicionalmente uno o más sustituyentes distintos de hidrógeno a través de las valencias disponibles (sustituido) que de otro modo no se especifican por el nombre del resto dado.

15 "Sulfuro" significa  $-\text{S}-\text{R}$  en el que R es H, alquilo, carbociclo, heterociclo, carbocicloalquilo o heterocicloalquilo. Son grupos sulfuro particulares mercapto, alquilsulfuro, por ejemplo metilsulfuro ( $-\text{S}-\text{Me}$ ); arilsulfuro, por ejemplo fenilsulfuro; aralquilsulfuro, por ejemplo bencilsulfuro.

"Sulfinilo" significa el radical  $-\text{S}(\text{O})-$ . Nótese que el radical sulfinilo puede estar adicionalmente sustituido con una diversidad de sustituyentes para formar grupos sulfinilo diferentes que incluyen ácidos sulfinicos, sulfinamidas, ésteres de sulfinilo y sulfóxidos.

20 "Sulfonilo" significa el radical  $-\text{S}(\text{O})(\text{O})-$ . Nótese que el radical sulfonilo puede estar adicionalmente sustituido con una diversidad de sustituyentes para formar grupos sulfonilo diferentes, incluyendo ácido sulfónicos, sulfonamidas, ésteres de sulfonato y sulfonas.

"Tiocarbonilo" significa el radical  $-\text{C}(\text{S})-$ . Nótese que el radical tiocarbonilo puede estar adicionalmente sustituido con una diversidad de sustituyentes para formar grupos tiocarbonilo diferentes, incluyendo tioácidos, tioamidas, tioésteres y tiocetonas.

25 "Animal" incluye seres humanos, mamíferos no humanos, perros, gatos, conejos, ganado bovino, caballos, ovejas, cabras, cerdos, ciervos, y similares) y no mamíferos (por ejemplo, pájaros, y similares).

30 "Biodisponibilidad", como se usa en el presente documento es la fracción o porcentaje de una dosis administrada de un fármaco o composición farmacéutica que alcanza la circulación sistémica intacto. En general, cuando una medicación se administra por vía intravenosa, su disponibilidad es del 100 %. No obstante, cuando una medicación se administra mediante otras rutas (por ejemplo, por vía oral), su biodisponibilidad disminuye (por ejemplo, debido a una absorción incompleta y a un metabolismo de primer paso). Los métodos para mejorar la biodisponibilidad incluyen soluciones de profármacos, síntesis de sales, reducción del tamaño de partículas, formación de complejos, cambios en la forma física, dispersiones sólidas, secado por pulverización, y extrusión por fundido en caliente.

35 "Enfermedad" incluye específicamente cualquier condición insalubre de un animal o parte del mismo e incluye una condición insalubre que puede producirse por, o relacionada con, el tratamiento médico o veterinario aplicado a este animal, es decir, los efectos secundarios de dicho tratamiento.

"Farmacéuticamente aceptable" significa que este es útil para preparar una composición farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica y ni biológicamente ni de otro modo no deseable e incluye que esta es aceptable para uso farmacéutico veterinario y también para uso farmacéutico humano.

40 "Sales farmacéuticamente aceptables" significa sales de compuestos de la presente invención que son farmacéuticamente aceptables, como se ha definido anteriormente, y que poseen la actividad farmacológica deseada. Dichas sales incluyen las sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos, o con ácidos orgánicos. Las sales farmacéuticamente aceptables también incluyen sales de adición de bases que pueden formarse cuando los protones ácidos presentes son capaces de reaccionar con bases inorgánicas u orgánicas.

45 "Profármaco" significa un compuesto que puede convertirse metabólicamente in vivo en un inhibidor de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, un inhibidor que comprende un grupo hidroxilo puede administrarse como un éster que se convierte mediante hidrólisis in vivo en el compuesto hidroxilo.

50 "Farmacóforo" como se define por The International Union of Pure and Applied Chemistry, es un conjunto de características estéricas y electrónicas que es necesario para asegurar las interacciones supramoleculares óptimas con una diana biológica específica y para estimular (o bloquear) su respuesta biológica. Por ejemplo, camptotecina es el farmacóforo de los fármacos bien conocidos topotecán e irinotecán. Como otro ejemplo, el farmacóforo de la mostaza de nitrógeno tiene una fórmula típica de  $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{X})_2$  o sus análogos de N-óxido en los que X es un grupo saliente tal como halo. Los fármacos anticancerosos que contienen un farmacóforo de mostaza de nitrógeno incluyen, pero no de forma limitativa, melfalano, bendamustina, ciclofosfamida, PX-478, TH-302, PR-104, ifosfamida, y así

sucesivamente.

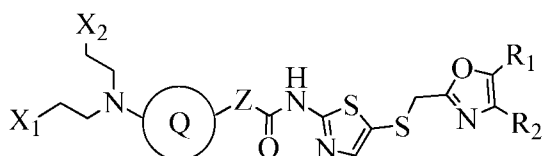
"Estabilidad" se refiere en general a lapso de tiempo que un fármaco retiene sus propiedades sin pérdida de potencia. Algunas veces esto se denomina como semivida. Los factores que influyen sobre la estabilidad del fármaco incluyen, entre otras cosas, la estructura química del fármaco, impurezas en la formulación, el pH, el contenido de humedad, así como factores ambientales tales como la temperatura, la oxidación, la luz, y la humedad relativa. Puede aumentarse la estabilidad proporcionando modificaciones químicas y/o cristalinas adecuadas (por ejemplo, modificaciones superficiales que pueden cambiar la cinética de hidratación; cristales diferentes que pueden tener propiedades diferentes), excipientes (por ejemplo, otras cosas diferentes de la sustancia activa en la forma farmacéutica), las condiciones de envasado, las condiciones de almacenamiento, etc.

Tal como se usa en el presente documento, el término "tratar" se refiere a administrar un compuesto a un sujeto que tiene un trastorno neoplásico o inmunitario, o tiene un síntoma de una predisposición hacia este, con el objetivo de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, atenuar, mejorar, o influir sobre el trastorno, los síntomas de o la predisposición hacia el trastorno. El término "una cantidad eficaz" se refiere a la cantidad del agente activo que se requiere para conferir el efecto terapéutico previsto en el sujeto. Las cantidades eficaces pueden variar, tal como reconocen los expertos en la materia, dependiendo de la ruta de administración, el uso de excipientes y la posibilidad de utilización simultánea con otros agentes. Un "sujeto" se refiere a un ser humano y a un animal no humano. Los ejemplos de animales no humanos incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos, tales como primates no humanos (particularmente primates superiores), perros, roedores (por ejemplo, un ratón o rata), cobayas, gatos, y no mamíferos, tales como aves, anfibios, reptiles, etc. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano. En otra realización, el sujeto es un animal experimental o animal adecuado como un modelo animal.

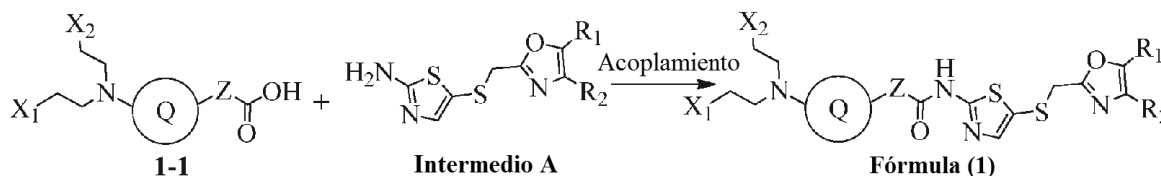
### PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS

Los compuestos de la invención pueden prepararse por cualquiera de los procedimientos conocidos en el campo. Pueden obtenerse materiales de partida necesarios por procedimientos convencionales de química orgánica. Los compuestos y procedimientos de la presente invención se entenderán mejor junto con los siguientes ejemplos y esquemas sintéticos representativos, que están destinados únicamente a ilustración y no a limitar el alcance de la invención. Diversos cambios y modificaciones a las realizaciones desveladas serán evidentes para los expertos en la materia y tales cambios y modificaciones incluyendo, sin limitación, aquellos relacionados con las estructuras químicas, sustituyentes, derivados, formulaciones y/o procedimientos de la invención pueden hacerse sin alejarse del espíritu de la invención ni del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

En general, los compuestos con la Fórmula (1)



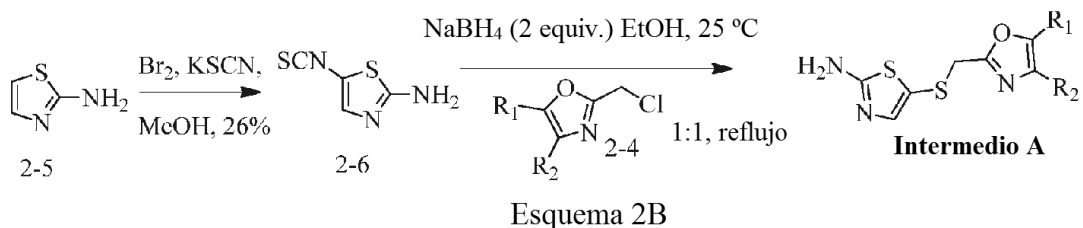
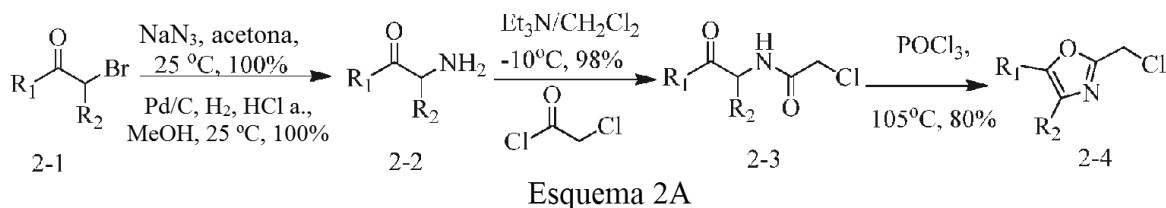
pueden prepararse mediante el siguiente Esquema 1, en el que X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, Q, Z, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub>, son iguales a los descritos en la sección de Sumario anterior.



Esquema 1

Como se muestra en el Esquema 1, el Intermedio A puede acoplarse con una mostaza de nitrógeno adecuada con una cola de ácido carboxílico (1-1) para proporcionar las moléculas diana con fórmula (I). Una diversidad de agentes de acoplamiento, como DCC(N,N'-diciclohexilcarbodiimida), DIC(N,N'-diisopropilcarbodiimida), EDC (también EDAC o EDCI, acrónimos para 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, HBTU hexafluorofosfato de (O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio), TBTU tetrafluoroborato de (O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio), HATU hexafluorofosfato de (O-(7-Azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio), HCTU hexafluorofosfato de (O-(6-clorobenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-8 tetrametiluronio), podrían usarse para la reacción de acoplamiento.

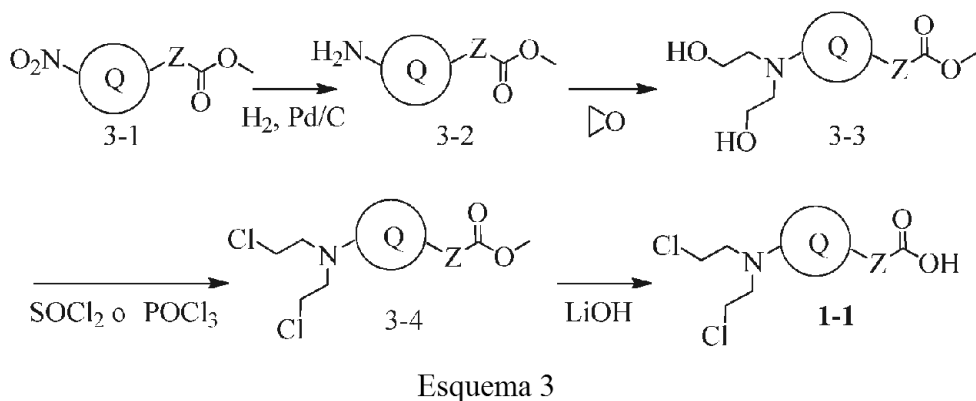
El Intermedio **A** en el Esquema 1 puede prepararse mediante el siguiente Esquema 2-A y 2-B, en el que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub>, son iguales a los descritos en la sección de Sumario anterior.



5 Como se muestra en el Esquema 2-A, el material de partida 2-1 puede convertirse suavemente en 2-2 por tratamiento con azida sódica, seguido de hidrogenación catalítica. La acilación de 2-2 con cloruro de cloroacetilo proporcionará la cetoamida 2-3, que se ciclará para dar el clorometiloxazol 2-4 intermedio en oxiclorigenato de fósforo a reflujo. En el Esquema 2-B, el núcleo de tiazol puede elaborarse por tratamiento de 2-aminotiazol disponible en el mercado (2-5) con bromo y tiocianato de potasio para dar 2-6 con un rendimiento bajo pero un procedimiento moderadamente escalable. La reducción de 2-6 mediante exposición a borohidruro sódico en metanol, seguido de alquilación del tiolato resultante con clorometiloxazol 2-4 conducirá al Intermedio **A**.

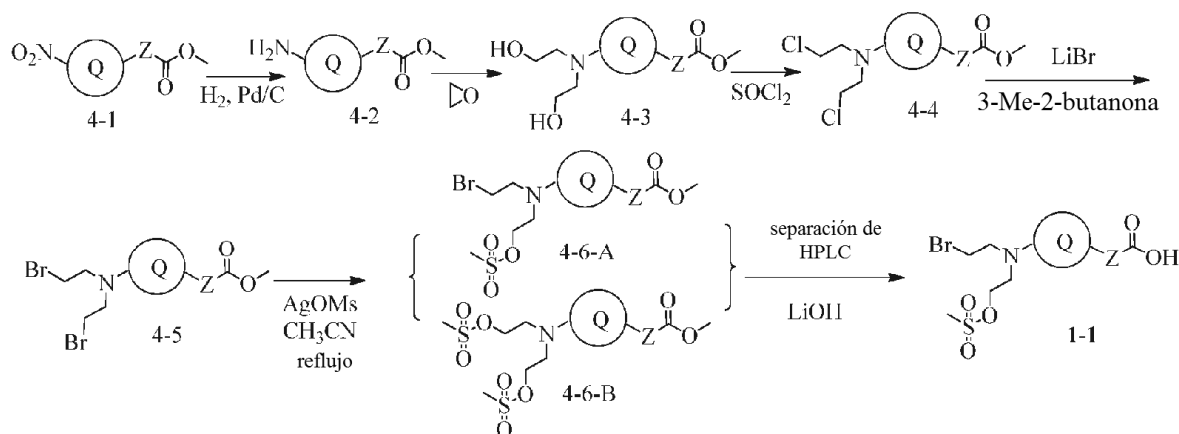
10

La preparación de la mostaza de nitrógeno 1-1 mostrada en el esquema 1 es bien conocida en el campo. Por ejemplo, la mostaza de nitrógeno 1-1 en la que X es igual que X<sub>2</sub> (por ejemplo, Cl) puede prepararse mediante el siguiente Esquema 3.



15 El material de partida (3-1) puede reducirse, por ejemplo con H<sub>2</sub>, Pd/C, para dar un intermedio sustituido con amino (3-2). El intermedio resultante (3-2) puede convertirse fácilmente en el intermedio (3-3) y después en el intermedio (3-4) por técnicas de síntesis orgánica convencionales con alto rendimiento. La hidrólisis del intermedio (3-4) en LiOH puede proporcionar la mostaza de nitrógeno **1-1**.

20 Para la mostaza de nitrógeno asimétrica **1-1** en la que X es distinto de X<sub>2</sub> (por ejemplo, X es Br y X es OSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) puede prepararse mediante el siguiente esquema 4.

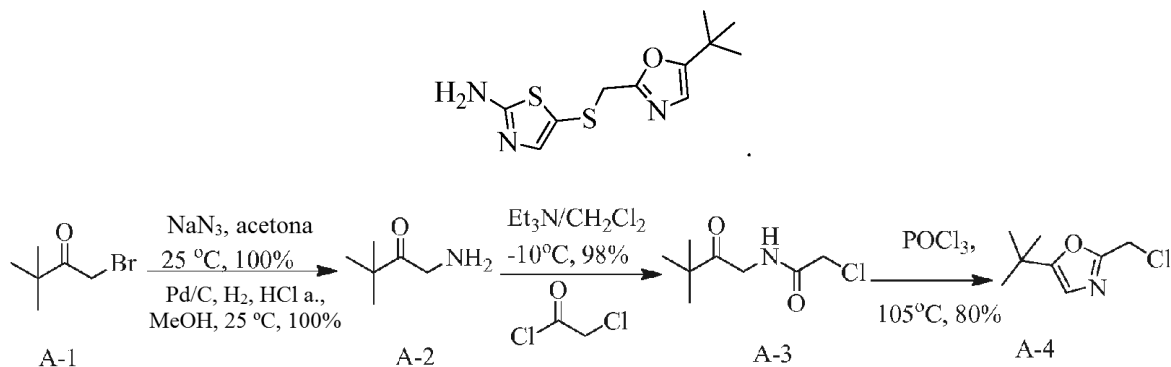


Esquema 4

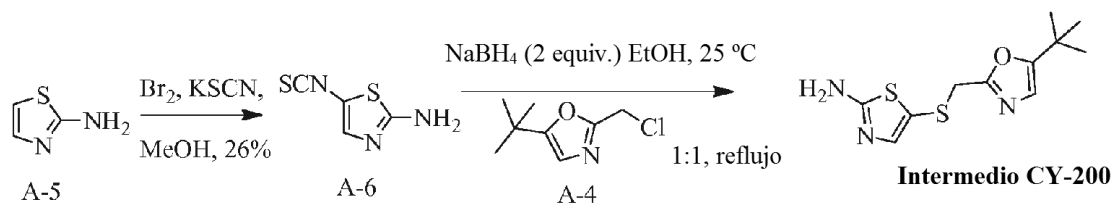
El material de partida (4-1) puede reducirse, por ejemplo, con H<sub>2</sub>, Pd/C, para dar un intermedio sustituido con amino (4-2). El intermedio resultante (4-2) puede convertirse fácilmente en el intermedio (4-3) y después en el intermedio (4-4) por técnicas de síntesis orgánica convencionales con alto rendimiento. El reemplazo de los grupos cloruro de (4-4) con LiBr en 3-metil-2-butanona en ebullición da el dibromuro (4-5), que está adicionalmente sustituido con metanosulfonato de plata en acetonitrilo a reflujo para producir una mezcla de mono- y dimesilatos (4-6-A) y (4-6-B), separable por cromatografía en columna. La hidrólisis del intermedio (4-6-A) en LiOH puede proporcionar la mostaza de nitrógeno asimétrica 1-1.

### Ejemplos

#### 10 Ejemplo 1: Preparación del Intermedio CY-200



Esquema A-1



Esquema A-2

Etapa 1: En un matraz de fondo redondo, de tres bocas y 2 l, equipado con un agitador mecánico, se añadió bromopinacolona A-1 (134 g, 747 mmol, 1,0 equiv.), acetona (1,2 l) y azida sódica (63,2 g, 971 mmol, 1,3 equiv.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche después se filtró, y los sólidos se lavaron con acetona (2 x 100 ml). El filtrado se concentró al vacío para proporcionar azidopinacolona (105,0 g, 100 %) en forma de un aceite. El material en bruto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Etapa 2: En un matraz de fondo redondo de tres bocas y 2 l equipado con un agitador mecánico se añadieron azidopinacolona (28,6 g, 203 mmol, 1,0 equiv.), metanol (1145 ml), HCl concentrado (18 ml) y Pd al 10 %/C (3,5 g,

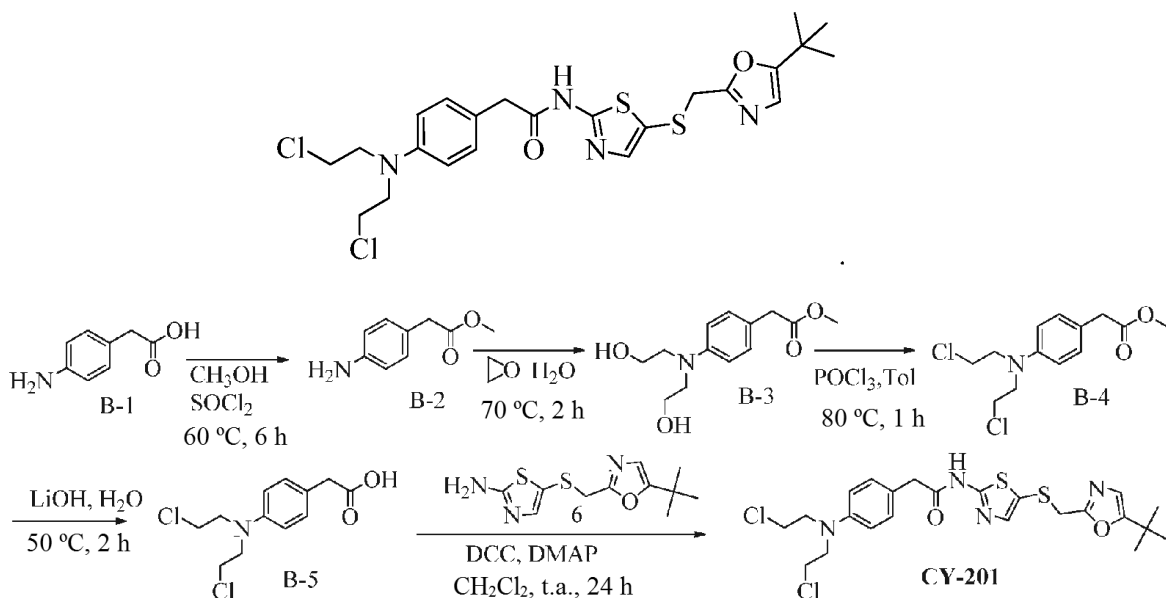
húmedo al 50 % en agua). La mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de hidrógeno a 0,14 MPa (20 psi) durante 2 h, la mezcla se filtró a través de una capa de Celite, y el residuo se enjuagó con metanol (2 x 50 ml). El filtrado se concentró a presión reducida a una temperatura por debajo de 40 °C. El sólido húmedo resultante se destiló azeotrópicamente con 2-propanol (2 x 100 ml), se añadió éter anhidro (100 ml) y la suspensión que se formó, se agitó durante 5 min. El producto sólido se recogió por filtración y la torta se lavó con éter dietílico (2 x 30 ml) y después se secó al vacío para dar el clorhidrato de aminopinacolona A-2.

Etapa 3: En un matraz de fondo redondo de tres bocas y 1 l, equipado con un agitador mecánico, se añadieron clorhidrato de aminopinacolona A-2 (15,2 g, 100 mmol, 1,0 equiv.) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (350 ml). La suspensión se enfrió a -5 °C, y se añadió trietilamina (35 ml, 250 mmol, 2,5 equiv.). La mezcla resultante se agitó y se enfrió a -10 °C. Una solución de cloruro de cloroacetilo (8,8 ml, 110 mmol, 1,1 equiv.) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 ml) se añadió gota a gota durante 15 min mientras se mantenía la temperatura de reacción por debajo de -5 °C. La reacción se agitó durante 1 h y después se interrumpió con HCl ac. 1 N (200 ml). Las fases se separaron y la fase orgánica se lavó con HCl ac. 1 N (200 ml) y agua (50 ml), se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró al vacío para proporcionar A-3 (18,9 g, 98 %) en forma de un sólido de color blanco.

Etapa 4: En un matraz de fondo redondo de 100 ml, equipado con un agitador magnético, se añadieron A-3 (18,9 g, 98,6 mmol, 1 equiv.) y POC13 (38 ml, 407 mmol, 4,1 equiv.). La mezcla de reacción se calentó a 105 °C y se agitó durante 1 h. Después de enfriarse a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se vertió cuidadosamente en hielo (180 g). La mezcla se extrajo con éter (6 x 150 ml). Los extractos orgánicos se combinaron y se neutralizaron a pH 7-8 con bicarbonato sódico saturado (~700 ml). La fase orgánica se separó y se lavó sucesivamente con bicarbonato sódico saturado (100 ml), agua (100 ml) y salmuera (50 ml), se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se concentró al vacío. El material en bruto se destiló a presión reducida para dar A-4 en forma de un aceite incoloro.

Etapa 5: A-6 se preparó a partir de A-5 de acuerdo con la publicación de J. Heterocicl. Chem. 1984, 21,401-406. A una solución del tiocianato A-6 (10,0 g, 63,3 mmol) en EtOH absoluto (600 ml) se le añadió en porciones NaBH<sub>4</sub> (4,8 g, 120 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 1 h y después se introdujo lentamente acetona (300 ml). Después de 1 h, se añadió una solución del cloruro de oxazol A-4 (12,0 g, 69 mmol) en EtOH (100 ml) y la mezcla de reacción oscura resultante se calentó a reflujo durante 1 h. La mezcla resultante se enfrió, se concentró al vacío y después se repartió entre EtOAc y salmuera. La fase orgánica se separó, se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se concentró al vacío para dar un sólido en bruto. El material en bruto se trituró con éter dietílico/hexano para proporcionar el Intermedio CY-200 (16,0 g, 94 %) en forma de un sólido de color rojo pálido-pardo. CL/EM: 270,1 [M+H]<sup>+</sup>.

### 30 Ejemplo 2: Preparación de CY-201



Esquema B

Etapa 1: Síntesis de 2-(4-aminofenil)acetato de metilo (B-2): A una solución de ácido 2-(4-aminofenil)acético (B-1) (10 g, 66,16 mmol) en metanol (50 ml) se le añadió gota a gota SOCl<sub>2</sub> (5 ml). La mezcla se agitó a 60 °C durante 6 h. Después de evaporarse el disolvente, el residuo se recristalizó con Et<sub>2</sub>O para proporcionar el producto (10,9 g 99 %) en forma de un sólido de color amarillo. CL-EM: (M+H)<sup>+</sup> = 166;

Etapa 2: Síntesis de 2-(4-(bis(2-hidroxiethyl)amino)fenil)acetato de metilo (B-3): A una solución de 2-(4-aminofenil)acetato de metilo (B-2) (10,9 g, 65,98 mmol) en agua (100 ml) se le añadió oxirano (25 ml) a 0 °C.

Después, la mezcla turbia se calentó a 70 °C con agitación vigorosa durante 2 h, la solución se evaporó y se extrajo con EtOAc (150 ml x 3), la fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La filtración y la concentración al vacío dieron el residuo en bruto. El residuo se recrystalizó con hexano para proporcionar el producto (8,5 g, 51 %) en forma de un sólido de color gris. CL-EM: (M+H)<sup>+</sup> = 254;

5 Etapa 3: Síntesis de 2-(4-(bis(2-cloroetil)amino)fenil)acetato de metilo (B-4): A una solución de 2-(4-(bis(2-hidroxi)etil)amino)fenil)acetato de metilo (B-3) (6,0 g, 23,69 mmol) en tolueno (30 ml) se le añadió cloruro de fosforilo (6 ml) a 0 °C. La mezcla se agitó a 80 °C durante 1 h, después la mezcla se enfrió a t.a. y se agitó con hidrogenocarbonato sódico acuoso y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 ml x 3). La capa orgánica se separó, se lavó con agua y salmuera, y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La filtración y la concentración al vacío dieron el residuo en bruto. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con PE a EtOAc = 20:1 para proporcionar el producto (3,4 g, 49,8 %) en forma de un aceite incoloro. CL-EM: (M+H)<sup>+</sup> = 291;

10 Etapa 4: Síntesis de ácido 2-(4-(bis(2-cloroetil)amino)fenil)acético (B-5). En un matraz de fondo redondo se añadió 2-(4-(bis(2-cloroetil)amino)fenil)acetato de metilo (B-4) (3,4 g, 11,68 mmol), LiOH (1,7 g, 70,83 mmol), H<sub>2</sub>O (100 ml) y THF (50 ml). La mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 2 h. Después de enfriar a t.a., la mezcla de reacción se ajustó con HCl (1 N) a pH 7 y se extrajo con EtOAc (100 ml\*2), la mezcla se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró a presión reducida. El producto en bruto (2,8 g) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. CL-EM: (M+H)<sup>+</sup> = 277;

15 Etapa 5: Síntesis de 2-(4-(bis(2-cloroetil)amino)fenil)-N-(5-((5-*terc*-butiloxazol-2-il)metiltio)tiazol-2-il)acetamida (CY-201). A una solución en agitación de cloruro de metileno (20 ml) se le añadieron DMAP (438 mg, 3,59 mmol) y ácido 2-(4-(bis(2-cloroetil)amino)fenil)acético (B-5) (906 mg, 3,27 mmol). Posteriormente, se añadió DCC (690 mg, 3,35 mmol) a la mezcla de reacción, seguido de la adición de 5-((5-*terc*-butiloxazol-2-il)metiltio)tiazol-2-amina (Intermedio CY-200) (800 mg, 2,97 mmol). La mezcla se agitó a t.a. durante 24 h. Después de retirar diclorohexilurea (DCU) por filtración, el filtrado se concentró al vacío y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: EtOAc = 20:1 para proporcionar un producto completo (1,2 g, 76 %) en forma de un sólido de color gris. CL-EM: (M+H)<sup>+</sup> = 528. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10,17 (s, 1H), 7,28-7,30 (m, 1H), 7,17 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,69 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 6,58 (s, 1H), 3,95 (s, 2H), 3,63-3,79 (m, 10H), 1,26 (s, 9H).

## Ensayos biológicos

### (a) inhibición de la actividad enzimática de CDK

#### (a-1) MATERIALES:

30 CDK1/cyclinB (Número de registro para CDK1; GenBank NM 001786, para cyclinB; EMBL M25753): cdk1 humana de longitud completa etiquetada con 6His en el extremo C (Pm = 35 kDa), y ciclina B de longitud completa humana etiquetada con GST en el extremo N (Pm = 75 kDa) se expresaron individualmente con el sistema de baculovirus en células de insectos Sf21. Las proteínas recombinantes se purificaron utilizando Ni<sup>2+</sup>/NTA-agarosa y GST-agarosa, respectivamente. La cdk1 se activó a continuación utilizando CAK y se volvió a purificar mediante Q Sefarosa y Ni<sup>2+</sup>/NTA-agarosa. A continuación se mezclaron in vitro para formar el complejo de proteínas. Se estimó que la pureza de este complejo de proteínas era del 80,5 % mediante SDSPAGE y la tinción del azul de Coomassie. Se midió que la actividad específica de la enzima recombinante era de 1329 U/mg donde una unidad de actividad cdk1 /cyclinB se define como 1 nmol de fosfato incorporado en 0,1 mg/ml de histona H1 por minuto a 30 °C con una concentración de ATP final de 100 mM. La enzima se almacenó a una concentración de 0,1 mg/ml en Tris/HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, EGTA 0, 1 mM, Brij-35 al 0,03 %, sacarosa 270 mM benzamida 1 mM PMSF 0,2 mM, 2-mercaptoetanol al 0,1 %,

40 CDK2/cyclinA (Número de registro para CDK2; EMBL M68520, para cyclin A; EMBL X51688): cdk2 de longitud completa humana etiquetada con 6His en el extremo C (Pm = 35 kDa), y cyclin A de longitud completa humana etiquetada con GST en el extremo N (Pm = 75 kDa) se expresaron individualmente con el sistema de baculovirus en células de insectos Sf21. La proteína cdk2 recombinante se purificó con M2+/NTA agarosa y a continuación se activó usando CAK y se volvió a purificar mediante Q Sefarosa y M2+/NTA agarosa. La ciclina A recombinante se purificó usando glutatión-agarosa. A continuación se mezclaron in vitro para formar el complejo de proteínas. Se midió el complejo de proteínas recombinantes que tenía un 67 % de pureza con SDS-PAGE y la tinción de azul de Coomassie. Se midió que la actividad específica de la enzima purificada era de 158 U/mg, donde una unidad de actividad de cdk2/cyclinA se define como 1 nmol de fosfato incorporados en 0,1 mg/ml de histona HI por minuto a 30 °C con una concentración final de ATP de 100 mM. La enzima se almacenó a una concentración de 0,1 mg/ml en Tris/HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, EGTA 0, 1 mM, Brij-35 al 0,03 %, sacarosa 270 mM benzamida 1 mM PMSF 0,2 mM, 2-mercaptoetanol al 0,1 %, solución congelada.

45 CDK2/cyclinE (Número de registro para CDK2; EMBL M68520, para cyclinE; GenBank NM\_001238): Se expresaron CDK2 recombinante de longitud completa etiquetada con 6His en el extremo C (Pm = 34 kDa) en complejo con cyclinE recombinante de longitud completa etiquetada con 6His en el extremo C, (Pm = 74 kDa) se expresaron con el sistema de baculovirus en células Sf21. Se purificaron proteínas recombinantes usando M2+/NTA agarosa y se midió que la pureza del complejo de proteínas recombinantes era alrededor del 76 % mediante SDS-PAGE y la tinción del azul de Coomassie. La actividad específica de CDK2/cyclinE recombinante era 1336U/mg, donde una unidad de actividad CDK2 /cyclinE se define como 1 nmol de fosfato incorporado en 0,1 mg/ml de histona H1 por minuto a 30 °C con una concentración de ATP final de 100 mM. La enzima se almacenó a una concentración de 0,1 mg/ml en Tris/HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Brij-35 al 0,03 %, EGTA 0, 1 mM, PMSF 0,2 mM, benzamida 1 mM 2-mercaptoetanol al 0,1 %,



sacarosa 270 mM.

5 CDK3/cyclinE (Número de registro para CDK3; GenBank X66357, para la ciclina E; GenBank NM 001238): cdk3 de longitud completa humana recombinante etiquetada con 6His en el extremo C (Pm = 36 kDa) se expresó simultáneamente con cyclin E humana recombinante de longitud completa etiquetada con GST en el extremo N (Pm = 74 kDa (con el sistema de baculovirus en células de insectos Sf21. El complejo de proteínas recombinantes se purificó usando Ni<sup>2+</sup>/NTA agarosa y con una pureza del 66 % mediante SDS-PAGE y la tinción del azul de Coomassie. Se midió la actividad específica de la enzima purificada que era de 861 U/mg, donde una unidad de actividad de cdk3/cyclinE se define como 1 nmol de fosfato incorporado en 0,1 mg/ml de histona HI por minuto a 30 °C con una concentración final de ATP de 100 mM. La enzima se almacenó a una concentración de 0,1 mg/ml en Tris/HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, EGTA 0, 1 mM, Brij 35 al 0,03 %, sacarosa 270 mM benzamida 1 mM PMSF 0,2 mM, 2-mercaptoetanol al 0,1 %, 10

15 CDK4/cyclinDI (Número de registro para CDK4; NP 000066, para cyclin D1; NP 444284) CDK-4 de longitud completa humana recombinante etiquetada con GST (Pm= 61,8 kDa) y cyclinDI (Pm= 61,2 kDa) se expresaron en células de insectos. Se midió que la enzima recombinante tenía una actividad específica igual a 190 nmoles de fosfato transferido a un sustrato del péptido RbING (INGSPRTPRRGQNR) por minuto por mg de proteína total a 30 °C. Se determinó la actividad a una concentración final de proteína a 8,33 µg/ml. La enzima se almacenó a una concentración de 0.4 mg/ml en Tris 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, EDTA 0,5 mM, Triton X-100 al 0,02 %, DTT 2 mM, glicerol al 50 %.

20 CDK6/cyclinD3 (Número de registro para CDK6; GenBank X66365, para cyclin D3; EMBL M90814): cdk6 humana de longitud completa etiquetada con 6His en el extremo N (Pm = 38 kDa) formando complejo con cyclin D3 humana de longitud completa etiquetada con GST en el extremo N (Pm = 59 kDa) se expresaron en células Sf21. El complejo de proteínas recombinantes se purificó usando glutatión-agarosa y se activó con CAK, y se volvió a purificar con una columna de M2+/NTA- agarosa. Se midió que la pureza era al menos del 68 %. Se midió que la actividad específica era de 39 U/mg, donde una unidad de actividad cdk6/cyclinD3 se define como 1 nmol de fosfato incorporado en 0,1 mg/ml de histona HI por minuto a 30 °C con una concentración final de ATP de 100 µM. La enzima se almacenó a una concentración de 0,1 mg/ml en Tris/HCl 50 mM, pH 7,5, sacarosa 270 mM NaCl 150 mM, benzamida 1 mM PMSF 0,2 mM, 2-mercaptoetanol al 0,1 %, EGTA 0,1 mM, Brij35 al 0,03 %. 25

30 CDK7/cyclinHI/MNATI (Número de registro para CDK7; NP 001790, para cyclinHI; NP 001230, para MNATI; NP 002422.1) Las proteínas humanas recombinantes de longitud completa, CDK7 etiquetada con histidina (Pm 0 43,2 kDa), cyclin HI etiquetada con histidina (Pm = 42,6 kDa), MNATI etiquetada con histidina (Pm = 40,5 kDa), se expresaron en células de insectos Se midió que la actividad específica del complejo de la enzima recombinante era igual a 94 nmoles de fosfato transferidos a un sustrato CDK7/9tide (YSPTSPSYSPSPSPSPSKKKK) por minuto por mg de proteína total a 30 °C. Se determinó la actividad con una concentración de proteína final a 3,33 µg/ml. La enzima se almacenó a una concentración de 0,42 mg/ml en Tris 50 mmol (pH 7,5), NaCl 150 mM, EDTA 0,5 mM, Triton X-100 al 0,02 %, DTT 2 mM, glicerol al 50 %.

35 CDK9/cyclinTI (Número de registro para CDK9; GenBank AF517840, para cyclin TI; GenBank NM 001240), cdk9 humana recombinante de longitud completa etiquetada con 6His en el extremo C (Pm = 44 kDa) se expresaron simultáneamente con cyclin TI humana de longitud completa sin etiquetar (Pm 0 80,79 kDa) con el sistema de baculovirus en células de insectos Sf21 El complejo de proteínas recombinantes se purificó con Ni<sup>2+</sup>/NTA agarosa Se midió que la pureza de la proteína recombinante era del 50 % mediante SDS-PAGE y la tinción del azul de Coomassie. Se midió que la actividad específica de la enzima purificada era de 186 U/mg, donde una unidad de actividad de cdk9/cyclin TI se define como 1 nmol de fosfato incorporado en 100 µM de PDKtide (KTFCGTPEYLAPEVRREPRILSEEEQEMFRDFYIAD- WC) por minuto a 30 °C con una concentración final de ATP de 100 µM. La enzima se almacenó a una concentración de 0,1 mg/ml en Tris/HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 300 mM, 0. EGTA 1 mM, Brij-35 al 0,03 %, sacarosa 270 mM benzamida 1 mM 2-mercaptoetanol al 0,1 %, PMSF 0,2 mM. Histon HI (sustrato para CDK1, 2, 3, 6 y 7): Se purifico histona HI (n° de cat. Sigma H4524), como una fracción rica en lisina procedente de timo de ternero con un 93 % de pureza (Pm = 21,5 kDa). La proteína purificada se almacenó a una concentración de 20 mg/ml = 930 µM en agua destilada. RBC-CTF (sustrato de CDK4): proteína RB humana (S773-K928, Pm = 44,46 kDa), etiquetada con GST en el extremo N se purificó y siguió una escisión con un factor Xa, que se llevó a cabo a una concentración 4 mM de glutatión, la proteína purificada se almacenó a una concentración de 0,67 mg/ml. PDKtide (sustrato para CDK9): sustrato peptídico sintético con secuencia de [KTFCGTPEYLAPEVRREPRILSEEEQEMFRDFD YIADWC], Pm = 4771,4 40 45 50

(a-2) CONDICIONES DE ENSAYO:

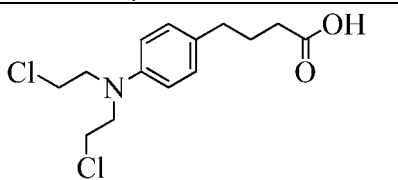
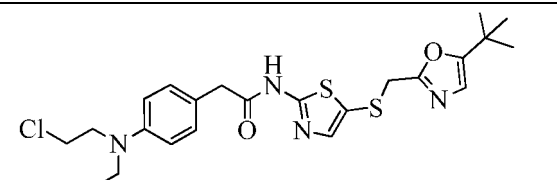
55 Para el ensayo de actividad de CDK se incubaron trazadores p33 ATP con una combinación específica recombinante purificada de las quinasas CDK purificadas ciclinas y sustratos para controlar la actividad de la enzima. En estos ensayos, se llevaron a cabo las reacciones individuales en las condiciones específicas descritas a continuación con el tampón de reacción: HEPES 20 mM (pH 7,5), MgCl<sub>2</sub> 10 mM, EGTA 1 mM, Brij 35 al 0,02 %, BSA 0,02 mg/ml, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 mM, DTT 2 mM. Se añadió un volumen igual de TCA al 25 % para detener la reacción y precipitar los péptidos marcados. Las proteínas precipitadas se capturaron sobre placas de filtración de fibra de vidrio B y el exceso de p33 ATP no marcado se eliminó mediante lavado. Se dejaron secar las placas al aire antes de la adición de 30 ul/pocillo de Packard Microscint 20. Se midió la cantidad de isótopo incorporado usando un lector de placas TopCount de Perkin 60

Elmer. Se añadieron diferentes concentraciones de compuestos a la reacción para evaluar la actividad de los compuestos para inhibir la PDGF-beta quinasa. Se calculó la CI50 utilizando el software Prism con un ajuste sigmoïdal de la curva de dosis-respuesta.

- 5 CDK1/cyclinB: se mezclaron CDK1/cyclinB 1 nM e Histon HI 20 µM en el tampón de reacción a una concentración final de ATP 1 µM y DMSO al 1 %. Se llevó a cabo la reacción durante 2 horas a temperatura ambiente con un índice de conversión de ATP igual al 7,5 %.
- CDK2/cyclinE: se mezclaron CDK2/cyclinE 0,5 nM e Histon HI 5 µM en el tampón de reacción a una concentración final de ATP 1 µM y DMSO al 1 %. Se incubó la reacción durante 2 horas a temperatura ambiente y el índice de conversión del ATP es aproximadamente de 4,5 %.
- 10 CDK3/cyclinE: se mezclaron de CDK3/cyclinE 0,5 nM e Histon HI 20 µM en el tampón de reacción a una concentración final de ATP 1 µM y DMSO al 1 %. Se incubó la reacción durante 2 horas a temperatura ambiente y con un índice de conversión de ATP que se midió que era del 7,0 %.
- CDK4/cyclinD1: se mezclaron de CDK4/cyclinD1 2 nM de RB-CTF y 1 µM en el tampón de reacción a una concentración final de 1 µM de ATP y DMSO al 1 %. Se incubó la reacción durante 2 horas a temperatura ambiente y con un índice de conversión de ATP que se midió que era del 8,5 %.
- 15 CDK6/cyclinD3: se mezclaron de CDK6/cyclinD3 50 nM y de Histon HI 5 µM en el tampón de reacción a una concentración final de ATP 1 µM y DMSO al 1 %. Se incubó la reacción durante 2 horas a temperatura ambiente y con un índice de conversión de ATP que se midió que era del 13 %.
- CDK7/cyclinH1/MNAT1: se mezclaron de CDK7 / cyclinH1/MNAT1 100 nM e de Histon HI 20 µM en el tampón de reacción con ATP 1 µM y DMSO al 1 %. Se incubó la reacción durante 2 horas a temperatura ambiente y con un índice de conversión de ATP que se midió que era del 5,5 %.
- 20 CDK9/cyclinT1: se mezclaron CDK9/cyclinT1 2 nM y pdkTIDE 20 µM en el tampón de reacción con ATP 1 µM de y DMSO al 1 % a concentraciones finales. Se incubó la reacción durante 2 horas a temperatura ambiente y con un índice de conversión de ATP que se midió que era del 12 %.

25 Se usó estaurosporina como compuesto de referencia. Dichos ensayos, llevados a cabo con un intervalo de dosis de los compuestos de ensayo, permiten la determinación de un valor de CI50 aproximado. Aunque las propiedades inhibitoras de los compuestos de la presente invención varían con el cambio estructural según lo esperado, la actividad presentada generalmente por estos agentes está en el intervalo de CI50 = 0,1 - 1000 nM.

30 Se indican a continuación estructuras de mostaza de nitrógeno del fármaco clorambucilo y su correspondiente derivado CY-201 inhibidor de CDK. Tanto clorambucilo como CY-201 tienen un farmacóforo de mostaza de nitrógeno capaz de alquilar el ADN. La siguiente tabla relaciona los valores de CI50 para CDK de CY-201 que muestran claramente que CY-201 es un inhibidor muy potente de CDK. Por lo tanto, CY-201, hasta donde los inventores saben representa el inhibidor de CDK de mostaza de nitrógeno con doble función más importante.

Clorambucilo la mostaza de nitrógeno alquilante del ADN precursor		CY-201 Derivados de clorambucilo inhibidores de CDK	
			
Subtipo CDK	CY-301 (nM)	Estaurosporina (nM)	Clorambucilo
CDK2/cyclin E	2,7	1,0	Sin actividad
CDK3/cyclin E	45,62	4,12	Sin actividad
CDK9/cyclin T1	90,44	6,56	Sin actividad

35 (b) Ensayo de antiproliferación in vitro:

Se hicieron crecer líneas de células tumorales humanas en medio RPMI 1640 que contenía suero de feto de bovino al 5 % y L-glutamina 2 mM. Para un experimento típico, se inocularon células en placas de microvaloración de 96 pocillos en 100 µl en densidades de siembra de 5.000 a 40.000 células/pocillo dependiendo del tiempo de duplicación de las líneas de células individuales. Tras la inoculación celular, se incubaron las placas de microvaloración a 37 °C, CO2 al 5 % aire al 95 % y 100 % de humedad relativa durante 24 h antes de la adición de fármacos experimentales. Después de 24 h, dos placas de cada línea celular se fijaron *in situ* con TCA, para representar una medición de la población celular de cada línea celular en el momento de la adición del fármaco (Tz). Se solubilizaron los fármacos experimentales en dimetil sulfoxido a 400 veces la concentración de ensayo máxima final deseada y se almacenaron congeladas antes de su uso. En el momento de la adición del fármaco, se descongeló una alícuota del concentrado congelado y se diluyó hasta dos veces la concentración de ensayo máxima final deseada con medio completo que

40

45

contenía 50 µg/ml de gentamicina. Se hacen adicionalmente cuatro, 10 o 1/2 diluciones en serie logarítmicas para proporcionar un total de cinco concentraciones de fármaco más el control. Se añadieron alícuotas de 100 µl de estas diluciones de fármaco diferentes a los pocillos de microvaloración adecuados que contenían ya 100 µl de medio, dando como resultado las concentraciones finales de fármaco requeridas.

5 tras la adición del fármaco, se incubaron las placas durante 48 h más a 37 °C. CO2 al 5 % aire al 95 %, y un 100 % de humedad relativa. Para células adherentes el ensayo finalizó mediante la adición de TCA frío. Las células se fijaron in situ mediante la adición suave de 50 µl de TCA frío al 50 % (p/v) (concentración final, TCA al 10 %) y se incubaron durante 60 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante, y las placas se lavaron cinco veces con agua corriente y se secaron al aire. Se añadió solución de sulfurohodamina (SRB) (100 µl) at 0,4 % (p/v) en ácido acético a cada pocillo, y se incubaron las placas durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de la tinción, el colorante no unido se retiró lavando cinco veces con ácido acético al 1 % y las placas se secaron al aire. La tinción unida se solubilizó posteriormente con base de trizma 10 mM, y se leyó la absorbancia sobre un lector de placas automatizado a una longitud de onda de 515 nm. Para la suspensión de células, la metodología es la misma excepto que el ensayo finalizó fijando las células sedimentadas en la parte inferior de los pocillos añadiendo suavemente 50 µl de TCA al 80 % (concentración final, TCA al 16 %).16 % NSCLC Utilizando las mediciones de siete absorbancias [tiempo cero, (Tz), crecimiento control (C), y ensayando el crecimiento en presencia de fármaco a los cinco niveles de concentración (Ti)], se calculó el porcentaje de crecimiento en cada uno de los niveles de concentración del fármaco. El porcentaje de inhibición del crecimiento se calculó como:

20 
$$\frac{[(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100}{[(Ti-Tz)/Tz] \times 100}$$
 para concentraciones para las cuales  $Ti \geq Tz$   
para concentraciones para las cuales  $Ti < Tz$ .

Se calcularon tres parámetros de dosis respuesta para cada agente experimental. Se calculó una inhibición del crecimiento del 50 % (GI50) se calculó a partir de  $[(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100 = 50$ , que es la concentración de fármaco que da como resultado una reducción del 50 % en el aumento de proteína neta (como se midió mediante la tinción SRB) en las células del control durante la incubación del fármaco. Dichos ensayos, llevados a cabo con un intervalo de dosis de los compuestos de ensayo, permiten la determinación de un valor de CI50 aproximado para el ensayo de antiproliferación celular in vitro de líneas celulares cancerosas. Aunque las propiedades inhibitoras de los compuestos de la presente invención varían con el cambio estructural según lo esperado, la actividad presentada generalmente por estos agentes está en el intervalo de CI50 = 0,001 -100 µM.

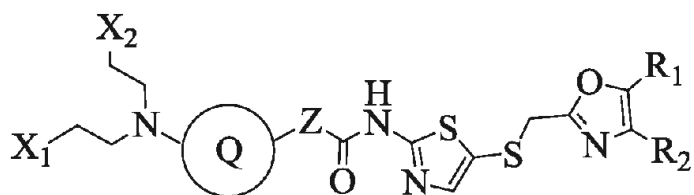
30 La siguiente tabla relaciona los valores CI50 de la mostaza de nitrógeno clorambucilo y su derivado CY-201 inhibidor de CDK en los ensayos antiproliferativos celulares. Los presentes inventores han encontrado de forma sorprendente que las actividades antitumorales del derivado CY-201 inhibidor de CDK aumentaron drásticamente en comparación con el fármaco progenitor clorambucilo. Por ejemplo, en la línea celular MDA-MS-435 de melanoma, CY-201 es más de 1500 veces más potente que el fármaco progenitor clorambucilo.

Cáncer	Línea celular	Clorambucilo (µM)	CY-201 (µM)	Relación
Mieloma múltiple	RPMI-8226	75,5	0,269	280,5
Cáncer de mama	MDA-MB-231	159,2	0,219	727,8
Cáncer de colon,	SW-620	87,5	0,098	895,4
Melanoma	M14	62,4	0,058	1083,9
Cáncer de ovario,	IGROV1	116,7	0,107	1088,9
Cáncer de colon,	HT29	131,5	0,107	1227,4
Cáncer de mama	HS 578T	188,4	0,148	1273,5
NSCLC	NCI-H322M	204,2	0,148	1380,4
Cáncer de colon,	KM12	143,2	0,091	1570,4
Melanoma	MDA-MB-435,	125,3	0,079	1577,6

35 Como los inventores saben. las CDK2 son las últimas protectoras de la ruta de señalización del daño del ADN (daño del DNA => ATM/ATR => Chk=> p53 => p21 => CDK2/Cyclin E =>detención de G1/S). La inhibición de CDK2 detendrá fuertemente la transición G1/S y detiene la proliferación descontrolada de células cancerosas. Asimismo, evidencias recientes indican que CDK2 está implicado en funciones independientes del ciclo celular tales como la reparación del daño del ADN. se constata que CDK2 es necesaria para la reparación adecuada del ADN. Por lo tanto, la inhibición de CDK2 inhibirá la reparación del daño del ADN. Además, la elusión de la apoptosis (por ejemplo, apoptosis inducida por daño del ADN) es un hito distintivo del cáncer. la inhibición de CDK conduce eventualmente a una fuerte apoptosis después de la detención del ciclo celular debido a que la ruta de reparación del ADN está dañada por la inhibición de CDK. En su conjunto, con una capacidad cuádruple de dañar el ADN, detener la progresión del ciclo celular, inhibir la reparación del daño del ADN, e inducir una fuerte apoptosis, el doble direccionamiento de CY-201 ha potenciado drásticamente las actividades anticancerosas en comparación con la mostaza de nitrógeno alquilante del ADN progenitora monofuncional del fármaco clorambucilo.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



Fórmula (1)

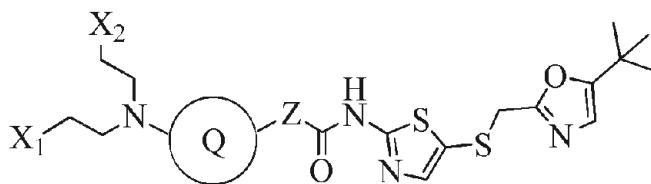
en la que

- 5 cada uno de  $X_1$  y  $X_2$  independientemente es halo o  $OSO_2R_a$ , en la que  $R_a$  es alquilo, alquenoilo o alquinilo;  
 Q es cicloalquilo, cicloalquenoilo, heterocicloalquenoilo, arilo o heteroarilo, cada uno de los cuales  
 independientemente está opcionalmente sustituido con alquilo, alquenoilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo,  
 cicloalquenoilo, heterocicloalquenoilo, arilo, heteroarilo, halo, nitro, oxo,  $-CH=NH$ , ciano, alquil- $R_b$ ,  $CH=NOR_b$ ,  $OR_b$ ,  
 $OC(O)R_b$ ,  $OC(O)OR_b$ ,  $OC(O)SR_b$ ,  $SR_b$ ,  $C(O)R_b$ ,  $C(O)OR_b$ ,  $C(O)SR_b$ ,  $C(O)NR_cR_d$ ,  $SOR_b$ ,  $SO_2R_b$ ,  $NR_cR_d$ ,  
 10 alquil- $NR_cR_d$  o  $N(R_c)C(O)R_d$ , en las que cada uno de  $R_b$ ,  $R_c$  y  $R_d$ , independientemente, es H, alquilo, alquenoilo,  
 alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, halo, ciano, nitro, amino, hidroxilo, alquilamino,  
 haloalquilo o alcoxi;  
 Z se elimina o es  $(CH_2)_m$  en la que m es un número entero de 1 a 10;  
 y cada uno de  $R_1$  y  $R_2$  independientemente es H, alquilo, alquenoilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo,  
 15 cicloalquenoilo, heterocicloalquenoilo, arilo, heteroarilo, halo, nitro, oxo,  $-CH=NH$ , ciano, alquil- $R_b$ ,  $CH=NOR_b$ ,  $OR_b$ ,  
 $OC(O)R_b$ ,  $OC(O)OR_b$ ,  $OC(O)SR_b$ ,  $SR_b$ ,  $C(O)R_b$ ,  $C(O)OR_b$ ,  $C(O)SR_b$ ,  $C(O)NR_cR_d$ ,  $SOR_b$ ,  $SO_2R_b$ ,  $NR_cR_d$ ,  
 alquil- $NR_cR_d$  o  $N(R_c)C(O)R_d$ , en los que:

- cicloalquilo se refiere a un sistema de anillo hidrocarburo saturado que tiene de 3 a 30 átomos de carbono;  
 cicloalquenoilo se refiere a un sistema de anillo hidrocarburo no aromático que tiene 3 a 30 carbonos y uno o más  
 20 dobles enlaces;  
 heterocicloalquilo se refiere a un sistema de anillo no aromático monocíclico de 5-8 miembros, bicíclico de 8-12  
 miembros o tricíclico de 11-14 miembros que tiene uno o más heteroátomos;  
 heterocicloalquenoilo se refiere a un sistema de anillo no aromático monocíclico de 5-8 miembros, bicíclico de  
 8-12 miembros o tricíclico de 11-14 miembros que tiene uno o más heteroátomos y uno o más dobles enlaces;  
 25 arilo se refiere a un sistema de anillo aromático monocíclico de 6 carbonos, bicíclico de 10 carbonos, tricíclico  
 de 14 carbonos;  
 heteroarilo se refiere a un sistema de anillo aromático monocíclico de 5-8 miembros, bicíclico de 8-12 miembros  
 o tricíclico de 11-14 miembros que tiene uno o más heteroátomos;  
 alquilo se refiere a un hidrocarburo lineal o ramificado que contiene 1-20 átomos de carbono;  
 30 alquenoilo se refiere a un hidrocarburo lineal o ramificado que contiene 2-20 átomos de carbono y uno o más  
 dobles enlaces; y  
 alquinilo se refiere a un hidrocarburo lineal o ramificado que contiene 2-20 átomos de carbono y uno o más  
 triples enlaces.

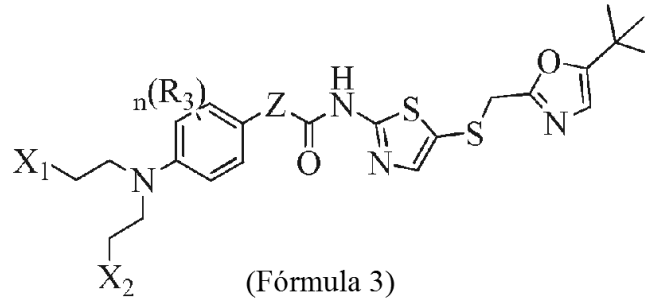
2. El compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que  $R_1$  es H, alquilo,  
 35 alquenoilo o alquinilo y  $R_2$  es H.

3. Un compuesto de la reivindicación 2 representado por la Fórmula (2) o una sal farmacéuticamente aceptable del  
 mismo:



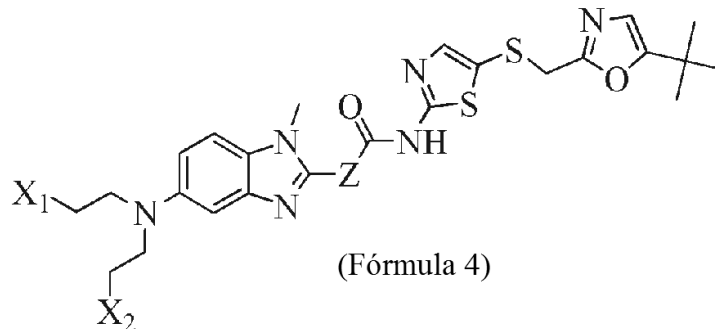
(Fórmula 2)

4. El compuesto de la reivindicación 3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que Q es un arilo o heteroarilo.
5. El compuesto de la reivindicación 4 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que Q es un heteroarilo o arilo de 5-6 miembros.
- 5 6. El compuesto de la reivindicación 5 representado por la Fórmula (3) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo

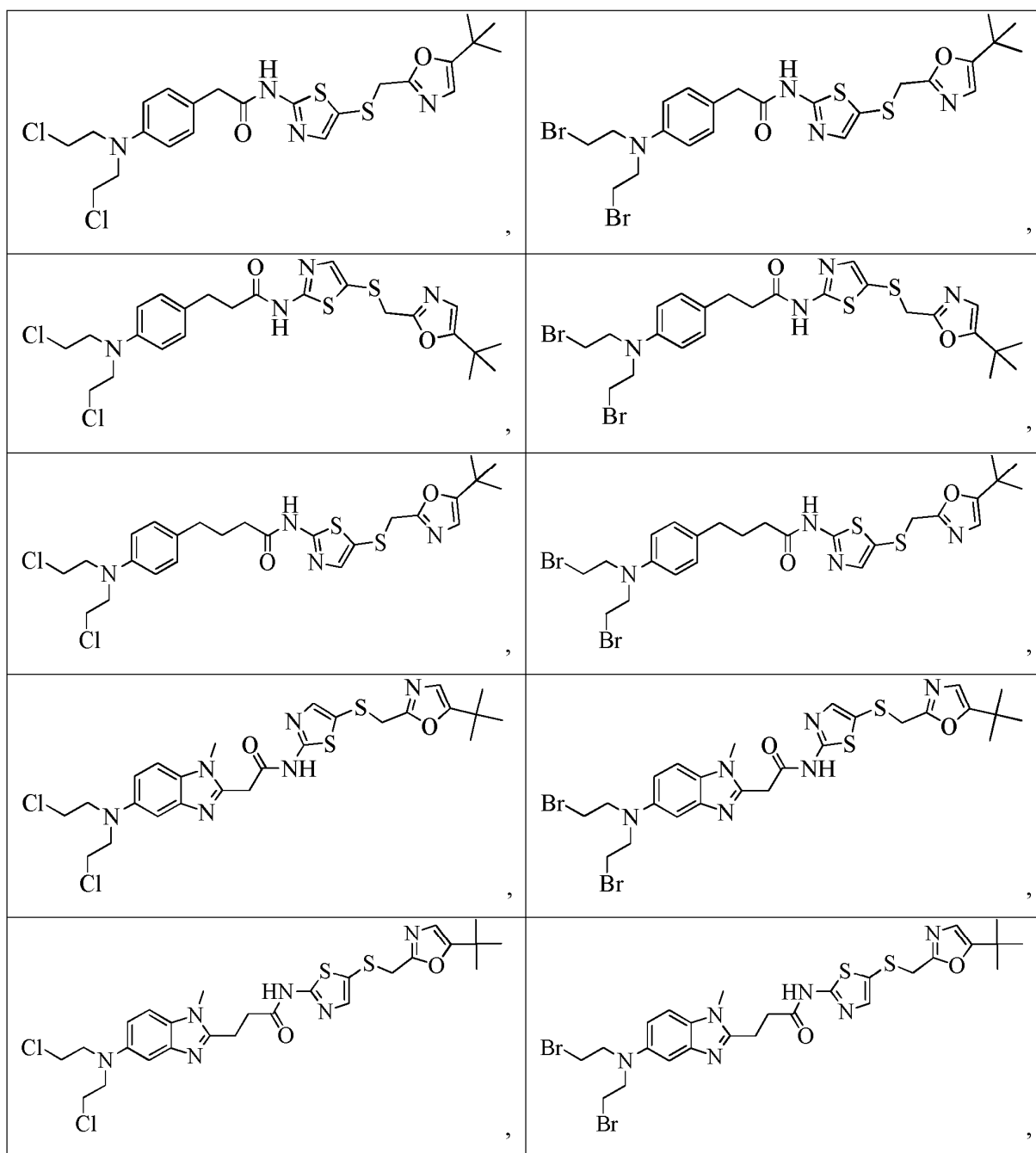


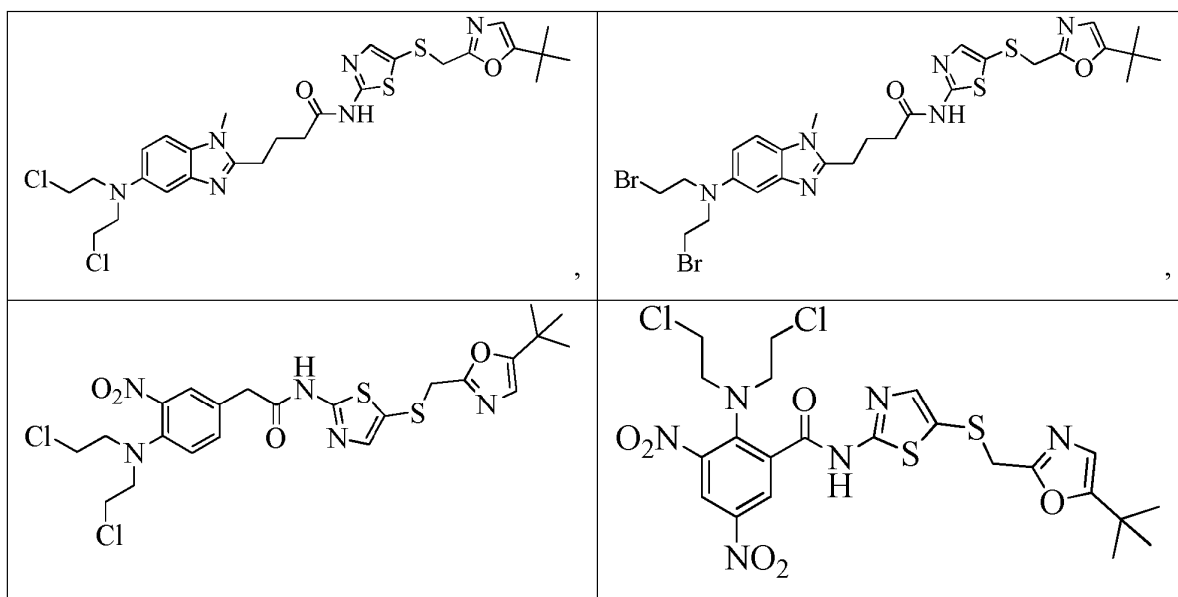
en la que R<sub>3</sub> es H o nitro; n es 0, 1, 2 o 3.

7. El compuesto de la reivindicación 4 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que Q es un heteroarilo o arilo de 9-10 miembros.
- 10 8. El compuesto de la reivindicación 7 representado por la Fórmula (4) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

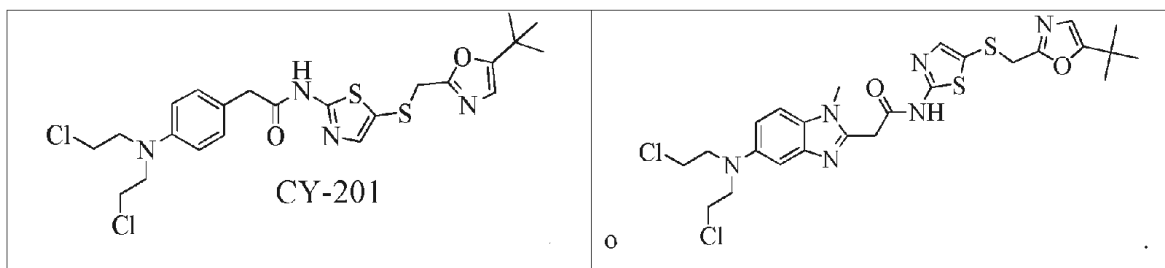


9. Un compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el compuesto es

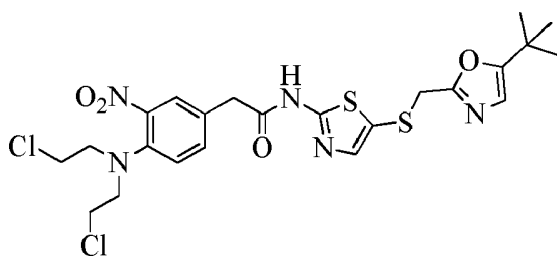




10. Un compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el compuesto es



11. Un compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el compuesto es



5 12. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 13. Un compuesto de la reivindicación 1 o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable para su uso en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad neoplásica o una enfermedad inmunitaria, comprendiendo dicho procedimiento administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de dicho compuesto o dicha sal farmacéuticamente aceptable del mismo.