

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 100**

51 Int. Cl.:

C07D 403/12 (2006.01)

C07D 405/14 (2006.01)

A61K 31/505 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.02.2014 PCT/IB2014/059094**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.08.2014 WO14128622**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2014 E 14708681 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2958911**

54 Título: **Quinazolinas como inhibidores de quinasa**

30 Prioridad:

21.02.2013 US 201361767423 P

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

12.02.2018

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE INTELLECTUAL PROPERTY
DEVELOPMENT LIMITED (100.0%)
980 Great West Road
Brentford, Middlesex TW8 9GS, GB**

72 Inventor/es:

**CASILLAS, LINDA N.;
CHARNLEY, ADAM KENNETH;
DONG, XIAOYANG;
HAILE, PAMELA A.;
DEMARTINO, MICHAEL P. y
MEHLMANN, JOHN F.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 654 100 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

Quinazolininas como inhibidores de quinasa

Campo de la invención

La presente invención se refiere a quinazolininas que inhiben la quinasa RIP2 y a procedimientos para preparar y usar las mismas.

Antecedentes de la invención

La proteína 2 que interacciona con receptor (RIP2) con actividad quinasa, que también se refiere como CARD3, RICK, CARDIAK, o RIPK2, es una proteína quinasa de serina/treonina de la familia TKL implicada en la señalización de la inmunidad innata. La quinasa RIP2 está compuesta por un dominio quinasa N-terminal y un dominio C-terminal de reclutamiento de caspasas (CARD) unidos mediante una región intermedia (IM) ((1998) *J. Biol. Chem.* 273, 12296-12300; (1998) *Current Biology* 8, 885-889; y (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 16968-16975). El dominio CARD de la quinasa RIP2 media la interacción con otras proteínas que contienen CARD, tales como NOD1 y NOD2 ((2000) *J. Biol. Chem.* 275, 27823-27831 y (2001) *EMBO reports* 2, 736-742). NOD1 y NOD2 son receptores citoplásmicos que juegan un papel clave en la vigilancia de la inmunidad innata. Reconocen patógenos bacterianos tanto gram positivos como gram negativos y se activan por restos peptidoglicano específicos, ácido diaminopimélico (es decir, DAP) y muramil dipéptido (MDP), respectivamente ((2007) *J Immunol* 178, 2380-2386).

Después de la activación, la quinasa RIP2 se asocia con NOD1 o NOD2 y parece funcionar principalmente como un soporte molecular para juntar otras quinasas (TAK1, IKK $\alpha/\beta/\gamma$) implicadas en la activación de proteína quinasa activada por NF- κ B y mitógenos ((2006) *Nature Reviews Immunology* 6, 9-20). La quinasa RIP2 experimenta una poliubiquitinación ligada a K63 en la lisina 209 lo que facilita el reclutamiento de TAK1 ((2008) *EMBO Journal* 27, 373-383). Esta modificación posterior a la traducción se requiere para la señalización ya que la mutación de este residuo evita la activación de NF- κ B mediada por NOD1/2. La quinasa RIP2 también experimenta autofosforilación en la serina 176, y posiblemente en otros residuos ((2006) *Cellular Signalling* 18, 2223-2229). Los estudios usando mutantes sin actividad quinasa (K47A) e inhibidores que son moléculas pequeñas no selectivos han demostrado que la actividad de la quinasa RIP2 es importante para regular la estabilidad de la expresión y señalización de la quinasa RIP2 ((2007) *Biochem J* 404, 179-190 y (2009) *J. Biol. Chem.* 284, 19183-19188).

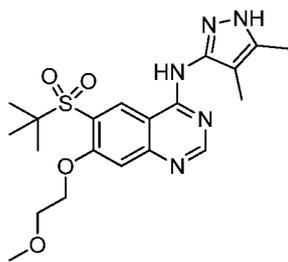
La desregulación de la señalización dependiente de RIP2 se ha ligado a enfermedades autoinflamatorias. Las mutaciones con ganancia de función en el dominio NACHT de NOD2 causan el Síndrome de Blau, sarcoidosis precoz, una enfermedad granulomatosa pediátrica caracterizada por uveítis, dermatitis, y artritis ((2001) *Nature Genetics* 29, 19-20; (2005) *Journal of Rheumatology* 32, 373-375; (2005) *Current Rheumatology Reports* 7, 427-433; (2005) *Blood* 105, 1195-1197; (2005) *European Journal of Human Genetics* 13, 742-747; (2006) *American Journal of Ophthalmology* 142, 1089-1092; (2006) *Arthritis & Rheumatism* 54, 3337-3344; (2009) *Arthritis & Rheumatism* 60, 1797-1803; y (2010) *Rheumatology* 49, 194-196). Las mutaciones en el dominio LRR de NOD2 se han ligado fuertemente a susceptibilidad a la Enfermedad de Crohn ((2002) *Am. J. Hum. Genet.* 70, 845-857; (2004) *European Journal of Human Genetics* 12, 206-212; (2008) *Mucosal Immunology* (2008) 1 (Supl 1), S5-S9. 1, S5-S9; (2008) *Inflammatory Bowel Diseases* 14, 295-302; (2008) *Experimental Dermatology* 17, 1057-1058; (2008) *British Medical Bulletin* 87, 17-30; (2009) *Inflammatory Bowel Diseases* 15, 1145 – 1154 y (2009) *Microbes and Infection* 11, 912-918). Las mutaciones en NOD1 se han asociado con asma ((2005) *Hum. Mol. Genet.* 14, 935-941) y enfermedad inflamatoria del intestino precoz y extraintestinal ((2005) *Hum. Mol. Genet.* 14, 1245-1250). Los estudios genéticos y funcionales también han sugerido un papel para la señalización dependiente de RIP2 en una variedad de otros trastornos granulomatosos, tales como sarcoidosis ((2009) *Journal of Clinical Immunology* 29, 78-89 y (2006) *Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Diseases* 23, 23-29) y Granulomatosis de Wegner ((2009) *Diagnostic Pathology* 4, 23).

Un inhibidor que es una molécula pequeña potente, selectivo de la actividad de la quinasa RIP2 bloquearía la señalización pro-inflamatoria dependiente de RIP2 y de esta manera proporciona un beneficio terapéutico en enfermedades autoinflamatorias y/o autoinmunes caracterizadas por una actividad incrementada y/o desregulada de la quinasa RIP2.

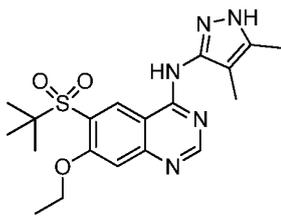
Sumario de la invención

La invención está dirigida a un compuesto seleccionado de:

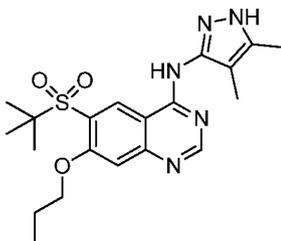
6-(*terc*-butilsulfonil)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-(2-metoxietoxi)quinazolin-4-amina, que tiene la fórmula:



6-(*tert*-butilsulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-etoxiquinazolin-4-amina que tiene la fórmula:

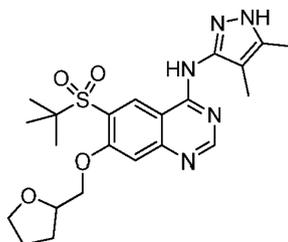


6-(*tert*-butilsulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-propoxiquinazolin-4-amina, que tiene la fórmula:



5

y 6-(*tert*-butilsulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-((tetrahidrofuran-2-il)metoxi)quinazolin-4-amina, que tiene la fórmula:



o una sal, particularmente una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 De acuerdo con esto, la presente invención está dirigida a un compuesto para su uso en un procedimiento para inhibir la quinasa RIP2, procedimiento que comprende poner en contacto una célula con un compuesto de la invención, o una sal, particularmente una sal farmacéuticamente aceptable, de éste.

15 La invención está dirigida además a un compuesto para su uso en un procedimiento para tratar una enfermedad o trastorno mediado por la quinasa RIP2 que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención, o una sal, particularmente una sal farmacéuticamente aceptable de éste, a un paciente (un ser humano u otro mamífero, particularmente, un ser humano) que lo necesite. También se describe el uso de un compuesto de la invención o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención para inhibir la quinasa RIP2 y/o tratar una enfermedad o trastorno mediado por la quinasa RIP2.

20 Los ejemplos de enfermedades o trastornos mediados por la quinasa RIP2 incluyen uveítis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria del intestino precoz y extraintestinal y trastornos granulomatosos, tales como sarcoidosis, síndrome de Blau, sarcoidosis precoz y Granulomatosis de Wegner.

25 La presente invención está dirigida además a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención, o una sal, particularmente una sal farmacéuticamente aceptable, de éste y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Particularmente, esta invención está dirigida a una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por la quinasa RIP2, en el que la composición comprende un

compuesto de la invención, o una sal, particularmente una sal farmacéuticamente aceptable, de éste y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

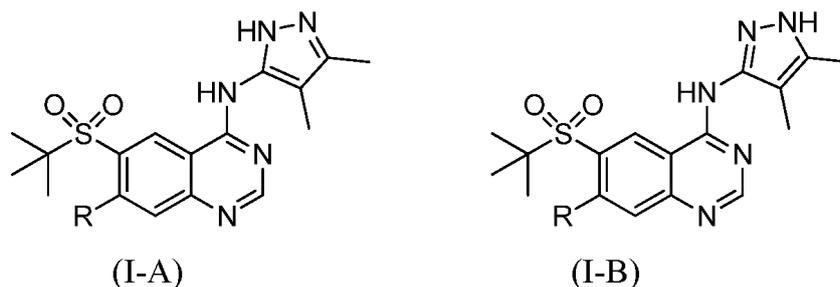
Breve descripción de los dibujos

- 5 La Figura 1 es un patrón de difracción de rayos x en polvo (PXRD) de un polvo de una forma cristalina de 6-(*terc*-butilsulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-etoxiquinazolin-4-amina (base libre).
La Figura 2 muestra la respuesta combinada de citoquina IL8 en muestras de sangre completa de ratas obtenidas después de pre-dosificar las ratas con el compuesto 6-(*terc*-butilsulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-etoxiquinazolin-4-amina, seguido de dosificación con L18-MDP.

Descripción detallada de la invención

- 10 Tal y como se usa en la presente memoria, los términos "compuesto(s) de la invención" o "compuesto(s) de esta invención" significan cualquiera de los compuestos definidos en la presente memoria, en cualquier forma, es decir, cualquier forma de sal o no de sal (por ejemplo,, como una forma de ácido o base libre, o como una sal, particularmente una sal farmacéuticamente aceptable de éste) y cualquier forma física de éste (por ejemplo, incluyendo formas no sólidas (por ejemplo, formas líquidas o semi-sólidas), y formas sólidas (por ejemplo, formas amorfas o cristalinas, formas polimórficas específicas, formas de solvato, incluyendo formas de hidrato (por ejemplo,,
15 mono-, di- y hemi- hidratos)), y mezclas de varias formas (un hidrato de una sal). Específicamente, se apreciará que la presente invención engloba los compuestos de la invención como la base libre y como sales de ésta, por ejemplo como una sal farmacéuticamente aceptable de ésta. En una realización la invención se refiere a los compuestos de la invención en la forma de una base libre. En otra realización, la invención se refiere a los compuestos de la invención en la forma de una sal, particularmente, una sal farmacéuticamente aceptable.

Los expertos en la técnica también apreciarán que el resto pirazolilo presente en los compuestos de esta invención puede existir como isómeros tautoméricos de pirazolilo representados por la Fórmula (I-A) y Fórmula (I-B):



- 25 Se entenderá que el resto pirazolilo resultante puede denominarse como un resto 3, 4-dimetil-1*H*-pirazol-5-ilo o un resto 4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-ilo. Debe entenderse que cualquiera referencia a un compuesto denominado de esta invención se pretende que englobe todos los tautómeros del compuesto denominado y cualesquiera mezclas de los tautómeros del compuesto denominado. Por ejemplo, el compuesto denominado 6-(*terc*-butilsulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-etoxiquinazolin-4-amina se pretende que englobe los compuestos 6-(*terc*-butilsulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-etoxiquinazolin-4-amina y 6-(*terc*-butilsulfonyl)-*N*-(3, 4-dimetil-1*H*-pirazol-5-il)-7-etoxiquinazolin-4-amina, y mezclas de éstos. Se pretende que todas las formas tautoméricas de los compuestos descritos en la presente memoria estén englobadas en el alcance de la presente invención.

- Los compuestos de la invención pueden contener uno o más centros asimétricos (también referidos como un centro quiral) y pueden existir, por lo tanto, como enantiómeros, diastereómeros individuales, u otras formas estereoisoméricas, o como mezclas de éstas. Los centros quirales, tales como un carbono quiral, también pueden estar presentes en los compuestos de esta invención. Cuando la estereoquímica de un centro quiral presente en un compuesto de esta invención (por ejemplo, nombre del compuesto) o en cualquier estructura química ilustrada en la presente memoria no se especifica, se pretende que el compuesto, nombre del compuesto, o estructura englobe todos los estereoisómeros individuales y todas las mezclas de éstos. Así, los compuestos de la invención que contienen uno o más centros quirales pueden estar presentes como mezclas racémicas, mezclas enriquecidas enantioméricamente, o como estereoisómeros individuales enantioméricamente puros.

- Los estereoisómeros individuales de un compuesto de la invención que contienen uno o más centros asimétricos pueden resolverse por procedimientos conocidos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, dicha resolución puede realizarse (1) por la formación de sales diastereoisoméricas, complejos u otros derivados; (2) por la reacción selectiva con un reactivo específico de estereoisómero, por ejemplo por oxidación o reducción enzimática; o (3) por cromatografía gas-líquido o líquido en un entorno quiral, por ejemplo, en un soporte quiral tal como sílice con un ligando quiral unido o en presencia de un disolvente quiral. El experto en la técnica apreciará que cuando el estereoisómero deseado se convierte en otra entidad química por uno de los procedimientos de separación descritos anteriormente, se requiere una etapa adicional para liberar la forma deseada. Alternativamente, pueden sintetizarse estereoisómeros específicos por síntesis asimétrica usando reactivos, sustratos, catalizadores o disolventes

ópticamente activos, o convirtiendo un enantiómero en el otro por transformación asimétrica.

Debe entenderse que una forma sólida de un compuesto de la invención puede existir en formas cristalinas, formas no cristalinas o una mezcla de éstas. Dichas formas cristalinas también pueden presentar polimorfismo (es decir, la capacidad de existir en diferentes formas cristalinas). Estas diferentes formas cristalinas se conocen típicamente como "polimorfos." Los polimorfos tienen la misma composición química pero se diferencian en el empaquetamiento, organización geométrica y otras propiedades descriptivas del estado sólido cristalino. Los polimorfos, por lo tanto, pueden tener diferentes propiedades físicas tales como forma, densidad, dureza, deformabilidad, estabilidad y propiedades de disolución. Los polimorfos presentan típicamente diferentes puntos de fusión, espectros IR, y patrones de difracción de rayos X en polvo, que pueden usarse para la identificación. Un experto en la técnica apreciará que pueden producirse diferentes polimorfos, por ejemplo, cambiando o ajustando las condiciones usadas en la cristalización/recristalización del compuesto.

Es muy conocido y entendido por los expertos en la técnica que los aparatos empleados, humedad, temperatura, orientación de los cristales de polvo y otros parámetros implicados en la obtención de un patrón de difracción de rayos X en polvo (PXRD) pueden causar alguna variabilidad en la apariencia, intensidades y posiciones de las líneas en el patrón de difracción. Un patrón de difracción de rayos X en polvo que está "sustancialmente de acuerdo" con el de la Figura proporcionada en la presente memoria es un patrón PXRD que un experto en la técnica consideraría que representa un compuesto que posee la misma forma de cristal que el compuesto que proporciona el patrón PXRD de la Figura. Por ejemplo, el patrón PXRD puede ser idéntico al de la Figura 1, o más probablemente puede ser algo diferente. Dicho patrón PXRD puede no mostrar necesariamente cada una de las líneas de los patrones de difracción presentados en la presente memoria, y/o puede mostrar un cambio ligero en la apariencia, intensidad o un desplazamiento en la posición de dichas líneas lo que resulta de diferencias en las condiciones implicadas en la obtención de los datos. Un experto en la técnica es capaz de determinar si una muestra de un compuesto cristalino tiene la misma forma que, o una forma diferente de, una forma descrita en la presente memoria por comparación de sus patrones PXRD. Por ejemplo, un experto en la técnica puede superponer un patrón PXRD de una muestra de una forma cristalina de 2, 6-(*terc*-butil sulfonil)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-etoxiquinazolin-4-amina (base libre) con el patrón PXRD de la Fig. 1, y usando la experiencia y el conocimiento en la técnica, determinar fácilmente si el patrón PXRD de la muestra está sustancialmente de acuerdo con el patrón PXRD de la Figura 1. Si el patrón PXRD está sustancialmente de acuerdo con la Fig. 1, la forma de la muestra puede identificarse fácilmente y exactamente como que tiene la misma forma que la forma cristalina de 6-(*terc*-butil sulfonil)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-etoxiquinazolin-4-amina (base libre) descrita en la presente memoria. De manera similar, un experto en la técnica es capaz de determinar si un ángulo de difracción dado (expresado en $^{\circ}2\theta$) obtenido a partir de un patrón PXRD está aproximadamente en la misma posición que un valor recitado.

Debido a su uso potencial en medicina, las sales de los compuestos de esta invención son preferiblemente sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen sales de adición a ácido o base, tales como las descritas por Berge, Bighley y Monkhouse J.Pharm.Sci (1977) 66, p 1-19 y "Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, 2ª Edición Revisada," P.H. Stahl y C.G. Wermuth (eds.), Wiley, Hoboken, NJ, US (2011).

El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones, y formas de dosificación que son, en el alcance del criterio médico sensato, adecuados para uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad, irritación excesivas u otro problema o complicación, acorde con una proporción beneficio/riesgo razonable.

"Sal(es) farmacéuticamente aceptables" se refiere a un compuesto que es adecuado para uso farmacéutico. Las formas de sal y solvato (por ejemplo, hidratos e hidratos de sales) de los compuestos de la invención que son adecuadas para uso en medicina son aquellas en las que el contraión o disolvente asociado es farmacéuticamente aceptable. Sin embargo, las sales y solvatos que tienen contraiones o disolventes asociados no farmacéuticamente aceptables están en el alcance de la presente invención, por ejemplo, para uso como intermedios en la preparación de otros compuestos de la invención y sus sales y solvatos.

Cuando un compuesto de la invención es una base (contiene un resto básico), una forma de sal deseada puede prepararse por cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica, incluyendo tratamiento de la base libre con un ácido. Los ejemplos de sales de adición a ácido farmacéuticamente aceptables incluyen acetato, adipato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, alcanforato, alcanfor-sulfonato (camsilato), caprato (decanoato), caproato (hexanoato), caprilato (octanoato), carbonato, bicarbonato, cinamato, citrato, ciclamato, dodecilsulfato (estolato), etano-1,2-disulfonato (edisilato), etanosulfonato (esilato), formato, fumarato, galactarato (mucato), gentisato (2,5-dihidroxibenzoato), glucoheptonato (gluceptato), gluconato, glucuronato, glutamato, glutarato, glicerofosforato, glicolato, hipurato, bromhidrato, clorhidrato, yodhidrato, isobutirato, lactato, lactobionato, laurato, maleato, malato, malonato, mandelato, metanosulfonato (mesilato), naftalen-1,5-disulfonato (napadisilato), naftalen-sulfonato (napsilato), nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato, difosfato, propionato, piroglutamato, salicilato, sebacato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, tosilato, undecilenato, 1-hidroxi-2-naftoato, 2,2-dicloroacetato, 2-hidroxietanosulfonato (isetionato), 2-oxoglutarato, 4-acetamidobenzoato, y 4-aminosalicilato. Las sales no farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, trifluoroacetato, pueden usarse, por ejemplo, en el aislamiento de un compuesto de la invención, y están incluidas en el alcance de esta invención.

5 Cuando un compuesto de la invención es un ácido (contiene un resto ácido), una forma de sal deseada puede prepararse por cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica, incluyendo tratamiento del ácido libre con una base inorgánica u orgánica. Los ejemplos de sales de adición a base farmacéuticamente aceptables incluyen amonio, litio, sodio, potasio, calcio, magnesio, sales de aluminio, sales de cinc, trimetilamina, trietilamina, morfolina, piridina, piperidina, picolina, dicitclohexilamina, *N,N'*-dibenciletilendiamina, 2-hidroxiethylamina, *bis*-(2-hidroxiethyl)amina, tri-(2-hidroxiethyl)amina, procaína, dibencilpiperidina, dehidroabietilamina, glucamina, *N*-metilglucamina, colidina, quinina, quinolina, lisina y arginina. En una realización, la sal de adición a base farmacéuticamente aceptable es sodio.

10 Algunos de los compuestos de la invención pueden formar sales con uno o más equivalentes de un ácido (si el compuesto contiene un resto básico) o una base (si el compuesto contiene un resto ácido). La presente invención incluye en su alcance todas las formas de sal estequiométricas y no estequiométricas posibles.

Esta invención también proporciona la conversión de una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de esta invención en otra sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de esta invención.

15 Si un compuesto básico se aísla como una sal, la forma de ácido libre o base libre correspondiente de ese compuesto puede prepararse por cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica.

20 Para los solvatos de los compuestos de la invención, incluyendo solvatos de sales de los compuestos de la invención, que están en forma cristalina, el experto en la técnica apreciará que pueden formarse solvatos farmacéuticamente aceptables en los que se incorporan moléculas de disolvente en la red cristalina durante la cristalización. Los solvatos pueden implicar disolventes no acuosos tales como etanol, isopropanol, DMSO, ácido acético, etanolamina, y EtOAc, o pueden implicar agua como el disolvente que se incorpora en la red cristalina. Los solvatos en los que el agua es el disolvente que se incorpora en la red cristalina se refieren típicamente como "hidratos." Los hidratos incluyen hidratos estequiométricos así como composiciones que contienen cantidades variables de agua. La invención incluye todos estos solvatos, particularmente hidratos.

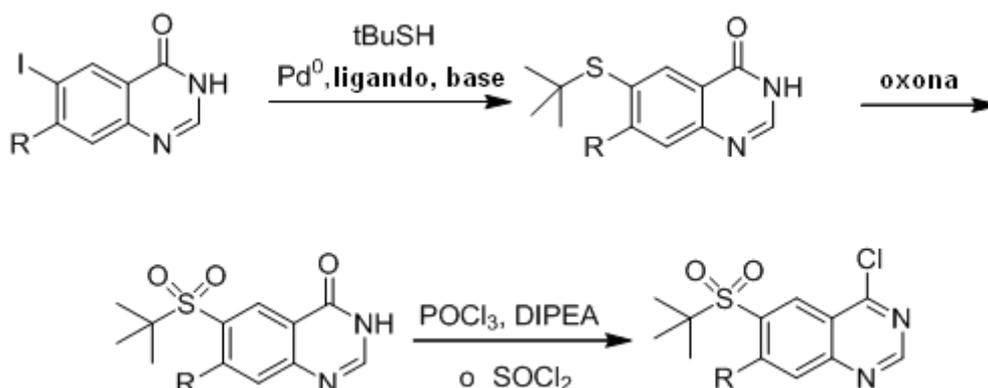
25 Como los compuestos de la invención se pretenden para uso en composiciones farmacéuticas se entenderá fácilmente que cada uno se proporciona preferiblemente en forma sustancialmente pura, por ejemplo al menos 60 % pura, más adecuadamente al menos 75 % pura y preferiblemente al menos 85 %, especialmente al menos 98 % pura (los % son en una base peso a peso). Las preparaciones impuras de los compuestos pueden usarse para preparar las formas más puras usadas en las composiciones farmacéuticas.

PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS GENERALES

30 Los compuestos de la invención pueden obtenerse usando los procedimientos sintéticos ilustrados en los Esquemas siguientes o haciendo uso del conocimiento de un químico orgánico experto. Las síntesis proporcionadas en estos Esquemas son aplicables para producir compuestos de la invención que tienen una variedad de diferentes grupos sustituyentes empleando precursores apropiados, que están protegidos adecuadamente si es necesario, para conseguir la compatibilidad con las reacciones mostradas en la presente memoria. La desprotección posterior, cuando es necesaria, rinde compuestos de la naturaleza descrita generalmente. Aunque los Esquemas se muestran solo con compuestos de una fórmula genérica, son ilustrativos de los procedimientos que pueden usarse para preparar los compuestos de la invención.

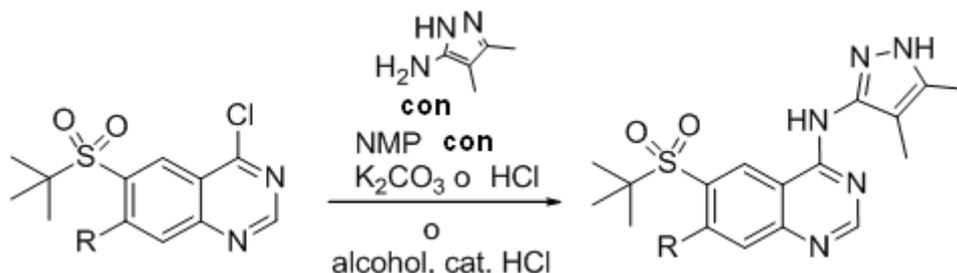
40 La sustitución en C6 podría instalarse antes de la instalación del resto pirazolilo. Un acoplamiento catalizado por paladio de un tiol con la 6-yodoquinazolinona puede proporcionar un sulfuro que puede oxidarse posteriormente a la sulfona. La cloración con POCl₃ o SOCl₂ puede proporcionar la 4-cloroquinazolina.

Esquema 1



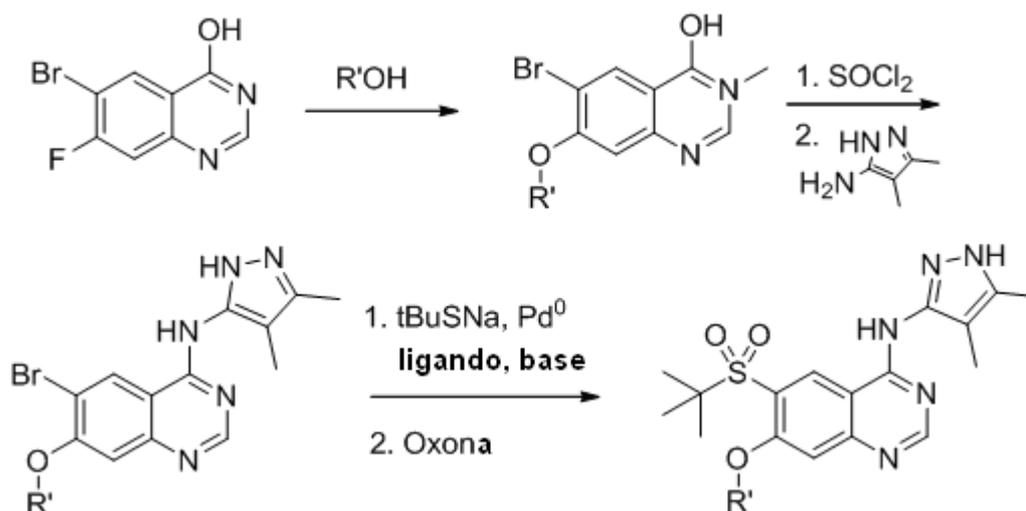
Podrían hacerse reaccionar anilinas/aminas con 4-cloro-quinazolinonas en condiciones básicas o ácidas para rendir 4-aminoquinazolinonas que podrían ser compuestos finales o usarse como intermedios para síntesis adicional.

Esquema 2



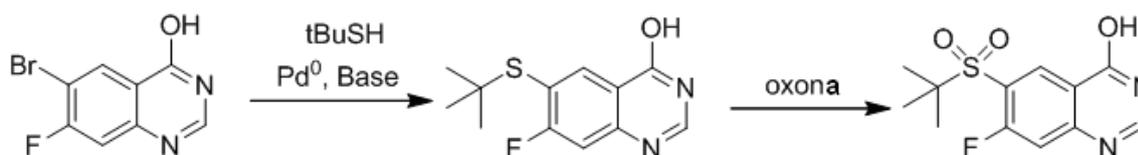
- 5 La preparación de algunos compuestos de la invención puede prepararse alternativamente a partir de 6-bromo-7-fluoroquinazolin-4-ol mediante reacción con alcoholes adecuados en presencia de base con calentamiento para proporcionar el 6-bromo-7-alcoxiquinazolin-4-ol apropiado. La cloración posterior y desplazamiento por aminas/anilinas rendirá 4-amino-6-bromo-7-alcoxiquinazolinonas. La reacción adicional de estos compuestos con tioles o tiolatos en presencia de una combinación adecuada de catalizador de paladio, ligando y base con calentamiento proporcionará 4-amino-6-alciltio-7-alcoxiquinazolinonas. La oxidación resultará en 4-amino-6-sulfonil-7alcoxiquinazolinonas que pueden ser compuestos finales o utilizarse como intermedios en química adicional.

Esquema 3



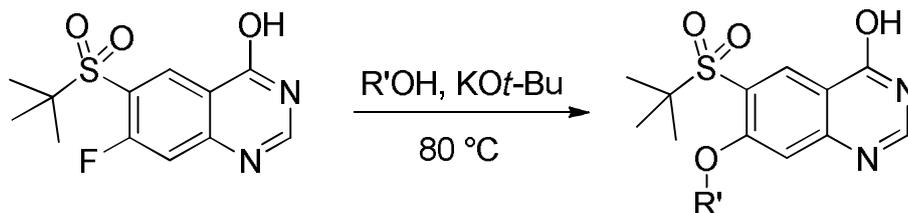
- 15 La preparación de algunos de los compuestos de la invención puede conseguirse a partir de 7-fluoro-6-sulfonil-4-quinazolinona. La síntesis de este intermedio empieza con la bromación del ácido 4-fluoro-2-aminobenzoico seguido de una condensación con acetato de formamidina in situ. Un acoplamiento catalizado por paladio con un tiol proporciona el sulfuro que se oxida posteriormente a la sulfona.

Esquema 4



- 20 La sustitución del sustituyente flúor por un grupo alcoxi puede lograrse por tratamiento con el alcohol apropiado y *t*-butóxido de potasio.

Esquema 5



Un compuesto particular de la invención es 6-(*tert*-butil-sulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-etoxiquinazolin-4-amina (como la base libre). En otra realización, un compuesto particular de la invención es 6-(*tert*-butil-sulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-etoxiquinazolin-4-amina o una sal de éste. En otra realización, un compuesto particular de la invención es 6-(*tert*-butil-sulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-etoxiquinazolin-4-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de éste. En otra realización, un compuesto particular de la invención es una forma cristalina de 6-(*tert*-butil-sulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-etoxiquinazolin-4-amina caracterizada por el patrón PXRD de la Figura 1. En otra realización más, un compuesto particular de la invención es una forma cristalina de 6-(*tert*-butil-sulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-etoxiquinazolin-4-amina caracterizada por los datos de difracción de la Tabla 1.

Los compuestos de esta invención son inhibidores de la quinasa RIP2. De acuerdo con esto, en una realización, la invención está dirigida a un compuesto para su uso en un procedimiento para inhibir la quinasa RIP2 que comprende poner en contacto una célula con un compuesto de la invención. En otra realización, la invención está dirigida a un compuesto para su uso en un procedimiento para tratar una enfermedad o trastorno mediado por la quinasa RIP2 que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención a un ser humano que lo necesita.

En otra realización particular, la invención está dirigida a un compuesto para su uso en un procedimiento para tratar una enfermedad o trastorno mediado por la quinasa RIP2 que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de 6-(*tert*-butil-sulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-etoxiquinazolin-4-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, a un ser humano que lo necesita.

Los compuestos de la invención pueden ser particularmente útiles para el tratamiento de enfermedades o trastornos mediados por la quinasa RIP2, particularmente enfermedades o trastornos en los que la inhibición de la quinasa RIP2 proporcionaría un beneficio. Los ejemplos de dichas enfermedades o trastornos mediados por la quinasa RIP2 incluyen uveítis, síndrome febril asociado con la enzima conversiva de interleuquina-1 (ICE, también conocida como Caspasa-1) (fiebre ICE), dermatitis, daño pulmonar agudo, diabetes mellitus de tipo 2, artritis (específicamente artritis reumatoide), trastornos inflamatorios del intestino (tales como colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), enfermedad inflamatoria del intestino precoz, enfermedad inflamatoria del intestino extra-intestinal, prevención de daño por isquemia reperfusión en órganos sólidos (específicamente riñón) en respuesta a isquemia inducida por cirugía cardíaca, trasplante de órganos, sepsis y otras agresiones, enfermedades hepáticas (esteatohepatitis no alcohólica, esteatohepatitis alcohólica, y hepatitis autoinmune), enfermedades alérgicas (tales como asma), reacciones a trasplantes (tales como enfermedad de injerto frente a huésped), enfermedades autoinmunes (tales como lupus eritematoso sistémico, y esclerosis múltiple), y trastornos granulomatosos (tales como sarcoidosis, síndrome de Blau, sarcoidosis precoz, granulomatosis de Wegner, y enfermedad pulmonar intersticial).

Los compuestos de esta invención pueden ser particularmente útiles en el tratamiento de uveítis, fiebre ICE, Síndrome de Blau, sarcoidosis precoz, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, granulomatosis de Wegener y sarcoidosis. El tratamiento de enfermedades o trastornos mediados por la quinasa RIP2, o más ampliamente, el tratamiento de enfermedades mediadas por inmunidad incluyendo, pero no limitado a, enfermedades alérgicas, enfermedades autoinmunes, prevención de rechazo de trasplantes y semejantes, puede lograrse usando un compuesto de esta invención como una monoterapia, o en terapia de combinación dual o múltiple, particularmente para el tratamiento de casos refractarios, tal como en combinación con otros agentes anti-inflamatorios y/o anti-TNF, que pueden administrarse en cantidades terapéuticamente eficaces como se conoce en la técnica.

Los compuestos de esta invención pueden emplearse solos o en combinación con otros agentes terapéuticos. Las terapias de combinación según la presente invención comprenden así la administración de al menos un compuesto de la invención, y el uso de al menos otro agente terapéuticamente activo. Preferiblemente, las terapias de combinación según la presente invención comprenden la administración de al menos un compuesto de la invención, y al menos un otro agente terapéuticamente activo. El o los compuestos de la invención y el otro o los otros agentes terapéuticamente activos pueden administrarse conjuntamente en una única composición farmacéutica o separadamente y, cuando se administran separadamente, esto puede ocurrir simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden. Las cantidades del o de los compuestos de la invención y del otro u otros agentes terapéuticamente activos y los esquemas de tiempo relativos de administración se seleccionarán con el fin de lograr el efecto terapéutico combinado deseado. Así, en un aspecto adicional, se proporciona una combinación que comprende un compuesto de la invención conjuntamente con uno o más agentes terapéuticamente activos adicionales. En un aspecto más, se proporciona una combinación que comprende 6-(*tert*-butil-sulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-etoxiquinazolin-4-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, conjuntamente con uno o

más agentes terapéuticamente activos adicionales.

Así, en un aspecto de esta invención, un compuesto de la invención y composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención pueden usarse en combinación con o incluir uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo un agente anti-inflamatorio y/o un agente anti-TNF.

- 5 Los compuestos de esta invención pueden administrarse en combinación con corticosteroides y/o agentes anti-TNF para tratar el síndrome de Blau, sarcoidosis precoz; o en combinación con biológicos anti-TNF u otros biológicos anti-inflamatorios para tratar la Enfermedad de Crohn; o en combinación con 5-ASA (mesalamina) o sulfasalazina para tratar colitis ulcerosa; o en combinación con bajas dosis de corticosteroides y/o metotrexato para tratar la granulomatosis de Wegener o sarcoidosis o enfermedad pulmonar intersticial, o en combinación con un biológico (por ejemplo, anti-TNF, anti-IL-6, etc.) para tratar artritis reumatoide, o en combinación con anti-IL6 y/o metotrexato para tratar la fiebre ICE.

15 Los ejemplos de agentes anti-inflamatorios adecuados incluyen preparaciones de ácido 5-aminosalicílico y mesalamina, sulfasalazina, hidroxicloroquina, tiopurinas (azatioprina, mercaptopurina), metotrexato, ciclofosfamida, ciclosporina, inhibidores de JAK (tofacitinib), corticosteroides, particularmente bajas dosis de corticosteroides (tales como prednisona (Deltasone®) y budesonida) y biológicos anti-inflamatorios tales como mAb anti-IL6R (Actemra® (tocilizumab)), biológicos anti-IL6, biológicos anti-IL1 o IL12 o IL23 (ustekinumab (Stelara®)), agentes anti-integrina (natalizumab (Tysabri®)), mAb anti-CD20 (rituximab (Rituxan®) y ofatumumab (Arzerra®)), y otros agentes, tales como abatacept (Orencia®), anakinra (Kineret®), y belimumab (Benlysta®), biológicos CD4 y otros inhibidores de citoquina o biológicos frente a receptores de células T o células B o interleuquinas. Los ejemplos de agentes anti-TNF adecuados incluyen los biológicos anti-TNF tales como Enbrel® (etanercept), Humira® (adalimumab), Remicade® (infliximab), Cimzia® (certolizumab), y Simponi® (golimumab).

25 Otros ejemplos de agentes anti-inflamatorios adecuados incluyen preparaciones de ácido 5-aminosalicílico y mesalamina, sulfasalazina, hidroxicloroquina, tiopurinas (azatioprina, mercaptopurina), metotrexato, ciclofosfamida, ciclosporina, inhibidores de calcineurina (ciclosporina, pimecrolimus, tacrolimus), ácido micofenólico (CellCept®), inhibidores de mTOR (temsirolimus, everolimus), inhibidores de JAK (tofacitinib), (Xeljanz®)), inhibidores de Syk (fostamatinib), corticosteroides, particularmente bajas dosis de corticosteroides (tales como prednisona (Deltasone®) y budesonida) y biológicos anti-inflamatorios tales como mAb anti-IL6R (Actemra® (tocilizumab)), biológicos anti-IL6, anti-IL1 (anakinra (Kineret®), canakinumab (Ilaris®), rilonacept (Arcalyst®)), biológicos anti-IL12 o y biológicos IL23 (ustekinumab (Stelara®)), biológicos anti-IL17 (secukinumab), anti-CD22 (epratuzumab), agentes anti-integrina (natalizumab (Tysabri®)), vedolizumab (Entyvio®)), anti-IFN α (sifalimumab), mAb anti-CD20 (rituximab (Rituxan®) y ofatumumab (Arzerra®)), y otros agentes, tales como abatacept (Orencia®), anakinra (Kineret®), canakinumab (Ilaris®), rilonacept (Arcalyst®), secukinumab, epratuzumab, sifalimumab, y belimumab (Benlysta®), biológicos CD4 y otros inhibidores de citoquinas o biológicos frente a los receptores de células T o células B o interleuquinas. Los ejemplos de agentes anti-TNF adecuados incluyen los biológicos anti-TNF tales como Enbrel® (etanercept), Humira® (adalimumab), Remicade® (infliximab), Cimzia® (certolizumab), y Simponi® (golimumab). Esta invención también proporciona un compuesto de la invención para uso en terapia. Específicamente, esta invención proporciona los compuestos descritos en la presente memoria, o una sal farmacéuticamente aceptable de éstos, para uso en terapia. Más específicamente, esta invención proporciona 6-(*terc*-butilsulfonil)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-etoxiquinazolin-4-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, para uso en terapia.

40 En otra realización, esta invención proporciona un compuesto de la invención para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por la quinasa RIP2. Específicamente, esta invención proporciona los compuestos descritos en la presente memoria, o una sal farmacéuticamente aceptable de éstos, para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por la quinasa RIP2.

45 En otra realización esta invención proporciona los compuestos descritos en la presente memoria, o una sal farmacéuticamente aceptable de éstos, para uso en el tratamiento de uveítis, síndrome febril asociado a la enzima conversiva de interleucina 1, dermatitis, daño pulmonar agudo, diabetes mellitus de tipo 2, artritis (específicamente artritis reumatoide), trastornos inflamatorios del intestino (tales como colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), enfermedad inflamatoria del intestino precoz, enfermedad inflamatoria del intestino extra-intestinal, prevención de daño por isquemia reperusión en órganos sólidos (específicamente riñón) en respuesta a isquemia inducida por cirugía cardíaca, trasplante de órganos, sepsis y otras agresiones, enfermedades hepáticas (esteatohepatitis no alcohólica, esteatohepatitis alcohólica, y hepatitis autoinmune), enfermedades alérgicas (tales como asma), reacciones frente a trasplante (tales como enfermedad de injerto frente a huésped), enfermedades autoinmunes (tales como lupus eritematoso sistémico y esclerosis múltiple), y trastornos granulomatosos (tales como sarcoidosis, síndrome de Blau, sarcoidosis precoz, granulomatosis de Wegener, o enfermedad pulmonar intersticial).

55 En otra realización esta invención proporciona los compuestos descritos en la presente memoria, o una sal farmacéuticamente aceptable de éstos, para uso en el tratamiento de uveítis. En otra realización esta invención proporciona los compuestos descritos en la presente memoria, o una sal farmacéuticamente aceptable de éstos, para uso en el tratamiento de síndrome febril asociado con la enzima conversiva de interleucina 1. En otra realización esta invención proporciona los compuestos descritos en la presente memoria, o una sal farmacéuticamente aceptable de éstos, para uso en el tratamiento del síndrome de Blau. En otra realización esta

invención proporciona los compuestos descritos en la presente memoria, o una sal farmacéuticamente aceptable de éstos, para uso en el tratamiento de sarcoidosis precoz. En otra realización esta invención proporciona los compuestos descritos en la presente memoria, o una sal farmacéuticamente aceptable de éstos, para uso en el tratamiento de colitis ulcerosa. En otra realización esta invención proporciona los compuestos descritos en la presente memoria, o una sal farmacéuticamente aceptable de éstos, para uso en el tratamiento de la enfermedad de Crohn. En otra realización esta invención proporciona los compuestos descritos en la presente memoria, o una sal farmacéuticamente aceptable de éstos, para uso en el tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino precoz. En otra realización esta invención proporciona los compuestos descritos en la presente memoria, o una sal farmacéuticamente aceptable de éstos, para uso en el tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino extraintestinal. En otra realización esta invención proporciona los compuestos descritos en la presente memoria, o una sal farmacéuticamente aceptable de éstos, para uso en el tratamiento de la Granulomatosis de Wegner. En otra realización esta invención proporciona los compuestos descritos en la presente memoria, o una sal farmacéuticamente aceptable de éstos, para uso en el tratamiento de sarcoidosis. También se contempla el uso de los compuestos descritos en la presente memoria, o una sal farmacéuticamente aceptable de éstos, en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de un ser humano que lo necesita que tiene una enfermedad o trastorno mediado por la quinasa RIP2. Una "cantidad terapéuticamente eficaz " se pretende que signifique la cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un paciente que necesita dicho tratamiento, es suficiente para efectuar el tratamiento, como se define en la presente memoria. Así, por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, es una cantidad de un agente inventivo que, cuando se administra a un ser humano que lo necesita, es suficiente para modular o inhibir la actividad de la quinasa RIP2 de manera que una afección patológica que está mediada por esa actividad se reduce, alivia o previene. La cantidad de un compuesto dado que corresponderá a dicha cantidad variará dependiendo de factores tales como el compuesto particular (por ejemplo, la potencia (pCI₅₀), eficacia (CE₅₀), y la vida media biológica del compuesto particular), afección patológica y su gravedad, la identidad (por ejemplo, edad, tamaño y peso) del paciente que necesita el tratamiento, pero puede determinarse sin embargo rutinariamente por un experto en la técnica. Asimismo, la duración del tratamiento y el periodo de tiempo de administración (periodo de tiempo entre dosificaciones y el esquema de tiempo de las dosificaciones, por ejemplo, antes/con/después de las comidas) del compuesto variarán según la identidad del mamífero que necesita el tratamiento (por ejemplo, peso), el compuesto particular y sus propiedades (por ejemplo, características farmacéuticas), enfermedad o trastorno y su gravedad y la composición y procedimiento específicos que se están usando, pero puede determinarse sin embargo por un experto en la técnica.

"Tratar" o "tratamiento" se pretende que signifique al menos la mitigación de una enfermedad o trastorno en un paciente. Los procedimientos de tratamiento para la mitigación de una enfermedad o trastorno incluyen el uso de los compuestos en esta invención de cualquier manera convencionalmente aceptable, por ejemplo para la prevención, retraso, profilaxis, terapia o cura de una enfermedad o trastorno mediada. Las enfermedades y trastornos específicos que pueden ser particularmente susceptibles a tratamiento usando un compuesto de esta invención se describen en la presente memoria.

Los compuestos de la invención pueden administrarse por cualquier ruta de administración adecuada, incluyendo tanto administración sistémica como administración tópica. La administración sistémica incluye administración oral, administración parenteral, administración transdérmica, administración rectal, y administración por inhalación. La administración parenteral se refiere a rutas de administración distintas de enteral, transdérmica o por inhalación, y es típicamente por inyección o infusión. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intramuscular, y subcutánea. La inhalación se refiere a la administración en los pulmones del paciente ya sea inhalada a través de la boca o a través de los orificios nasales. La administración tópica incluye la aplicación en la piel.

Los compuestos de la invención pueden administrarse una vez o según un régimen de dosificación en el que se administra un número de dosis a intervalos de tiempo variados durante un periodo de tiempo dado. Por ejemplo, las dosis pueden administrarse una, dos, tres o cuatro veces al día. Las dosis pueden administrarse hasta que se logre el efecto terapéutico deseado o indefinidamente para mantener el efecto terapéutico deseado. Los regímenes de dosificación adecuados para un compuesto de la invención dependen de las propiedades farmacocinéticas de ese compuesto, tales como absorción, distribución y vida media, que pueden determinarse por el experto en la técnica. Además, los regímenes de dosificación adecuados, incluyendo la duración en la que se administran dichos regímenes, para un compuesto de la invención dependen de la enfermedad o trastorno que se está tratando, la gravedad de la enfermedad o trastorno que se está tratando, la edad y condición física del paciente que se está tratando, el historial médico del paciente que se va a tratar, la naturaleza de la terapia concurrente, el efecto terapéutico deseado y factores semejantes en el conocimiento y experiencia del experto en la técnica. Dicho experto en la técnica entenderá además que los regímenes de dosificación adecuados pueden requerir un ajuste dada la respuesta de un paciente individual al régimen de dosificación o durante el tiempo al necesitar un cambio el paciente individual.

Para uso en terapia, los compuestos de la invención se formularán normalmente, pero no necesariamente, en una composición farmacéutica antes de la administración a un paciente. De acuerdo con esto, la invención también está dirigida a composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

En una realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende 6-(*terc*-butilsulfonil)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-etoxiquinazolin-4-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En otra realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende 6-(*terc*-butilsulfonil)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-etoxiquinazolin-4-amina (como la base libre) y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En otra realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una forma cristalina de 6-(*terc*-butilsulfonil)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-etoxiquinazolin-4-amina caracterizada por el patrón PXRD de la Figura 1 y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden prepararse y envasarse en forma al por mayor en el que una cantidad eficaz de un compuesto de la invención puede extraerse y administrarse al paciente tal como polvos, jarabes y disoluciones para inyección. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden prepararse y envasarse en forma unitaria de dosificación. Para la aplicación oral, por ejemplo, pueden administrarse uno o más comprimidos o cápsulas. Una dosis de la composición farmacéutica contiene al menos una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de esta invención. Cuando se preparan en forma unitaria de dosificación, las composiciones farmacéuticas pueden contener de 1 mg a 1.000 mg de un compuesto de esta invención.

Como se proporciona en la presente memoria, las formas unitarias de dosificación (composiciones farmacéuticas) que contienen de 1 mg a 1.000 mg de un compuesto de la invención pueden administrarse una, dos, tres o cuatro veces al día, preferiblemente una, dos o tres veces al día, y más preferiblemente, una o dos veces al día, para efectuar el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por RIP2.

Las composiciones farmacéuticas de la invención contienen típicamente un compuesto de la invención. Sin embargo, en determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención contienen más de un compuesto de la invención. Además, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender además opcionalmente uno o más compuestos farmacéuticamente activos adicionales.

Tal y como se usa en la presente memoria, "excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un material, composición o vehículo implicado en dar forma o consistencia a la composición. Cada excipiente debe ser compatible con los demás ingredientes de la composición farmacéutica cuando se mezcla de manera que se evitan las interacciones que sustancialmente reducirán la eficacia del compuesto de la invención cuando se administra a un paciente y las interacciones que resultarían en composiciones farmacéuticas que no son farmacéuticamente aceptables. Además, cada excipiente debe tener por supuesto una pureza lo suficientemente alta para convertirlo en farmacéuticamente aceptable.

Los compuestos de la invención y el excipiente o excipientes farmacéuticamente aceptables se formularán típicamente en una forma de dosificación adaptada para la administración al paciente por la ruta de administración deseada. Las formas de dosificación convencionales incluyen las adaptadas para (1) administración oral tal como comprimidos, cápsulas, comprimidos ovalados, pastillas, tabletas, polvos, jarabes, elixires, suspensiones, disoluciones, emulsiones, sobres y sellos; (2) administración parenteral tal como disoluciones, suspensiones y polvos estériles para reconstitución; (3) administración transdérmica tal como parches transdérmicos; (4) administración rectal tal como supositorios; (5) inhalación tal como aerosoles y disoluciones; y (6) administración tópica tal como cremas, pomadas, lociones, disoluciones, pastas, pulverizadores, espumas y geles.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados variarán dependiendo de la forma de dosificación particular elegida. Además, los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados pueden elegirse para una función particular para la que pueden servir en la composición. Por ejemplo, determinados excipientes farmacéuticamente aceptables pueden elegirse por su capacidad de facilitar la producción de formas de dosificación uniformes. Determinados excipientes farmacéuticamente aceptables pueden elegirse por su capacidad de facilitar la producción de formas de dosificación estables. Determinados excipientes farmacéuticamente aceptables pueden elegirse por su capacidad de facilitar el porte o transporte del compuesto o compuestos de la invención una vez administrados al paciente desde un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano, o parte del cuerpo. Determinados excipientes farmacéuticamente aceptables pueden elegirse por su capacidad de aumentar el cumplimiento del paciente.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen los siguientes tipos de excipientes: diluyentes, materiales de relleno, aglutinantes, disgregantes, lubricantes, deslizantes, agentes de granulación, agentes de recubrimiento, agentes humectantes, disolventes, co-disolventes, agentes de suspensión, emulsionantes, edulcorantes, agentes saporíferos, agentes enmascaradores del sabor, agentes colorantes, agentes anti-torta, humectantes, agentes quelantes, plastificantes, agentes que incrementan la viscosidad, antioxidantes, conservantes, estabilizantes, tensioactivos y agentes tamponadores. El experto en la técnica apreciará que determinados excipientes farmacéuticamente aceptables pueden servir para más de una función y pueden servir para funciones alternativas dependiendo de cuánto excipiente está presente en la formulación y qué otros ingredientes están presentes en la formulación.

Los expertos en la técnica poseen el conocimiento y experiencia en la técnica para permitirles seleccionar excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados en cantidades apropiadas para uso en la invención. Además, existen varios recursos que están disponibles para el experto en la técnica que describen excipientes farmacéuticamente aceptables y pueden ser útiles para seleccionar excipientes farmacéuticamente aceptables

adecuados. Los ejemplos incluyen Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company), The Handbook of Pharmaceutical Additives (Gower Publishing Limited), y The Handbook of Pharmaceutical Excipients (the American Pharmaceutical Association and the Pharmaceutical Press).

- 5 Las composiciones farmacéuticas de la invención se preparan usando técnicas y procedimientos conocidos para los expertos en la técnica. Algunos de los procedimientos usados comúnmente en la técnica se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company).

10 En un aspecto, la invención está dirigida a una forma de dosificación sólida oral tal como un comprimido o cápsula que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de la invención y un diluyente o material de relleno. Los diluyentes y materiales de relleno adecuados incluyen lactosa, sacarosa, dextrosa, manitol, sorbitol, almidón (por ejemplo, almidón de maíz, almidón de patata, y almidón pre-gelatinizado), celulosa y sus derivados (por ejemplo, celulosa microcristalina), sulfato de calcio y fosfato de calcio dibásico. La forma de dosificación sólida oral puede comprender además un aglutinante. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón (por ejemplo, almidón de maíz, almidón de patata, y almidón pre-gelatinizado), gelatina, goma arábiga, alginato sódico, ácido alginico, tragacanto, goma de guar, povidona, y celulosa y sus derivados (por ejemplo, celulosa microcristalina). La forma de dosificación sólida oral puede comprender además un disgregante. Los disgregantes adecuados incluyen crospovidona, glicolato sódico de almidón, croscarmelosa, ácido alginico y carboximetil celulosa de sodio. La forma de dosificación sólida oral puede comprender además un lubricante. Los lubricantes adecuados incluyen ácido esteárico, estearato de magnesio, estearato de calcio y talco.

Ejemplos

- 20 Los ejemplos siguientes ilustran la invención. No se pretende que estos ejemplos limiten el alcance de la presente invención, sino que sirvan para proporcionar una guía para el experto en la técnica para preparar y usar los compuestos, composiciones, y procedimientos de la presente invención.

25 La invención también incluye varias formas deuteradas de los compuestos de la invención. Cada átomo de hidrógeno disponible unido a un átomo de carbono puede reemplazarse independientemente con un átomo de deuterio. Un experto en la técnica sabrá cómo sintetizar formas deuteradas de los compuestos de la invención.

30 Los nombres para los compuestos intermedios y finales descritos en la presente memoria se generaron usando el programa de software de denominación ACD/Name Pro V6.02 disponible en Advanced Chemistry Development, Inc., 110 Yonge Street, Piso 14º, Toronto, Ontario, Canadá, M5C 1T4 (<http://www.acdlabs.com/>) o el programa de denominación en ChemDraw, Struct=Name Pro 12.0, como parte de ChemBioDraw Ultra, disponible en CambridgeSoft. 100 CambridgePark Drive, Cambridge, MA 02140 EEUU (www.cambridgesoft.com).

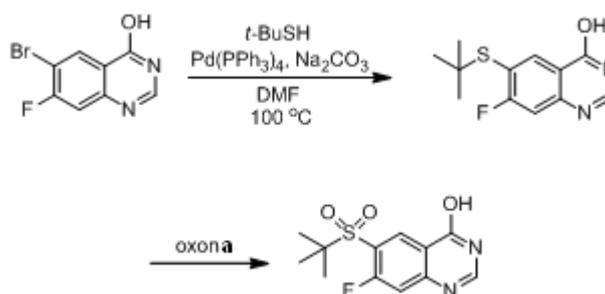
En las descripciones experimentales siguientes, pueden usarse las abreviaturas siguientes:

Abreviatura	Significado
salmuera	cloruro de sodio acuoso saturado
CH ₂ Cl ₂ o DCM	cloruro de metileno
CH ₃ CN o MeCN o ACN	acetronitrilo
d	día
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina, base de Hunig
DMSO	dimetilsulfóxido
equiv	equivalentes
Et	etilo
Et ₃ N o TEA	triethylamina
Et ₂ O	dietil éter
EtOAc	acetato de etilo
EtOH	etanol
h, hr	hora(s)
HCl	ácido clorhídrico
KOt-Bu	<i>tert</i> -butóxido de potasio
LCMS	cromatografía líquida-espectroscopía de masas
Me	metilo
MeOH o CH ₃ OH	metanol

(continuación)

Abreviatura	Significado
MgSO ₄	sulfato de magnesio
min	minuto(s)
MS	espectro de masas
μw	microondas
Na ₂ SO ₄	sulfato de sodio
NH ₄ OH	hidróxido de amonio
POCl ₃	cloruro de fosforilo
Rt, RT	temperatura ambiente
satd.	saturado
2-MeTHF	2-metil-tetrahidrofuranol
TFA	ácido trifluoroacético

Preparación 1

6-(*tert*-Butilsulfonyl)-7-fluoroquinazolin-4-ol

5

Etapa 1: 6-(*tert*-butiltio)-7-fluoroquinazolin-4-ol: Una mezcla de 6-bromo-7-fluoroquinazolin-4-ol (69 g, 285 mmol), tetraquis(trifenilfosfina)-paladio(0) (20 g, 17 mmol) y carbonato de sodio (60 g, 570 mmol) se agitó en DMF (1 L) mientras se purgaba con nitrógeno gas durante 5 minutos. Se añadió 2-Metilpropano-2-tiol (64 ml, 570 mmol) y la mezcla de reacción se calentó bajo condensador de reflujo durante 6 horas a 100 °C. La reacción se enfrió y se filtró a través de filtro de papel de vidrio y se vertió lentamente en 1.500 ml de agua agitada. El precipitado rojo resultante se filtró y se trituró con 200ml EtOAc. El sólido se filtró y se lavó secuencialmente con 110 ml de hexanos, 150 ml de 90:10 hexanos:EtOAc para proporcionar 6-(*tert*-butiltio)-7-fluoroquinazolin-4-ol (44,5g, rendimiento 61,9 %) como un sólido oscuro. LC/MS: M+H = 253,2 ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,23 - 12,72 (m, 1 H), 8,24 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H), 8,19 (s, 1 H), 7,58 (d, *J*=9,6 Hz, 1 H), 1,28 (s, 9 H).

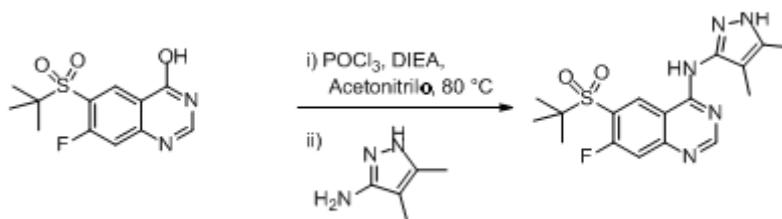
10

Etapa 2: 6-(*tert*-butilsulfonyl)-7-fluoroquinazolin-4-ol: Una suspensión de 6-(*tert*-butiltio)-7-fluoroquinazolin-4-ol (45 g, 124 mmol) y oxona (191 g, 311 mmol) en acetato de etilo (1.220 ml), metanol (1.220 ml), y agua (1.220 ml) se agitó durante 4 h a 25 °C, cuando se añadieron otros 25 g (2,8 eq en total) de oxona. La mezcla de reacción se agitó por agitador vertical durante 12 h. La reacción se filtró y el filtrado se basificó lentamente con bicarbonato de sodio acuoso saturado, después bicarbonato de sodio sólido, hasta pH~7,5. La mezcla se extrajo con 1,25 L adicionales de EtOAc seguido de 500 ml de EtOAc. Los orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron *in vacuo*. Se eliminó una pequeña impureza por trituración con 200 ml de EtOAc. El 6-(*tert*-butilsulfonyl)-7-fluoroquinazolin-4-ol deseado (33,2g, rendimiento 94 %) se recogió por filtración como un sólido amarillo. LC/MS: M+H = 285,2 ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,48 - 13,03 (m, s. a, 1 H), 8,47 (d, *J*=7,8 Hz, 1 H), 8,32 (s, 1 H), 7,73 (d, *J*=11,1 Hz, 1 H), 1,17 - 1,40 (s, 9 H).

20

25 Preparación 2

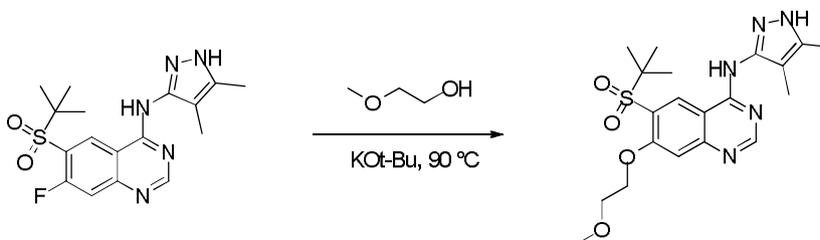
6-(*tert*-butilsulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-fluoroquinazolin-4-amina



A una disolución de 6-(*tert*-butilsulfonyl)-7-fluoroquinazolin-4-ol (4,14 g, 14,56 mmol) en acetonitrilo (42,7 ml) se añadió POCl₃ (2,036 ml, 21,84 mmol) y DIEA (3,81 ml, 21,84 mmol). La reacción se calentó a 80 °C toda la noche durante 16h. Se añadió POCl₃ adicional (500 ul) y la reacción se agitó a 80 °C durante 18h. La conversión completa a cloruro se observó por LCMS. Se añadió 4,5-Dimetil-1*H*-pirazol-3-amina (1,942 g, 17,47 mmol) y la reacción se agitó durante 1h a 80 °C. El precipitado se filtró, se lavó con acetonitrilo y se secó para rendir 6-(*tert*-butilsulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-fluoroquinazolin-4-amina, clorhidrato (4,15 g, 9,93 mmol, rendimiento 68,2 %). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,10 - 9,44 (m, 1 H) 8,88 (s. a., 1 H) 7,94 (d, *J*=10,36 Hz, 1 H) 2,23 (s, 3 H) 1,82 (s, 3 H) 1,24 - 1,45 (m, 9 H). MS (*m/z*) 378 (M+H)⁺.

10 Ejemplo 1

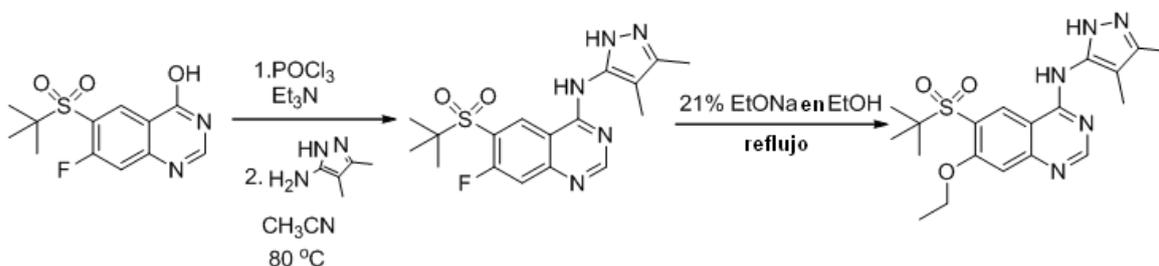
6-(*tert*-Butilsulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-(2-metoxietoxi)quinazolin-4-amina



Una mezcla de 6-(*tert*-butilsulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-fluoroquinazolin-4-amina, clorhidrato (300 mg, 0,73 mmol), 2-metoxietanol (5,7 ml, 73 mmol) y KOtBu (410 mg, 3,6 mmol) se calentó a 90 °C durante 4 d. La reacción se concentró a sequedad, se cargó en seco en gel de sílice y se purificó por cromatografía en columna (ISCO-Rf, 0-25 % metanol (con 1 % NH₄OH)/acetato de etilo para rendir 6-(*tert*-butilsulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-(2-metoxietoxi)quinazolin-4-amina (230 mg, 0,531 mmol, rendimiento 73,2 %) como un sólido amarillo. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,19 (s, 1 H), 10,36 (s, 1 H), 8,99 (s, 1 H), 8,45 (s, 1 H), 7,34 (s, 1 H), 4,26 - 4,42 (m, 2 H), 3,73 (t, *J*=4,4 Hz, 2 H), 3,34 (s, 3 H), 2,18 (s, 3 H), 1,74 (s, 3 H), 1,33 (s, 9 H). MS (*m/z*) 434.

20 Ejemplo 2

6-(*tert*-Butilsulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-etoxiquinazolin-4-amina



Etapa 1: 6-(*tert*-butilsulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-fluoroquinazolin-4-amina: A una suspensión de 6-(*tert*-butilsulfonyl)-7-fluoroquinazolin-4-ol (5,50 g, 19,35 mmol) en acetonitrilo (48 ml) se añadió POCl₃ (2,70 ml, 29,0 mmol) y TEA (4,0 ml, 29 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 80 °C toda la noche. Se añadió 4,5-Dimetil-1*H*-pirazol-3-amina (2,58 g, 23,2 mmol) a la disolución, y la mezcla de reacción se continuó agitando a 80 °C durante 1 h. Un sólido empezó a precipitar. Se dejó que la mezcla de reacción se enfriara hasta temperatura ambiente. El sólido se filtró y se lavó con acetonitrilo frío. El sólido se secó en un horno con vacío para proporcionar 6-(*tert*-butilsulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-fluoroquinazolin-4-amina, clorhidrato (4,91 g, 11,86 mmol, rendimiento 61,3 %). (M+H)⁺ 378,2.

Etapa 2: 6-(*tert*-butilsulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-etoxiquinazolin-4-amina: Se combinaron etóxido de sodio (24 ml, 65,6 mmol, 21 % en EtOH) y 6-(*tert*-butilsulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-fluoroquinazolin-4-amina, clorhidrato (4,80 g, 11,60 mmol) y la suspensión se calentó a 80 °C durante 2 horas. Se dejó que la mezcla

de reacción se enfriara hasta temperatura ambiente. El EtOH se evaporó y el residuo se disolvió en 25 ml de agua. La disolución se neutralizó hasta pH~9 añadiendo 1N HCl. Un sólido amarillo claro precipitó. El sólido se filtró, se lavó con agua y se secó en un horno con vacío toda la noche para proporcionar 6-(*terc*-butil sulfonil)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-etoxiquinazolin-4-amina (3,90 g, 9,67 mmol, rendimiento 83 %). (M+H)⁺ 404,1; ¹H RMN (DMSO-d₆, 400MHz): δ = 12,20 (s, 1 H), 10,36 (s, 1 H), 8,99 (s, 1 H), 8,46 (s, 1 H), 7,30 (s, 1 H), 4,13 – 4,34 (m, 2 H), 2,18 (s, 3 H), 1,74 (s, 3 H), 1,40 (t, *J*=6,9 Hz, 3 H), 1,33 ppm (s, 9 H).

Una muestra de 6-(*terc*-butil sulfonil)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-etoxiquinazolin-4-amina (120 g) se suspendió en EtOH (2.000ml) y se calentó hasta 70 °C. Se añadió EtOH adicional (2.000ml) y la mezcla resultante se calentó a reflujo. La mayor parte del sólido se disolvió en el disolvente. La suspensión caliente se filtró y la disolución se vertió en 12 L de agua fría. Esta mezcla se agitó durante aproximadamente 60 min y se dejó permanecer toda la noche mientras el baño se calentaba hasta RT. Se aisló un precipitado amarillo claro por filtración y se secó en un horno con vacío para rendir 105,9 g (261 mmol, recuperación del 88 %) de 6-(*terc*-butil sulfonil)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-etoxiquinazolin-4-amina cristalina, que se caracteriza por el patrón PXRD de la Figura 1 y los datos de difracción de la Tabla 1.

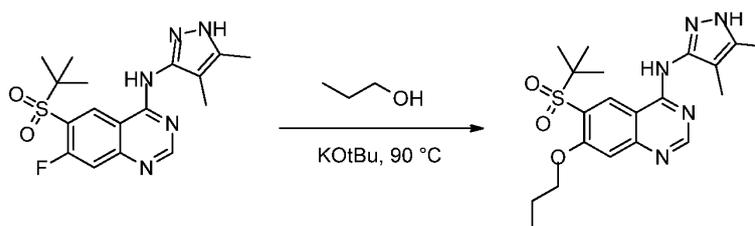
El análisis de PXRD se realizó en un Difractómetro de rayos X Rigaku Desktop, modelo Miniflex II, número de serie DD02652 usando un detector de Centelleo NaI (TI). Las condiciones de adquisición incluyeron: radiación Cu K_α (λ = 1,54059 Å), voltaje del generador: 30kV, corriente del generador: 15mA, ángulo de partida: 3,0°2θ, ángulo final: 40,0°2θ, tamaño de paso: 0,04°2θ, tiempo por paso: 0,5 segundos. La muestra se preparó usando la técnica de fondo cero ("front fill").

Tabla 1.

Ángulo de Difracción (°2θ)	d-espaciado [Å]	Intensidad Relativa [%]
8,49	0,118	26,2
9,35	0,157	14,2
9,84	0,118	27,0
11,03	0,157	9,2
12,26	0,118	4,3
12,87	0,157	14,9
14,18	0,157	14,7
15,47	0,157	3,7
16,95	0,157	100,0
17,33	0,157	14,8
17,75	0,157	5,4
18,24	0,197	12,0
18,61	0,157	6,2
19,51	0,157	7,7
20,03	0,118	3,9
21,17	0,157	10,4
21,93	0,197	17,6
22,59	0,157	6,8
22,96	0,157	8,0
23,95	0,197	6,2
25,83	0,157	2,3
26,57	0,118	5,1
28,05	0,157	16,6
28,97	0,157	7,1
30,51	0,157	7,7
31,17	0,157	2,3
32,81	0,197	2,7
33,38	0,236	2,6
34,36	0,236	1,1

(continuación)

Ángulo de Difracción (°2θ)	d-espaciado [Å]	Intensidad Relativa [%]
36,25	0,236	1,9
36,90	0,236	1,6
38,71	0,197	2,3

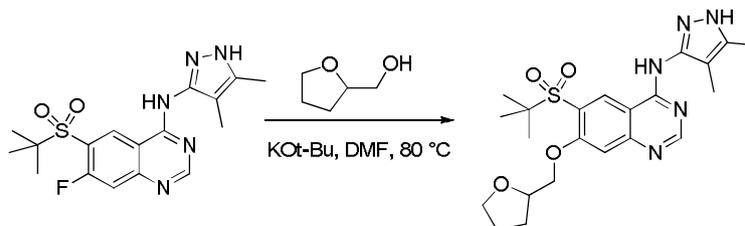
Ejemplo 36-(*tert*-Butilsulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-propoxiquinazolin-4-amina

5

Una mezcla de 6-(*tert*-butilsulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-fluoroquinazolin-4-amina (1,5 g, 3,97 mmol), propan-1-ol (17,85 ml, 238 mmol) y KOtBu (2,230 g, 19,87 mmol) se calentó a 90°C durante 21h. La reacción se vertió en éter - la disolución se volvió turbia - sin precipitado. La mezcla se neutralizó con ácido cítrico y se extrajo con EtOAc (1x) y 2-MeTHF (1x). Los orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron a sequedad para rendir producto crudo que se purificó por HPLC (10-50 % ACN/agua, 0,1 % TFA). Las fracciones que contenían producto se repartieron entre EtOAc y bicarbonato de sodio sat., se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron a sequedad. El residuo resultante se trituró con EtOAc y se filtró para rendir 6-(*tert*-butilsulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-propoxiquinazolin-4-amina (280 mg, 0,671 mmol, rendimiento 16,87 %) como un sólido blanco. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,19 (s, 1 H) 10,36 (s, 1 H) 8,99 (s, 1 H) 8,45 (s, 1 H) 7,29 (s, 1 H) 4,17 (t, *J*=6,19 Hz, 2 H) 2,18 (s, 3 H) 1,76 - 1,84 (m, 2 H) 1,74 (s, 3 H) 1,26 - 1,37 (m, 9 H) 1,07 (t, *J*=7,45 Hz, 3 H). MS (*m/z*) 418,3 (M+H)⁺

10

15

Ejemplo 46-(*tert*-Butilsulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-((tetrahidrofuran-2-il)metoxi)quinazolin-4-amina

A una disolución de (tetrahidrofuran-2-il)metanol (148 mg, 1,45 mmol) en DMF (1 ml) se añadió KOtBu (163 mg, 1,45 mmol). La disolución se agitó a temp ambiente durante 5 min. Se añadió 6-(*tert*-butilsulfonyl)-7-cloro-*N*-(4,5-dimetil-1*H*pirazol-3-il) quinazolin-4-amina (30 mg, 0,076 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 80 °C toda la noche. La mayor parte del DMF se eliminó *in vacuo*. El material crudo se purificó con una columna biotage (0 a 16 % MeOH/DCM) para proporcionar 6-(*tert*-butilsulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-((tetrahidrofuran-2-il)metoxi)quinazolin-4-amina (40 mg, 0,084 mmol, rendimiento 35 %). ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ: 12,19 (s. a., 1H), 10,36 (s. a., 1H), 8,99 (s, 1H), 8,45 (s, 1H), 7,34 (s, 1H), 4,21 (m, 3H), 3,77 - 3,87 (m, 1H), 3,65 - 3,76 (m, 1H), 2,18 (s, 3H), 2,00 (m, 2H), 1,79 - 1,90 (m, 2H), 1,75 (s, 3H), 1,32 (s, 9H). MS (*m/z*) 460.

20

25

Composiciones Farmacéuticas

Ejemplo A

Se preparan comprimidos usando procedimientos convencionales y se formulan como sigue:

30

Ingrediente	Cantidad por comprimido
Compuesto	5 mg
Celulosa microcristalina	100 mg
Lactosa	100 mg

(continuación)

Ingrediente	Cantidad por comprimido
Glicolato sódico de almidón	30 mg
Estearato de magnesio	2 mg
Total	237 mg

Ejemplo B

Se preparan cápsulas usando procedimientos convencionales y se formulan como sigue:

Ingrediente	Cantidad por comprimido
Compuesto	15 mg
Almidón seco	178 mg
Estearato de magnesio	2 mg
Total	195 mg

5

Ensayo Biológico:

Se desarrolló un ensayo de unión basado en polarización fluorescente para cuantificar la interacción de compuestos nuevos de ensayo al bolsillo de unión de ATP de RIPK2, por competición con un ligando competitivo ATP marcado con fluorescencia. Se purificó RIPK2 de longitud completa con etiqueta FLAG His a partir de un sistema de expresión de Baculovirus y se usó a una concentración final en el ensayo de dos veces la KD aparente. Se usó un ligando marcado con fluorescencia (ácido (5-({[2-({[3-({[4-[(5-hidroxi-2-metilfenil)amino]-2-pirimidinil]amino)fenil]carbonil]amino)etil] amino)carbonil)-2-(6-hidroxi-3-oxo-3*H*-xanten-9-il)benzoico, preparado como se describe en WO2011/120025) a una concentración final en el ensayo de 5nM. Tanto la enzima como el ligando se prepararon en disoluciones en 50mM HEPES pH7,5, 150mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, y 1mM CHAPS. Los compuestos de ensayo se prepararon en 100 % DMSO y se dispensaron 100nL en pocillos individuales de una placa multipocillo. A continuación, se añadieron 5ul de RIPK2 a los compuestos de ensayo al doble de la concentración final del ensayo, y se incubó a rt durante 10 min. Después de la incubación, se añadieron 5ul de la disolución de ligando marcado con fluorescencia a cada reacción, al doble de la concentración final del ensayo, y se incubó a rt durante al menos 10 min. Finalmente, las muestras se leyeron en un instrumento capaz de medir la polarización fluorescente. La inhibición del compuesto de ensayo se expresó como porcentaje (%) de la inhibición de los controles internos del ensayo.

10

15

20

Para los experimentos de respuesta a la concentración/dosis, se ajustaron los datos normalizados y se determinaron las pCl₅₀ usando técnicas convencionales. Las pCl₅₀ se promedian para determinar un valor medio, para un mínimo de 2 experimentos.

Ejemplo No.	pCl ₅₀
1	7,4
2	7,8
3	7,9
4	8,0

25

El ensayo continuado resultó en un cambio ligero en la pCl₅₀ promedio indicada para el compuesto del Ejemplo 1 (7,5) y Ejemplo 3 (8,1).

Preparación de RIPK2 etiquetada con FLAG His:

30

Se adquirió el ADNc de RIPK2 humana de longitud completa (quinasa de serina-treonina que interacciona con receptor 2) en Invitrogen (Carlsbad, California, EEUU, Clon ID:IOH6368, RIPK2-pENTR 221). Se usó la clonación Gateway[®] LR para recombinar de manera específica de sitio RIPK2 en 3' de un FLAG-6His *N*-terminal contenido en el vector de destino pDEST8-FLAG-His6 según el protocolo descrito por Invitrogen. La transfección en células de insecto *Spodoptera frugiperda* (Sf9) se realizó usando Cellfectin[®] (Invitrogen), según el protocolo del fabricante.

35

Las células Sf9 se crecieron en medio de crecimiento Excell 420 (SAFC Biosciences, Lenexa, Kansas, EEUU; Andover, Hampshire Reino Unido) a 27°C, 80 rpm en matraz agitado hasta un volumen suficiente para inocular un bioreactor. Las células se crecieron en un bioreactor con un volumen de trabajo de 50 litros (Applikon, Foster City, California, EEUU; Schiedam, Holanda) a 27°C, 30 % oxígeno disuelto y una velocidad de agitación de 60-140 rpm

hasta que se consiguió el volumen requerido con una concentración celular de aproximadamente $3,7 \times 10^6$ células/ml. Las células de insecto se infectaron con Baculovirus a una multiplicidad de infección (MOI) de 12,7. El cultivo se continuó durante una fase de expresión de 43 horas. Las células infectadas se retiraron del medio de crecimiento por centrifugación a 2.500 g usando una centrifuga continua Viafuge (Carr) a una velocidad de flujo de 80 litros/hora. El sedimento celular se congeló inmediatamente y se suministró posteriormente para purificación.

Procedimiento de Purificación I: Se re-suspendieron $9,83 \times 10^5$ células de insecto en 1,4 L de tampón de lisis (50mM Tris (pH 8,0), 150mM NaCl, 0,5mM NaF, 0,1 % Tritón X-100, 1ml/litro de Mezcla de Inhibidores de Proteasas Conjunto III (disponible en EMD Group; CalBiochem/Merck Biosciences, Gibbstown, New Jersey, EEUU; Damstadt, Alemania) y se procesaron por homogeneización dounce en hielo. La suspensión se aclaró por centrifugación a 47.900g durante 2 h, a 4°C. El lisado se decantó del sedimento insoluble y se cargó a una velocidad de flujo lineal de 16 cm/h en una columna de afinidad de 55 ml FLAG-M2 (2,6 x 10,4 cm) que se había pre-equilibrado con 10 volúmenes de columna de tampón A (50mM Tris (pH 8,0), 150mM NaCl, 0,5mM NaF, 1ml/litro de Mezcla de Inhibidores de Proteasas Conjunto III). La columna se lavó con 15 volúmenes de columna de tampón A, y se eluyó con 6 volúmenes de columna de tampón B (tampón A + 150µg/ml péptido 3X FLAG) a una velocidad de flujo lineal de 57 cm/h. Las fracciones que se identificó por SDS-PAGE que contenían proteína de interés se dializaron para eliminar el péptido 3X FLAG de la preparación frente a 5 L de Tampón A (que no contenía Mezcla de Inhibidores de Proteasas) toda la noche, usando Un sistema de tubos de diálisis plegado de 10 kDa MWCO SnakeSkin. El procedimiento de purificación rindió 11,3 mg de proteína total, con la RIPK2 presente con un 40 % de pureza por escaneo de densitometría del gel y con identidad confirmada por huella de masa peptídica. Las principales proteínas contaminantes en la preparación se identificaron como especies degradadas de menor peso molecular de RIPK2.

Procedimiento de Purificación II: 100g de células (fermentación a escala de 10 litros) se congelaron, descongelaron y re-suspendieron en 1L de tampón de lisis (50mM Tris HCL pH7,5, 250 mM NaCl, 0,1mM TCEP, 3ml Mezcla de inhibidores de proteasas) y se lisaron por homogeneización con alta presión a 10.000 psi una vez (Avestin). La suspensión se aclaró por centrifugación a 35.000g durante 45 minutos a 4°C. El sobrenadante se recogió por centrifugación y se incubó con 5 ml de resina anti-FLAG-M2 que se pre-equilibró con tampón A (50mM Tris HCL pH7,5, 250 mM NaCl, 0,1mM TCEP). Después de la unión de proteínas a 4°C grados durante 1 hora, la resina se empaquetó en dos columnas desechables de 25ml. Cada columna se lavó con 25ml de tampón A y se eluyó con 10ml (tampón A + 200ug/ml péptido Flag). El conjunto de la elución se concentró hasta 1ml y se aplicó en una columna para determinación de tamaño superdex 200 (16/60). Las fracciones que contenían RIPK2 de longitud completa se recogieron según los resultados del análisis de SDS-PAGE. El procedimiento de purificación rindió 1,36mg/L de proteína RIPK2 80 % pura y su identidad se confirmó por huella de masa peptídica.

Ensayo Biológico:

Se desarrolló un ensayo de producción de citoquinas en sangre completa humana estimulada por muramil dipéptido (MDP) para evaluar la potencia y eficacia celular de los nuevos compuestos de ensayo. Se dispensó sangre heparinizada (160 µL) obtenida de voluntarios humanos sanos en pocillos individuales de una placa multipocillo. Los compuestos de ensayo se disolvieron en 100 % DMSO y se diluyeron en D-PBS sin calcio ni magnesio para preparar disoluciones madre de trabajo 10x. Se añadieron veinte microlitros del compuesto de ensayo diluido por pocillo y las placas se pusieron en un agitador de placas (500 rpm) y se incubaron durante 30 min en un incubador humidificado (37°C, 5 % CO₂). Se preparó una preparación madre de trabajo 10x de MDP en agua estéril sin endotoxinas que contenía 1 % DMSO. Se añadieron veinte microlitros de la disolución madre de MDP por pocillo (conc.final = 100ng/ml) para estimular la producción de citoquinas dependiente de la quinasa RIP2. La concentración final de DMSO fue 0,1 % (v/v) en todos los pocillos. Las placas se incubaron durante 6 hr adicionales (como se ha indicado anteriormente). Se añadieron 100 µL adicionales de D-PBS (disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco)/pocillo, las placas se centrifugaron y se recogieron los sobrenadantes. Se cuantificaron los niveles de TNFα en los sobrenadantes usando un inmunoensayo comercial (MesoScale Discovery). La inhibición del compuesto de ensayo se expresó como porcentaje (%) de inhibición de los controles internos del ensayo. Para los experimentos de respuesta a la concentración/dosis, se ajustaron los datos normalizados y se determinaron las pCl₅₀ usando técnicas convencionales. Las pCl₅₀ se promediaron para determinar un valor medio, para un mínimo de 2 experimentos.

Ejemplo No.	pCl ₅₀
1	7,4
2	7,2
3	7,0
4	7,2

Ensayo Biológico *in vivo* - Inhibición de Respuesta Inflamatoria Inducida

La eficacia de los inhibidores de RIP2 también puede evaluarse *in vivo* en roedores. Se ha mostrado que la administración intraperitoneal (*i.p.*) o intravenosa (*i.v.*) de L18-MDP en ratones induce una respuesta inflamatoria

mediante la activación de la ruta de señalización NOD2 (Rosenweig, H. L., et al. 2008. Journal of Leukocyte Biology 84:529-536). El nivel de la respuesta inflamatoria en las ratas tratadas con L18-MDP se monitoriza usando técnicas convencionales midiendo incrementos en los niveles de una o más citoquinas (IL8, TNF α , IL6 e IL-1 β) en suero y/o fluido de lavado peritoneal y/o midiendo el influjo de neutrófilos en el espacio peritoneal (cuando L18-MDP se dosifica *i.p.*). La inhibición de la respuesta inflamatoria inducida por L18-MDP en ratas tratadas puede mostrarse por pre-dosificación oral con un compuesto de ensayo y midiendo y comparando los niveles de una o más citoquinas (IL8, TNF α , IL6 e IL-1 β) en suero frente a animales tratados control usando técnicas convencionales.

Por ejemplo, las ratas se pre-dosificaron oralmente con el compuesto del Ejemplo 2, 6-(*terc*-butil sulfonil)-N-(4,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)-7-etoxiquinazolin-4-amina, a dosis de 0, 0,04, 0,4 y 4 mg/kg, seguido de dosificación con L18-MDP (50 μ g/rata) 0,25 h/min después de la pre-dosificación. Los niveles de la citoquina IL8 en muestras de sangre completa tomadas de ratas en este estudio se midieron usando detección basada en anticuerpo (plataforma Meso-Scale Discovery). La respuesta de la citoquina IL8 se calculó como la respuesta promediada para cada nivel de dosis expresada respecto a la respuesta observada en las ratas tratadas con vehículo, y se representa en la Figura 2 como la media \pm error estándar de la media (n=8 ratas/grupo).

15 Ensayo Biológico *in vivo* - Preparación de Cuña Cardíaca de Conejo

Se anticoagularon conejos hembra que pesaban 2.2-3 kg con heparina y se anestesiaron con pentobarbital (50 mg/kg, *i.v.*). El pecho se abrió mediante una toracotomía izquierda y el corazón se escindió y se puso en una disolución cardioplégica que consiste en disolución de Tyrode normal fría (4°C). Se diseccionó una cuña transmural con dimensiones de aproximadamente 1,5 cm de ancho y 2-3 cm de largo del ventrículo izquierdo.

20 La cuña de tejido se canuló a través de la arteria descendente anterior izquierda o la arteria circunfleja y se perfundió con disolución cardioplégica. La preparación se puso en un baño tisular pequeño y se perfundió arterialmente con disolución de Tyrode (T: 35,7 \pm 0,1°C, presión de perfusión: 30-45 mmHg). Se dejó que la cuña ventricular se equilibrara en el baño tisular hasta que fue eléctricamente estable, habitualmente una hora. Las preparaciones se estimularon a longitudes de ciclo básicas (BCL) de 1.000 y 2.000 mseg usando electrodos de plata bipolares aislados excepto en las puntas y se aplicaron en la superficie endocárdica.

Se registró un electrocardiograma (ECG) transmural en todos los experimentos usando electrodos extracelulares de plata/cloruro de plata puestos en la disolución de Tyrode que baña la preparación 1,0 a 1,5 cm desde las superficies epicárdica y endocárdica, a lo largo del mismo vector que los registros transmembrana (Epi: polo "+"). En el ECG, la dispersión transmural de repolarización (TDR) se definió por el intervalo entre el final y el pico de la onda T (T_{p-e}). El intervalo QT se definió como el tiempo desde el inicio del QRS hasta el punto en el que la pendiente descendente final de la onda T cruzaba la línea isoeléctrica. Las duraciones de QRS, QT, y T_{p-e} se midieron durante 10 barridos y se promediaron por tratamiento. Los datos de la población total de animales se promedian por tratamiento, y se comparan con la media de los valores control.

35 La generación de la fuerza contráctil isométrica (%ICF) se mide durante 10 barridos y se promedia por tratamiento. Los datos de la población total de animales se promedian por tratamiento, y se comparan con la media de los valores control.

Cada compuesto de ensayo se preparó en 100 % DMSO a una concentración de preparación madre de 30 mM. El compuesto se diluyó hasta la mayor concentración ensayada en tampón de Tyrode (que contiene en mM: 129 NaCl, 4 KCl, 0,9 NaH₂PO₄, 20 NaHCO₃, 1,8 CaCl₂, 0,5 MgSO₄, y 5,5 glucosa, pH 7,4 cuando se tampona con 95 % O₂ y 5 % CO₂) a partir de la cual se prepararon diluciones seriadas posteriores.

45 Cada compuesto de ensayo se ensayó a 4 concentraciones, de 1 - 30 μ M. Después de que las preparaciones en cuña se perfundieran con disolución normal de Tyrode y se estimularan a una BCL de 1.000 mseg durante una hora, la frecuencia de estimulación se redujo hasta una BCL de 2.000 mseg durante un periodo de 5 minutos de estabilización después de lo cual se registraron ECG de línea base y fuerza contráctil isométrica (ICF). Las preparaciones se volvieron a una BCL de 1.000 mseg y se perfundieron con disolución de Tyrode que contiene un compuesto de ensayo. Para cada concentración de compuesto de ensayo, las preparaciones en cuña se perfundieron durante 20 minutos a una BCL de 1.000 mseg seguido de 5 minutos a una BCL de 2.000 mseg durante los cuales se registraron ECG e ICF. El compuesto del Ejemplo 2 (6-(*terc*-butil sulfonil)-N-(4,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)-7-etoxiquinazolin-4-amina) se evaluó en la preparación de cuña cardíaca de conejo. Las cuatro lecturas principales de la preparación de cuña incluyen prolongación de QT, torsadogenicidad (puntuación TdP derivada de QT, T_{p-e} y poco después de despolarizaciones), conducción del impulso (relacionada con QRS) y contractilidad, que se presentan en la Tabla 2.

55 Se usó un sistema de puntuación para la estimación del riesgo de un compuesto para el riesgo relativo TdP usando la preparación de cuña ventricular izquierda aislada de conejo: puntos para el intervalo QT, la proporción T_{p-e}/QT. La puntuación TdP se generó convirtiendo en primer lugar el intervalo QT y proporción T_{p-e}/QT a % de cambio desde la línea base. Estos valores se asignan individualmente a puntuación TdP basada en el sistema siguiente: <-5 % = -1, -5 % a 10 % = 0, 10 % a 20 % = 1, 20 % a 30 % = 2, >30 % = 3. El intervalo del sistema de puntuación total es -2 a 14 a BCL=2.000 ms.

Tabla 2. Datos resumen (media, n=2).

	Control	1 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M
QT (mseg)	335,5	346,4	351,9	348,8	348,8
Δ QT %		3	4,8	4,0	4,0
Tp-e (mseg)	70,8	71,9	73,2	68,4	69,1
QRS (mseg)	40,1	39,6	39,2	39,4	39,7
ICF (%cambio)		-4,4	-5,3	-15,1	-20,7
Proarritmia	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Puntuación TdP	0	-0,50	0,00	-0,50	-0,50
QT=intervalo QT, Tp-e=Dispersión transmural, ICF=Contractilidad.					

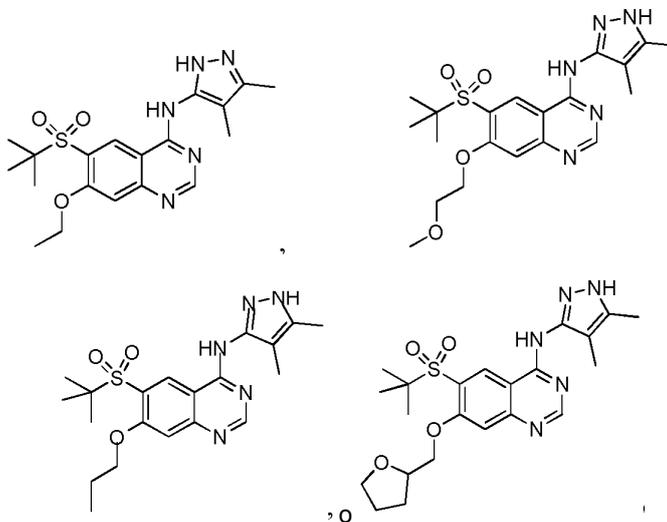
Selectividad de Quinoma

5 La selectividad de quinoma (como se realiza por Reaction Biology Corporation, One Great Valley Parkway, Malvern, PA, EEUU, 19355, <http://www.reactionbiology.com>) para el compuesto del Ejemplo 2 (6-(*terc*-butil sulfonil)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-etoxiquinazolin-4-amina) se determinó mediante la determinación de un perfil *in vitro* frente a un panel de quinasas de 337 miembros. A una concentración de 1 μ M, el compuesto del Ejemplo 2 demostró > 70 % de inhibición de 1 a 337 quinasas ensayadas y > 50 % de inhibición de 4 de 337 quinasas ensayadas.

10 Referencias: WO2011/120025, WO2011/120026, WO2011/123609, WO2011/140442, WO2012/021580, WO2012/122011, WO2013/025958

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula:



5 o una sal del mismo.

2. El compuesto de la reivindicación 1 que es 6-(*tert*-butilsulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-etoxiquinazolin-4-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. El compuesto de la reivindicación 2 que es 6-(*tert*-butilsulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-etoxiquinazolin-4-amina

10 4. Una composición farmacéutica que comprende 6-(*tert*-butilsulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-etoxiquinazolin-4-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4 que comprende 6-(*tert*-butilsulfonyl)-*N*-(4,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-il)-7-etoxiquinazolin-4-amina y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

15 6. El compuesto, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se define en la reivindicación para uso en terapia.

20 7. El compuesto, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se define en la reivindicación 2, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por la quinasa RIP2, en el que la enfermedad o trastorno se selecciona de uveítis, síndrome febril asociado a la enzima convertidora de interleucina-1, dermatitis, daño pulmonar agudo, diabetes mellitus tipo 2, artritis, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino precoz, enfermedad inflamatoria del intestino extraintestinal, prevención de daño por isquemia reperfusión en trasplante de órgano sólido, esteatohepatitis no alcohólica, esteatohepatitis alcohólica, hepatitis autoinmune, asma, enfermedad de injerto frente a hospedador, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, sarcoidosis, síndrome de Blau, sarcoidosis precoz, granulomatosis de Wegner, y enfermedad pulmonar intersticial.

25 8. El compuesto, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la enfermedad o trastorno se selecciona de uveítis, síndrome febril asociado a la enzima convertidora de interleucina-1, Síndrome de Blau, sarcoidosis precoz, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, granulomatosis de Wegener y sarcoidosis.

30

Figura 1

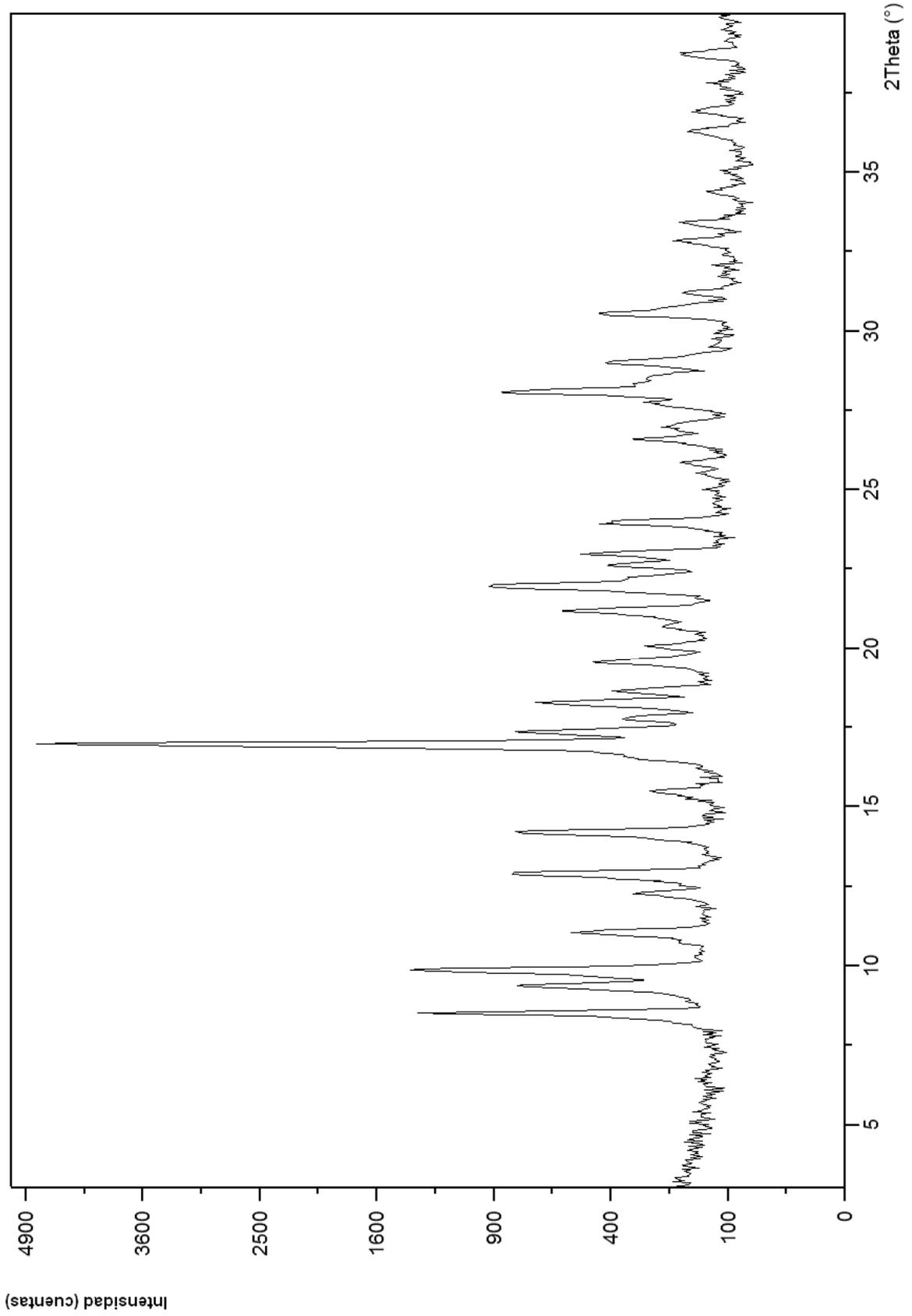


Figura 2

