

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 849**

51 Int. Cl.:

C07D 471/04 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.10.2014 PCT/US2014/062832**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2015 WO15069512**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2014 E 14800188 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 3066099**

54 Título: **Compuestos de pirido[2,3-d]pirimidin-4-ona como inhibidores de la tanquirasa**

30 Prioridad:

07.11.2013 US 201361901023 P

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

26.12.2017

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**CHEDID, MARCIO;
EISSA, HISHAM OMER;
ENGLER, THOMAS ALBERT;
FURNESS, KELLY WAYNE;
RANK, KENNETH B.;
WOODS, TIMOTHY ANDREW y
WROBLESKI, AARON D.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 647 849 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

Compuestos de pirido[2,3-d]pirimidin-4-ona como inhibidores de la tanquirasa

La señalización de Wnt desencadena tres cascadas de señalización intracelular que incluyen la ruta canónica mediada por β -catenina, la polaridad de célula plana no canónica y la ruta Wnt/calcio. La ruta de señalización Wnt canónica conservada evolutivamente regula muchos procesos celulares, que incluyen la proliferación, diferenciación, adhesión y mantenimiento celular. La ruta canónica, que regula los niveles de proteína β -catenina dentro de las células, se inicia cuando los ligandos Wnt se enlazan a los coreceptores (LRP)5/6 de proteínas relacionadas con el receptor de Frizzled y lipoproteína de superficie celular, que a su vez promueven el desplazamiento de la quinasa GSK3 del complejo de destrucción APC/Axin/GSK-3 (poliposis adenomatosa coli (APC), Axin, glucógeno sintasa quinasa $3\alpha/\beta$ (GSK3)). En presencia de enlazamiento de Wnt (estado activo), se activa Desorientada (una proteína en la ruta Wnt) que, a su vez, recluta GSK3 lejos del complejo de destrucción que conduce a la acumulación de β -catenina citosólica, translocación de β -catenina al núcleo, interacción con factores de transcripción de la familia del factor de células T/factor potenciador linfoide (TCF/LEF) y transcripción de genes sensibles a la ruta canónica Wnt. En ausencia de ligandos de Wnt (estado desactivado), la β -catenina citosólica se fosforila constitutivamente y es direccionada a ubiquitinación y degradación por el proteosoma.

Las dos isoformas de tanquirasa humana altamente homólogas, la tankyrasa 1 y 2 (TNKS1 y TNKS2) son miembros de la familia de enzimas poli(ADP-ribosa)polimerasa (PARP) que catalizan la modificación postraduccional de las proteínas usando β NAD⁺ como sustrato para sucesivamente añadir fracciones ADP ribosa sobre proteínas diana (parilación o parsilación). Uno de los sustratos proteicos para las tanquirasas es Axin, un componente limitante de la concentración del complejo de destrucción de P-catenina; la parsilación marca Axin para la degradación y la inhibición de la tanquirasa conduce a la estabilización de Axin, a la inhibición de la señalización de Wnt y a la degradación de la β -catenina.

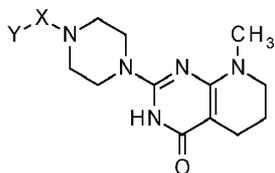
Las mutaciones que activan la ruta de señalización Wnt se encuentran en una amplia gama de cánceres y se cree que contribuyen a la iniciación, mantenimiento y/o progresión del tumor. Por lo tanto, la inhibición de la actividad de la tanquirasa parece ser un enfoque prometedor en el tratamiento de cánceres tales como cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de mama (incluido el cáncer de mama triple negativo), cáncer de ovario, meduloblastoma, melanoma, cáncer de pulmón (incluido cáncer de pulmón de células pequeñas), cáncer de páncreas, cáncer de próstata, glioblastoma, linfoma de células T, linfoma T-linfoblástico, leucemia linfocítica aguda de células T (ALL), linfoma de células del manto, mieloma múltiple, leucemia mieloide crónica y leucemia mieloide aguda.

Se han realizado esfuerzos considerables para identificar agentes farmacéuticos que inhiban la ruta de señalización canónica de Wnt/ β -catenina. Se conocen inhibidores de TNKS1 y TNKS2 tales como WO 2013/117288.

A pesar del documento WO 2013/117288, existe la necesidad de encontrar compuestos que tengan actividad inhibidora de TNKS1 y TNKS2. Existe una necesidad adicional de encontrar compuestos que tengan inhibición selectiva de TNKS1 y TNKS2 sobre otros PARP.

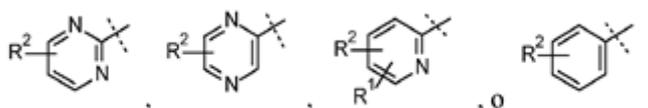
La Figura 1 es un patrón representativo de XRPD para la sal de ácido 8-Metil-2-[4-(pirimidin-2-ilmetil)piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona 4-metilbencenosulfónico, el compuesto del Ejemplo 6.

Un aspecto de la presente invención son compuestos de Fórmula I:



en la que:

Y es:



X es $-\text{CH}_2-$, $-\text{C}(\text{CH}_3)\text{H}-$, o $-\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{H}-$;

R¹ es hidrógeno, hidroxilo, o halo;

R² es hidrógeno, halo, -CN, -CH₃, CF₃, o -OCH₃;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Preferiblemente, un aspecto adicional de la presente invención proporciona compuestos de Fórmula I en la que:

Y es:



5

X es -CH₂-, -C(CH₃)H-, o -C(CH₂CH₃)H-;

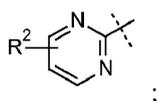
R¹ es hidrógeno, hidroxilo, o halo;

R² es hidrógeno, halo, -CN, -CH₃, CF₃, o -OCH₃;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 Preferiblemente, otro aspecto de la presente invención proporciona compuestos de Fórmula I en la que:

Y es



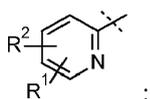
X es -CH₂-, -C(CH₃)H-, o -C(CH₂CH₃)H-;

R² es hidrógeno, halo, -CN, -CH₃, CF₃, o -OCH₃;

15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Otro aspecto preferido de la presente invención proporciona compuestos de Fórmula I en la que:

Y es:



X es -CH₂-, -C(CH₃)H-, o -C(CH₂CH₃)H-;

20 R¹ es hidrógeno, hidroxilo, o halo;

R² es hidrógeno, halo, -CN, -CH₃, CF₃, o -OCH₃;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25 Un aspecto preferido de la presente invención es un compuesto: 8-Metil-2-[4-(pirimidin-2-ilmetil)piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; 8-Metil-2-[4-(1-pirimidin-2-iletill)piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; 2-[4-[(4-Cloropirimidin-2-il)metil]piperazin-1-il]-8-metil-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o 2-[4-[(4-metoxipirimidin-2-il)metil]piperazin-1-il]-8-metil-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 Otro aspecto preferido de la presente invención es un compuesto: 2-[4-[(3-Bromo-2-piridil)metil]piperazin-1-il]-8-metil-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; 2-[4-[(3-Cloro-2-piridil)metil]piperazin-1-il]-8-metil-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; 2-[4-[(3-Fluoro-2-piridil)metil]piperazin-1-il]-8-metil-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o 2-[4-(8-Metil-4-oxo-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)piperazin-1-il]metil]piridin-3-carbonitrilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

35 Un aspecto adicional de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Todavía un aspecto adicional de la presente invención proporciona un compuesto de fórmula I para su uso en un procedimiento para inhibir la Tanquirasa 1 y 2 en un paciente con cáncer en necesidad del mismo, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a dicho paciente.

- 5 Otro aspecto de la presente invención proporciona un compuesto de fórmula I para su uso en un procedimiento para tratar un cáncer que es cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, cáncer de ovario, meduloblastoma, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, glioblastoma, linfoma de células T, linfoma linfoblástico T, leucemia linfocítica aguda de células T (T-ALL), linfoma de células del manto, mieloma múltiple, leucemia mieloide crónica o leucemia mieloide aguda en un paciente que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un aspecto todavía adicional de la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en terapia.

- 15 Otro aspecto de la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de un cáncer que es cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, cáncer de ovario, meduloblastoma, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, glioblastoma, linfoma de células T, linfoma T-linfoblástico, leucemia linfocítica aguda de células T (T-ALL), linfoma de células del manto, mieloma múltiple, leucemia mieloide crónica o leucemia mieloide aguda.

- Un aspecto adicional de la presente invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer que es cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, cáncer de ovario, meduloblastoma, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, glioblastoma, linfoma de células T, linfoma T-linfoblástico, leucemia linfocítica aguda de células T (T-ALL), linfoma de células del manto, mieloma múltiple, leucemia mieloide crónica o leucemia mieloide aguda.

El término "paciente" significa mamífero y "mamífero" incluye, pero no se limita a, un humano.

- El término "cáncer de mama triple negativo" se refiere a un cáncer de mama caracterizado por una muestra tumoral que arrojó resultados negativos para receptores de estrógeno (ER), receptores de progesterona (PR) y receptores 2 de factor de crecimiento epidérmico hormonal (HER2/neu).

- "Cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad efectiva" significa la dosificación de un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéutica que contiene un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, necesaria para inhibir la ruta de señalización Wnt/ β -catenina en un paciente con cáncer y bien sea destruyen las células cancerosas objetivo o ralentizan o detienen la progresión del cáncer en un paciente. Las dosificaciones anticipadas de un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo están en el intervalo de 0,1 a 200 mg/paciente/día. Las dosis preferidas se anticipan en el intervalo de 1 a 175 mg/paciente/día. Se anticipa que las dosis más preferidas están en el intervalo de 5 a 150 mg/paciente/día. La dosificación exacta requerida para tratar a un paciente y la duración del tiempo de tratamiento serán determinados por un médico en vista de la etapa y la gravedad de la enfermedad, así como las necesidades específicas y la respuesta del paciente individual. Aunque se expresa como dosificación por día, el régimen de dosificación puede ajustarse para proporcionar un beneficio terapéutico más óptimo para un paciente y para gestionar y/o mejorar los efectos farmacodinámicos indeseables. Además de la dosificación diaria, puede ser apropiado la dosificación cada dos días (Q2D); día por medio durante un período de cinco días seguido de dos días sin dosificación (T.I.W.); o cada tres días (Q3D).

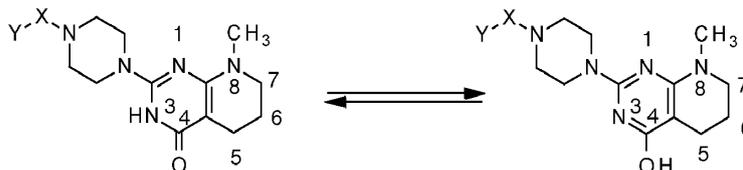
Los términos "tratamiento", "trato" y "tratar" pretenden incluir todo el espectro de intervención para el cáncer del cual el paciente está sufriendo, tal como la administración del compuesto activo para aliviar, ralentizar o reversar uno o más de los síntomas y para retrasar la progresión del cáncer, incluso si el cáncer no se elimina realmente. El paciente que se va a tratar es un mamífero, en particular un ser humano.

- Un compuesto de la presente invención se formula preferiblemente como una composición farmacéutica usando un vehículo farmacéuticamente aceptable y se administra por una variedad de rutas. Preferiblemente, tales composiciones son para administración oral. Tales composiciones farmacéuticas y procesos para prepararlos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (A. Gennaro, et al., eds., 19th ed., Mack Publishing Co., 1995). En una realización particular, la composición farmacéutica comprende 8-metil-2-[4-(pirimidin-2-ilmetil)piperazin-1-il]-5,6,7,8-tetrahidropirido [2,3-d] pirimidina-4(3H)-ona o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos particularmente para el tratamiento de un tipo específico de cáncer.

Un compuesto de la presente invención es capaz de reaccionar con un número de ácidos inorgánicos y orgánicos para formar sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables. Tales sales farmacéuticamente aceptables y la metodología común para prepararlas son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, P. Stahl, *et al.*, HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); S.M. Berge, *et al.*, "Pharmaceutical Salts," Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 66, No. 1, January 1977.

Un compuesto de la presente invención, tal como el Ejemplo 1, se denomina: 8-metil-2-[4-(pirimidin-2-ilmetil)piperazin-1-il]-5,6,7,8-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4(3H)-ona (IUPAC); y también puede ser denominado: pirido[2,3-d]pirimidin-4(3H)-ona, 5,6,7,8-tetrahidro-8-metil-2-[4-(2-pirimidinilmetil)-1-piperazinil]- (CAS); y otros nombres pueden usarse para identificar inequívocamente un compuesto de la presente invención.

- 10 Se entenderá que los compuestos de Fórmula I se representan como un solo estereoisómero. Un sustituyente definido particular puede dar lugar a un centro quiral que proporciona una mezcla racémica o dos estereoisómeros. Como se usa en la presente memoria, a menos que se indique otra cosa, las referencias a un compuesto específico pretenden incluir estereoisómeros individuales y mezclas racémicas que incluyen el compuesto nombrado. Los estereoisómeros específicos pueden prepararse por síntesis estereoespecífica usando materiales de partida enantioméricamente puros o enriquecidos. Los estereoisómeros específicos bien sea de materiales de partida, intermedios o mezclas racémicas se pueden resolver mediante técnicas bien conocidas en la técnica, tales como las encontradas en Stereochemistry of Organic Compounds, E. I. Eliel and S. H. Wilen (Wiley 1994) and Enantiomers, Racemates, and Resolutions, J., Jacques, A. Collet, and S. H. Wilen (Wiley 1991), que incluyen cromatografía sobre fases estacionarias quirales, resoluciones enzimáticas, o cristalización fraccionada o cromatografía de diastereómeros formados para ese fin, tales como sales diastereoméricas. Cuando se aísla o resuelve un compuesto quiral en sus isómeros, pero no se determinan configuraciones absolutas o rotaciones ópticas, los isómeros se designan arbitrariamente como isómero 1 e isómero 2 que corresponden al orden que cada uno eluye de la cromatografía quiral y si la cromatografía quiral se inicia temprano en la síntesis, la misma designación se aplica a intermedios y ejemplos subsecuentes.
- 25 Un experto en la técnica reconocerá que los compuestos de Fórmula I pueden existir en equilibrio tautomérico. Para fines ilustrativos, el equilibrio se muestra a continuación:



Por conveniencia, la forma 4-oxo se representa en la Fórmula I, y la nomenclatura correspondiente se usa a lo largo de esta especificación. Sin embargo, tales representaciones incluyen la forma hidroxil tautomérica correspondiente.

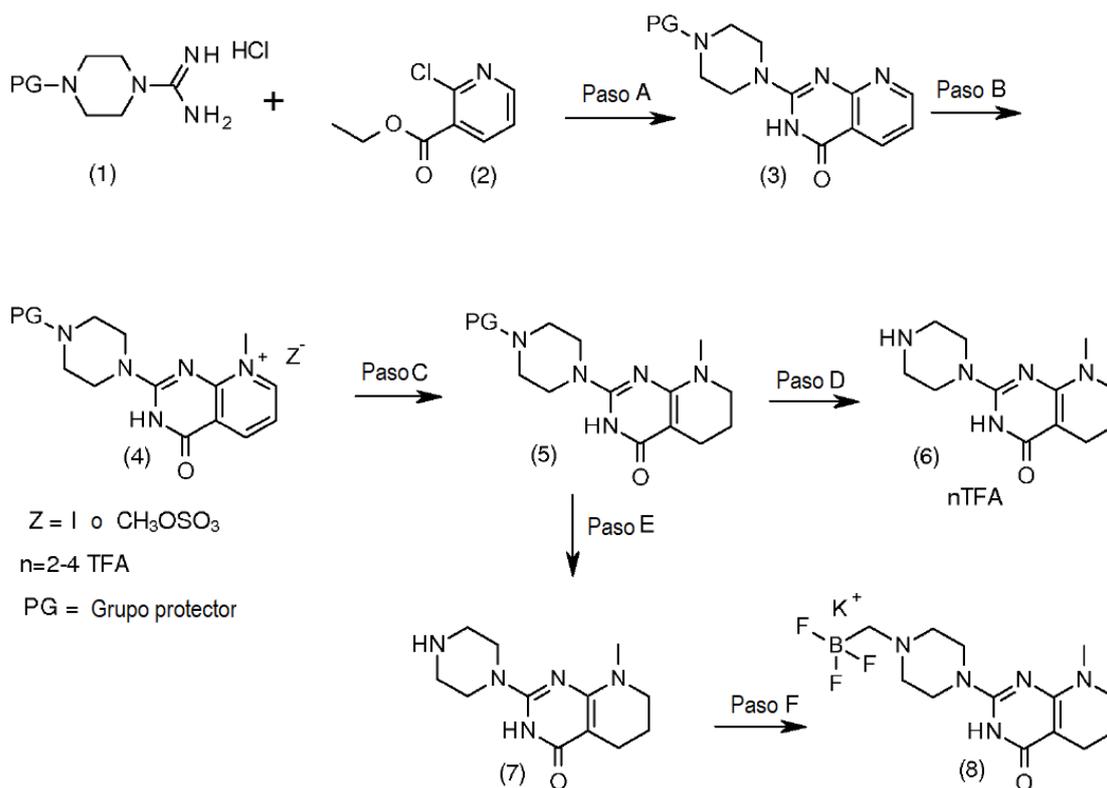
- 30 Los compuestos empleados como materiales de partida iniciales en la síntesis de compuestos de la presente invención son bien conocidos y, en la medida en que no están disponibles comercialmente, se sintetizan fácilmente usando referencias específicas proporcionadas, mediante procedimientos estándar comúnmente empleados por los expertos en la técnica, o se encuentran en textos de referencia generales.
- 35 Los ejemplos de procesos y procedimientos conocidos incluyen los descritos en textos de referencia generales tales como Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers Inc, 1989; Compendium of Organic Synthetic Methods, Volúmenes 1-10, 1974-2002, Wiley Interscience; Advanced Organic Chemistry, Reactions Mechanisms, and Estructura, 5a Edición, Michael B. Smith and Jerry March, Wiley Interscience, 2001; Advanced Organic Chemistry, 4a Edición, Parte B, Reactions and Synthesis, Francis A. Carey and Richard J. Sundberg, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2000, etc., y referencias citadas en este documento.
- 40 Adicionalmente, ciertos compuestos intermedios descritos en los siguientes esquemas pueden contener uno o más grupos protectores de nitrógeno. El grupo protector variable puede ser el mismo o diferente en cada caso, dependiendo de las condiciones de reacción particulares y de las transformaciones particulares que se van a realizar. Las condiciones de protección y desprotección son bien conocidas por los expertos en la técnica y se describen en la bibliografía (véase, por ejemplo, "Greene's Protective Groups in Organic Synthesis", cuarta edición, por Peter GM Wuts and Theodora W. Greene, John Wiley and Sons, Inc. 2007).

Las abreviaturas usadas en la presente memoria se definen de acuerdo con Aldrichimica Acta, vol. 17, No. 1, 1984. Otras abreviaturas se definen como sigue: "APC" se refiere a poliposis coli adenomatosa; "BID" se refiere a dosificación dos veces al día; "NAD+ biotinilado" se refiere a 6-biotina-17-nicotinamida-adenina-dinucleótido; "BOC" se refiere a tert-butiloxycarbonilo; "DCM" se refiere a diclorometano; "DMF" se refiere a dimetilformamida; "DMAP" se refiere a 4-dimetilaminopiridina; "DMEM" se refiere al Medio de Eagle Modificado de Dulbecco; "DMSO" se refiere a dimetilsulfóxido; "DPBS" se refiere a solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco; "DTT" se refiere a ditiotreitól; "EDCI" se refiere a 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; "EGFP" se refiere a Proteína Fluorescente Verde Mejorada; "EtOAc" se refiere a acetato de etilo; "FBS" se refiere a Suero de Bovino Fetal; "Etiqueta Flag" se

5 refiere al péptido Flag DYKDDDDK, terminal N a Terminal C (SEC ID NO: 6); "HEK" se refiere al riñón embrionario humano; "HEPES" se refiere a ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico; "HOAc" se refiere a ácido acético; "HRP" se refiere a peroxidasa de rábano picante; "IPAm" se refiere a isopropilamina; "MEM" se refiere al Medio Esencial Mínimo; "MeOH" se refiere a metanol; "MOI" se refiere a la multiplicidad de infección; "NCBI" se refiere al National Center for Biotechnology Information; "PBS" se refiere a solución salina tamponada con fosfato; "RPMI" se refiere al Roswell Park Memorial Institute; "SCX" se refiere a una columna de purificación de ácido fenil sulfónico de intercambio catiónico fuerte enlazado a sílice; "SCX-2" se refiere a una columna de purificación de ácido propilsulfónico de intercambio catiónico fuerte enlazado a sílice; "SFC" se refiere a cromatografía de fluido supercrítico; "TBS" se refiere a solución salina tamponada Tris; "THF" se refiere a tetrahidrofurano; "TBME" se refiere a tert-butil metil éter; "Peroxidasa de TMB" se refiere a 3,3',5,5'-tetrametilbencidina; "Tris" se refiere a tris(hidroximetil)aminometano, y "X-Phos" se refiere a 2-(diciclohexilfosfino)-2',4',6'-trisopropilbifenilo.

15 Los compuestos de la presente invención, o las sales de los mismos, se pueden preparar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, algunos de los cuales se ilustran en los Esquemas, Preparaciones y Ejemplos a continuación. Los pasos sintéticos específicos para cada una de las rutas descritas se pueden combinar de diferentes maneras, o junto con pasos de diferentes esquemas, para preparar compuestos de Fórmula I, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los productos de cada etapa en los esquemas a continuación pueden recuperarse por procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica, que incluyen extracción, evaporación, precipitación, cromatografía, filtración, trituración y cristalización. En los esquemas a continuación, todos los sustituyentes a menos que se indique otra cosa, son como se definieron previamente. Los reactivos y materiales de partida están fácilmente disponibles para una persona de experiencia normal en la técnica.

Esquema 1



El esquema 1 representa la formación de 8-metil-2-piperazin-1-il-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona (6) como una sal de TFA, el material neutro (7) y la sal metil trifluoroborato de (7).

25 En el Paso A, se obtiene una 2-piperazin-1-il-3H-pirido [2,3-d] pirimidin-4-ona protegida (3) a partir de la ciclación de una sal de clorhidrato de piperazina-1-carboxamida protegida (1) con 2-cloronicotinato de etilo (2). La reacción transcurre en un disolvente inerte, tal como DMF, en presencia de una base fuerte, tal como tert-butoxido de potasio, a una temperatura de 50-120 °C. El grupo protector preferido es un tert-butiloxycarbonilo pero podrían usarse otros grupos protectores de carbamato.

30 En el Paso B, una 2-piperazin-1-il-3H-pirido[2,3-d]pirimidin-4-ona protegida (3) se metila usando yoduro de metilo para dar la sal cuaternaria, yoduro de 8-metil-2-piperazin-1-il-3H-pirido[2,3-d]pirimidin-8io-4-ona (4) (Z es I, Esquema 1). La reacción transcurre en un autoclave en un disolvente inerte, tal como THF o dioxano, a una temperatura de

50-120 °C durante 4 a 24 h. Alternativamente, la sal de sulfato de metilo se puede formar añadiendo sulfato de dimetilo al compuesto (3) en un disolvente aprótico polar tal como DMF con calentamiento a aproximadamente 60-80 °C. La solución se transfiere a temperatura ambiente a un recipiente que contiene TMBE para precipitar el producto (4) para Z es CH₃OSO₃.

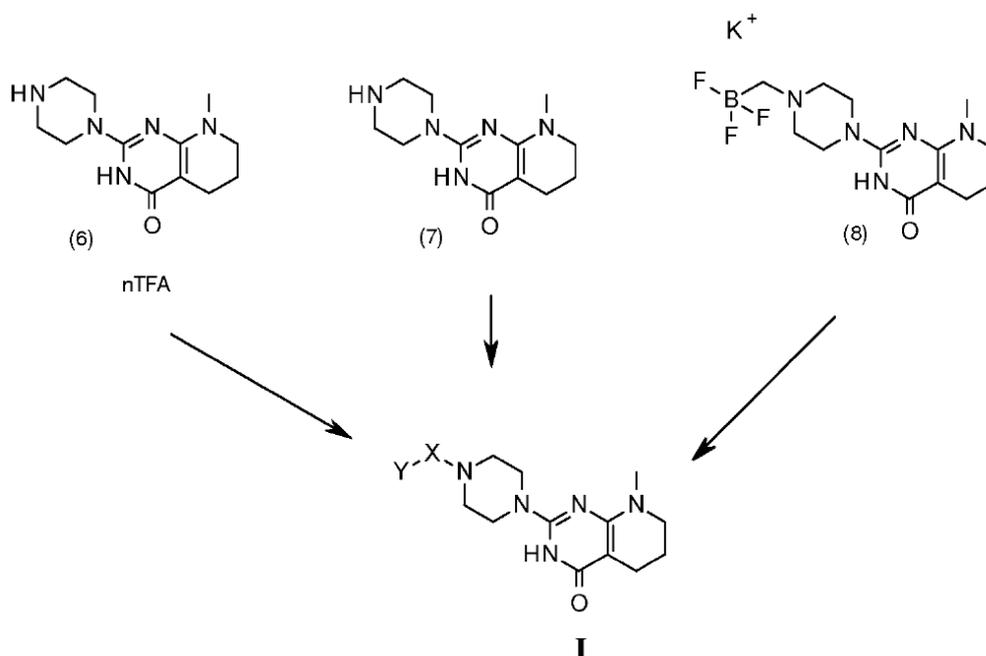
- 5 En el Esquema 1, Paso C, la sal cuaternaria (4, Z es I) se reduce para proporcionar 8-metil-2-piperzino-1-il-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona protegida (5). La reducción puede realizarse usando un agente reductor, tal como cianoborohidruro de sodio en una mezcla de DMF/TFA de aproximadamente 10/1. El TFA y el agente reductor se agregan a una temperatura de 0-5 °C, no permitiendo que la temperatura se eleve por encima de 15 °C. Entonces se deja que la reacción transcurra de 12 a 24 h a TA. Se pueden agregar cantidades adicionales de TFA y agente reductor con enfriamiento para guiar la reacción hasta su finalización.

Alternativamente, el Paso C puede realizarse reduciendo la sal de sulfato de metilo (4, Z es CH₃OSO₃) con un agente reductor tal como óxido de platino e hidrogenándose a aproximadamente 1.054 kPa en un disolvente polar tal como MeOH para dar el compuesto (5).

- 15 En el Paso D, el anillo de piperazino se desprotege para proporcionar 8-metil-2-piperazino-1-il-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona (6). Las condiciones ácidas para la eliminación de grupos protectores tales como BOC son bien conocidas en la técnica. Las condiciones preferidas usan una mezcla 1/1 de DCM y TFA a TA durante un período de 2 a 24 h para dar el producto como una sal de TFA con 2-4 equivalentes de TFA presentes. La forma de sal no está caracterizada, pero se calcula por peso.

- 20 El Paso E muestra la desprotección del grupo protector como se discutió anteriormente para dar la sal de TFA que puede ser neutralizada con una resina de intercambio iónico o una columna SCX usando amoníaco/MeOH para dar el material neutro (7). El nitrógeno del anillo de pirazina puede convertirse en la sal de trifluoroborato de metilo usando trifluoroborato de bromometilo de potasio en un disolvente tal como THF para dar una forma de sal como se muestra en el Paso F, compuesto 8.

Esquema 2



- 25 El Esquema 2 ilustra la formación de compuestos de Fórmula I a partir de la forma de sal (6), el material neutro (7) o la sal de trifluoro boranato de metilo (8). Hay muchas maneras de formar compuestos de Fórmula I a partir de los intermediarios (6), (7) y (8) tales como alquilación, alquilación reductiva o acoplamiento de Suzuki dependiendo de la disponibilidad o síntesis de aldehídos o cetonas apropiados para alquilaciones reductivas, reactivos de haluro apropiados para alquilaciones o reactivos de ácido borónico para acoplamiento de Suzuki. La sal de amina de TFA (6) o la amina neutra (7) pueden usarse en alquilaciones reductivas o alquilación para dar compuestos de Fórmula I.
- 30 Las alquilaciones reductivas son bien conocidas en la técnica e implican la reacción de un aldehído con una amina usando un agente reductor tal como cianoborohidruro de sodio en un disolvente apropiado tal como DMF a temperatura ambiente u otros agentes reductores tales como triacetoxiborohidruro de sodio en un disolvente apropiado tal como DCM a temperatura ambiente. Si se desea, se puede usar una cantidad catalítica de metanol

con DMF y cianoborohidruro de sodio para impulsar la reacción más rápido. Se puede usar un haluro de aril metilo apropiado para alquilar la sal de amina de TFA (6) o el material neutro (7) usando una base orgánica apropiada tal como trietilamina o una base inorgánica tal como carbonato de potasio en un disolvente tal como acetonitrilo o DCM. El yoduro de sodio puede usarse in situ para convertir un sustrato de clorometilo en un sustrato de yodometilo más reactivo para completar la alquilación de la pirazina, piridina o pirimidina apropiadas. Las reacciones se pueden agitar a temperatura ambiente durante 1-3 días para dar compuestos de Fórmula I.

El compuesto (8) se puede acoplar con haluros de arilo bajo condiciones de acoplamiento cruzado catalizadas por paladio de Suzuki para formar productos sustituidos con N-metilheteroarilo. El compuesto 8, la sal metil trifluoroborato, proporciona otra variación para preparar compuestos de Fórmula I. El experto en la técnica reconocerá hay una variedad de condiciones útiles para facilitar tales reacciones de acoplamiento cruzado. Por consiguiente, un reactivo de paladio adecuado incluye acetato de paladio (II) y un reactivo organofosforado adecuado tal como X-phos con una base tal como carbonato de cesio, carbonato de sodio, carbonato de potasio o monohidrato de fosfato de potasio tribásico. Otros reactivos de organofósforo y paladio adecuados incluyen cloruro de bis(trifenilfosfina)paladio (II), tris(dibencilidenacetona)dipaladio (0) con triciclohexilfosfina, cloruro de (1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno)paladio (II) o tetrakis(trifenilfosfina) de paladio.

En un paso opcional, se puede formar una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de Fórmula I, tal como una sal de hidrocloreto, por reacción de un compuesto de base libre de Fórmula I con un ácido apropiado en un disolvente adecuado bajo condiciones estándar. Adicionalmente, la formación de tales sales puede ocurrir simultáneamente después de la desprotección de un grupo protector de nitrógeno.

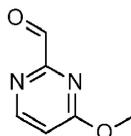
Las siguientes preparaciones y ejemplos ilustran además la invención. A menos que se indique lo contrario, los compuestos ilustrados en la presente memoria se nombran y numeran usando Accelrys® Draw versión 4.0 (Accelrys, Inc., San Diego, CA), IUPACNAME ACDLABS o ChemDraw® Ultra 12.0.

Descripción general del procedimiento de purificación en fase reversa

Sistema: Agilent 1200 LCM/MS equipado con el espectrómetro de masas Detector Selectivo Masivo (MSD) y el automuestreador Leap/recolector de fracciones; Columna: Phenomenex Gemini-NX de 75 x 30 mm, columna de tamaño de partícula de 5 µ con protector de 10 x 20 mm; Sistema de disolvente: A: bicarbonato de amonio 10 mM, pH 10 como fase acuosa, B: ACN como fase orgánica; Caudal: 85 ml/min; Procedimiento: El gradiente para cada procedimiento se designa en el nombre del procedimiento como el % B de inicio- % B final (por ejemplo, como en pH alto 13-48). El gradiente se establece de la siguiente manera: 0-1 min (mantener al % B de inicio), 1-8 min (gradiente desde comenzar % B de inicio- % B final), 8-8,1 min (rampa desde el % B final hasta 100 % B), 8,1-9 min (mantener 100 % B).

Preparación 1

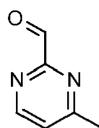
4-Metoxipirimidina-2-carbaldehído



Combinar 4-metoxipirimidin-2-metanol (300 mg, 2,14 mmol) y cloruro de oxalilo (1 ml, 2,0 M en DCM) en DCM (5 ml) y se enfría hasta -78 °C. Añada DMSO (0,33 ml, 4,71 mmol) y agitar la mezcla durante 2 h. Añada trietilamina (0,66 ml, 4,71 mmol) y calentar la mezcla hasta temperatura ambiente durante la noche. Agregar agua (5 ml), agitar durante 1 hora y extraer con DCM (2 x 50 ml). Secar los extractos orgánicos combinados sobre sulfato de sodio, filtrar y concentrar el filtrado bajo presión reducida para dar un sólido de color marrón claro y usar sin purificación adicional. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ pico de aldehído 9,94 (s, ¹H), los picos restantes no asignables debido a la mezcla de más de un compuesto.

Preparación 2

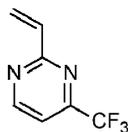
4-Metilpirimidin-2-carbaldehído



Preparar 4-metilpirimidin-2-carboxaldehído esencialmente como se describe en la Preparación 1 usando (4-metilpirimidin-2-il)metanol para obtener el compuesto del título y usar sin purificación adicional. ¹H RMN, 400 MHz, CDCl₃) δ 10,06 (s, ¹H), 8,79 (d, ¹H, J = 5,2 Hz), 7,33 (d, ¹H, J = 4,8 Hz), 2,65 (s, 3H)

Preparación 3

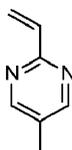
4-(Trifluorometil)-2-vinil-pirimidina



- 5 Combinar 2-cloro-4- (trifluorometil) pirimidina (250 mg, 1,37 mmol), viniltrifluoroborato de potasio (184 mg, 1,37 mmol), carbonato de cesio (1,34 g, 4,11 mmol), THF (5 ml) y agua (0,5 ml) en un vial Se desgasifica con una corriente de nitrógeno durante 1 min. Agregue cloruro de bis(trifenilfosfina)paladio (II) (48 mg, 0,069 mmol), selle el vial y caliente la mezcla a 85 °C durante 3 días. Enfriar, diluir la mezcla con DCM, filtrar a través de tierra de diatomáceas y concentrar el filtrado bajo presión reducida para dar el compuesto del título (0,200 g, 84 %) que se usa sin purificación adicional. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,93 (d, ¹H, J = 5,0 Hz), 7,43 (d, ¹H, J = 5,0 Hz), 6,94 (ABX, ¹H, J_{AX} = 17,3, J_{BX} = 10,47), 6,74 (ABX, ¹H, J_{AB} = 1,54, J_{AX} = 17,3), 5,84 (ABX, ¹H, J_{AB} = 1,54, J_{BX} = 10,47).

Preparación 4

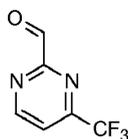
5-Metil-2-vinil-pirimidina



- 15 Preparar el compuesto del título esencialmente como se describe en la Preparación 3 usando 2-cloro-5-metilpirimidina y usar sin purificación adicional (220 mg, 94 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,38 (s, 2H), 6,73 (ABX, ¹H, J_{AX} = 17,4, J_{BX} = 10,7), 6,41 (ABX, ¹H, J_{AB} = 1,8, J_{AX} = 17,4), 5,54 (ABX, ¹H, J_{AB} = 1,8, J_{BX} = 10,7), 2,16 (s, 3H).

Preparación 5

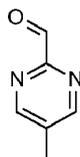
4-(Trifluorometil)pirimidina-2-carbaldehído



- 20 Combinar 4-(trifluorometil)-2-vinil-pirimidina (200 mg, 0,84 mol) con peryodato de sodio (737 mg, 3,45 mmol) y tetróxido de osmio, polímero enlazado (292 mg, 0,057 mmol) en dioxano (3 ml) y agua (1 ml) y agitar la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Diluir la mezcla con EtOAc (5 ml) y agua (5 ml). Filtrar la mezcla a través de lana de vidrio y separar las capas. Secar la capa orgánica sobre sulfato de magnesio, filtrar y concentrar el filtrado para dar el compuesto del título (40 mg, 20 %). Utilice el material crudo sin purificación adicional. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ aldehído 10,16 (s, ¹H), los picos restantes no asignables debido a la mezcla de más de un compuesto.

Preparación 6

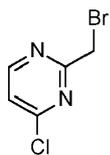
5-Metilpirimidin-2-carbaldehído



- 30 Preparar 5-metilpirimidina-2-carbaldehído esencialmente como se describe en la Preparación 5, usando 2-cloro-5-metil-pirimidina para dar el compuesto del título (90 mg, 44 %) y usar sin purificación adicional. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 10,06 (s, ¹H), 8,79 (s, 2H), 2,42 (s, 3H).

Preparación 7

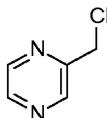
2-(Bromometil)-4-cloro-pirimidina



5 Combine 2-metil-4-cloropirimidina (200 mg, 1,55 mmol), tetracloruro de carbono (5 mL), N-bromosuccinimida (304 mg, 1,71 mmol) y peróxido de benzoilo (38 mg, 1,6 mmol) en un vial, purgar con nitrógeno durante 2 minutos, sellar y calentar a 80 °C durante la noche. Use la mezcla de reacción cruda sin purificación adicional. GC-MS m/e: (⁷⁹Br/⁸¹Br 205/207 (M⁺).

Preparación 8

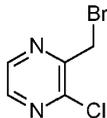
2-(Clorometil)pirazina



10 Disolver 2-pirazinilmetanol (2,0 g, 18,1 mmol) en DCM (200 ml) y se enfriar hasta 0 °C mientras se agita bajo nitrógeno. Agregue cloruro de tionilo (4,63 ml, 63,6 mmol) gota a gota durante 10 minutos, y deje calentar hasta 25 °C. Agitar a temperatura ambiente durante 16 h. Concentre la mezcla y luego diluya con DCM. Lavar la solución cruda con NaHCO₃ saturado, secar sobre MgSO₄, filtrar y concentrar. Disolver el residuo crudo en DCM y purificar por cromatografía instantánea en gel de sílice (hexano/EtOAc, gradiente de 95:5 a 100 % de EtOAc) para dar el compuesto del título como un aceite de color amarillo pálido. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4,67 (s = 2H), 8,50-8,55 (m, 2H), 8,73 (s, ¹H).

Preparación 9

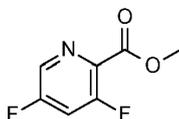
2-(Bromometil)-3-cloro-pirazina



20 Añadir juntos 2-cloro-3-metil-pirazina (5,0 g, 38,9 mmol), N-bromosuccinimida (6,92 g, 38,9 mmol), peróxido de benzoilo (0,471 g, 1,94 mmol) y tetracloruro de carbono (50 ml) y calentar a reflujo bajo nitrógeno durante 16 h. Enfriar la mezcla de reacción hasta 25 °C y diluir con hexanos. Filtrar la mezcla, concentrar el líquido bajo presión reducida, y purificar mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice (hexano/EtOAc, 95:5 con gradiente a 40:60) para dar el compuesto del título como un aceite de color marrón (3,93 g, 49 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4,66 (s = 2H), 8,32 (d, J = 2,4 Hz, ¹H), 8,47 (d, J = 2,4 Hz, ¹H).

Preparación 10

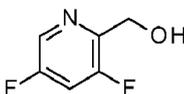
3,5-difluoropiridin-2-carboxilato de metilo



30 Añadir juntos ácido 3,5-difluoropiridin-2-carboxílico (1,4 g, 8,8 mmol) y DCM (30 ml) y enfriar hasta 0 °C. Añadir MeOH (3 ml), DMAP (1,32 g, 10,6 mmol) y EDCI (2,1 g, 10,6 mmol). Permita que la mezcla se caliente hasta temperatura ambiente y agite durante la noche. Se concentra la mezcla de reacción bajo presión reducida y se purifica el residuo por cromatografía sobre gel de sílice (elución con 10/1 de éter de petróleo/EtOAc) para dar el compuesto del título (1,03 g, 72 %). LC-ES/MS m/z 174 (M+H)⁺.

Preparación 11

(3,5-Difluoro-2-piridil)metanol

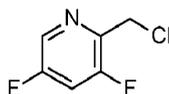


35

Añadir juntos 3,5-difluoropiridin-2-carboxilato de metilo (1,0 g, 4,6 mmol), THF (10 ml) y borohidruro de litio 2 M en THF (15 ml, 23 mmol). Agite la mezcla a temperatura ambiente durante 2 días. Se concentra bajo presión reducida y se purifica el residuo mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con DCM para dar el compuesto del título (0,448 g, 60 %).

5 Preparación 12

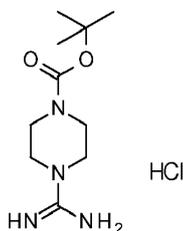
2-(Clorometil)-3,5-difluoropiridina



10 Añadir juntos (3,5-difluoro-2-piridil)metanol (200 mg, 1,4 mmol), DCM (4 ml), DMF (0,1 ml) y cloruro de tionilo (1 ml) y agitar la mezcla durante 4 horas. Ajustar el pH a aproximadamente 7,0 con bicarbonato de sodio acuoso 4 M y extraer la mezcla con DCM (3 x 50 ml). Se combinan las porciones orgánicas, se secan sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra y se concentra para dar el compuesto del título (182 mg, 81 %) como un aceite de color naranja.

Preparación 13

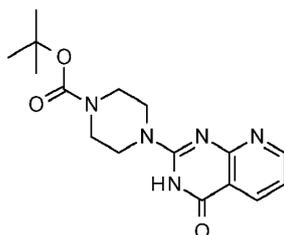
Clorhidrato de 4-carbamimidoilpiperazin-1-carboxilato de tert-butilo



15 Cargar un reactor encamisado de 10 l con piperazin-1-carboxilato de tert-butilo (1500 g, 8,054 mol) y DMF (4,05 l). Revuelva hasta que se obtenga una solución. Añadir 1 H-pirazol-1-carboxamida HCl (1180 g, 8,054 mol) seguido de diisopropilamina (1041 g, 8,054 mol) durante 15 min a 22 hasta 28 °C. Calentar a 55 hasta 60 °C durante 5 h y luego enfriar hasta 20 °C. Transfiera la mezcla de reacción a un reactor encamisado de 50 l que contiene TBME (30 l) durante 15 hasta 20 minutos y enjuague las líneas de transferencia con DMF (400 ml). Agite la suspensión durante 1 hora a 20 °C y luego filtre a través de tres embudos Buchner de 26 cm separados. Lavar cada torta de producto con TMBE (2 x 1000 ml) y secar en un horno de vacío a 60 °C durante la noche para dar el compuesto del título (1898 g, 89 %) como un sólido blanco. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1,41 (s, 9H), 3,42-3,50 (m, 4H), 3,33-3,42 (m, 4H), 7,77 (s, 4H).

Preparación 14

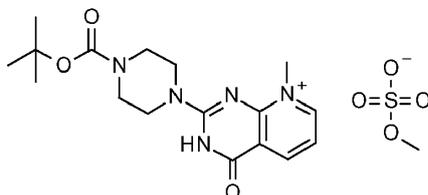
25 4-(4-oxo-3H-pirido[2,3-d]pirimidin-2-il)piperazin-1-carboxilato de tert-butilo



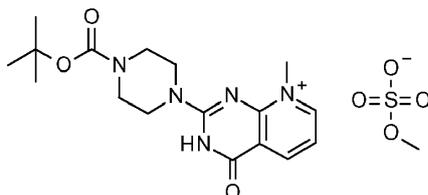
30 Se carga un matraz de fondo redondo de 22 l con clorhidrato de 4-carbamimidoilpiperazin-1-carboxilato de tert-butilo (1897 g, 7,165 mol), DMF (10,1 l) y 2-cloronicotinato de etilo (1266 g, 6,824 mol). Agregue tert-butoxido de potasio (1293 g, 11,52 mol) en porciones durante 55 minutos mientras permite que la temperatura suba gradualmente de 17 hasta 62 °C. Calentar la reacción a 100 °C durante 2,5 h. - Se enfría la mezcla de reacción hasta 20 °C y se transfiere a un reactor encamisado de 30 l que contiene agua (15,2 l) usando DMF (350 ml) para enjuagar el reactor y las líneas de transferencia. Introducir ácido clorhídrico 3 N (1,52 l) hasta que se obtenga un pH de 5 a 6 y agitar la suspensión durante 2 horas a 20 °C. Recoja el producto por filtración a través de tres embudos Buchner de 26 cm separados y lave cada torta con agua (3 x 1,5 l). Combine las tortas, suspéndalas en agua (15,0 l) y revuelva durante 60 minutos a 20 °C. Recoja el producto por filtración a través de dos embudos Buchner de 26 cm separados y lave la torta con agua (2 x 1,5 l). Secar el sólido en un horno de vacío a 60 °C durante 24 horas para dar el compuesto del título (1332 g, 59 %) como un sólido amarillo. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1,43 (s, 9H), 3,36-3,49 (m, 4H), 3,62-3,76 (m, 4H), 7,13-7,20 (m, 1 H), 8,22-8,27 (m, ¹H), 8,62 - 8,70 (m, ¹H).

Preparación 15

4-(8-metil-4-oxo-3H-pirido[2,3-d]pirimidin-8-io-2-il)piperazin-1-carboxilato de tert-butilo, metil sulfato



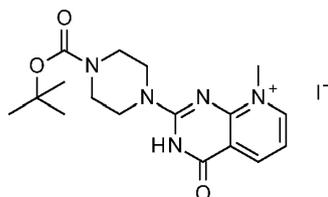
- 5 Cargar un reactor encamisado de 20 l con 4-(4-oxo-3H-pirido[2,3-d]pirimidin-2-il)piperazin-1-carboxilato de tert-butilo (1331 g, 4,017 mol) y DMF (6,66 l). Agregue dimetilsulfato (583 g, 2,83 mol) durante 5-10 min y observe una ligera exotermia hasta 38 °C. Calentar la solución a 63 hasta 73 °C durante 30 minutos. A continuación, introduzca dimetilsulfato adicional (50,7 g, 0,402 mol) y caliente a 68 hasta 73 °C durante 30 min. La muestra de la reacción muestra un 2,0 % de material de partida restante. Agregar dimetilsulfato adicional (50,7 g, 0,402 mol) y calentar a 68 hasta 73 °C. La muestra de nuevo muestra el restante 1.3 % del material de partida. Se enfría la reacción hasta 20 °C
- 10 y se transfiere durante 20 hasta 30 minutos a un reactor de camisa de 50 l que contiene TBME (26,6 l), 4-(8-metil-4-oxo-3H-pirido[2,3-d]pirimidin-8-io-2-il)piperazin-1-carboxilato de tert-butilo y semillas (1 g) usando DMF (300 ml) para enjuagar el reactor y las líneas de transferencia. Agitar la suspensión durante la noche a 20 °C durante la noche y recoger el producto por filtración usando tres embudos Buchner de 26 cm separados. Enjuague cada torta con TBME (3 x 1,3 l), combine las tres porciones y suspenda el material en TBME (13,3 l), revuelva durante 1 hora a 20 °C, y recoja el producto en dos embudos Buchner de 26 cm separados. Lavar cada torta con TBME (3 x 2,0 l) y secar en un horno de vacío a 55 hasta 60 °C durante 16 horas para dar el compuesto del título (1812 g, 98 %) como un sólido amarillo. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1,44 (s, 9H), 3,37 (s, 3H), 3,45-3,55 (m, 4H), 3,80-3,95 (m, 4H), 4,08 (s, 3H), 7,40-7,45 (m, ¹H), 8,72-8,76 (m, ¹H), 8,86-8,91 (m, ¹H)

Preparación 15 Formación de cristales de semillas

- 20 Cargar un reactor de 250 ml con 4-(4-oxo-3H-pirido [2,3-d] pirimidin-2-il)piperazin-1-carboxilato de tert-butilo (15 g, 45,3 mmol) y dimetilformamida (75 ml) . Añadir dimetilsulfato (6,28 g, 49,8 mmol) en una porción a la mezcla en agitación (observar una ligera exotermia hasta 34 °C). Calentar la solución resultante a 68 hasta 73 °C durante 3 horas. Se agrega dimetilsulfato (0,57 g, 4,5 mmol) y se agita a 68 hasta 73 °C durante 1 hora adicional. Se enfría hasta 20 °C y se transfiere gota a gota a un matraz de 1 l que contiene TBME (300 ml). Observe el cambio sólido pegajoso a la suspensión agitable, agite durante la noche a 20 °C y filtre en un embudo Buchner. Lave la torta del producto con TBME (3 x 35 ml) y suspenda en TBME (100 ml). Agitar la suspensión durante 1 hora a 20 °C, filtrar en un embudo Buchner y lavar la torta con TBME (2 x 35 ml). Secar los sólidos en un horno de vacío a 55 hasta 60 °C durante 16 horas para dar 4- (8-metil-4-oxo-3H-pirido[2,3-d] pirimidin-8-io-2-il) piperazin-1-carboxilato de tert-butilo, metilsulfato (18,84 g, 91 % de rendimiento) (pureza de HPLC 95 %).
- 30

Preparación 16

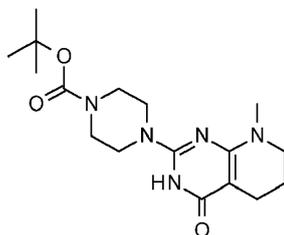
Yoduro de 4-(8-metil-4-oxo-3H-pirido[2,3-d]pirimidin-8-io-2-il)piperazin-1-carboxilato tert-butilo



- 35 Combine 4-(4-oxo-3H-pirido [2,3-d] pirimidin-2-il) piperazin-1-carboxilato de tert-butilo (115,43 g), THF (1,4 l) y yoduro de metilo (24 mL) en un autoclave Parr de 2 l con agitador mecánico. Selle el autoclave y mezcle la reacción con calentamiento a 70 °C durante 22 horas. Se enfría la reacción hasta temperatura ambiente y se transfiere la suspensión resultante de color amarillo brillante a un matraz de fondo redondo usando MeOH. Se concentra la suspensión y se seca el sólido resultante en un horno de vacío a 50-60 °C para dar el compuesto del título como un sólido amarillo (167,44 g, 100 %). LC-ES/MS m/z 346,2 [M+H]⁺, T_R = 1,16 min.

Preparación 17

4-(8-metil-4-oxo-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)piperazin-1-carboxilato de tert-butilo



5 Cargue un recipiente a presión de 0,90 l con 4-(8-metil-4-oxo-3H-pirido [2,3-d]pirimidin-8-io-2-il) piperazin-1-carboxilato de tert-butilo, sulfato de metilo (881 g, 1.927 mol) y MeOH (4,9 l). Agregue óxido de platino (1 % p/p, 8,81 g) y presurice con hidrógeno a 1.054 kPa. Agitar durante 4 horas a 22-28 °C. Filtrar a través de un cartucho de filtro para recoger el catalizador. Separe el filtrado que se va a combinar con el filtrado de una segunda hidrogenación. Repita la reacción en otra porción de 4-(8-metil-4-oxo-3H-pirido [2,3-d] pirimidin-8-io-2-il)piperazin-1-carboxilato de

10 tert-butilo, sulfato de metilo (925 g, 2,023 mol), MeOH (5,0 l) y óxido de platino (1 % p/p, 9,25 g) como antes se filtran y combinan los dos filtrados y se concentran para dar un residuo oleoso. Se disuelve el residuo en DCM (9,3 l) y se lava con HOAc acuoso 0,1 N (2 x 2,0 l y 2 x 1,1 l) y NaOH 0,5 M (8,0 l). Agregue agua (4,0 l) y ajuste a pH 6-7 con HOAc acuoso 0,1 N (aproximadamente 1,9 l). Separar las capas y secar la capa orgánica sobre sulfato de magnesio, filtrar y concentrar a un volumen de aproximadamente 4,5 l y agregar EtOAc (16,0 l) para cristalizar el producto. Concentrar la suspensión a un volumen de aproximadamente 4,5 l, enfriar a 0 a 5 °C y recoger el producto

15 por filtración. Lavar la torta con EtOAc (2 x 2,0 l y 2 x 1,1 l) y secar en un horno de vacío a 55 hasta 65 °C durante 16 h para dar el compuesto del título (1185 g, 77 %) como un sólido blanco (muy electrostático) ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 1,45 (s, 9H), 1.76-1,88 (m, 2H), 2,53 (t, J = 6,3 Hz, 2h), 3,04 (s, 3H), 3,20-3,26 (m, 2H), 3,40-3,52 (m, 4 H), 3,60-3,70 (m, 4H), 5,01 (s, ¹H), 12,1-12,3 (br s, ¹H). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 20,00, 21,63, 28,81, 36,55, 44,99, 50,20, 80,38, 85,85, 152,38, 155,15, 160,14, 164,03. ESI/ MS m/z 350,0 [M+H]⁺.

Preparación 17 Síntesis alternative

Cargar un matraz de fondo redondo con yoduro de 4-(8-metil-4-oxo-3H-pirido [2,3-d]pirimidin-8-io-2-il) piperazin-1-carboxilato de tert-butilo (167,44 g, 353,76 mmol) y DMF (815 mL) y enfriar en un baño de hielo a una temperatura interna de 0-5 °C. Agregue ácido trifluoroacético (80,25 mL, 1,06 mol) a una tasa para mantener la temperatura interna por debajo de 15 °C (45 min). Enfríe la reacción a una temperatura interna de 0-5 °C y agregue

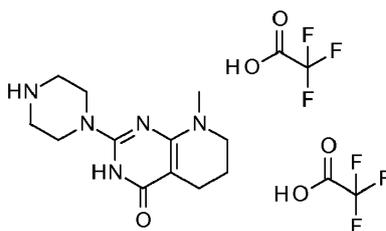
25 cianoborohidruro de sodio (66,69 g, 1,06 mol) a una tasa para mantener la temperatura por debajo de 15 °C (aproximadamente 50 min). Agitar la reacción durante 18 h mientras se calienta hasta 25 °C. Enfríe la reacción de vuelta hasta 0-5 °C y agregue ácido trifluoroacético (80,25 mL, 1,06 mol) a una tasa para mantener la temperatura por debajo de 15 °C (10 min) seguido de cianoborohidruro de sodio (66,69 g, 1,06 mol) a una tasa para mantener la temperatura por debajo de 15 °C (10 min). Agite la reacción durante la noche mientras se calienta hasta 25 °C.

30 Enfríe la reacción de vuelta hasta 0-5 °C y agregue ácido trifluoroacético (26,6 ml, 0.345 mol) a una tasa para mantener la temperatura por debajo de 10 °C (5 min) seguido de cianoborohidruro de sodio (22,3 g, 0.345 mol) en dos porciones durante 10 min. Agitar durante la noche mientras se calienta hasta 25 °C. Coloque un cangilón de 12 l con un agitador superior y cárguelo con bicarbonato de sodio (297,18 g, 3,54 mol) y agua (7,2 l). Agregue la mezcla de reacción cruda a la solución de bicarbonato usando un embudo de decantación durante un período de 30 minutos y observe la evolución del gas. Agitar la mezcla durante 2 horas y luego dejar reposar a 25 °C durante la noche.

35 Recoger el sólido resultante por filtración y enjuagar con agua y dietil éter. Secar el sólido en un horno de vacío a aproximadamente 60 °C durante la noche para dar el compuesto del título (111,34 g, 90 %) como un sólido beige. LC-ES/MS m/z 350,0 [M+H]⁺, T_R = 1,93 min.

Preparación 18

40 Sal de bis-(ácido 2,2,2-trifluoroacético) 8-Metil-2-piperazin-1-il-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona



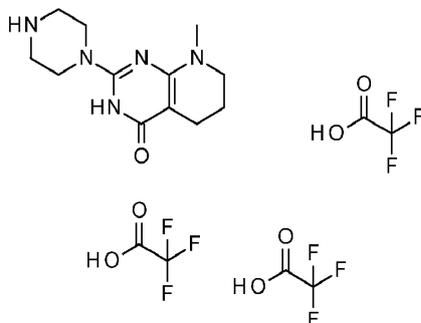
Añadir juntos 4-(8-metil-4-oxo-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)piperazin-1-carboxilato de tert-butilo (46,8 g, 133,9 mmol) y DCM (100 ml). Añadir trifluoroacético (80 ml, 1,09 moles) durante 15 minutos y agitar a 25 °C durante la noche. Se concentró bajo presión reducida, añadir DCM (200 ml) y reconcentrar bajo presión reducida cuatro

veces para dar el compuesto del título como un sólido blanquecino (69,685 g, 100 % crudo). LC-ES/MS m/z 250,0 [M+H]⁺, T_R = 0,53 min.

Preparación 19

8-Metil-2-piperazin-1-il-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona; ácido tri-2,2,2-trifluoroacético

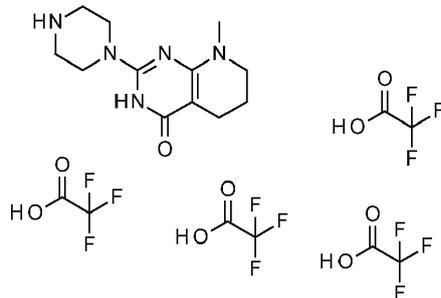
5



10 Agregar juntos 4- (8-metil-4-oxo-3,5,6,7-tetrahidropirido [2,3-d]pirimidin-2-il)piperazin-1-carboxilato de tert-butilo (196,0 g, 560,8 mmol) y DCM (783 mL). Enfriar la suspensión turbia en un baño de hielo hasta una temperatura interna de 4 °C y agregar ácido trifluoroacético (254 ml) durante 10 min mientras se agita. Agitar durante 42 horas a temperatura ambiente. Eliminar los volátiles bajo presión reducida y disolver en DCM. Eliminar los volátiles bajo presión reducida y secar bajo vacío a 40 °C durante la noche para dar el compuesto del título (431, 5 g, 99 %) como un sólido blanco. ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8,96 (s ancho, 2H), 7,49 (s ancho, TFA/agua, 9H), 3,78 (t, 4H, J = 5 Hz), 3,29 (t, 2H, J = 5 Hz), 3,15 (s, 4H), 3,04 (s, 3H), 2,37 (t, 2H, J = 6,3 Hz), 1,76 (pt, 2H, J = 5,8 Hz)

Preparación 20

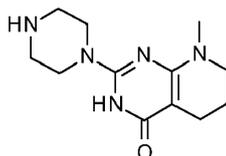
15 8-Metil-2-piperazin-1-il-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona; ácido tetra-2,2,2-trifluoroacético



20 Añadir juntos 4-(8-metil-4-oxo-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)piperazin-1-carboxilato de tert-butilo (0,29 g, 0,83 mmol) , DCM (3 ml) y ácido trifluoroacético (3 ml). Agitar la reacción a temperatura ambiente durante 4 horas. Concentrar la mezcla y disolver el residuo en DCM (2x) y concentrar la mezcla. Se seca bajo vacío durante 1 hora para dar el compuesto del título (0,556 g, 95 %) que se usa sin purificación o caracterización.

Preparación 21

8-Metil-2-piperazin-1-il-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona



25 Cargar un matraz de fondo redondo con 4-(8-metil-4-oxo-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il) piperazin-1-carboxilato de tert-butilo (730 mg) , 1,53 mmol), DCM (15 ml) y ácido trifluoroacético (15 ml) y agitar la reacción a temperatura ambiente durante 3 horas. Se concentra bajo presión reducida, se disuelve el residuo en metanol, se agrega la resina de intercambio iónico Dowex® 50WX4-400 (5,5 g) y se agita la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Filtrar la mezcla y lavar la resina de intercambio iónico con amoníaco 7 M en metanol. Combine el filtrado y los lavados, y concéntrese bajo presión reducida para dar el compuesto del título como un sólido naranja (385 mg, 95 %). LC-ES/MS m/z 250 [M+H]⁺.

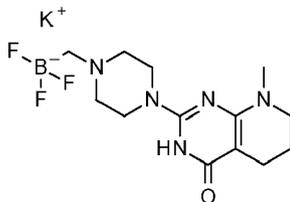
30

Preparación alternativa 21

Prelave una columna SCX-2 de 10 g con DCM (30 ml) y cargue con una solución de bis-(ácido 2,2,2-trifluoroacético) 8-metil-2-piperazin-1-il-3,5,6,7-tetrahidropirido [2,3-d]pirimidin-4-ona (0,5 g, 1,05 mmol) en DCM (10 ml) y MeOH (1 ml). Lavar la columna con DCM (30 ml), seguido de MeOH (30 ml) y eluir con NH₃ 2 M/MeOH (60 ml). Se concentran las fracciones que contienen el producto bajo presión reducida para dar el compuesto del título (0,26 g, 100 %).

5 Preparación 22

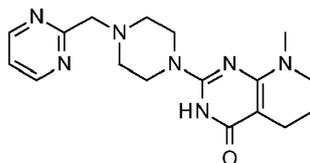
trifluoro-[[4-(8-metil-4-oxo-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il) piperazin-1-il]metil]boranuide de potasio



Disuelva 8-metil-2-piperazin-1-il-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona (250 mg, 1,00 mmol) en THF (4 ml) y añada bromometil trifluoroborato de potasio (208 mg, 1,00 mmol), Calentar a 80 °C durante 90 min y luego concentrar bajo una corriente de nitrógeno. Agregar acetona (30 ml) y bicarbonato de potasio (100 mg, 1,00 mmol) y agitar a temperatura ambiente durante la noche. Eliminar los sólidos por filtración y concentrar el filtrado bajo presión reducida para dar el compuesto del título (273 mg, 73 %) como un sólido blanquecino. ES/MS m/z 330 [M-K⁺].

Ejemplo 1

8-Metil-2-[4-(pirimidin-2-ilmetil)piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona



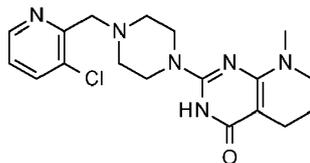
Disolver 8-metil-2-piperazin-1-il-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona; ácido tri-2,2,2-trifluoroacético (409 g, 531 mmol) en DCM (2,0 l) en un embudo de extracción de 5 l. Purgue el embudo con nitrógeno y equípelo con un agitador mecánico superior. Añadir pirimidin-2-carboxaldehído (66,6 g, 616 mmol) y agitar durante 40 minutos. A continuación, agregue triacetoxiborohidruo de sodio (225,1 g, 1060 mmol) en porciones y observe una exotermia de 20 hasta 36 °C inmediatamente después de la adición. Agitar la reacción a temperatura ambiente durante la noche. Vierta la reacción cuidadosamente en NaOH 1 M (2,32 l) a 20 °C en un reactor de 10 l mientras se controla la exotermia resultante con un enfriador. Ajuste el pH a 8 a 9 con NaOH 1 N (2,55 l). Recoja la capa orgánica y extraiga la capa acuosa con DCM (2,32 l). Se combinan las capas orgánicas, se concentran y se secan bajo una corriente de nitrógeno durante la noche para dar el compuesto del título (193 g, producto crudo al 100 %). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ (br s, ¹H), 8,78 (d, 2H, J = 5,5 Hz), 7,41 (t, ¹H, J = 4,9 Hz), 3,76 (s, 2H), 3,52 (br s, 4H), 3,187 (t, 2H, J = 5,2 Hz), 2,96 (s, 3H), 2,54 (m, 2H), 2,28 (t, 2H, J = 6Hz), 1,72 (pt, 2H, J = 5,2 Hz). Este lote se combina con otros 4 lotes para purificación (203 g). Se purifica mediante filtración con sílice (20 cm de diámetro por 8 cm de altura) y se eluye con 90 % de DCM/10 % de NH₃ 2 M en MeOH para dar el compuesto del título. (162 g, 84 %), ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8,74 (d, J = 5,1 Hz, 2H), 7,20 (t, J = 5,1 Hz, ¹H), 3,85 (s, 2H), 3,78-3,69 (m, 4H), 3,27-3,19 (m, 2H), 3,03 (2, 3H), 2,68-2,59 (m, 4H), 2,47-2,38 (m, 2H), 1,88-1,76 (m, 2H).

Ejemplo 1 Síntesis Alternativa

Combinar ácido tri-2,2,2-trifluoroacético de 8-metil-2-piperazin-1-il-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona (203,23 g, 344 mmol), pirimidin-2-carbaldehído (40 g, 370 mmol) y DMF (343 ml) y se agita hasta que se obtiene una solución homogénea (30 minutos). Enfriar la solución en un baño de hielo y añadir cianoborohidruo de sodio (25 g, 397 mmol) en una porción de 5 g seguida de una porción de 10 g 5 minutos más tarde. Agitar durante 1,5 horas y agregar los últimos 10 g de cianoborohidruo. Agite durante 30 minutos mientras mantiene la temperatura por debajo de 25 °C. Agite la reacción durante la noche y deje calentar hasta 25 °C. Verter la mezcla de reacción en un vaso de precipitados (4 l) equipado con un agitador superior que contiene bicarbonato de sodio (115 g, 1,37 mol) y agua (350 ml). Agitar la mezcla durante 20 minutos y luego agregar EtOAc (1 l) y agitar durante 30 minutos. Vierta la mezcla a través de tierra de diatomáceas (700 g) durante aproximadamente 30 minutos y filtre por gravedad durante aproximadamente 1 hora. Luego aplique vacío y enjuague la tierra de diatomáceas con EtOAc (2 x 1 l). Combine y concentre la capa orgánica para dar un aceite amarillo viscoso con un peso crudo de 117 g. Purificar el aceite por cromatografía instantánea sobre gel de sílice (DCM a 90 % de DCM/MeOH, gradiente). Secar el material resultante en un horno de vacío a 50 °C para dar el compuesto del título como un sólido espumoso blanco (44,22 g, 38 %). LC-ES/MS m/z 342,3 [M+H]⁺, T_R = 0,96 min.

Ejemplo 2

2-[4-[(3-Cloro-2-piridil)metil]piperazin-1-il]-8-metil-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona



5 Añadir juntos 8-metil-2-piperazin-1-il-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona; ácido tetra 2,2,2-trifluoroacético (0,556 g, 0,788 mmol), 3-cloropicolinaldehído (557,87 mg, 3,94 mmol) en DMF (3 ml) seguido de cianoborohidruro de sodio (148,6 mg, 2,36 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 5 días. Diluir la reacción con CHCl_3 (75 ml) y lavar con NaHCO_3 saturado y salmuera. Secar sobre Na_2SO_4 , filtrar y concentrar hasta sequedad. El producto crudo se purifica por cromatografía en gel de sílice eluyendo con DCM hasta 90 % de DCM/MeOH para dar el producto del título (214 mg, 72 %). LC E ES/MS m/z 375,3 (^{35}Cl) (M+H)⁺.

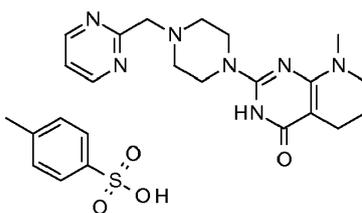
10 Los siguientes Ejemplos 3, 4 y 5 se preparan esencialmente siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 2, usando el aldehído o la cetona apropiados, agitando a temperatura ambiente durante 2 horas hasta 48 horas y monitorizando la reacción para completar, añadiendo más cianoborohidruro de sodio si es necesario y agitando por otras 24 horas.

Tabla 1

Ej. No.	Nombre químico	Estructura	LC-ES/MS m/z
3 ^a	2-[4-[(3-Bromo-2-piridil)metil]piperazin-1-il]-8-metil-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona		419,1 (^{79}Br) (M+H) ⁺
4 ^b	2-[4-[(3-Hidroxi-2-piridil)metil]piperazin-1-il]-8-metil-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona		357,2 (M+H) ⁺
5 ^c	8-Metil-2-[4-[1-[5-(trifluorometil)pirimidin-2-il]etil]piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona		374,2 (M+H) ⁺
<p>^a Se añadió MeOH (1 ml) además de DMF como disolvente.</p> <p>^b El diclorometano es un disolvente y se usa triacetoxiborohidruro de sodio en lugar de borohidruro de sodio.</p> <p>^c MeOH es disolvente</p>			

Ejemplo 6

15 Sal de ácido 4-metilbencenosulfónico 8-Metil-2-[4-(pirimidin-2-ilmetil]piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona



5 Añadir 8-metil-2-[4-(pirimidin-2-ilmetil)piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona (274,5 mg, 0,804 mmol) a etanol (0,5 ml) y añadir monohidrato de ácido toluenosulfónico (160 mg). Se somete a sonicación para dar una solución de color rojo ámbar oscuro. Agregue heptano (5 ml), tape la mezcla, agite y caliente la mezcla hasta 80 °C. La mezcla se solidifica en un sólido marrón oscuro. Agitar la mezcla durante 30 minutos, recoger el sólido por filtración al vacío y secar al aire para dar el compuesto del título (387 mg, 94 %).

Ejemplo 6 Difracción en polvo de rayos X

10 Los patrones XRPD de sólidos cristalinos se obtienen en un difractómetro en polvo de rayos X Bruker D4 Endeavor, equipado con una fuente CuK α ($\lambda = 1,54060 \text{ \AA}$) y un detector Vantec, que funciona a 35 kV y 50 mA. La muestra se escanea entre 4 y 40° en 2θ , con un tamaño de paso de 0,0087° en 2θ y una velocidad de escaneo de 0,5 segundos/paso, y con divergencia de 0,6 mm, antipersión fija de 5,28mm y ranuras detectoras de 9,5 mm. El polvo seco se empaqueta en un soporte de muestra de cuarzo y se obtiene una superficie lisa utilizando un portaobjetos de vidrio. Es bien conocido en la técnica de la cristalografía que, para cualquier forma cristalina dada, las intensidades relativas de los picos de difracción pueden variar debido a la orientación preferida que resulta de factores tales como la morfología y hábito del cristal. Donde están presentes los efectos de la orientación preferida, las intensidades máximas se alteran, pero las posiciones pico características del polimorfo no cambian. Véase, por ejemplo The U. S. Pharmacopeia 35 - National Formulary 30 Chapter <941> Characterization of crystalline and partially crystalline solids by X-ray powder diffraction (XRPD) Official December 1, 2012-May 1, 2013. Adicionalmente, también es bien conocido en el arte de la cristalografía que para cualquier forma cristalina dada, las posiciones de los picos angulares pueden variar ligeramente. Por ejemplo, las posiciones de los picos pueden cambiar debido a una variación en la temperatura o humedad a la que se analiza una muestra, el desplazamiento de la muestra o la presencia o ausencia de un estándar interno. En el presente caso, una variabilidad de posición pico de $\pm 0,2$ en 2θ tendrá en cuenta estas variaciones potenciales sin obstaculizar la identificación inequívoca de la forma de cristal indicada. La confirmación de una forma de cristal se puede hacer con base en cualquier combinación única de picos distintivos (en unidades de $^\circ 2\theta$), típicamente los picos más prominentes. Los patrones de difracción en forma de cristales, recogidos a temperatura ambiente y humedad relativa, se ajustaron con base en los picos estándar NIST 675 a 8,85 y 26,77 grados 2-theta.

30 Una muestra preparada del Ejemplo 6 se caracteriza por un patrón de XRPD que usa radiación CuK α que tiene picos de difracción (valores 2-theta) como se describe en la Tabla 1 a continuación. Específicamente, el patrón contiene un pico a 7,68 en combinación con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste en 12,02, 12,93, 15,17, 19,24 y 23,21 con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

Picos de difracción en polvo de rayos X del Ejemplo 6

Tabla 2

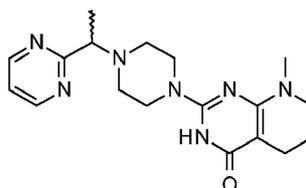
Pico	Ángulo (2-Theta °)	Intensidad Relativa (%)
1	7,28	20
2	7,68	100
3	9,88	15
4	12,02	46
5	12,42	16
6	12,93	69
7	13,11	36

(continuación)

Pico	Ángulo (2-Theta °)	Intensidad Relativa (%)
8	13,76	33
9	15,17	45
10	17,02	32
11	17,24	17
12	19,24	83
13	19,88	19
14	20,27	27
15	21,85	36
16	22,06	47
17	22,52	23
18	23,21	75
19	23,42	27
20	24,36	38
21	24,80	33
22	25,76	21
23	25,87	23
24	28,58	28

Ejemplo 7

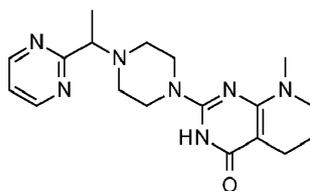
8-Metil-2-[4-(1-pirimidin-2-iletíl)piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona



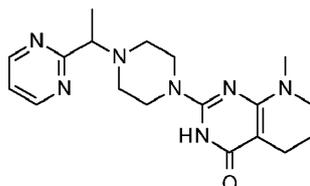
5

Ejemplo 8

8-Metil-2-[4-(1-pirimidin-2-iletíl)piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona, Isómero 1

**Ejemplo 9**

8-Metil-2-[4-(1-pirimidin-2-iletíl)piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona, Isómero 2



- 5 Combine la sal de bis-(ácido 2,2,2-trifluoroacético) 8-metil-2-piperazin-1-il-3,5,6,7-tetrahidropirido [2,3-d]pirimidin-4-ona (1,0 g, 2,1 mmol), 2-acetilpirimidina (0,38 g, 3,14 mmol), DMF (3 ml), MeOH (1 ml), cianoborohidruro de sodio (0,20 g, 3,14 mmol) y agitar a temperatura ambiente durante 20 horas. Añadir 2-acetilpirimidina adicional (0,38 g, 3,14 mmol) y cianoborohidruro de sodio (0,20 g, 3,14 mmol) y calentar a 80 °C durante la noche. Se evapora la DMF bajo una corriente de nitrógeno durante 4 días y se purifica por cromatografía instantánea sobre gel de sílice eluyendo con DCM a 90 % de DCM/MeOH para dar el compuesto del título, Ejemplo 7 (330 mg, 44 %) como racemato.

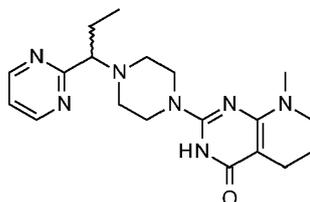
- 15 Separar 8-metil-2-[4-(1-pirimidin-2-iletíl)piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona usando SFC en una columna Phenomene® Lux® Cellulose-2 (2,1 x 25 cm, 5 µm). Fase móvil: 40 % de EtOH (0,2 % de IPAm)/dióxido de carbono. Caudal: 70 ml/min. Detección: 225 nm. Obtenga el primer pico de elusión como Isómero 1 y el segundo pico de elusión como Isómero 2.

Ejemplo 8, Isómero 1: 135 mg, 99,25 % puro con 0,75 % de Isómero 2 como una impureza ($T_R = 4,59$ min; columna Phenomenex® Lux® Cellulose-2 (2,1 x 25 cm, 5 µm), fase móvil: 40 % EtOH (0,2 % de IPAm)/dióxido de carbono, caudal: detección de 5 ml/min: 225 nm). LC-ES/MS m/z 356,3 (M+H)⁺.

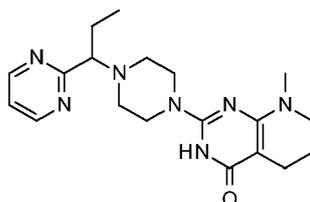
- 20 **Ejemplo 9**, isómero 2: 121 mg, 96,63 % de pureza con 3,36 % de isómero 1 como impureza ($T_R = 5,91$ min, columna Phenomenex® Lux® Cellulose-2 (2,1 x 25 cm, 5 µm), fase móvil: 40 % EtOH (0,2 % de IPAm)/dióxido de carbono, caudal: 5 ml/min, detección: 225 nm). LC-ES/MS m/z 356,3 (M+H)⁺.

Ejemplo 10

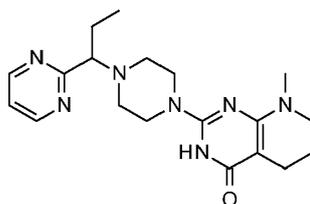
8-Metil-2-[4-(1-pirimidin-2-ilpropil)piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona

**Ejemplo 11**

8-Metil-2-[4-(1-pirimidin-2-ilpropil)piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona, Isómero 1

**Ejemplo 12**

8-Metil-2-[4-(1-pirimidin-2-ilpropil)piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona, Isómero 2



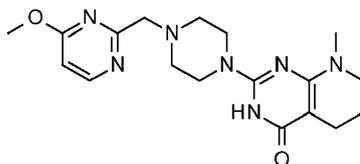
Preparar los Ejemplos 10, 11 y 12 siguiendo esencialmente el proceso descrito en los Ejemplos 7, 8 y 9 usando 1-(2-pirimidinil)-1-propanona y purificar mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice eluyendo con un gradiente de DCM al 90 % DCM/MeOH. Purificar por segunda vez mediante cromatografía sobre gel de sílice usando las mismas condiciones. A continuación, purificar adicionalmente mediante HPLC preparativa de pH alto (Columna: 150 g C18 Gold de alta resolución; inicial: 5 % de acetonitrilo/95 % de bicarbonato de amonio 10 mM con MeOH al 5 % con gradiente hasta 60 % de acetonitrilo/40 % de bicarbonato de amonio con 5 % MeOH durante 30 min., Longitudes de onda de detección 239, 254, 280 y 290 nm) para dar el compuesto del título, Ejemplo 10 (140 mg, 18 %). Separar la mezcla enantiomérica resultante usando SFC usando las condiciones descritas para los Ejemplos 8 y 9 con la excepción de que se usa una columna Lux® Cellulose-4.

Ejemplo 11, Isómero 1: 50 mg, > 99,9 % de pureza ($T_R = 4,26$ min; columna Phenomenex® Lux® Cellulose-4 (2,1 x 25 cm, 5 μ m), fase móvil: 40 % EtOH (0,2 % IPAm)/dióxido de carbono, caudal: 5 ml/min, detección: 225 nm). LC-ES/MS m/z 370,2 (M+H)⁺.

Ejemplo 12, Isómero 2: 47 mg, > 99,9 % de pureza ($T_R = 5,67$ min; columna Phenomenex® Lux® Cellulose-4 (2,1 x 25 cm, 5 μ m). Fase móvil: 40 % EtOH (0,2 % IPAm)/ dióxido de carbono. Caudal: 5 ml/min. Detección: 225 nm), LC-ES/MS m/z 370,2 (M+H)⁺.

Ejemplo 13

2-[4-[(4-metoxipirimidin-2-il)metil]piperazin-1-il]-8-metil-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona



Combine la sal de bis-(ácido 2,2,2-trifluoroacético) 8-metil-2-piperazin-1-il-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d] pirimidin-4-ona (0,5 g), 1,0 mmol), 4-metoxipirimidin-2-carbaldehído (150 mg, 1,08 mmol), DMF (10 ml), MeOH (1 ml) y cianoborohidruro de sodio (136 mg, 2,17 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante 3 días. Se diluye con MeOH y se absorbe sobre una columna SCX-2, se enjuaga con MeOH y luego se eluye con NH₃ 2 M en MeOH, se concentra y se purifica por cromatografía instantánea en gel de sílice eluyendo con DCM/MeOH al 90 % para dar el compuesto del título (43 mg, 11 %). LC-ES/MS m/z 372,1 (M+H)⁺ $T_R = 1,519$ min.

Los siguientes Ejemplos se preparan esencialmente siguiendo el procedimiento del Ejemplo 13, usando el aldehído apropiado y la cromatografía apropiada.

Tabla 3

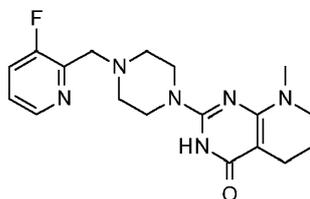
Ej. No,	Nombre Químico	Estructura	LC-ES/MS m/z
14 ¹	8-Metil-2-[4-[(4-metilpirimidin-2-il)metil]piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona		356,1 (M+H) ⁺

(continuación)

Ej. No,	Nombre Químico	Estructura	LC-ES/MS m/z
15 ²	8-Metil-2-[4-[[5-(trifluorometil)pirimidin-2-il]metil]piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona		410,1 (M+H) ⁺
16	8-Metil-2-[4-[[4-(trifluorometil)pirimidin-2-il]metil]piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona		410,2 (M+H) ⁺
17 ³	8-Metil-2-[4-[(5-metilpirimidin-2-il)metil]piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona		356,3 (M+H) ⁺
18 ⁴	2-[4-[(5-Cloropirimidin-2-il)metil]piperazin-1-il]-8-metil-3,5,6,7-tetrahidropirido [2,3-d]pirimidin-4-ona		376,0 (³⁵ Cl) (M+H) ⁺
19 ⁵	8-Metil-2-[4-(2-piridilmetil)piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona		341,2 (M+H) ⁺
<p>¹ Agitar la reacción durante 3 días</p> <p>² Agregar aldehído adicional (1 eq) y cianoborohidruo de sodio (1,5 eq); luego callentar a 80 °C durante 6 h, Purificación adicional mediante procedimiento general de cromatografía en fase reversa (pH alto 5-100).</p> <p>³ Purificación adicional mediante procedimiento general de cromatografía en fase reversa (pH alto 9-24)</p> <p>⁴ Purificación adicional mediante procedimiento general de cromatografía en fase reversa (pH bajo 0,1 % TFA/ACN) seguido por cromatografía en una columna SCX-2.</p> <p>⁵ Agitar la reacción a temperatura ambiente durante 12 horas y purificar adicionalmente mediante un procedimiento general de cromatografía en fase reversa (pH alto 13-48).</p>			

Ejemplo 20

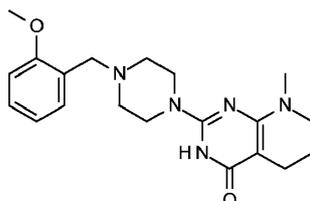
2-[4-[(3-Fluoro-2-piridil)metil]piperazin-1-il]-8-metil-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona



5 Suspendir bis-(ácido 2,2,2-trifluoroacético) 8-metil-2-piperazin-1-il-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona (20,31 g, 34,34 mmol) en DCM (114 ml) y purgar con nitrógeno. Agregar 3-fluoropiridin-2-carbaldehído (5,26 g, 41,2 mmol) y agitar durante 60 minutos. Luego agregue triacetoxiborohidruro de sodio (14,56 g, 68,68 mmol) en una porción y observe una exoterma hasta reflujo. Agite y deje que la reacción se enfríe hasta temperatura ambiente durante 1 hora. Verter en NaOH 0,5 M (200 ml) y ajustar el pH: 7-8 con NaOH 2M. Recoger la capa orgánica y extraer la capa acuosa con DCM (2 x 200 ml). Combine y seque las capas orgánicas sobre sulfato de sodio, filtre y concéntrese para obtener un aceite. Se purifica por cromatografía en gel de sílice (400 g), eluyendo con 95 % de DCM/5 % de MeOH para 8 volúmenes de columna y con 90 % de DCM/10 % de MeOH para 8 volúmenes de columna para dar el compuesto del título (7,59 g, 61,7 %) 97 % de pureza por HPLC y también 2,64 g (21,5 %) de producto adicional con 87 % de pureza por HPLC. LC ES/MS m/z 359,1 (M+1)⁺.

Ejemplo 21

15 2-[4-[(2-Metoxifenil)metil]piperazin-1-il]-8-metil-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona



20 Combine sal de bis-(2,2,2-ácido trifluoroacético) 8-metil-2-piperazin-1-il-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona (0,25 g, 0,52 mmol), 2-metoxibenzaldehído (0,21 g, 1,57 mmol), DMF (15 ml), MeOH (5 ml) y cianoborohidruro de sodio (100 mg, 1,57 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante 12 horas. Diluir con metanol y absorber en una columna SCX-2, enjuagar con MeOH y luego eluir con NH₃ 2 M en MeOH, concentrar y purificar por cromatografía en fase reversa, véase el procedimiento general para cromatografía reversa (pH alto 21-55) para dar el compuesto del título (223 mg, 59 %). LC-ES/MS m/z 370,2 (M+H)⁺.

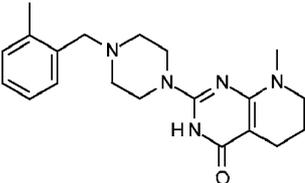
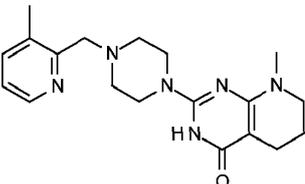
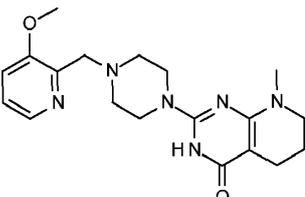
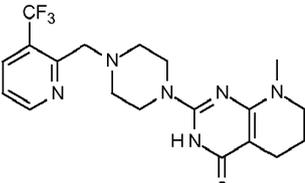
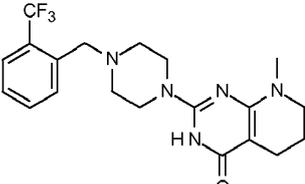
Los siguientes compuestos se preparan esencialmente como se describe en el Ejemplo 21 usando el aldehído apropiado.

25

Tabla 4

Ej. No.	Nombre químico	Estructura	LC-ES/MS m/z
22	2-[4-[(2-Fluorofenil)metil]piperazin-1-il]-8-metil-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona		358,2 (M+H) ⁺

(continuación)

Ej. No.	Nombre químico	Estructura	LC-ES/MS m/z
23 ^a	8-Metil-2-[4-(o-tolilmetil)piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona		354,2 (M+H) ⁺
24 ^b	8-Metil-2-[4-[(3-metil-2-piridil)metil]piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona		355,2 (M+H) ⁺
25 ^c	2-[4-[(3-Metoxi-2-piridil)metil]piperazin-1-il]-8-metil-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona		371,2 (M+H) ⁺
26 ^b	8-Metil-2-[4-[[3-(trifluorometil)-2-piridil]metil]piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona		409,2 (M+H) ⁺
27 ^d	8-Metil-2-[4-[[2-(trifluorometil)fenil]metil]piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona		408,2 (M+H) ⁺

^a. Cromatografía en fase reversa (pH alto 30-64)

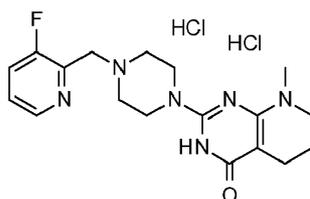
^b. Cromatografía en fase reversa (pH alto 23-57)

^c. Cromatografía en fase reversa (pH alto 13-48)

^d. Cromatografía en fase reversa (pH alto 39-73)

Ejemplo 28

Dihidrocloruro de 2-[4-[(3-Fluoro-2-piridil)metil]piperazin-1-il]-8-metil-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona



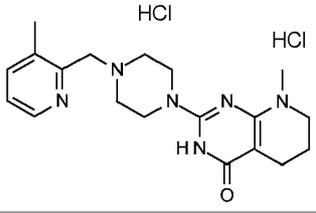
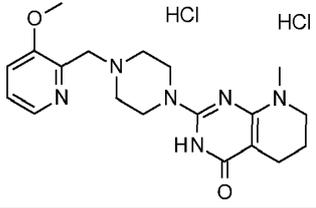
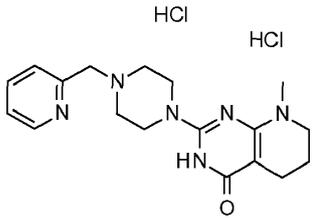
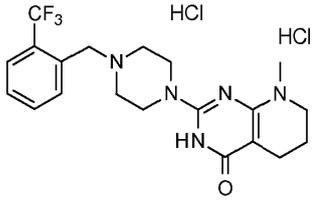
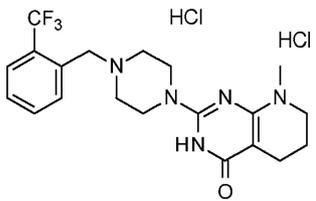
5 En 2 viales, agregue a cada uno DCM (5 ml) HCl 4M en dioxano (1 ml, 4 mmol) y 2-[4-[(3-fluoro-2-piridil)metil]piperazin-1-il]-8-metil-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona (0,127 g, 0,65 mmol). Agite los viales durante 1 hora, combine en 1 vial y luego evapórese bajo una corriente de nitrógeno durante la noche. Secar el material en un horno de vacío durante la noche para dar el compuesto del título (0,28 g, 99 %). LC-ES/MS m/z 359,2 $[M+H]^+$, $T_R = 1,04$ min.

Los siguientes Ejemplos se preparan esencialmente como se describe en el Ejemplo 28 usando el compuesto apropiado de los Ejemplos 21-27.

Tabla 5

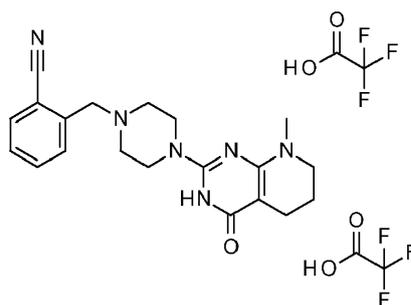
Ej. No,	Nombre químico	Estructura	LC-ES/MS m/z
29	dihidrocloruro de 2-[4-[(2-Metoxifenil)metil]piperazin-1-il]-8-metil-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona		370,2 (M+H) ⁺
30	dihidrocloruro de 2-[4-[(2-Fluorofenil)metil]piperazin-1-il]-8-metil-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona		358,2 (M+H) ⁺
31	dihidrocloruro de 8-Metil-2-[4-(o-tolilmetil)piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona		354,2 (M+H) ⁺

(continuación)

Ej. No,	Nombre químico	Estructura	LC-ES/MS m/z
32	dihidrocloruro de 8-Metil-2-4-[(3-metil-2-piridil)metil]piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona		355,2 (M+H) ⁺
33	dihidrocloruro de 2-[4-[(3-Metoxi-2-piridil)metil]piperazin-1-il]-8-metil-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona		371,2 (M+H) ⁺
34	dihidrocloruro de 8-Metil-2-[4-(2-piridilmetil)piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona		341,2 (M+H) ⁺
35	dihidrocloruro de 8-Metil-2-[4-[[3-(trifluorometil)-2-piridil]metil]piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona		409,2 (M+H) ⁺
36	dihidrocloruro de 8-Metil-2-[4-[[2-(trifluorometil)fenil]metil]piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona		408,2 (M+H) ⁺

Ejemplo 37

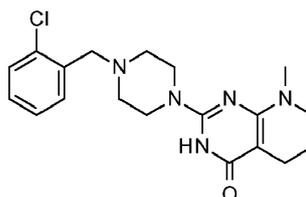
5 2-[[4-(8-Metil-4-oxo-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)piperazin-1-il]metil]benzonitrilo; ácido bis-2,2,2-trifluoroacético



5 Combine una solución de bis-(ácido 2,2,2-trifluoroacético) 8-metil-2-piperazin-1-il-3,5,6,7-tetrahidropirido [2,3-d] pirimidin-4-ona (0,364 g, 0,76 mmol) en DMF (3,2 ml) con 2-cianobenzaldehído (0,499 g, 3,18 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. Agregar cianoborohidruro de sodio (0,143 g, 2,28 mmol) y agitar a temperatura ambiente durante la noche. Viértalo en agua e intente recogerlo por filtración. Observe la obstrucción del filtro y luego agregue NaOH 2 N y NaCl (acuoso) y extraiga el producto crudo en acetato de etilo (3x). Combine las capas orgánicas, seque sobre sulfato de sodio, filtre y concentre. Se purifica por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con 98 % de DCM/etanol isocrático al 2 % durante 10 min con gradiente por etapas hasta 95 % de DCM/etanol al 5 % y se mantiene durante 45 minutos. Purificar adicionalmente por cromatografía en fase reversa preparativa eluyendo con 5 % de acetonitrilo (0.1 % de TFA)/95 % de agua (0.1 % de TFA) gradiente a 54 % de acetonitrilo (0.1 % de TFA)/46 % de agua (0.1 % de TFA) para dar el compuesto del título (48,1 mg, 10,7 %). LC-ES/MS m/z 365,2 [M+H]⁺

Ejemplo 38

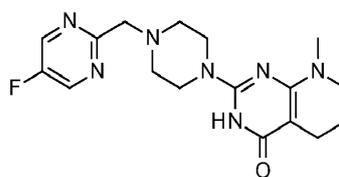
2-[4-[(2-Clorofenil)metil]piperazin-1-il]-8-metil-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona



15 Preparar el compuesto del título esencialmente como se describe en el Ejemplo 37 usando 2-cloro-5-metil-pirimidina 2-clorobenzaldehído. Se purifica el material crudo por cromatografía instantánea en gel de sílice (EtOH al 5 %/CHCl₃ hasta gradiente de EtOH al 10 %/CHCl₃). Recristalizar el material de DMSO/MeOH para obtener un sólido blanco (83 mg, 29 %). LC-ES/MS m/z 374,3 (³⁵Cl) [M+H]⁺.

20 Ejemplo 39

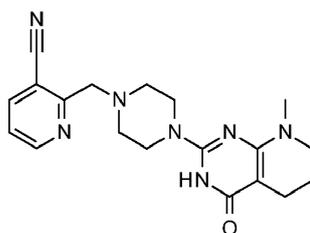
2-[4-[(5-Fluoropirimidin-2-il)metil]piperazin-1-il]-8-metil-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona



25 Combine trifluoro-[[4-(8-metil-4-oxo-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)piperazin-1-il]metil] boranuida de potasio (273 mg, 0,74 mmol), 2-cloro-5-fluoropirimidina (98 mg, 0,74 mmol), carbonato de cesio (723 mg, 2,22 mmol), X-Phos (71 mg, 0,15 mmol), THF (10 ml) y agua (1 ml) y desgasificar con una corriente de nitrógeno durante 2 minutos. Agregar acetato de paladio (II) (17 mg, 0,074 mmol) y calentar a 80 °C durante la noche. Someter a partición la mezcla entre acetato de etilo y agua y separar la capa orgánica. Secar sobre sulfato de magnesio, filtrar y concentrar el filtrado bajo presión reducida. Se purifica el residuo resultante mediante cromatografía instantánea de gel de sílice eluyendo con DCM hasta DCM/MeOH al 90 % para dar el compuesto del título (20 mg, 7,5 %). LC-ES/MS m/z 360,2 [M+H]⁺.

30 Ejemplo 40

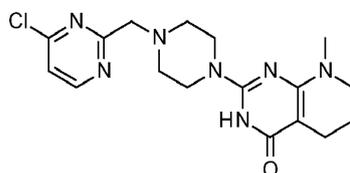
2-[[4-(8-Metil-4-oxo-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)piperazin-1-il]metil]piridin-3-carbonitrilo



5 Disolver 2-[4-[(3-bromo-2-piridil)metil]piperazin-1-il]-8-metil-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona (167 mg, 0,388 mmol) en DMF (10 ml) y desgasificar con una corriente de nitrógeno durante 1 minuto. Agregue tetrakis(trifenilfosfina)paladio (92 mg, 0,080 mmol) y cianuro de zinc (187 mg, 1,59 mmol) y calentar la mezcla a 120 °C durante la noche. Enfriar la reacción y diluir con MeOH. Transferir la mezcla a una columna SCX-2 de 10 g y eluir con NH₃ 2 M en MeOH. Se concentra y se purifica adicionalmente la cromatografía en fase reversa del residuo resultante (pH alto 9-29) para dar el compuesto del título (35 mg, 24 %). LC-ES/MS m/z 366,2 (M+H)⁺

Ejemplo 41

2-[4-[(4-Cloropirimidin-2-il)metil]piperazin-1-il]-8-metil-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona



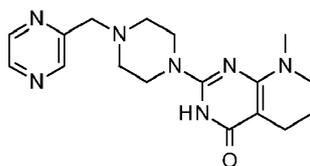
10 Combinar 2-(bromometil)-4-cloro-pirimidina (322 mg, 1,55 mmol) como una solución cruda en tetracloruro de carbono (5 ml), DCM (2 ml), trietilamina (0,65 ml, 4,65 mmol) y bis- (ácido 2,2,2-trifluoroacético) 8-metil-2-piperazin-1-il-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona (739 mg, 1,55 mmol) y agitar a 25 °C durante 3 días. Someter a partición la mezcla de reacción entre DCM y agua y extraer la capa acuosa con DCM. Combine las capas orgánicas, seque sobre MgSO₄, filtre y concentre. Purificar el residuo resultante mediante SFC guiada por masa (columna: 4-nitrobenceno sulfonamida, cromatografía Princeton, 150 x 30 mm, caudal = 100 ml/min; procedimiento: 95 % de CO₂/amoníaco 14 mM en MeOH isocrático durante 30 segundos, luego gradiente a 60 % de CO₂/amoníaco 14 mM en gradiente de MeOH durante 330 segundos, luego aumentar al 50 % de CO₂/amoníaco 14 mM en MeOH durante 10 segundos y mantener durante 30 segundos) para dar 71 mg de producto deseado con impurezas de sal de amoníaco. El producto se purifica adicionalmente mediante cromatografía instantánea en gel de sílice (CH₂Cl₂/MeOH, 90:10) para dar el compuesto del título (28 mg, 5 %). LC-ES/MS m/z 376,0 [M+H]⁺

15

20

Ejemplo 42

8-Metil-2-[4-(pirazin-2-ilmetil)piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona



25 Combinar bis-(ácido 2,2,2-trifluoroacético) 8-metil-2-piperazin-1-il-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona (500 mg, 1,05 mmol), trietilamina (0,73 ml, 5,2 mmol), yoduro de sodio (78,5 mg, 0,52 mmol) y acetonitrilo (7 ml). Se agrega 2-(clorometil)pirazina (201 mg, 1,57 mmol) y se agita a 25 °C durante 72 h. Diluya la reacción con DCM y agua y extraiga el producto en DCM. Lave la porción orgánica con NaHCO₃ saturado y salmuera, secar sobre Na₂SO₄, filtrar y concentrar. Se purifica el residuo resultante mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice (DCM/NH₃ 2 M en MeOH, 90:10) para dar el compuesto del título como un sólido amarillo (249 mg, 0,72 mmol, 70 %). LC-ES/MS m/z 342,0 [M+H]⁺, T_R = 0,99 min.

30

Los siguientes Ejemplos se preparan esencialmente siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 42, usando la halo-metilpirazina apropiada.

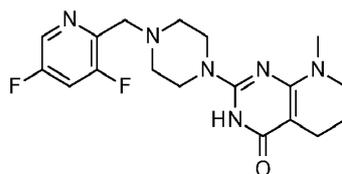
35

Tabla 6

Ej. No,	Nombre químico	Estructura	LC-ES/MS m/z
43	2-[4-[(3-Cloropirazin-2-il)metil]piperazin-1-il]-8-metil-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona		376,0 [M+H] ⁺ , T _R = 1,17 min,
44	8-Metil-2-4-[(3-metilpirazin-2-il)metil]piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona		356,0 [M+H] ⁺ , T _R = 1,03 min,

Ejemplo 45

2-[4-[(3,5-Difluoro-2-piridil)metil]piperazin-1-il]-8-metil-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona



5

Añadir 2-(clorometil)-3,5-difluoropiridina (182 mg, 1,11 mmol), 8-metil-2-piperazin-1-il-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidina-4-ona (260 mg, 1,04 mmol), carbonato de potasio (2,2 g, 15 mmol) y acetonitrilo (5 ml) y agitar la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se concentra la mezcla de reacción bajo presión reducida y se purifica el residuo mediante cromatografía sobre gel de sílice (elución con MeOH/DCM, 1/20) para dar el compuesto del título (160 mg, 43 %). LC-ES/MS m/z 377,2 (M+H)⁺, T_R = 1,11 min.

10

El cáncer se reconoce cada vez más como una colección heterogénea de enfermedades cuya iniciación y progresión son inducidas por la activación o función aberrante de uno o más genes que regulan la reparación del ADN, la estabilidad del genoma, la proliferación celular, la muerte celular, la adhesión, la angiogénesis, la invasión y la metástasis en microambientes celulares y tisulares. La función variante o aberrante de los genes "cancerosos" puede ser resultado del polimorfismo de ADN natural, cambios en el número de copias del genoma (a través de amplificación, delección, pérdida cromosómica o duplicación), cambios en la estructura génica y cromosómica (a través de translocación cromosómica, inversión o otra reordenación que conduce a la expresión génica desregulada) y mutaciones puntuales. Las neoplasias cancerosas pueden ser inducidas por una función génica aberrante, y mantenidas por la misma función genética aberrante, o mantenimiento y progresión exacerbados por activaciones o funciones de genes aberrantes adicionales.

15

20

Más allá de las aberraciones cromosómicas genéticas mencionadas anteriormente, cada uno de los cánceres también puede incluir modificaciones epigenéticas del genoma, incluida la metilación del ADN, la impresión genómica y la modificación de histonas por acetilación, metilación o fosforilación. Una modificación epigenética puede desempeñar un papel en la inducción y/o mantenimiento de la malignidad.

25

30

Se conocen y se usa de forma rutinaria el diagnóstico de malignidades cancerosas mediante biopsia, inmunofenotipo y otras pruebas. Además de las bandas cromosómicas de alta resolución y las tecnologías de imágenes cromosómicas avanzadas, las aberraciones cromosómicas en casos sospechosos de cáncer se pueden determinar mediante análisis citogenéticos como hibridación fluorescente in situ (FISH), cariotipo, cariotipo espectral (SKY), FISH múltiple (M-FISH), hibridación genómica comparativa (CGH), matrices de polimorfismos de un solo nucleótido (Chips SNP) y otras pruebas de diagnóstico y de análisis conocidas y usadas por los expertos en la técnica.

35

Una parte importante de la ruta de señalización de Wnt/ β -catenina es la proteólisis regulada de la β -catenina en dirección 3 mediante el complejo de destrucción de β -catenina. Los principales constituyentes del complejo de destrucción de β -catenina son la poliposis adenomatosa coli (APC), Axin y GSK3 α/β . En ausencia de la activación de la ruta Wnt, la β -catenina citosólica se fosforila constitutivamente y se dirige a la degradación. Tras la estimulación de Wnt, el complejo de destrucción de β -catenina se disocia, lo que conduce a la acumulación de β -

catenina citosólica, a la translocación al núcleo y a la transcripción de los genes que responden a la ruta canónica de Wnt.

Se han realizado esfuerzos considerables para identificar agentes farmacéuticos que inhiban la ruta de señalización canónica de Wnt/ β -catenina. Inhibidores de TNKS1 y TNKS2 tales como XAV939, Huang et al., Nature, 2009, 461, 614; JW55, Waaler et al., Cancer Res., 2012, 72(11), 2822; G007-LK, Lau et al., Cancer Res., 2013, 73(10), 3132; TNKS656, Shultz et al., J. Med. Chem. publicado en línea el 11 de julio de 2013, DOI: 10.1021/jm400807n; y WO 2013/117288 son conocidos. A pesar de estos esfuerzos, en este momento no han surgido agentes terapéuticos inhibidores clínicos de TNKS1 y TNKS2.

Se ha observado en cánceres la activación aberrante de la ruta, mediada por la sobreexpresión de proteínas Wnt o mutaciones que afectan a los componentes del complejo de destrucción de β -catenina, lo que conduce a la estabilización de β -catenina. Notablemente, las mutaciones truncadoras de APC son las alteraciones genéticas más prevalentes en carcinomas colorrectales (Miyaki, M. et al. Cancer Res. 1994, 54, 3011-20; Miyoshi, Y. et al. Hum. Mol. Genet. 1992, 1, 229-33; and Powell, S. M. et al. Nature 1992, 359, 235-7). Además, las mutaciones Axin1 y Axin2, reguladores negativos de la ruta de señalización Wnt, se han identificado en pacientes con hepatocarcinomas y cáncer colorrectal respectivamente (Taniguchi, K. et al. Oncogene 2002, 21, 4863-71; Liu, W. et al. Nat. Genet. 2000, 26, 146-7; Lammi, L. et al. Am. J. Hum. Genet. 2004, 74, 1043-50). Estas mutaciones somáticas dan como resultado la estabilización de β -catenina independiente de Wnt y la activación constitutiva de la transcripción mediada por β -catenina.

La actividad de la ruta de señalización Wnt aberrante ha sido implicada en varios cánceres (Waaler et al. Cancer Res. 2012, 72, 2822-2832; Busch et al. BMC Cancer 2013, 13, 211; Yang et al. Oncogene 2011, 30, 4437-4446; De Robertis et al. Mol. Cancer Ther. 2013, 12, 1180-1189; Polakis, P. Curr. Opin. Genet. Dev. 2007, 17, 45-51; and Barker, N. et al. Nat. Rev. Drug Discov. 2006, 5, 997-1014), incluyendo cáncer colorrectal, gástrico, hepático, de mama, cáncer de mama triple negativo, ovario, meduloblastoma, melanoma, pulmón, pulmón de células no pequeñas, páncreas, cáncer de próstata y glioblastomas. La actividad de señalización de la ruta aberrante de Wnt/ β -catenina ha sido implicada en el linfoma de células T, linfoma T-linfoblástico, leucemia linfocítica aguda de células T (T-ALL) Groen et al. Cancer Res. 2008, 68, 6969-6977; mieloma múltiple Qiang et al. Oncogene 2003, 22, 1536-1545, y Chim et al. Leucemia 2007, 21, 2527-2536; linfoma de células de manto Gelebart et al. Blood 2008, 112, 5171-5179; leucemia mieloide crónica (CML), Heidel et al. Cell Stem Cell 2012, 10(4):412-424, y leucemia mieloide aguda (AML), Ysebaert et al. Leukemia 2006, 20, 1211-1216.

Se ha descubierto que la degradación de β -catenina puede promoverse estabilizando el complejo de destrucción Axin/APC/GSK3 α / β a través de la inhibición de las enzimas poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP) tanquirasa 1 y tanquirasa 2, Huang et al. Nature 2009, 461, 614-620.

Los siguientes estudios in vitro e in vivo demuestran la actividad inhibidora de la ruta de señalización de Wnt/ β -catenina y la eficacia de compuestos ejemplificados y probados de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en la inhibición de hTNKS1 y hTNKS2, estabilización de Axin2 en células HEK293, selectividad contra la inhibición de PARP1, reducir la expresión de genes inducibles por Wnt y la actividad antitumoral in vivo. Estos ensayos generalmente son reconocidos por los expertos en la técnica como indicativos de la actividad quimioterapéutica clínica humana. Se cree que la inhibición de TNKS 1 y TNKS 2 es efectiva contra la activación aberrante de la ruta de señalización Wnt/ β -catenina. Los ensayos que evidencian la actividad inhibidora de la ruta de señalización de Wnt/ β -catenina y la eficacia se pueden llevar a cabo sustancialmente de la siguiente manera o mediante ensayos similares que proporcionan datos similares.

Ensayos

En general, las líneas celulares se generan usando materiales comercialmente disponibles y mediante procedimientos conocidos y utilizados rutinariamente por los expertos en la técnica.

Ensayo bioquímico para demostrar la inhibición compuesta de la actividad de la enzima hTNKS

La actividad enzimática de hTNKS1 y hTNKS2 se establece usando un ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzimas (ELISA) que detecta poli ADP ribosa incorporada en la proteína de factor 1 de enlazamiento repetitivo Telomérico (TRF1) enlazada a placa (NCBI, Número de acceso NP_059523.2 (SEQ ID NO: 1) en un formato de 384 pozos. Utilizando la enzima recombinante hTNKS1 (NCBI, Número de acceso NP_003738.2 (SEQ ID NO: 2) o hTNKS2 (NCBI, Número de acceso NP_079511.1 (SEQ ID NO: 3), este ensayo usa NAD⁺ biotilado y mide su incorporación en hTRF1 recombinante utilizando un conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano (HRP) y sustrato de peroxidasa TMB para generar una señal colorimétrica. La proteína hTRF1 etiquetada con Flag recombinante se genera expresando proteína TRF1 humana de longitud completa con una etiqueta Flag en N-terminal en *E. coli*. La proteína recombinante Flag-hTNKS1 (con un cambio de Q83P) se genera expresando TNKS1 humana de longitud completa con una etiqueta Flag de N-terminal en Baculovirus de acuerdo con el protocolo del fabricante del sistema de Expresión de Baculovirus Bac-to-Bac (Invitrogen™; Véase también el Manual de usuario de Invitrogen™, Versión F, de 4 de septiembre de 2010; y el Manual de instrucciones de Invitrogen™ con fecha del

27 de febrero de 2002). Las etiquetas Flag en hTRF1 y hTNK1 se usan solo para la purificación de las enzimas y no están involucradas en el ensayo ELISA.

Se diluye Flag-TRF1 a 5 µg/ml usando tampón de recubrimiento TBS (Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM) y se añaden 25 µl a cada pozo de una placa Corning 3700 (Tewksbury, MA # CLS3700). Las placas se incuban durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se lavan 3 veces con 50 µl/pozo de tampón de lavado (PBS (preparado a partir de concentrado 10x usando Hyclone, Logan, UT # SH30258.01) con Tween-20 al 0,1 % (Sigma, St. Louis, MO # 7949)) seguido de bloqueo durante 1,5 horas a temperatura ambiente usando 50 µl de tampón de bloqueo de caseína al 1 % (Thermo Scientific, Waltham, MA n.º 37528) en 1x PBS (Roche, Indianapolis, IN # 11666789001). Después del bloqueo, las placas se lavan 3 veces con 50 µl/pozo de tampón de lavado. El ensayo enzimático se establece usando 2 µg/ml de Flag-hTNKS1, 9,5 µM de NAD⁺ (Sigma, St. Louis, MO #N0632), 0,5 µM de biotina-NAD⁺ (Trevigen, Gaithersburg, MD # 4670-500-01), y compuestos diluidos de 10 µM a concentración final 4 nM en Tris 50 mM, pH 8,0 (Invitrogen™, Grand Island, NY # 15568-025), MgCl₂ 4 mM, DTT 0,2 mM, Triton X-100 al 0,5 % (Roche, Indianapolis, IN # 11332481001) y 1.0 % de DMSO en un volumen total de 25 µl. La reacción se incuba durante 120 minutos a temperatura ambiente y se detiene lavando la placa 3 veces con 50 µl/pozo de tampón de lavado. La detección de la incorporación de biotina-NAD⁺ se realiza usando 25 µl/pozo de estreptavidina-HRP (GE Life Sciences Pittsburgh, PA # RPN1231V) diluido 1: 3000 con tampón de lavado e incubado durante 60 minutos a temperatura ambiente. La placa se lava 3 veces usando 50 µl/pozo de tampón de lavado. Esto es seguido por la incubación con 25 µl/pozo del kit de sustrato de peroxidasa TMB (KPL, Gaithersburg, MD # 50-76-02 y # 50-65-02) durante 15 minutos a temperatura ambiente y deteniendo la reacción usando 25 µl/pozo de H₂SO₄ 2 N. La absorbancia se lee a 450 nm usando un modelo Envision 2103.

Siguiendo sustancialmente los procedimientos descritos anteriormente para hTNKS1, y usando hTNKS2, se prepara un ensayo de ELISA esencialmente similar.

La actividad de esos compuestos probados contra ambas isoformas hTNKS se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7

Ejemplo No.	hTNKS1 IC ₅₀ (nM)	hTNKS2 IC ₅₀ (nM)
1	19,1 (± 17,7, n=13)	13,7 (± 7,77, n=13)
2	10,7 (±7,13, n=6/7)	6,25 (± 1,20, n=5)
3	10,9 (± 10,5, n=4)	6,58 (±4,48, n=5)
4	26,4 (± 11,2, n=5)	11,6 (±6,88, n=5)
5	85,2 (± 35,5, n=8)	69,4 (±17,6, n=8)
6	17,5 (± 6,48, n=3)	9,95
7	41,9 (± 19,9, n=5)	37,1 (±8,12, n=5)
8	94,8 (± 2,99, n=3/4)	68,7 (± 8,48, n=3/4)
9	83,3 (± 89,4, n=4)	54,9 (± 44,7, n=4)
10	158 (± 89,0, n=4)	121 (± 11,3, n=4)
11	32,7 (± 29,9, n=5)	24,7 (± 20,0, n=5)
12	27,5 (± 32,7, n=5)	22,0 (± 15,1, n=5)
13	14,9 (± 9,89, n=6/7)	12,4 (±3,67, n=6)
14	22,8 (± 13,0, n=7)	11,7 (± 7,32, n=6)

ES 2 647 849 T3

(continuación)

Ejemplo No.	hTNKS1 IC₅₀ (nM)	hTNKS2 IC₅₀ (nM)
15	25,3 (± 5,05, n=6/7)	16,7 (±5,16, n=5)
16	55,1 (± 32,5, n=6)	43,4 (± 23,8, n=4)
17	67,6 (±64,7, n=5)	81,5 (± 9,15, n=4)
18	114 (±84,2, n=6)	85,1 (± 6,72, n=5)
19	19,9 (± 6,75, n=5)	11,8 (± 6,55, n=5)
20	31,8 (±38,2, n=6)	11,3 (± 4,26, n=5)
28	29,5 (± 47,3, n=5)	35,8 (± 19,1, n=4/5)
29	18,4 (±13,3, n=5)	14,1 (± 3,57, n=5)
30	41,7 (±40,2, n=5)	24,5 (±22,6, n=5)
31	15,2 (±5,04, n=5)	12,2 (± 4,59, n=5)
32	37,2 (±39,7, n=6)	22,7 (±24,2, n=6)
33	35,8 (± 32,5, n=6)	26,6 (± 20,8, n=6)
34	47,6 (±36,6, n=5)	11,6 (± 4,30, n=4)
35	21,6	7,54
36	26,2 (± 2,55, n=5)	17,6 (±11,0, n=5)
37	19,8 (± 13,3, n=4)	10,8 (± 1,34, n=4)
38	45,3 (± 32,0, n=4)	30,2 (± 5,13, n=4)
39	30,3 (± 26,6, n=6)	15,9 (± 8,48, n=6)
40	14,3 (± 4,89, n=5)	8,41 (± 1,99, n=5)
41	14,5 (± 10,7, n=5)	10,6 (± 3,51, n=5)
42	19,8 (± 15,9, n=5)	13,0 (±7,41, n=5)
43	34,3 (± 12,7, n=4)	12,7 (± 6,54, n=4)
44	17,6 (± 8,49, n=6)	12,7 (± 2,49, n=6)
45	37,3 (± 11,1, n=6)	19,6 (± 9,93, n=6)
Media ± SEM; SEM = error estándar de la media		

Los datos en la Tabla 7 proporcionan evidencia de que los compuestos ensayados tienen actividad inhibitora in vitro contra ambas isoformas de las tanquirarasas humanas.

Ensayo de estabilización de EGFP-Axin2 para demostrar la actividad basada en células de los inhibidores de la tanquilarasa

5 Las células de Proteína Fluorescente Verde Mejorada-Axin2 (EGFP-Axin2) se preparan por transfección estable de células HEK293 con un constructo Axin2 que contiene una etiqueta de EGFP truncada en terminal N (aminoácidos 228-466; SEQ ID NO: 7). Los cambios en los niveles de Axin2, específicamente la estabilización de Axin2, se monitorizan mediante la cuantificación del nivel de EGFP en la línea celular estable después de diversos tratamientos en un formato de 384 pozos. Los incrementos en la fluorescencia, que reflejan la estabilización de la proteína de fusión EGFP-Axin2 como consecuencia de la inhibición de la tanquilarasa, se monitoeizan en un Citómetro de Barrido Láser Acumen.

10 Las células HEK293 (ATCC, Manassas, VA # CRL-1573) se mantienen en medio completo de DMEM: F12 (Invitrogen™, Grand Island, NY # 93-0152DK) que contiene FBS al 5 % (Invitrogen™, Grand Island, NY # 10082-147), HEPES 20 mM (Hyclone, Logan, UT # SH30237.01) y Glutamax (Invitrogen™, Grand Island, NY n.º 35050-061). Las células EGFP-Axin2 se generan transfectando células HEK293 con Axin2 humano de longitud completa (NCBI, número de acceso NP_004646.3 (SEQ ID N°: 4)) que contiene una etiqueta N-terminal EGFP truncada (aminoácidos 228-466) (EGFP de longitud completa, NCBI, número de acceso ABG78037.1 (SEQ ID NO: 5) en pcDNA3.1+ (de acuerdo con el protocolo del fabricante, Invitrogen™, Grand Island, NY # V79020). Las células EGFP-Axin2 estables se mantienen en medio completo de HEK293 anterior con la adición de 800 µg/ml de G418 (Invitrogen™, Grand Island, NY # 10131-035). El ensayo de estabilización de EGFP-Axin2 se realiza sembrando en placas 2000 células EGFP-Axin2/pozo en una placa de 384-pozo BD recubierta de poli-D-lisina. (BD Biosciences, San Jose, CA # 356663) e incubando en 30 µl/pozo medio completo de HEK293 y crecimiento durante la noche a 37 °C, 5 % de CO₂. Compuestos en DMSO al 100 % se agregan directamente a los medios celulares en 100 nl/pozo. La concentración final de los compuestos probados en el ensayo es de 33 µM -1,7 nM con una concentración final de DMSO en el ensayo de 0,33 %. Las células se incubaron con compuesto durante 24 horas a 37 °C, 5 % de CO₂ y las células se fijaron usando una concentración final de formaldehído al 2 % durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células fijadas se lavan dos veces durante 20 minutos cada una en 40 µl/pozo de PBS (Hyclone, Logan, UT # SH30264.01) que contiene 0,1 % de Triton X-100 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA # BP151-500). Luego se tiñen usando 30 µl/pozo de PBS que contiene 10 µg/ml de yoduro de propidio (Invitrogen™, Grand Island, NY # P3566) y 50 µg/ml de RNasaA (Sigma, St. Louis, MO # R6513). La intensidad de EGFP se mide usando un Citómetro de Barrido Láser Acumen modelo eX3 Acumen cerrado para tener un 10 % de EGFP/célula.

Tabla 8

Ejemplo No.	Estabilización de Axin2 EC₅₀ (nM)
1	65,9 (± 22,7, n=11)
2	32,0 (± 9,34, n=4)
3	18,4 (± 15,8, n=3)
4	26,9 (± 11,5, n=3)
5	115 (± 78,3, n=4)
6	59,5 (± 6,94, n=4)
7	121 (± 21,9, n=3)
8	71,5 (± 28,7, n=5)
9	70,9 (± 30,6, n=4)
10	590 (± 228, n=3)

ES 2 647 849 T3

(continuación)

Ejemplo No.	Estabilización de Axin2 EC ₅₀ (nM)
11	119 (± 26,6, n=4)
12	122 (± 31,2, n=4)
13	101 (± 26,8, n=4)
14	52,7 (± 23,9, n=4)
15	115 (± 17,5, n=4)
16	509 (± 130, n=3)
17	198 (± 57,4, n=3)
18	901 (± 138, n=3)
19	62,6 (± 14,6, n=4)
20	77,9 (± 29,6, n=3)
28	130 (± 79,4, n=4)
29	41,7 (± 12,9, n=3)
30	57,7 (± 27,1, n=3)
31	38,5 (± 6,69, n=3)
32	136 (± 84,8, n=4)
33	122 (± 73,6, n=4)
34	156 (± 141, n=3)
35	27,8
36	29,1(± 8,88, n=3)
37	23,9 (± 4,48, n=3)
38	34,8 (± 4,46, n=3)
39	181 (± 64,9, n=5)
40	39,8 (± 16,2, n=6)
41	61,6 (± 10,5, n=4)
42	141 (± 44,0, n=3)

(continuación)

Ejemplo No.	Estabilización de Axin2 EC ₅₀ (nM)
43	74,5 (± 20,0, n=4)
44	118 (± 33,2, n=4)
45	144 (± 1,88 n=3)
Media ± SEM; SEM = error estándar de la media	

Los datos en la Tabla 8 proporcionan evidencia de que los compuestos probados estabilizan Axin2 en células HEK293.

5 Ensayo enzimático de PARP1 humano para determinar la selectividad de los inhibidores de la tanquirasa (vs. PARP1)

El ensayo Poly ADP-ribosa polimerasa 1 (PARP1) es un ELISA que detecta poli ADP ribosa incorporada en la proteína histona unida a la placa en un formato de 384 pozos. Usando la enzima hPARP1 recombinante, este ensayo usa NAD⁺ biotinilado y mide la incorporación en histonas usando un conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) y sustrato de peroxidasa de TMB para generar una señal colorimétrica.

- 10 La histona se diluye a 0,1 mg/ml en tampón de recubrimiento (Na₂CO₃ 50 mM, pH 9,4, Mallinckrodt, St. Louis, MO) y se añaden 25 µl a cada pozo de una placa Corning 3700. Las placas se incuban durante la noche a 4 °C. Al día siguiente las placas se lavan 3x con 50 µl/pozo de tampón de lavado (PBS (preparado a partir de 10x concentrado) con Tween-20 al 0,1 %) seguido de bloqueo durante 1,5 horas a temperatura ambiente usando 50 µl de tampón de bloqueo de caseína al 1 % en 1 x PBS (Roche, Indianapolis, IN # 11666789001). Después del bloqueo, las placas se lavan 3 veces con 50 µl/pozo de tampón de lavado. El ensayo de enzima PARP1 se establece usando 0,01 U/µl de hPARP1 (Trevigen, Gaithersburg, MD # 4668-500-01), cóctel de 0.5X PARP, ADN activado (Trevigen, Gaithersburg, MD # 4671-096-03 y # 4671 -096-06) y compuestos diluidos a partir de una concentración final de 10 µM a 4 nM en tampón de ensayo que contiene Tris 50 mM, pH 8,0, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM (Invitrogen™, Grand Island, NY # 15508-013), Triton X-100 al 0,5 % y DMSO al 1.0 %. La reacción se incuba durante 60 minutos a temperatura ambiente y se detiene lavando la placa 3 veces con 50 µl/pozo de tampón de lavado. La detección de la incorporación de biotina-NAD⁺ se realiza usando 25 µl/pozo de Streptavidina-HRP diluido 1:3000 con tampón de lavado y se incuba durante 60 minutos a temperatura ambiente. La placa se lava entonces 3 veces usando 50 µl/pozo de tampón de lavado. Esto es seguido por la incubación con 25 µl/pozo del kit de sustrato de peroxidasa TMB (KPL, Gaithersburg, MD # 50-76-02 y # 50-65-02) durante 15 minutos a temperatura ambiente y deteniendo la reacción usando 25 µl/pozo de H₂SO₄ 2 N. La absorbancia se lee a 450 nm usando un modelo Envision 2103.

Tabla 9

Ejemplo No.	Inhibición de PARP1 IC ₅₀ (nM)
1	4.510 (± 3030, n=2)
2	919 (n=1/2)
3	2.330 (± 234, n=2)
4	3.020 (± 197, n=2)
5	7.660 (± 1450, n=2)
6	2.670 (± 433, n=2)
7	5.930 (± 647, n=2)
8	5470

ES 2 647 849 T3

(continuación)

Ejemplo No.	Inhibición de PARP1 IC₅₀ (nM)
9	3940
10	33.700 (± 3130, n=2)
11	13.500
12	5.050
13	3.470 (± 318, n=2)
14	5.660 (± 698, n=2)
15	6.910 (± 746, n=2)
16	187 (± 183, n=2)
17	7.220 (± 1790, n=2)
18	77.600 (± 24000, n=2)
19	5390
20	8.240 (±10800, n=4)
29	6.070 (± 1730, n=2)
30	8.800 (± 1720, n=2)
31	17.400 (± 48.1, n=2)
32	21.500 (± 2340, n=2)
33	15.300 (± 2230, n=2)
34	16.200 (± 5740, n=2)
36	95.700 (± 6420, n=2)
37	2.440 (± 598, n=2)
38	46.700 (± 23700, n=2)
39	7.740
40	2.840
41	4.660
42	2.650 (± 143, n=2)

(continuación)

Ejemplo No.	Inhibición de PARP1 IC ₅₀ (nM)
43	6.390 (± 1430, n=2)
44	5.830 (± 229, n=2)
45	3.530 (± 2030, n=2)
Media ± SEM; SEM = error estándar de la media	

Los datos en la Tabla 9 proporcionan evidencia en cuanto a la inhibición selectiva de cada compuesto probado de las tanquirasas cuando se compara con la inhibición de PARP1.

5 Ensayo DLD-1 TOPFlash para determinar la capacidad de los inhibidores de la tanquirasa para reducir la expresión de genes inducibles por Wnt

10 Las células DLD-1 contienen una mutación en el gen de adenoma poliposis coli (APC) que codifica una proteína APC truncada. Esta proteína es incapaz de enlazarse al complejo de destrucción y causa una ruta Wnt activada constitutivamente al permitir que la β-catenina se transloque al núcleo y active los factores de transcripción TCF/LEF. DLD-1 TOPFlash es una línea celular informadora derivada de células DLD-1 (adenocarcinoma colorrectal humano) mediante transfección estable de un promotor TCF4 unido a un informador de luciferasa. La cantidad de luciferasa en los lisados celulares se cuantifica midiendo la luminiscencia en un formato de 96 pozos.

15 Las células DLD-1 (ATCC, Manassas, VA, # CCL-221) se mantienen en medio completo de RPMI (Invitrogen™, Grand Island, NY # 11875-093) que contiene 10 % de SFB (Hyclone, Logan, UT # SH30070.03). Las células DLD-1 TOPFlash se generan de acuerdo con el protocolo del fabricante infectando células DLD-1 con Cignal Lenti TCF/LEF Reporter (Luc) (Qiagen, Valencia, CA # CLS-018L-8, lote # BX16) a una MOI de 10. Se agrega Polybreen (Sigma, St. Louis, MO # H9268) a una concentración final de 8 µg/ml y las células se incuban durante la noche a 37 °C, CO₂ al 5 %. Al día siguiente, el medio se cambia a medio de crecimiento fresco que contiene 10 µg/ml de puromicina (Clontech, Mountain View, CA # 631305) y las células se incuban durante 3 días adicionales a 37 °C, CO₂ al 5 % para generar una línea celular estable. El ensayo TOPFlash se realiza sembrando en placas células DLD-1 TOPFlash a 10.000 células/pozo en una placa blanca/transparente Corning de 96 pozos (Corning Tewksbury, MA # 3610) e incubando en medio completo 30 µl/pozo que contiene RPMI (Hyclone, Logan, UT # SH30027.01), 10 % de FBS y 10 µg/ml de puromicina y se hizo crecer durante la noche a 37 °C, CO₂ al 5 %. Los compuestos en 100 % de DMSO se diluyen 28,5 veces en OptiMEM® (Invitrogen™, Grand Island, NY # 31985-062) que contiene 0.2 % de BSA (diluido de 7.5 % de BSA Invitrogen™, Grand Island, NY # 15260-037) y 5 µl de compuesto diluido añadido a los 30 µl de medio de cultivo celular/pozo. La concentración final de los compuestos probados en el ensayo es 50 µM -1,5 nM siendo la concentración final de DMSO en el ensayo de 0.48 %. Las células se incuban con el compuesto durante 24 horas a 37 °C, CO₂ al 5 % y las placas se retiran de la incubadora y se ponen a temperatura ambiente durante 30 minutos. El reactivo BugLite™ (3x) se prepara disolviendo 2,296 g de DTT (Sigma, St. Louis, MO # D0632), 1,152 g de CoA (Sigma, St. Louis, MO # C3019), 0,248 g de ATP (Sigma, St. Louis, MO # A7699) y 0,42 g de Luciferina (Biosynth AG, Itasca, IL # L-8240) en 1 litro de tampón de lisis Triton-X100 que contiene Tris 150 mM (108,15 ml de HCl Tris 1 M y 41,85 ml de Base Tris 1M (Sigma, St. Louis, MO # T3253 y T-1503)), MgCl₂ 3 mM y Triton X-100 al 3 %. Después de equilibrar las placas a temperatura ambiente, se añaden 18 µl de reactivo BugLite 3x a cada pozo y las placas se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación. La luminiscencia se mide usando un modelo Envision 2103.

Tabla 10

Ejemplo No.	Inibición de la expresión del gen inducible por Wnt IC ₅₀ (µM)
1	0,0132 (± 0,00595, n=6)
2	0,00817 (± 0,00587, n=4)
3	0,00866 (± 0,00190, n=3)

ES 2 647 849 T3

(continuación)

Ejemplo No.	Inibición de la expresión del gen inducible por Wnt IC₅₀(μM)
4	0,00671 (\pm 0,00248, n=3)
5	0,0211 (\pm 0,00437, n=4)
6	0,00720 (\pm 0,00120, n=2)
7	0,0146 (\pm 0,0128, n=3)
8	0,0184 (\pm 0,0110, n=3)
9	0,0282 (\pm 0,0257, n=4)
10	0,171 (\pm 0,0474, n=3)
11	0,0281 (\pm 0,00945, n=3)
12	0,0195 (\pm 0,0111, n=3)
13	0,0230 (\pm 0,0126, n=3)
14	0,00935 (\pm 0,00872, n=3)
15	0,0154 (\pm 0,00630, n=3)
16	0,102 (\pm 0,0268, n=3)
17	0,0373 (\pm 0,0103, n=3)
18	0,156 (\pm 0,0724, n=3)
19	0,0126 (\pm 0,00325, n=3)
20	0,0222 (\pm 0,00155, n=2)
28	0,0228 (\pm 0,0105, n=3)
29	0,0177 (\pm 0,0138, n=3)
30	0,0168 (\pm 0,0124, n=3)
31	0,0178 (\pm 0,0119, n=3)
32	0,0201 (\pm 0,0178, n=3)
33	0,0268 (\pm 0,0229, n=3)
34	0,0236 (\pm 0,0246, n=3)
35	0,0058

(continuación)

Ejemplo No.	Inibición de la expresión del gen inducible por Wnt IC ₅₀ (µM)
36	0,0208 (± 0,0168, n=3)
37	0,00622 (± 0,00286, n=3)
38	0,0222 (± 0,00824, n=3)
39	0,0206 (± 0,0129, n=4)
40	0,00695 (± 0,00456, n=4)
41	0,0138 (± 0,00253, n=3)
42	0,0220 (± 0,00397, n=3)
43	0,0110 (± 0,00217, n=3)
44	0,0112 (± 0,00315, n=3)
45	0,0188 (± 0,00510, n=4)
Media ± SEM; SEM = error estándar de la media	

Los datos en la Tabla 10 demuestran que los compuestos probados son inhibidores de genes inducibles por Wnt medidos por el ensayo informador TOPFlash Wnt.

5 Establecimiento de la actividad antitumoral in vivo de los inhibidores de la tanquirasa:

Los ratones de la cepa C57BL/6J-Apc^{Min}/J portan una mutación truncada en el codón 850 del gen Apc y desarrollan pólipos intestinales y neoplasmas colorrectales a la edad de 3-6 meses. El truncamiento en el gen APC conduce a la activación de la ruta de señalización de Wnt y se detectan niveles elevados de β-catenina en lesiones preneoplásicas/neoplásicas en estos ratones.

- 10 Con el fin de evaluar la actividad antitumoral in vivo de los inhibidores de la tanquirasa, los ratones de la cepa C57BL/6J-Apc^{Min}/J se adquieren de Jackson Laboratories (número de inventario 002020) y se aclimatan durante 1 semana. Los animales se dividen en 2 grupos y se tratan con 25 mg/kg (BID) del Ejemplo 1 o vehículo durante 60 días consecutivos. Al final del período de tratamiento, los animales se sacrifican y se cuenta el número de pólipos en el intestino delgado bajo un microscopio de disección. Como se muestra en la Tabla 11, los ratones de la cepa C57BL/6J-Apc^{Min}/J tratados con el compuesto del Ejemplo 1 tienen un número estadísticamente significativo menor de tumores en el intestino delgado en comparación con los animales tratados con vehículo.
- 15

Tabla 11

Tratamiento	Número de animales por grupo	Número promedio de pólipos por animal	Valor p
Vehículo	13	7,3 ± 0,53	
Ejemplo 1	9	4,3 ± 0,70	0,0028

- 20 Los datos en la Tabla 11 proporcionan evidencia de que el tratamiento in vivo con el Ejemplo 1 reduce el número de pólipos intestinales en ratones de la cepa C57BL/6J-Apc^{Min}/J.

Ensayo de formación de colonias

El compuesto del Ejemplo 1 también se prueba en un ensayo de formación de colonias in vitro contra cuatro líneas celulares tumorales humanas diferentes, tres derivadas de tumores pancreáticos (Capan-2, HPAF-II y Panc 04.03) y una derivada de cáncer de pulmón de células no pequeñas (A549). Este ensayo se lleva a cabo usando materiales comercialmente disponibles por procedimientos conocidos y utilizados de forma rutinaria por los expertos en la técnica.

Las células A549 (ATCC, Manassas, VA # CCL-185) se mantienen en medio completo de F12K (Hyclone, Logan, UT # SH30526) que contiene 10 % de FBS (Invitrogen, Grand Island, NY # 16000-044). Las células Capan-2 (ATCC, Manassas, VA # HTB-80) se mantienen en medio completo de McCoys 5A (Hyclone, Logan, UT # SH30200) que contiene 10 % de FBS (Invitrogen, Grand Island, NY # 16000-044). Las células HPAF-II (ATCC, Manassas, VA # CRL-1997) se mantienen en medio completo de EMEM (Hyclone, Logan, UT # SH30024) que contiene 10 % de FBS (Invitrogen, Grand Island, NY # 16000-044). Las células Panc 04.03 (ATCC, Manassas, VA # CRL-2555) se mantienen en medio completo de RPMI (Hyclone, Logan, UT # SH30255) que contiene 15 % de FBS (Invitrogen, Grand Island, NY # 16000-044) y 20 µg/ml de insulina (Sigma, St. Louis, MO # I9278). Los ensayos de formación de colonias se realizan sembrando en placas células A549 a 250 células/pozo; células Capan-2 a 2000 células/pozo; células HPAF-II a 1000 células/pozo o células Panc 04.03 a 2000 células/pozo cada una en una placa de 6 pozos (Corning Life Sciences, Tewksbury, MA # 353046), incubando en 2 ml de medio completo y cultivadas durante la noche a 37 °C, CO₂ al 5 %. Al día siguiente, se retira el medio y se reemplaza con 2 ml de medio de crecimiento respectivo fresco para cada línea celular. Los compuestos de prueba en 100 % de DMSO se diluyen en 100 % de DMSO a una concentración de 1000X y se agregan 2 µl a 2 ml de medio en el pozo para lograr una concentración final de 0,03 a 3 µM. Las células se incuban a 37 °C, 5 % de CO₂. Cada tres o cuatro días, se retira el medio y se reemplaza con 2 ml de medio completo nuevo para cada línea celular como antes. Después del cambio de medio, se agrega el compuesto fresco como se indicó anteriormente. Las células se incuban un total de 11 días en presencia del compuesto. El día 11, se retira el medio y las células se lavan una vez con 5 ml de DPBS (Hyclone, Logan, UT # SH30028). Se añade tinción de cristal violeta (0,5 % de violeta cristal (Sigma, St Louis, MO, n° C3886) en metanol al 20 % (EMD Millipore, Billerica, MA # MX0490-4) a cada pozo (0,4 ml) y se incuba a temperatura ambiente durante 15 min. Los pozos se lavan dos veces con DPBS y las placas se fotografían con Fuji LAS4000 (FujiFilm, Tokio, Japón). El análisis del área de la colonia dentro de cada pozo se realiza utilizando el software FujiFilm Colony Version 1.1 (FujiFilm, Tokio, Japón).

Tabla 12

Efecto del compuesto del Ejemplo 1 en la formación de colonias				
Compuesto de la concentración del Ejemplo 1	% de inhibición de la formación de colonias			
	A549	Capan-2	HPAF-II	Panc 04.03
Control	0	0	0	0
0,03 µM	25,46	-20,82	2,44	-34,35
0,11 µM	46,50	18,04	40,47	51,39
0,33 µM	54,23	55,90	61,65	92,79
1 µM	74,35	63,92	85,22	92,51
3 µM	72,07	70,73	88,23	90,03

Los datos en la Tabla 12 demuestran que el compuesto del Ejemplo 1 inhibe la formación de colonias cuando se compara con el control contra cada una de las líneas celulares analizadas.

Tabla 13

Polipéptido usado en ensayos	Secuencias de aminoácidos
hTRF1	(SEQ ID NO: 1)

(continuación)

Polipéptido usado en ensayos	Secuencias de aminoácidos
NCBI, Número de acceso NP_059523.2	
hTNKS1	(SEQ ID NO: 2)
NCBI, Número de acceso NP_003738.2	
hTNKS2	(SEQ ID NO: 3)
NCBI, Número de acceso NP_079511.1	
hAxi2	(SEQ ID NO: 4)
NCBI, Número de acceso NP_004646.3	
EGFP	(SEQ ID NO: 5)
NCBI, Número de acceso ABG78037.1	
Péptido Flag	(SEQ ID NO: 6)
Sigma-Aldrich	
EGFP	(SEQ ID NO: 7)
Aminoácidos 228-466	
NCBI, Número de acceso ABG78037.1	

Secuencias

SEQ ID NO: 1 - hTRF1 - proteína

MAEDVSSAAPSPRGCADGRDADPTTEEQMAETERNDEEQFECQELLECCQVQVGA
 PEEEEEEEEEDAGLVAAEA EVAAGWMLDFLCLSLCRAFRDGRSEDFRRTRNSAEAI
 IHGLSSLTACQLRTIYICQFLTRIAAGKTLDAQFENDERITPLESALMIWGSIEKEH
 DKLHEEIQNLIQAIIVCMENGNFKEAEEVFERIFGDPNSHMPFKSKLLMIISQKD
 TFHSFFQHFSYNHMMEEKIKSYVNYVLSEKSS'FLMKAAA'KVVESKRTRTITSQDK
 PSGNDVEMETEANLDTRKSVSDKQSAVTESEGTVSLLRSHKNLFLSKLQHG'GTQ
 QQDLNKKERRV'GTPQST'KKKKESRRATESRIPVSKSQPVTPEKHRARKRQAWLW
 EEDKNLRSGVRKYGEGNWSKILLHYKFNNRTSVMLKDRWR'TMK'KLKLISSDSE
 D

SEQ ID NO: 2 - hTNKS1 - proteína

MAASRRSQHHHHHHQQLQPAPGASAPPPPPPLSPGLAPGTPASPTASGLAPF
 ASPRHGLALPEGDGSRDPPDRPRSPDPVDGTSCCSTTSTICTVAAAPVVPVAVSTSS
 AAGVAPNPAGSGSNNSPSSSSSPTSSSSSSPSSPGSSLAESPEAAGVSSTAPLGPGA
 AGPGTGVPAVSGALRELLEACRNGDVSrvKRLVDAANVNAKDMAGRKSSPLHF
 AAGFGRKDVVEHLLQMGANVHARDGGLIPLHNACSFghAEVVSLLLCQGADP
 NARDNWNYPPLHEAAIKGKIDVCIVLLQHGADPNIRNTDGKSALDLADPSAKAV
 LTGEYKKDELLEAARSGNEEKLMALLTPLNVNCHASDGRKSTPLHLAAGYNRV
 RIVQLLLQHGADVHAKDKGGLVPLHNACSYGHYEVTELLLKHGACVNAMDW
 QFTPLHEAASKNRVEVCSLLLSHGADPTLVNCHGKSAVDMAPTPELRERLTYEF
 KGHSLLQAAREADLAKVKKTLALEIINFKQPQSHETALHCAVASLHPKRKQVTEL
 LLRKGANVNEKNKDFMTPHVAAERAHNDVMEVLHKHGAKMNALDTLGQTA
 LHRAALAGHLQTCRLLLSYGS DPSIISLQGFTA AQMGNEAVQQILSESTPIRTSDV
 DYRLLLEASKAGDLETVKQLCSSQNVNCRDLEGRHSTPLHFAAGYNRVSVEYLL
 HHGADVHAKDKGGLVPLHNACSYGHYEAELLVRHGASVNVADLWKFTPLHE
 AAKGKYEICKLLLKHGADPTKKNRDGNTPLDLVKEGDTDIQDLLRGDAALLD
 AAKKGCLARVQKLC TPENINCRDTQGRNSTPLHLAAGYNNLEVAEYLLEHGAD
 VNAQDKGGLIPLHNAASYGHVDIAALLIKYNTCVNATDKWAFTPLHEAAQKGR
 TQLCALLLAHGADPTMKNQEGQTPLDLATADDIRALLIDAMPPEALPTCFKPQAT
 VVSASLISPASTPSCLSAASSIDNLTGPLAE LAVGGASNAGDGAAGTERKEGEVA
 GLDMNISQFLKSLGLEHLRDFETEQITLDV LADMGHEELKEIGINAYGHRHKLK
 GVERLLGGQQGTNPYLTFHCVNQGTILLDLAPEDKEYQSVEEEMQSTIREHRDG
 GNAGGIFNRYNVIRIQKVVNKLRERFCHRQKEVSEENHNHHNERMLFHGSPFIN
 AIIHKGFDERHAYIGGMFGAGIYFAENSSKSNQYVYGIGGGTGCPHDKDRSCYIC
 HRQMLFCRVTLGKSFLQFSTMKMAHAPPGHHSVIGRPSVNGLAYAEYVIYRGEQ
 AYPEYLITYQIMKPEAPSQTATAAEQKT

SEQ ID NO: 3 - hTNKS2 - proteína

MSGRRACAGGGAACASAAAEAVEPAARELFEACRNGDVERVKRLVTPEKVNSRD
 TAGRKSTPLHFAAGFGRKDVVEYLLQNGANVQARDDGGLIPLHNACSFHAEV
 VNLLLRHGADPNARDNWNYPPLHEAAIKGKIDVCIVLLQHGAETIRNTDGRTA
 LDLADPSAKAVLTGEYKDELLESARSGNEEKMMALLTPLNVNCHASDGRKSTP
 LHLAAGYNRVKIVQLLLQHGADVHAKDKGDLVPLHNACSYGHYEVTELLVKHG
 ACVNAMDLWQFTPLHEAASKNRVEVCSLLLSYGADPTLLNCHNKSAIDLAPTPQ
 LKERLAYEFKGSLLQAAREADVTRIKKHLSEMNVFKHPQTHETALHCAAASP
 YPKRKQICELLRRKGANINEKTKFELTPLHVASEKAHNDVVEVVVKHEAKVNAL
 DNLGQTSLHRAAYCGHLQTCRLLLSYGCDPNIIISLQGFTALQMGNEENVQQLQE
 GISLGNSEADRQLLEAAKAGDVETVKKLCTVQSVNCRDIEGRQSTPLHFAAGYN
 RVSVEYLLQHGADVHAKDKGGLVPLHNACSYGHYEVAELLVKHGAVVNVAD
 LWKFTPLHEAAAKGKYEICKLLLQHGADPTKKNRDGNTPLDLVKDGDTDIQDLL
 RGDAALLDAAKKGLARVKKLSSPDVNCRDVTQGRHSTPLHLAAGYNNLEVAE
 YLLQHGADVNAQDKGGLIPLHNAASYGHVDVAALLIKYNACVNATDKWAFTPL
 HEAAQKGRQTQLCALLAHGADPTLKNQEGQTPDLVSAADDVSALLTAAMPSSAL
 PSCYKQPVLNGVRSPGATADALSSGPSSPSSLSAASSLDNLSGSFSELSSVVSSGT
 EGASSLEKKEVPGVDFSTQFVRNLGLEHLMDFEREQITLDVLVEMGHKELKEIG
 INAYGHRHKLKIGVERLISGQQLNPYLTLNTSGSGTILIDLSPDDKEFQSVEEEM
 QSTVREHRDGGHAGGIFNRYNLIKIQKVCNKKLWERYTHRRKEVSEENHNHANE
 RMLFHGSPFVNAIIHKGFDERHAYIGGMFGAGIYFAENSSKSNQYVYGGGGTGC
 PVHKDRSCYICHRQLFCRVTLGKSFLQFSAMKMAHSPPGHHSVTGRPSVNGLA
 LAEYVIYRGEQAYPEYLITYQIMRPEGMVDG

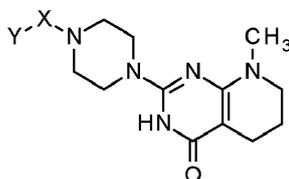
SEQ ID NO: 4 - hAxin2 - proteína

MSSAMLVTCPLDPSSSFREDAPRPPVPGEEGETPPCQPGVGGKQVTKPMPVSSNT
 RRNEDGLGEPEGRASPDSPLTRWTKSLHSLLDGDQDGAFLFRTFLEKRCVDTLDF
 WFACNGFRQMNLDKTKTLRVAKAIYKRYIENNSIVSKQLKPKATKYIRDGIKKQ
 QIDSIMFDQAQTEIQSVMEENAYQMFLTSDIYLEYVRSRGENTAYMSNGGLGSLK
 VVCGYLPNLNEEEWTCADFKCKLSPTVVGLSSKTLRATASVRSTETVDSGYRSF
 KRSDPVNPHYHIGSGYVFAPATSANDSEISSDALTDSSMSMTDSSVDGIPPYRVGS
 KKQLQREMHRSVKANGQVSLPHFPRTHRLPKEMTPVEPATFAELISRLEKLEKLE
 LESRHSLEERLQQIREDEEREGSELTLNSREGAPTQHPLSLLPSGSYEEDPQTILDD
 HLSRVLKTGPCQSPGVGRYSPRSRSPDHHSQYHSLPPGGKLPAAASPGA
 CPLLGGKGFVTKQTTKHVHHHYIHHHVAVPKTKEEIEAEATQRVHCFPCGGSEYY
 CYSKCKSHSKAPETMPSEQFGGSRGSTLPKRNGKGTPEGLALPAREGGAPGGAG
 ALQLPREEGDRSQDVWQWMLSESRQSKPKPHSAQSTKKAYPLESARSSPGERAS
 RHHLWGGNSGHPRTTPRAHLFTQDPAMPPLTPPNTLAQLEEACRRLAEVSKPPK
 QRCCVASQQRDRNHSATVQTGATPFSNPSLAPEDHKEPKLAGVHALQASELVV
 TYFFCGEEIPYRRMLKAQSLTLGHFKEQLSKKGNRYRYFKKASDEFACGAVFEEI
 WEDETVLPMYEGRILGKVERID

SEQ ID NO: 5 - EGFP - proteína de longitud completa

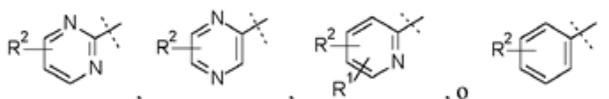
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula:



en la que:

5 Y es:



X es -CH₂-, -C(CH₃)H-, o -C(CH₂CH₃)H-;

R¹ es hidrógeno, hidroxilo, o halo;

R² es hidrógeno, halo, -CN, -CH₃, CF₃, o -OCH₃;

10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Un compuesto de la reivindicación 1 en el que:

Y es:



X es -CH₂-, -C(CH₃)H-, o -C(CH₂CH₃)H-;

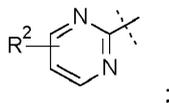
15 R¹ es hidrógeno, hidroxilo, o halo;

R² es hidrógeno, halo, -CN, -CH₃, CF₃, o -OCH₃;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. Un compuesto de la reivindicación 1 o 2 en el que:

Y es



20

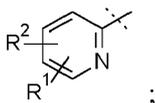
X es -CH₂-, -C(CH₃)H-, o -C(CH₂CH₃)H-;

R² es hidrógeno, halo, -CN, -CH₃, CF₃, o -OCH₃;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. Un compuesto de la reivindicación 1 o 2 en el que:

25 Y es:



X es -CH₂-, -C(CH₃)H-, o -C(CH₂CH₃)H-;

R¹ es hidrógeno, hidroxilo, o halo;

R² es hidrógeno, halo, -CN, -CH₃, CF₃, o -OCH₃;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 5. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, o 3 que es:

8-Metil-2-[4-(pirimidin-2-ilmetil)piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

8-Metil-2-[4-(1-pirimidin-2-iletal)piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

10 2-[4-[(4-Cloropirimidin-2-il)metil]piperazin-1-il]-8-metil-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o

2-[4-[(4-metoxipirimidin-2-il)metil]piperazin-1-il]-8-metil-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, o 4 que es:

15 2-[4-[(3-Bromo-2-piridil)metil]piperazin-1-il]-8-metil-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

2-[4-[(3-Cloro-2-piridil)metil]piperazin-1-il]-8-metil-3,5,6,7-tetrahidropirido [2,3-d]pirimidin-4-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

20 2-[4-[(3-Fluoro-2-piridil)metil]piperazin-1-il]-8-metil-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o

2-[[4-(8-Metil-4-oxo-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)piperazin-1-il]metil]piridin-3-carbonitrilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25 7. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 o 5 que es 8-metil-2-[4-(pirimidin-2-ilmetil)piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4(3H)-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

8. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 5 o 7 que es sal de ácido 8-Metil-2-[4-(pirimidin-2-ilmetil)piperazin-1-il]-3,5,6,7-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-4-ona 4-metilbencenosulfónico.

9. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 10. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en terapia.

35 11. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de un cáncer que es cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, cáncer de ovario, meduloblastoma, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, glioblastoma, linfoma de células T, linfoma T-linfoblástico, leucemia linfocítica aguda de células T (T-ALL), linfoma de células del manto, mieloma múltiple, leucemia mieloide crónica o leucemia mieloide aguda.

Fig. 1

